

## Лекція 2. Методи отримання антитіл з необхідними властивостями

### Властивості антигенів та антитіл

Антигени. Властивості антигенів як індукторів імунної відповіді. Валентність антигенів  
Антитіла. Природа та структура молекули антитіл

Валентність антитіл. Афіність і авідність антитіл. Специфічність антитіл

Одержання антитіл. Поліспецифічні та моноспецифічні сироватки. Перехресно-реагуючи антитіла

Властивості поліклональних анти сироваток

Загальні принципи роботи з антитілами

Моноклональні антитіла

Антитіла як антигени. Вторинні антитіла

### Властивості антигенів та антитіл

Імунологічний аналіз має у своїй основі специфічність та кількісні взаємодії антитіл з антигеном.

Відповідно до традиційних уявлень, антиген - це молекула, здатна викликати специфічний імунний відповідь, який має три форми: продукцію антитіл, розвиток реакцій клітинного імунітету і стан толерантності.

У більш широкому сенсі антигенами позначають суміші молекул, цілі мікроорганізми, клітини, що використовуються як тригер розвитку імунної відповіді, або полідетермінантні мішені для зв'язування антитіл в імунологічних тестах. Для того щоб розрізняти молекули, що індують утворення антитіл, або розвиток реакцій клітинного імунітету антиген називають імуногеном, а молекули, які є мішенями для зв'язування антитіл називають антиген. Це допомагає розділення уявлень про імуногенні і антигенні властивості молекул, що проявляються в здатності зв'язування антитіл.

У таблиці 1 узагальнені дані про типі антигенів, їхнє походження та приклади.

Таблиця 1 – Класи антигенів та їхнє походження

Клас	Походження	Приклади	
		Приклади типів	Приклади специфічності
Природні	Рослини, бактерії, тварини	Корпускулярні (частки)	Клітини крові, бактерії, віруси
		Розчинні	Токсини, токсоди*, білки, вуглеводи, глікопротеїни, ліпопротеїди
Природні модифіковані	Хімічно модифіковані природні	Білки, що пов'язані з йодом, кон'югати білок-гаптен	
Синтетичні	Молекули, синтезовані за допомогою хімії	Поліпептиди, поліамінокислоти, мультіланцюгові сополімери	
*токсоїд – токсин, у якого в результаті обробки втрачені токсичні властивості, але збережена імуногенність			

Екзогенні антигени, які можуть викликати захворювання в організмі господаря, називаються патогени. Патогени - вірусні, бактеріальні та паразитарні антигени. Автоантигени – антигени власних тканин господаря, індують імунну відповідь і викликають розвиток автоімунних захворювань. Антигени-алергени (наприклад, пилок), антигени, що викликають стан гіперреактивності в імунній відповіді, алергійні реакції.

Толерогени – антигени, що викликають стан толерантності, а не імунної відповіді. Прикладом природних толерогенів є антигени власних тканин господаря. Екзогенні антигени можуть бути толерогенами, якщо вони вводяться в організм реципієнта на ранній стадії його розвитку, тобто до на стадії неповного формування його імунної системи.

*Антигени. Властивості антигенів як індукторів імунної відповіді. Валентність антигенів*

*Чужерідність та досить складна структура.* Структури на антигені, які розпізнаються імунокомпетентними клітинами й антитілами, називають антигенні детермінанти.. Структури антигенних детермінант, комплементарні паратопам антитіл називають епітопи.. Антигени, здатні індукувати імунну відповідь, характеризують

- 1) жорсткість структури,
- 2) досить висока м.м.,
- 3) здатність до процесингу в клітинах, що презентують антиген (АПК),
- 4) досить тривалий час персистування – час взаємодії з різними АПК,
- 5) специфічність – вона визначається структурою антигенних детермінант; у білків це 3 - 4 амінокислотних залишки, у вуглеводів – 5 - 6 залишків цукрів. Найбільшу значимість мають амінокислотні залишки N – і C – кінців та циклічних амінокислот.

*Детермінанти, епітопи, валентність антигенів.* Певні ділянки тривимірної структури імуногенів і антигенів називають детермінанти. Ці ділянки здатні взаємодіяти як зі специфічними рецепторами лімфоцитів, індукуючи тим самим імунну відповідь, так і з антигензв'язуючими центрами специфічних антитіл (епітопи). Складні антигени мають безліч антигенних детермінант. Одна антигенна детермінанта може бути утворена залишками 4-6 амінокислот або цукрів. Детермінанти надзвичайно різноманітні за формою та розподілу зарядів, що визначає різноманітність реакцій гуморальної імунної відповіді, її поліклональність. Уважають, що одна детермінанта доводиться на м.м. білка 5000 дальтон.

Кількість антигенних детермінант (епітопів, сайтів) визначає валентність антигенів. Антигени можуть бути одновалентні (одно сайтові), двовалентні (двох сайтові), полівалентні.

При імунізації тварин полівалентними антигенами одержують спектр антиген специфічних поліклональних антитіл.

Однакові по амінокислотному складу й послідовності амінокислот, антигенні детермінанти можуть бути різноманітні за формою, розподілу заряду. Саме тому вони розпізнаються й зв'язуються різними В – лімфоцитами й визначають поліклональну імунну відповідь.

Гаптен – сполука, яка не володіє властивостями імуногену, але придбає їх при зв'язуванні з білками – носіями. Гаптени – одно сайтові.

Антиген – структура, що розпізнається імунною системою, як що антиген ініціює імунну відповідь його звать імуноген, а як що антиген блокує імунну відповідь – це толероген.

*Антитіла. Природа та структура молекули антитіл*

Антитіла належать до типу білкових молекул, які називають імуноглобуліни (Ig). В організмі людини це гетерогенна популяція, що складається з 5 класів або ізотипів. Кожен клас імуноглобуліну в цілому характеризується різними функціями, а також різними періодами напіврозпаду. Імуноглобуліни можуть бути знайдені в рідких секретах, або пов'язаними з поверхнею клітини, таких як В лімфоцити.

Основна структурна одиниця молекул антитіл – 4 мономерні ланцюга. До складу цих чотирьох ланцюгів входять два ідентичних важких (H) ланцюгів і два ідентичних легких (L) ланцюгів.

Кожний ланцюг містить N-кінець і С-кінець. N-кінці L-і H-ланцюгів є частиною варіабельного або «V» регіону, С-кінці - константного або «С» регіону. Таким чином, як в легких так і в тяжких ланцюгах є варіабельні і константні регіони, які позначаються як  $V_L$  і  $C_L$ ,  $V_H$  і  $C_H$  відповідно. У легких ланцюгах два регіони (домени): варіабельний і константний.  $C_H$  регіон ділиться на три області (домени), які позначаються  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  і  $C_{H3}$ . Частина молекули антитіла, яка пов'язує антиген, розташована у варіабельних регіонах легких та важких ланцюгів. Між  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  розташована петля або шарнірна ділянка. Регіон петлі формується з двох важких ланцюгів. Шарнірна ділянка забезпечує гнучку структуру антитіла. Під дією папаїну молекула імуноглобулінів на рівні шарнірної ділянки розщеплюється на два фрагменти – фрагмент, що зв'язує антиген  $F(ab)_2$  та Fc-фрагмент.

Послідовність амінокислот у константних регіонах антитіла генетично детермінована й завжди постійна для даної тварини або людини, вона визначає видову специфічність антитіла. Розрізняють 5 константних структур важких ланцюгів антитіла, назва яких визначила назву класу імуноглобулінів:  $\mu$  – IgM,  $\gamma$  – IgG,  $\alpha$  – IgA,  $\epsilon$  – IgE,  $\delta$  – IgD. Варіанти в структурі відповідних важких ланцюгів визначають підкласи імуноглобулінів. Їх 4 в IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) і 2 в IgA (IgA1, IgA2) [ ].

Константна ділянка антитіла, названа Fc-фрагментом, відіграє важливу роль у виконанні ефекторних функцій імуноглобулінів: зв'язування з комплементарними до Fc-фрагмента рецепторами мембран нейтрофілів і моноцитів, В – лімфоцитів, рецепторами на плаценті, що забезпечує проходження материнських імуноглобулінів до плода, тобто Fc-фрагмент забезпечує взаємодію антитіла з іншими компонентами імунної системи.

Унікальною особливістю антитіла є їхня здатність вибірково, специфічно взаємодіяти з антигеном, що індукував їхній синтез. Здатністю до зв'язування з антигеном володіють тільки варіабельні домени молекули імуноглобуліну.

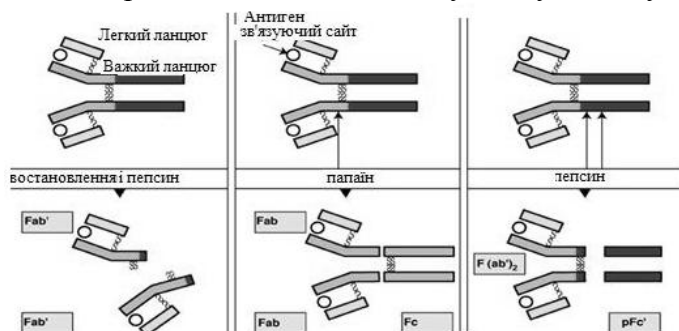


Рис – 1 – Загальна структура імуноглобулінів

Ці ділянки називають антигензв'язуючі сайти або Fab-фрагменти. Fab-фрагмент антитіла зв'язується з епітопом. При зв'язуванні антитіла з антигеном відбуваються значні конформаційні зміни всієї молекули імуноглобуліну, особливо в його константній ділянці – Fc-фрагменті (рис.1) [ ]. Конформаційні зміни Fc-фрагменту є сигналом і необхідною умовою для приєднання до нього компонентів комплементу.

Специфічність антитіла до антигену є головним чинником, що забезпечує безпеку організму від дії комплементу на свої власні структури, а у випадку аутоімунних захворювань – це пусковий елемент руйнування власних тканин і клітин.

Таким чином, варіабельні домени антитіла антигенспецифічні і забезпечують розпізнавання та зв'язування антигену, що індукував їхній синтез, константні домени забезпечують зв'язок з гуморальними та клітинними ланками імунної системи. Сигналом для підключення цих ланок є зміна конформації Fc-фрагмента антитіла, що утворили комплекс з антигеном.

Що розпізнають антитіла? Структури на поверхні вірусів, бактерій, грибів та інше. Ці поверхні структури (епітопи) можуть бути: білками, нуклеїновими кислотами, ліпідами,

сахарами, деякими амінокислотами, фосфатними групами, метильними групами та їхніми комбінаціями. Антитіла – інструмент №1 в імунному аналізі!

### Валентність антитіл

Здатність антитіла зв'язувати кількість специфічних антигенних детермінант визначає валентність антитіла. Валентність антитіл визначається числом Fab фрагментів. IgG та IgE – 2-х валентні; IgM – 10; IgA слизових – 4-х валентні.



Рис. 2. – Валентність основних класів імуноглобулінів

### Афінність і авідність антитіл

Утворення імунного комплексу антиген-антитіло забезпечується просторовою компліментарністю антигенної детермінанти й антиген зв'язуючого центра антитіл (ключ-замок) та нековалентними взаємодіями між ними. Сила зв'язків антигенної детермінанти (епітопу) з антигензв'язуючим центром антитіл (паратопом) характеризує афінність антитіл. За високу афінність у разі антитіл вважають  $10^{12}/M$ , низькою –  $10^5/M$ . Загальну силу (енергію) нековалентних зв'язків між антигензв'язуючими сайтами антитіл і антигенними детермінантами антигену називають авідність. Термін афінність відноситься до зв'язування антитіла з моновалентним гаптенем або з однією антигенною детермінантою. У більшості випадків, однак, ми маємо справу із взаємодією з антигеном антисироватки, тобто сироватки імунізованої тварини або людини. У цьому випадку антисироватки взаємодіють з полівалентним антигеном. Для опису такого зв'язування використовують термін "авідність".

Оскільки гетерогенна популяція антитіл має різну афінність по відношенню до певної антигенної детермінанти, то результуюча константа асоціації представляє собою усереднене значення. У зв'язку з цим неможливо оцінити Афінність сироватки, що володіє поліспецифічністю, тобто специфічною по відношенню до безлічі детермінант одного антигену. Такі сироватки порівнюють оду з одною по їх сумарним характеристикам зв'язування з антигеном – за загальною силою реакції в обраній тест-системі, що позначається як авідність. Авідність – строго функціональний термін, який описує поведінку антитіл (сироватки) у конкретній реакції.

Авідність визначається багатьма факторами, зокрема, гетерогенністю антитіл в цій сироватці, спрямованих до певної антигенної детермінанти, а також гетерогенністю самих детермінант. Необхідно враховувати і таку обставину. Полівалентність більшості антигенів призводить до своєрідного ефекту, що "підсилює": величезне зростання константи рівноваги, що виникає через те, що складові афінності не складаються, а перемножуються, і забезпечує цей підсилюючий ефект. Саме авідність характеризує імунну відповідь *in vivo* і служить мірою функціональної афінності антисироватки до природного полівалентного антигену. Висока авідність має перевагу перед низькою для здійснення багатьох реакцій. Математично ця величина характеризується як константа асоціації ( $K_a$ ), що розраховується в стані рівноваги між концентрацією імунного комплексу й концентрацією антитіла й антигену.

Приклад: IgM, як правило, має більш низьку Афінність, чим IgG, але IgM високоавідний пентамер, 10-валентний, тому він більш ефективно зв'язує антиген.

### Специфічність антитіл

Специфічність антитіл – це показник того, наскільки вибірково вони взаємодіють з молекулами антигенів певного типу. Специфічність поліклональних антитіл визначається

сукупністю специфічних взаємодій з численними антигенними детермінантами, які можуть бути або не бути унікальними, тобто притаманними тільки молекулам певної речовини.

Кожна молекула антитіла специфічна до тієї антигенної детермінанти, з якою вона зв'язується, це уявлення про специфічність в найбільш вузькому сенсі. Специфічність антитіл до антигену визначається тим, що його детермінанти відбирали відповідні В лімфоцити з комплементарними антигензв'язуючими центрами на мембранних імуноглобулінах (рис.3)

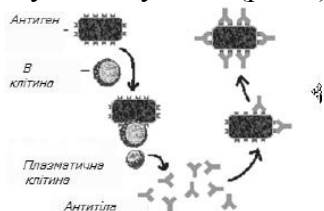


Рис.3 – Антиген визначає В клітинну імунну відповідь

На відміну від цього специфічність антисироватки визначається безліччю специфічностей антитіл, які вона містить. Антисироватки зв'язується з одним певним антигеном тільки в тому випадку, якщо сукупність специфічностей антигензв'язуючих центрів антитіл у сироватці спрямована на детермінанти тільки цього антигену. Однак, як правило, деякі детермінанти є спільними для декількох антигенів (одні й ті ж білки близьких видів тварин). У цьому випадку деякі з антитіл, що утворюються у відповідь на стимуляцію даними антигеном, можуть зв'язуватися і з іншими антигенами. Такі антитіла називають перехресно-реагуючими, а сироватку, що містить їх, неспецифічною, перехресно-реагуючою. Специфічність такої сироватки можна підвищити шляхом очищення на сорбенті. Процес очищення називають виснаженням сироватки. В процесі очищення перехресно-реагуючі антитіла відділяють шляхом контакту з антигенами, які містять антигенні детермінанти спільні з індукують антигеном і знаходяться на імуносорбенті (нерозчинна форма антигенів на сорбенті).

Одержання антитіл. Поліспецифічні та моноспецифічні сироватки. Перехресно-реагуючі антитіла

Антитіла одержують шляхом імунізації тварин, з наступним відділенням сироватки крові й називають антисироватками. Специфічність антисироватки визначається безліччю специфічностей утворюючих її антитіл і здатністю до зв'язування з антигеном. Тому їх називають поліклональними.

Можливі наступні варіанти зв'язування антитіл сироватки з антигеном. Всі антигензв'язуючі центри антитіл взаємодіють тільки з одним антигеном, його детермінантами. Такі сироватки називають моноспецифічні.

При імунізації тварин навіть добре очищеним антигеном отримують поліспецифічні, перехресно-реагуючі сироватки.

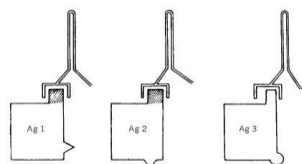


Рис. 4. – Перехресні реакції антитіл

Поняття перехресної реакції може бути застосовано й до антигену. Перехресно-реагуючий антиген – той антиген, котрий зв'язується з антитілами, утворення яких було індуковано іншим антигеном, що володіють із цим антиген загальними антигенними детермінантами.

#### Властивості поліклональних антисироваток



Поліклональна антисироватка – це сироватка імунізованої тварини – кролика, кози, барана й т.д.

Рис. 5. – Антигенні детермінанти та поліклональна сироватка.

Відповідно до рис. 5 поліклональна сироватка походить від численних клонів антитіла-продукуючих клітин і може мати кілька різної специфічності двовалентних антитіл (анти-A1, анти-A2, анти-A3, анти-A4, анти-B1 анти-D3), що здатні реагувати з кожною детермінантою (A, B, C, D) на одному рідному антигені (Ag), що зображений в центрі. Детермінанти A, B, C розташовані на поверхні полівалентного глобулярного нативного білка. Внутрішня детермінанта D може бути похована у середині ядра нативного білка, і антитіла реагують з цією латентною детермінантою тільки тоді, коли антиген знаходиться в денатурованому стану. Кожна тварина, яка імунізована антигеном, може виробляти антитіла до деяких або всіх з цих визначальних детермінант.

Поліклональна сироватка тому, що антиген, яким імунізували тварину, був полідетермінантним (A, B, C, D, рис.5). Вона містить антитіла неоднакової специфічності стосовно його детермінантів (епітопів). Основна перевага цих сироваток – здатність до утворення великих нерозчинних імунних комплексів з антигеном, преципітаті, аглютинації клітин, у мембранах яких є антиген. Такі реакції зручно спостерігати й нефелометризувати. Основні обмеження у використанні поліклональних антисироваток: гетерогенність по специфічності навіть при взаємодії з антигеном невеликої м.м.; не стандартність, яка обумовлена необхідністю імунізації декількох тварин і в різний термін. В утворенні таких антисироваток брали участь численні клітинні клони, тому поліспецифічні сироватки різні по класу, підкласу й афінності.

З поліспецифічних сироваток можна приготувати:

- поліспецифічні до безлічі окремих антигенів;
- олігоспецифічні – специфічні до невеликого числа окремих антигенів;
- моноспецифічні – специфічні до одного єдиного антигену.

В останньому випадку вони теж поліспецифічні – специфічні до різних антигенних детермінантів одного антигену.

Крім того, у ході гуморальної імунної відповіді на індивідуальну антигенну детермінанту антитіла продукуються численними клітинними клонами; тому за той самий епітоп можуть конкурувати антитіла з різною афінністю.

Практичне значення подібної гетерогенності однієї сироватки або різних сироваток полягає в тому, що кожна сироватка унікальна по складу антитіл, оптимальним умовам зв'язування з антигеном, поводженню в імунологічних реакціях.

Ця обставина ставить за обов'язок щораз приймати рішення відносно придатності наявної сироватки для конкретного імунологічного тесту.

### **Загальна схема імунізації тварин**

У цей час відома безліч методів імунізації різних видів тварин. Науково-дослідні лабораторії одержують антитіла самостійно для конкретних методів.

Загальна схема одержання моноспецифічних антитіл з високим титром включає імунізацію кроликів дуже малими кількостями високо очищених антигенів, порядку 25 мкг/кг живої ваги. У такий спосіб виключається вплив будь – яких можливих домішок в антигені на утворення антитіл, і в той же час зазначена доза досить велика для одержання антитіл з високим титром.

Одержати антитіла до одного білка можна в такий спосіб: готують розчин з концентрацією 2 - 4 мг/мл. На 0 – й, 14 – й, 28 – й і 42 – й день кроликові вагою 3 – 4 кг вводять стандартну суміш 50 мкл і 50 мкл неповного ад'юванта Фрейнда. Ад'ювант забезпечує помірне поглинання антигену та неспецифічну стимуляцію імунної системи (активацію макрофагів). Ін'єкцію роблять у стовщену ділянку шкіри над лопаткою, максимально ближче до поверхні. На 50 – й день відбирають 45 мл крові з вушної вени. Через кожні 6 тижнів беруть чергову порцію 45 мл крові, причому тварині вводять стандартну суміш антигену за 8 – 10 днів до відбору крові. Така схема відбору крові не приводить до анемії й захворювання тварин. Тварина може використатися кілька років.

Ін'єкції в подушечки лапок тварин приносять їм непотрібні страждання!

Для одержання поліспецифічної сироватки дозу збільшують приблизно в 10 разів. Для збільшення титру антитіл реімунізацію проводять через кожні 14 днів, 4 ін'єкції.

Здатність продукувати антитіла в кожного кролика різко індивідуальна, і разом з тим титр антитіл у кожної окремої тварини може змінюватися від одного забору крові до іншого. Якщо при імунізації тварин досягнутий певний рівень антитіл, один – два забору крові без попередньої імунізації звичайно приводить лише до незначного зниження середнього титру антитіл.

### **Динаміка синтезу антитіл. Первинна та вторинна імунна відповідь**

Перше введення антигену супроводжується прихованим або латентним періодом, протягом якого антитіла не виявляються впродовж 2 – 4 днів. Потім слідує первинна імунна відповідь, яку характеризує:

- поступове підвищення в плазмі крові антитіла протягом від декількох днів до декількох тижнів;
- концентрація специфічних антитіл досягає плато і протягом наступних тижнів зменшується до дуже низького або невизначені рівня;
- спочатку синтезуються IgM антитіла, їх синтез триває 10-12 днів, 4-5 днів слідує IgG відповідь із синтезом великої кількості IgG антитіл;
- у відсутність антигенної стимуляції IgM антитіла зникають, синтез IgG антитіл може здійснюватися протягом кількох місяців.

Після первинної відповіді слідує фаза формування імунологічної пам'яті, що виявляється посиленням імунної відповіді на повторне введення антигену.

Вторинну імунну відповідь характеризують

- короткий латентний період;
- швидкий синтез і більш високі концентрації антитіл;
- у відповідь на повторний контакт з тим же антигеном синтезується мінімум IgM та високий рівень IgG антитіл;
- включається імунологічна пам'ять.

### **Виділення окремих класів імуноглобулінів**

У багатьох випадках робота з виділеними імуноглобулінами має переваги в порівнянні з використанням нативної сироватки. Так, в імунологічних дослідженнях з фарбуванням імунопреципітатів після завершення реакції антиген-антитіло необхідно повне видалення сторонніх білків шляхом відмивання. Відмивання спрощується, якщо застосовувати чисті імуноглобуліни замість сироваток. Ліпопротеїди особливо підсилюють фарбування фону. Абсолютно необхідно працювати з імуноглобуліновою фракцією антисироватки у випадку одержання кон'югатів антитіл з ферментами та флуорохромами.

Отримання IgM: преципітація фракції імуноглобулінів хімічними методами, що засновані на м.м. та розчинності

- еуглобулінова преципітація,
- подальше очищення за допомогою гелю хроматографії,
- центрифугування у градієнті щільності.

Отримання IgG: іонообмінна хроматографія, афінна хроматографія з використання білків А та G (Staph. Aureus – протеїн А, Streptococcus – протеїн G).

Отримання IgA, IgD, IgE – багатостадійні методи.

IgA: преципітація Zn, іонообмінна хроматографія й гелю фільтрація.

IgE – афінна хроматографія; імуносорбентні методи: антиген специфічно ізолюється на поверхні сефарози, целюлози або поліакриламідного гелю.

### *Визначення титру антитіл*

Титр антитіл є їхньою істотною характеристикою. Він являє собою максимальну кількість антигену, яку можна осадити 1 мл антитіл.

*Метод кількісного осадження.* Титрування роблять додаванням концентрацій антигену, що збільшуються, в серію пробірок, що містять однакову кількість антитіл. Обсяг кожної пробірки доводять до постійного додаванням фізіологічного розчину.

Після годинної інкубації при 37<sup>0</sup>С пробірки поміщають у холодильник на 48 годин, можна довше, причому вміст пробірок двічі в день перемішують, щоб досягти повноти реакції антиген-антитіло. Кількість білка, що преципітує, еквівалентно зменшенню змісту білка в рідині. Зміст білка в рідині визначають із реактивом Фоліна. Титр антитіл розраховують по кількості антитіл у пробірці, що містить найбільшу кількість преципітату.

Крім методів кількісного осадження визначення титру антитіл здійснюють з використанням реакцій аглютинації, радіальної імунодифузії, ракетного імуноелектрофорезу, методів з використанням мітки, тобто за допомогою тих методів, в яких конкретні антитіла будуть використані.

#### *Загальні принципи роботи з антитілами*

Антитіла – білки й повинні зберігатися на льоді або замороженими, якщо вони не використовуються.

Антитіла працюють краще одразу після розведення. Тому головувати розведення антитіл варто перед використанням. При повтореному заморожуванні й розморожуванні антитіла втрачають активність. Розморожені один раз розчини антитіл варто зберігати при 4<sup>0</sup>С.

Якщо лабораторія одержує антитіла замороженими, їх необхідно помістити на лід, якщо у вигляді розчину – їх негайно поміщають на лід. При розморожуванні антитіл на пробірці вказується дата розморожування.

Центрифугувати розчин антитіл необхідно обережно в мікроцентрифузі.

Антитіла втрачають стійкість пропорційно їхньому розведенню. Тому антитіла зберігають у концентрованому виді, без розведення.

Як правило, на пробу використовують 10 – 50  $\mu$ l. Тільки при більших розведеннях використовують більші обсяги.

Маркувати пробірки необхідно з точною вказівкою розведення антитіл і дати готування розведення.

#### *Моноклональні антитіла. Гуманізовані моноклональні антитіла*

Моноклональні антитіла – гомогенні антитіла, що продукують гібридні клітини, в яких поєднуються здатність синтезу специфічних імуноглобулінів одного ізотипу з необмеженою проліферацією. таких гібридних клітин, інакше званих гібридома. У загальних рисах методика отримання моноклональних антитіл полягає в тому, що лімфоцити імунізованої тварини, наприклад, миші, гібридизуються з пухлинними клітинами, що культивуються у середовищі, наприклад мишачими мієлобластами. В процесі пасажів гібридом вдається проводити відбір клонів, які синтезують антитіла зі специфічністю, що яка цікавить дослідника.

Головною перевагою моноклональних антитіл є стандартна і відтворна в пасажах специфічність відносно конкретного епітопа, оскільки кожен з відібраних клонів містить генний набір одного імунного лімфоцита, тоді як звичайні сироватки від імунізованих тварин являють собою суміш східних, але не ідентичних антитіл, які продукуються безліччю лімфоцитів. Антитіла, отримані при імунізації тварин на відміну від моноклональних, позначаються як поліклональні. Моноклональні антитіла однорідні не тільки по своїй специфічності, але і по всіх інших біологічних властивостях, як-то авідності, афінності, стабільності і т. п. Нарешті, гібридомна технологія дозволяє виготовляти практично необмежені кількості гомогенних антитіл до різноманітних антигенів, тобто препаратів діагностичного, виробничого або лікувального призначення. Моноклональні антитіла знайшли широке застосування у практиці імунного аналізу. З їх допомогою стало можливим підвищити чутливість і відтворюваність діагностичних тестів.

Взагалі моноклональні антитіла використовують для



- отримання очищених білків,
- ідентифікації та ізолювання субпопуляцій та клонів лімфоцитів,
- рутинної лабораторної техніці – серології,
- виявлення пухлин, у діагностичних цілях,
- терапії клітин-мішеней пухлин.

Таким чином, моноклональні антитіла мають такі основні переваги перед поліклональними:

- повна стандартизація препарату антитіл;
- висока специфічність;
- вільний вибір антигенних детермінант, до яких утворюються антитіла.

Разом з тим, у деяких схемах імуноаналізу застосування поліклональних антитіл (у комбінації з моноклональними) дозволяє досягти кращих результатів. Це обумовлено здатністю поліклональних антитіл пов'язувати не одну, а практично всі наявні на молекулі визначуваної речовини антигенні детермінанти. У діагностичних тест-системах, як ти що розпізнають, а також у пасткових, застосовуються антитіла класу IgG. Причинами цього є наступні обставини:

- вміст IgG у сироватці значно більше, ніж імуноглобулінів інших класів, що важливо при отриманні поліклональних антитіл;
- молекула IgG представлена мономером, який має більшу мобільність, ніж димер або пентамер;
- Fc-фрагмент молекули IgG може бути в свою чергу пов'язаний, наприклад, з білком А, що використовується в деяких схемах імуноаналізу.

Для терапевтичних цілей моноклональні антитіла гуманізують для зменшення імуногенності.

Отримання людських антитіл і антитіл частково людського походження стало можливим після клонування генів імуноглобулінів і розробки генно-інженерних методів. Константні і варіабельні регіони антитіл незалежно кодується безліччю генетичних сегментів. Генно-інженерні технології дозволяють створювати гібридні антитіла миша/людина, що розрізняються ступенем «гуманізації». Найбільш ранньою версією таких гібридних антитіл є химерні антитіла. У химерних антитіл константні регіони мають людське походження, а варіабельні отримані від миші. Типовий приклад химерного антитіла - ритуксимабу. Друге покоління гібридних антитіл - гуманізовані антитіла, в яких мишаче походження мають тільки невеликі антигензв'язуючі ділянки варіабельних регіонів. Як у химерних, так і в гуманізованих антитіл ділянки, що безпосередньо зв'язують антиген, отримували від імунізованих тварин. В останнє десятиліття розроблені способи конструкції повністю людських антитіл, минаючи етап імунізації людини.

Моноклональні антитіла – ідеальний діагностичний засіб проти білків крові й тканин, проти специфічних антигенів збудників, органів і тканин нормальних і ракових клітин, ряду хімічних сполук.

#### *Антитіла як антигени. Вторинні антитіла*

Видові особливості антитіл дозволяють використати їх як антигени при імунізації тварин. Використання антитіл при імунізації як антигенів призводить до утворення в організмі імунізованої тварини або людини "анти-антитіл" – вторинних антитіл, антиглобулінів. Наприклад, імуноглобуліни людини є антигенами для миші і викликають вироблення антиімуноглобулінових антитіл. Препарати таких антитіл мають назву мишачих антитіл проти імуноглобулінів людини. Необхідно відзначити, що проти імуноглобулінів різних класів утворюються антитіла різної специфічності. Наприклад, антитіла проти IgG людини не розпізнають IgM, і навпаки. Так звані антивидові антитіла використовуються в імуноаналітичних методах для визначення в крові людини специфічних антитіл, наприклад, до інфекційних патогенів. Частина антивидових антитіл буде специфічна до Fab-фрагментів вихідного антитіла, частина до Fc-фрагмента. Fab ділянки таких "анти-

антитіл" будуть мати серологічні ознаки антитіл тієї тварини, що були використані для одержання вихідних (первинних) антитіл. "Анти-антитіла", що мають на своїх Fab-фрагментах імунологічні ознаки антигену, який був використаний для одержання специфічних до нього первинних антитіл, називають антиідіотипичними антитілами.