بسم الله الرّحمن الرّحیم

موضوع :تولید آنتی بادی مونوکلونال به روش هیبریدوما و سایر روشها

نام درس:ایمنی شناسی مولکولی

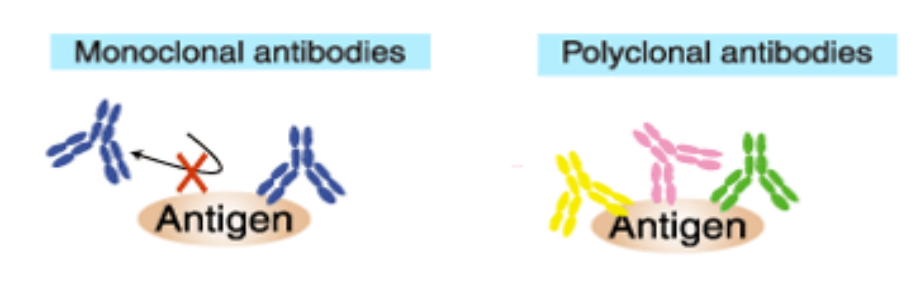
نام استاد:خانم دکتر مریم ناصرالاسلامي

گردآوری شده توسط:نیما جعفری رستگار

آنتی بادی پلی کلونال:

از سلول های اجدادی متفاوتی نشأت میگیرند و مجموعه آنتی بادی های هتروژنوس گوناگونی اند که علیه اپی توپهای مختلف یک آنتی ژن میکنند.

از سرم انواع حیوانات به عنوان منابع عمده تولید آنتی بادی پلی کلونال استفاده میشود اعم از:پرندگان،پستانداران و انسان



خرگوش،موش،اسب و گاو منابع حیوانی رایج تری هستند.

عوامل انتخاب حیوان:

۱.مقدار سرم مورد نیاز

۲.میزان ایمونوژنیسیتی حیوان(بسته به هدف تولید)

مراحل تولید آنتی بادی پلی کلونال تا حد زیادی مشابه نوع مونوکلونال است که در ادامه بحث میشود

آنتی بادی مونوکلونال:

آنتی بادی که فقط از یک تک-کلون ساخته شده است و مجموعه آنتی بادی های یکنواخت با اجزای مشابه اند و همگی علیه یک اپی توپ خاص در یک آنتی ژن عمل میکنند.

کلون: مجموعه سلول های زنده که در کنار هم زندگی می کنند.

تک کلون: مجموعه ای از سلول های همسان که همگی از یک سلول حاصل شده اند.

یکنواختی، اختصاصیت و توانایی تکثیر بی نهایت سه ویژگی بارز آنتی بادی های مونوکلونال است که آنها را از آنتی بادی پلی کلونال متمایز می کند.

فرایند ایمنی زایی

روش های تزریقی متداول ایمونیزاسیون:

درون عضلانی I.M-داخل پوستI.D -زیر پوستS.C-داخل صفاق I.P -داخل پنجه ها Foot Pad -گره های لنفاوی یا طحال-زائده گوشتی زیر گلو پرندگان

شامل دو مرحله است:پاسخ اولیه- پاسخ ثانویه

– پاسخ اولیه:

به محض تزریق آنتی ژن بیگانه به حیوان

مراحل فرایند:

فاز نهفته(Latent phase): فازی که هنوز نمی توان حضور آنتی بادی را نشان داد.

فاز لگاریتمی(logarithmic phase):غلظت آنتی بادی به صورت لگاریتمی افزایش می یابد تا به حداکثر برسد.

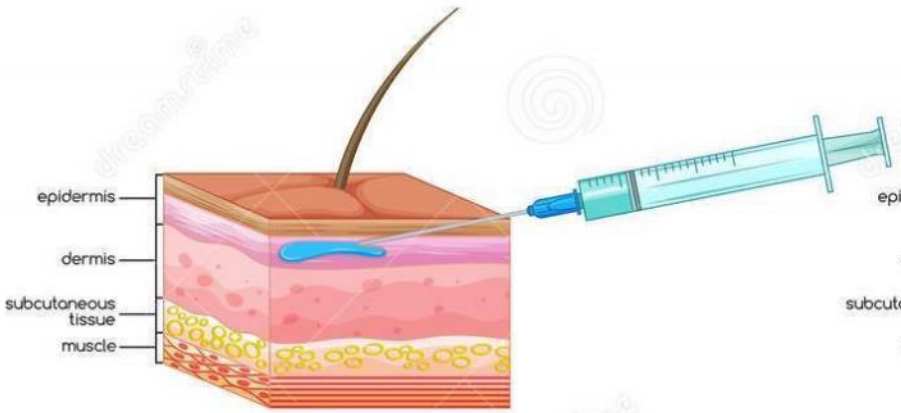
مرحله کفه(Plateau phase):فاصله زمانی است که در آن افزایش یا کاهش در مقدار آنتی بادی دیده نمی شود.

دوره تنزل (Decline phase):میزان کاتابولیسم و از دست رفتن آنتی بادی بیشتر از میزان سنتز آن است.

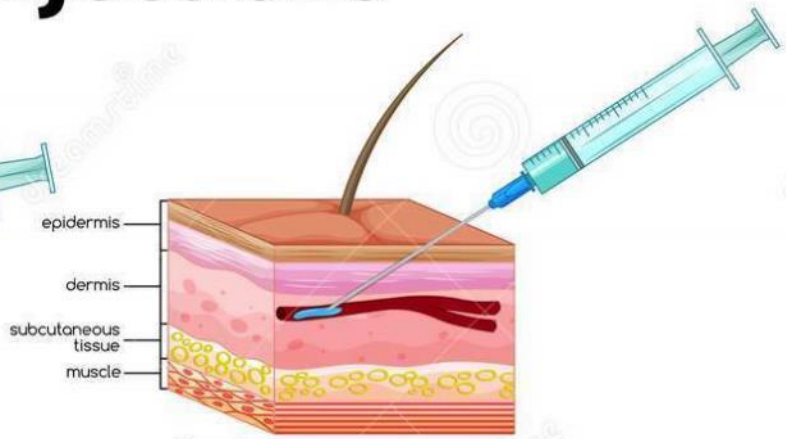
ب- پاسخ ثانویه:

اگر مدتی پس از پاسخ اولیه تماس حضور مجدد ایمونوژن رخ دهد پاسخی شدیدتر از پاسخ اولیه بروز می کند.

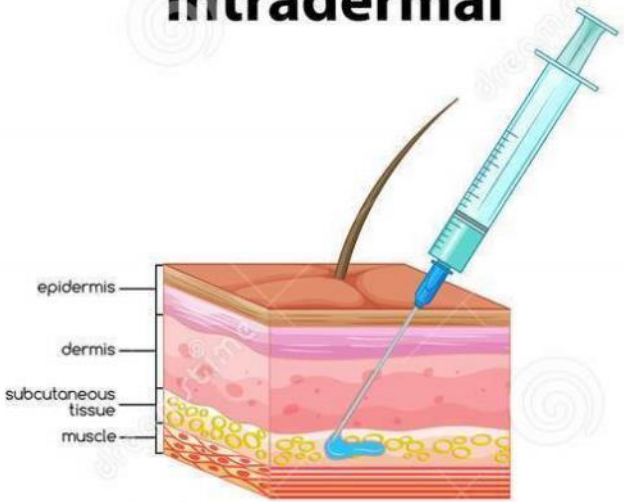
Types of Injections



Intradermal

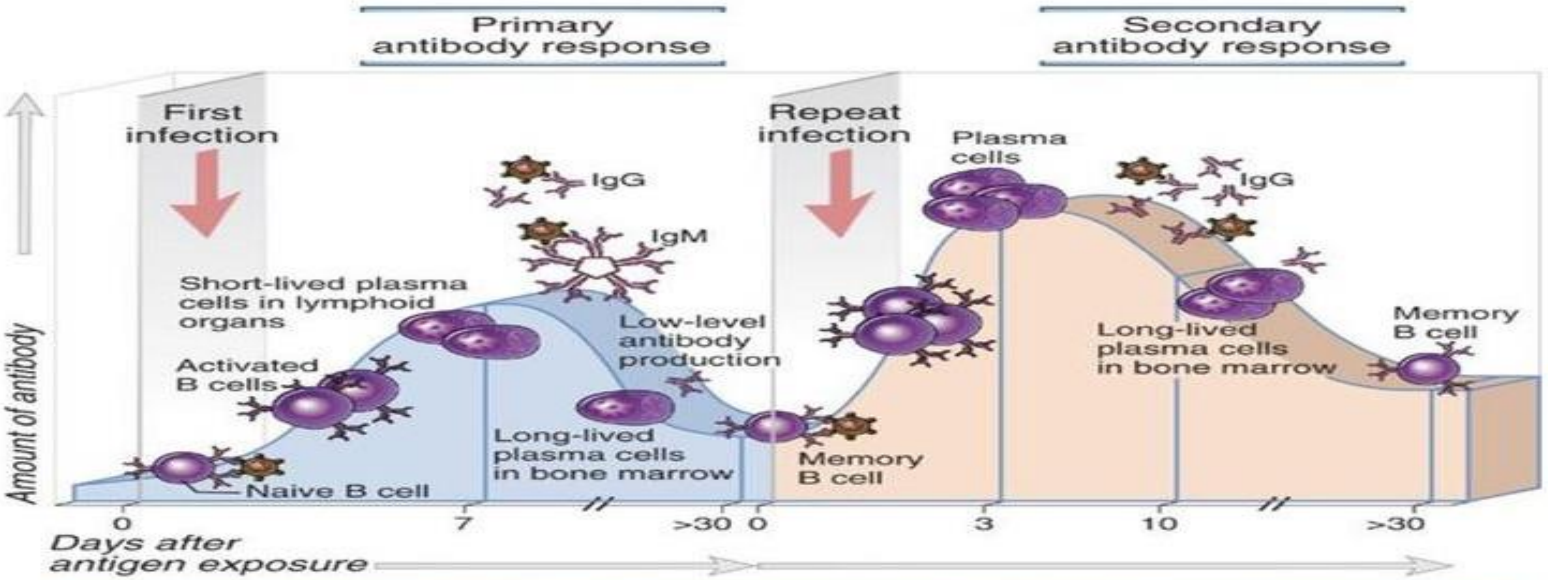


Intravenous



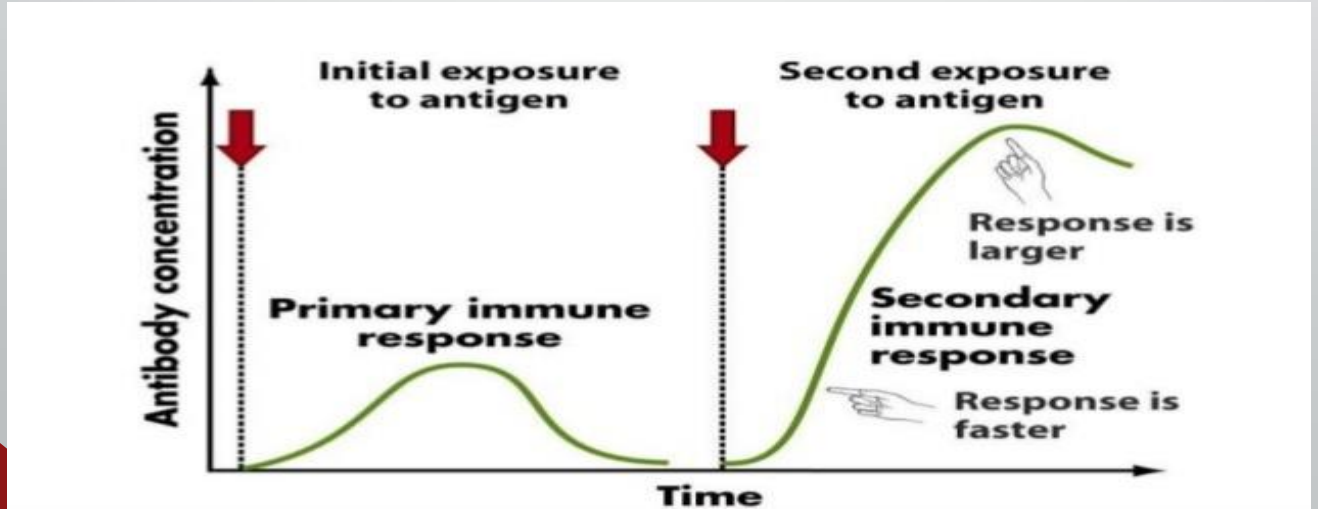
Subcutaneous

Intramuscular



Feature	Primary response	Secondary response
Peak response	Smaller	Larger
Antibody isotype	Usually IgM > IgG	Relative increase in IgG and, under certain situations, in IgA or IgE
Antibody affinity	Lower average affinity, more variable	Higher average affinity (affinity maturation)
Induced by	All immunogens	Only protein antigens

Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology, 7e.
Copyright © 2012, 2007, 2005, 2003, 2000, 1997, 1994, 1991 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.



تفاوتهای بارز (مزایا و معایب)

آنتی بادی پلی کلونال

مزایا:

زمان تولید کوتاه و قیمت پایین-پایداری و مقاومت بالا در برابر تغییرات بافری-ایده آل برای واکنشهای پرسیپیتاسیون حتی در صورت بیان پایین به علت افینیتی بالا-مقاومت زیاد در برابر تغییرات آنتی ژن(پلی مورفیسم،دناتوراسیون اندک و هتروژنیتی گلیکوزیلاسیون)

معایب:

به علت اثر بر اپی توپهای متعدد نیازمند تست برای امکان بروز واکنشهای کراس با آنتی ژنهای خودی-امکان ایجاد تغییر کیفی محصولات بین دسته های تولید متفاوت-نوعی واکنش آلرژیک انسان به

آنتی بادی موش معروف به پاسخHAMA(human anti-mouse antibody)

آنتی بادی مونوکلونال

مزایا:

اختصاصیت بسیار بالا برای شناسایی یک اپی توپ از یک آنتی ژن-رده های سلولی نامیرای هیبریدوما قابلیت تولید بینهایت آنها را دارند-ثبات ساختاری زیاد- احتمال بسیار کم بروز واکنشهای کراس-ایده آل برای تخلیص ترکیبات براساس افینیتی

معایب:

نیازمند زمان،قیمت و مهارت تکنیکی بالا-به علت اختصاصیت بسیار بالا احتمال بروز مشکل جهت استفاده های بین گونه ای دارند-به تغییرات آنتی ژن بسیار حساسند و کوچکترین تغییر در کونفورماسیون آنتی ژن ظرفیت اتصال را به شدت کاهش میدهد

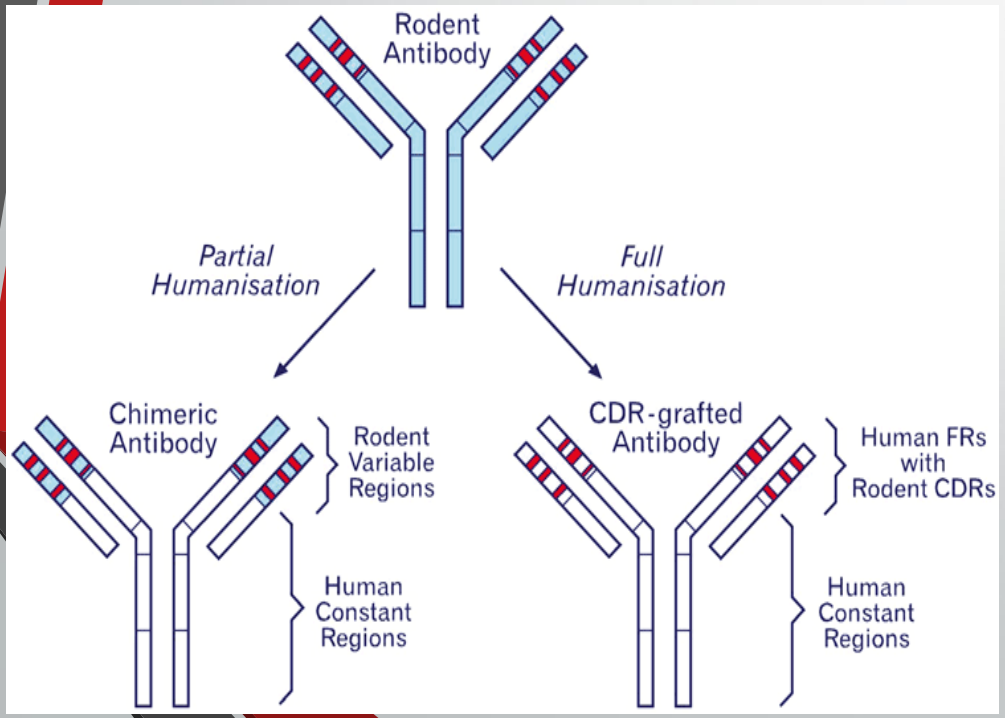
آنتی بادی کایمریک:

نوع خاصی از آنتی بادی های درمانی است که با ترکیب ژن انسان و غیر انسان (موش) تولید می شود.

از ۶۵٪ جز ژنتیکی انسانی ساخته شده و خطر واکنش های ناخواسته به آنتی بادی های خارجی را کاهش می دهد.در آنتی بادی های انسانی، مناطق بیش از حد متغیر بر روی چارچوب واحد متغیر پیوند داده می شوند.

آنها گاهی از لحاظ اتصال به آنتی ژن ها ضعیف تر از آنتی بادی های مونوکلونال موش های مادر هستند.

برای افزایش میل اتصال آنتی بادی به آنتی ژن ، میتوان روشهایی مانند تصادفی سازی زنجیره ای را به کار گرفت تا برخی از تحولات را به منطقه تعیین کننده مکمل CDR معرفی شوند.



نمونه هایی از آنتی بادی های انسانی تأیید شده توسط FDA:

alemtuzmela , omalizumab , daclizumab

روش های تولید MAbs انسانی از طریق بیان قطعات آنتی بادی یا قطعه متغیر تک زنجیری (scFV یا Fab) در باکتری امکان پذیر می باشد.در سال ۲۰۰۳ دانشمندی به نام Humira اولین داروی mAb کاملا انسانی را برای درمان آرتریت روماتوئید تولید کرد.

***Transgenic mice platform:**

دستکاری اندوژنوس زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین موش و loci زنجیره سبک ایمونوگلوبولین نتیجه فرآیند مهندسی Transchromosonalاست.

در این سیستم بیان ایمونوگلوبولین انسانی در موش های تراریخته از پاسخ های ناخواسته HAMA جلوگیری می کند شایستگی تکنیک کشت سلولی متعارف برای تولید معرف های بالقوه درمانی حفظ می کند.

***Phage display platform:**

این فناوری برای اولین بار در سال ۱۹۸۵ پایه گذاری شد و برای تولید مقدار زیادی از پپتید های کوتاه و مولکول های پروتئینی به روی باکتریوفاژها به کار گرفته شده است.

این امر اجازه کلون کردن توالیDNA خارجی در باکتریوفاژ های رشته ای و در ادامه بیان این کلونها در سطوح ذرات فاژی به عنوان پروتئینهای الحاقی را داد.

از این فناوری به طور موثری برای بیان قطعات آنتی ژنی هدفمند و انحصاری استفاده شده است.

پروسه ترکیبی عفونت و نوترکیبیin-vivo برای ارائه قطعات متغیر تک-زنجیری(scFV) به سطح فاژ استفاده شده است تا مخازن آنتی بادی بزرگی تولید کنند.

در حال حاضر ۳۵ human mAbs از طریق این فناوری تولید و توسط سازمان غذا و دارو به عنوان معرف های درمانی تایید شده اند.

مراحل کلی تولید آنتی بادی مونوکلونال با سلول میلوما:

الف- ایمن سازی

ب- خون گیری از موش

ج- تعیین تیتر آنتی سرم در حیوان ایمن

د- انتخاب و تهیه سلول میلوما

ه- ادغام یا امتزاج سلولی

و- محیط انتخابی

ز- سلول های تغذیه ای

الف- ایمن سازی:

اساسی ترین کار در تولید آنتی بادی مونوکلونال انتخاب سلولهایی است که آنتی بادی اختصاصی تولید می کنند.

دلایل استفاده از موش و رت برای تولید آنتی بادی مونوکلونال:

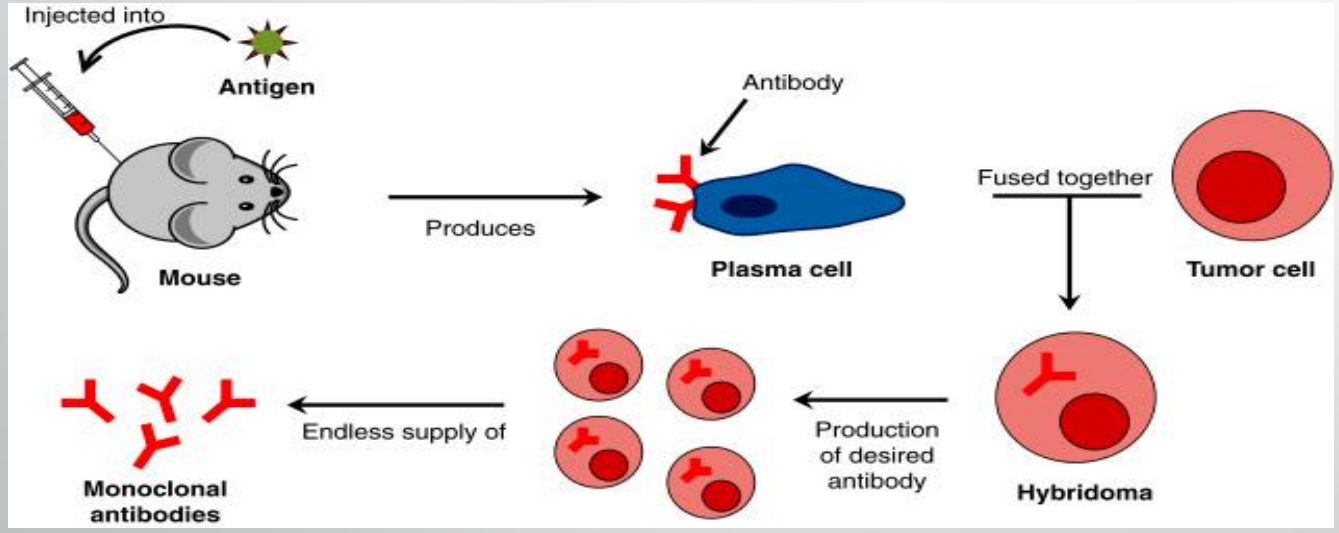
-واکنش ایمنی و ژنتیک آنها به خوبی مطالعه شده

-با آمیزش های اختصاصی ، اختلافات آللیک را در یک گونه تصحیح کرده اند

-رده های سلولی میلوما از آنها حاصل شده اند

روش های تزریقی ایمن کردن موش:

زیرپوستی – عضلانی- داخل صفاقی – داخل وریدی



مراحل پاسخ به ایمنی:

قبل از تزریق

قله پاسخ اولیه

کاهش بعد از پاسخ اولیه

قله پس از پاسخ ثانویه

کاهش پس از پاسخ ثانویه

ب- خونگیری از موش از طریق عروق رترو-اربیتاری چشم یا عروق دم حیوان انجام می گیرد

ج- بررسی حضور آنتی بادی ضد آنتی ژن مورد نظر به روش انتشار دوگانه،ایمونواسی با آنزیم یا تکنیک RIAانجام می شود.

د- تهیه ی سلول میلوما:

تعریف: میلوما یا پلاسماسایتوما سلول های سرطانی لنفوسیتی تکامل یافته ای هستند که قادر به تولید آنتی بادی می باشند.آنها در سال ۱۹۵۹ به طور تصادفی مشاهده شدند و کشف شد که با تشعشع به منطقه صفاقی ، سلول های میلومای موشی رشد می کنند. پس از آن دیده شد که برخی روغن های معدنی قادر به ایجاد میلوما در موش هستند.آنها از نظر تولید ایمونوگلوبولین دارای انواع متفاوتی هستند.

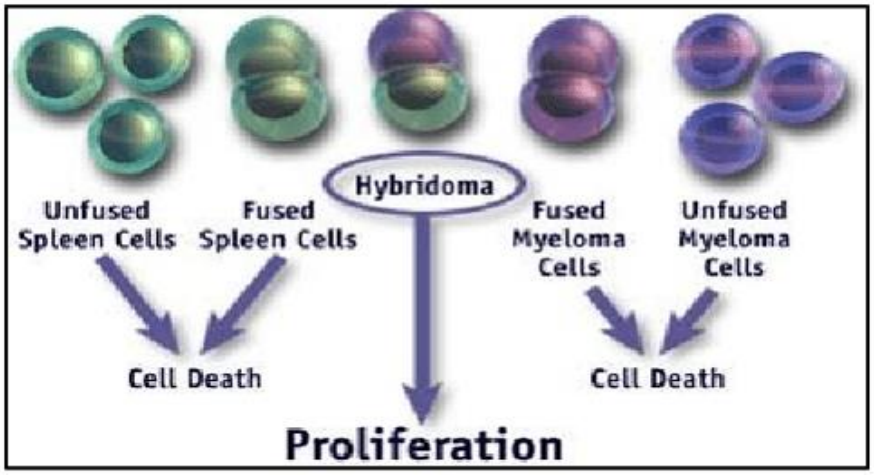
در تکنولوژی هیبریدوما از میلوماهای غیرمترشحه استفاده می کند.لازم به ذکر است که در این سلولها، ژن سنتز آنتی بادی باید جهش یافته باشد اما سیستم سنتز و پردزاش آنتی بادی کاملا نرمال و سالم باشند.

بهترین رده سلولی جهت تولید آنتی بادی مونوکلونال: رده Sp2/0 – Ag14

در این تکنیک ما سلولهای پلاسمای مولد آنتی بادی اسپلنوسایت و میلوما را ادغام میکنیم تا سلول پلاسمایی سرطانی یعنی هیبریدوما به دست آید.

ه- ادغام سلولی:

عبارت است از جوش خوردن غشاء دو سلول یکسان یا متفاوت و تشکیل یک سلول جدید



روشهای ادغام:

1. ادغام با ویروس سندایی
2. پلی اتیلن گلیکول
3. امتزاج الکتریکی سلول ها
4. پیوند سلولی به وسیله میدان الکتروآکوستیک
5. امتزاج به کمک لیزولستین

جداسازی سلول های هیبریدوما:

پس از ادغام سلولها و ایجاد هیبریدوما،ما محیط کشت حاوی مواد زیر داریم:

سلولهای طحالی اِسپلنوسایت(دارای عمر کوتاه بوده و عدم توانایی تکثیر)- سلولهای میلوما – سلولهای هیبریدوما

و- حال باید سلول های هیبرید طحال و میلوما جدا شده و سلول های هیبرید بتوانند مادام العمر در محیط کشت رشد و تکثیر و تولید آنتی بادی کنند. برای این کار باید راه اصلی سنتز نوکلئوتیدها را متوقف نمود.

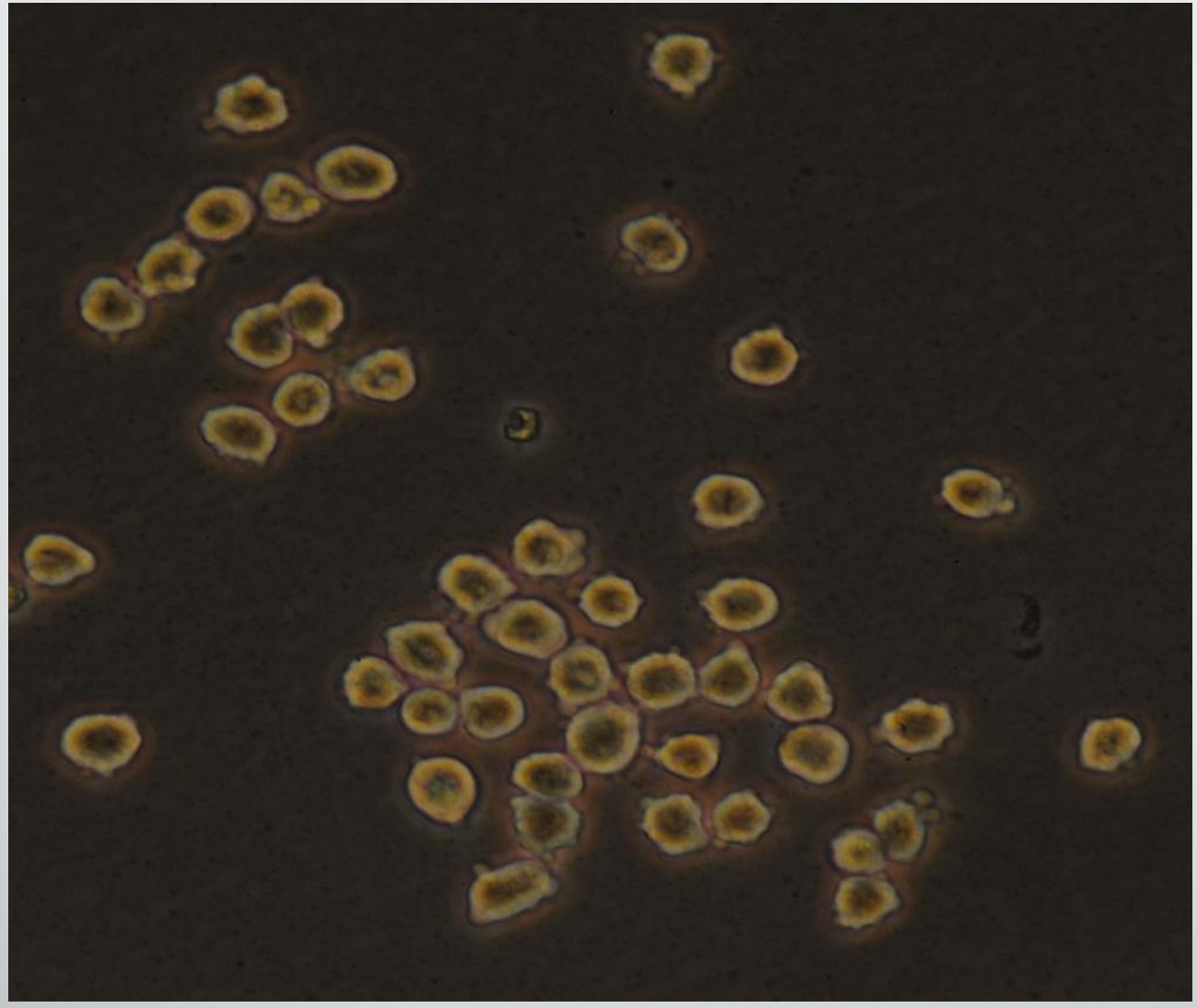
موادی که سنتز نوکلئوتیدها را متوقف می کنند:

۱-آزاسرین: آنالوگ گلوتامین بوده و قادر است در مسیر اصلی به آنزیم های لازم جهت سنتز بازهای پورین متصل شده آنها را غیر فعال کند.

۲-آنالوگ های فولات: آنالوگ های فولات با فولات در اتصال به آنزیم دی هیدروفولات ردوکتاز رقابت کرده مانع نولید تتراهیدروفولات می شوند و در نتیجه سنتز پیریمیدین ها متوقف شده و به طور غیر مستقیم با کاهش مقدار کوآنزیم تتراهیدروفولات سنتز پورین ها را هم متوقف می کنند.

سلول های میلوما چون از طرفی در حضور آمینوپترین قادر به ساخت DNA از مسیر اصلی (Denovo) نیستند و از طرفی دیگر به علت فقدان آنزیم های هایپوگزانتین گوانین فسفوریبوزیل ترانسفراز (HGPRT) و تیمیدن کیناز (TK) در محیط کشت دارای هایپوگزانتین ، آمینوپترین و تیمیدین (HAT) از بین می روند. سلول های هیبریدوما چون ژن های HGPRT و TK را از والد سلول طحالی دریافت کرده اند در محیط HAT می توانند به حیات خود ادامه دهند.

ز- سلول های لنفوئیدی به هنگام کشت در غلظت کم دچار کاهش رشد شده و یا می میرند. به منظور رفع این مشکل از سلول های با رشد کم یا بدون رشد استفاده می کنند:سلول های تغذیه ای طحال موش،ماکروفاژهای صفاقی،تیموسیت های موش



Hybridoma cells grown in culture

تولید انبوه آنتی بادی مونوکلونال:

۱-تکثیر کلنی ها در آزمایشگاه

۲-تزریق داخل صفاق موش جهت تولید مایع آسیت

تخلیص:

۱-ایجاد رسوب با سولفات آمونیم

۲-تخلیص با اسید کاپریلیک

۳-تخلیص با کروماتوگرافی تعویض یون

۴-تخلیص با کروماتوگرافی تمایلی به وسیله پروتئین G یا A

۵-تخلیص با ایمونوافینیتی کروماتوگرافی

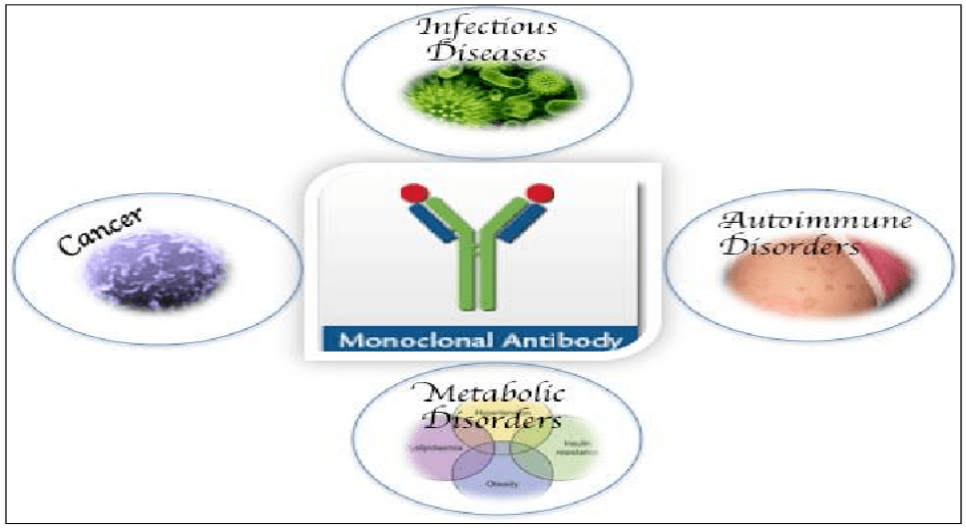


Figure 3: Some areas for therapeutic applications of mAbs

کاربرد آنتی باید مونوکلونال:

۱-مصرف در تخلیص: خالص سازی مواد با روش ایمونوافینتی کرماتوگرافی

۲-مصارف تشخیصی: تشخیص بالینی آنتی ژن های محلول-تشخیص پاتوژنها-تشخیص سلول های سرطانی خوش خیم از بدخیم و متاستاز در تصویر برداری با اتصال به ماده رادیواکتیو

۳-مصارف درمانی:درمان غیرفعال انواع عفونتها-کیموایمونوتراپی با اتصال به مواد شیمیایی یا سموم -رادیوتراپی با اتصال به ماده رادیواکتیو-مهار گیرنده های فاکتور رشد- جلوگیری از واکنش های رد شدن پیوند

- متوقف کردن سیستم ایمنی در بیماری های خود ایمنی مثل آنتی بادی های AdaiimumAb و InfiniXmAb که در مقابل

آرتریت روماتوئید، بیماری کرون و کولیت اولسراتیو موثر است.میتوان از آنها برای مهار TNF ، TNF-α ، IL-2 بر روی T-Cellهای فعال شده استفاده کرد که توسط BasiliximAbو DaclizumAb انجام میشود.

- اختلالات متابولیکی:دانشمندان از GPCR ها(گیرنده همراه پروتئین های G)به عنوان هدفی برای درمان اختلالات متابولیکی استفاده کردند.

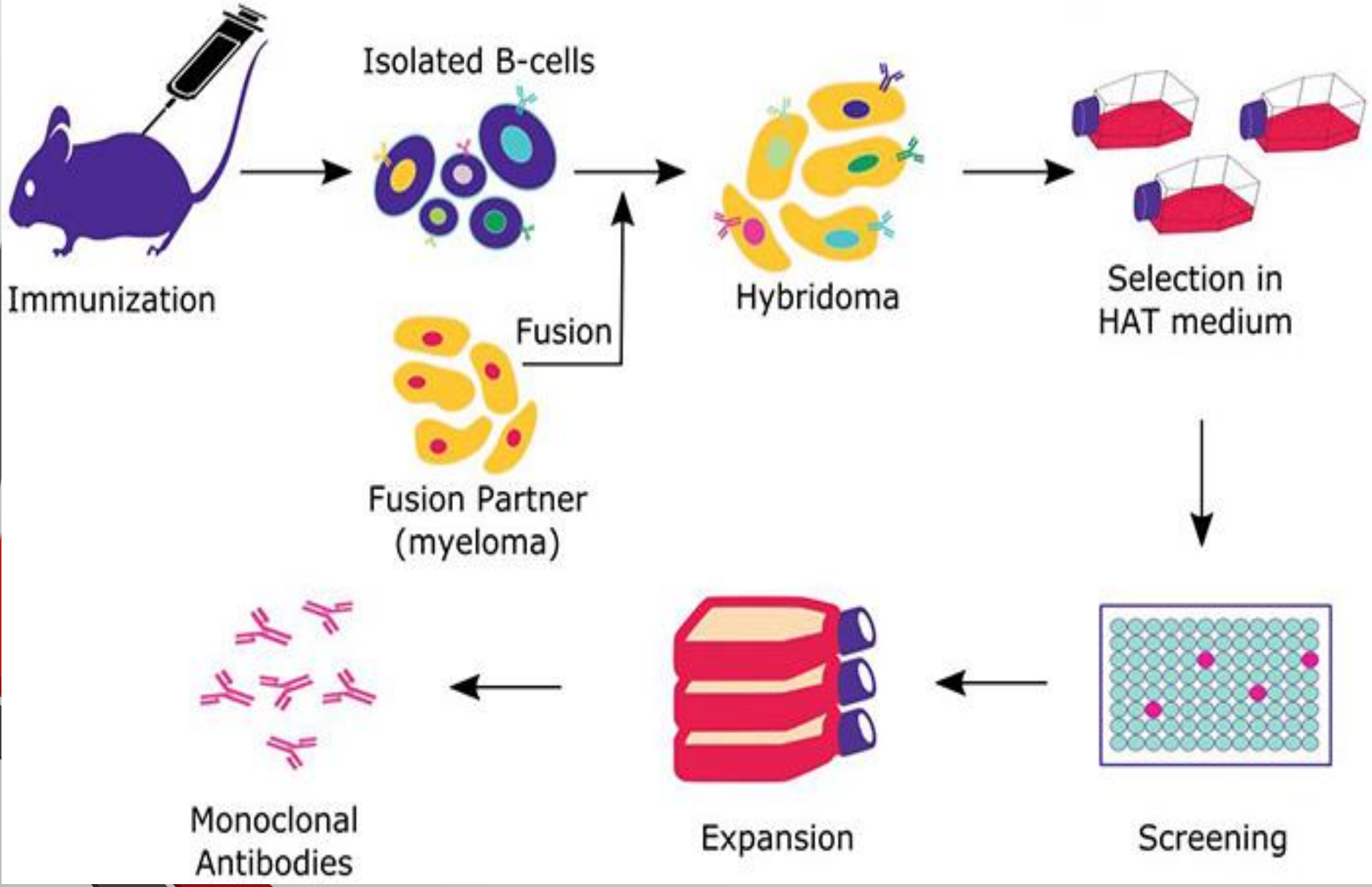
mAb ها به طور بالقوه می توانند ازپوسیدگی دندان توسطstreptococcus mutans جلوگیری کنند.

در موارد ۴-تهیه ی واکسن:

الف- استفاده به عنوان واکسن بر طبق تئوری آنتی ایدیوتایپ

ب- شناسایی اپی توپ های ایمنی زا و نیز خالص کردن پپتیدهای ایمنی زا

Hybridoma Technology



۵-کاربردهای متفرقه:

الف- تعیین گروه خونی، نوع RH

ب- واکسن های ضد حاملگی

ج- مطالعه لنفوسیت های T، B در بیماری های ویروسی ، باکتریایی و قارچی

د- در آلرژی

ه- در ایمنو سایتوشیمی و ایمونوهیستوشیمی

منابع تولید آنتی بادی منوکلونال:

الف- موش

ب- انسان

ج- اسب

د- ترانسژنیک موش-گاو

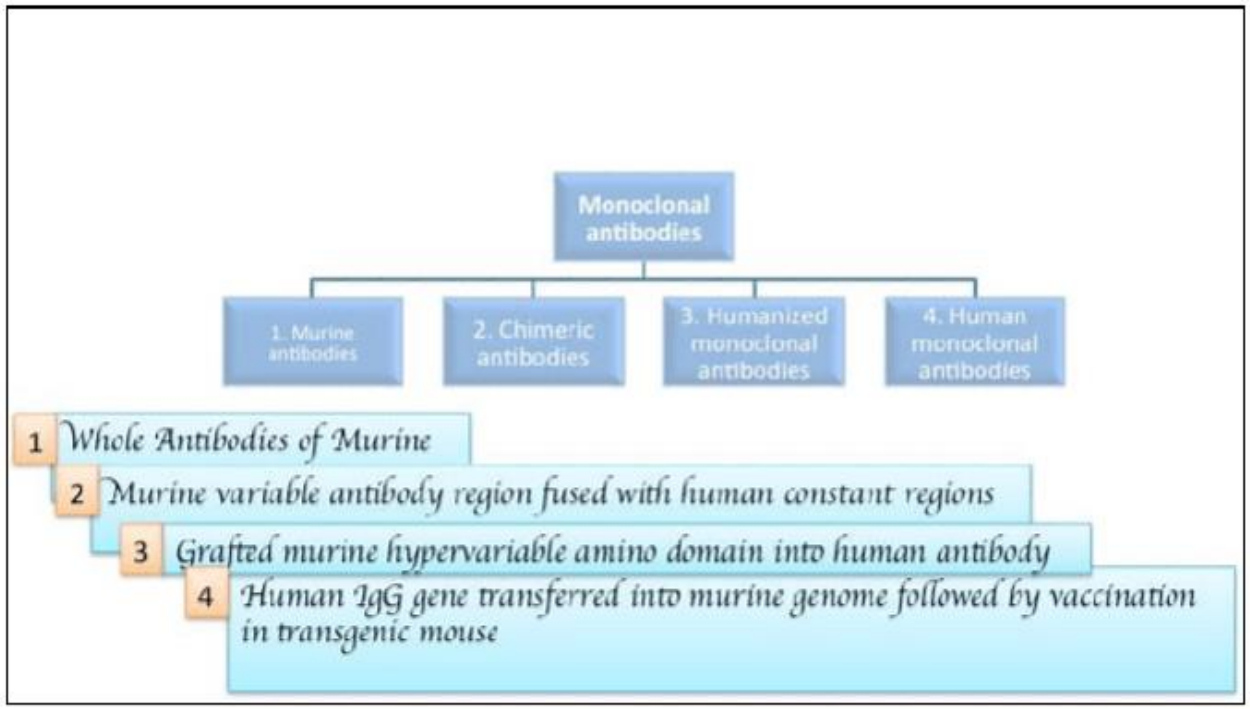
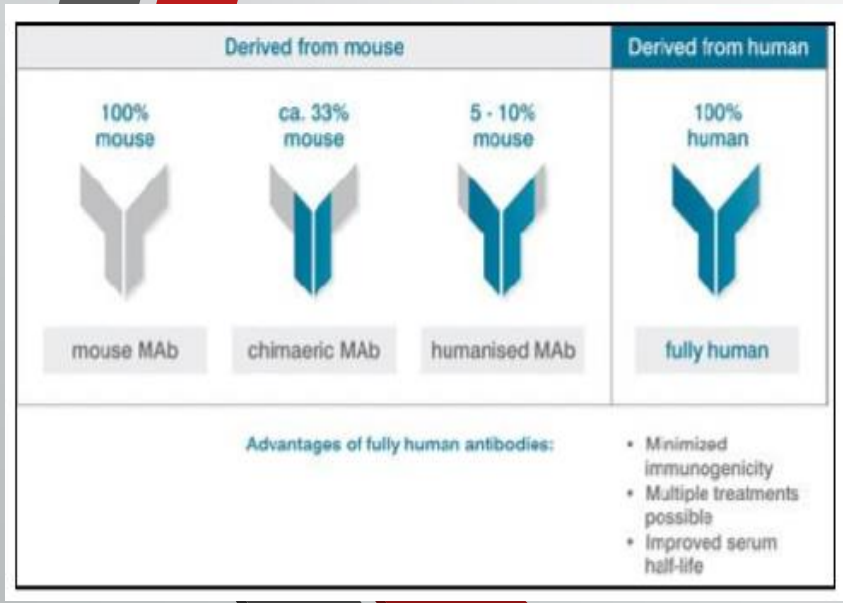


Figure 2: Types of therapeutic mAbs and their production methods

سایر روش ها و تشریح عمل جمعیت های لنفوسیتی:

1. ترانسفرمه کردن ویروس اپشتین بار(EBV)
2. ایمن کردن سلول های لنفوسیت B انسانی در آزمایشگاه
3. تکنولوژی هیبریدومای انسانی
4. تکنولوژی SCDI-hu-PBL-mouse
5. سلول های T کمکی +CD57 در خون محیطی و اندام های لنفوئیدی ثانویه
6. تولید آنتی بادی مونوکلونال انسانی به وسیله هتروهیبریدوما و هیبرید-هیبریدوما



مشکلات تولید آنتی بادی مونوکلونال از انسان:

1. فقدان منبع مناسب سلول های B ایمن
2. نبود تکنیک جاودانه کردن مستقیم سلول های لنفوسیت B
3. فقدان سلول شریک ادغام مناسب
4. عدم پایداری همان تعداد محدود سلول هیبریدومای انسانی ساخته شده

مزایا و معایب تولید آنتی بادی مونوکلونال در in vitro

مزایا:

- موش های کمتری لازم است هرچند برای تولید لایه مغذی (feeder layer) از سلول ها موش استفاده می شود.
- برای تولید انبوه از نظر صنعت داروسازی بهتر و مقرون به صرفه تر است
- احتیاجی به کسب اجازه از کمیته ها وجود ندارد
- غلظت آنتی بادی تولید شده در مایع آسیت موش مطلوب است درحالیکه سایر مواد آلوده کننده موجود در مایع آسیت را ندارد.

معایب:

- بعضی هیبریدوماها در این محیط خوب رشد نمی کنند یا در کشت از دست می روند.
- معمولا احتیاج به FCS دارند که استفاده از آنتی بادی های حاصل از آن را برای تزریق به موجود زنده محدود می کند.
- گلیکوزیلاسیون غیر صحیح آنتی بادی ممکن است استفاده از آنتی بادی را در محیط in vivo محدود کند.
- به طور کلی کشت سری(batch) در هر میلی لیتر حاوی مقدار کمتری آنتی بادی مونوکلونال نسبت به مایع آسیت موش است و ممکن است غلظت آنتی بادی کم باشد و احتیاج به تغلیظ داشته باشد که می تواند تمایل آنتی بادی را تغییر داده و موجب دناتوره شدن آن گردد.
- بیشتر سری های Ab تولید شده آلوده به سلول های هیبریدومای مرده و محصولات آنها می باشند که باید تخلیص شوند که گران قیمت می باشد.
- برای تولید آنتی بادی مونوکلونال در مقادیر کم یا متوسط روشی گران قیمت است.

مزایا و معایب تولید آنتی بادی مونوکلونال در مایع آسیت موش

مزایا:

- آسیت موش معمولا غلظت بالایی از آنتی بادی مونوکلونال دارد که اغلب نیاز به مراحل تغلیظ بعدی نیست.
- به علت غلظت بالای آنتی بادی مونوکلونال مشکل تخلیص کمتری نسبت به روش کشت سری (batch-culture) وجود دارد.
- احتیاج به متخصص کشت سلول ندارد.

معایب:

- احتیاج به مراقبت روزانه و مداوم از موشها دارد.
- محصول حاوی پروتئین های متنوع موش است که گاهی لازم می شود تخلیص شود.
- اگر از موشهای نقص ایمنی استفاده شده باشد به علت شرایط خاص نگهداری گران قیمت است.
- روش برای موش ها دردآور و استرس زا است.

عوامل مؤثر در کشت سلول

محیط کشت:

محیط کشت های مرسوم در کشت سلول: DMEM، RPMI-1640 – Ham’s F12

لازم است گلوتامین، گلوکز، اسید های آمینه ، اسیدهای چرب ضروری، ویتامین ها و عوامل رشد مداوم به محیط کشت اضافه شود.

ویژگی های سرم:

- فراهم کردن فاکتورهای اتصال و گسترش و مواد غذایی اصلی به شکل محلول و اتصال به پروتئین ها
- داشتن پروتئین های حامل(آلبومین و ترانسفرین) ، ناقل هورمون ها، لیپیدها، مواد معدنی و ویتامین ها و داشتن مهار کننده های پروتئازی
- فراهم نمودن PH بافری ۴/۷

اکسیژن:

اکسیژن در محیط بسیار نامحلول است و میزان حلالیت آن در محیط کشت ۶/۷ میکروگرم در میلی لیتر است. مصرف اکسیژن توسط سلول ها (۷-۵ میکروگرم در دقیقه برای هر $۱۰^{۶}$ سلول) می باشد. لذا محیطی با دانسیته سلولی $۲ X ۱۰^{۶}$ سلول در میلی لیتر خیلی سریع از اکسیژن تهی می شود و به همین دلیل باید در طول دوره اکسیژن به محیط وارد شود.

پتانسیل احیا:

پتانسیل احیا تحت تآثیر عوامل اکسیدکننده و احیاء کننده موجود در محیط کشت قرار می گیرد. در طی رشد لگاریتمی و ۲۴ ساعت قبل از اینکه سلول ها به فاز توقف برسند پتانسیل احیا کاهش می یابد. ردیابی منظم پتانسیل احیاء از طریق یک کاوشگر ، معیار خوبی برای آگاهی از فازهای مختلف کشت می باشد.

فاکتورهای کمی مهم در تولید آنتی بادی:

- غلظت آنتی بادی تک دودمان در میلی لیتر
- حجم آنتی بادی به دست آمده
- مدت زمان تولید
- هزینه های صرف شده به ازای یک میلی گرم آنتی بادی

فاکتورهای کیفی مهم در تولید آنتی بادی:

- آلودگی آسیت با آنتی بادی هایی از منشأ داخلی و کاهش ویژگی آنتی بادی در تست های غربالگری
- استفاده از حیوانات مدل دارای نقص سیستم ایمنی مشکل آنتی بادی های با منشأ داخلی را برطرف می کند ولیکن به افزایش هزینه ها منجر می شود.
- آلودگی آسیت به عوامل بیماری زای موشی،نیازمند آزمون های کنترل کیفی دقیق در صورت مصارف درمانی و پروفیلاکسی خواهد بود.
- فعالیت مناسب آنتی بادی به گلیکوزیلاسیون مناسب مرتبط است و تولید در in vitro می تواند این فرآیند را تأمین نماید.

منابع:

1.Review article,Monoclonal antibodies: A review of therapeutic applications and future prospects

Aliyu Mahmuda1,2, Faruku Bande3, Khalid Jameel Kadhim Al-Zihiry4, Noor Abdulhaleem5, Roslaini Abd Majid1, Rukman Awang Hamat1, Wan Omar Abdullah6 and Zasmy Unyah1*

2.HYBRIDOMA TECHNOLOGY FOR PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES

Shivanand Pandey

Volume 1, Issue 2, March – April 2010; Article 017 ISSN 0976 – 044X

International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research Page 88

Available online at www.globalresearchonline.net

3. https://www.creative-diagnostics.com/polyclonal-vs-monoclonal-antibodies.htm