

ІМУНОБІОТЕХНОГІЯ

▣ **1. Моноклональні та поліклональні антитіла.**

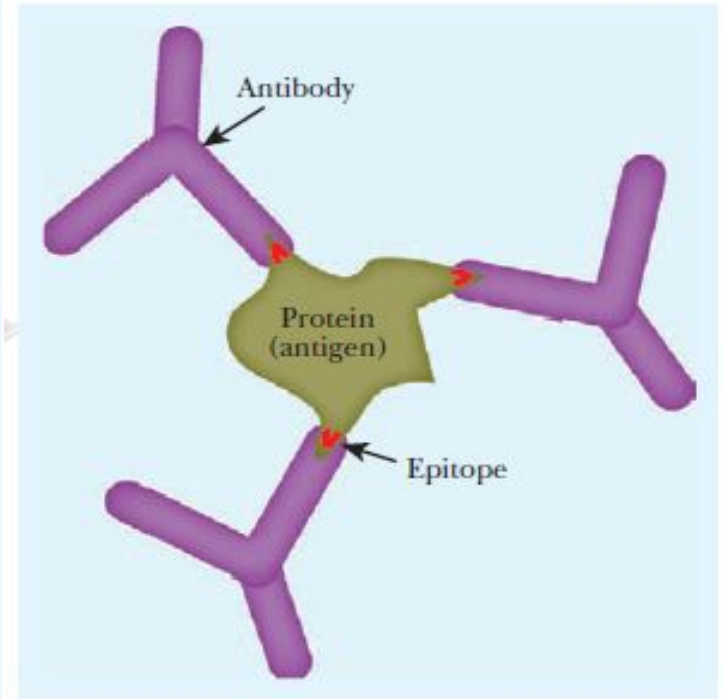
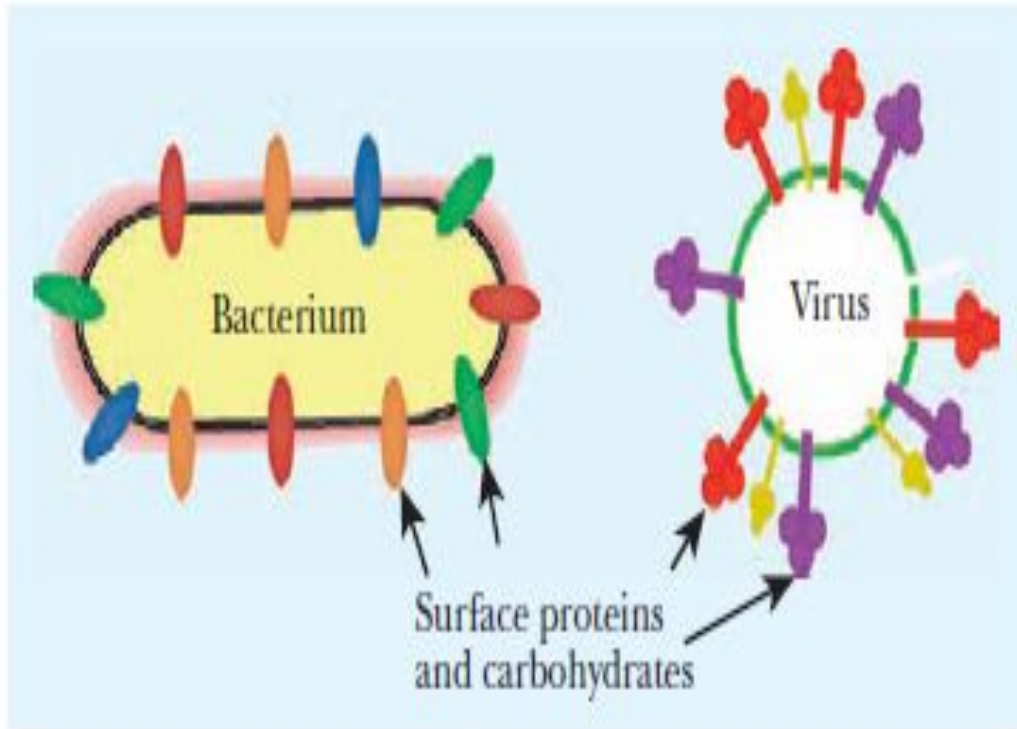
Отримання моноклональних антитіл.

▣ **2. Використання моноклональних антитіл. ELISA-тест.**

▣ **3. Гуманізовані антитіла.**

▣ **4. Вакцини, зворотня вакцинологія.**



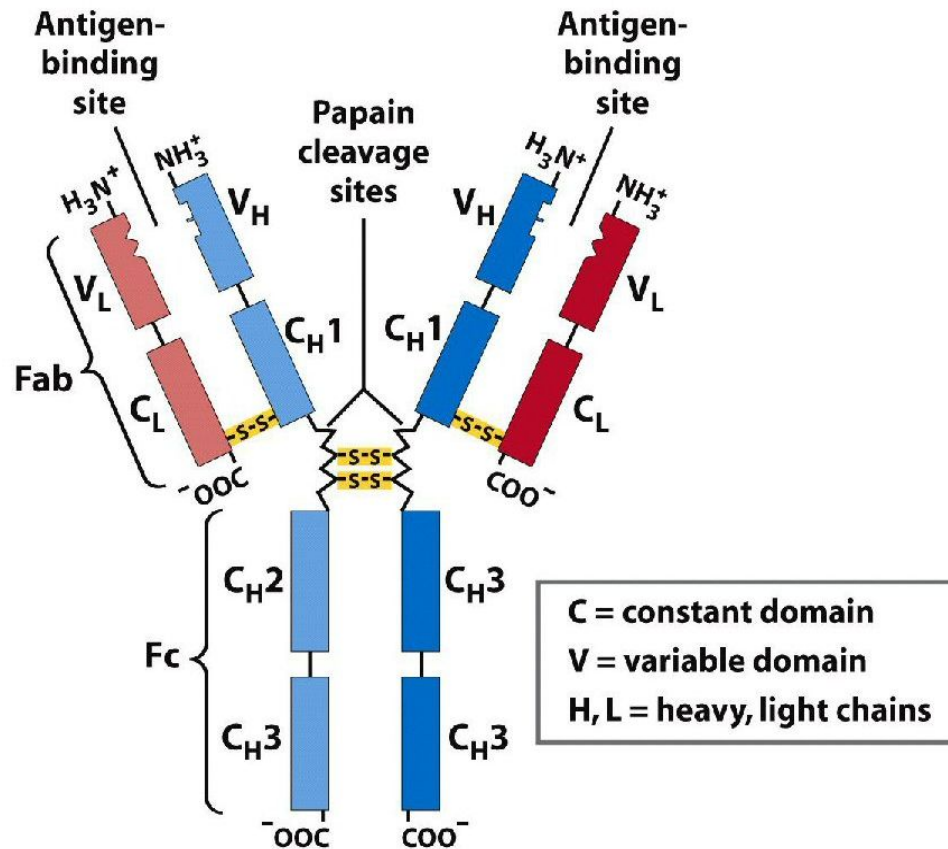


Клітини бактерій та вірусів містять глікопротеїни та ліпопротеїни, які розпізнаються антитілами більшості організмів

Область антигену, яка зв'язується з антитілом, називається **епітопом**



БУДОВА АНТИТІА (IgG)



- **Поліклональні антитіла** – сукупність антитіл, які виробляються пулом В-лімфоцитів на антиген-мішень
- **Моноклональні антитіла** – антитіла, які розпізнають лише один епітоп антигену і походять від однієї клітини В-лімфоциту. Вперше отримані Г.Келлером і Ц.Мільштейном у 1975 р. (Нобелівська премія 1984 року з фізіології та медицини)

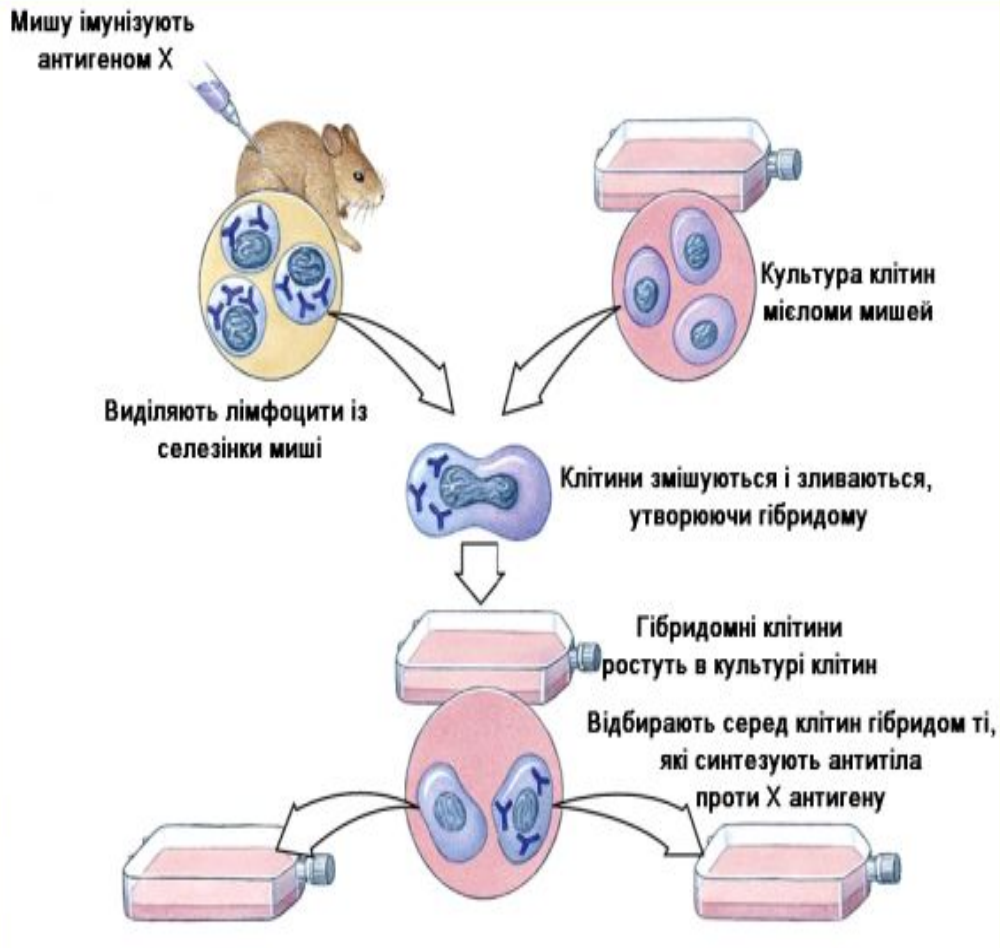


Цезар Мільштейн
(27.10.1927-24.03.2002)



Георг Келлер
(17.04.1945-

Отримання моноклональних антитіл



Моноклональні антитіла продукуються одним В-лімфоцитом.

- 1. Антиген вводиться в мишу, щоб викликати імунну реакцію.
- 2. Виділяють селезінку, а з неї - В-лімфоцити.
- 3. В-лімфоцити в культурі живуть недовго, тому вони зливаються з мієломними клітинами, мутантними за **геном ГГФРТ**. Утворюються **гібридами**.
- 4. Гібридами культивуюються в **середовищі ГАТ** і розділяються таким чином, щоб кожний гібрид був відокремлений від іншого.
- 5. Далі серед клонів проводять скринінг на пошук потрібного антитіла.

Використання моноклональних антитіл

▣ У проведенні імуноферментного аналізу (ELISA-процедура)

Для детекції:

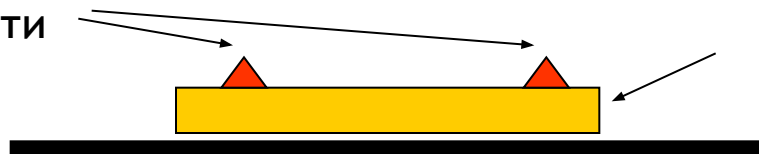
- ✓ гормонів (хоріонічного гонадотропіну, гормону росту, лютеїнізуючого, тиреотропного, пролактину та ін.)
 - ✓ маркерів пухлин (канцероембріонального антигену, рецептора інтерлейкіну-2, рецептора епідермального фактору росту)
 - ✓ цитокінів (інтерлейкіни 1-8, колонієстимулюючий фактор)
 - ✓ лікарських препаратів (теофілін, гентаміцин, циклоспорин)
 - ✓ різних сполук (тироксин, вітамін В12, феритин, продукти розпаду фібрин, Тау-білки)
-
- ▶ ✓ інфекційних захворювань (хламідіоз, герпес, краснуха,

Процедура ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

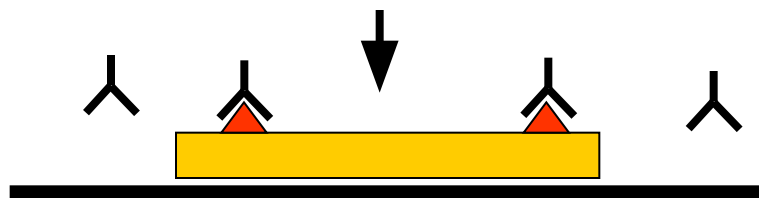
- Зв'язування зразка, який тестується на присутність специфічної молекули (молекули-мішені), на твердій поверхні (пластмасовій пластинці)**
- Додавання антитіл, специфічних до антигенів молекули-мішені (первинних антитіл). Промивання зразка для видалення антитіл, які з ним не зв'язалися**
- Додавання вторинних антитіл, які специфічно зв'язуються з первинними антитілами, але не з антигенами молекули-мішені. Вторинні антитіла зв'язані з ферментами, що перетворюють безбарвний субстрат у кольоровий продукт. Промивання зразка для видалення вторинних антитіл, які з ним не зв'язалися**
- Додавання субстрату. Поява кольорового продукту вказує на присутність молекули-мішені.**

Використовується для виявлення і оцінки концентрації білка у зразку, детекції присутності мінімальних кількостей вірусів чи бактерій. Застосовується в клінічних та домашніх умовах.

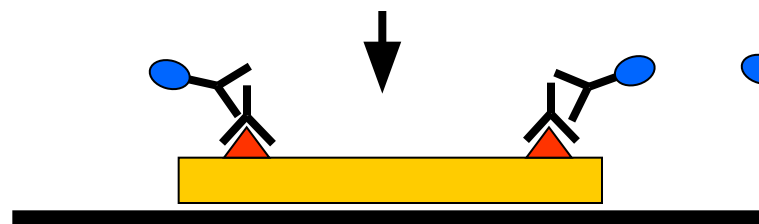
Антигенні сайти



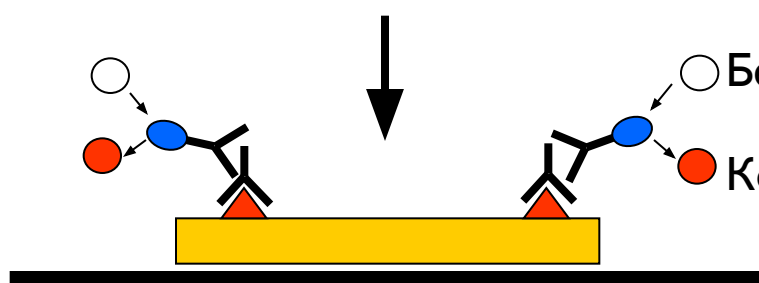
Молекула-мішень



Первинні антитіла



Кон'югат вторинних антитіл з ферментом



Безбарвний субстрат

Кольоровий продукт



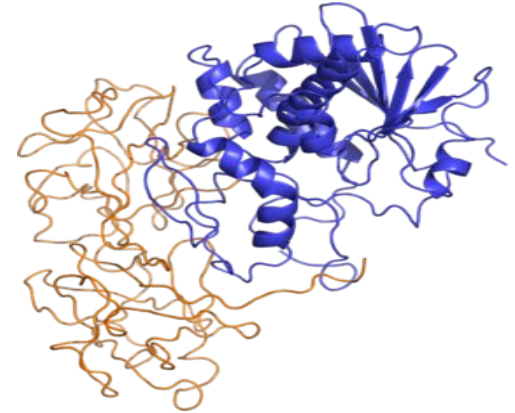
Використання МКА

Для специфічного знищення ракових клітин та вірусів

▣ **Імунотоксини** – комплекси моноклональних антитіл з отрутою білкової природи (дифтерійний токсин, рицин, абрин).

▣ Рицин – білок, виділений з рицини, складається з 2 субод. В специфічно взаємодіє з глікопротеїнами мембрани, а субод. А проникає в клітину, відщеплюється від субод. В і взаємодіє з 60S-субод. В і об'єднують з МКА, специфічними до ракових клітин.

В системі *in vitro* субод. А відділяють від субод. В і об'єднують з МКА, специфічними до ракових клітин.



Білок рицин: субод. А – синього кольору, субод. В – золотистого



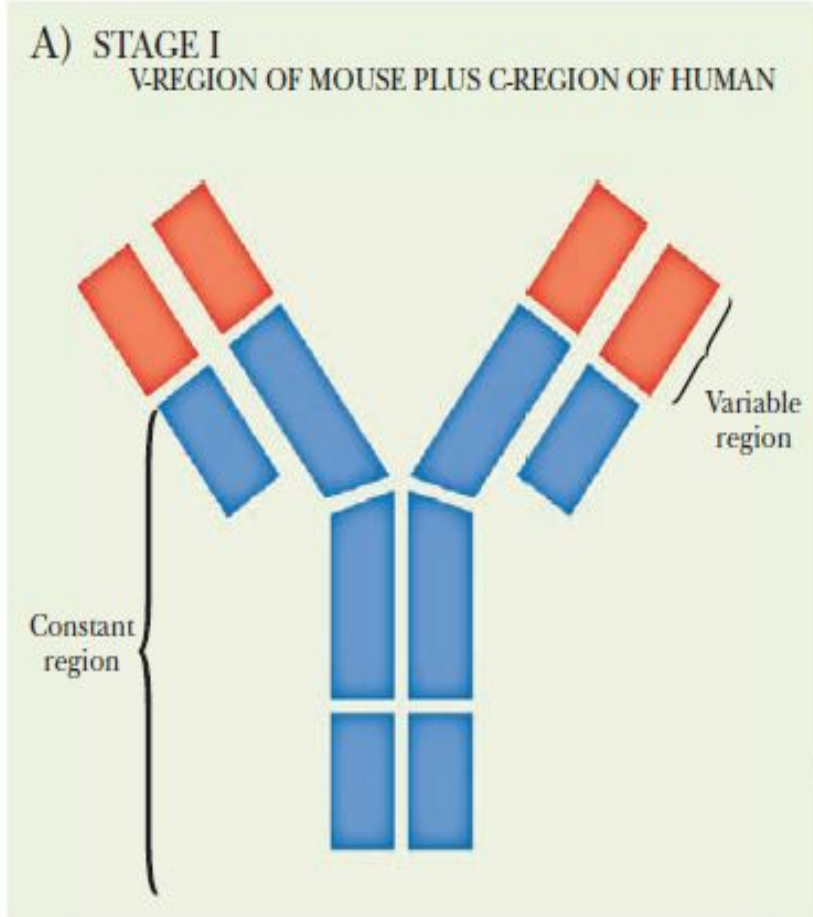
Насіння
рицини

Використання МКА

Для полегшення доставки ліків до місця дії:

- 1. Поміщати в ліпосоми.
- 2. Вбудовувати гени специфічних токсинів в лімфоцити, які інфільтрують пухлину, звільнюючи токсини безпосередньо в клітині.
- 3. Приєднувати молекули лікарських засобів до моноклональних антитіл, специфічних до білків, які є на поверхні визначених клітин, напр., пухлинних.
- 4. Використовують лікарські засоби в неактивній формі, переводячи їх в активний стан за допомогою ферментів. Щоб таке перетворення відбувалося лише поблизу клітини-мішені, фермент приєднують до МКА, специфічного до поверхневого антигену цієї клітини.

Гуманізовані антитіла



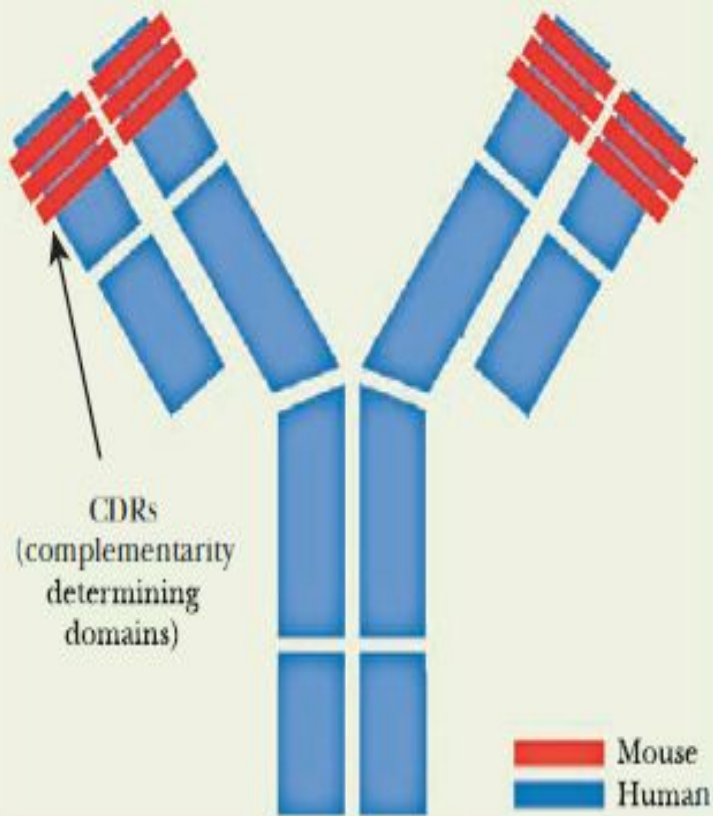
A. Константні домени L і H ланцюгів миші замінюються на людські (химерні антитіла, 25 % білка миші, I генерація гуманізованих антитіл).

Лише варіабельні домени (V-домени) антитіл розпізнають антигени. Це дозволяє замінити С-домени миші на С-домени людини.

- 1. Гібридами першої генерації (містять В-лімфоцити миші) виділяються і культивуються.
- 2. Виділяють ДНК миші, яка кодує антитіла, і клонують її у вектор.
- 3. ДНК константних доменів антитіл миші замінюється на відповідні послідовності людини. ДНК V-домену залишається.
- 4. Гібридний ген (людини-миші) вводиться в іншу мієломну клітину для продукції антитіл в культурі.

B) STAGE II

ONLY CDRs ARE FROM MOUSE, REST IS HUMAN

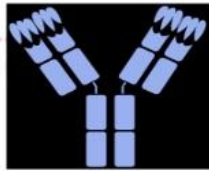


B. Антитіла мають 6 CDR доменів, які визначають сайт зв'язування антигену. Містять 5-10% білка миші, II генерація гуманізованих антитіл

□ Більшість варіацій в V-доменах ланцюгів обмежені трьома короткими сегментами, які утворюють петлі на поверхні антитіла, формуючи антиген-зв'язуючий сайт. Вони відомі як **гіперваріабельні райони (complementarity determining regions, CDR)**. Кожен антиген-зв'язуючий сайт має 6 ГВР: 3 легкого ланцюга та 3 – важкого (**II генерація**).

□ **III генерація** - повністю гуманізовані антитіла передбачають повну заміну 6 ГВР миші на людські.

МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА



МИШЕЙ

Ортоклон ОКТ3, Зевалин, Бексар, Ремоваб



ХИМЕРНІ

Реопро, Мабтера, Симулект, Ремкейд
Эрбитукс, Адцетрис



ГУМАНІЗОВАНІ

Зенапакс, Синагис, Герцептин,
Милотарг, Кэмпас, Ксолар, Раптив,
Авастин, Тизабри, Актемра, Луцентис,
Симвиза, Солирис, Перьета



ЛЮДСЬКІ

Хумира, Вектибикс, Симпони
Арзерра, Бенлиста, Ервой
Пролна/Эксджива

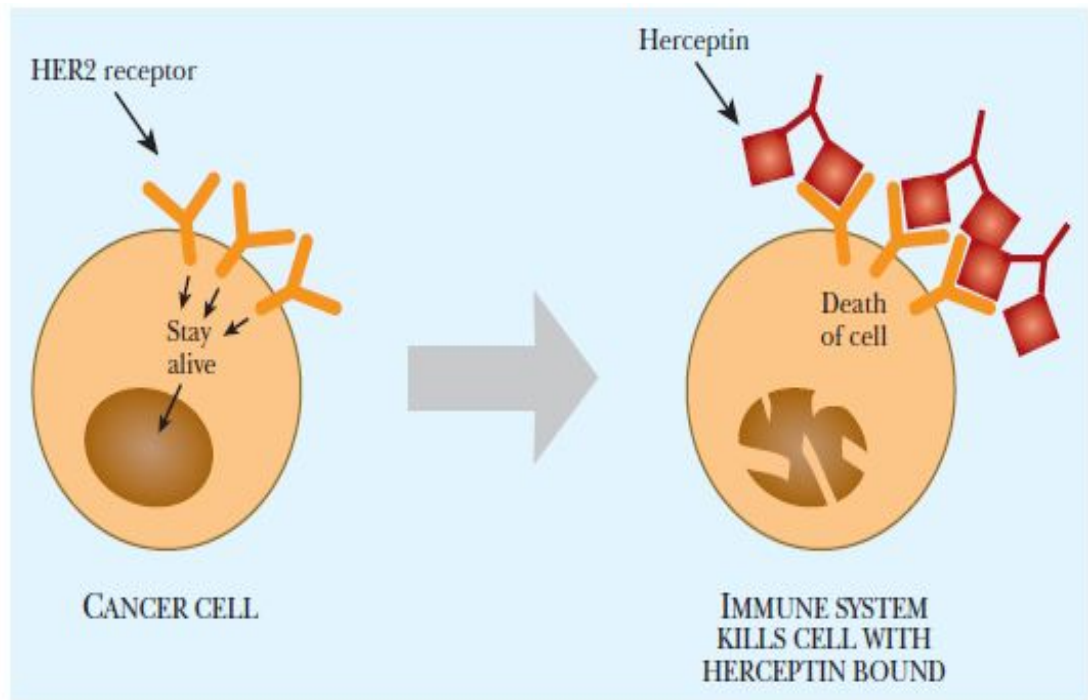


**"БІЛКИ
ЗЛИТТЯ"**

Амевив, Энбрел, Оренсия²
Аркалист, Энплейт
Эйлеа /Залтрап

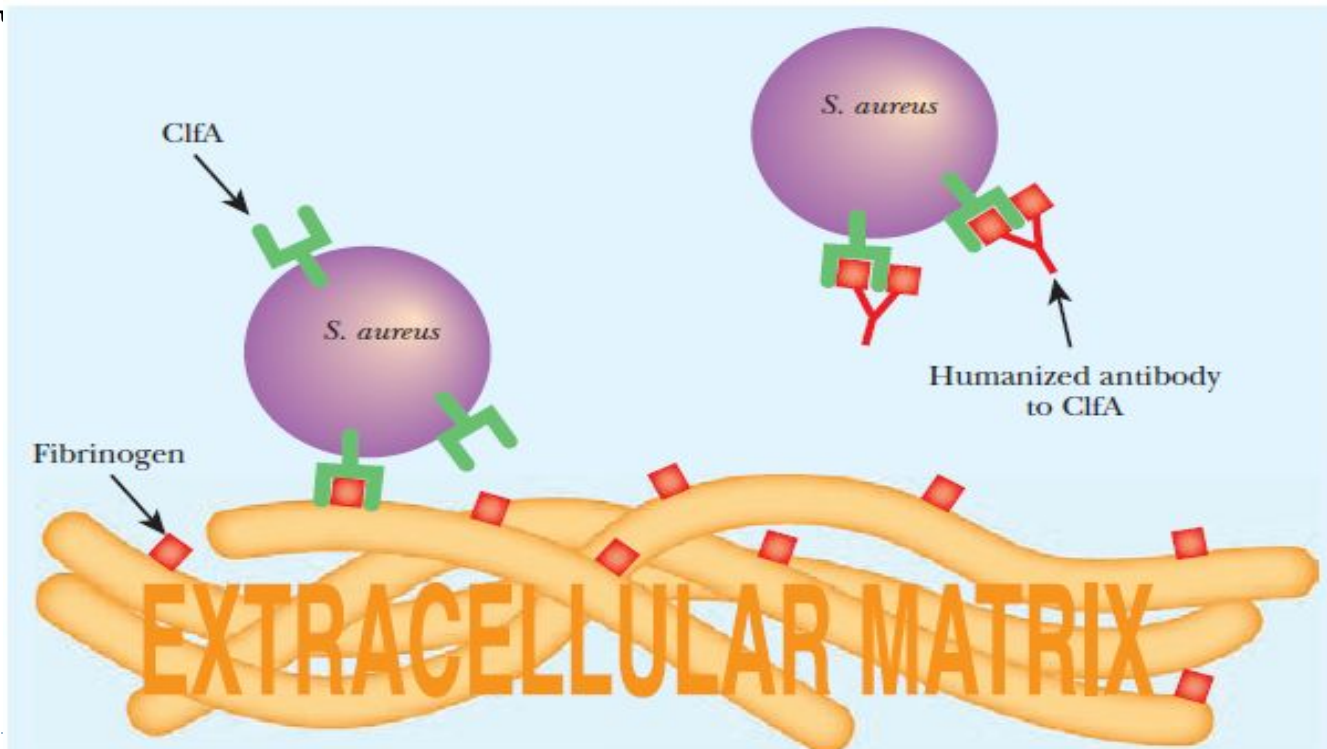
Клінічне застосування гуманізованих антитіл

- Herceptin – перше гуманізоване антитіло (ГА), яке було застосоване в медицині для лікування раку грудей у 1998 р. Зв'язується з HER2 рецептором з родини рецепторів епідермального фактору росту, які контролюють процеси проліферації, диференціації та апоптозу. У пацієнтів спостерігається надекспресія HER2. Зв'язування Герцептину з рецептором блокує передачу сигналів в середину клітини. Це зупиняє поділ клітини та індукує імунну відповідь.




Клінічне застосування гуманізованих антитіл

- Для боротьби з бактерійними (госпітальними, нозокоміальними) інфекціями у лікарнях.
- Серед *S. aureus* є метицилін- (MRSA) та ванкоміцин (VRSA) резистентні штами. Ці антибіотики найбільш ефективні проти цієї бактерії. Антитіла до **C1fA** (clumping factor A, фактор, який зумовлює адгезію бактерії на фібриногені) перешкоджають зв'язуванню бактерії з фібриногеном. Неколонізовані бактерії не спри



ВАКЦИНИ

Особи, які перенесли інфекційне захворювання, стають до нього стійкі. Це відбувається завдяки **імунній пам'яті**, яка зумовлена спеціалізованими В-клітинами – **клітинами пам'яті**. Імунну пам'ять можна стимулювати **вакцинами**.



Типи вакцин

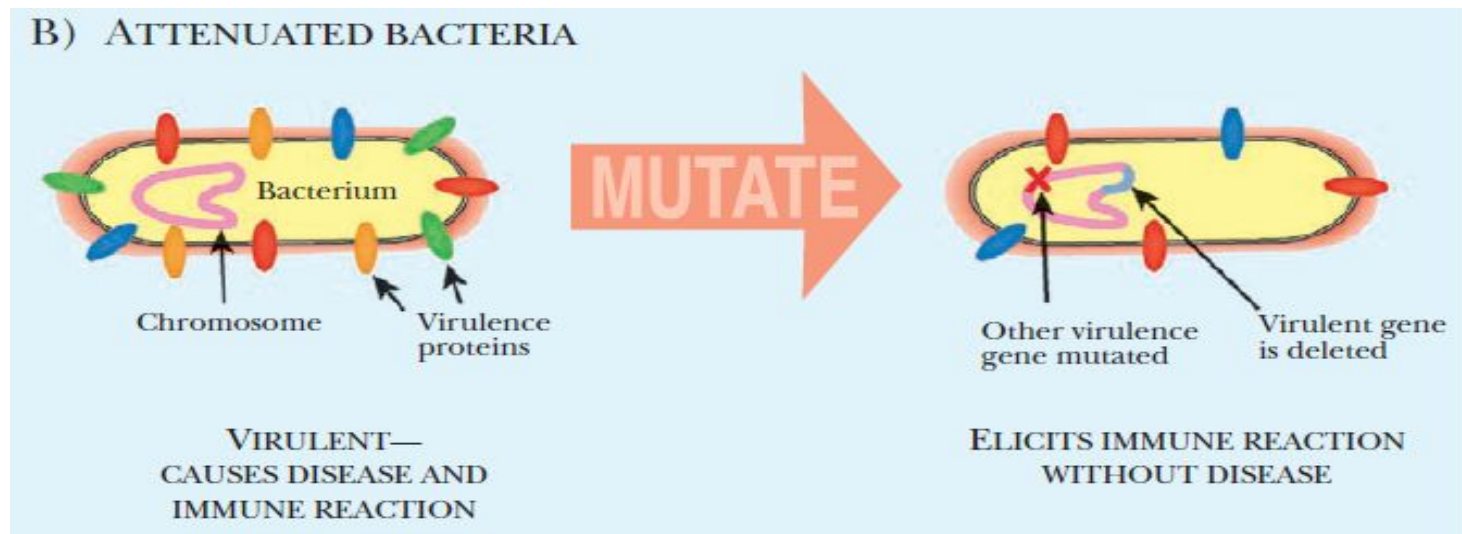
- 1. Більшість вакцин – інфекційні агенти, **інактивовані високою температурою або хімічно**. Такі вакцини спричиняють найкращу імунну відповідь, але не всі інфекційні агенти піддаються культивуванню і робота з живими вірусами є небезпечною.

A) HEAT DENATURED VIRUS



2. АТЕНЮЙОВАНІ ВАКЦИНИ

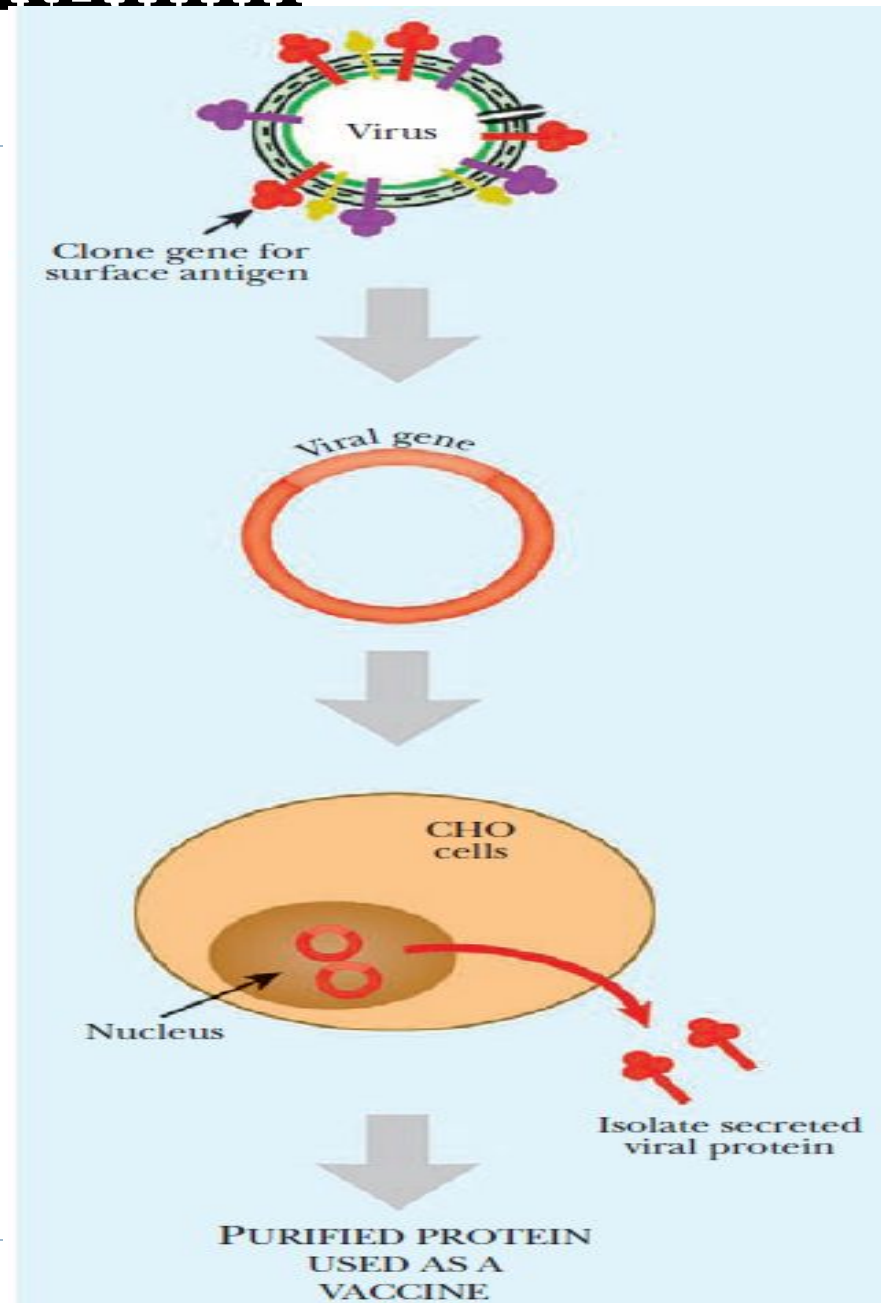
- Це живі патогени, які більше не експресують токсини чи протеїни, що спричиняють захворювання. Або це можуть споріднені, але непатогенні лінії інфекційних агентів.
- Атенюйовані бактерії чи віруси містять мутації в генах, які спричиняють захворювання, або у них методами генної інженерії ці гени видалено. Імунна система розпізнає такі атенюйовані патогени.
Недоліки: можлива реверсія мутації; потрібно знати гени, що спричиняють захворювання.



3. СУБОДИНИЧНІ ВАКЦИНИ

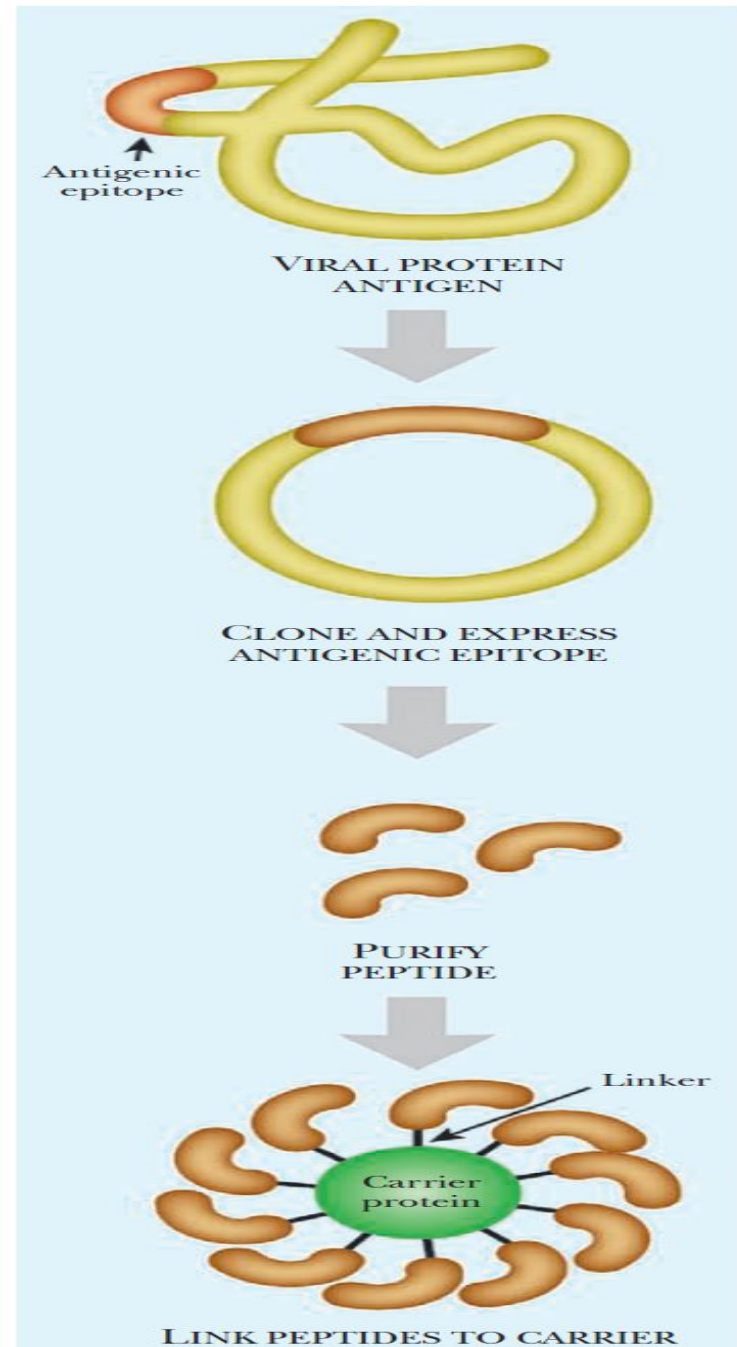
□ Вакцини проти одного компонента чи протеїна інфекційного агента. Створюють методами рекомбінантних ДНК. З патогена ізолюють антигенний протеїн і його ген клонують у вектор експресії. Ген експресується в культурі клітин (напр., Chinese hamster ovary, CHO). Отриманий протеїн виділяється, очищається і використовується як вакцина (вірус простого герпесу, холера SARS, людський папіломавірус, *S. aureus*).

□ **Недолік:** протеїн може втрачати свою активність в результаті неправильного укладання в культурі клітин.



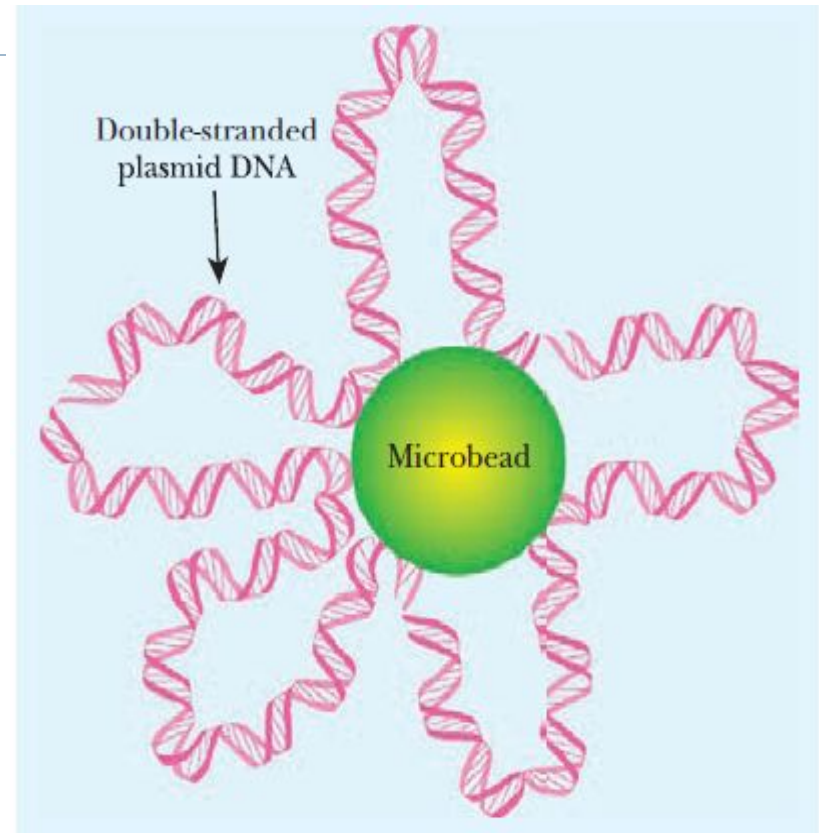
4. ПЕПТИДНІ ВАКЦИНИ

- Несуть невелику частину антигенного протеїну патогена, який викликає сильну імунну відповідь. Оскільки протеїн невеликий, то кілька пептидів кон'югують з білком-носієм, щоб запобігти деградації та стимулювати імунну відповідь (малярія (в розробці), рак, алергії).



5. ДНК-вакцини

- Принцип **ДНК-вакцин** полягає у застосуванні ДНК замість цілого мікроорганізму або очищених білків, яка кодує потрібні антигени та викликає імунну відповідь (генетична імунізація). ДНК-вакцини складаються з плазмиди, яка несе ген антигена від контролем сильного промотора, напр., промотора цитомегаловіруса. ДНК осаджують на мікрокульку і вводять у м'язи. Ген експресується кілька тижнів, впродовж яких синтезується кількість білка, яка здатна викликати імунну відповідь, не викликаючи захворювання. Така вакцина дешевша, ніж очищений білок, та може зберігатися при кімнатній температурі.
- **Недолік:** ДНК послідовності можуть індукувати імунну відповідь.



Мікрокульку вкривають плазмідною ДНК, яка містить ген антигену, і вводять пацієнту.

1. Вибір антигенного протеїну

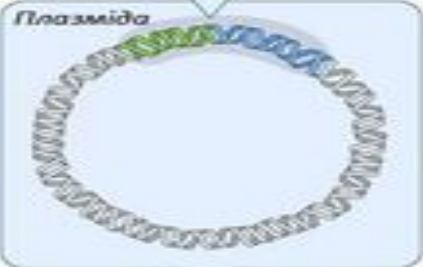
Вірус
лихоманки
Західного Нілу



2. Отримання послідовності гену



3. Клонування потрібного фрагменту за допомогою ПЛР



4. Підбір вектору Вставка гену в плазміді

5. Введення плазміді в бактерію



6. Культивування бактерії для клонування ДНК

Хроматографічна колонка

Схема створення ДНК-вакцини на прикладі вакцини проти вірусу лихоманки Західного Нілу



7. Виділення й очищення потрібної плазміді

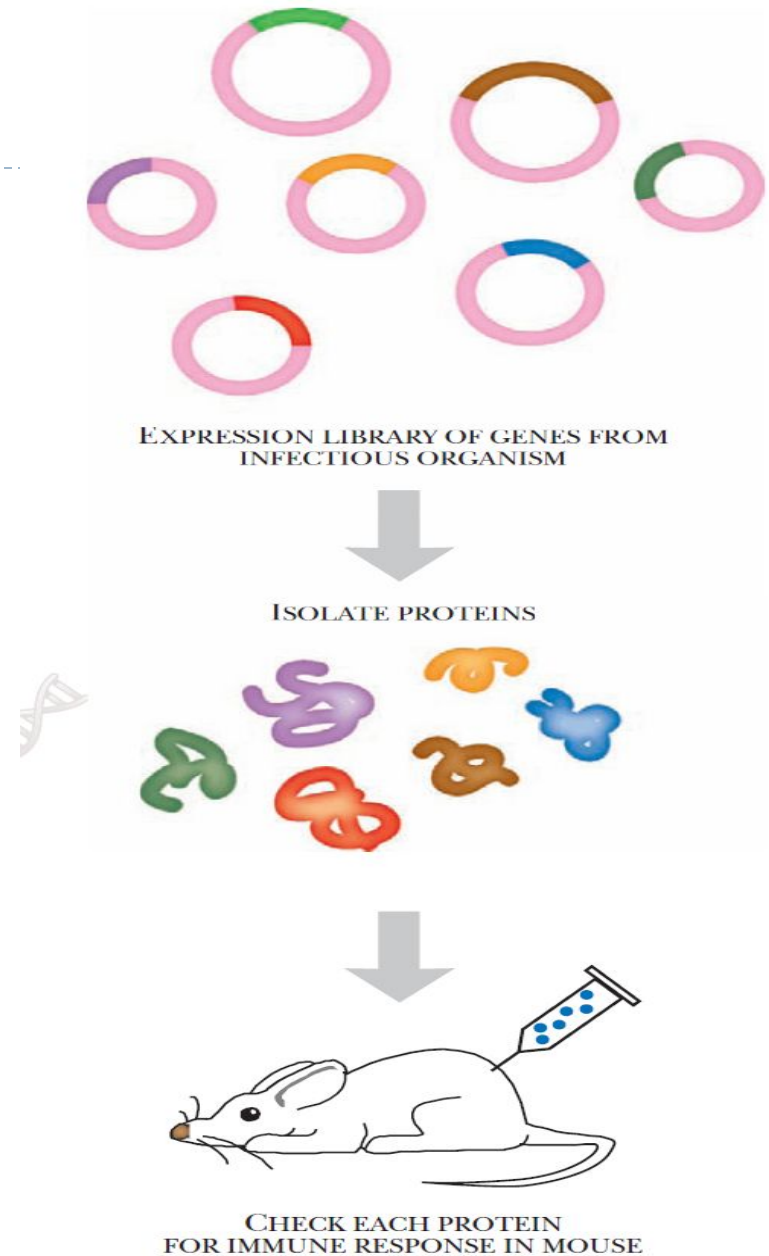
Вакцина

6. ІСТИВНІ ВАКЦИНИ

- Альтернатива до ін'єкційних вакцин.
- **Переваги:** термостабільні при зберіганні, недороговартісні. Зберігаються як звичайний урожай. Такі вакцин можна отримувати у великих кількостях. Пацієнту достатньо з'їсти певну порцію.
- Наприклад: генно-інженерними методами створено картоплю, яка містить вакцину **від гепатиту В**. Випробування на добровольцях показали, що у 60% з них в крові були антитіла проти гепатиту В.
- В перспективі використання *Nicotiana benthamiana*, який легко піддається трансгенозу. Передбачається, що антиген буде експресуватися в хлоропластах листків. Листки будуть збирати, мити, заморожувати. Порошок пакуватиметься у желатинові капсули. Такі вакцини легко транспортувати, вони термостабільні, капсули легко ковтати.

Зворотня вакцинологія

Використовує інформацію про секвеновані геноми для пошуку нових потенційних вакцин. Пошук починається з клонування кожного гена інфекційного агента в бібліотеку генів. Отримані протеїни виділяються, очищаються та вводяться мишам для отримання імунної відповіді. Кожний протеїн тестується на здатність стимулювати імунну систему і здатність захищати від реального патогена. Протеїни, які зумовлюють найсильнішу відповідь, використовуються надалі як субдинічні вакцини чи як окремі вакцини.



Зворотня вакцинологія: застосування

- Для створення вакцини проти ***Neisseria meningitidis*** серотипу В (збудник менінгококової інфекції, найтяжчим проявом якої є гнійний менінгіт). Атенюйована вакцина не була ефективною.
 - У *E.coli* було створено бібліотеку генів 350 різних протеїнів *N. meningitidis*, які були виділені і очищені. Кожний з протеїнів був індивідуально перевірений на його наявність на поверхні бактерії методом ELISA. Серед 350 протестованих протеїнів, 29 були відібрані як потенційні вакцини.
-



**ДЯКУЮ ЗА
УВАГУ**

