

Продуценты антител лимфоциты.
Технологии получения антител.
Дисплейный метод



Актуальность:

- Антитела животного происхождения (сыворотки, моноклональные антитела) обладают недостатком: низкая степень аффинности и авидности этих антител к антигенам.
- Антитела животного происхождения имеют отличный от человеческих аминокислотный состав, что может спровоцировать выработку антииммуноглобулинов у реципиента, и что еще хуже – вызвать аллергическую реакцию.
- Разработка новых методов получения антител предполагает решение вышеуказанных проблем.

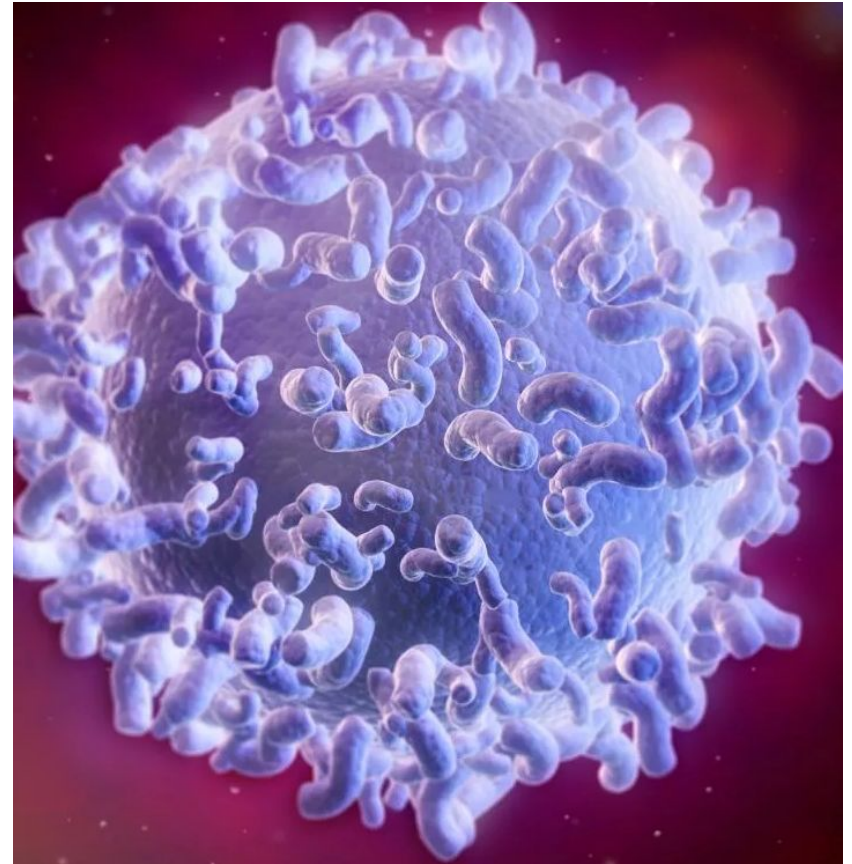


- **В-лимфоциты** являются основным клеточным функционером гуморального иммунитета. Для осуществления этой функции В-лимфоциты имеют на своей поверхности специальные рецепторы для связывания с антигеном – иммуноглобулины.

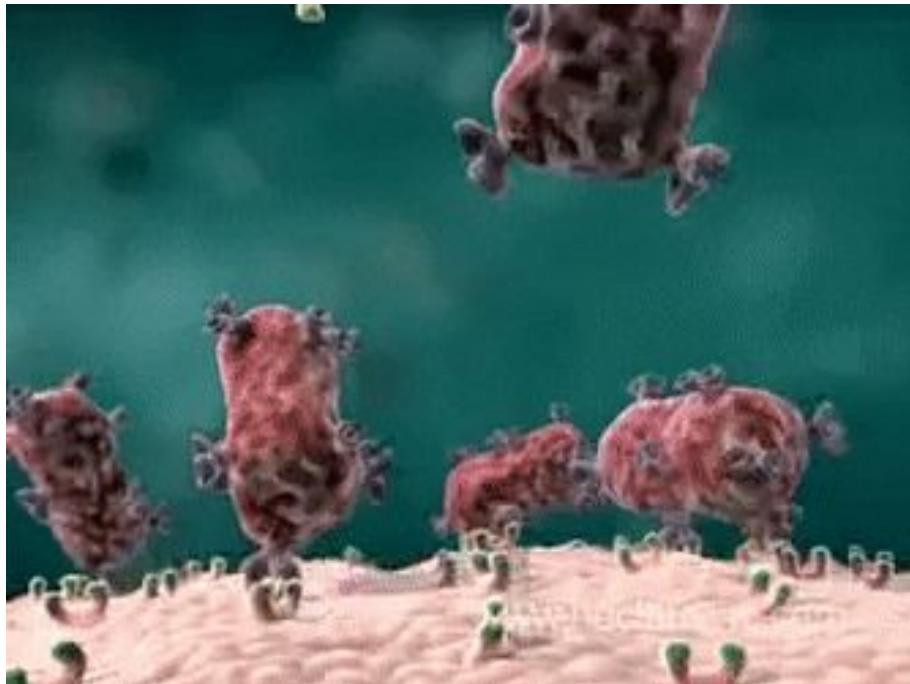


Рецепторы В-лимфоцитов:

- **CD21** – рецептор для С3 компонента комплемента;
- **CD23** – низкоаффинный рецептор для IgE;
- **CD40** – опосредует переключение на синтез другого изотипа Ig;
- **CD80** и **CD86** – костимулирующие молекулы, которые обеспечивают второй сигнал для активации В-лимфоцитов, взаимодействуя с соотв. рецепторами Т-клеток;
- **HLA II** класса – участвует в презентации антигена.



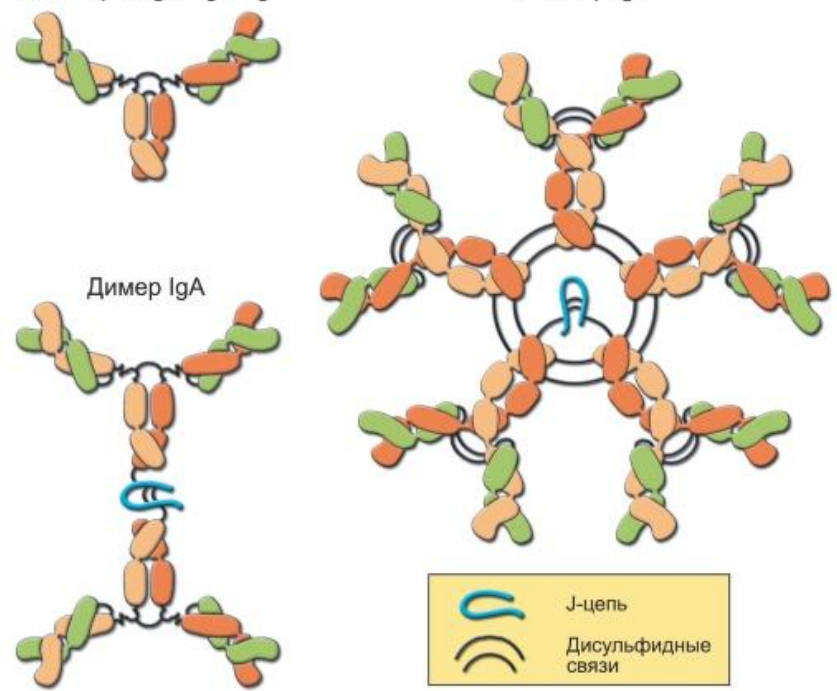
- Антитела – белки, вырабатываемый В-лимфоцитами в ответ на внедрение в организм антигена.



Антитела содержат 4 цепи:
2 легкие и 2 тяжелые.
Содержат констабельные и
вариабельные домены.

- **Подклассы.** У иммуноглобулинов классов G (IgG) и A (IgA) имеется несколько подклассов: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и IgA1, IgA2.
- **Изотипы.** Классы и подклассы иммуноглобулинов иначе называют изотипами, они одинаковы у всех особей данного вида.
- **Аллотипы.** Индивидуальные аллельные варианты иммуноглобулинов в пределах одного изотипа называются аллотипами.

Мономеры: IgG, IgD, IgE Пентамер IgM

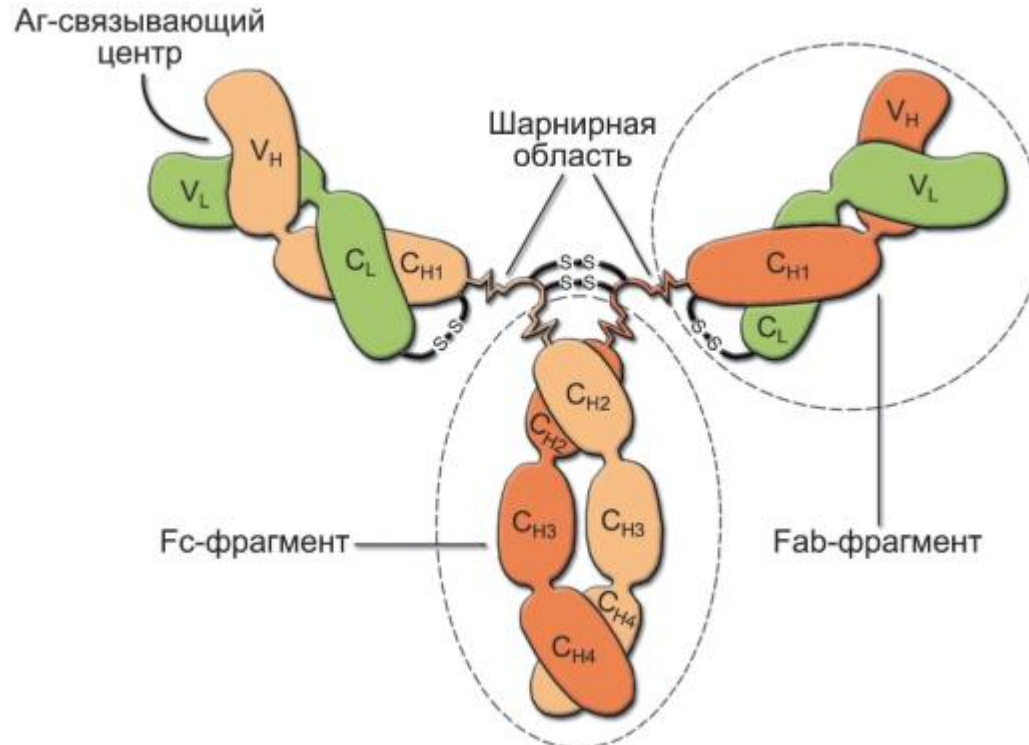


специфичности антитела относят к

- Классы антител:
 IgG (80%),
 IgA (15%),
 IgM (10%),
 IgD (менее 0,1%),
 IgE (менее 0,01%).

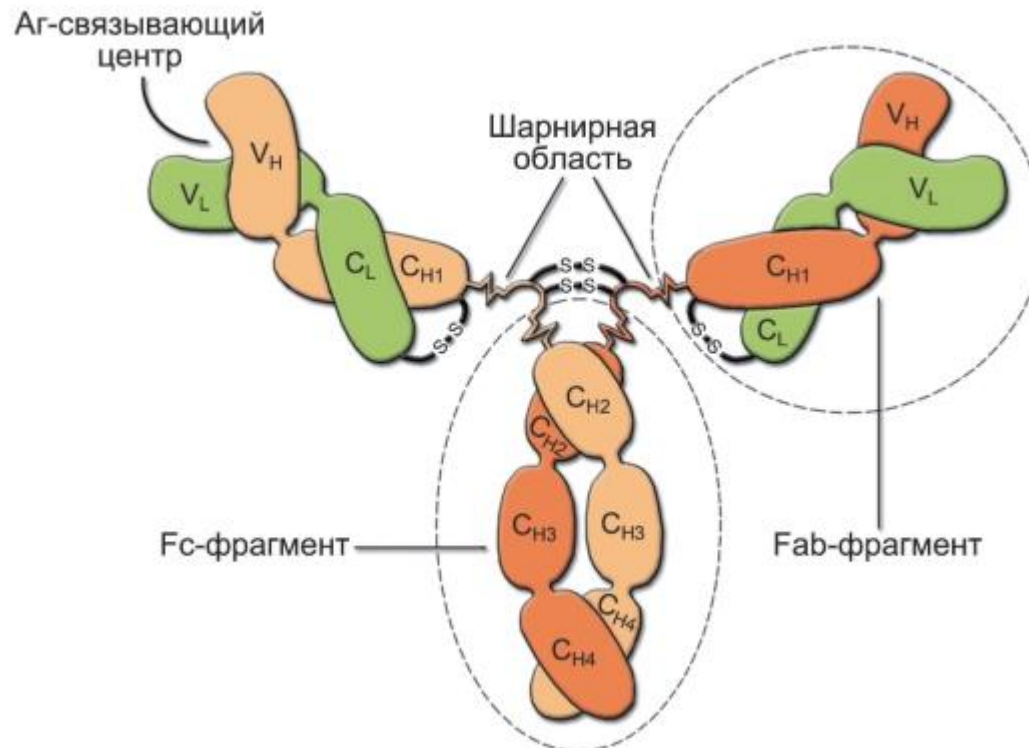
Структура иммуноглобулинов:

- **◇ Fab-фрагменты** (*Fragment, antigen binding* - антигенсвязывающие фрагменты) - 2 одинаковых фрагмента, сохраняющих способность связывать антиген.



Структура иммуноглобулинов:

- ◇ **Fc-фрагмент** (*Fragment, constant or crystallizable* - константный фрагмент) - непарный, легко кристаллизуется. Fc-фрагменты иммуноглобулинов в пределах одного изотипа строго идентичны (независимо от специфичности антител к антигенам). Они обеспечивают взаимодействие комплексов антиген-антитело с системой комплемента, фагоцитами, эозинофилами, базофилами, тучными клетками. При этом каждый класс иммуноглобулинов взаимодействует только с определёнными эффекторными клетками или молекулами.



Производство антител.

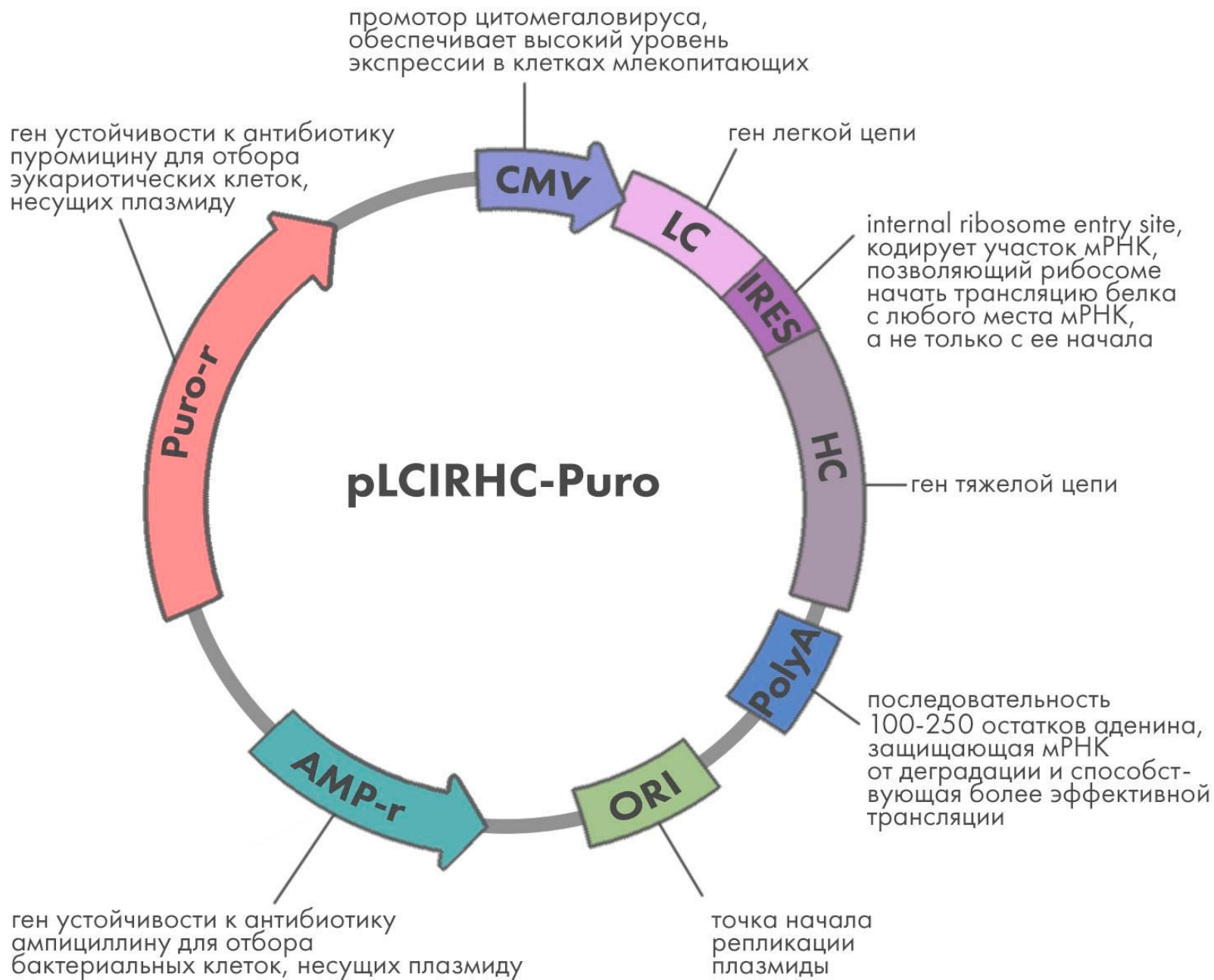
- Антитела практически невозможно синтезировать без использования живых систем, т.к. они имеют очень сложное строение.
- Для того чтобы клетка производила антитело, необходимо ввести в нее гены, кодирующие его тяжелые и легкие цепи. Также нужно, чтобы генетическая конструкция, которая вводится в клетку (*вектор*), содержала ряд вспомогательных элементов, обеспечивающих наиболее эффективную транскрипцию и трансляцию гена в клетке.

- Путем изменения генетических конструкций, кодирующих антитело, можно влиять на такие его характеристики, как способ действия, селективность к мишени, время выведения из организма и др.
- Если необходимо модифицировать **специфичность** или **селективность**, то изменению подлежат переменные фрагменты антител, отвечающие за связывание с антигеном (**Fab-фрагменты**).
- Если же нужно изменить другие параметры — время полужизни антитела, его механизм действия, — модифицируют константные участки (**Fc-фрагмент**).



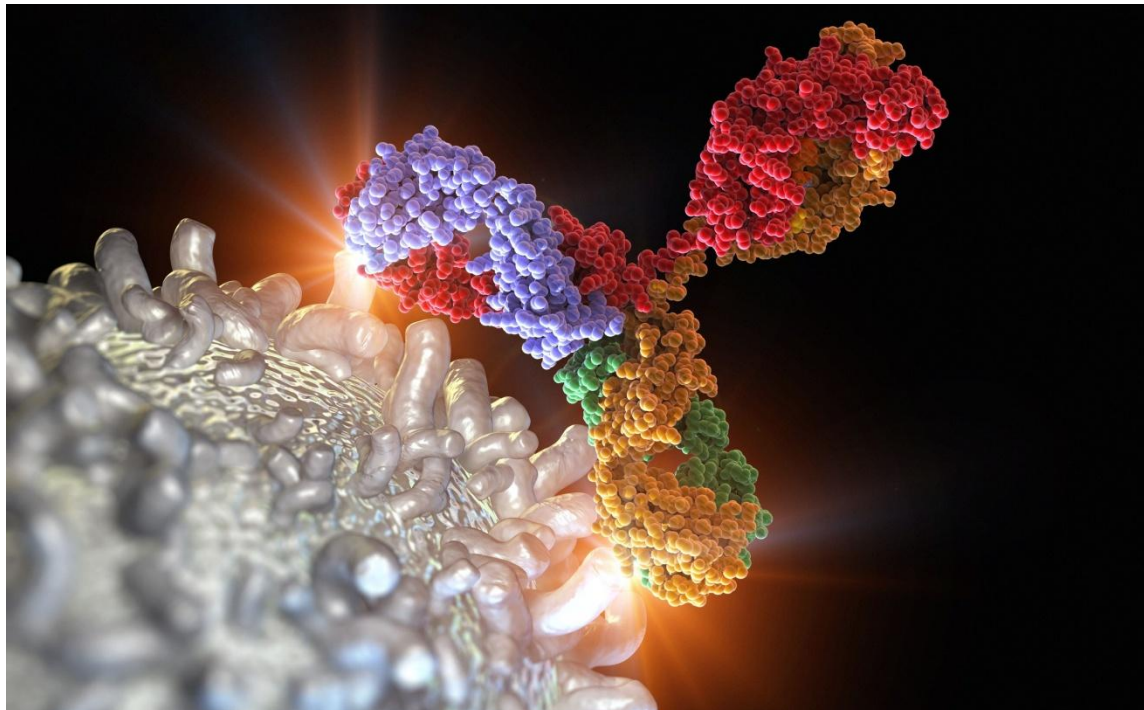
Генная инженерия антител

- Сейчас существуют программы, позволяющие оптимизировать нуклеотидную последовательность генно-инженерных конструкций для продукции антител *in silico*.
- В качестве вектора используют **плазмиды** — кольцевые ДНК, кодирующие как сам ген белка, так и вспомогательные элементы. Так, для экспрессии в эукариотических клетках используют **промотор** цитомегаловируса (CMV), обеспечивающий высокую эффективность транскрипции.



Получение переменных фрагментов антител

- Антиген, как правило, представляет собой белковую молекулу, и площадь поверхности контакта антитела с антигеном слишком велика для моделирования *in silico*, которое также осложняется наличием молекул воды. Поэтому приходится использовать биологические объекты, у которых есть способность очень тонко настраивать последовательность аминокислот антитела для обеспечения высочайшей **аффинности** к антигену.



Дисплейные методы получения антител.

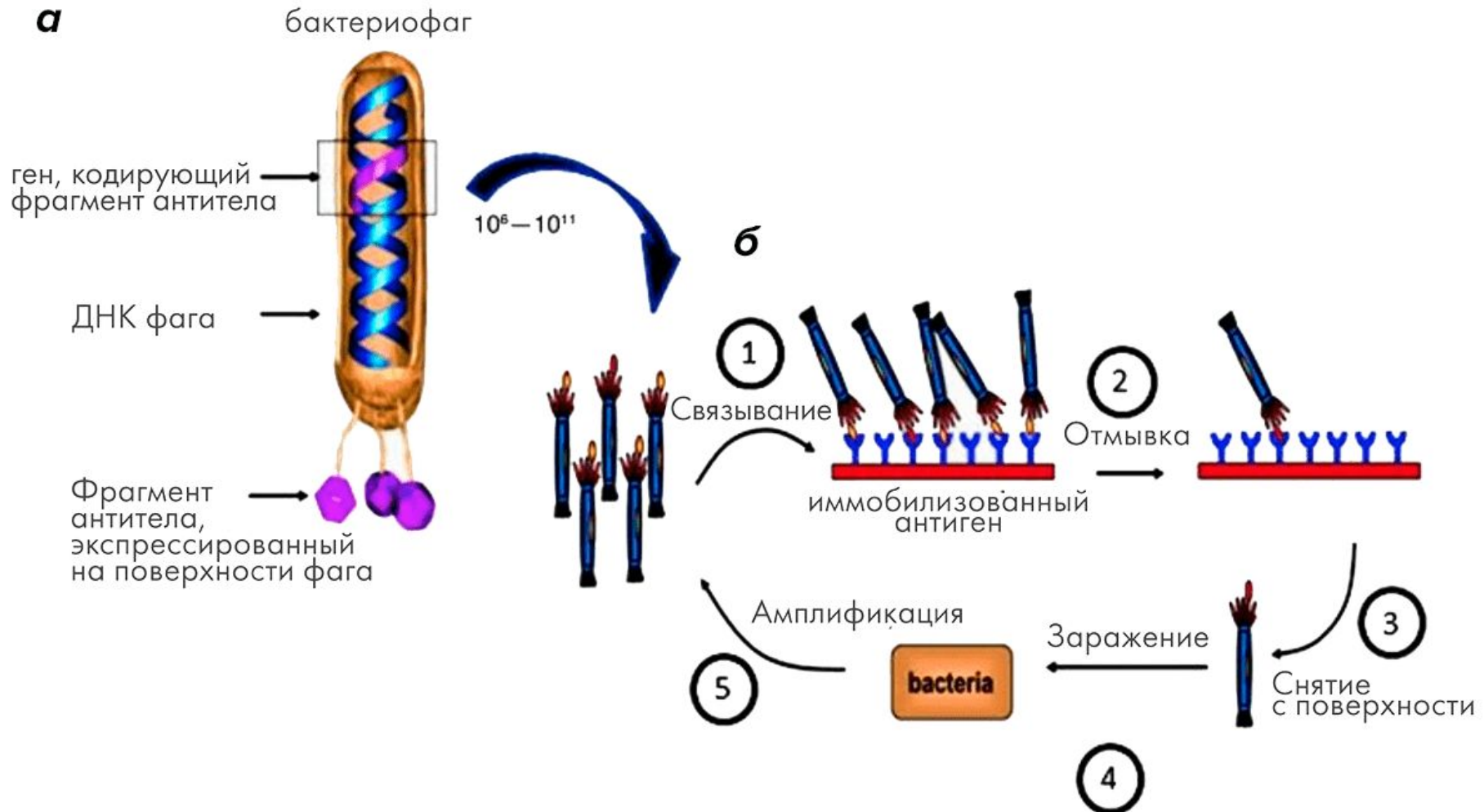


За использование метода фагового дисплея в отборе пептидов и антител была присуждена Нобелевская премия по химии 2018 г.

Получение антитела дисплейным методом *in vitro* схематически подражает эволюционному процессу формирования антител в организме :

- Сперва необходимо породить разнообразие генов, кодирующих переменные фрагменты — так получают библиотеки антител.
- Затем нужно экспрессировать эти гены, то есть преобразовать генотип в фенотип.
- Потом нужно осуществить селективное давление, которое бы заставило генотип эволюционировать.
- И наконец необходимо амплифицировать полученный результат.

Схема получения антител:



- 1. Целевые белки или последовательности ДНК помещаются в ячейки микротитрационного планшета.
- 2. Различные генетические последовательности, вставленные в ген синтеза капсида, экспрессируются в бактериофагах, таким образом, на оболочке каждого фага «отображается» свой белок, соответствующий внесенным генетическим изменениям.
- 3. Эти бактериофаги помещаются на планшет, и спустя некоторое время, которое требуется для связывания, смываются с него.
- 4. Таким образом, на планшете останутся только те фаги, которые хорошо связались с целевыми молекулами, а остальные будут смыты.
- 5. Связавшиеся фаги могут быть элюированы (отмыты) и использованы для получения новых фагов путём заражения подходящих бактерий-носителей. Новая популяция фагов представляет собой смесь, в которой намного меньше нерелевантных (не связывающихся с целевыми молекулами) фагов, чем в изначальной смеси.
- 6. Шаги 3-5 опционально можно повторить несколько раз для получения более богатой специфичными фагами популяции.
- 7. После амплификации с помощью бактерий секвенируется ДНК полученных специфичных фагов для определения белков или их фрагментов, взаимодействующих с целевыми молекулами.

Выводы:

- При помощи современных технологий можно прибегнуть к созданию антител без иммунизации крупных животных.
- В настоящее время существует 2 методики получения антител *in vitro*: метод молекулярных гибридом и метод фагового дисплея.
- Преимущество метода фагового дисплея состоит в том, что можно создать антитела с высокой афинностью и авидностью.
- Получаемые антитела можно гуманизировать.

Спасибо за внимание