

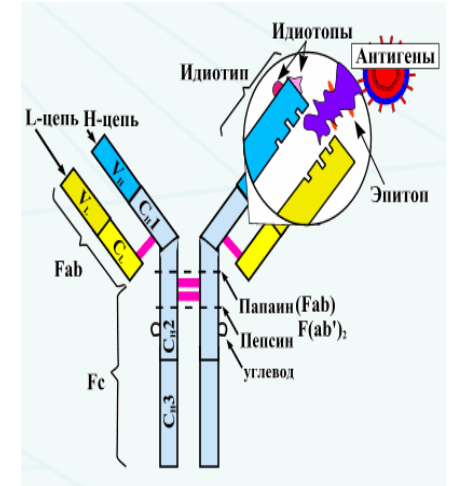
Тақырып: Гибридомалық технология

Жоспар:

Моноклоналды антиденелер қасиеттері

Гибридомаларды алу технологиясы

Моноклоналды антиденелерді практикада қолдану перспективалары



➤ МҚА қасиеттері

- ❑ Бір клоннан синтезделетін антиденелер (МҚА) **молекулалар класы бойынша, оның типі, спецификасы және авидтілігі** бойынша біркелі болып келеді.
- ❑ Олар бір ғана **антигенмен**, бір ғана **антигенді детерминантамен** әрекеттеседі. Алынған антиденелерді **диагностикалық және емдік** мақсатта қолданады.
- ❑ МҚА негізінде жасалған препараттарды: қан мен ұлпа белокатрына қарсы, спецификалық антигендерге қарсы, ісік клеткаларына қарсы, вирустар мен бактерияларға қарсы, паразиттер және көптеген химиялық қосылыстарға қарсы қолданылады.
- ❑ Әйте де поликлоналды антиделелерді алмастыра алмайды.

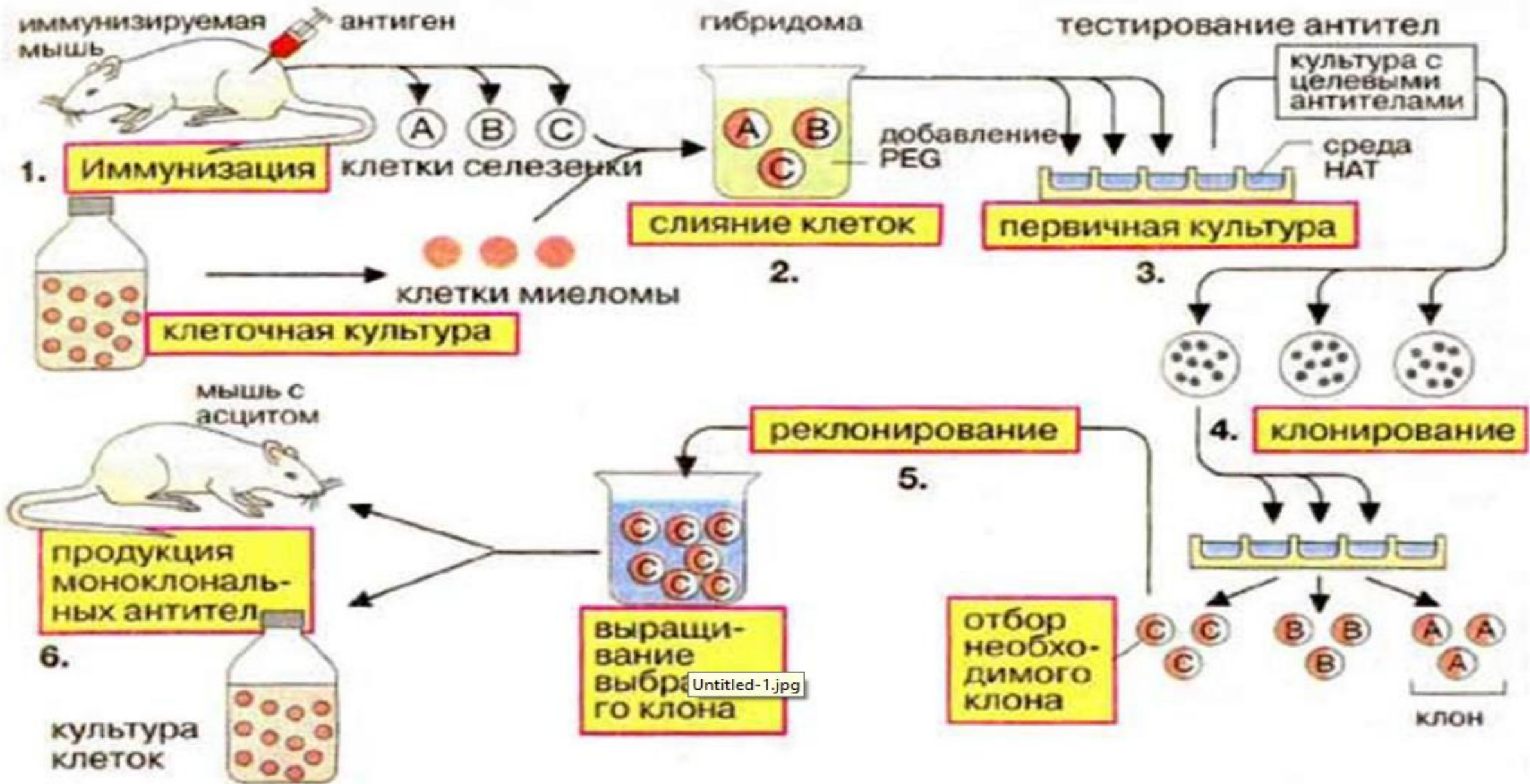
➤ Поликлоналды сарсу қасиеттері

- Денатурацияға ұшыраған антигенге қарсы, мутацияланған антигенге қарсы қоладнылады

➤ Гибридомаларды алу

- МКА өндіретін гибридомаларды алу сатылары:

1. Жануарларды иммунизациялау,
2. Клеткаларды құйылыстыруға дайындау,
3. Клеткаларды құйылыстыру,
4. Спецификалық антиденелерді өндіруші клондарды сұрыптау,
5. Клондау және реклондау,
6. Гибридомалар синтездеген антиденелерді анықтау,
7. Моноклоналды антиденелерді көбейту. Антиденелер бар культуралық сұйықтықтан немесе асцит алу,
8. Антиденелерді бөліп алу және тазарту.



Будандастыру нұсқасы



Инъекция антигена (A)



Взятие крови или иммунных спленоцитов

Инъекции антигена (A) проводят несколько раз с интервалом в несколько недель с целью стимуляции продукции В-лимфоцитами специфических иммуноглобулинов



График, показывающий титр анти-А-антител, продуцируемых В-лимфоцитами с течением времени

➤ **In vitro- жағдайында иммунизациялау әдісінің артықшылықтары:**

1. Иммунизациялау мерзімі 4-5 тәулікке қысқарады,
 2. Антиген мөлгері аз кетеді,
 3. Көптеген антигендерге айқын көрінетін иммунді жауап алу мүмкіндігі,
 4. Жауап беретін клеткалар үлесі жоғарылайды,
 5. Иммунитет тиімділігіне әсер ететін факторларды оңай айқындау мүмкіндігі
- **Кемшілігі: LgM- түзетін клондар үлесі артады.**

- Клеткаларды құйылыстыру

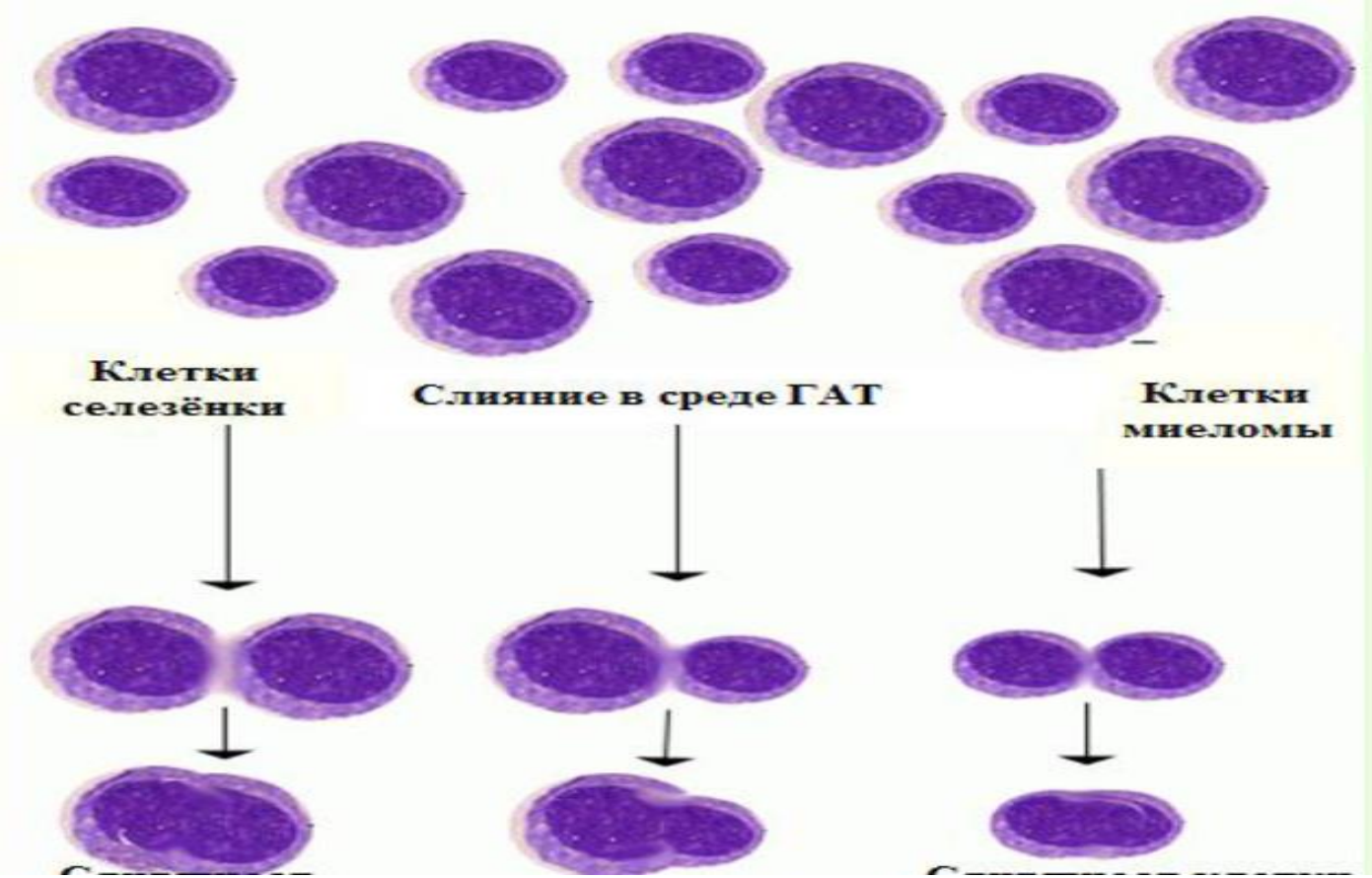
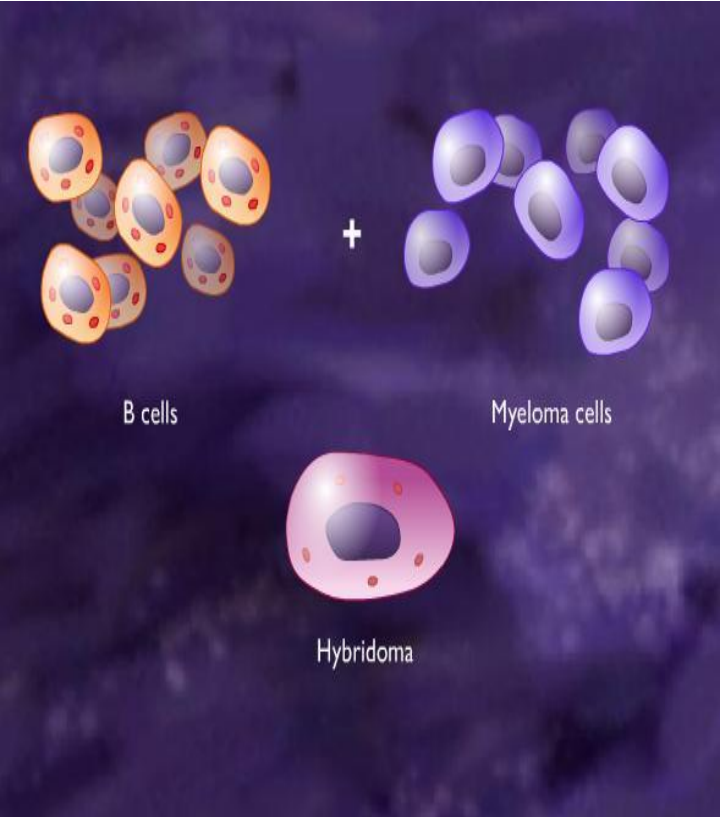
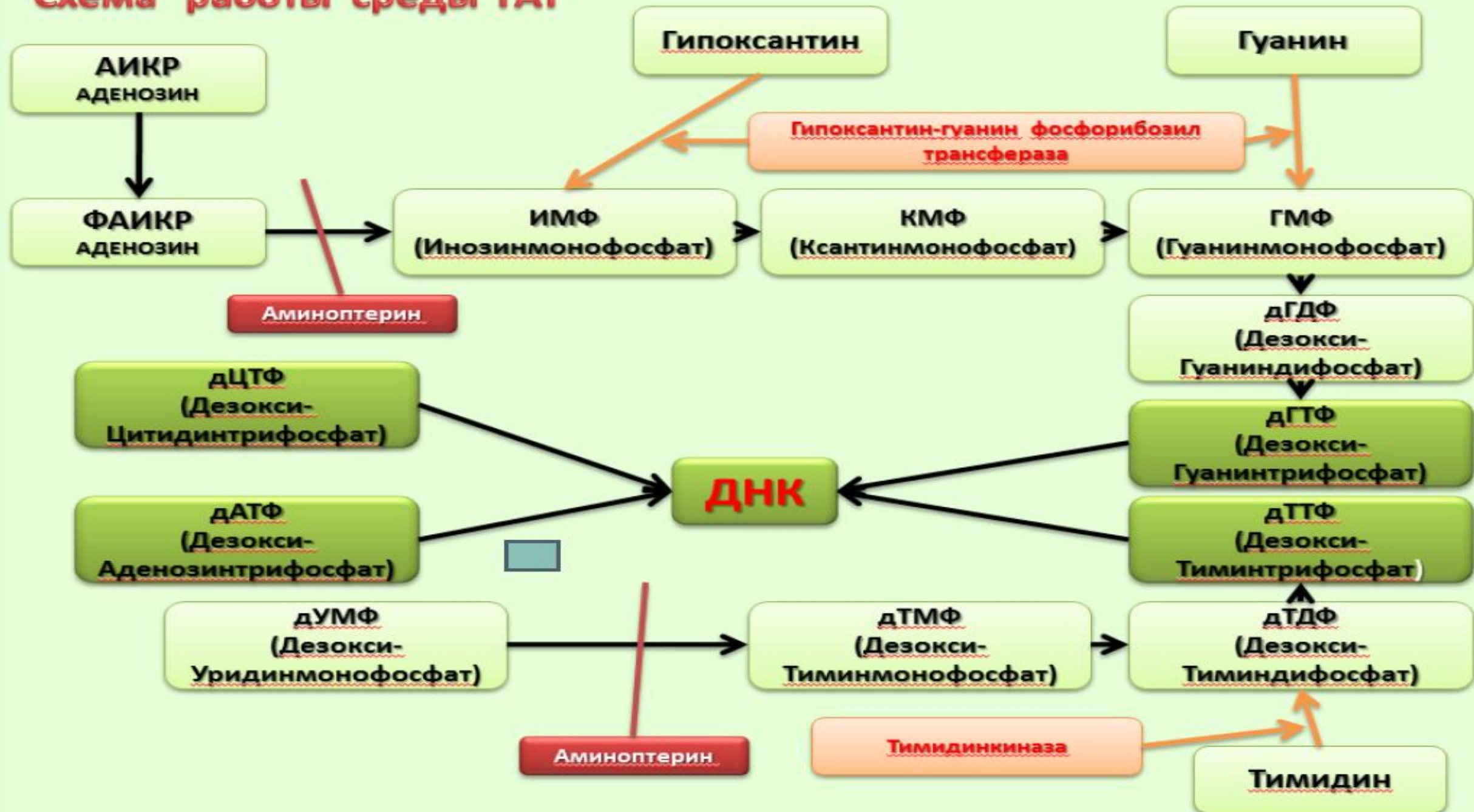
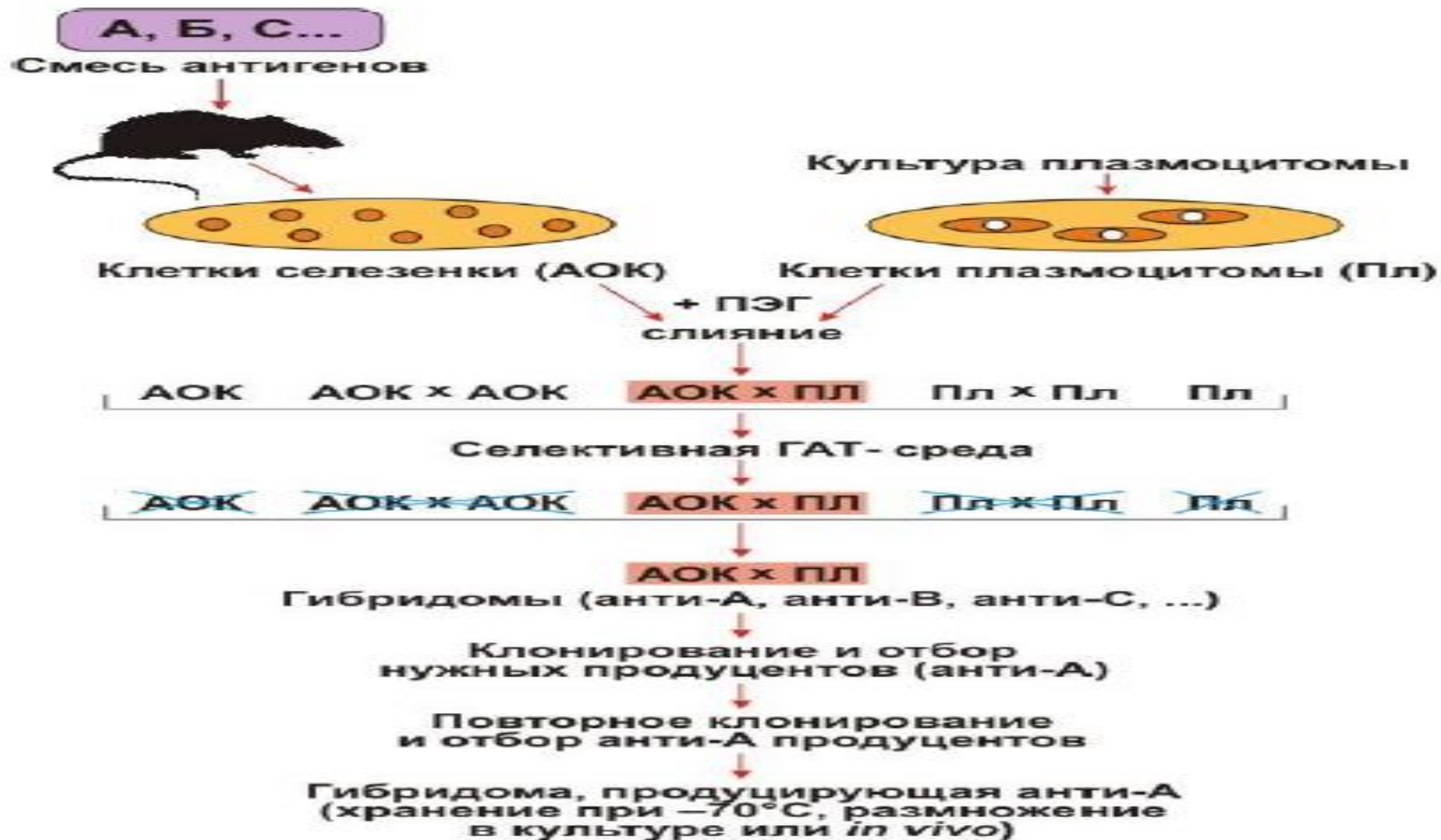


Схема работы среды ГАТ





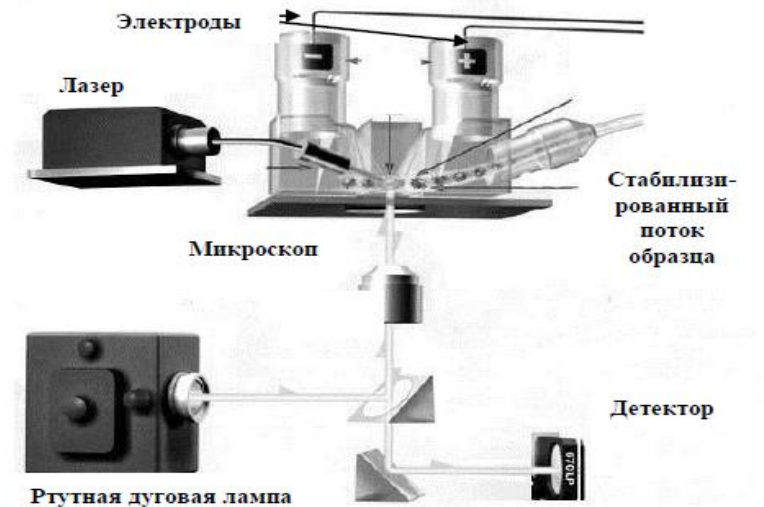
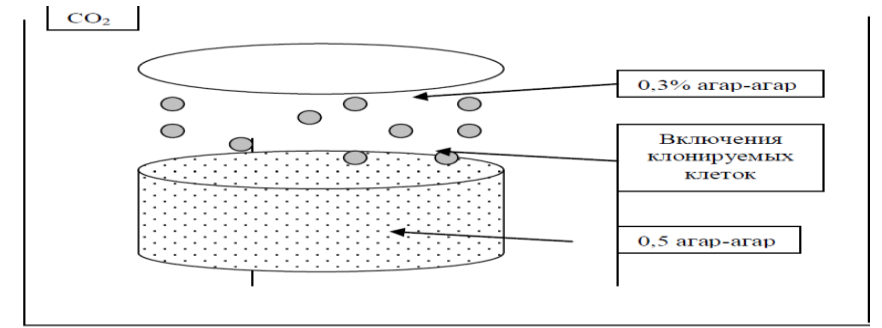
- Бірегей антиденелерді өндіретін клондарды сұрыптау
- Серологиялық және иммунологиялық әдістер:
 - иммуноферментті,
 - радиоиммунды,
 - иммундықфлюоресцентті,
 - қатты фазалы иммуноферментті анализ (ТИФА),
 - стафилакок Cowan –ның А белогымен агглютинациялау,
 - РПГА,
 - гельде локалды гемолиз,
 - цитологиялық анализ т.б.

Клондау және реклондау

- Бір клеткадан клон популяциясын алу

➤ Тұрақты клеткалық клон алу үшін қолданылатын әдістер:

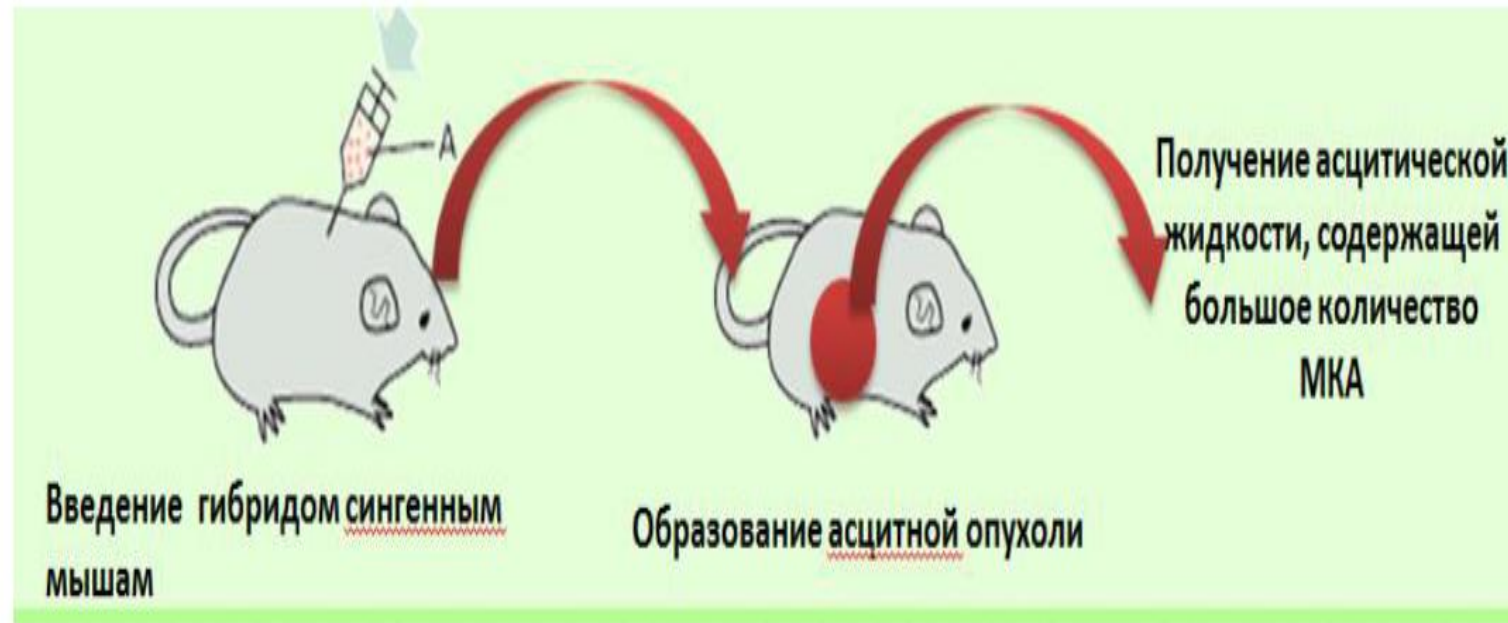
1. Лимитті сұйылту арқылы клондау,
2. Жартылай сұйық агар - агарда клондау
3. Ағынды цитофлуориметр көмегімен клондау



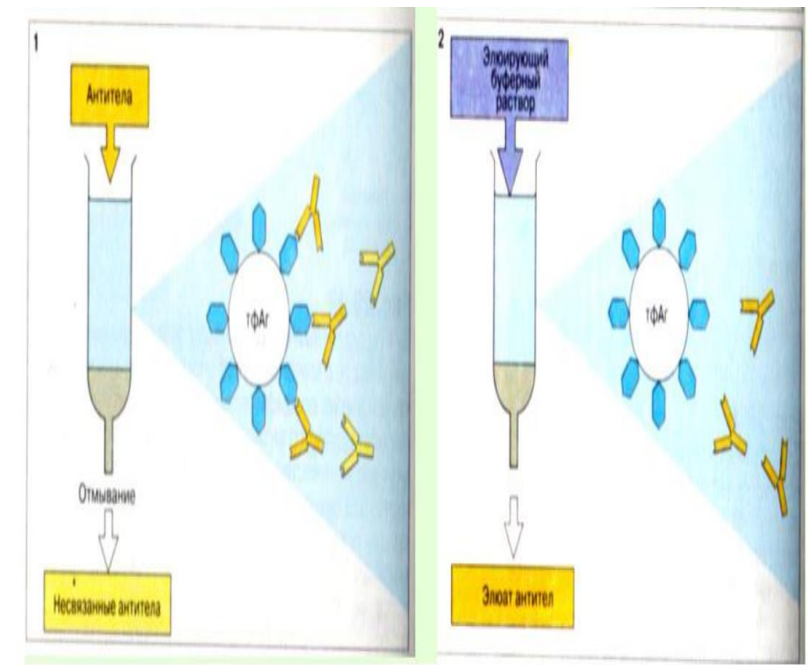
- Моноклоналды антиденелерді **жаппай** көбейту.

1. In vitro жағдайында алынған культуралық сұйықтықта МКА **10-100 мкг/мл**

2. Сингенді тышқандарға егу негізінде асцитті ісік пайда болады, 10 мл сұйықтық алу мүмкіндігі болады. **5-20 мг/мл**



- Антиденелерді бөліп алу және тазарту
 - ✓ Аммоний сульфатымен диализдеу
 - ✓ Ухтерлони әдісімен бөліп алу.
 - ✓ Иммуносорбенттерде бөліп алады.
 - ✓ Аффинді хроматография
 - ✓ Ионалмастырғыш хроматография



Аффинді хроматография әдісі

- Бірегей клеткалық линиялар мен гибридомалар туралы мәліметтерді сақтайтын банк базасы құрылған **CSIB – cell source information bank**, 1977 ж.
- **Гибридомалар** туралы мәліметтер сақталатын банк базасы **CODATA –IUIS** – ғылыми және технологиялық мәліметтерді сақтайтын Халықаралық ұйым, сонымен қатар, оның құрамына басқа да мекемелер кіреді:
 - ✓ Ғылым мен техника мәліметтерін жинайтын комиссия , Франция - **MIDST**,
 - ✓ Физикалық және химиялық зерттеулер институты, Жапония -RIKEN,
 - ✓ Ғылыми зерттеулер қоры, Швейцария
 - ✓ Медициналық зерттеулер кеңесі, мен мемлекеттік денсаулық сақтау институты Ұлыбритания ,Тағамдық өнімдер сапасын бақылау мекемесі – **NIAID, NIDR, NIGMS, NCI,DDR**
 - ✓ Микробиологиялық мәліметтер банкі - **MIRDAB**
 - ✓ Организмдердің клеткалары туралы мәліметтер банкі – **Excerpta Medica**

- **Моноклоналды антиденелерді қолдану:**

- Агглютинация реакциясы** (цоликон) эритроциттердің агглютиногендерін анықтау, эритроцит типирование, қан тобын анықтау,

- Иммунофлуоресценция ИФА** (пероксидаза)

- Ағынды цитометрия** (лазер сәулесі арқылы клетка суспензиясының ағынын өткізу арқылы клеткалардың оптикалық өлшемдері алынады), флуоресцентті антидене немесе флуоресценді бояулар, флуорохром қолданылады.

- Радиоиммунды анализ**

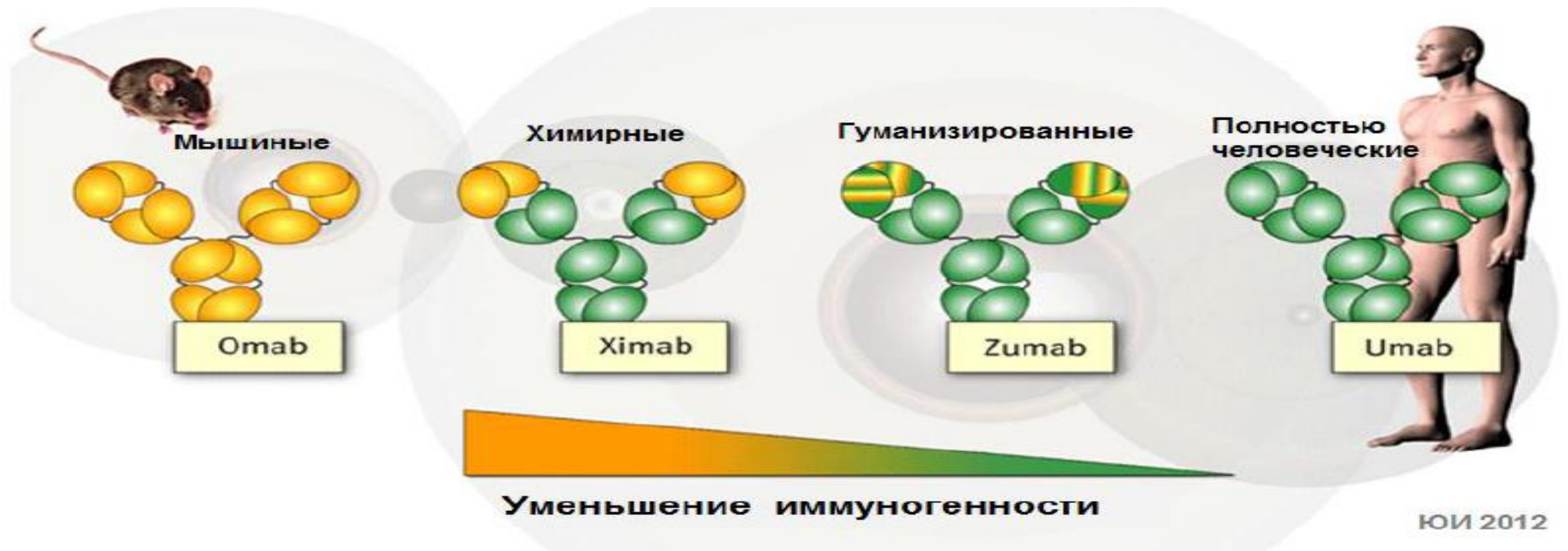
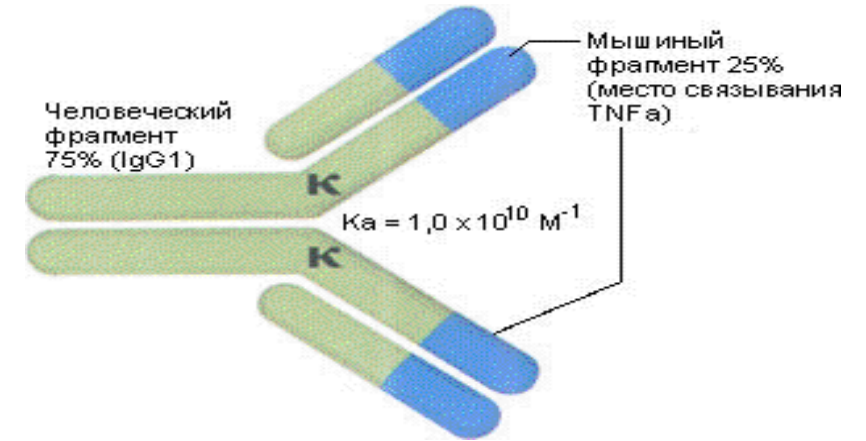
- Иммунды хроматография**

- Терапевтік МКА қолдану** (рекомбинантты ДНҚ технологиясы негізінде тышқандардың клеткаларында адам андитенелерінің Fc- фрагменті бар **химералық антиденелер** алу, оның құрамы **65%- адам иммуноглобулинінен** тұрады), оларды онкологиялық және иммундық ауруларға қарсы қолдану.

Гуманизацияланған антиденелерді алу (95% - адам иммуноглобулинінен ұрады),

толық адам иммуноглобулинінен тұратын трансгенді технология жасалған.

- МКА атауларының соңы «**mab**» аяқталады, - **monoclonal antibody**
- Тышқан МКА -«**-omab**»
- Химералық МКА -«**-ximab**»
- Гуманизацияланған антидене -«**-zumab**»
- Адам МКА -«**-umab**»



➤ МКА негізінде жасалған препараттар

1. Herceptin (сүт безі рагында қолданылады) «trastuzumab».
2. Rituxan, В-клеткалық лимфоманы емдеуге қолданылады, «rituximab»

Rituxan/MabThera u Remicade –фармацевтік индустриядағы Топ-5 блокбастерлер.

3. Трастузумаб (Trastuzumab, Герцептин) - сүт безі обыры клеткаларының рецептором HER2 рецепторларымен (эпидермалды өсу факторын қоздыратын) байланысады, гуманизацияланған МКА.

4. Ритуксимаб (Ритуксан, Мабтера) – В-клеткалық лимфома клеткаларына қарсы қолданылады, CD20+ антигенмен байланысады, аутоиммунды ауруларға қарсы қолданылады. Химералық МКА б.т.

5. Алемтузумаб (Кампат, Кэмпас, Campath) – гуманизацияланған МКА, CD52 антигенмен байланысады, созылмалы лимфолейкозға қарсы қолданылады.

6. Радиоиммунотоксиндер, анти–CD20 антиденеге негізделген, радиоактивті изотоптар бар, лимфоманы емдеуге арналған.

7. РЕМИКЕЙД (инфликсимаб) - Infliximab (REMICADE®), қабыну процестерін емдеуге арналған МКА, қабынуға қатысатын цитокинді тежейді, ісік некроз факторына (tumor necrosis factor alpha - TNF-alpha) тежейді, TNF ревматоидті артрит, псориаз тудырады. Крон ауруына қарсы қолданылады.

8. Адалimumаб (Хумира) – адамның рекомбинантты МКА. Ревматоидті артритті емдеуге қолданылады.

9. Этанерцепт (Etanercept, Энбрел) – Рекомбинантты белокты МКА, Ревматоидті артриттің бастапқы сатыларында емдеуге қолданылады

10. Anakinra (Kineret) рекомбинантты еритін ИЛ–1 антоганисті, РА емдеуге қолданылады.

11. Tysabri (natalizumab) – VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$ -integrin) рецепторлардың адгезиясын бұғаттайды, склероз және Крон ауруына қарсы қолданылады.

12. Цетуксимаб (Эрбитукс) — химерное МкАТ, эпидермалды өсу факторының (EGFR) рецепторын тежейді, ісіктің өсуін тоқтатады.