**Лекция № 13**

**Основные направления и перспективы гибридомной биотехнологии**

**План лекции:**

1 Моноклональные антитела

2. Химерные, гуманизированные и рекомбинантные антитела

3. Технология получения рекомбинантных фаговых антител.

**Моноклональные антитела**

Моноклональные антитела представляют собой важнейший инструмент в руках иммунолога-исследователя. Применение их в комбинации с такими методами, как эпитопное картирование и молекулярное моделирование, делает возможным составление антигенного профиля и визуализацию макромолекулярной поверхности. Кроме того, нельзя представить себе современную клиническую лабораторную диагностику без использования моноклональных антител.

Моноклональные антитела- антитела, специфичные к одному эпитопу и продуцируемые одним В- клеточным клоном.

 Первой проблемой, вставшей перед учеными на пути создания МАТ явилось то, что В-клетки погибали через несколько дней после их изоляции, например, из селезенки мышей.

Это повлекло за собой развитие методик иммортализации В-клеток: применялась трансформация клеток вирусами или слияние их с опухолевыми клетками (клетками миеломы), так что получались клеточные гибриды, секретирующие моноклональные антитела – «гибридомы»

 Имеются рекомбинантные технологии получения антител,

Для того, чтобы получить мышиные моноклональные антитела, необходимо пройти 4 стадии: 1) иммунизацию, 2) гибридизацию иммунных В-клеток с клетками миеломы и селекцию, 3) скрининг, 4) исследование свойств полученных антител и их описание.

*Стадия 1. Иммунизация.* Иммунизация BALB/с мышей осуществляется тем иммуногеном, к которому необходимо получить антитела, обычно в присутствии адьюванта.

В качестве иммуногена может выступать белок, целая клетка, пептид достаточной протяженности или короткий пептид, присоединенный к белку-носителю.

Белки, как правило, вводятся под кожу, а клетки – внутрибрюшинно. Для получения хорошего иммунного ответа необходимо, чаще всего, несколько инъекций. После каждой инъекции у мышей берут кровь и оценивают титр антител при помощи иммуноферментного анализа (для проведения которого, кстати, тоже необходимы моноклональные антитела). Заметим, что проведение повторных иммунизаций способствует переключению типа вырабатываемых антител с IgM на IgG.

В подавляющем большинстве случаев желательно получить моноклональные антитела класса IgG, т.к. они менее склонны к деградации и более применимы в качестве терапевтических агентов. Выбирается мышь с наиболее активным иммунным ответом, и из ее селезенки или лимфоузлов изолируют В-лимфоциты для последующей гибридизации. Заметим также, что помимо иммунизации in vivo, описанной выше, существует еще возможность иммунизации in vitro, проводимой на культивированных клетках селезенки с минимальным количеством антигена.

*Стадия 2. Гибридизация и селекция.* Процесс гибридизации заключается в слиянии В-лимфоцитов от иммунизированной мыши с клетками миеломы, в присутствие полиэтиленгликоля.

 Клетки миеломы дефектны по ферменту гипоксантин-гуанинфосфорилрибозилтрансферразе (ГГФРТ), и это их свойство важно для последующей селекции гибридом. Для лучшего понимания этого процесса, заметим, что существует два пути биосинтеза нуклеотидов – путь de novo (проще говоря, с нуля) и альтернативный, осуществляемый как раз с помощью фермента ГГФРТ. Клетки миеломы, не имеющие этого фермента, не могут использовать альтернативный путь.

Когда слияние произошло, необходимо удалить оставшиеся миеломные клетки из смешанной культуры, т.к. размножаясь, они могут «вытеснить» гибридомные клетки. Эта селекция производится в среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин. Аминоптерин блокирует de novo путь синтеза нуклеотидов, и миеломные клетки, для которых альтернативного пути нет, погибают, а гибридомы, заполучившие этот фермент от В-лимфоцитов, остаются. Колония гибридомных клеток растет и через 20-30 дней ее начинают культивировать в среде без аминоптерина, т.к. он уже не нужен.

*Стадия 3. Скрининг.* Теперь, получив гибридомы, мы должны найти и выделить те из них, которые продуцируют антитела нужной специфичности. Вначале тестируют клеточный супернатант на реактивность и специфичность содержащихся в нем антител, для чего применяют ИФА. В некоторых случаях используют иммуноцитохимический анализ. Гибридомы, секретирующие антитела, неспецифичные к данному антигену, стараются выявить и удалисть как можно раньше. Выбранные гибридомы пересаживают в большие по размеру колбы и культивируют, в супернатанте при этом содержатся моноклональные антитела в концентрации, как правило, от 1 до 60 мкмоль/мл. Получаемые таким образом антитела замораживают и хранят до тех пор, пока они не понадобятся.

*Стадия 4. Анализ моноклональных антител.* За всеми вышеописанными действиями следует исследование реактивности, специфичности и кросс-реактивности получаемых антител. Необходимо определить изотип секретируемых антител от каждой полученной гибридомы. Поскольку, как правило, мы имеем несколько стабильных позитивных гибридом, образовавшихся при слиянии различных В-лимфоцитов с миеломными клетками, мы располагаем целой коллекцией моноклональных антител к данному антигену различного изотипа (к примеру, IgG1, IgG2a, IgG2b и т.д.). Антитела тестируются также на связывание с антигеном в условиях различных систем анализа.

Это важно особенно в тех случаях, если антитела будут применяться в диагностических целях, поскольку в разных диагностических системах они могут вести себя по-разному, ведь при использовании некоторых технологий эпитопы антигена могут быть маскированы, разрушены или стать недоступными для антител в результате иммобилизации.

 Моноклональные антитела могут быть специфичны к нескольким эпитопам, поэтому проводят также эпитопное картирование, т.е. выявление тех последовательностей аминокислот, с которыми может связаться антитело. Каждое антитело с помощью ИФА тестируется на связывание с пептидами длиной порядка 10-20 а/к, перекрывающими всю структуру белка-антигена. Если антитела не связываются ни с одним пептидом, то, вероятно, они специфичны к конформационным эпитопам. Для анализа антигенных детерминант таких антител применяют конкурентный ИФА. Дальнейшая характеристика свойств антител может включать анализ аффинности их связывания с антигеном например, с помощью, поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

 **ППР** – это оптический биосенсорный метод, позволяющий проводить наблюдения в реальном режиме времени, что позволяет не только регистрировать взаимодействие молекул, но и оценивать кинетические характеристики этого процесса.

Лазерный пучок света, проходящий через призму, падает на поверхность, покрытую золотом. Свет отражается от поверхности по всем направлениям за исключением критического угла. Лазерный пучок в этом направлении возбуждает плазмонную волну на поверхности металла, что и вызывает падение интенсивности отраженного света.

 Величина критического угла строго зависит от коэффициента преломления слоя, прилегающего к поверхности сенсора.

Таким образом, оценивая изменения критического угла с течением времени, можно определить изменения, происходящие на поверхности сенсора.

После того, как моноклональные антитела получены и охарактеризованы, они могут применяться в различных целях.

Как правило, цели эти – научно-исследовательские (например, эпитопное картирование антигена) или диагностические (диагностика инфекций, гистопатологическая диагностика аутоиммунных заболеваний, злокачественных опухолей и т.д.).

Применение мышиных антител с лечебной целью затруднено, т.к.они и могут вызвать на себя иммунный ответ.

Чтобы этого избежать, существуют способы создания химерных антител, с мышиным Fab-доменом и человеческим Fc-доменом.

**Химерные, гуманизированные и рекомбинантные антитела**

В последние годы применение моноклональных антител в научно-исследовательской и клинической практике сильно возросло, благодаря такому свойству антител, как чрезвычайно высокая специфичность.

Начали создаваться моноклональные антитела, «заточенные» под применение в той или иной сфере клинической практики:

менее иммуногенные, меньших размеров, большей аффинности или несущие на себе специальные терапевтические или диагностические лиганды, например, радиометки, флуоресцентные метки, токсины или ферменты, превращающие неактивное пролекарство в активную цитотоксическую форму.

После того, как был разработан способ получения мышиных моноклональных антител, чрезвычайно возрос интерес к применению иммунотерапии антителами злокачественных опухолей.

Однако интерес этот начал быстро гаснуть, поскольку в клинической практике применения таких антител медики столкнулись с серьезными трудностями. Первая и наиглавнейшая из них – «анти-мышиный» антительный ответ человеческой иммунной системы, направленный на вводимые с лечебной целью антитела.

К другим проблемам можно отнести менее выраженную антителозависимую цитотоксичность и меньшую продолжительность жизни мышиных моноклональных антител по сравнению с человеческими.

Наладить продукцию человеческих моноклональных антител оказалось также затруднительным вследствие низкого уровня гибридизации (слияния человеческих лимфоцитов с клетками миеломы) и низкой стабильности с большим трудом полученных гибридом.

Вследствие всех вышеописанных обстоятельств начали развиваться технологии «очеловечивания» мышиных антител путем определенных их модификаций.

Было предложено 3 подхода к модификации мышиных антител:

1. *Химерные антитела первого поколения.*

Ген вариабельного домена мышиного антитела клонируется и экспрессируется в системе вместе с генами константного домена человеческого антитела. Получают гибридные антитела с мышиным Fab- и человеческим Fc-доменом.

1. *Гиперхимерные антитела второго поколения.*

В этом подходе используются лишь минимальные фрагменты мышиного антитела, которые определяют его комплементарность к антигену, эти фрагменты как бы встроены в структуру человеческого антитела. Получаемые таким образом антитела больше похожи на человеческие, чем антитела первого поколения, и потому менее иммуногенны. Если химерное антитело содержит 30-35% мышиного и 65-70% человеческого белка, то в гиперхимерном (гуманизированном) антителе содержание человеческого белка достигает 90%, а мышиного остается только 10%. Частота образования нейтрализующих антител в ответ на введение этих модернизированных антител уменьшается с 74% в случае мышиных до 46% - химерных и 4% - гиперхимерных антител.

3. Получение биспецифических гуманизированных антител. Биспецифичные антитела получают из моноклональных антител, специфичных к совершенно разным антигенам. Так, например, биспецифическое антитело, применяемое для лечения опухоли, одним плечом гипервариабельного домена связывается с поверхностным антигеном опухолевой клетки (HER2), а другим с антигенным рецептором Т-клетки (CD3), что обеспечивает их тесный контакт.

**Технология получения рекомбинантных фаговых антител.**

Такие фрагменты намного легче получить рекомбинантным путем от бактерий, поскольку для их синтеза не требуется гликозилирование.

 Fab -фрагменты состоят из легкой и тяжелой цепей, соединенных между собой в области CL- и CH1-доменов.

Однако Fv-фрагменты, состоящие только из вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, трудно получить подобным образом, т.к. вариабельные домены не склонны к стабильной ассоциации.

Был разработан способ конструкции одноцепочечных Fv-фрагментов (scFv), в которых легкая и тяжелая цепи соединены между собой коротким пептидом .

В 1990 году Mc Cafferty и соавт. предложили методику, с помощью которой удалось добиться экспрессии sc Fv-фрагментов на поверхности нитевидного бактериофага.

Нитевидный фаг – это вирусоподобная частица, способная инфицировать бактерии E. сoli, вводя в бактериальную клетку свой генетический материал. Геном этого фага представляет собой одноцепочечную молекулу ДНК, кодирующую пять оболочечных фаговых белков. После того, как ДНК фага оказывается в клетке, она начинает реплицироваться, внутри клетки происходит сборка фаговых частиц, и новые бактериофаги секретируются во внешнюю среду, не разрушая при этом саму бактериальную клетку.

С помощью генной инженерии, ДНК, кодирующую scFv-фрагмент антитела (предварительно амплифицированную с помощью ПЦР) можно «вставить» в ген оболочечного белка бактериофага. Таким образом, на поверхности фага можно экспрессировать scFv-фрагменты антител любой специфичности, что делает возможным создание т.н. фаговой библиотеки.

Из такой библиотеки можно будет отобрать фага необходимой специфичности и легко размножить его, получив необходимое число копий scFv-фрагментов антител к какому-либо антигену.

Самый простой способ провести селекцию фага нужной специфичности – инкубировать фаги с антигеном, сорбированным на подложке. Все фаги, не связавшиеся с антигеном, удаляются при отмывке, а связавшиеся с ним изолируются, размножаются, подвергаются очистке и используются в различных целях.

Чаще всего - в качестве лабораторных реагентов, заменяющих обычные антитела, например, в проточной цитометрии или иммуногистохимическом и иммуноферментном анализах.

Также рекомбинантные антитела могут применяться для лечения злокачественных новообразований. Некоторой сложностью применения фаговых антител в диагностических целях является то, что они несут на себе лишь один сайт связывания с антигеном, в то время как у обычного антитела их, как минимум, два. Т.е. фаговые антитела должны иметь очень высокую аффинность связывания с антигеном и не могут быть случайно удаленными при отмывке. Однако с появлением таких методов, как плазмонный резонанс, позволяющий точно определять аффинность связывания молекул, эти трудности уже несложно преодолеть, тем более, что существуют способы повысить аффинность scFv-фрагментов к антигену путем направленного мутагенеза.