

Η τεχνολογία του υβριδώματος

Η κατανόηση της τεχνολογίας του υβριδώματος για την παραγωγή των μονοκλωνικών αντισωμάτων



Με τη σύντηξη των κυττάρων που παράγουν αντισώματα με τα αθάνατα κύτταρα του μυελώματος, οι ερευνητές παράγουν μεγάλες ποσότητες εξαιρετικά ειδικών αντισωμάτων.

Τι είναι η τεχνολογία του υβριδώματος;

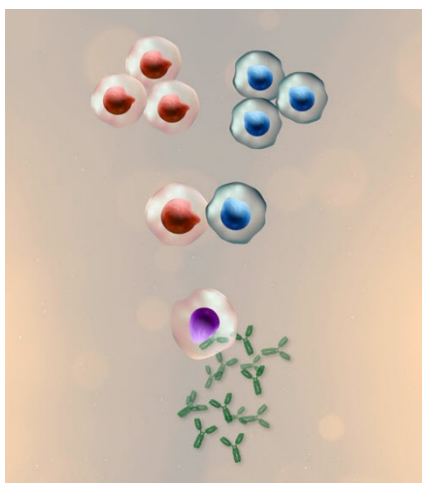
Η τεχνολογία του υβριδώματος περιλαμβάνει τη σύντηξη βραχύβιων Β κυττάρων που παράγουν αντισώματα με αθάνατα κύτταρα μυελώματος. Οι προκύπτουσες κυτταρικές σειρές παράγουν μια τεράστια ποσότητα ενός συγκεκριμένου μονοκλωνικού αντισώματος. Η τεχνική δημιουργήθηκε το 1975 από τους βραβευμένους με Νόμπελ επιστήμονες Georges Kohler και Cesar Milstein.

Μονοκλωνικά Αντισώματα

Οι επιστήμονες δημιουργούν μονοκλωνικά αντισώματα κλωνοποιώντας μια μόνο κυτταρική σειρά που παράγει αντισώματα. Σε αντίθεση με τα πολυκλωνικά αντισώματα (τα πολυκλωνικά αντισώματα παράγονται από διαφορετικές σειρές ανοσοκυττάρων και παρουσιάζουν συγγένεια για το ίδιο αντιγόνο, αλλά διαφορετικούς επιτοπους), τα μονοκλωνικά είναι εξαιρετικά ειδικά για ένα αντιγόνο. Με τη σύντηξη κυττάρων μυελώματος που μπορούν να

διαιρούνται επ' αόριστον με Β κύτταρα που παράγουν ειδικά αντισώματα κατά του στόχου που ενδιαφέρει, οι ερευνητές αποκτούν μια σχεδόν απεριόριστη πηγή πανομοιότυπων μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Από το 1986, περισσότερα από 117 μονοκλωνικά αντισώματα έχουν εγκριθεί από τον FDA, ξεκινώντας με το μονοκλωνικό αντίσωμα Muromonab-CD3 για την απόρριψη μοσχεύματος νεφρού. Εκτός από τα αντισώματα από ποντίκια και ανθρώπους, οι ερευνητές έχουν παραγάγει χιμαϊρικά και εξανθρωπισμένα μονοκλωνικά αντισώματα που αποτελούνται από αλληλουχίες και από τα δύο είδη.



Αντικαθιστώντας αλληλουχίες πρωτεϊνών που προέρχονται από ποντίκια με ανθρώπινες, αυτά τα μονοκλωνικά αντισώματα μειώνουν τον κίνδυνο πρόκλησης ανοσοαπόκρισης στον άνθρωπο. Χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους, οι επιστήμονες έχουν παραγάγει επίσης μονοκλωνικά αντισώματα από άλλα θηλαστικά για διάφορους σκοπούς.

Η τεχνολογία του υβριδώματος Βήμα προς Βήμα

Βήμα 1: Ανοσοποίηση

Οι ερευνητές κάνουν ένεση σε ένα θηλαστικό, συνήθως σε ποντίκι, με ένα αντιγόνο στόχο, διεγείροντας μια ανοσολογική απόκριση. Η ένεση αντιγόνου μπορεί να γίνει επαναλαμβανόμενα κατά τη διάρκεια αρκετών εβδομάδων. Στη συνέχεια, οι ερευνητές συλλέγουν το σπλήνα του ποντικού για να αποκτήσουν Β κύτταρα που παράγουν το επιθυμητό αντίσωμα.

Βήμα 2: Σύντηξη κυττάρων

Οι ερευνητές συγχωνεύουν Β κύτταρα που παράγουν αντισώματα με κύτταρα μυελώματος σε κυτταρική καλλιέργεια. Η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) διευκολύνει τη σύντηξη των πλασματικών μεμβρανών και των δύο κυττάρων, σχηματίζοντας ένα ενιαίο κύτταρο υβριδώματος με δύο ή περισσότερους πυρήνες. Εναλλακτικά, η ηλεκτροσύντηξη μπορεί να συγχωνεύσει τα κύτταρα χρησιμοποιώντας ένα παλμικό ηλεκτρικό πεδίο.

Βήμα 3: Ανάπτυξη κυττάρων υβριδώματος

Λιγότερο από το 1 τοις εκατό των αρχικών κυττάρων συντήκονται για να σχηματίσουν κύτταρα υβριδώματος. Τα αχρησιμοποίητα Β κύτταρα στην καλλιέργεια σταματούν να διαιρούνται φυσικά, ενώ η χημειοθεραπεία καταστρέφει τα μη συντηγμένα κύτταρα του μυελώματος. Οι ερευνητές χρησιμοποιούν μέσο HAT (υποξανθίνη-αμινοπτερίνη-θυμιδίνη) για να επιτρέψουν τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό αθάνατων κυτταρικών γραμμών που παράγουν μονοκλωνικά αντισώματα. Η αμινοπτερίνη στο μέσο HAT σταματά τη σύνθεση νουκλεοτιδίων, ενώ η υποξανθίνη και η θυμιδίνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν από κύτταρα, όπως τα Β

κύτταρα, που φέρουν το ένζυμο HGPRT (υποξανθινο-γουανινο-φωσφοριβοσυλ-τρανσφεράση). Τα κύτταρα του υβριδώματος με λειτουργικό ένζυμο HGPRT μπορούν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν, ενώ τα κύτταρα μυελώματος που δεν το έχουν τελικά πεθαίνουν.

Βήμα 4: Έλεγχος

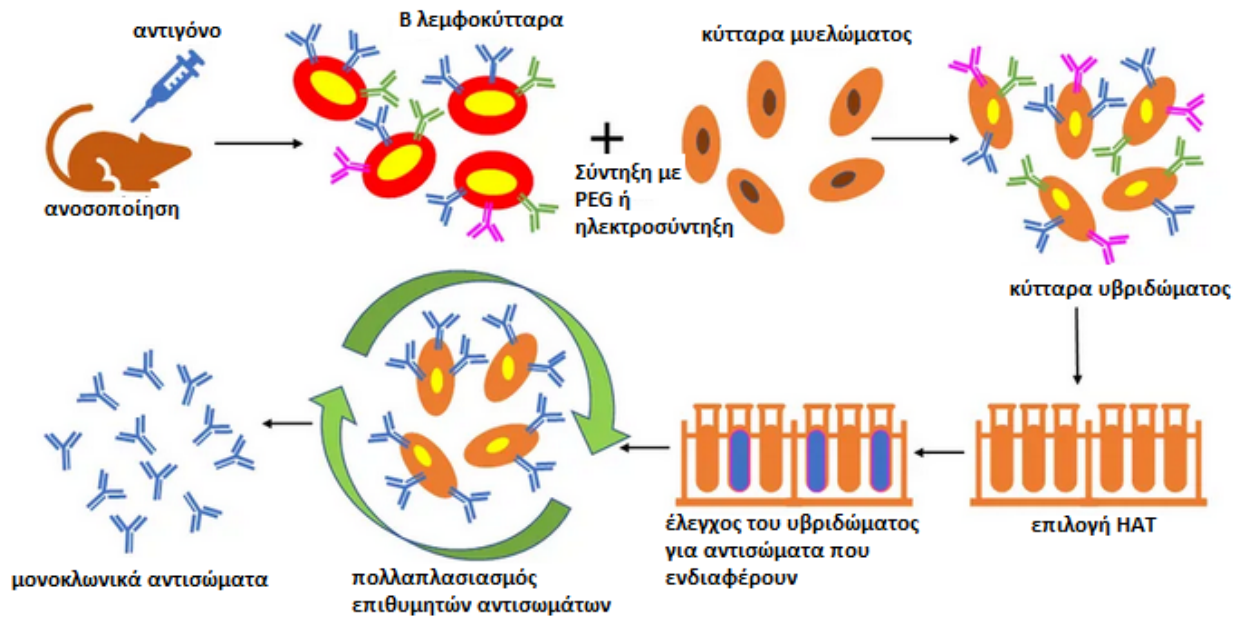
Οι ερευνητές συχνά εξετάζουν τα κύτταρα του υβριδώματος για το μονοκλωνικό αντίσωμα που μας ενδιαφέρει χρησιμοποιώντας μια ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA). Οι δοκιμασίες ELISA αναγνωρίζουν αντισώματα με την κατάλληλη ειδικότητα ακινητοποιώντας το αντιγόνο σε μια επιφάνεια και επωάζοντάς το με ένα υπερκείμενο υβριδώματος κυττάρων. Οι ερευνητές χρησιμοποιούν επίσης τεχνικές όπως το western blot, την κυτταρομετρία ροής και τη φασματομετρία μάζας ανοσοκατακρήμνισης για να εξετάσουν τις καλλιέργειες υβριδώματος τους.

Βήμα 5: Επέκταση υβριδώματος

Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει την κλωνοποίηση των επιθυμητών κυττάρων υβριδώματος για τη λήψη ενός σταθερού κυτταρικού πληθυσμού και την ανάπτυξη της καλλιέργειας για τη συλλογή μεγάλων ποσοτήτων μονοκλωνικών αντισωμάτων. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με μία από τις δύο μεθόδους:

- in vitro ανάπτυξη υβριδικών κυττάρων σε καλλιέργεια ιστών και την ανάπτυξη
- in vivo ανάπτυξη μετά τον εμβολιασμό κυττάρων υβριδώματος στην κοιλιά ενός ποντικού.

Η in vitro παραγωγή αντισωμάτων οδηγεί στην παραγωγή αντισωμάτων υψηλής καθαρότητας



Παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων με την τεχνική του υβριδώματος.

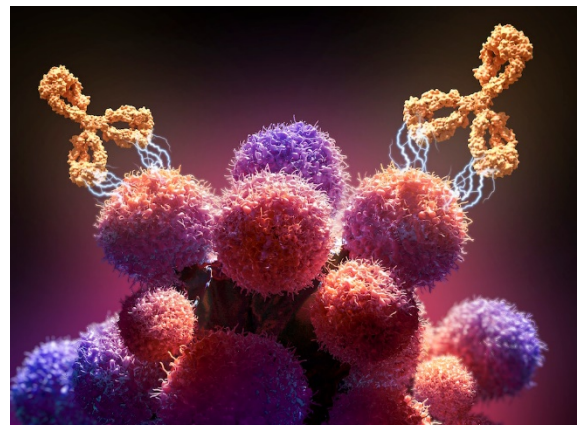
Οφέλη και περιορισμοί του υβριδώματος

Αυτή η τεχνολογία προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, συγκεκριμένα:

- Ακριβής στόχευση αντιγόνου.
- Μεγάλη ποσότητα σταθερών αντισωμάτων.
- Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για χρήση σε βιολογικούς προσδιορισμούς.
- Εξάλειψη της ανάγκης για ζωικά μοντέλα (μέθοδος in vitro).
- Χρήση σε θεραπευτικές και διαγνωστικές θεραπείες, δημιουργία εμβολίων και χημειοθεραπεία.

Ωστόσο, η τεχνολογία έχει και μερικούς περιορισμούς:

- Μεγάλος χρόνος παραγωγής.
- Είναι δαπανηρή.
- Δεν είναι κατάλληλο για τη δημιουργία βραχέων πεπτιδίων και θραυσμάτων αντιγόνων.
- Ευαισθησία σε μόλυνση και κακή βιωσιμότητα των κυττάρων.
- Κίνδυνος μόλυνσης από ιούς και μετάδοσης ασθενειών.
- Απουσία σταθερών κυττάρων του μυελώματος για παραγωγή ανθρώπινων αντισωμάτων.



Εφαρμογές υβριδώματος

Διαγνωστικές εφαρμογές

Λόγω της υψηλής ειδικότητάς τους, τα αντισώματα που παράγονται από την τεχνολογία υβριδώματος έχουν ένα ευρύ φάσμα διαγνωστικών εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένων των παρακάτω:

- Ενζυμικό ανοσοπροσροφητικό (ELISA): ανίχνευση αντισωμάτων HIV, επιφανειακό αντιγόνο ηπατίτιδας Β και ορμόνη εγκυμοσύνης.
- Δοκιμασία ανοσοφθορισμού (IFA): ανίχνευση αυτοάνοσων διαταραχών, ιού γρίπης και *Chlamydia trachomatis*.
- Western blot: ανάλυση βιοδεικτών καρκίνου.
- Κυτταρομετρία ροής: αξιολόγηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού στον HIV, τη λευχαιμία και το λέμφωμα.
- Ανοσοϊστοχημεία (IHC): ανάλυση βιοδεικτών καρκίνου.
- Γρήγορες δοκιμές αντιγόνου: ανίχνευση ελονοσίας, δάγκειου πυρετού, ιού Ζίκα και COVID-19.

Ανοσοθεραπεία

Υπάρχουν διάφορες εγκεκριμένες από τον FDA ενδείξεις μονοκλωνικών αντισωμάτων. Οι συνήθεις ενδείξεις περιλαμβάνουν τα ακόλουθα:

- Θεραπεία καρκίνου: αντικαρκινική ανοσοθεραπεία κατά του καρκίνου του προστάτη, του μαστού, του πνεύμονα, της ουροδόχου κύστης, του ήπατος, του στομάχου, του παχέος εντέρου και του ενδομητρίου.
- Αυτοάνοσες διαταραχές: διαχείριση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της νόσου του Crohn, του λύκου, της ψωρίασης.
- Λοιμώδη νοσήματα: πρόληψη και θεραπεία του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού και του COVID-19.
- Μεταμόσχευση οργάνων: πρόληψη απόρριψης μεταμοσχεύσεων νεφρού, ήπατος, πνευμόνων και καρδιάς.

