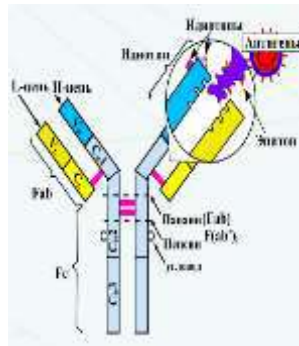


Тақырып: Гибридомдық технология және моноклоналды антиденелерді алу

Жоспар:

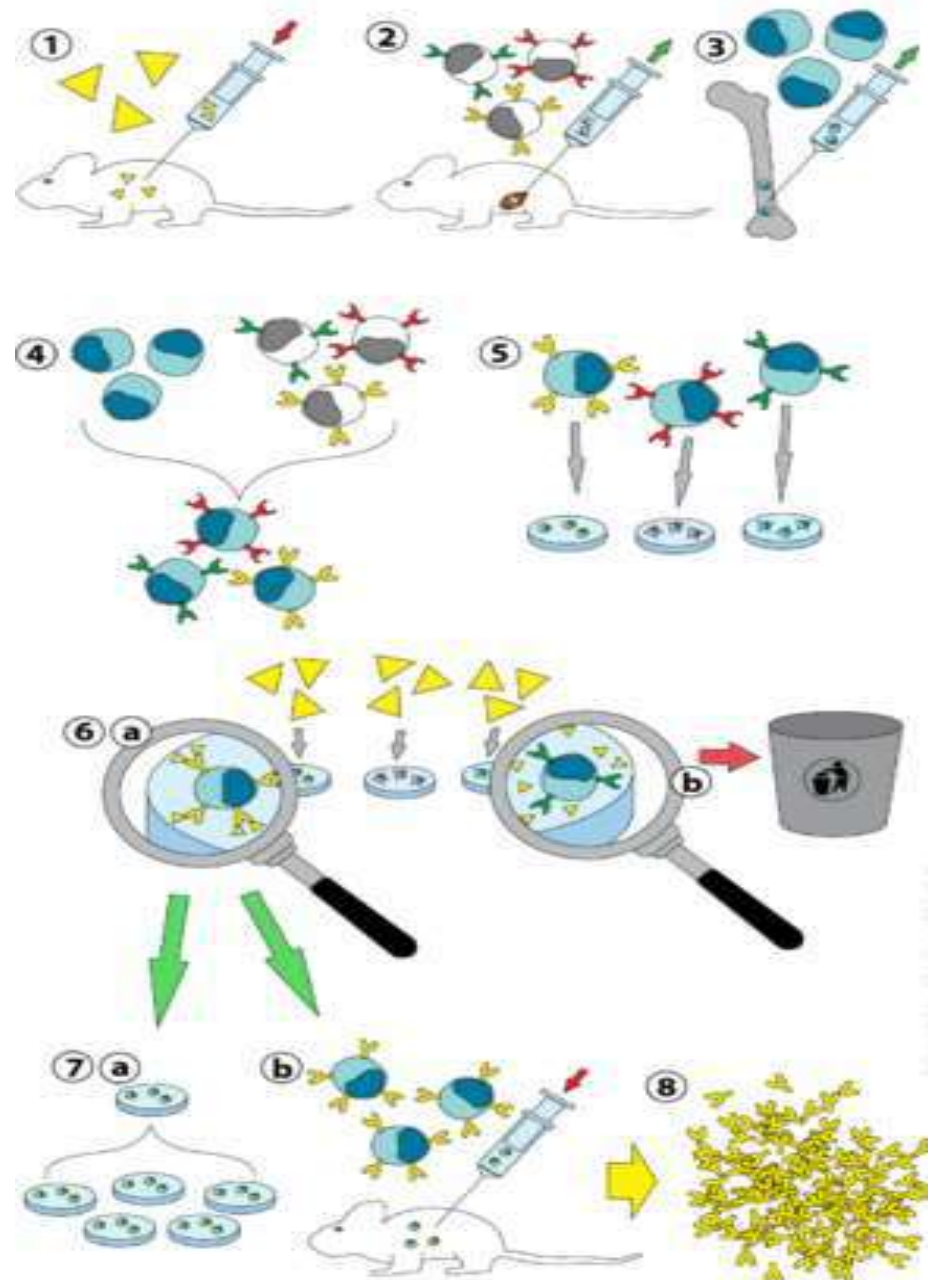


Моноклоналды антиденелер

Гибридомаларды алу технологиясы

Гибридомалардың банк базасы

Моноклоналды антиденелерді практикада қолдану перспективалары



Гибридомалық технология негізінде моноклоналды антиденелерді (МКА) алу әдістерін ұсынған ғалымдар, 1975 ж.



Жорж Кёлер, Сезар Мильштейн и Ниелс К. Джерне

➤ Иммунизацияланған жануарлардан бөліп алынған қалыпты **лимфоциттерді** жасанды ортада өсірілген **миеломды** клеткалармен будандастыру негізінде **гибридомаларды** алу технологиясын жасады.

➤ Будандастыруға **гипоксантинфосфорибозилтрансфераза** ферменті жоқ штамм қолданылған. Құрамында **гипоксантин, аминоптерин, тимидин** бар **селективті ГАТ ортасында** будандаспаған штамм клеткалары тіршілігін жояды. Ал лимфоциттер тіршілігін жалғастырады.

➤ Будандастыруға қоректік ортаға **ПЭГ** қосылған. Нәтижесінде гибридома лимфоцит клеткасынан белгілі бір антидене синтездеуге және ГАТ ортасында тірі қалу қасиетін алады, ал миеломды штамнан *in vitro* жағдайында шексіз көбею қасиетіне ие болады.

➤ Гибридомалық клондар көбейтуге болады.

➤ МКА қасиеттері

- ❑ Бір клоннан синтезделетін антиденелер (МКА) **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.
- ❑ МКА 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

➤ Клеткаларды құйылыстыру механизмі. 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.

➤ **I САТЫ.** Иммунизацияланған жануардың көк бауырынан **спленоциттерді** алу.

❑ **Иммунизациялаудың мақсаты:** белгілі бір антигенге қарсы антидененің түрін өндіретін клеткалардың санын арттыру және оларды құйылысуға қабілетті функцияналдық күйге жеткізу.

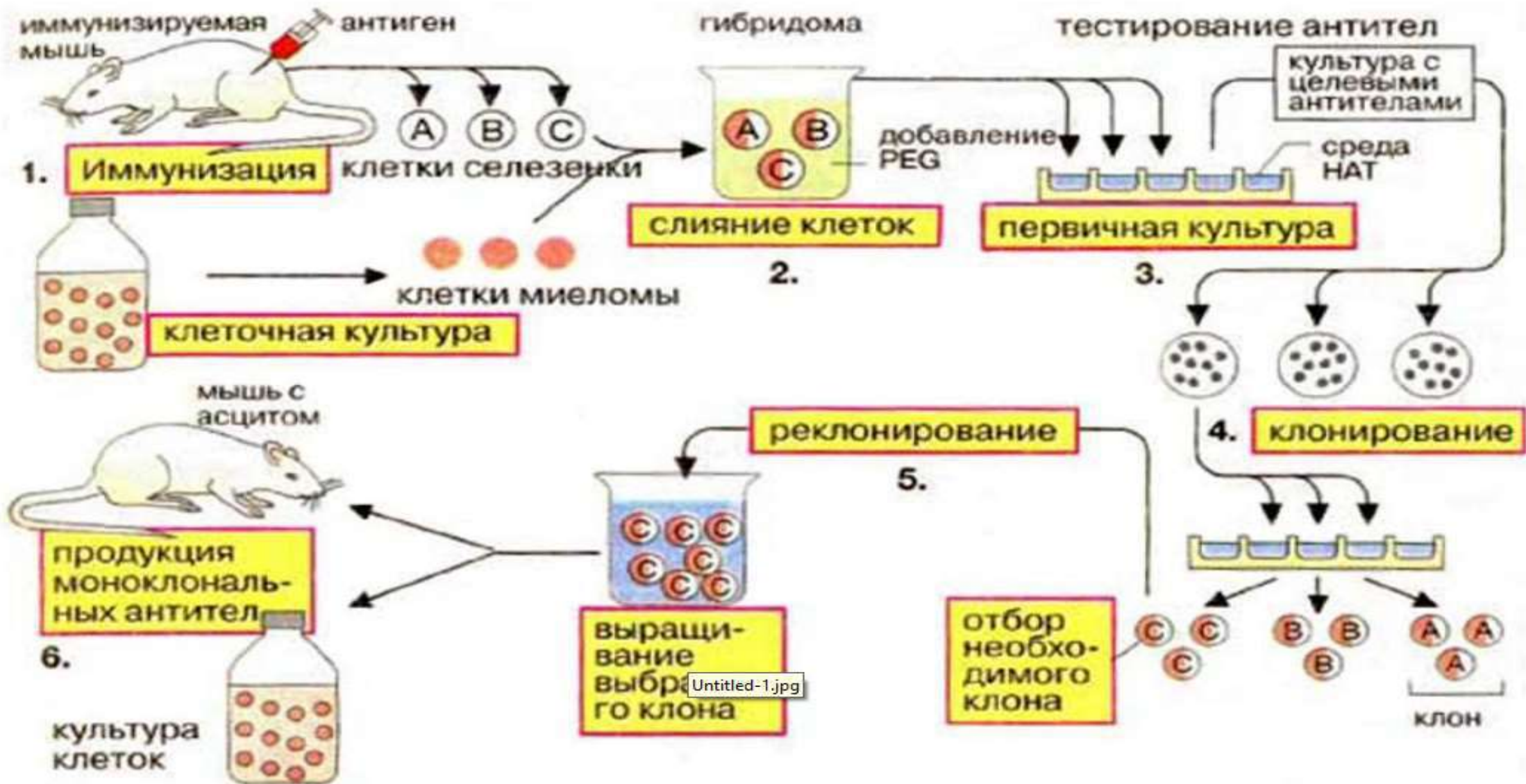
❑ Ол үшін алдын ала жануарды бірнеше рет иммунизациялайды. Бастапқыда **антиген концентрациясы** жоғары (**иммуногенділігі төмен** және **толеранттілік** тудыруы мүмкін), ал келесіде сұйытылған немесе концентрлі болуы мүмкін.

- Көптеген **еритін белоктар** клетка қабықшаларының антигендеріне қарағанда **иммуногенділігі төмен** болады. Сондықтан иммундық жауапты арттыру үшін **адъюванттар** қолданылады, мысалы көп қолданысқа ие - **Фрейнд (ПАФ)** қосылады.

- **Тазартылған антиген** концентрациясын оның табиғаты мен иммуногенділігіне қарай таңдалады.

❑ **Будандастыру** үшін жануардың көк бауырынан иммунизациялаудан кейін **(3-5 тәуліктен соң)** спленоциттерді бөліп алады.

❑ **Будандастырудың оптималды мерзімі** иммунизацияланған жануардың лимфоидты мүшелерінде антиденелер түзуші ересек клеткалардың саны максимумға жетпеген кезде қолайды. Антидене түзуші клеткалардың ізашарларының құйылысу тиімділігі жоғары болып келеді.



Будандастыру нұсқасы

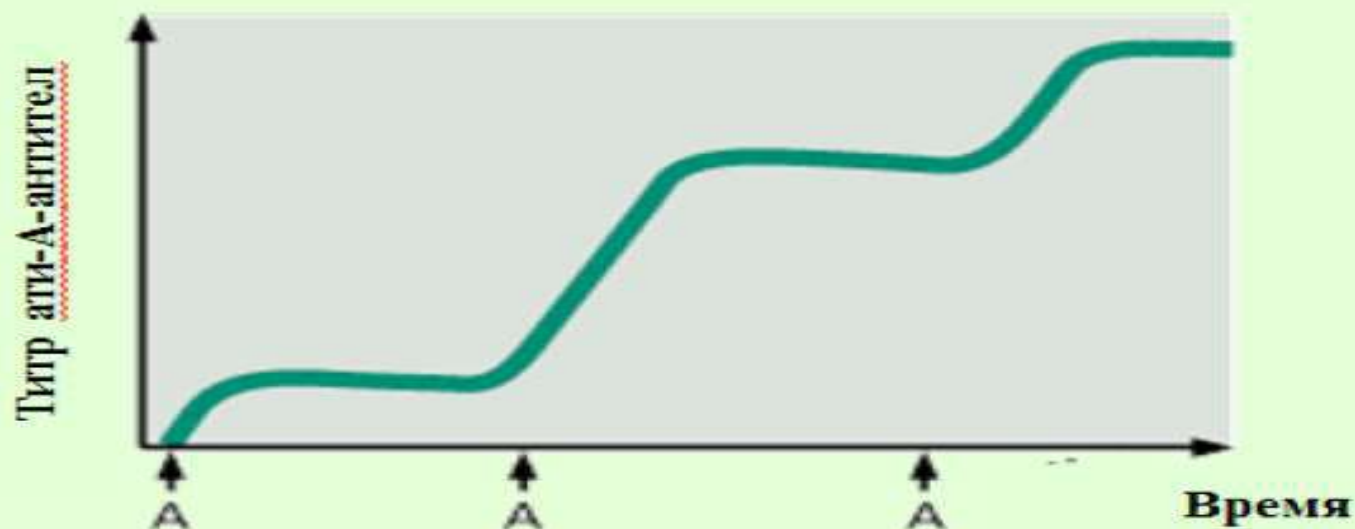


Инъекция антигена (A)



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. Оның себебі **in vivo-**жағдайында иммунизацияланғанда клеткаларды екінші реттік иммундық жауап кезінде алады, ол кезде негізінен: **G класы** түзіледі. Ал **In vitro-** жағдайында реакция бірінші тип бойынша жүреді. Бұл проблеманы жасанды ортада екінші иммундық жауап тудыру арқылы шешуге болады.

❑ Жануар көкбауырына тікелей антиген ендіру (будандастыруға 3-4 тәулік бұрын) әдісі де тиімділігін көрсеткен, әйтсе де бұл жағдайда да **LgM-** түзетін клондар үлесі артатындықтан, практикалық қолдану маңыздылығы төмен болатынын көрсетті.

II САТЫ Клеткаларды құйылыстыруға дайындау

A) Миеломды және гибридомды клеткаларды өсіруге арналған орта

1. RPMI 1640 қоректір ортасы немесе Дульбекко модификациясындағы Игла ортасы
2. Натрий пируваты
3. Антибиотик ерітінділері
4. L-глутамат
5. 2-меркаптоэтанол
6. HEPES – буфері
7. Сиыр ұрығының сарысуы

B) Миеломды клеткалар линиялары: NS-1/Ag4.1, SP2/Ag14, P3.X63.Ag8.653, NS0

Бұл линиялар иммуноглобулиндерді синтездеу қабілетінен айырылған, пролиферациялану мен будандасу қабілеті жоғары

Ісік клеткаларына қойылатын талаптар:

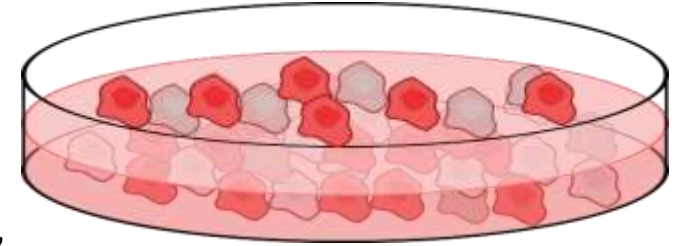
- ✓ Иммуноглобулиндерді синтездеу қабілетінен айырылған,
- ✓ In vitro - жағдайында селективті ортада клеткалардың өсуіне қажет белгілі бір ферменттің ақауы бар болу керек.

➤ **Қорек қабатын құрайтын клеткалар (фидерлі клеткалар)**

- **Оларға:** көк бауыр клеткалары, тимоциттер, перитонеалды макрофагтар, тышқан фибробласттар қолданылады.

□ Фидерлі клеткалардың функциялары:

1. Клеткалардың тығыздығын қамтамасыз етеді,
2. Гибридомалардың пролиферациясын арттыратын заттарды синтездейді,
3. Тіршілігі жойылған клеткалардың макромолекулалық утилизациясын жүзеге асырады,



➤ **Кемшіліктері:**

1. Дайындау қиын және уақытқа тәуелді,
2. Бактериалды ластанудың потенциалды көзі,
3. Қоректік ортаны метаболиздейді,
4. Қоректендіруші қабат клеткалары гибридомалардан сан жағынан артып, олардың тіршілігін жоюы мүмкін,
5. Гибридомаларды визуалды идентификациялауды қиындатады,

➤ Альтернативті орта. **Кондиционирленген орта** (фидерлі клеткалар өскен ортаның супернатанты) онда фидерлік клеткаларға тән кемшіліктер болмайды.

Д) суспензиялық клеткалар (иммунды спленоциттер)

• III САТЫ Клеткаларды құйылыстыру

1. **Сендай вирусын** қолдану (ол үшін арнайы зертханада вирусты көбейту және инактивациялау қажет).
2. **30-50% ПЭГ** (Mr 1000-4000) – клетка қабықшаларының зарядын азайтады, осмотик
3. **ДМСО** (диметилсульфоксид) осмотық қысымды жоғарылатады (ПЭГ +ДМСО)

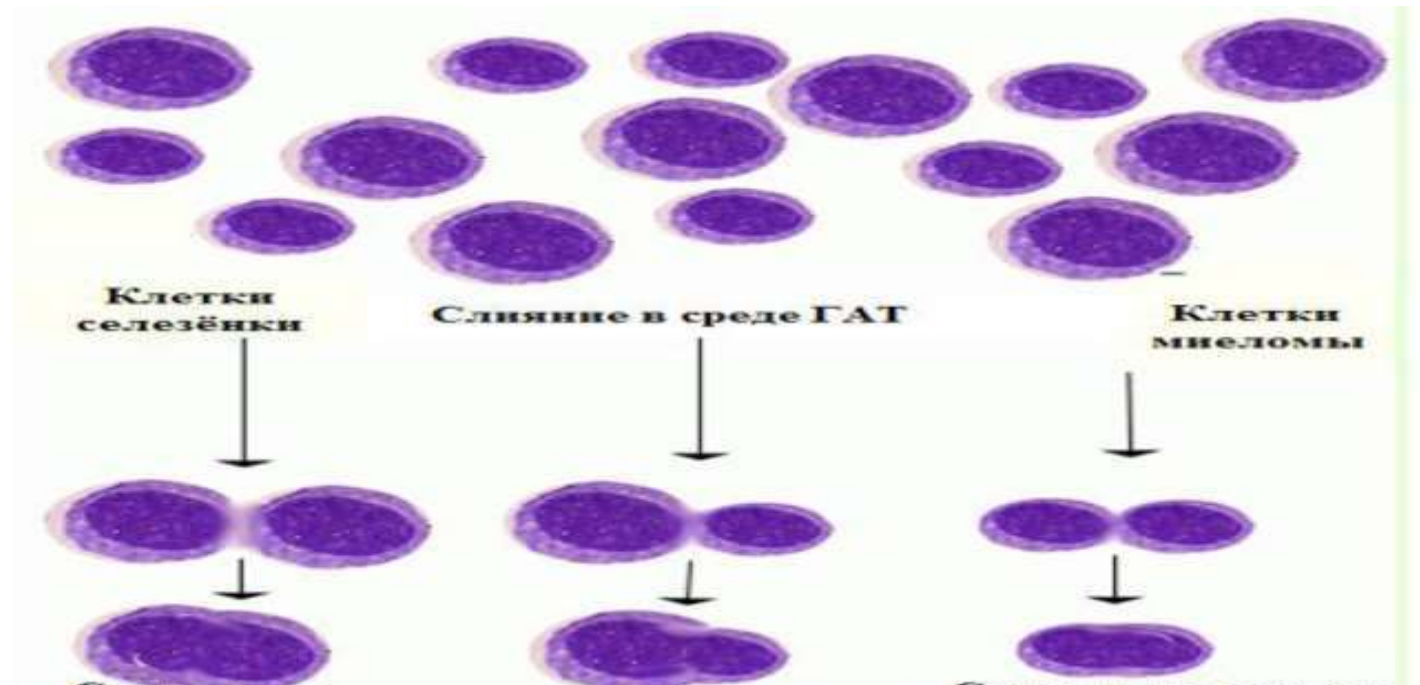
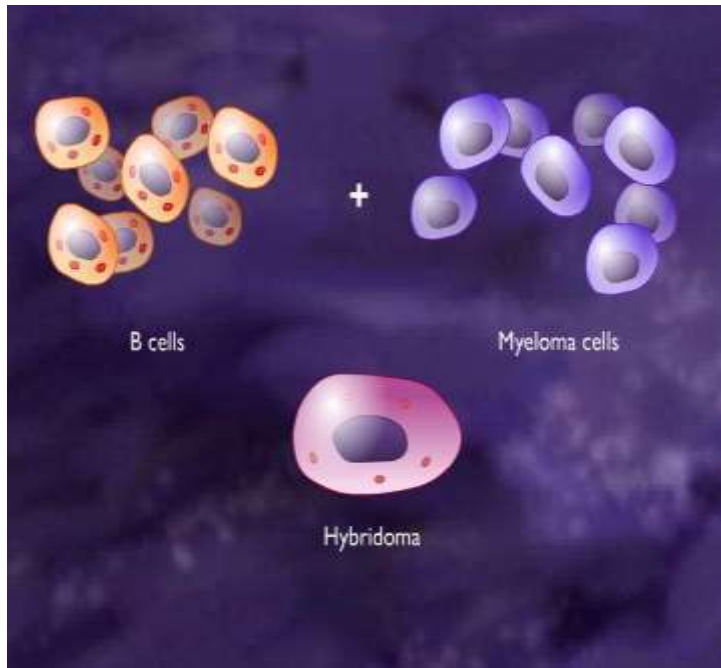
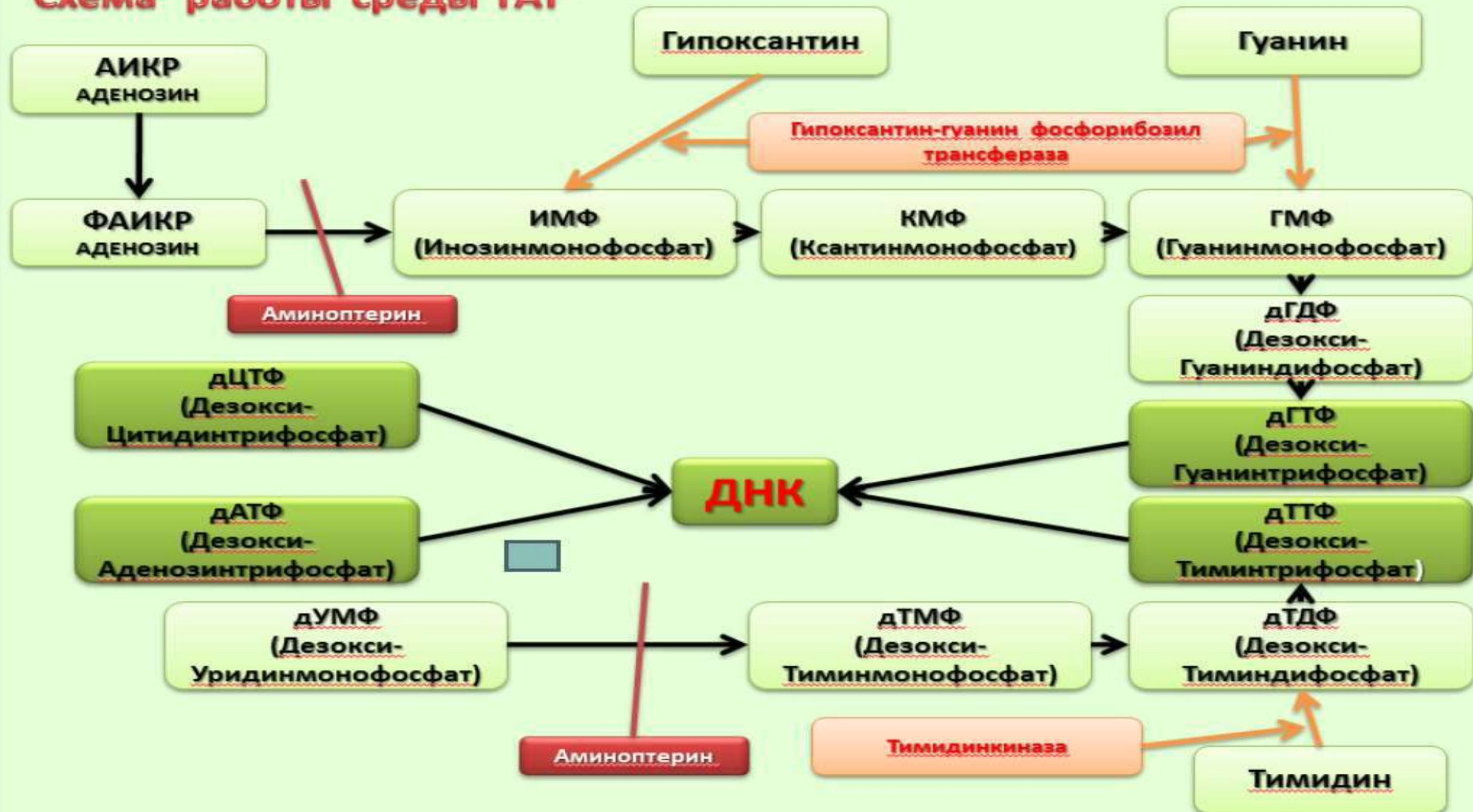
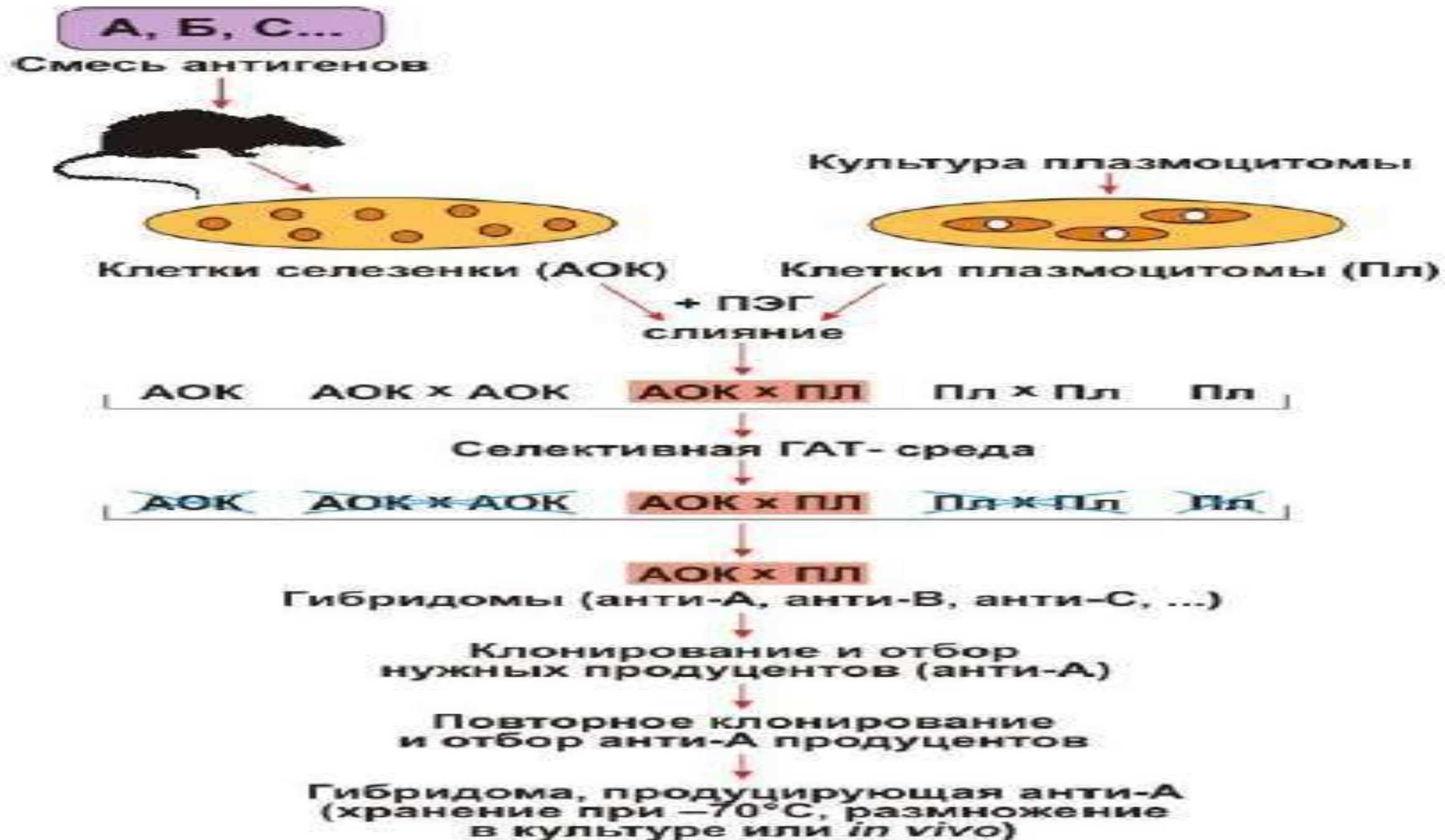


Схема работы среды ГАТ





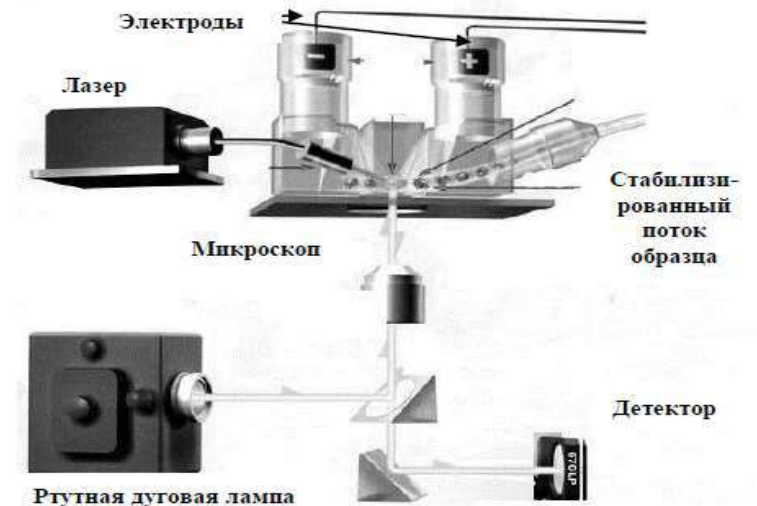
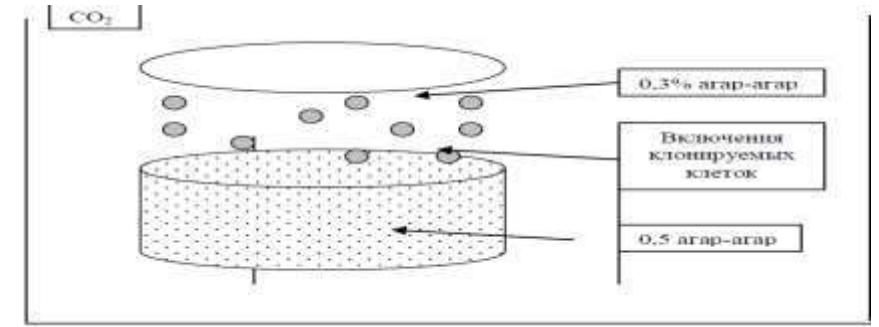
- IVСATЫ. Бірегей антиденелерді өндіретін клондарды сұрыптау
- Серологиялық және иммунологиялық әдістер:
 - иммуноферментті,
 - радиоиммунды,
 - иммунофлюоресцентті,
 - қатты фазалы иммуноферменттік талдау (ТИФА),
 - стафилакок Cowan –ның А белогымен агглютинациялау,
 - РПГА,
 - гельде локалды гемолиз,
 - цитологиялық талдау т.б.
- Әдістер: тез орындалатын, сезімтал және өнімділігі жоғары болу керек.
- Қатты фазалы иммуноферментті талдау (**ТИФА**) кең қолданылады.

V САТЫ Клондау және реклондау

- Бір клеткадан клон популяциясын алу

➤ Тұрақты клеткалық клон алу үшін қолданылатын әдістер:

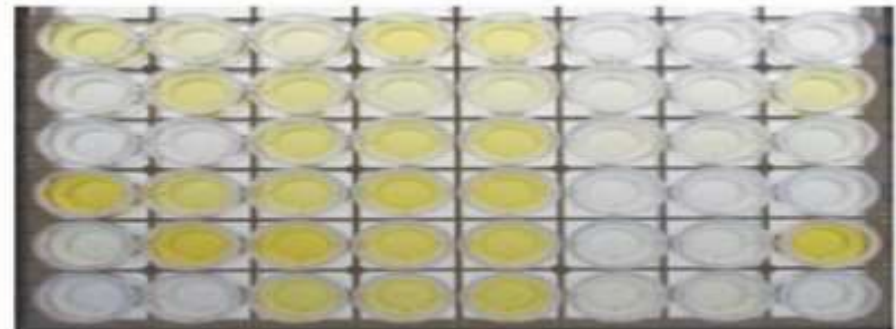
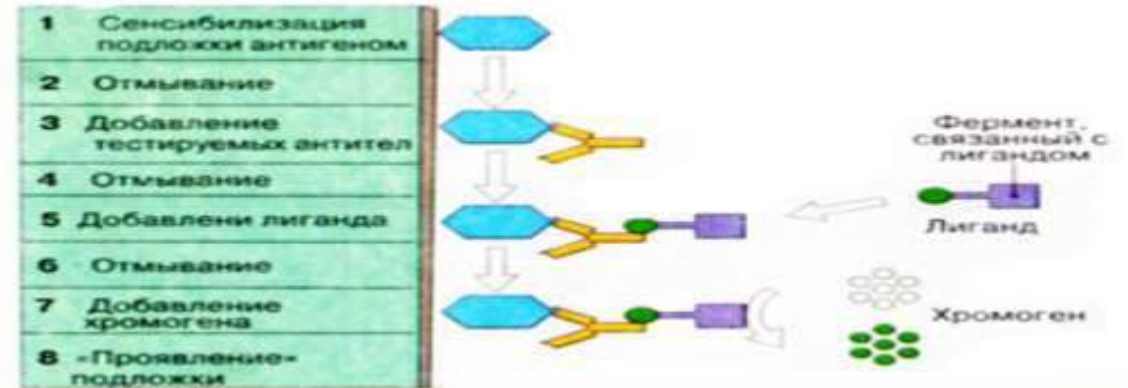
1. Лимитті сұйылту арқылы клондау,
2. Жартылай сұйық агар-агарда клондау
3. Ағынды цитофлуориметр көмегімен клондау



- VI САТЫ будан клеткалар синтездейтін антиденелерді айқындау
- Әдістер:
- иммуноферментті (ИФА),
- радиоиммунологиялық,
- иммунофлюоресцентті

1. Антиген в солевом растворе инкубируют на пластиковой подложке, в результате чего небольшое его количество адсорбируется на поверхности пластика.
2. Лигандом служит молекула, способная выявить антитела и ковалентно связанная с ферментом, например пероксидазой.
3. Лиганд соединяется с тестируемыми антителами и после предварительного удаления несвязавшегося лиганда отмыванием, связанный лиганд можно визуализировать путём добавления хромогена – бесцветного субстрата, который под влиянием связанного с лигандом фермента превращается в окрашенный продукт реакции.

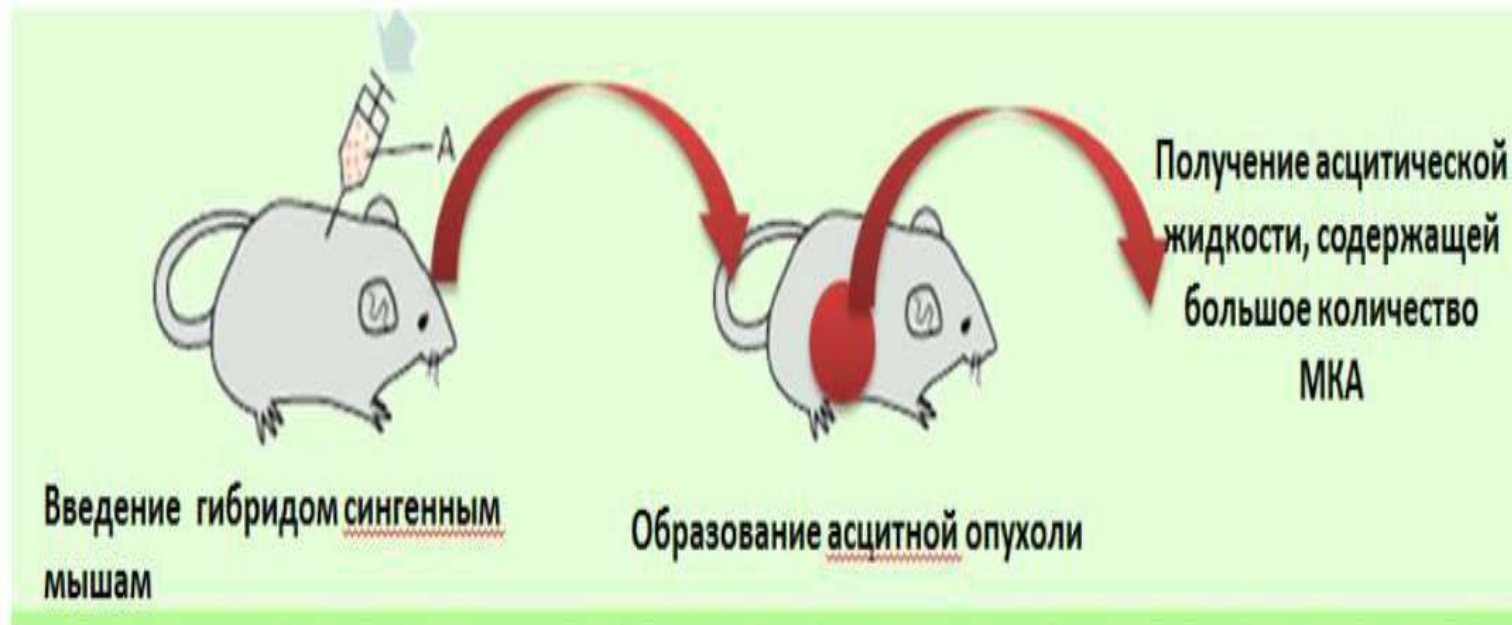
Фотография «проявленного» планшета. Количество тестируемых антител определяют по содержанию окрашенного продукта реакции путём сканирования оптической плотности.



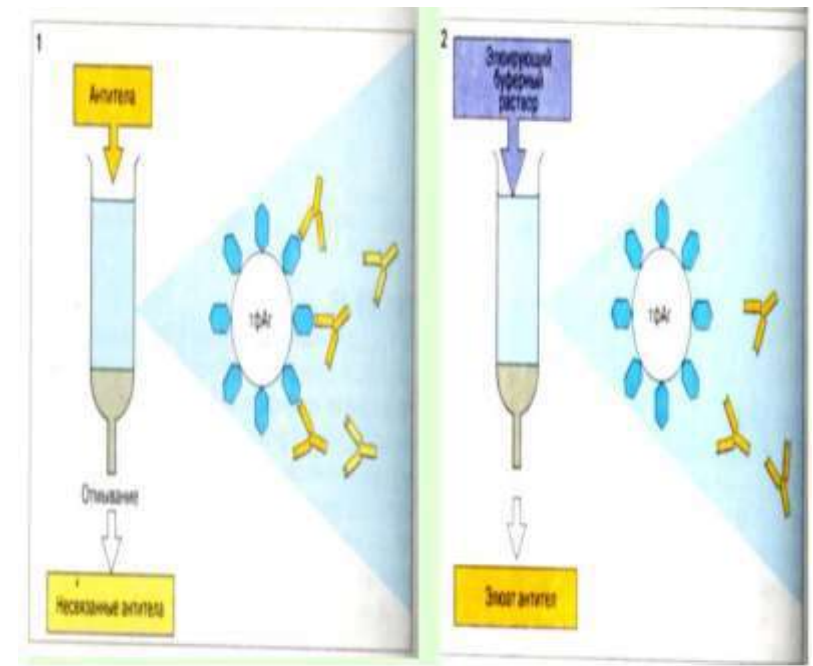
ELISA

- VII САТЫ 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**



- **VIII САТЫ Антиденелерді бөліп алу және тазарту**
 - ✓ Иммуноглобулин фракциясын **аммоний сульфатымен диализдеу** арқылы бөліп алады.
 - ✓ Белгілі бір класқа жататын антиденелерді **Ухтерлони әдісімен** бөліп алады.
 - ✓ Таза антиденелерді **иммуносорбенттерде** (тасымалдағышқа ковалентті тігілген антиген) бөліп алады. Тасымалдағыш ретінде **сефароза** қолданылады.
 - ✓ **Аффинді хроматография**
 - ✓ **Ионалмастырғыш хроматография** әдістерімен бөліп алуға болады.



Аффинді хроматография
әдісі

- Аффинді хроматография әдісімен антиденелерді тазартып алу сатылары

1. Қатты фазалы **иммуносорбент (тфАг) инертті (декстран) негізге** ковалентті байланысқан **антиген** дайындайды.

Иммуносорбентпен колонканы толтырып, осы фаза арқылы **антидене** қоспасын өткізеді.

Антиденелер иммуносорбентпен байланысып, ал байланыспағаны колонкадан сыртқа қарай ағып кетеді.

2. Антиденелерді сорбенттің үстіңгі қабатынан **буфер ерітіндісімен** (ацетат буфері, рН 3,0; диэтиламин рН 11,5 немесе 3М Гуанидин HCl) жуып (**элюаттап**) алады.

- 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**

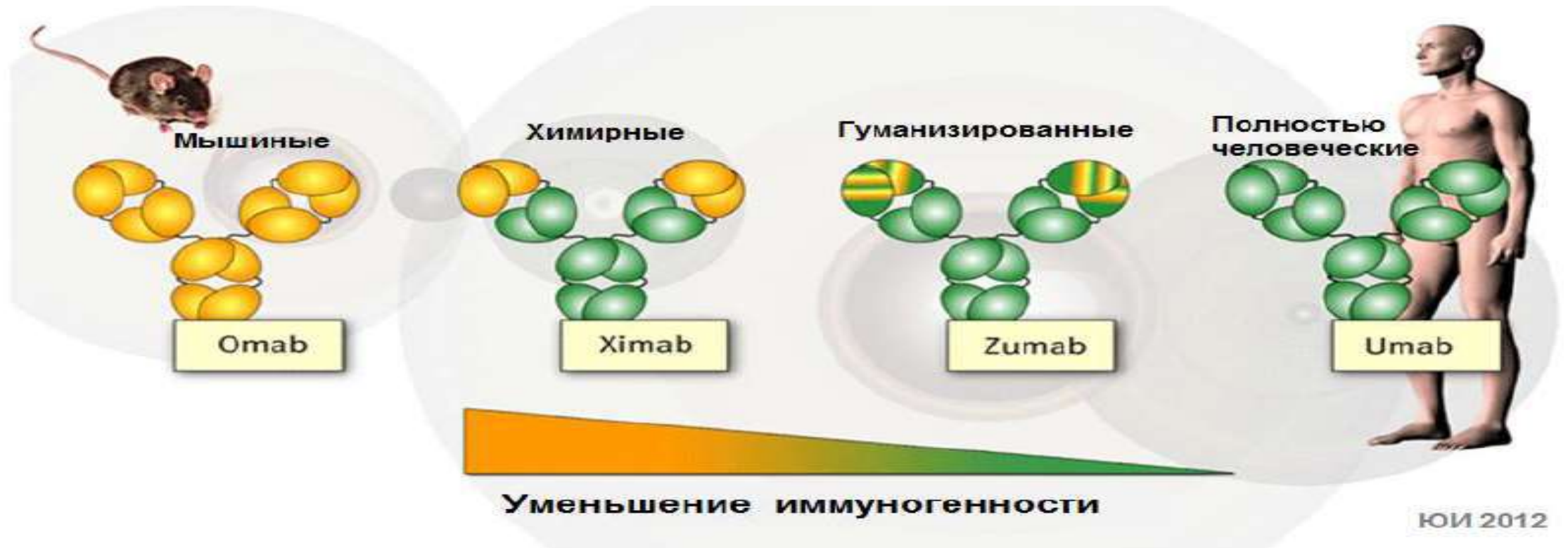
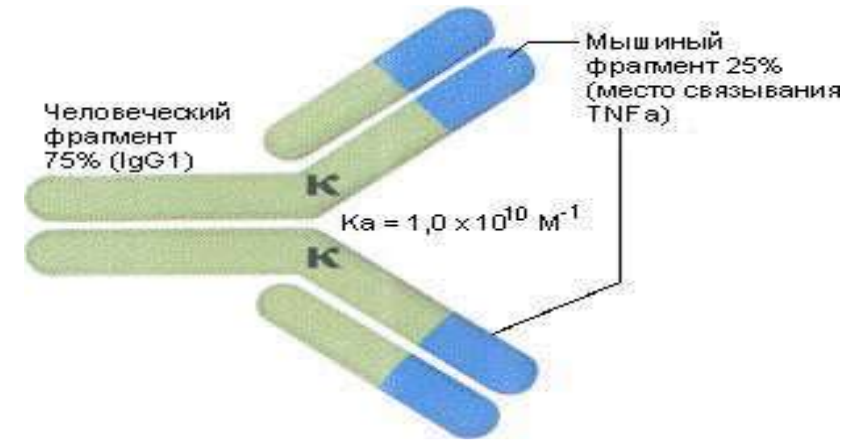
Практическое использование МКА



- **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 тұрады),
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.

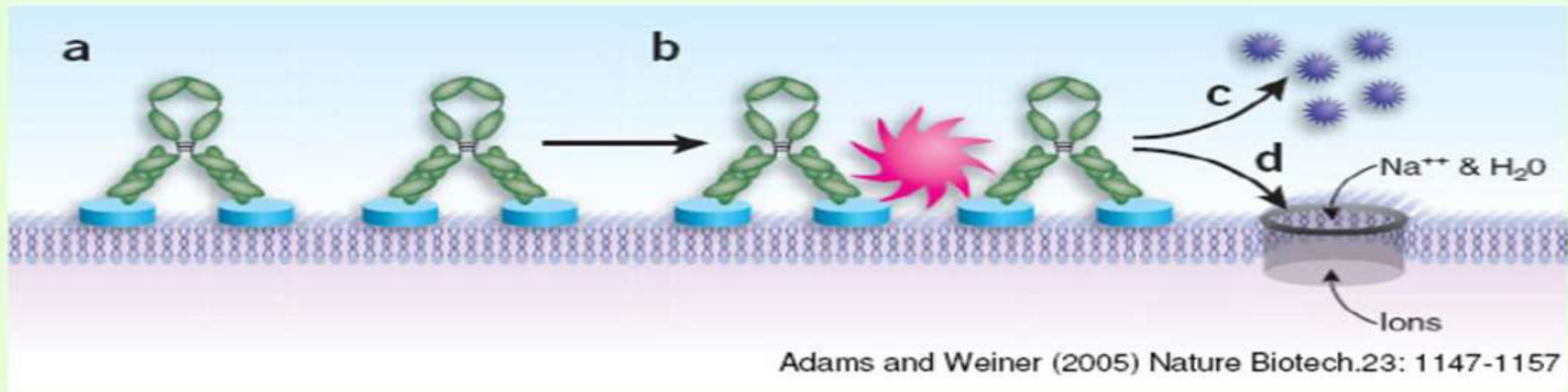
8. Адалимумаб (Хумира) – адамның рекомбинантты МКА. Ревматоидті артритті емдеуге қолданылады.

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.



a). Связывание МКА со специфическим рецептором на поверхности опухолевой клетки.

b.) Экспозиция сайта прикрепления на МКА для протеинов, инициирующих каскад комплемента.

c.) Запуск триггерного механизма факторов хемотаксиса

d.) Формирование клеточного канала, возникновение ионного дисбаланса и гибель клетки..

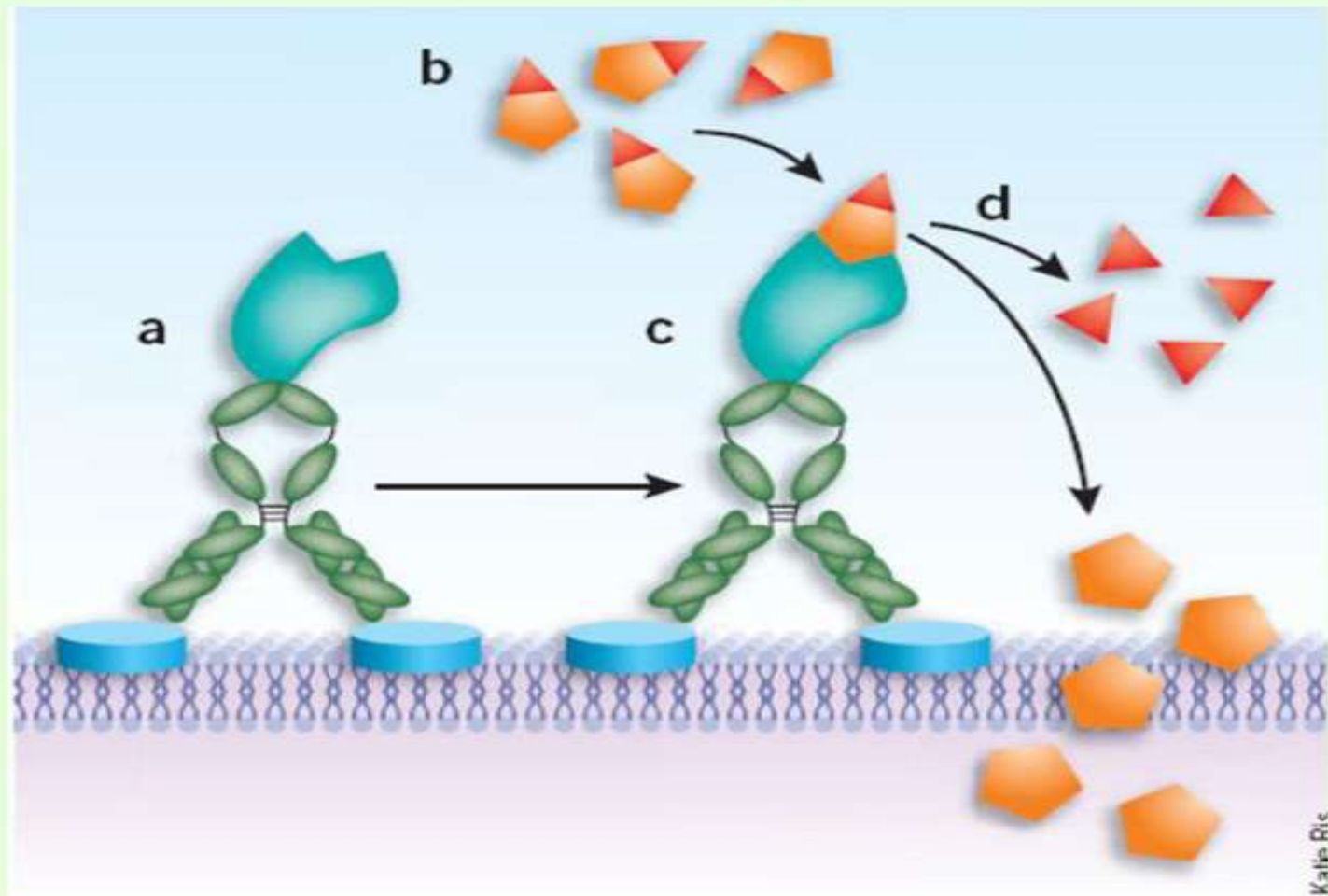
Цитотоксикалық комлименттік байланыс

a). Связанный комплекс антитело-фермент (**mAb-enzyme**) связывается со специфическим рецептором на поверхности опухоли

b.) Пролечество в неактивной форме, активируемое ферментом (**enzyme**)

c.) Выборочное связывание пролекарства с ферментом и активация пролекарства

d.) Цитотоксическое действие лекарственного препарата.



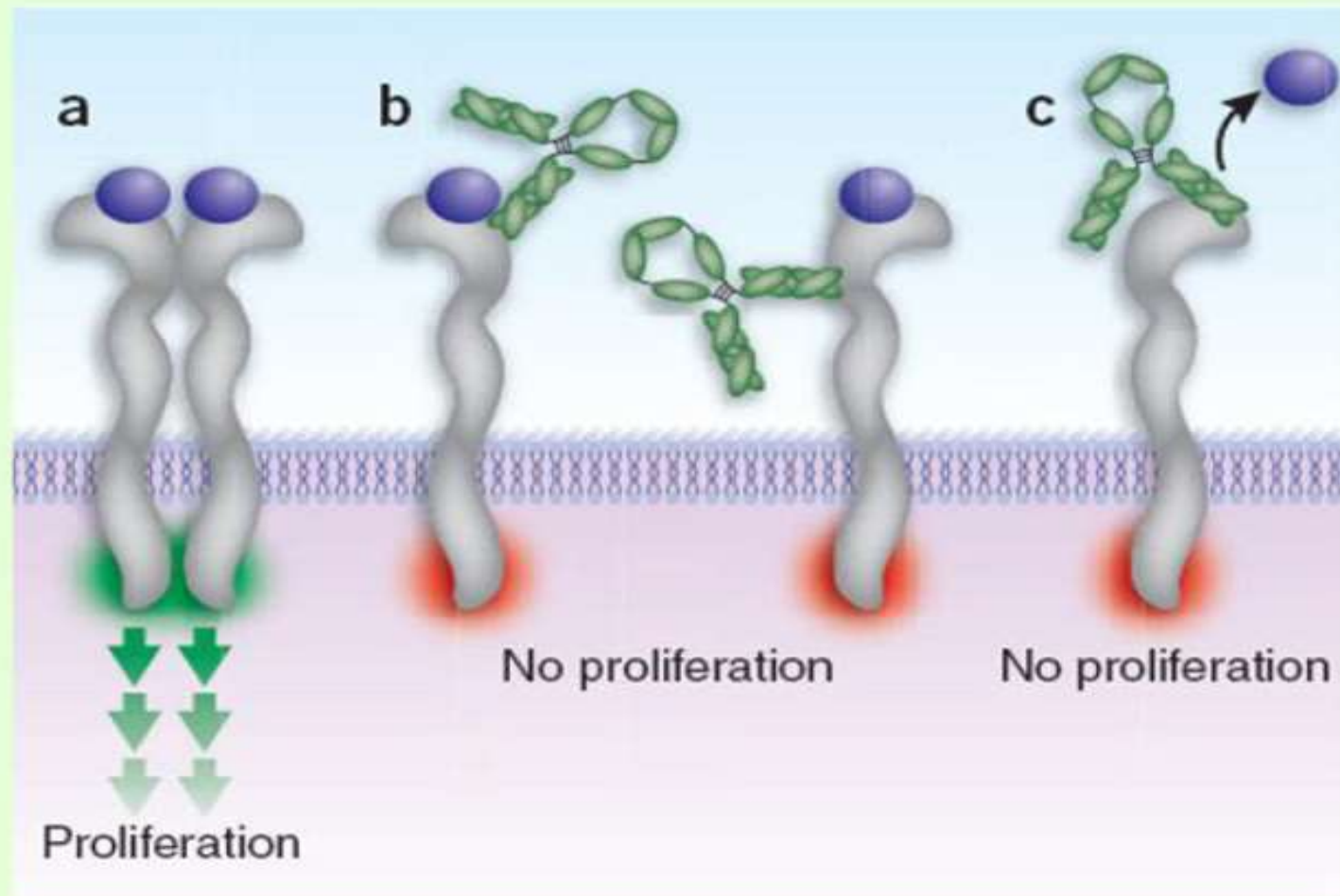
Adams and Weiner (2005) Nature Biotech.23: 1147-1157

МКА мен фермент байланысқан комплекстің
терапевтік әсері

a). Прикрепление лиганда к рецептору фактора роста опухоли и активирование сигнального каскада пролиферации.

b.) Связывание МКА препятствует димеризации рецептора фактора роста опухоли и блокирует каскад пролиферации.

c.) Связывание МКА препятствует связыванию лиганда с рецептором и блокирует каскад пролиферации.



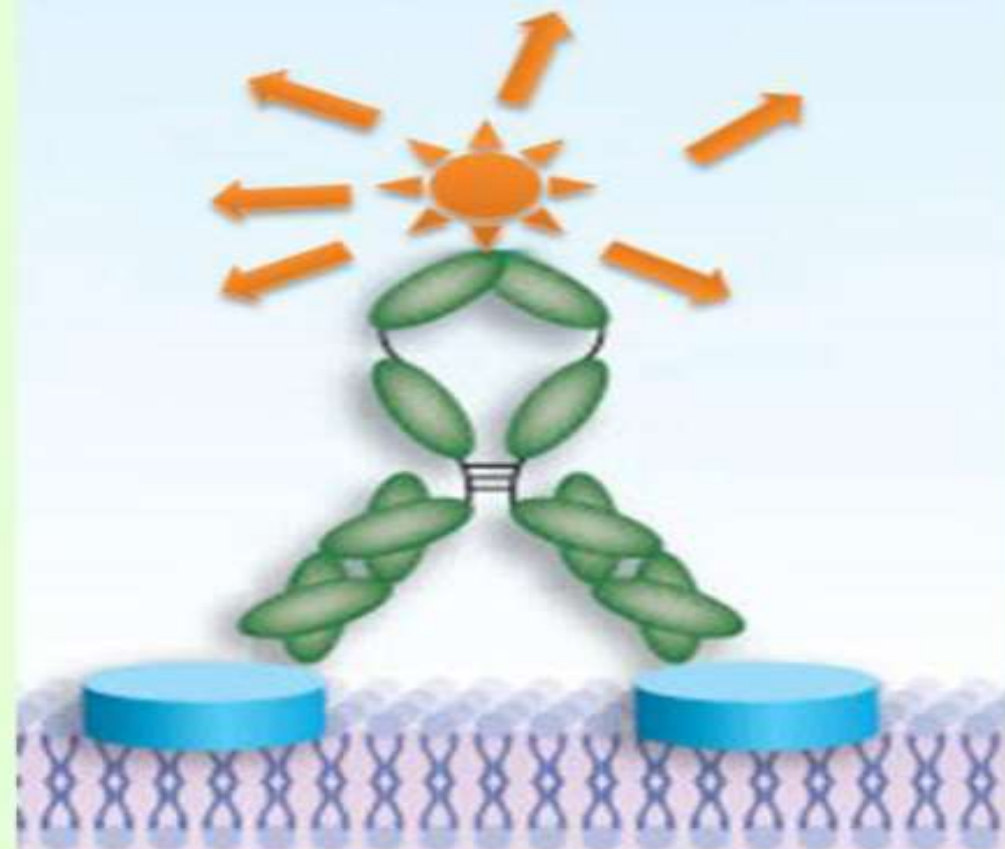
Adams and Weiner (2005) Nature Biotech.23: 1147-1157

МКА мен фермент байланысқан комплекстің онкологияда әсері

Прикрепление радиоактивного изотопа к МКА (как правило иттрия-90, технеция-99 и индия-111).

Когда несущее радиоактивную метку антитело связывается с опухолевым эпитопом, расположенные рядом клетки подвергаются локальному облучению.

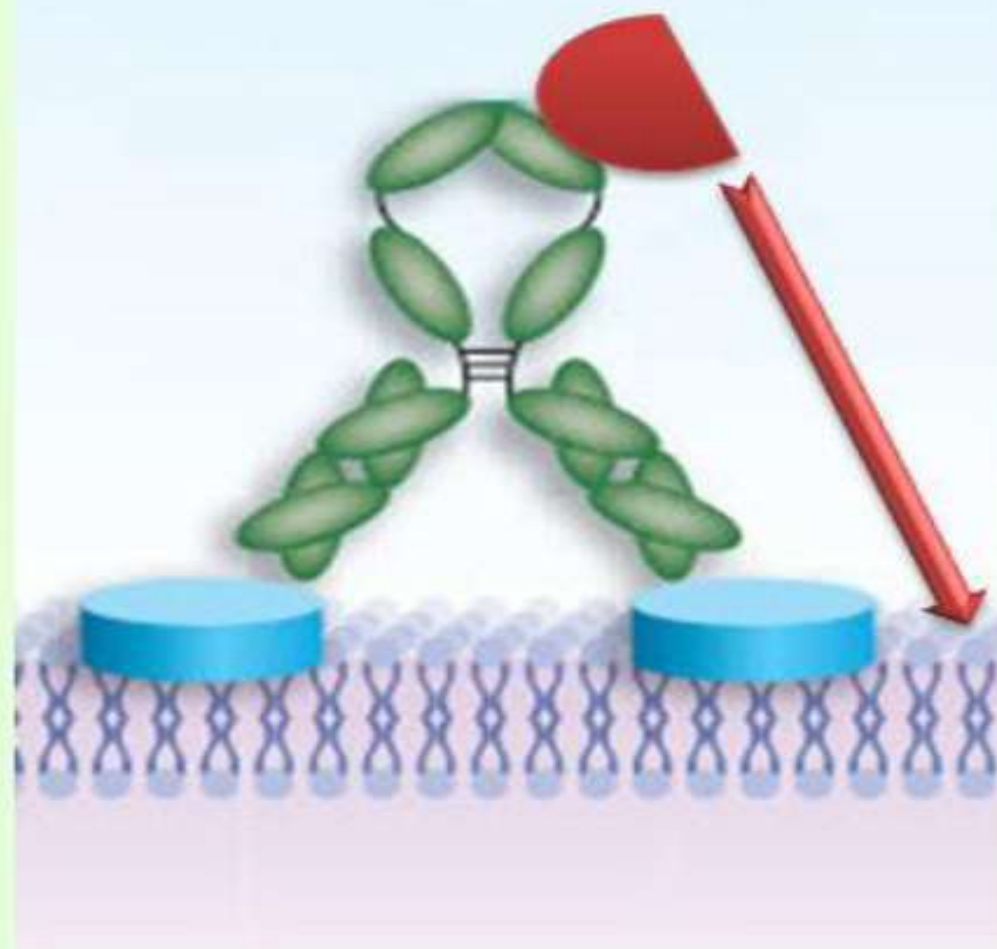
Это гораздо менее вредно для пациента, чем внешнее облучение.



Радиоимундық терапиялық әсері

Прикрепление токсина к МКА (В качестве токсина может быть рицин, дифтерийный токсин, экзотоксин *Pseudomonas*, фактор некроза опухолей).

Когда несущее токсин антитело связывается с опухолевым эпитопом, токсин переносится внутрь клетки, где оказывает своё воздействие.



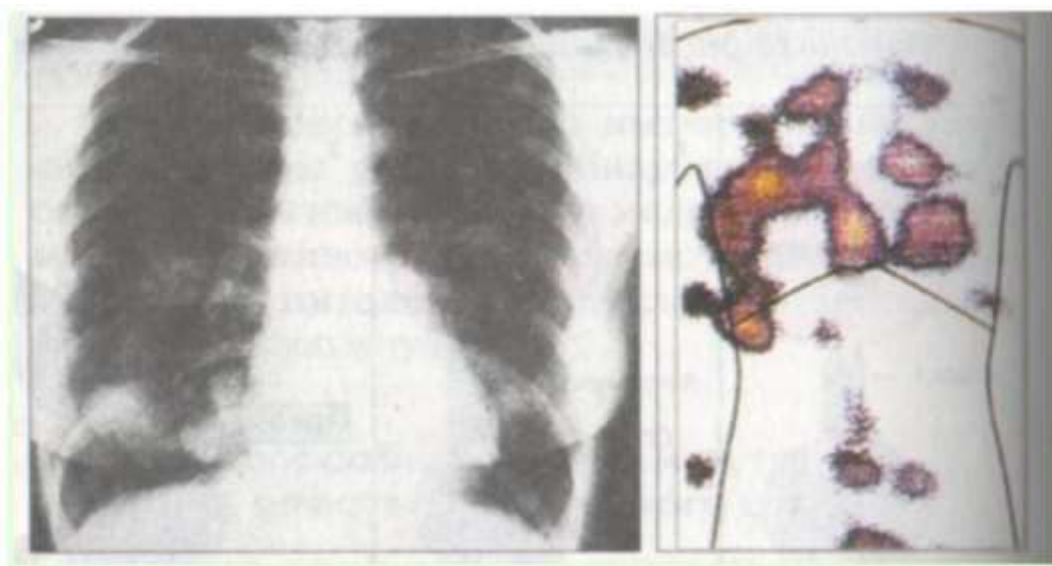
- Цитотоксикалық терапия

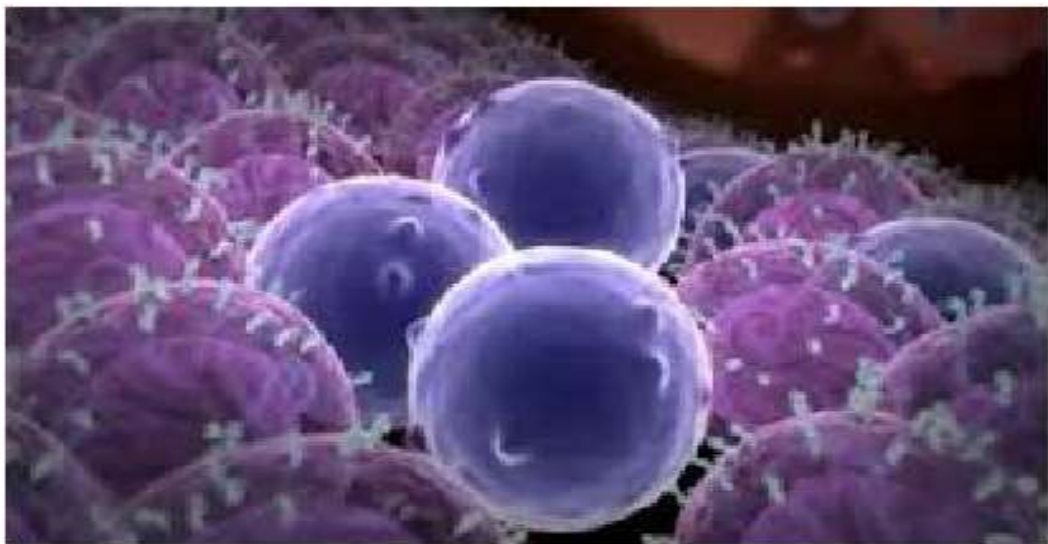


Радиоиммунотерапия
(гамма - сцинтиграфия)

Радиоиммунотерапия

Радиоиммунотерапия (РИТ) – вид лечения, который включает в себя иммунотерапию и радиотерапию. Этот вид лечения нашел свое широкое применение в онкологической практике. При радиоиммунотерапии используются моноклональные антитела, которые способны обнаружить раковые клетки.





**Моноклональные антитела
при псориазе**



**Моноклональные антитела
при раке**



Моноклональные антитела при мигрени