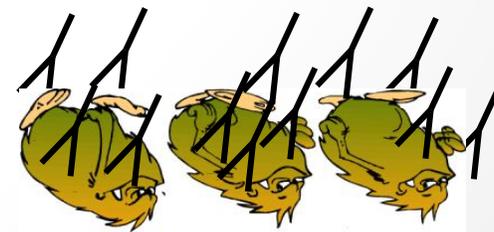




Антитела

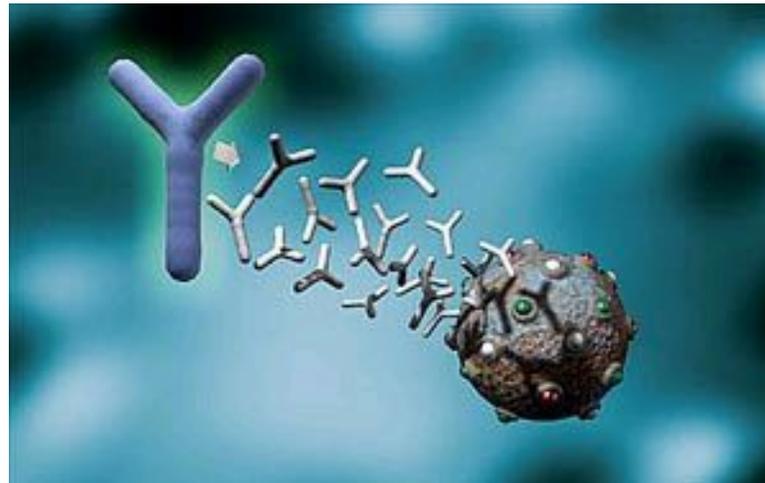
Стройлова Юлия Юрьевна
с.н.с. лаборатории
молекулярной и клеточной
биологии Института
молекулярной медицины

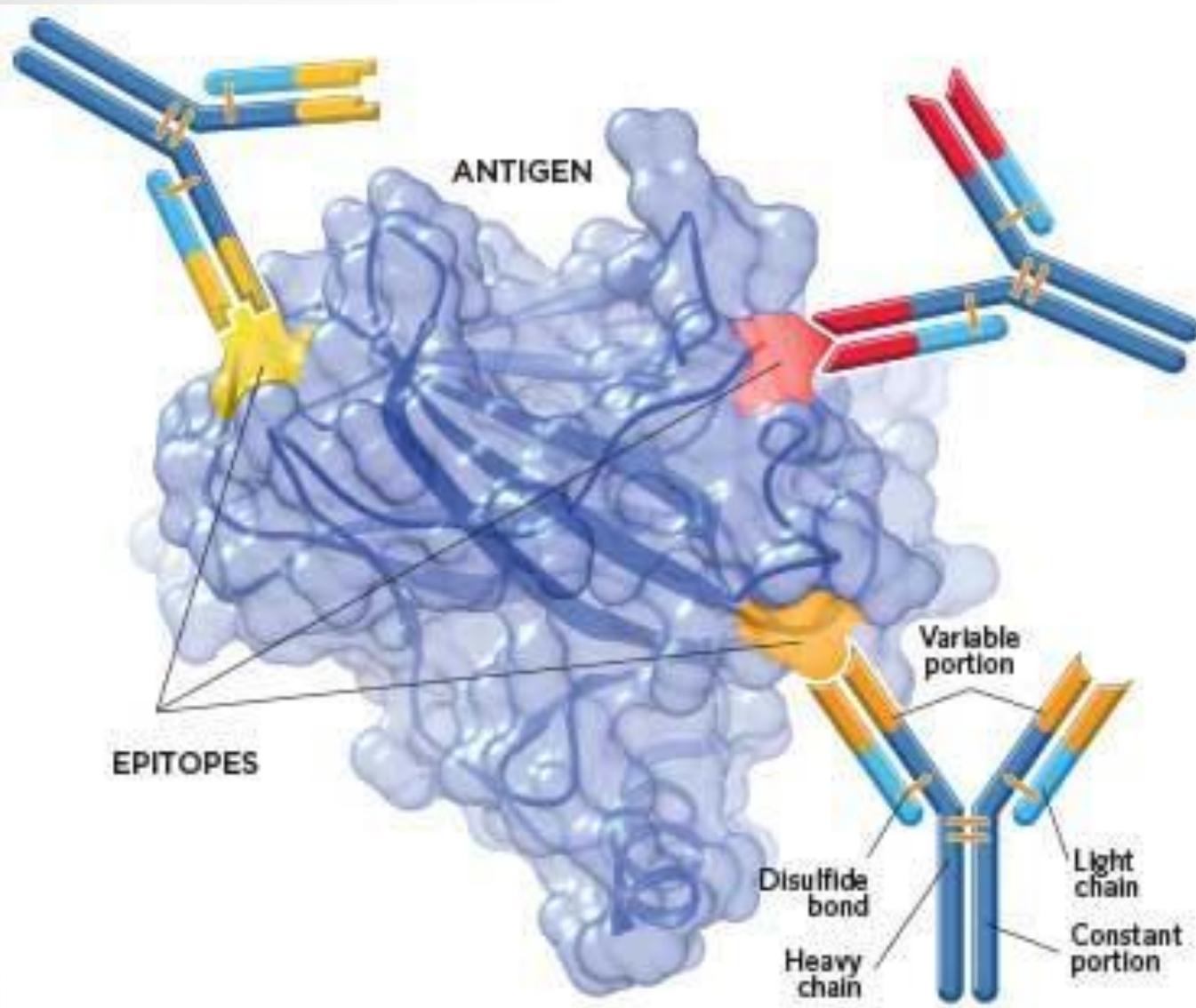


- Антитела, строение и функции
- V(D)J-рекомбинация
- Получение моноклональных антител
- Иммунохимические методы – ИФА и Western blot, иммуноцитохимия
- Абзимы
- Лекарства на основе антител

Антитела (иммуноглобулины) – это сывороточные белки, образующиеся в ответ на действие антигена и способные к специфическому взаимодействию с ним.

Продуцируются **В-лимфоцитами**.





Эпитоп (англ. epitope), или антигенная детерминанта — часть макромолекулы антигена, которая распознаётся иммунной системой (антителами, В-лимфоцитами, Т-лимфоцитами).

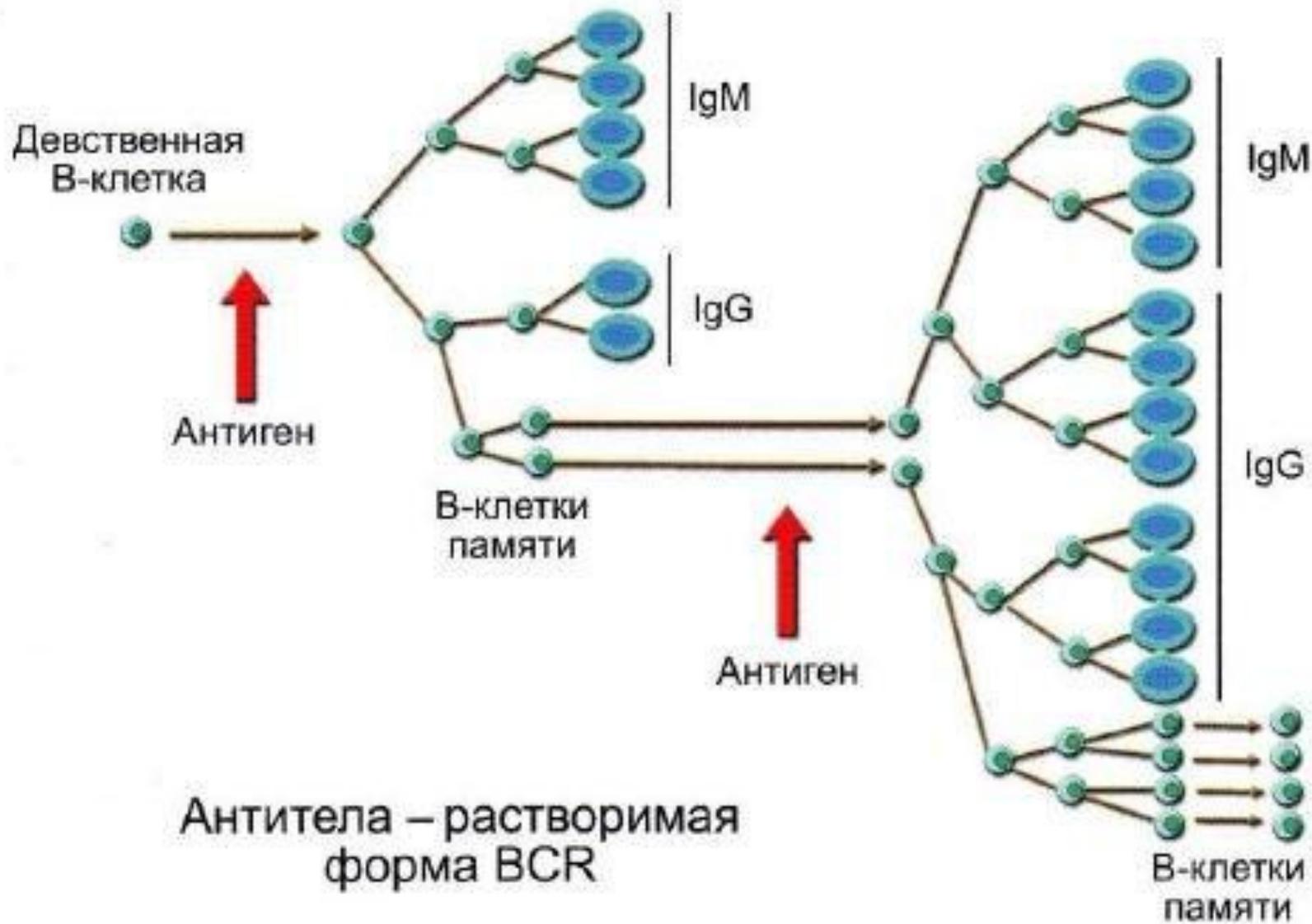
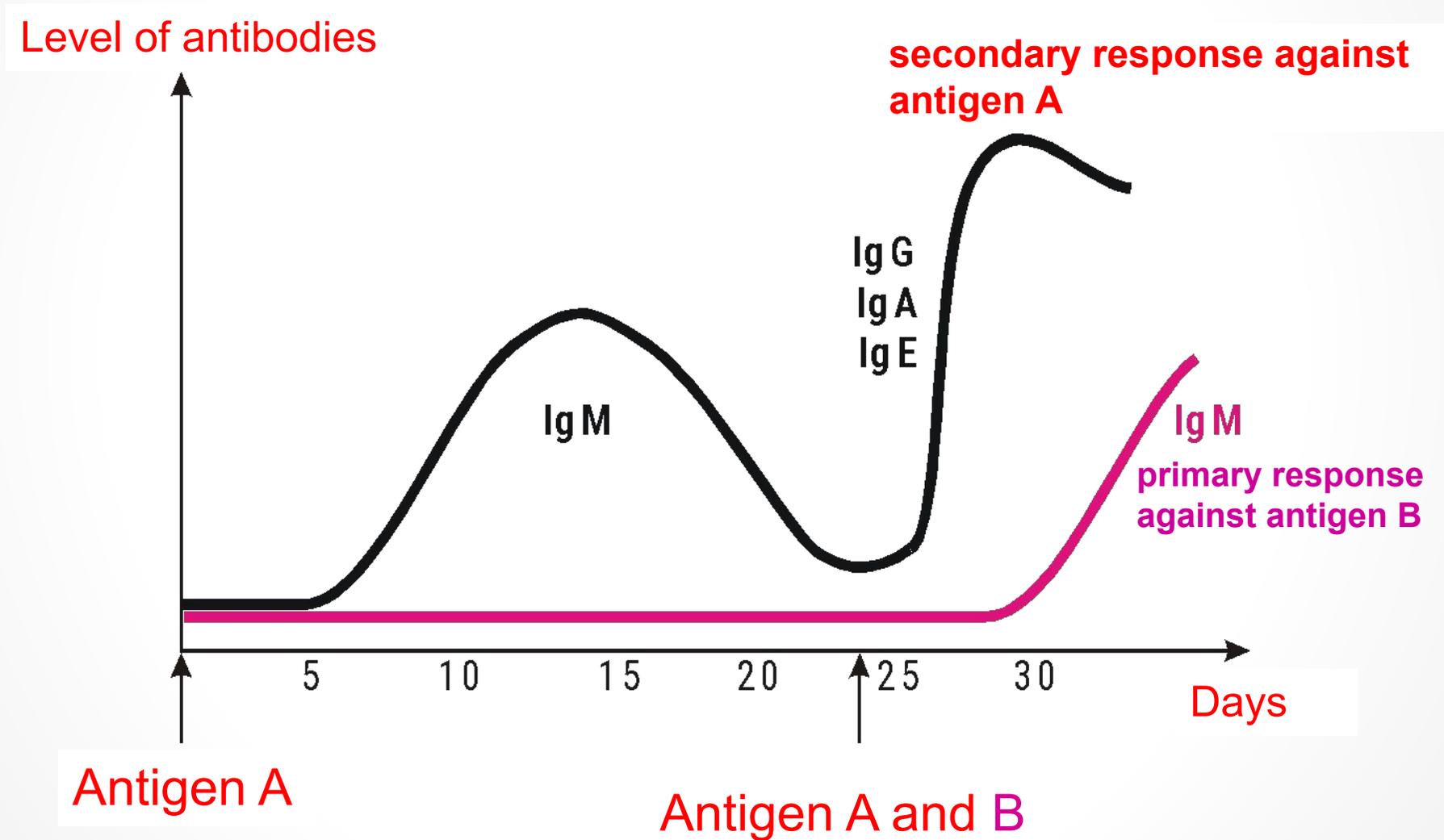
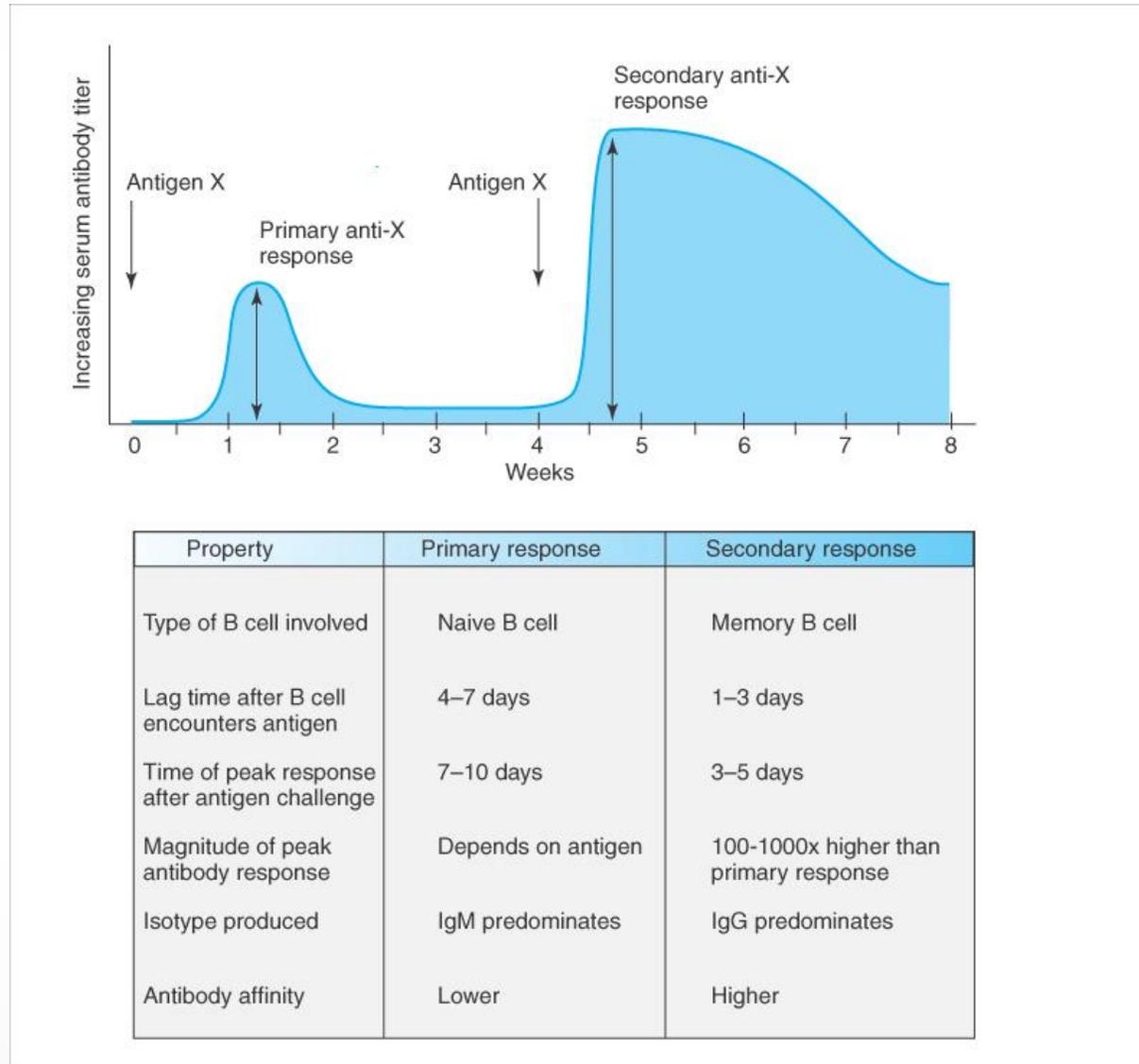


Рис. 11.1. Клеточные стадии в формировании первичного и вторичного ответа на антигенный стимул

Продукция антител при первичном и вторичном ответе

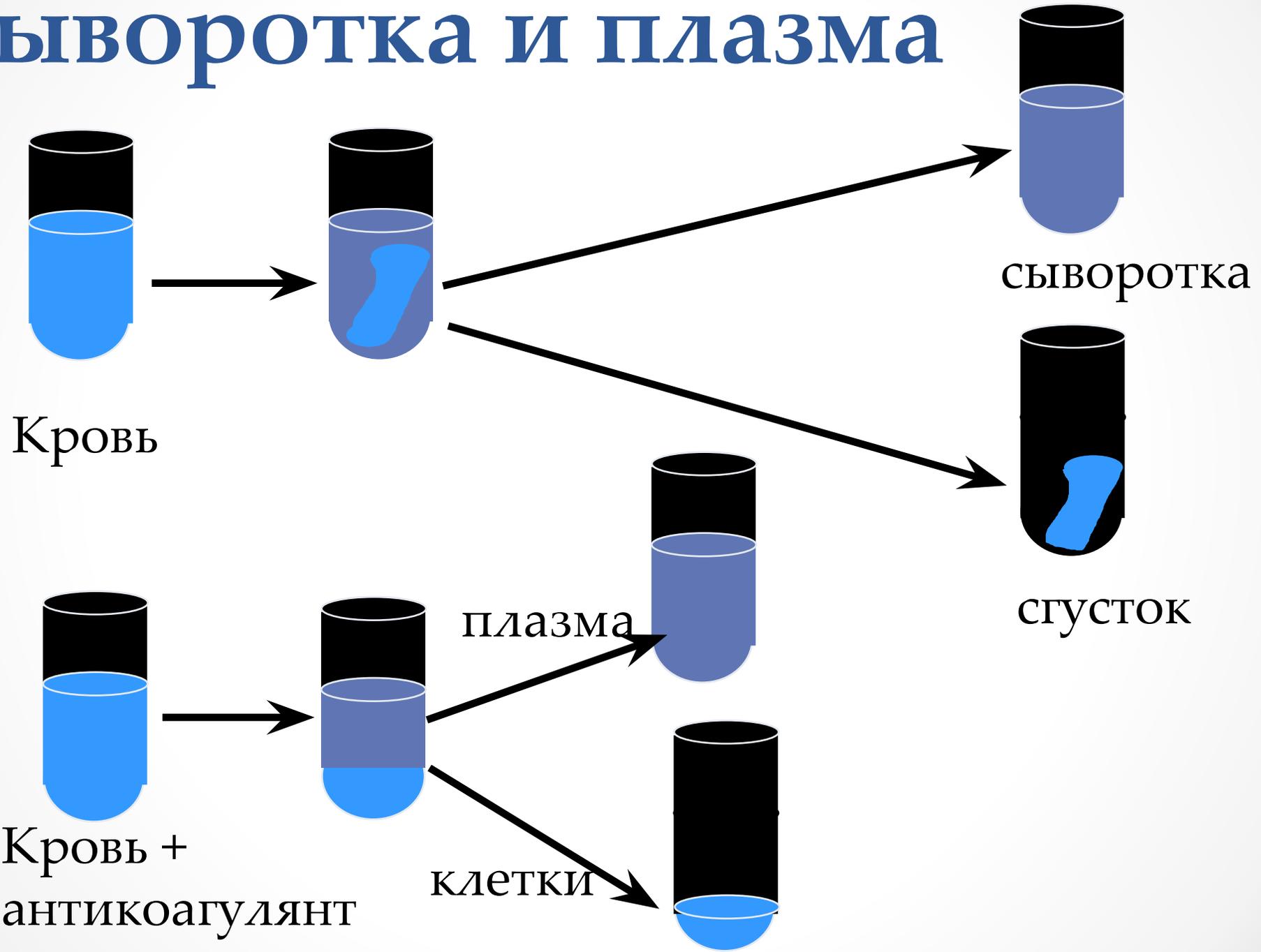


Продукция антител при первичном и вторичном ответе

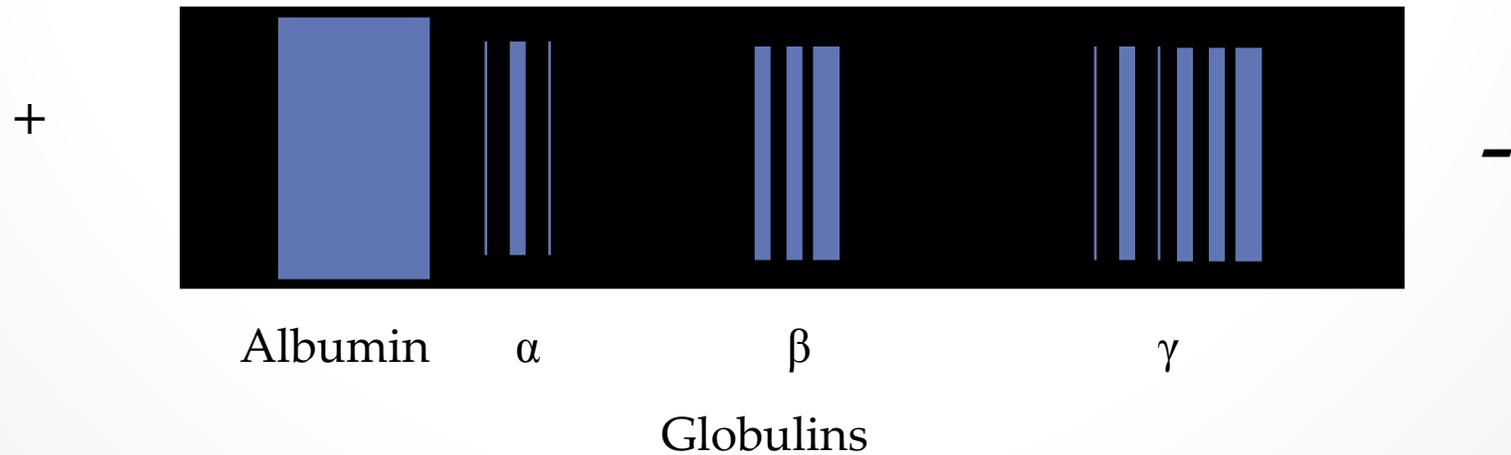
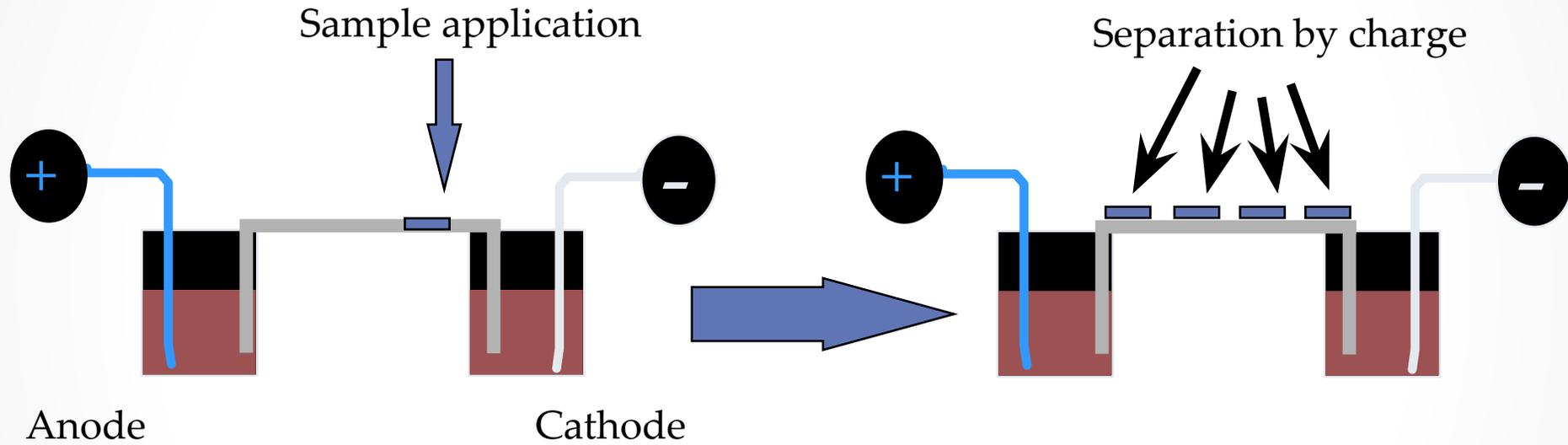


- Самое первое антитело было обнаружено Берингом и Китагато в 1890 году, однако в это время о природе обнаруженного столбнячного антитоксина, кроме его специфичности и его присутствия в сыворотке иммунного животного, ничего определенного сказать было нельзя.
- Только с 1937 года — исследований Тизелиуса и Кабата, начинается изучение молекулярной природы антител.
- Авторы использовали метод электрофореза белков и продемонстрировали увеличение гамма-глобулиновой фракции сыворотки крови иммунизированных животных. Адсорбция сыворотки антигеном, который был взят для иммунизации, снижала количество белка в данной фракции до уровня интактных животных.

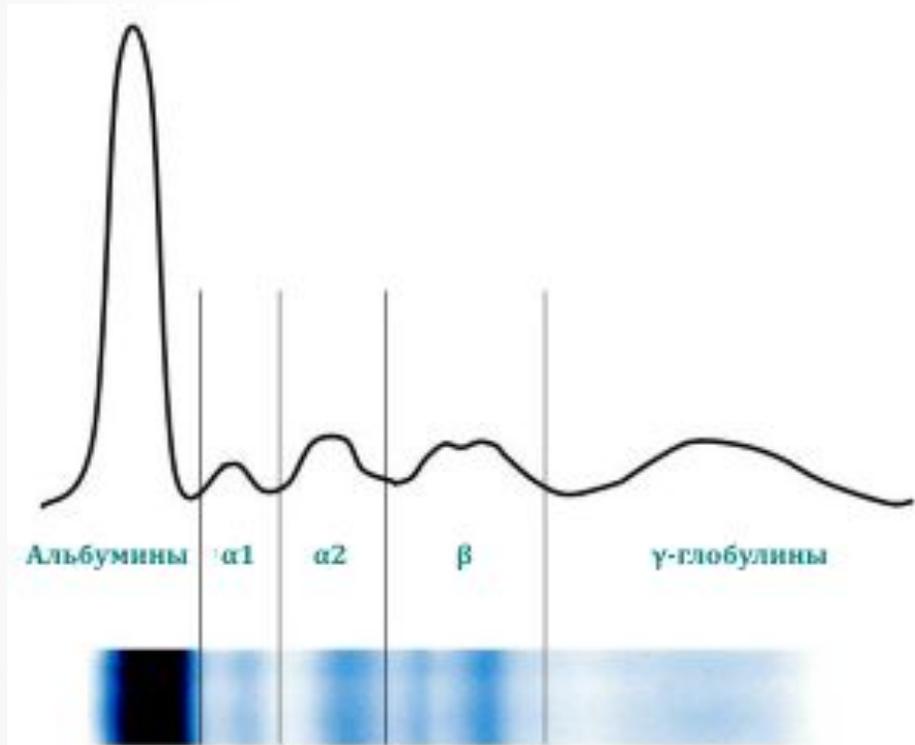
Сыворотка и плазма



Электрофоретический анализ сыворотки крови

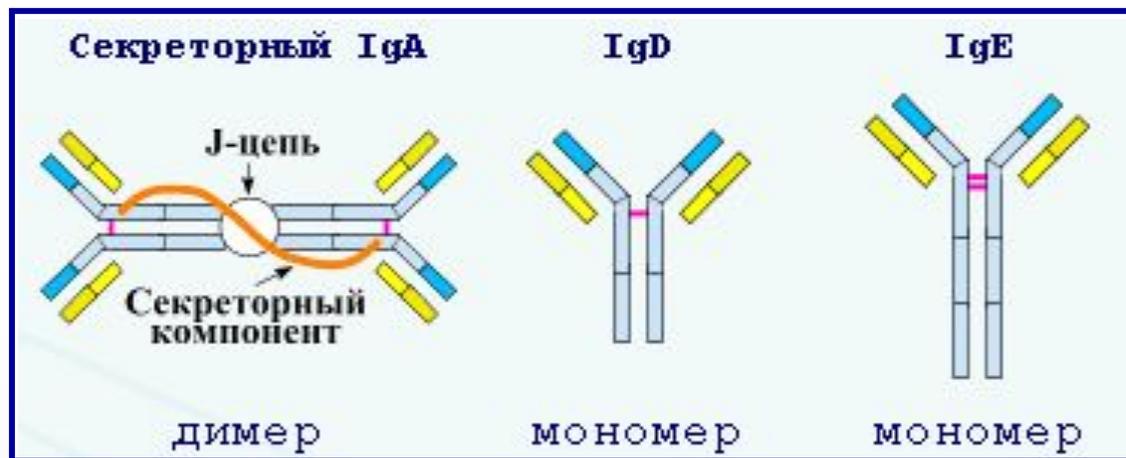
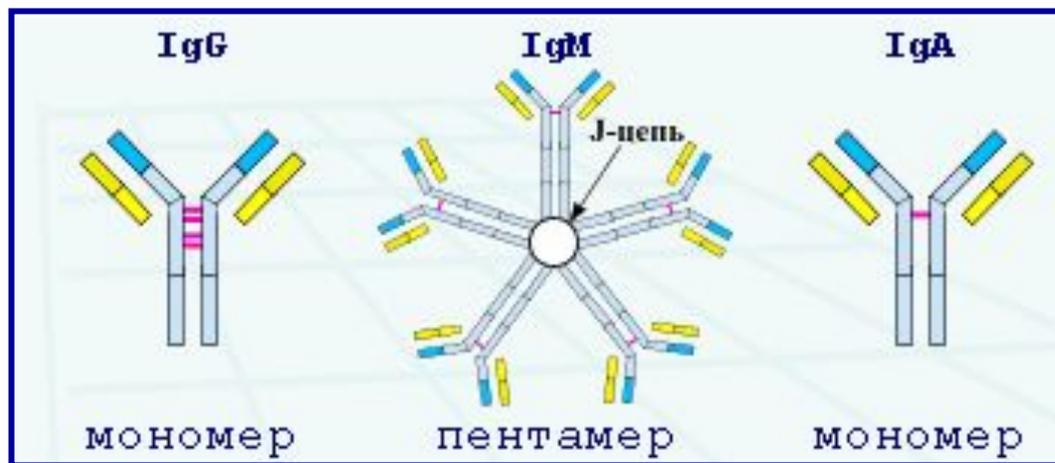


Белки сыворотки



Белки из-за наличия избыточного отрицательного заряда движутся к аноду, разделяются на пять фракций - альбумины, α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулины. После разделения белки можно окрашивать с помощью красителей и денситометрически оценивать количества белков в полученных окрашенных полосах.

Структура иммуноглобулинов различных классов



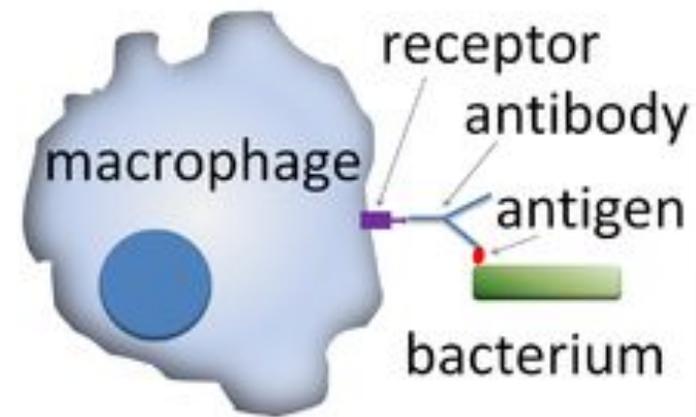
Классы иммуноглобулинов

- **Ig A** - Обеспечивает защиту слизистых оболочек от инфекции (местный иммунитет).
- **Ig M** - синтезируется на ранних стадиях иммунного ответа, пентамер.
- **Ig G** – синтезируется на поздних стадиях первичного и в процессе вторичного иммунного ответа, обеспечивает защиту от микроорганизмов и токсинов, активирует компоненты комплемента, проникает через плаценту, составляет 75% от всех иммуноглобулинов.
- **Ig E** - Уровень в крови увеличивается при аллергических и паразитарных заболеваниях.
- **Ig D**

Функции иммуноглобулинов

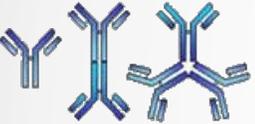
Функция иммуноглобулинов – гуморальный иммунный ответ:

- Связывание антитела с **поверхностным** антигеном активирует систему комплемента (система белков-перфоринов) и запускает фагоцитоз.
- Связывание антигена со **свободными** антигенами вызывает их агглютинацию и фагоцитоз.

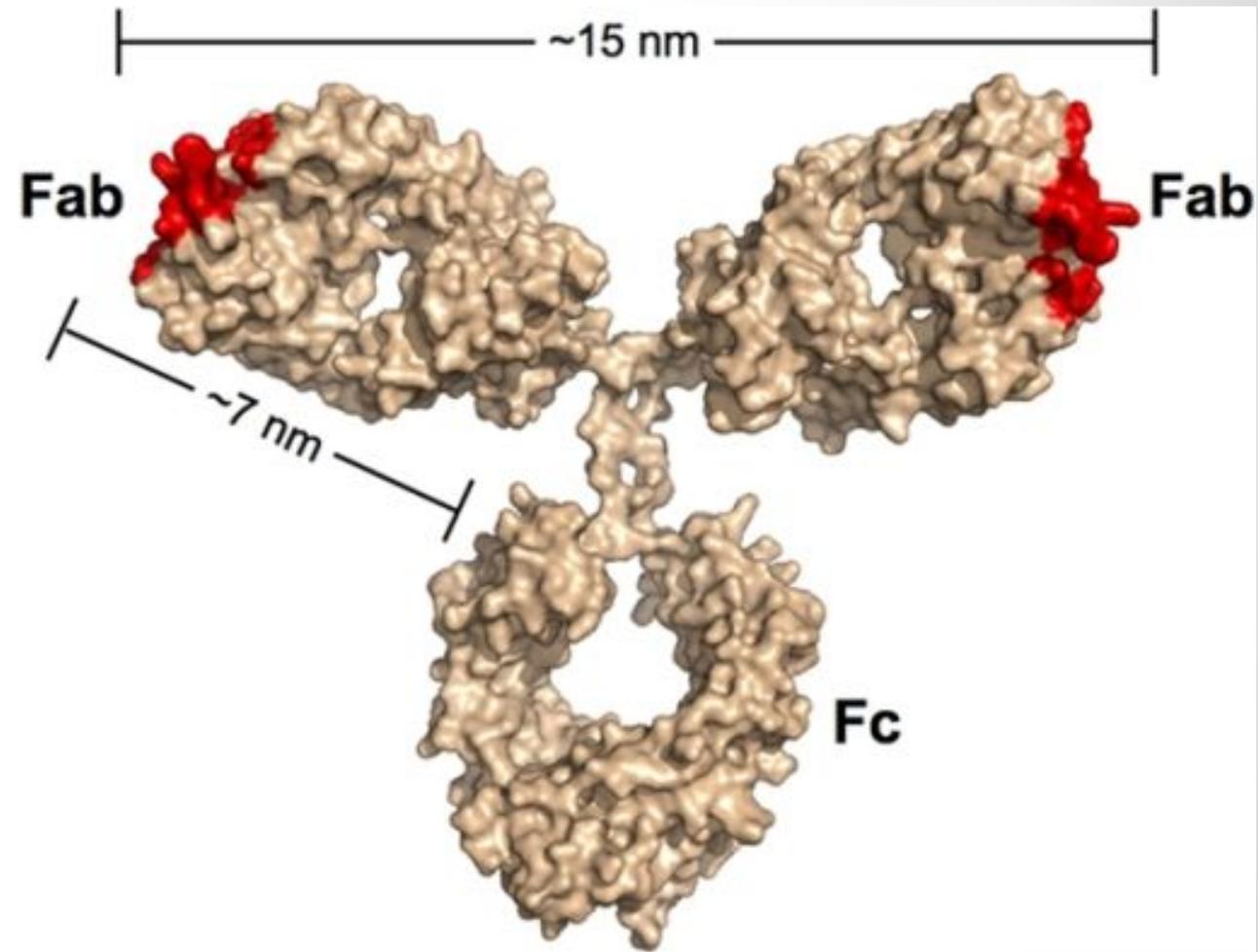
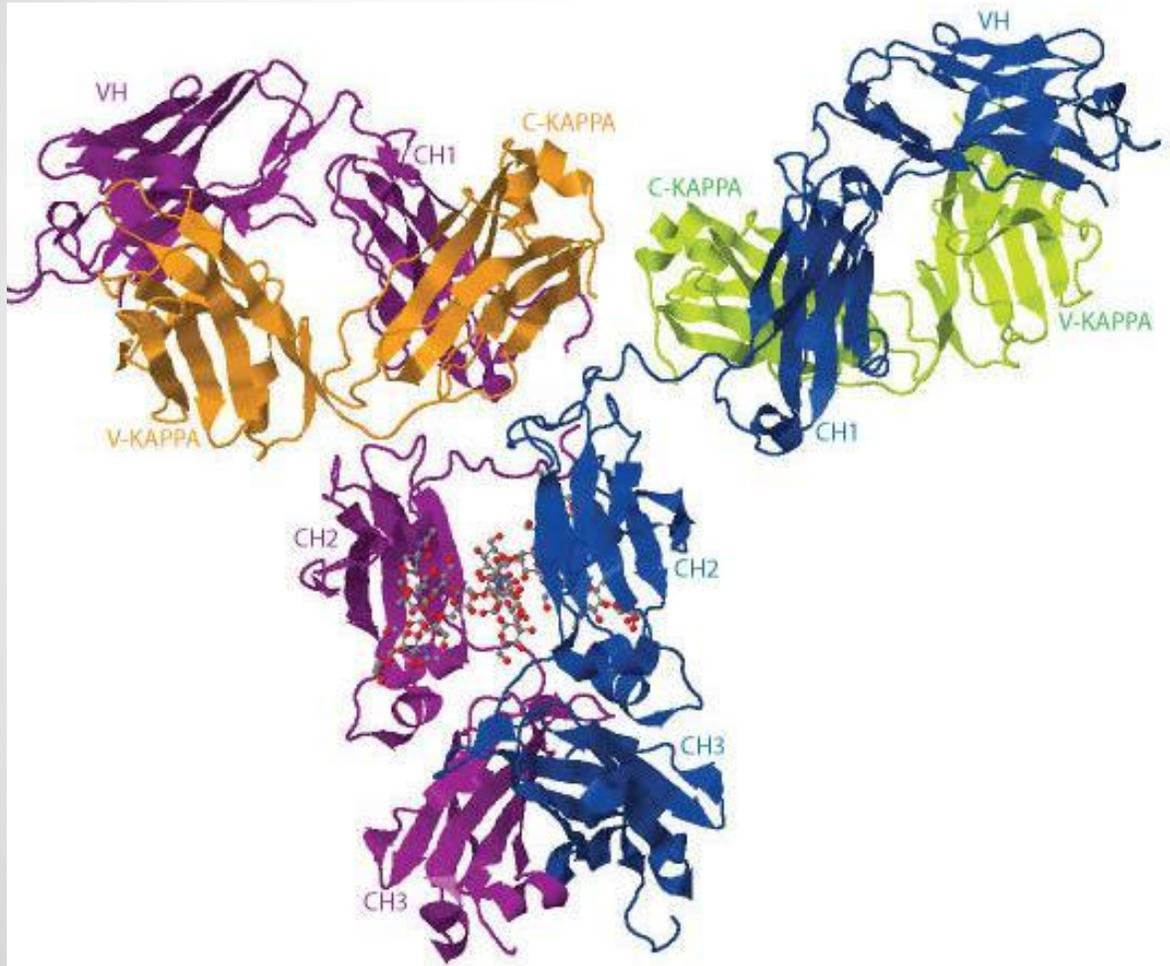


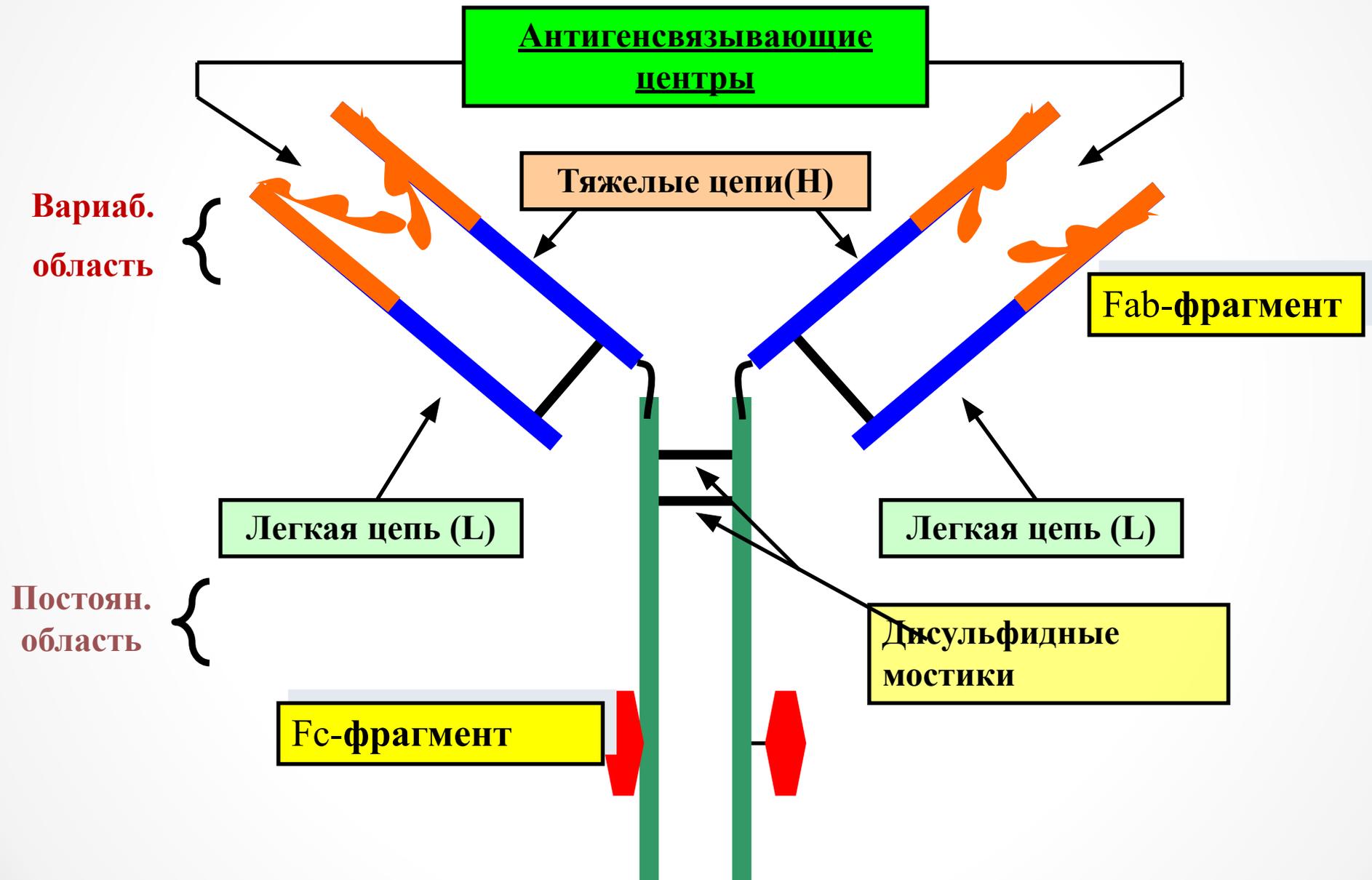
Функции антител

- Иммуноглобулины всех изотипов бифункциональны. Это означает, что иммуноглобулин любого типа:
- распознает и связывает антиген, а затем
- усиливает киллинг и/или удаление иммунных комплексов, сформированных в результате активации эффекторных механизмов.
- Одна область молекулы антител (Fab) определяет ее антигенную специфичность, а другая (Fc) осуществляет эффекторные функции: связывание с рецепторами, которые экспрессированы на клетках организма (например, фагоцитах); связывание с первым компонентом (C1q) системы комплемента для инициации классического пути каскада комплемента.

Название класса иммуноглобулинов	Количество субъединиц (L-H)2	Количество антиген-связывающих сайтов	Содержание в сыворотке крови, %%	Среднее время жизни в сыворотке крови, дней	Молекулярная масса, кДа	Биологические функции
IgG (имеет 4 подкласса) 	1	2	70-80	23	150	Проникают через плаценту и обеспечивают иммунологическую защиту плода, нейтрализация токсинов, опсонизация, активация системы комплемента, цитофильная активность
IgA (имеет 2 подкласса) 	1 (80% - у человека), 2, 3	2, 4, 6	10-15	6	170-500	Противомикробная активность, агглютинирование бактерий, активация системы комплемента, нейтрализация токсинов
IgM 	5	10	5-10	5	970	Образуются при первичном иммунном ответе, высокая агглютинирующая активность, сильный опсонизирующий эффект, активация системы комплемента, являются антигенсвязывающим рецептором В-лимфоцитов.
IgE 	1	2	0,002	2,5	190	Защитная функция от паразитов, аллергические реакции
IgD 	1	2	<1	3	180	Рецептор на поверхности В-лимфоцитов

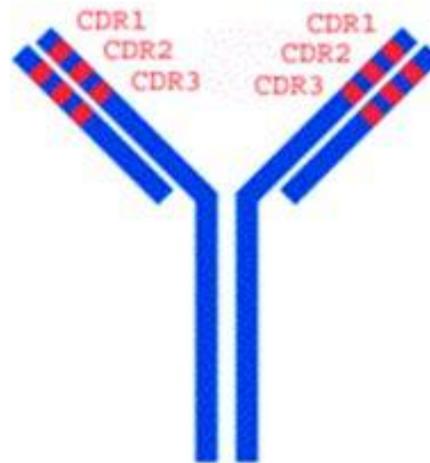
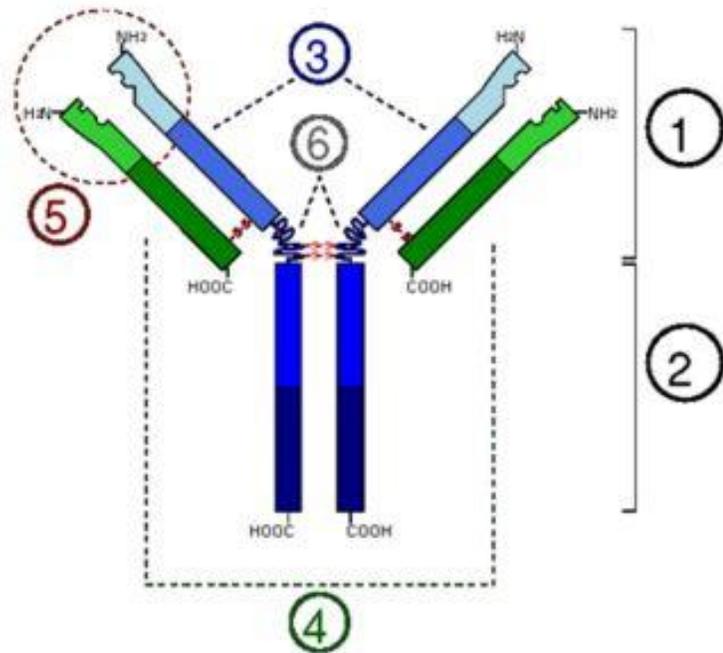
Структура IgG





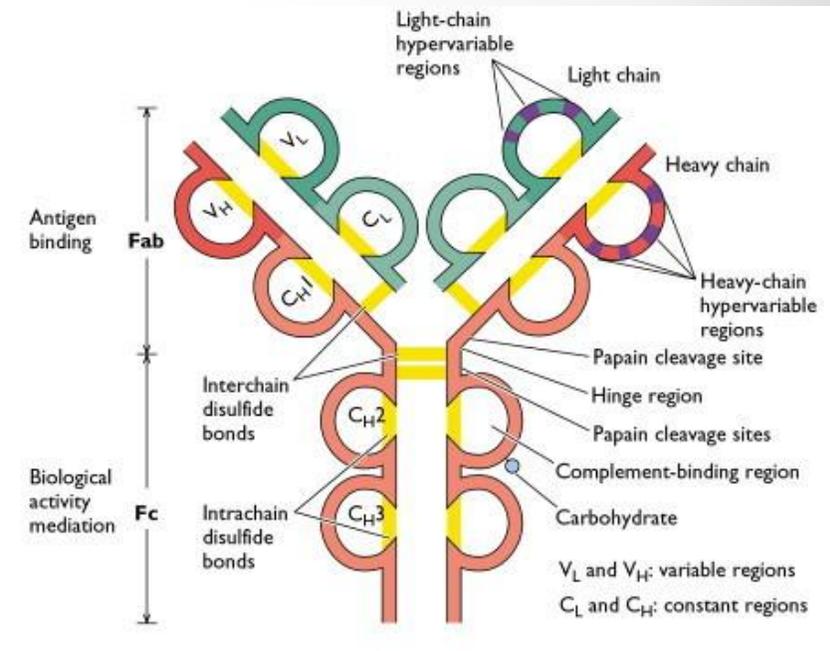
Строение молекулы антитела

- ❖ Антитела (иммуноглобулины, ИГ, Ig) — это растворимые гликопротеины, присутствующие в сыворотке крови, тканевой жидкости или на клеточной мембране, которые распознают и связывают антигены.
- ❖ К IgG относятся примерно 70% всех ИГ. IgA составляют 20%. IgM - 10%.
- ❖ Мономер антитела состоит из двух тяжелых и двух легких цепей. В каждой из цепей выделяют константные и вариабельные участки.
- ❖ CDR тяжелых цепей вносят больший вклад в связывании антигена, чем CDR легких цепей. Особенно важен **CDR3** тяжелых цепей.
- ❖ В организме человека может существовать до 10^8 вариантов антител.



Complementarity
Determining
Regions –
гипервариабельные
участки

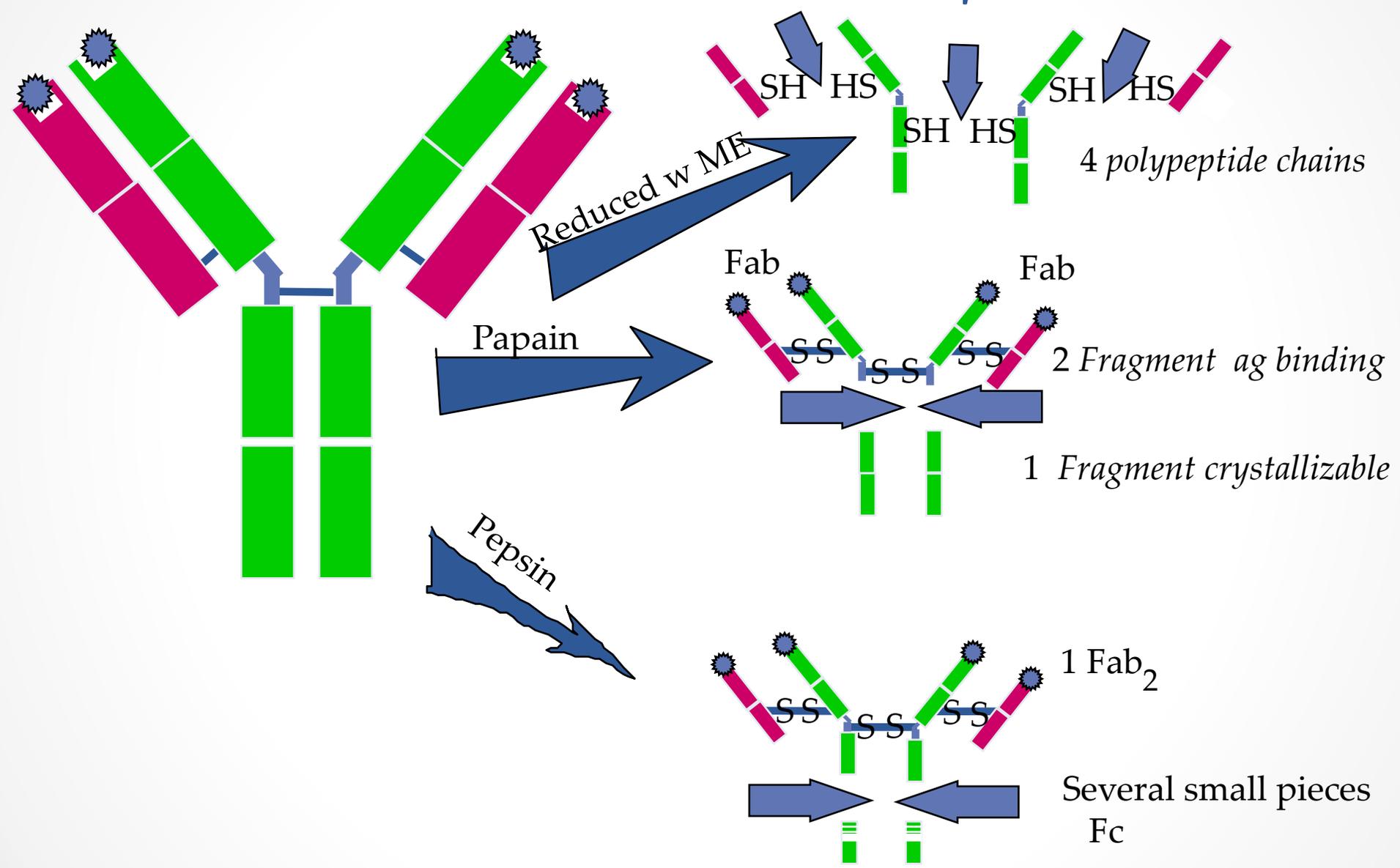
- Антитела являются относительно крупными (~150 кДа — IgG) гликопротеинами, имеющими сложное строение.
- Состоят из двух идентичных тяжелых цепей (H-цепи, в свою очередь состоящие из V_H, C_{H1}, шарнира, C_{H2} и C_{H3} доменов) и из двух идентичных лёгких цепей (L-цепей, состоящих из V_L и C_L доменов).
- К тяжелым цепям ковалентно присоединены олигосахариды.
- При помощи протеазы папаина антитела можно расщепить на два Fab (англ. fragment antigen binding — антиген-связывающий фрагмент) и один Fc (англ. fragment crystallizable — фрагмент, способный к кристаллизации).
- Всего различают пять типов тяжелых цепей (α-, γ-, δ-, ε- и μ- цепи) и два типа легких цепей (κ-цепь и λ-цепь).



Структура IgG

- IgG является основным иммуноглобулином сыворотки здорового человека (составляет 70-75 % всей фракции иммуноглобулинов),
- наиболее активен во вторичном иммунном ответе и антитоксическом иммунитете.
- Благодаря малым размерам (коэффициент седиментации 7S, молекулярная масса 146 кДа) является единственной фракцией иммуноглобулинов, способной к транспорту через плацентарный барьер и тем самым обеспечивающей иммунитет плода и новорожденного.
- В составе IgG 2-3 % углеводов; два антигенсвязывающих Fab-фрагмента и один Fc-фрагмент. Fab-фрагмент (50-52 кДа) состоит из целой L-цепи и N-концевой половины H-цепи, соединённых между собой дисульфидной связью, тогда как Fc-фрагмент (48 кДа) образован C-концевыми половинами H-цепей.
- Всего в молекуле IgG 12 доменов (участки, сформированные из β -структуры и α -спиралей полипептидных цепей Ig в виде неупорядоченных образований, связанных между собой дисульфидными мостиками аминокислотных остатков внутри каждой цепи): по 4 на тяжёлых и по 2 на лёгких цепях.

Расщепление IgG



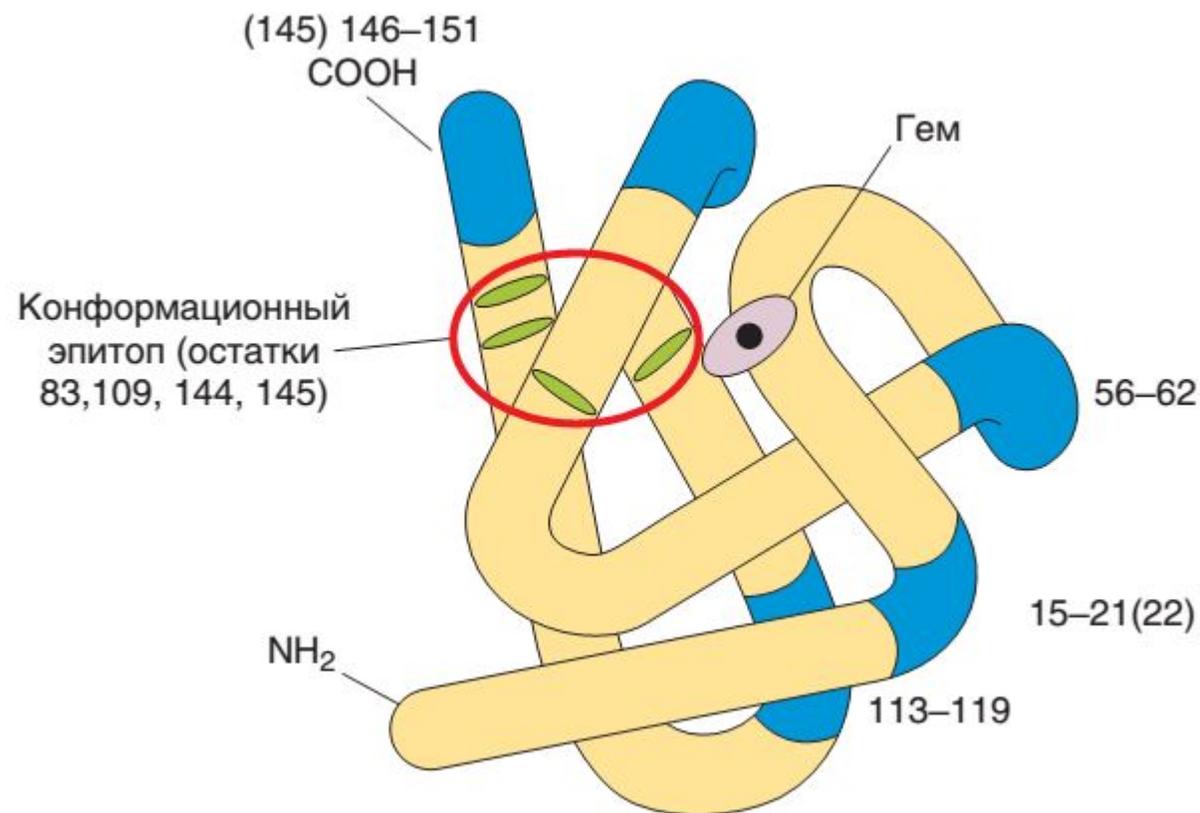
Взаимодействие антитела с антигеном

1. В каждом антителе выделяют *Fc-фрагмент* (якорная часть), который может взаимодействовать с мембраной клеток, и *Fab-фрагмент*, в котором находится *антигенсвязывающий центр*, который взаимодействует с антигеном.
2. Антитело взаимодействует не со всей молекулой антигена сразу, а лишь с ее *антигенной детерминантой (эпитопом)*.

Свойства ЭПИТОПОВ

- Линейные
- Конформационные

Размер – около 10 а.к



Характеристики антител

1. **Валентность** – количество активных (антиген-связывающих) центров антител. Как правило, бивалентны.
2. **Аффинность** – сродство антигенной детерминанты с активным центром антитела.
3. **Авидность** – скорость и прочность связывания антитела с соответствующим антигеном.
4. **Специфичность** – способность взаимодействовать только с комплементарным антигеном.

Иммуноглобулины по специфичности делятся на те же группы, что и соответствующие микробные антигены:

- вариантспецифические;
- видоспецифические;
- группоспецифические;
- перекрестнореагирующие.

Специфичность антител

- **Клонально-селекционная теория** имеет в виду то, что каждый лимфоцит синтезирует антитела только одной определенной специфичности. И эти антитела располагаются на поверхности этого лимфоцита в качестве рецепторов.

Клонально-селекционная теория

- Антитела и лимфоциты с нужной специфичностью уже существуют в организме до первого контакта с антигеном.
- Лимфоциты, которые участвуют в иммунном ответе, имеют антигенспецифические рецепторы на поверхности своей мембраны. У В-лимфоцитов рецепторы- молекулы той же специфичности, что и антитела, которые лимфоциты впоследствии продуцируют и секретируют.

Клонально-селекционная теория

- Любой лимфоцит несет на своей поверхности рецепторы только одной специфичности.
- Лимфоциты, имеющие антиген, проходят стадию пролиферации и формируют большой клон плазматических клеток. Плазматические клетки синтезируют антитела только той специфичности, на которую был запрограммирован лимфоцит-предшественник.
- Сигналами к пролиферации служат цитокины, которые выделяются другими клетками. Лимфоциты могут сами выделять цитокины.

Классификация по антигенам

- **антиинфекционные или антипаразитарные** антитела, вызывающие непосредственную гибель или нарушение жизнедеятельности возбудителя инфекции либо паразита
- **антитоксические** антитела, не вызывающие гибели самого возбудителя или паразита, но обезвреживающие вырабатываемые им токсины.
- так называемые «**антитела-свидетели заболевания**», наличие которых в организме сигнализирует о знакомстве иммунной системы с данным возбудителем в прошлом или о текущем инфицировании этим возбудителем, но которые не играют существенной роли в борьбе организма с возбудителем (не обезвреживают ни самого возбудителя, ни его токсины, а связываются со второстепенными белками возбудителя).

Классификация по антигенам

- **аутоагрессивные антитела, или аутологичные антитела, аутоантитела** — антитела, вызывающие разрушение или повреждение нормальных, здоровых тканей самого организма хозяина и запускающие механизм развития аутоиммунных заболеваний.
- **аллореактивные антитела, или гомологичные антитела, аллоантитела** — антитела против антигенов тканей или клеток других организмов того же биологического вида. Аллоантитела играют важную роль в процессах отторжения аллотрансплантатов, например, при пересадке почки, печени, костного мозга, и в реакциях на переливание несовместимой крови.
- **гетерологичные антитела, или изоантитела** — антитела против антигенов тканей или клеток организмов других биологических видов. Изоантитела являются причиной невозможности осуществления

Классификация по антигенам

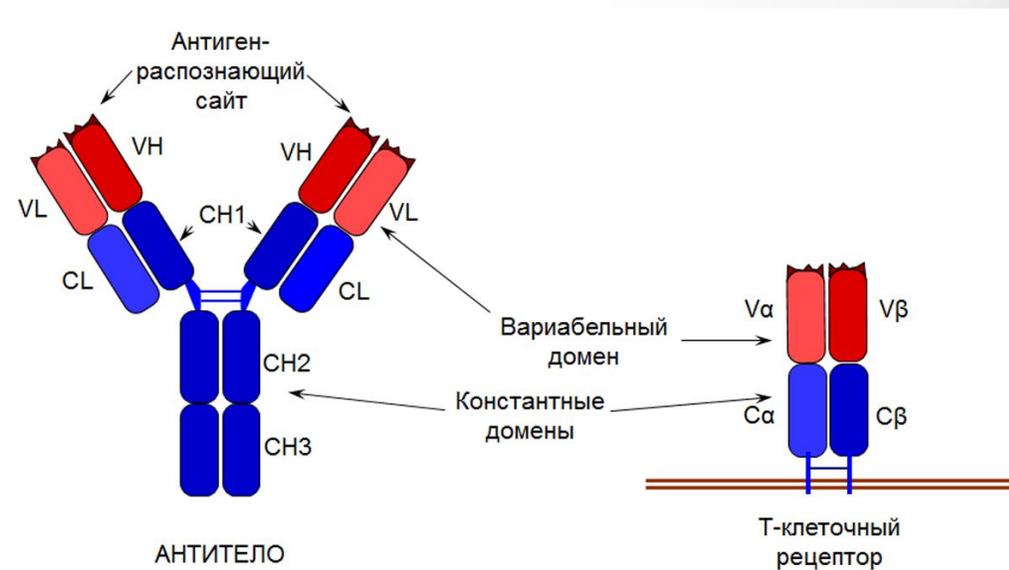
- **гетерологичные антитела, или изоантитела** — антитела против антигенов тканей или клеток организмов других биологических видов. Изоантитела являются причиной невозможности осуществления ксенотрансплантации даже между эволюционно близкими видами (например, невозможна пересадка печени шимпанзе человеку) или видами, имеющими близкие иммунологические и антигенные характеристики (невозможна пересадка органов свиньи человеку).

Классификация по антигенам

- **антиидиотипические антитела** — антитела против антител, вырабатываемых самим же организмом. Причём это антитела не «вообще» против молекулы данного антитела, а именно против рабочего, «распознающего» участка антитела, так называемого идиотипа.
- Антиидиотипические антитела играют важную роль в связывании и обезвреживании избытка антител, в иммунной регуляции выработки антител.
- Антиидиотипическое антитело служит для организма фактором иммунологической памяти, аналогом исходного антигена, который остаётся в организме и после уничтожения исходных антигенов. В свою очередь, против антиидиотипических антител могут вырабатываться анти-антиидиотипические антитела и т. д.

V(D)J-рекомбинация

- механизм соматической рекомбинации ДНК, происходящий на ранних этапах дифференцировки лимфоцитов и приводящий к формированию антиген-распознающих участков иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора.
- Гены иммуноглобулина (англ. Ig) и Т-клеточного рецептора (англ. TCR) состоят из повторяющихся сегментов, принадлежащих к трем классам: V (variable), D (diversity) и J (joining). В процессе V(D)J-перестройки генные сегменты, по одному из каждого класса, соединяются вместе.



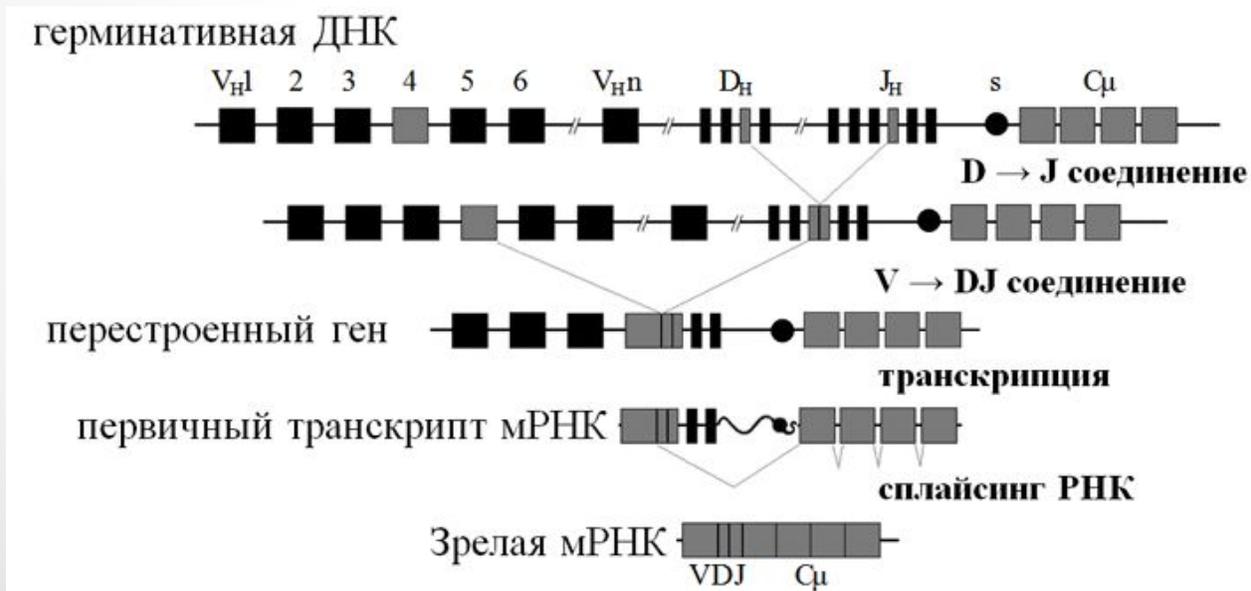
- Система адаптивного (приобретенного) иммунитета способна распознавать **МИЛЛИОНЫ** отдельных антигенных детерминант.
- Если бы весь антиген-распознающий репертуар рецепторов Т- и В-лимфоцитов кодировался отдельными генами, то они не вместились бы в геном.
- В связи с этим, в эволюции позвоночных животных развилась способность генерировать гены антиген-распознающего рецептора путём **рекомбинации отдельных генных сегментов случайным образом** в каждой клетке-предшественнике лимфоцита.
- В течение жизни образуются миллиарды лимфоцитов с уникальными антиген-специфическими рецепторами, в совокупности они образуют практически неограниченный репертуар распознаваемых антигенов.

Количество генных сегментов и разнообразие перестроек

Сегмент	иммуноглобулин			TCR $\alpha\beta$		TCR $\gamma\delta$	
	каппа (κ)	лямбда (λ)	тяжелая цепь	альфа (α)	бета (β)	гамма (γ)	дельта (δ)
Variable (V)	40	30	65	70	52	12	4
Diversity (D)	0	0	27	0	2	0	3
Joining (J)	5	4	6	61	13	5	4
Вариантов перестроек	200	120	11 000	4 270	1 352	60	48
Разнообразие рецепторов	3,5*10 ⁶			5,9*10 ⁶		2880	

Механизм

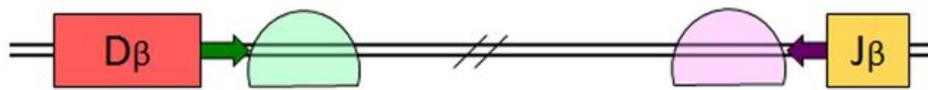
- Молекулярный механизм рекомбинации всех семи локусов Ig/TCR идентичный. Эти генные перестройки происходят на ранних этапах дифференцировки лимфоцитов в костном мозге (для В-лимфоцитов) и тимусе (для Т-лимфоцитов) и представляют собой соматическую негомологичную рекомбинацию, в результате которой V, D и J генные сегменты сближаются, а промежуточная последовательность удаляется.



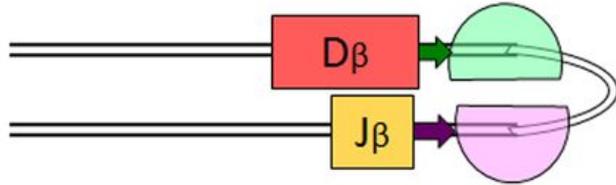
Реаранжировка и сплайсинг мРНК гена IgH

Сигнальные последовательности

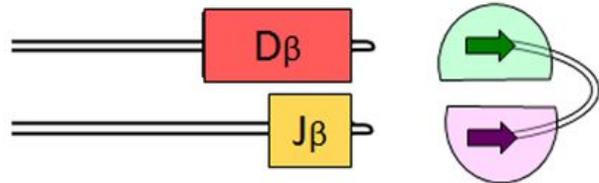
- Рекомбинация происходит по сигнальным последовательностям ДНК, непосредственно прилегающим к генным сегментам.
- Консервативные сигнальные последовательности называются RSS (англ. recombination signal sequence)
- Состоят из семи нуклеотидов — 5'-CACAGTG-3' (гептамер), за которым следует последовательность из 12 или 23 нуклеотидов — спейсер, и ещё одного консервативного блока из девяти нуклеотидов — 5'-ACAAAAACC-3'.
- Последовательность спейсера может варьировать, но длина консервативна и соответствует одному (12 нуклеотидов) или двум (23 нуклеотида) виткам двойной спирали ДНК.
- Перестройка происходит только между двумя RSS, одна из которых имеет спейсер 12 пар нуклеотидов, другая — 23 п. н., так называемое «правило рекомбинации 12/23».



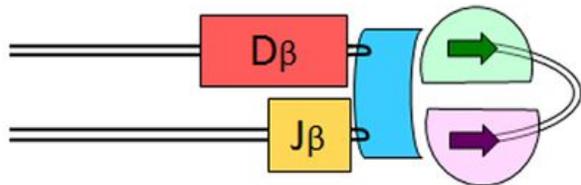
RAG1 и *RAG2* белки связываются с RSS и сближают их вместе



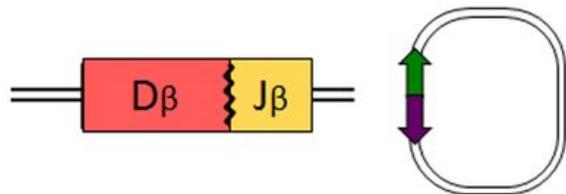
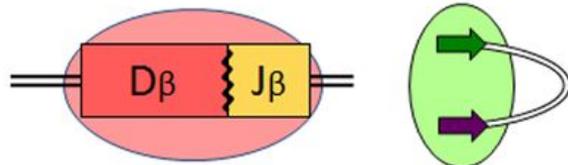
RAG1 и *RAG2* белки инициируют двуцепочечный разрыв ДНК, который замыкается в «шпильку»



Другие белки: *Ku70:Ku80*, *DNA-PK*, *DNA-ligase IV* связываются со «шпильками», вносят в нее односторонний разрыв, после чего происходит случайное отщепление и прибавление с помощью *Tdt* нескольких нуклеотидов.

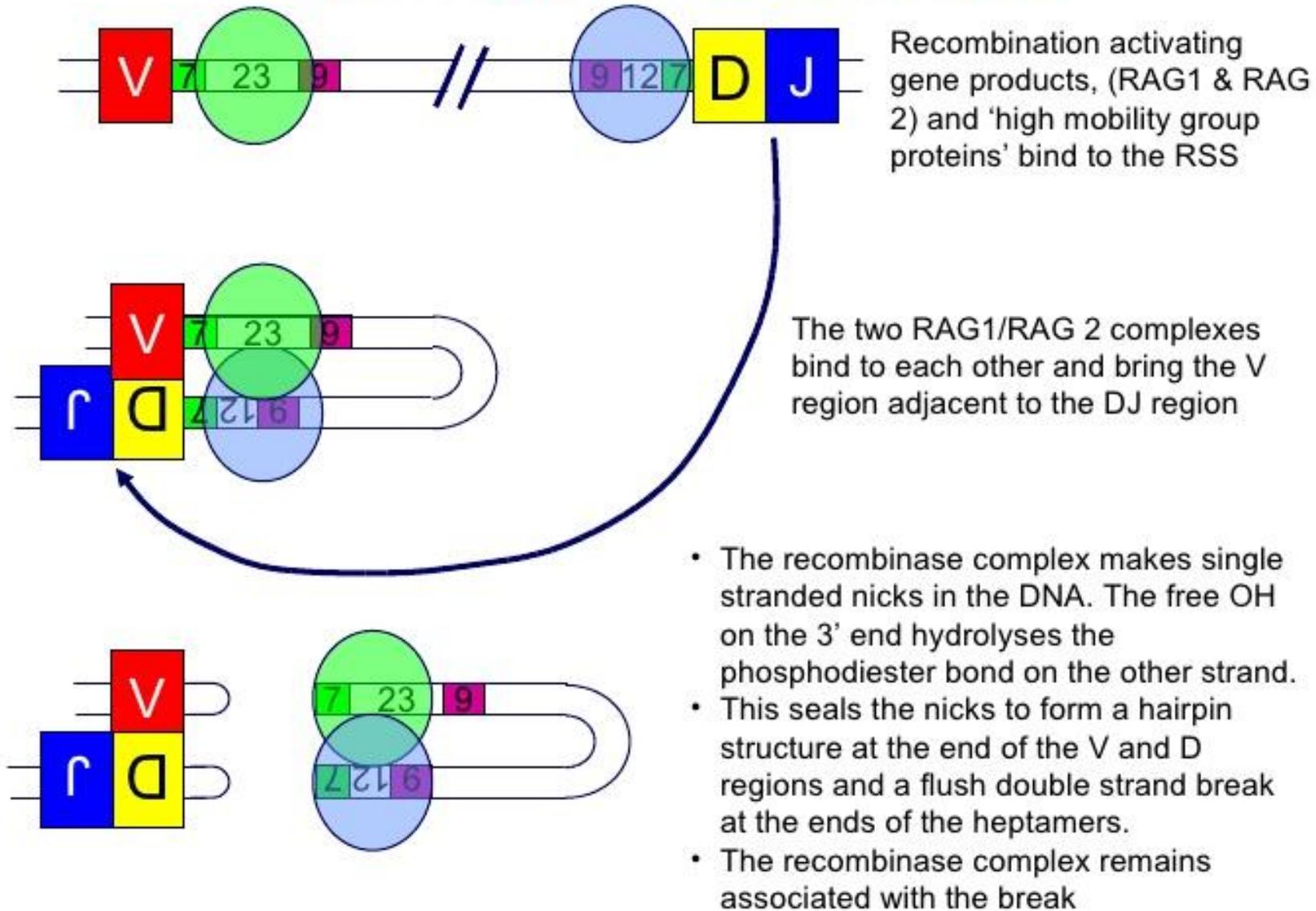


DNA-ligase IV соединяет генные сегменты образуя кодирующее и сигнальное соединение



- **V(D)J-рекомбинация** представляет собой ряд последовательных реакций сближения, разрывов и воссоединений двойной спирали ДНК и протекает в два этапа.
- На первом этапе продукты генов RAG1 и RAG2 (англ. recombination activation genes) — распознают RSS (англ. recombination signal sequence) и связываются с ними. В формировании комплекса участвуют белки HMG-1 и 2 (high mobility group proteins).
- Рекомбиназы вносят односторонний разрыв в ДНК на 5'-конце консервативной последовательности и активируют 3'-ОН конец кодирующего сегмента
- который образует фосфатную связь во второй нити ДНК с образованием ковалентно замкнутой шпильки на конце сегмента и «тупых» концов гептамера. Первый этап требует присутствия ионов Mg^{2+} .

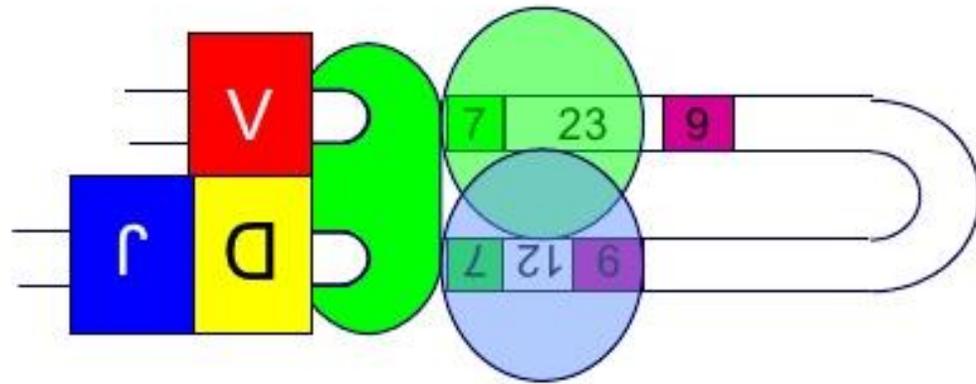
Steps of Ig gene recombination



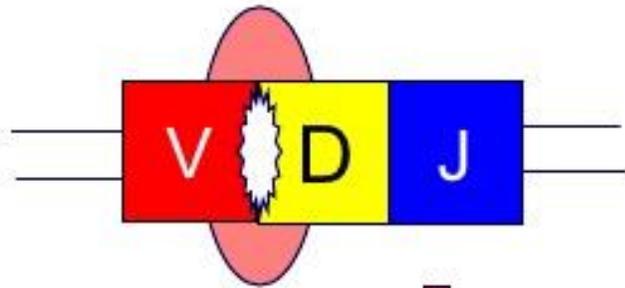
2 этап

- На втором этапе реакции тупые концы гептамеров соединяются, образуя так называемое сигнальное соединение. Кодирующие концы перед объединением подвергаются процессингу. Шпилька расщепляется в случайном месте, оставляя иногда палиндромную последовательность, называемую Р-нуклеотидами, на конце генного сегмента.
- Перед воссоединением генных сегментов концы ДНК могут немного деградировать при участии экзонуклеаз, а также происходит нематричное добавление нуклеотидов терминальной дезоксирибонуклеотидил трансферазой (англ. TdT) — так называемых N-нуклеотидов.
- Наконец, кодирующие концы объединяются. Подобный механизм перестройки называют негомологичной рекомбинацией (англ. NHEJ, non-homologous DNA end-joining).
- Помимо RAG-рекомбиназ в процессе участвуют другие белки системы репарации/рекомбинации: Artemis осуществляет открытие шпильки, DNA-РК связывается с Artemis для обработки кодирующего конца, белки Ku70 и Ku80 связывают и репарируют двухнитевые разрывы ДНК, белок XRCC4 и ДНК-лигаза IV соединяют кодирующие концы.

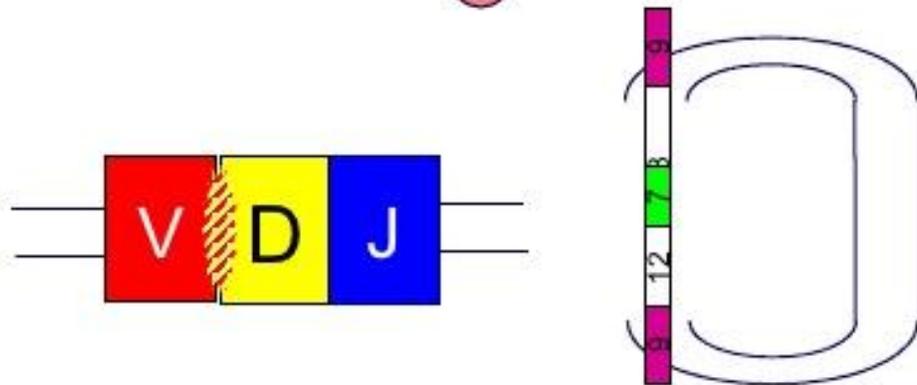
Steps of Ig gene recombination



A number of other proteins, (Ku70:Ku80, XRCC4 and DNA dependent protein kinases) bind to the hairpins and the heptamer ends.



The hairpins at the end of the V and D regions are opened, and exonucleases and transferases remove or add random nucleotides to the gap between the V and D region

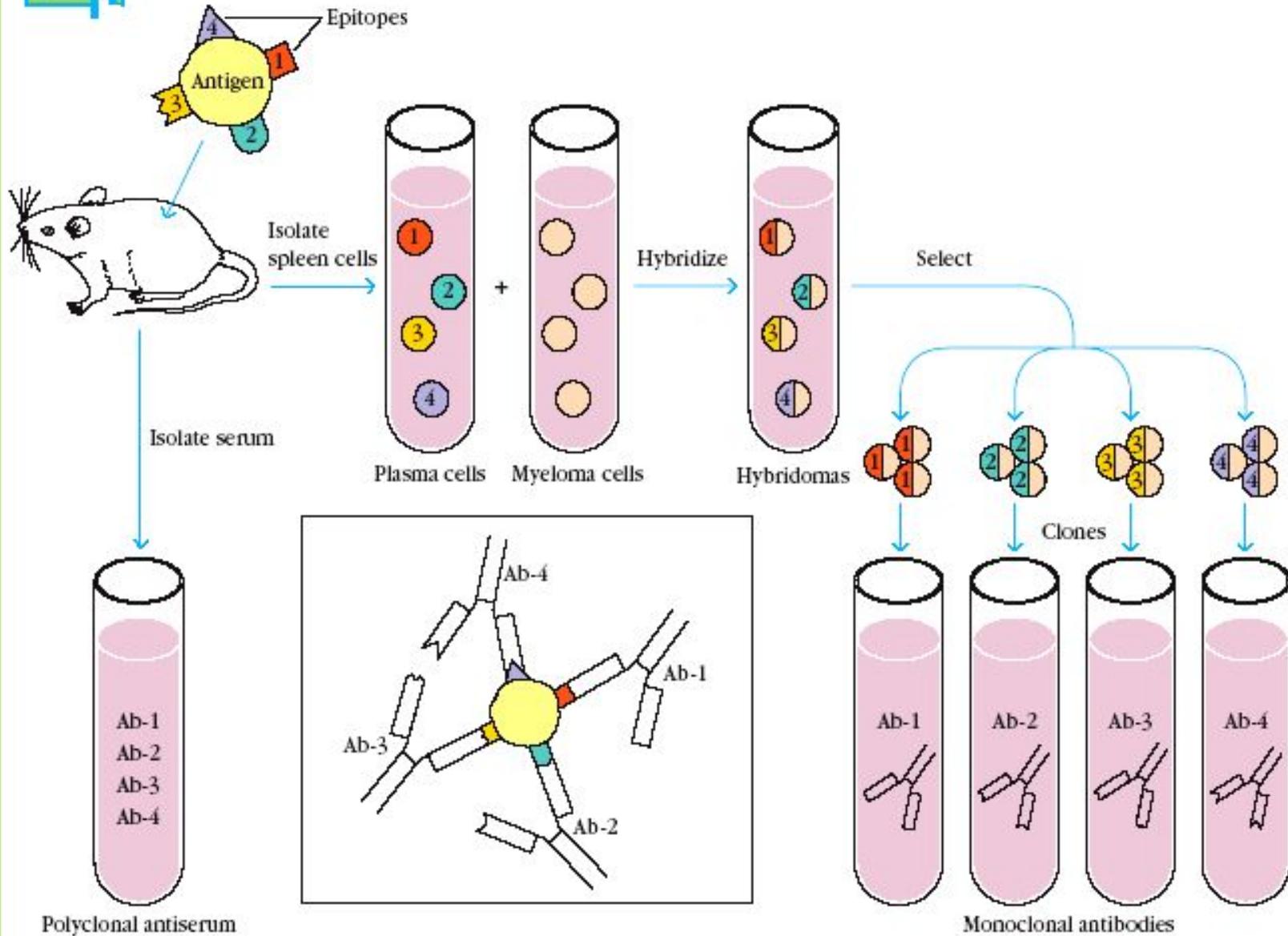


DNA ligase IV joins the ends of the V and D region to form the coding joint and the two heptamers to form the signal joint.

Получение моноклональных антител



VISUALIZING CONCEPTS



ANTIBODIES

POLYCLONAL

- Derived from different B Lymphocytes cell lines.
- Batch to Batch variation affecting Ab reactivity & treatment.
- NOT Powerful tools for clinical diagnostic tests.

MONOCLONAL

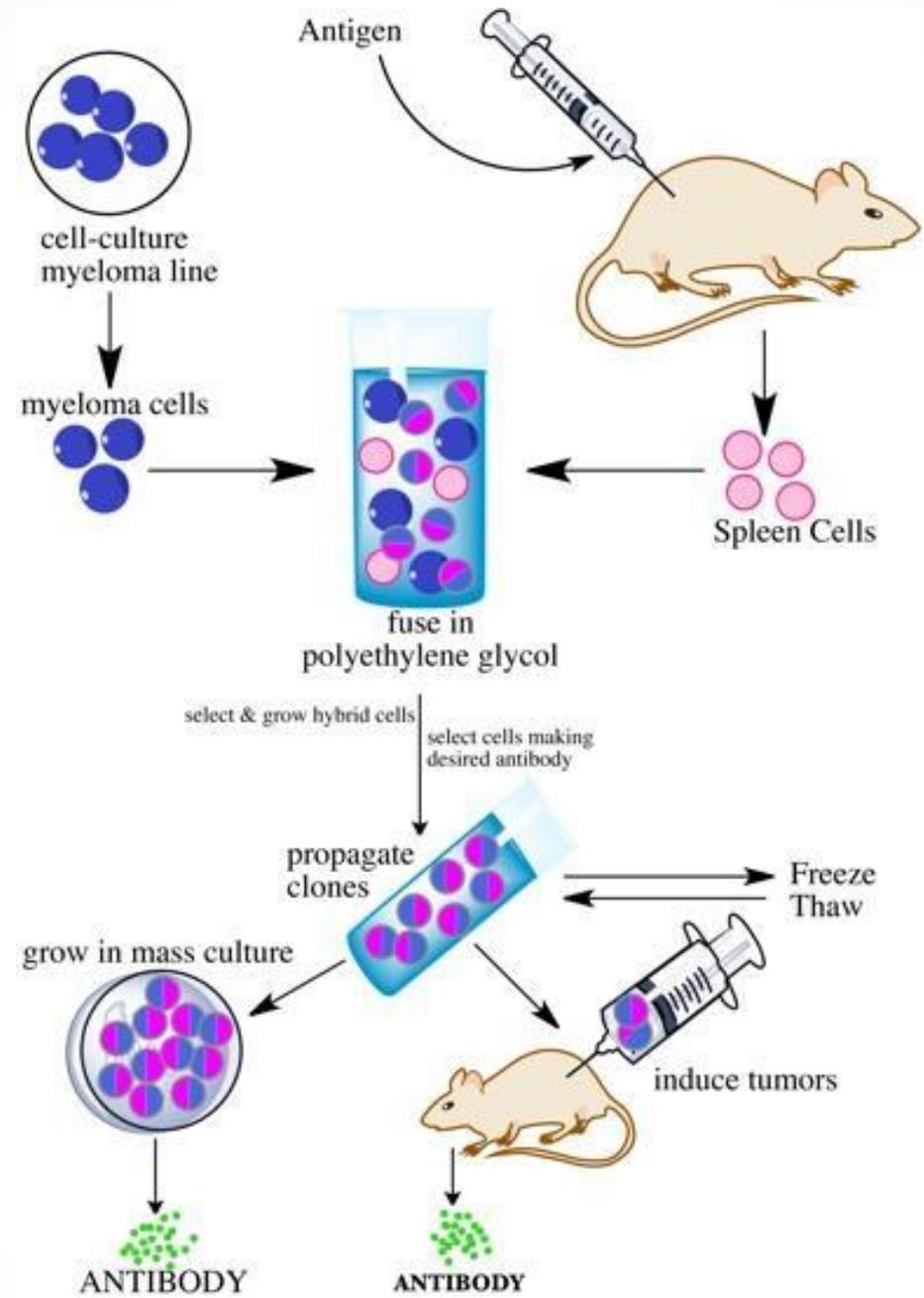
- Derived from a single B cell clone.
- No Batch to Batch variations. Effectiveness of Ab is much more predictable.
- Enable the development of secure immunoassay systems.

Моноклональные антитела и гибридомная технология

1976 г Келер и Мильстайн осуществили соматическую гибридизацию антителообразующей и миеломной клеток

Этапы получения МАТ

- 1. Спленоциты иммунизированных АГ мышей сливают с миеломной клеткой в присутствии ПЭГ**
- 2. Отбирают гибриды на селективной среде ГАТ (гипоксантин, аминоптерин, тимидин)**
- 3. Клонирование гибридов**
- 4. Отбор нужных антителообразующих гибридом**
- 5. Трансплантация в брюшную полость мышам или наращивание гибридомы *in vitro***



Иммунохимические методы исследования

- ELISA
- Western Blotting
- Иммуногистохимия
- Иммунопреципитация

Иммунохимические методы исследований

Иммунохимические методы исследований – методы, основанные на специфической реакции взаимодействия антигена с антителом.

Сфера применения - показаны в ситуациях, когда необходимо количественно определить концентрации химических веществ, содержащихся в очень низких концентрациях в биологическом материале.

- ❖ Белки сыворотки крови: Иммуноглобулины, липопротейны
- ❖ Опухолевые маркёры: Раково-эмбриональный антиген (РЭА), альфа-фетопротейн и др.
- ❖ Гормоны
- ❖ Инфекционные маркёры: Hbs Ag, Anti-HIV
- ❖ Маркеры воспаления: Ревматоидный Фактор, С-Реактивный Белок
- ❖ Лекарственные вещества: Теофиллин, Дигоксин, Фенитоин и др.

Специфичность и чувствительность иммунохимических методов

Специфичность: иммунохимические методы высокоспецифичны (95-98%), можно легко и точно дифференцировать в биологической пробе химические вещества, имеющие очень схожую молекулярную структуру (например, Тироксин и Трийодтиронин).

Чувствительность: При помощи иммунологических методов исследования в биологической пробе можно определить химические вещества в концентрациях вплоть до 10^{-23} моль/л.

ELISA (ИФА)

Enzyme Linked Immunosorbent Assay
(Иммуноферментный анализ)

Прямой твердофазный ИФА (схема)

1. Сыворотку инкубируют с Аг, фиксированным на твердом субстрате (пластиковая микропланшетка)

2. АТ, не связавшие Аг, удаляют многократным промыванием

3. Вносят меченную ферментом антисыворотку к АТ, связавшим Аг

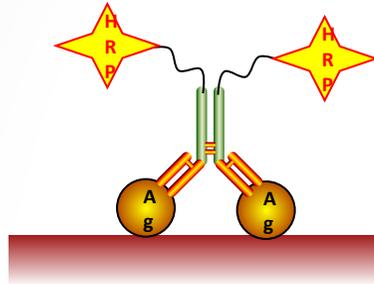
4. Определяют количество фермента-маркера, связавшегося с АТ



Types of immunodetection systems

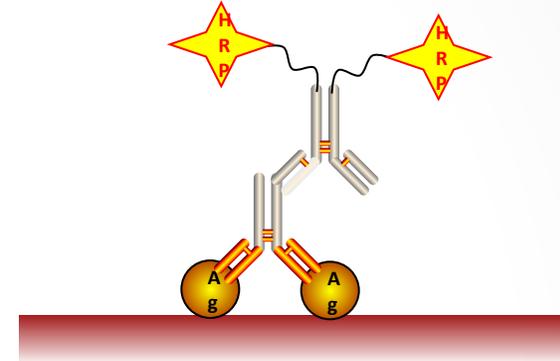
1. Direct immunodetection

Primary antibody conjugated with enzyme system



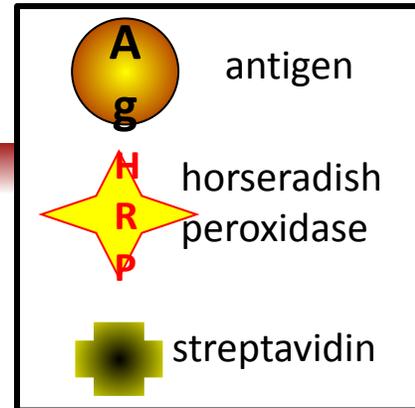
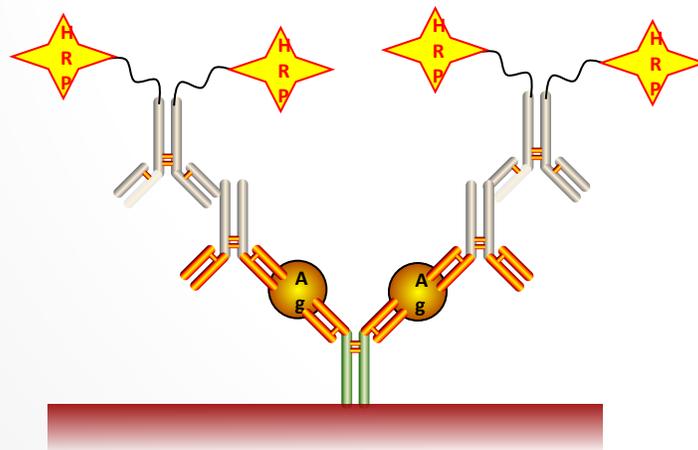
2. Indirect immunodetection

Secondary antibody conjugated with enzyme system



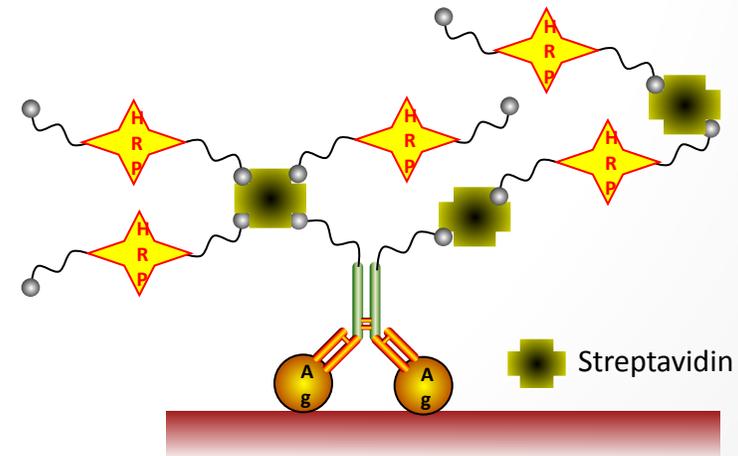
3. Sandwich indirect immunodetection

Antigen applied in soluble form

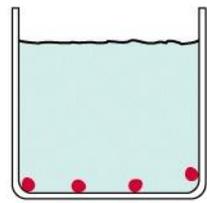


4. Indirect immunodetection with biotin linkers

Biotinylated primary antibodies

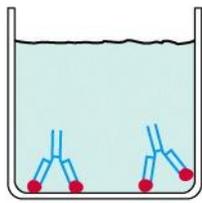


(a) Indirect ELISA



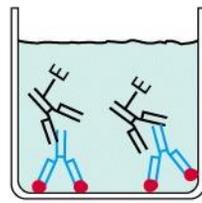
Antigen-coated well

wash



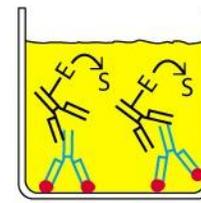
Add specific antibody to be measured

wash



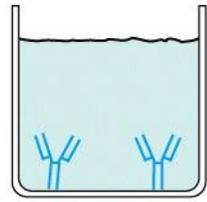
Add enzyme-conjugated secondary antibody

wash



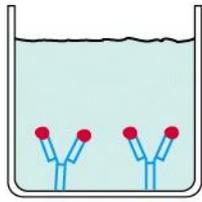
Add substrate (S) and measure color

(b) Sandwich ELISA



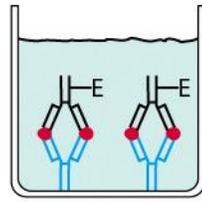
Antibody-coated well

wash



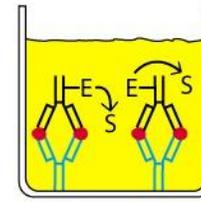
Add antigen to be measured

wash



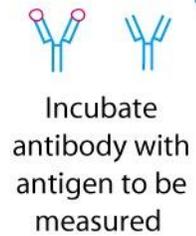
Add enzyme-conjugated secondary antibody

wash

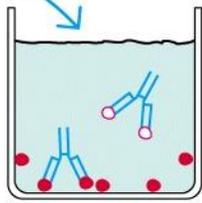


Add substrate and measure color

(c) Competitive ELISA

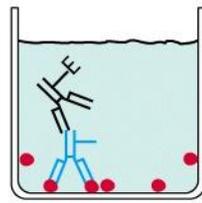


Incubate antibody with antigen to be measured



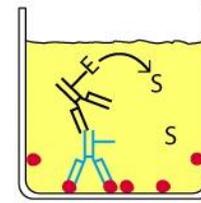
Add Ag-Ab mixture to antigen-coated well

wash



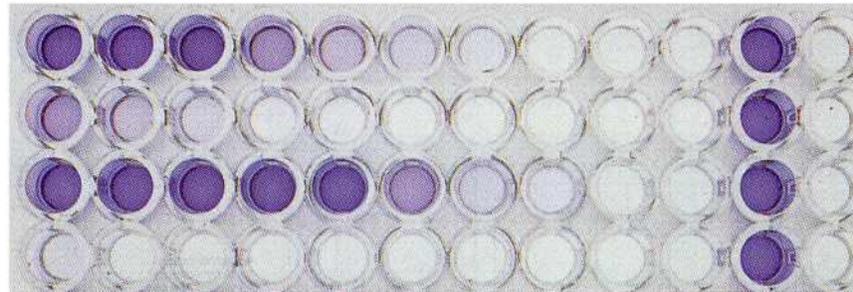
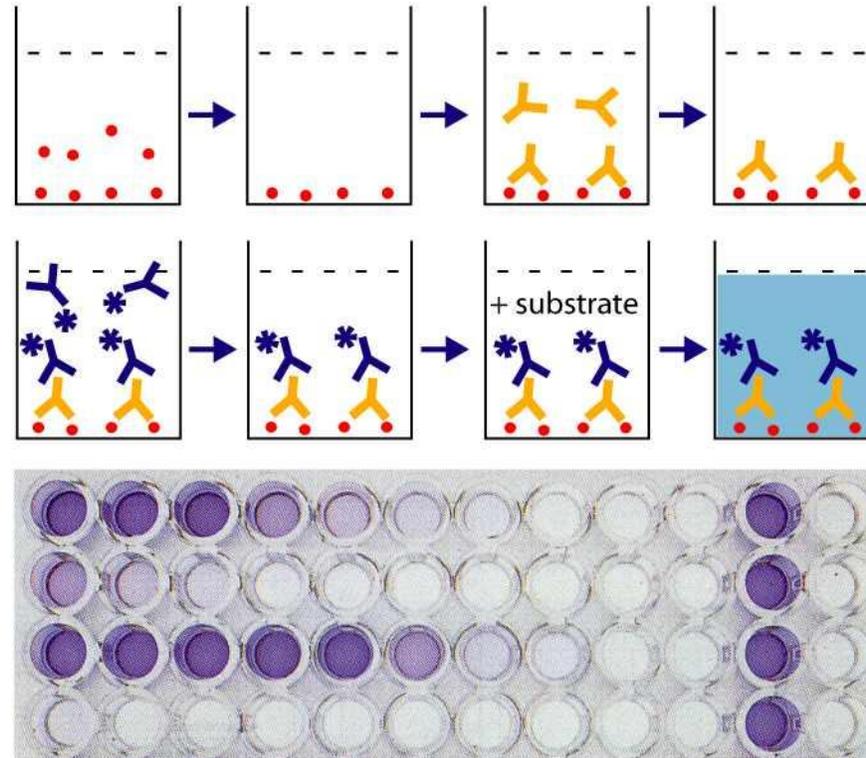
Add enzyme-conjugated secondary antibody

wash

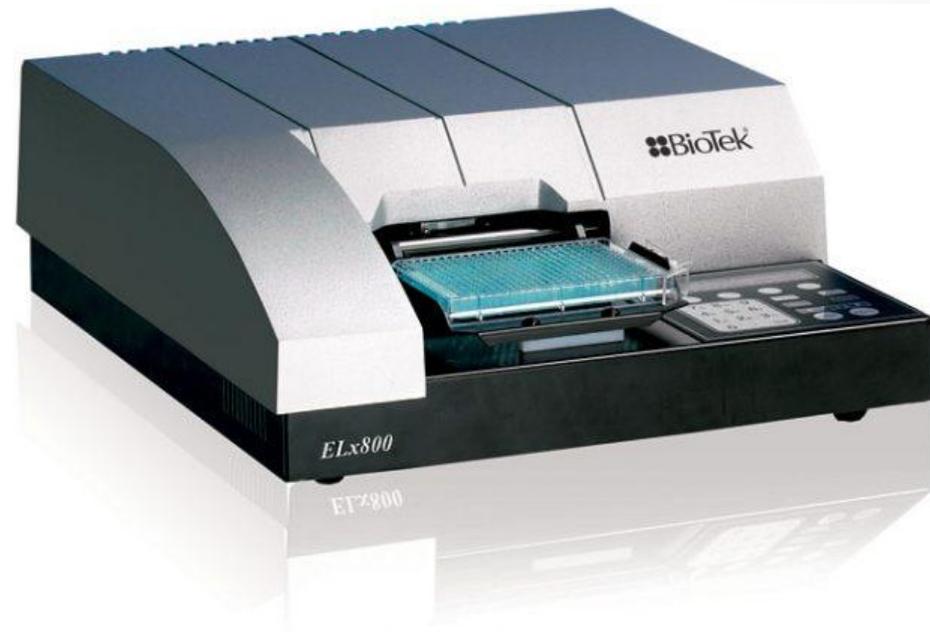
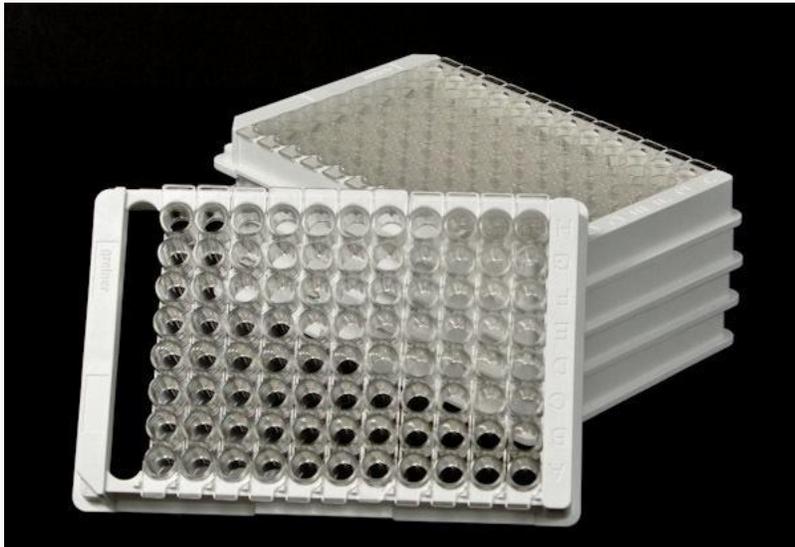


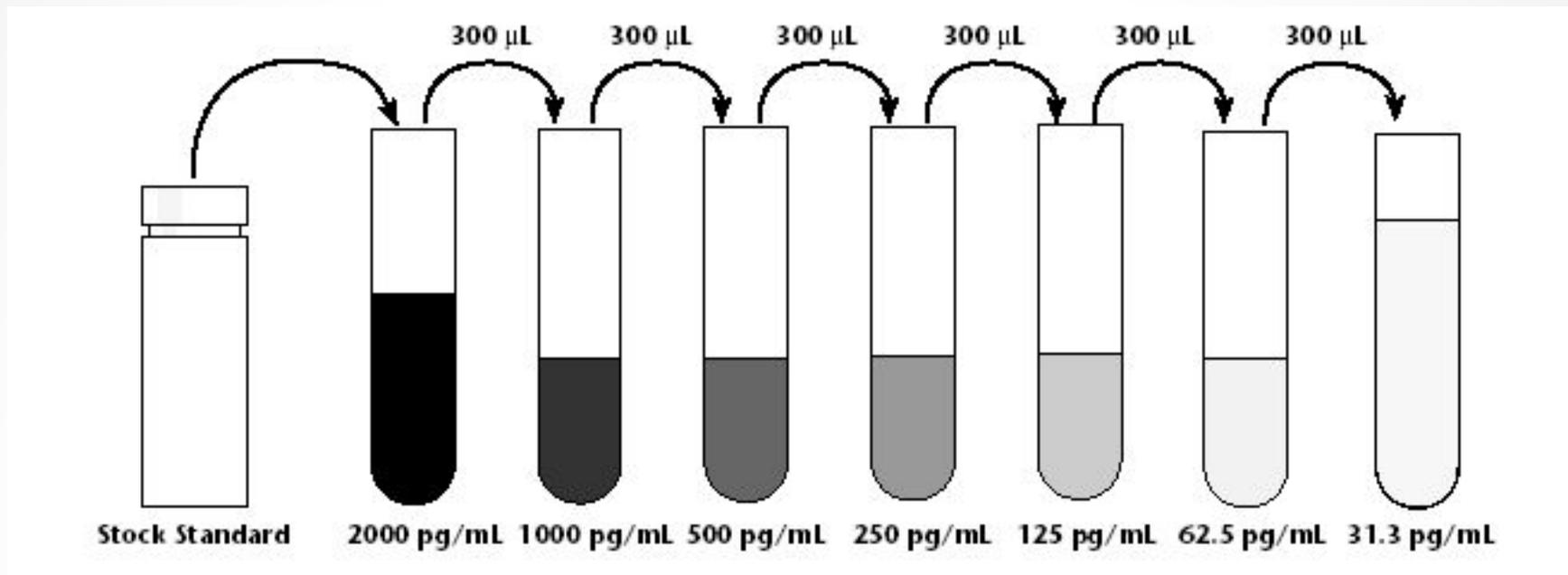
Add substrate and measure color

Indirect ELISA



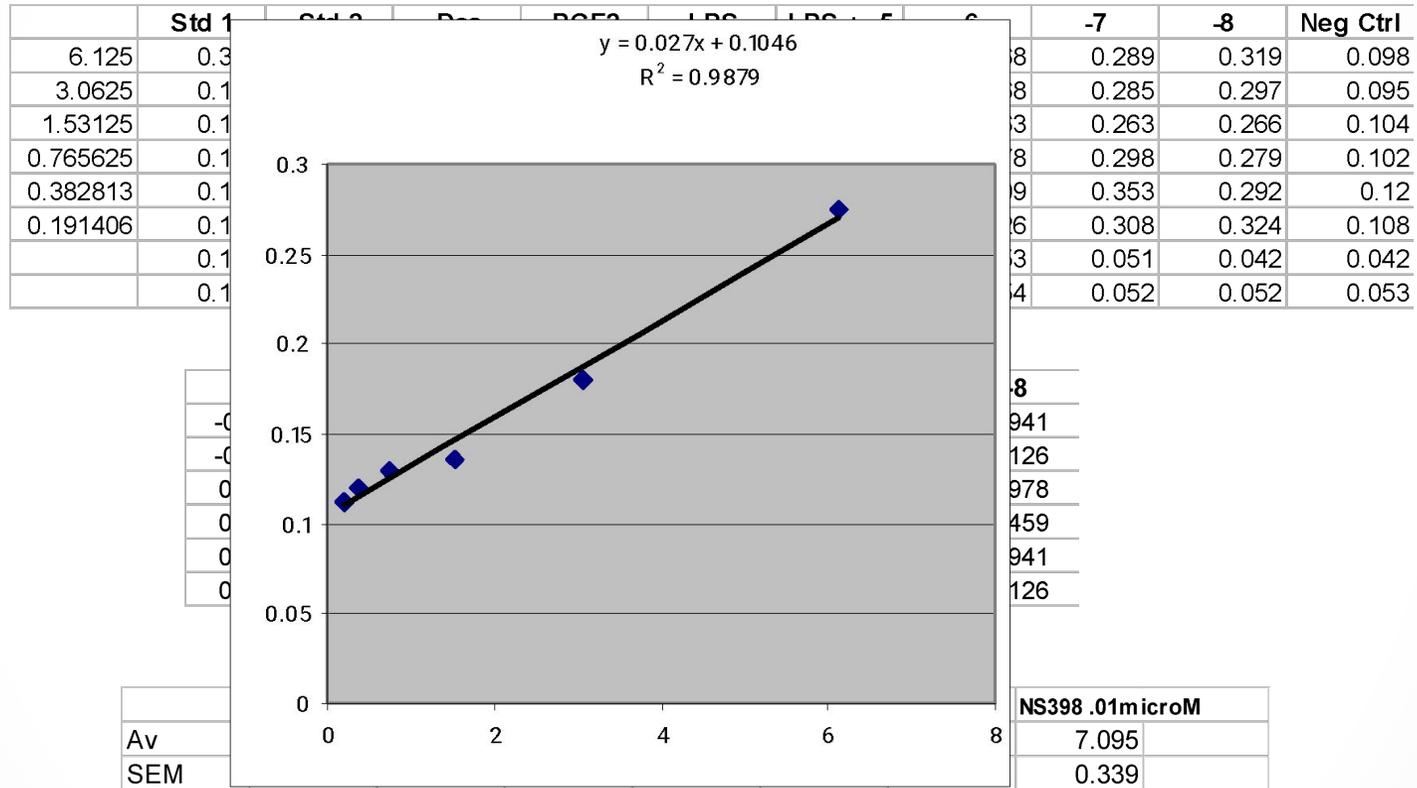
Детекция сигнала: оптическое поглощение (450 нм)





□ Растворка стандартного антигена

Data Analysis



Western blotting

Enzyme Linked Immunosorbent Assay
(Иммуноферментный анализ)

Виды блоттинга

```
graph TD; A[Виды блоттинга] --> B[Blotting technique]; B --> C[Southern Blot]; B --> D[Northern Blot]; B --> E[Western blot]; C --- C_desc[It is used to detect DNA.]; D --- D_desc[It is used to detect RNA.]; E --- E_desc[It is used to detect protein.];
```

Blotting technique

Southern Blot

It is used to detect DNA.

Northern Blot

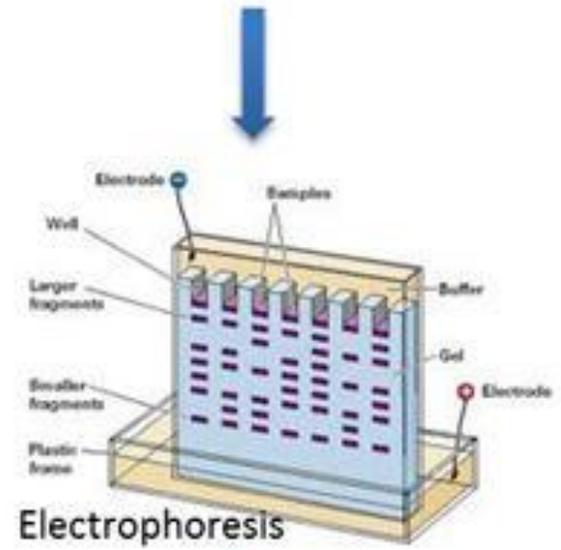
It is used to detect RNA.

Western blot

It is used to detect protein.

Workflow

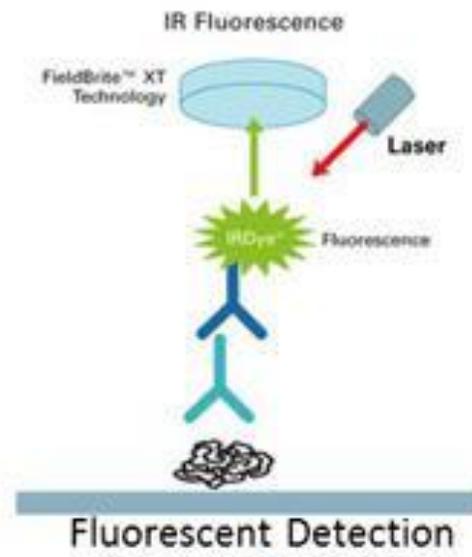
Sample Preparation



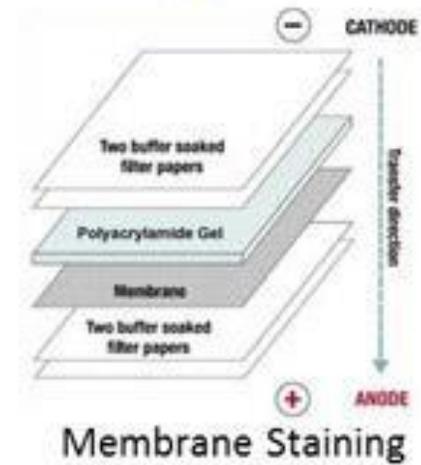
Electrophoresis



Transfer

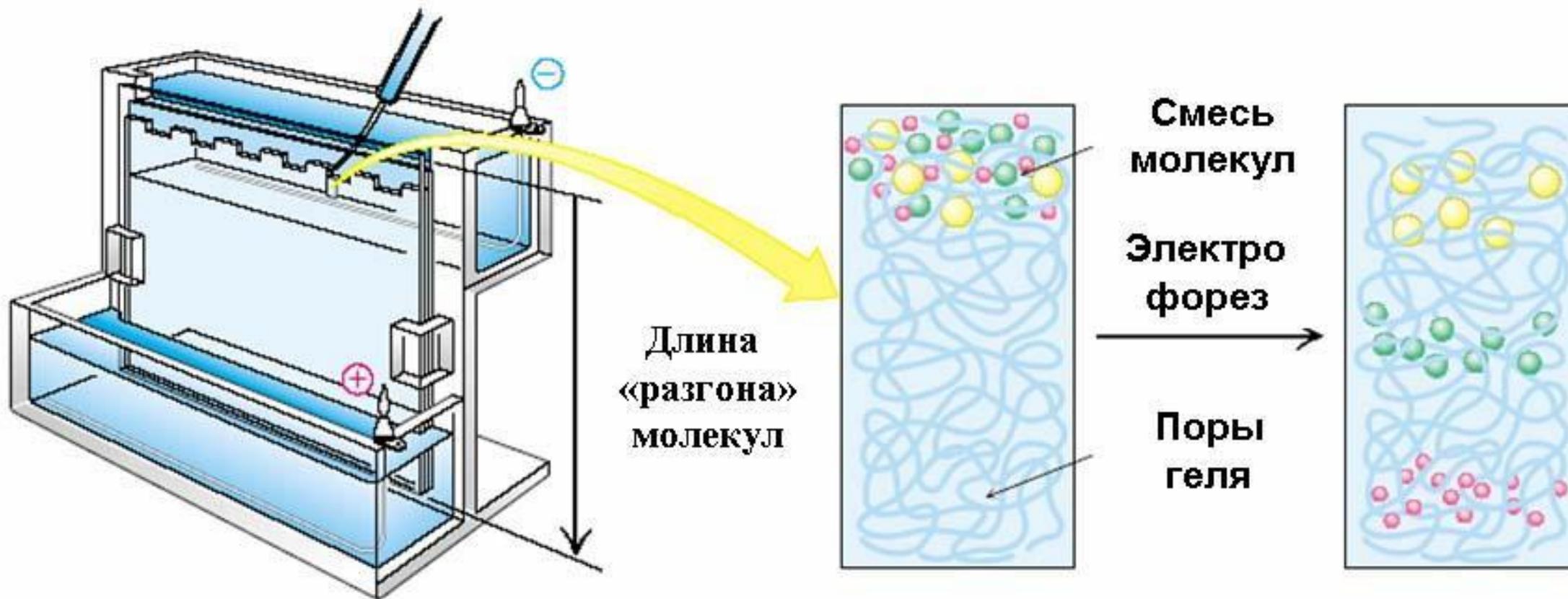


Fluorescent Detection

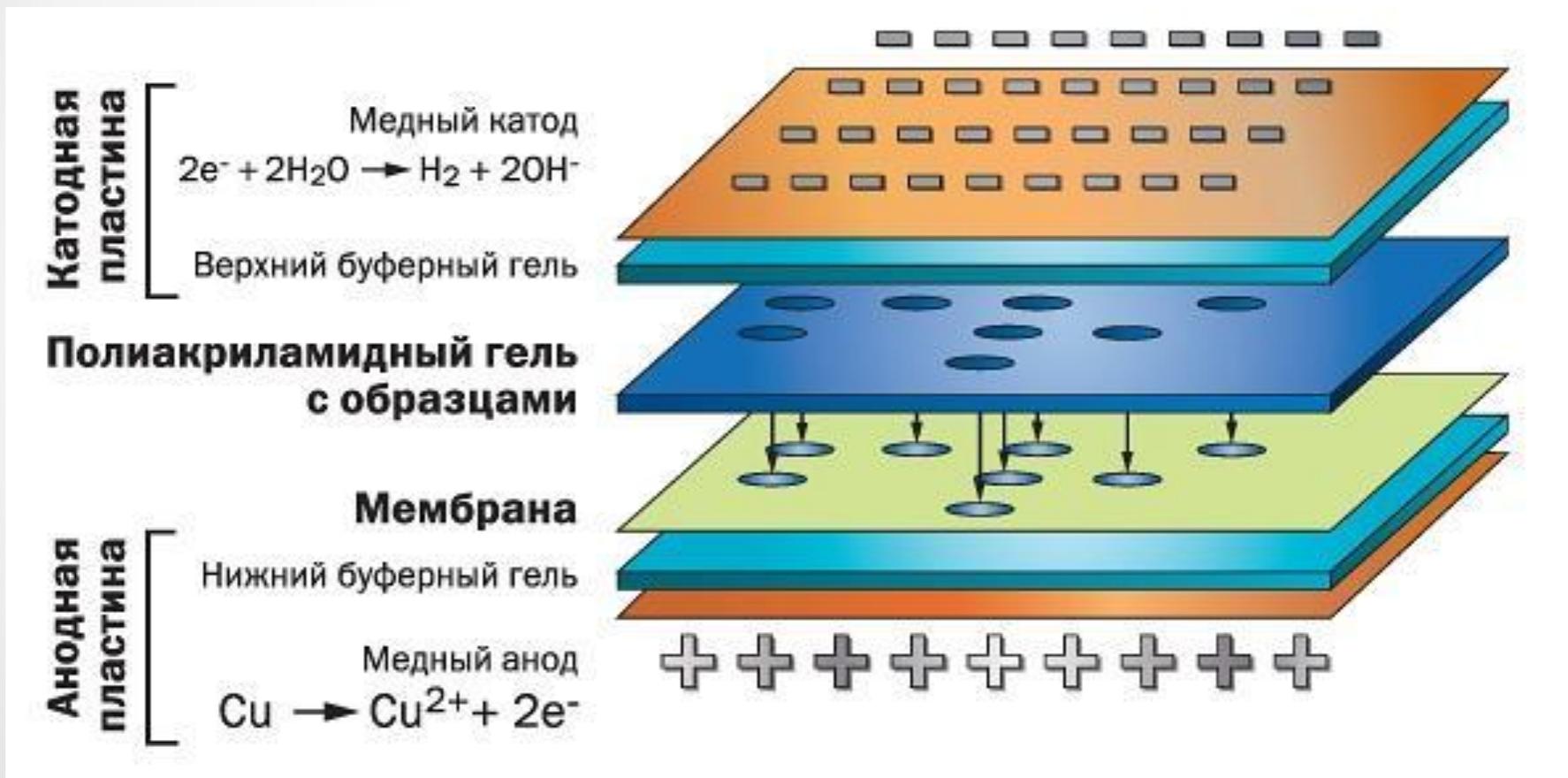


Membrane Staining

Электрофорез белков



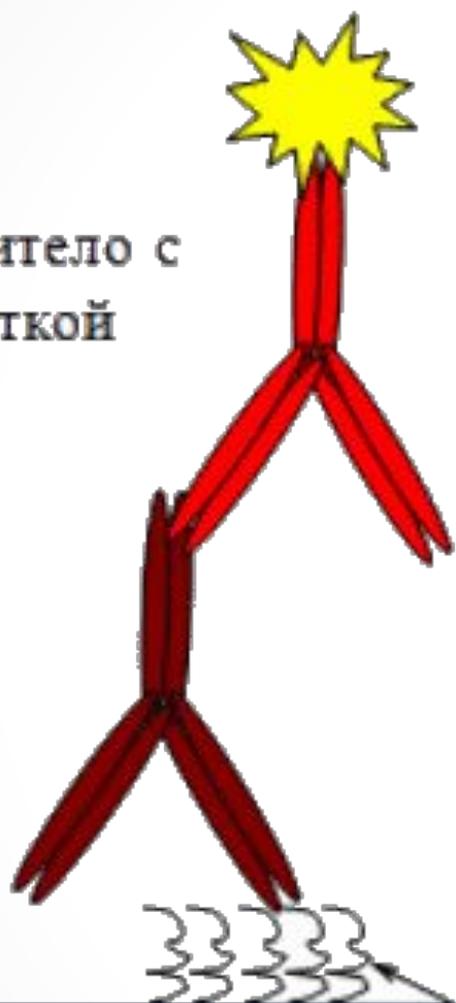
Электроперенос белков на мембрану



А

Вторичное антитело с ферментной меткой

Специфическое антитело



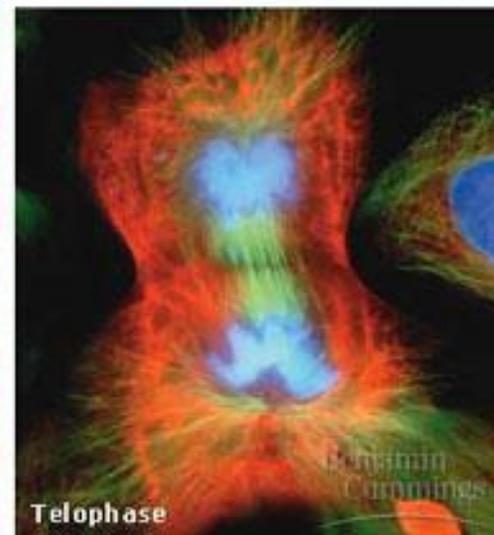
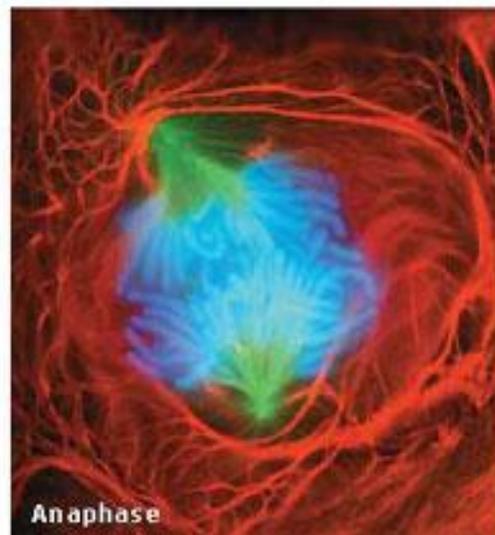
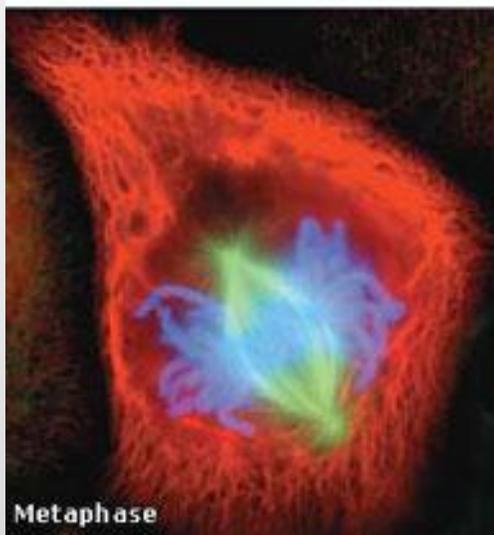
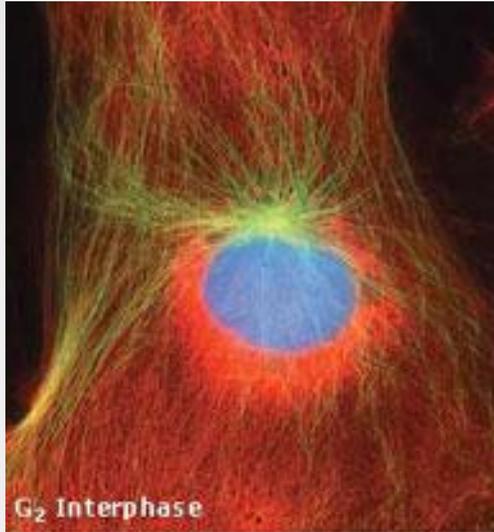
Б

Специфическое антитело с ферментной меткой



Белок-ДСН комплекс, иммобилизованный на нитроцеллюлозной мембране

Иммуноцитохимическое окрашивание



- Фиксация клеток
- Окрашивание первичными АТ
- Отмывка
- Окрашивание втор. АТ с флуоресцентной меткой
- ДНК – окрашивают синим флуоресцентным красителем DAPI

Иммунопреципитация

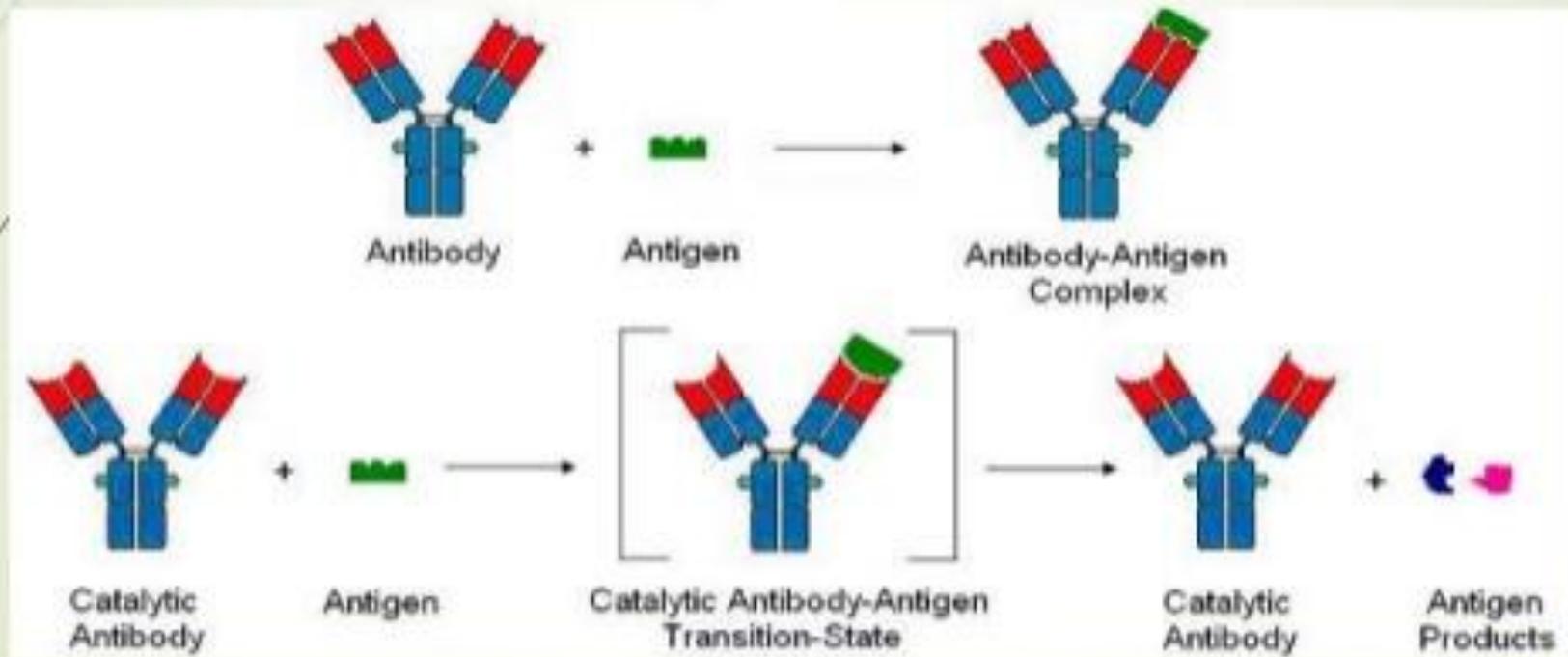
- Метод выделения белка из сложных смесей при помощи специфичных антител
- Антитела иммобилизуют на нерастворимых гранулах (агарозы, магнитные частицы)
- Осаждают комплексы (центрифугирование, магнит)
- Можно идентифицировать белки - партнеры

Абзимы

- Абзимы (англ. abzyme, antibody enzyme) — каталитически активные антитела. В широком смысле термином «абзимы» обычно называют моноклональные каталитически активные антитела, обладающие свойствами ферментов — то есть катализирующие определенные химические реакции.

Catalytic antibody

- Antibody specificity
- Enzyme's catalytic power



Антитела в медицине

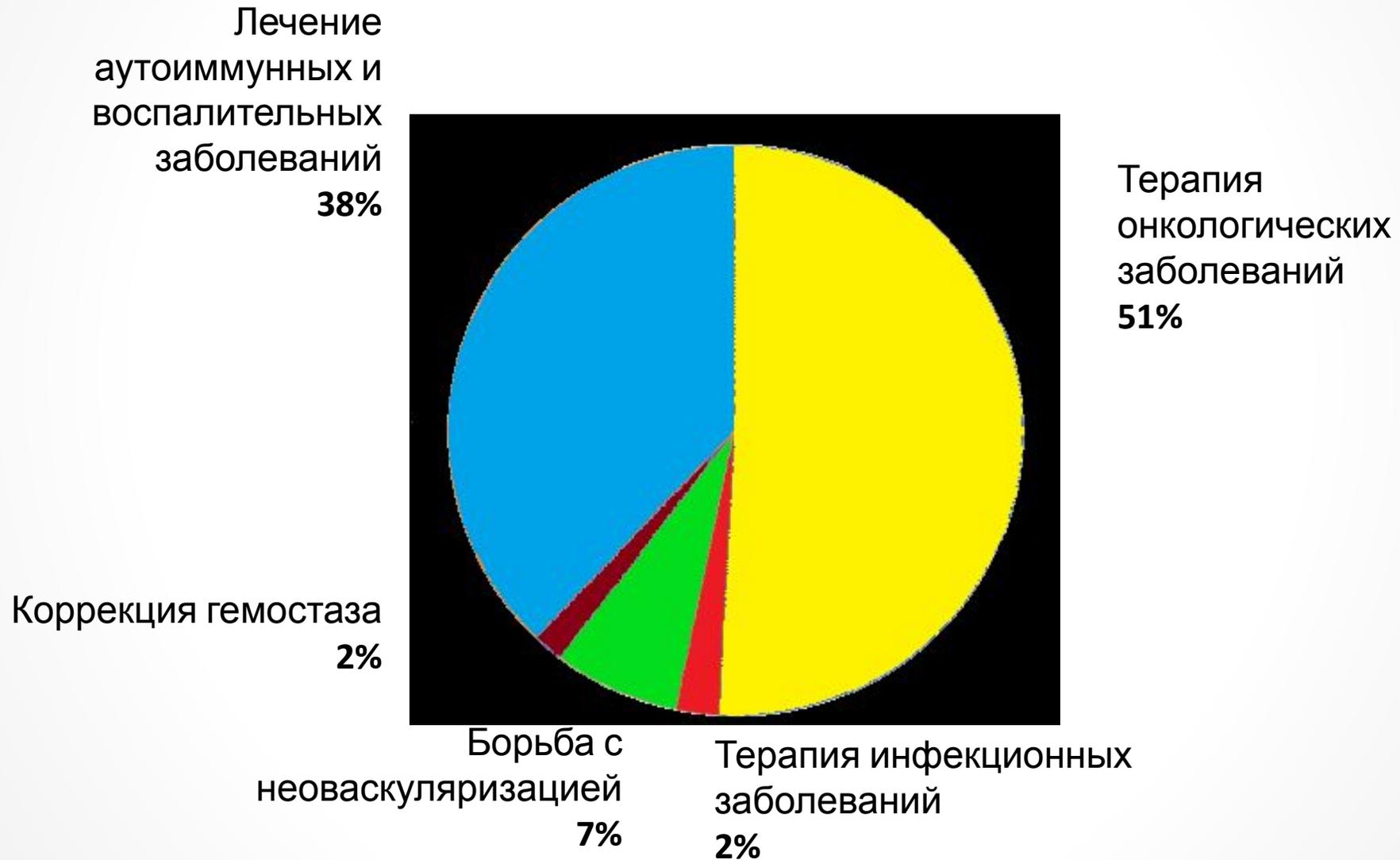
- К ноябрю 2014 года в США и Европе к использованию допущены 47 лекарственных препаратов на основе моноклональных антител
- Около 300 подобных лекарств в данный момент находятся на стадии клинических исследований.

-omab, -ximab, -zumab, -umab

Сегодня применение моноклональных антител в медицине основано на трех основных стратегиях:

- распознавание антителами характерных белков на поверхности раковых клеток, вирусов, бактерий с последующим привлечением систем иммунного ответа;
- специфичная доставка цитотоксичных молекул, связанных с антителами, к раковым клеткам;
- ингибирование белковых рецепторов, сигнальных молекул за счет специфического связывания с антителами.

Использование препаратов моноклональных антител в 2010 г.



Therapeutic monoclonal antibodies approved or in review in the European Union or United States

Source: Janice M. Reichert, PhD, Reichert Biotechnology Consulting LLC

http://www.antibodysociety.org/news/approved_mabs.php

Therapeutic monoclonal antibodies approved or in review in the European Union or the United States

International non-proprietary name	Trade name	Target; Format	Indication first approved or reviewed	First EU approval year	First US approval year
Idarucizumab	(Pending)	Dabigatran; Humanized Fab	Reversal of dabigatran-induced anticoagulation	In review	In review
Alirocumab	Praluent	PCSK9; Human IgG1	High cholesterol	In review	In review
Mepolizumab	(Pending)	IL-5; Humanized IgG1	Severe eosinophilic asthma	In review	In review
Necitumumab	(Pending)	EGFR; Human IgG1	Non-small cell lung cancer	In review	In review
Evolocumab	Repatha	PCSK9; Human IgG2	High cholesterol	EC decision pending	In review
Dinutuximab	Unituxin	GD2; Chimeric IgG1	Neuroblastoma	EC decision pending	2015
Secukinumab	Cosentyx	IL-17a; Human IgG1	Psoriasis	2015	2015
Nivolumab	Opdivo	PD1; Human IgG4	Melanoma, non-small cell lung cancer	EC decision pending	2014



Мазуров В.И., IV Всероссийская школа по клинической иммунологии, 2013г.

Схема получения инфликсимаба

