



Моноклональные антитела

Выполнила студентка V курса факультета ветеринарной
медицины и зоотехнии группы В516 Безматерных
Екатерины Александровны

Моноклональные антитела - антитела, синтезируемые и секретируемые одним клоном антителообразующих клеток. Все свойства моноклональных антител (класс иммуноглобулинов, структура полипептидных цепей и активных центров), то есть их антительная специфичность - идентичны.

Они распознают только один антиген и взаимодействуют только с ним. В связи с этим значительно повышается и специфичность всех иммунологических реакций, протекающих с участием моноклональных антител. В организме моноклональные антитела синтезируются при плазмоцитомах, что известно давно.

В организме моноклональные антитела синтезируются при плазмоцитомах, что известно давно. И лишь в 1975 году Келер и К. Мильштейн разработали методику получения гибридом для искусственного синтеза моноклональных антител. Для получения гибридом были использованы такие штаммы миеломных клеток, которые не содержат фермента гипоксантин фосфо-рибозил трансферазы (ГФРТ) и поэтому гибнут в селективной питательной среде - Г АТ (содержащей гипоксантин, аминоитерин и тимидин); лимфоциты в такой среде не погибают. Для слияния лимфоцитов с миеломными клетками использовали полиэтиленгликоль, так как под его влиянием предпочтительнее сливаются размножающиеся или активированные с помощью антигена В лимфоциты.

Возникающие при слиянии клеток гибридомы наследуют от иммунных В-лимфоцитов способность синтезировать иммуноглобулины только одной антительной специфичности и способность размножаться в селективной среде с ГАТ, а от миеломной клетки - способность к бесконечному размножению.

Процесс получения гибридом включает определенные этапы:

- 1) Получение линии миеломных клеток (мышинные или крысиные клеточные линии).
- 2) Получение иммунных В лимфоцитов (антителообразующих клеток) из селезенки иммунизированного соответствующим антигеном животного.
- 3) Создание условий для слияния клеток (одна из 10^4 клеток).
- 4) Выделение гибридом и отбор из них интересующего клона.
- 5) Накопление клеток полученного клона для его практического использования.

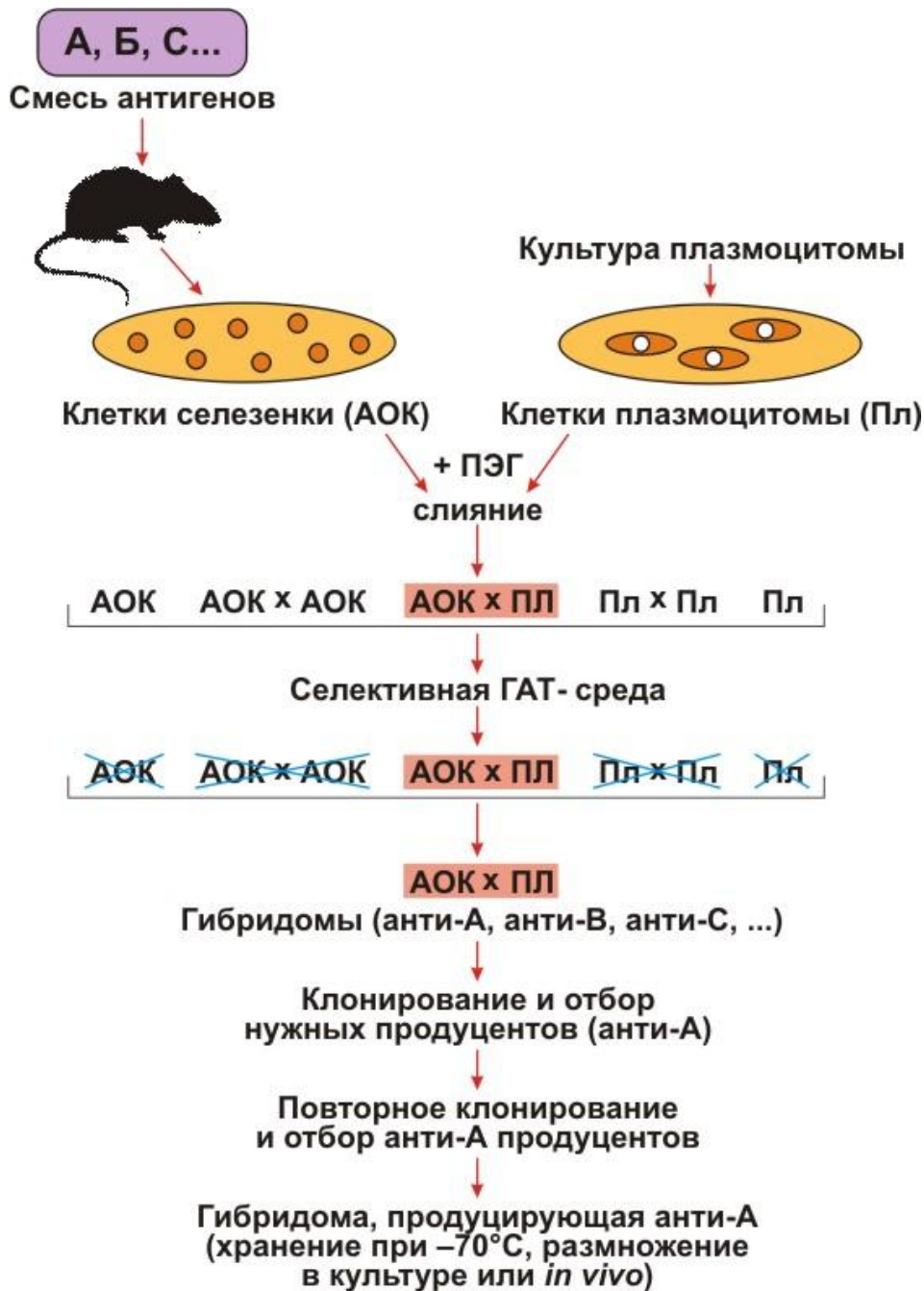


Схема получения гибридом.

А, В, С — многокомпонентная смесь антигенов, использованная для иммунизации;

АОК — антителообразующие клетки селезенки;

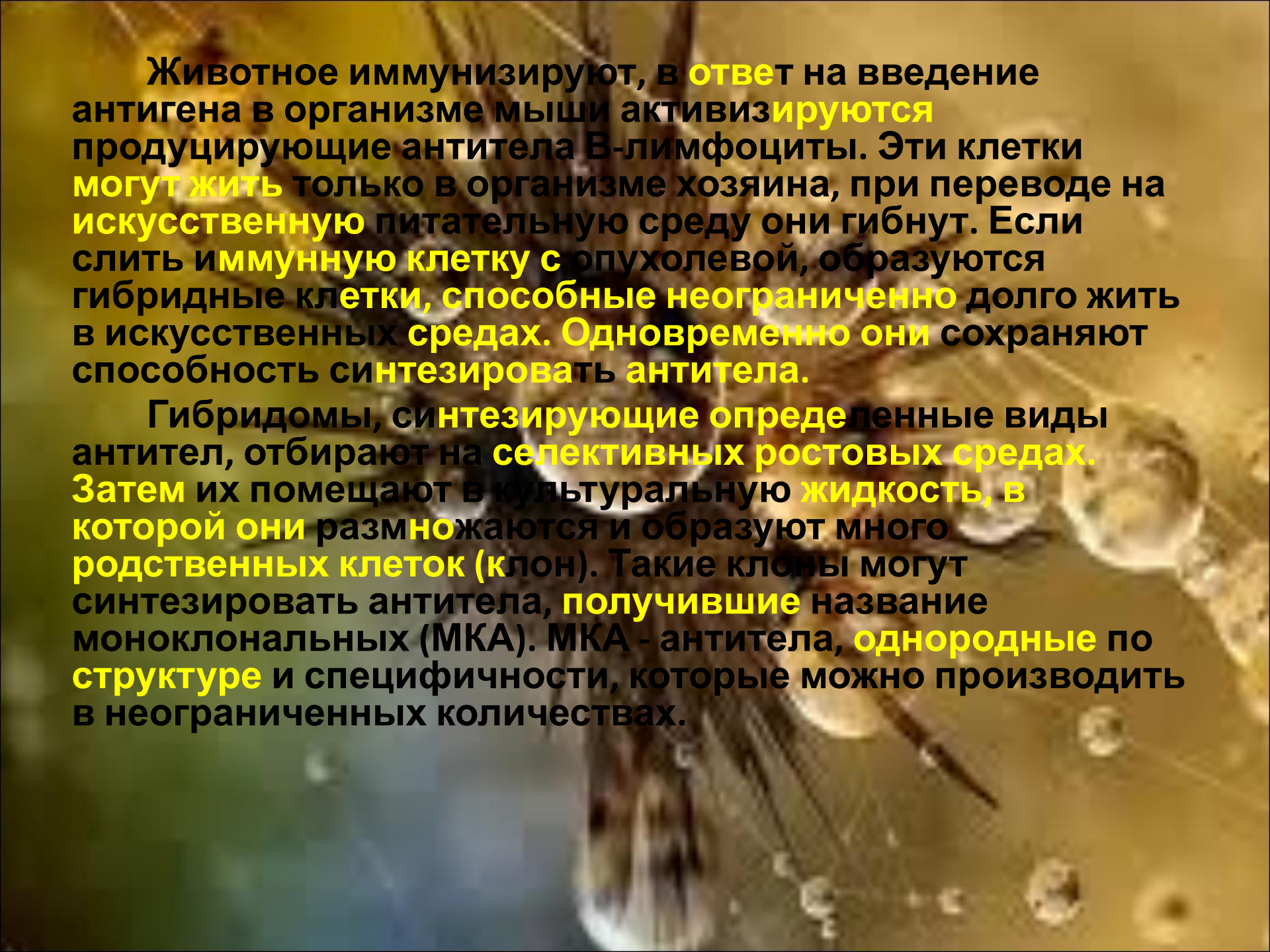
Пл — клетки плазмоцитомы, не растущие в селективной ГАТ-среде;

ПЭГ — полиэтиленгликоль;

ГАТ — среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин, тимидин;

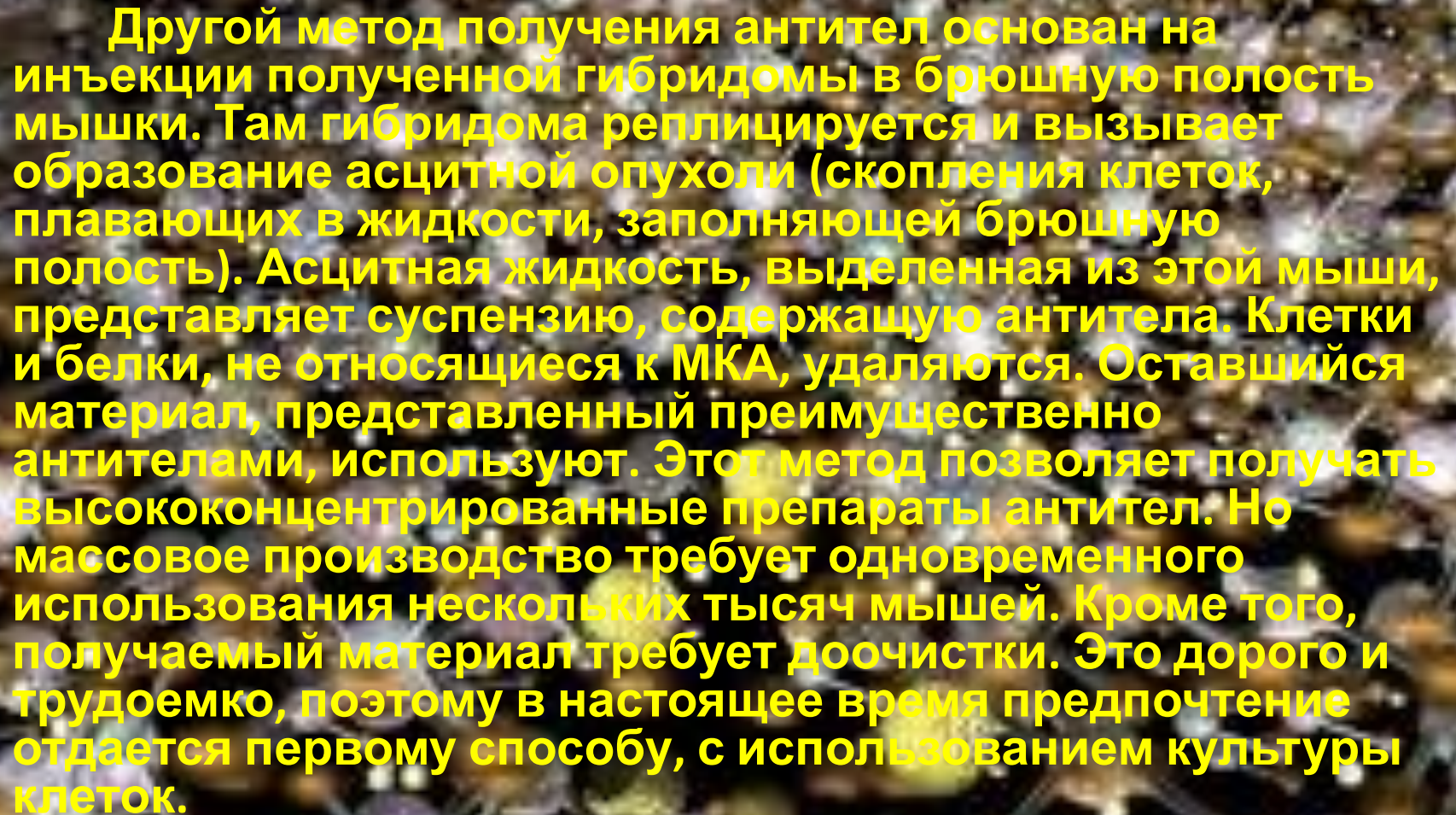
анти-А, анти-В, анти-С — моноклональные антитела соответственно к А-, В-, С-антигенам.

Следующий этап после получения гибридом — клонирование и отбор нужных клонов. Выжившие в ГАТ клетки рассеивали в специальные пластиковые планшеты, содержащие обычно 96 лунок емкостью примерно по 0,2 см³. В каждую лунку помещали в среднем по 10 гибридных клеток, которые культивировали в присутствии «кормящих» клеток, не имеющих отношения к гибридомам, но способствующих их росту. После нескольких дней культивирования содержимое каждой лунки проверяли на присутствие антител нужной специфичности. Для этого использовали микрометоды выявления антител к соответствующему антигену. Клетки из лунок, содержащих нужные антитела, клонировали (то есть повторно рассеивали по таким же лункам, но из расчета 1 клетка на лунку), вновь культивировали и проверяли на присутствие нужных антител. Процедуру повторяли 1–2 раза. Таким образом, отбирали клоны, продуцирующие антитела только одной нужной специфичности, то есть моноклональные антитела. Полученные клоны можно заморозить при –70 °С и хранить до того, пока они не потребуются. Их можно культивировать и накапливать антитела в культуральной среде, а можно привить мышам (так как гибридомы — это опухолевые клетки), где они будут расти и накапливать колоссальные количества моноклональных антител. От одной мышки можно получить антител не меньше, чем от кролика. Эти антитела не содержат посторонних антител и настолько однородны физико-химически, что могут рассматриваться как чистые химические

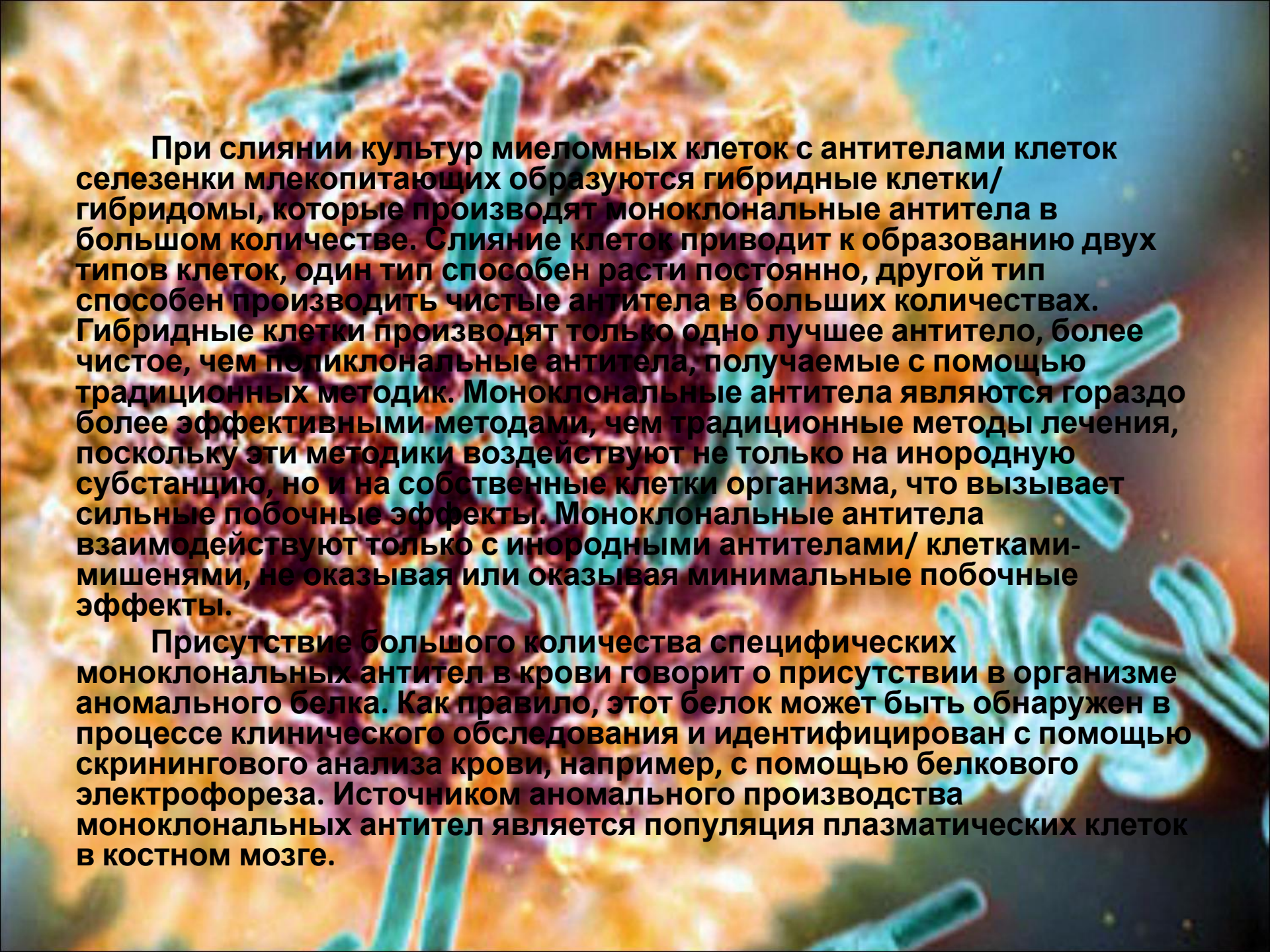
A microscopic image showing various cells, likely B-lymphocytes, with visible nuclei and cytoplasm. The background is a warm, golden-brown color, suggesting a stained slide or a specific lighting condition. The cells are scattered across the frame, with some appearing more prominent than others.

Животное иммунизируют, в **ответ** на введение антигена в организме мыши активизируются продуцирующие антитела В-лимфоциты. Эти клетки **могут жить** только в организме хозяина, при переводе на **искусственную** питательную среду они гибнут. Если слить **иммунную клетку с опухолевой**, образуются гибридные клетки, **способные неограниченно** долго жить в искусственных **средах**. **Одновременно они** сохраняют способность **синтезировать антитела**.

Гибридомы, **синтезирующие определенные** виды антител, отбирают на **селективных ростовых средах**. **Затем их помещают в культуральную жидкость, в которой они размножаются** и образуют много **родственных клеток (клон)**. Такие клоны могут синтезировать антитела, **получившие** название моноклональных (МКА). МКА - антитела, **однородные по структуре** и специфичности, которые можно производить в неограниченных количествах.

A microscopic view of various cells, likely hybridoma cells, showing their complex structures and interactions. The cells are diverse in shape and color, ranging from small, round, yellowish-green spheres to larger, more irregular, purple and blue structures with prominent nuclei and cytoplasm. Some cells appear to be in the process of dividing or interacting with each other. The background is dark, making the individual cells stand out.

Другой метод получения антител основан на инъекции полученной гибридомы в брюшную полость мышки. Там гибридома реплицируется и вызывает образование асцитной опухоли (скопления клеток, плавающих в жидкости, заполняющей брюшную полость). Асцитная жидкость, выделенная из этой мыши, представляет суспензию, содержащую антитела. Клетки и белки, не относящиеся к МКА, удаляются. Оставшийся материал, представленный преимущественно антителами, используют. Этот метод позволяет получать высококонцентрированные препараты антител. Но массовое производство требует одновременного использования нескольких тысяч мышей. Кроме того, получаемый материал требует доочистки. Это дорого и трудоемко, поэтому в настоящее время предпочтение отдается первому способу, с использованием культуры клеток.

The background of the slide is a microscopic image showing a dense population of cells. Many of these cells are stained with a bright blue fluorescent dye, likely DAPI, which highlights the nuclei. The cells appear to be in various stages of division or are of different types, with some showing distinct nuclear morphology. The overall color palette is a mix of warm, naturalistic tones (pinks, oranges, yellows) and the cool, artificial blue of the fluorescence.

При слиянии культур миеломных клеток с антителами клеток селезенки млекопитающих образуются гибридные клетки/гибридомы, которые производят моноклональные антитела в большом количестве. Слияние клеток приводит к образованию двух типов клеток, один тип способен расти постоянно, другой тип способен производить чистые антитела в больших количествах. Гибридные клетки производят только одно лучшее антитело, более чистое, чем поликлональные антитела, получаемые с помощью традиционных методик. Моноклональные антитела являются гораздо более эффективными методами, чем традиционные методы лечения, поскольку эти методики воздействуют не только на инородную субстанцию, но и на собственные клетки организма, что вызывает сильные побочные эффекты. Моноклональные антитела взаимодействуют только с инородными антителами/клетками-мишенями, не оказывая или оказывая минимальные побочные эффекты.

Присутствие большого количества специфических моноклональных антител в крови говорит о присутствии в организме аномального белка. Как правило, этот белок может быть обнаружен в процессе клинического обследования и идентифицирован с помощью скринингового анализа крови, например, с помощью белкового электрофореза. Источником аномального производства моноклональных антител является популяция плазматических клеток в костном мозге.

Применение

Обычные поликлональные антитела давно и широко применяются для определения биологически активных веществ — белков крови и других биологических жидкостей, гормонов, ростовых факторов, клеточных рецепторов, медиаторов воспаления и иммунитета, бактериальных и вирусных антигенов, различных ядов и т.п. Моноклональные антитела из-за высочайшей специфичности, стандартности и технологичности получения успешно вытесняют и заменяют иммунные сыворотки.

Далее гибридомы создают уникальные возможности в аналитических целях: их можно применять как «иммунологический микроскоп» с чрезвычайно высоким разрешением. Так, например, если нужно сравнить две клеточные линии, отличающиеся одним или немногими антигенами, и надо выявить такие антигены, то метод гибридом предоставляет для этого исключительные возможности. Проиммунизовав мышей одной из линий и получив сотни гибридом, продуцирующих антитела к антигенам этой линии, можно найти одну или две с антителами только к данной линии. Размножив такую гибридому в пробирке или вырастив ее на мышах, можно получить огромное количество антител к уникальному антигену (или детерминантной группе), затерянному среди других компонентов клетки подобно иголке в стоге сена. Это будет продукт одного клона. В крови иммунизированного животного среди множества других антител он никак не проявится из-за чисто количественных отношений. Благодаря же гибридомам его можно не только обнаружить, но и вывести в линию и получить любое количество соответствующих антител. С помощью гибридом можно обнаружить антигены, характерные для опухолей определенных тканей, получить к ним антитела и использовать их для диагностики и типирования опухолей. Такие моноклональные антитела нашли широкое применение в онкологической клинике. Наконец, во всем мире ведутся активные исследования по использованию моноклональных антител в качестве специфических переносчиков токсических веществ в опухолевые клетки. Пока же с помощью моноклональных антител в опухоль и ее метастазы доставляются радиоактивные вещества, позволяющие обнаружить небольшие узелки опухоли по локализации в них радиоактивности.

Гибридомы сыграли и продолжают играть огромную роль в фундаментальной и прикладной иммунологии. Они созданы на основе клонально-селекционной теории иммунитета и явились самым ярким и окончательным доказательством этой теории. Гибридомы сделали реальностью предполагаемые клоны антителообразующих клеток и позволили даже обнаружить их существование в организме до введения соответствующего антигена. Гибридомы революционизировали иммунологическую промышленность и создали в ней совершенно новые области. Благодаря гибридомам возникли новые методы диагностики многих заболеваний и открылись новые пути для изучения злокачественных опухолей. И хотя гибридомы скорее относятся к гениальным изобретениям, а не к открытиям, они были отмечены в 1984 году Нобелевской премией «за открытие и разработку принципов выработки моноклональных антител с помощью гибридом». Если бы Кёлер и Мильштейн запатентовали свой метод, они вскоре бы стали миллиардерами, так как все, кто использовал бы гибридомы в коммерческих целях, должны были бы платить за право пользоваться патентом. Авторы гибридом, несомненно, понимали это, но в интересах развития науки не пошли на такой шаг. Метод гибридом беспрепятственно вошел во все сферы иммунологии, и сами авторы всемерно способствовали этому, предоставляя свою клеточную линию плазмоцитомы для исследований всем желающим. И первые гибридомы в нашей стране, полученные в 1979–1980 годах, были созданы на основе клеток, ведущих происхождение из лаборатории этих авторов и с их любезного разрешения.