

ЧЕХОНИН В. П., ГУРИНА О. И., ДМИТРИЕВА Т. Б.

**Моноклональные
антитела
к нейроспецифическим
белкам**

В. П. ЧЕХОНИН, О. И. ГУРИНА, Т. Б. ДМИТРИЕВА

Моноклональные антитела к нейроспецифическим белкам



Москва
«Медицина»
2007

УДК 616.98-078.33
ББК 52.5
Ч56

Чехонин В. П., Гурина О. И., Дмитриева Т. Б.

Моноклональные антитела к нейроспецифическим белкам / В. П. Чехонин, О. И. Гурина, Т. Б. Дмитриева.— М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2007.— 344 с.: ил.
ISBN 5-225-03920-0

В монографии обобщены современные представления о нейроспецифических антигенах и моноклональных антителах к ним. Приводятся данные о способах получения как рекомбинантных нейроспецифических белков, так и гомогенных препаратов из нервной ткани млекопитающих. Центральное место в монографии отведено анализу современных данных о моноклональных антителах к антигенам нервной ткани и представлен собственный опыт авторов в аспекте получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к нейроспецифическим белкам. На основании полученных результатов авторами анализируются научные направления, базирующиеся на применении моноклональных антител к нейроспецифическим антигенам, для разработки диагностических иммунохимических методов анализа структуры и проницаемости гематоэнцефалического барьера. Специальные разделы монографии посвящены клинико-лабораторным исследованиям нейроспецифических белков и антител к ним в биологических жидкостях больных с нервными, психическими и нейроонкологическими заболеваниями.

Рассмотрены перспективы нанобиотехнологических подходов для создания диагностических и лекарственных препаратов нового поколения, способных направленно транспортироваться в клетки мишени нервной ткани.

Монография предназначена для широко круга специалистов — иммунологов, биохимиков, молекулярных биологов, нейробиологов, клиницистов, а также преподавателей, аспирантов и студентов биологических факультетов и медицинских вузов.

ББК 52.5

ISBN 5-225-03920-0

© Коллектив авторов,
2007

Все права авторов защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Оглавление

Предисловие	7
Введение	10
Глава 1. Общие принципы получения моноклональных антител (В. П. Чехонин, О. И. Гурина)	13
1.1. Выбор животных — продуцентов В-лимфоцитов	13
1.2. Выбор миеломных клеток	16
1.3. Антигены и иммунизация	17
1.4. Выбор агентов, сшивающих клетки (агенты слияния)	19
1.5. Среды для культивирования гибридом	20
1.6. Влияние фидерных клеток	20
1.7. Селекция клеток на средах с гипоксантином, аминоптерином и тимидином (НАТ-селекция)	21
1.8. Общие принципы скрининга клонов гибридных клеток	22
1.9. Получение моноклональных антител из культуральной жидкости или асцита	23
1.10. Заключение	24
Глава 2. Моноклональные антитела к нейроспецифическим белкам	27
2.1. Моноклональные антитела к глиофибриллярному антигену (GFAP) (О. И. Гурина, И. И. Шенелева, К. А. Павлов, В. П. Чехонин)	28
2.1.1. Глиофибриллярный кислый протеин (GFAP)	28
2.1.2. Моноклональные антитела к GFAP и их клинико-лабораторное применение	37
2.1.3. Получение и иммунохимический анализ глиофибриллярного кислого протеина. Получение рекомбинантного GFAP	41
2.1.4. Получение и иммунохимический анализ моноклональных антител к GFAP	48
2.1.5. Разработка и стандартизация иммуноферментного анализа GFAP в биологических жидкостях человека и животных	54
2.2. Моноклональные антитела к нейроспецифической енолазе (NSE) (О. И. Гурина, Т. С. Портная, В. П. Чехонин)	55
2.2.1. Нейроспецифическая енолаза (NSE) или белок 14-3-2	55
2.2.2. Моноклональные анти-NSE-антитела и их клинико-лабораторное применение	59
2.2.3. Получение и иммунохимический анализ нейроспецифической енолазы	66
2.2.4. Получение и иммунохимический анализ моноклональных антител к NSE	68
2.2.5. Разработка и стандартизация иммуноферментного анализа NSE в биологических жидкостях человека и животных	73
2.3. Моноклональные антитела к основному белку миелина (MBP) (О. И. Гурина, А. В. Семенова, А. В. Лохонина, И. П. Лазаренко, В. П. Чехонин)	75
2.3.1. Основной белок миелина (MBP)	75

2.3.2.	Моноклональные анти-MBP-антитела и их клинико-лабораторное применение	84
2.3.3.	Получение и иммунохимический анализ основного белка миелина (MBP)	90
2.3.4.	Получение и иммунохимический анализ моноклональных антител к MBP	93
2.3.5.	Разработка и стандартизация иммуноферментного анализа MBP в биологических жидкостях человека и животных	98
2.4.	Разработка иммуноферментного анализа антител к GFAP, NSE и MBP в биологических жидкостях человека и животных	99
2.5.	Заключение	102
Глава 3. Комплексный иммуноферментный анализ НСБ и антител к ним в биологических жидкостях с помощью тест-систем на основе моноклональных антител (О. И. Гурина, Т. Б. Дмитриева, С. В. Лебедев, Д. В. Блинов, И. А. Рябухин, С. В. Петров, А. В. Семенова, С. О. Рогаткин, Н. Н. Володин, В. П. Чехонин)		
3.1.	Сравнительный анализ результатов иммуноферментного скрининга GFAP, NSE и MBP на основе моно- и поликлональных антител в образцах сыворотки крови доноров	107
3.2.	Иммуноферментный анализ GFAP и анти-GFAP-антител в биологических жидкостях пациентов с заболеваниями, сопровождающимися нарушением проницаемости ГЭБ	109
3.3.	Иммуноферментный анализ NSE и анти-NSE-антител в биологических жидкостях пациентов с заболеваниями, сопровождающимися нарушением проницаемости ГЭБ	113
3.4.	Иммуноферментный анализ MBP и анти-MBP-антител в биологических жидкостях пациентов с заболеваниями, сопровождающимися нарушением проницаемости ГЭБ	115
3.5.	Заключение	125
Глава 4. Моноклональные антитела к нейроспецифическим антигенам в оценке состояния гематоэнцефалического барьера (В. П. Чехонин, С. В. Лебедев, О. И. Гурина, И. А. Рябухин, С. В. Петров, А. И. Волков, И. П. Лазаренко)		
4.1.	Роль нейроспецифических белков и антител к ним в патогенезе заболеваний и повреждений ЦНС (аналитический обзор)	138
4.1.1.	Нейроспецифические белки (НСБ) — маркеры процесса нейродегенерации	139
4.1.2.	Ликвородинамика и возможные пути проникновения белков из мозга в кровь	140
4.1.3.	Нейроспецифические белки и иммунная система	144
4.1.4.	Оценка возможности проникновения моноклональных анти-НСБ-антител через гематоэнцефалический барьер	146
4.1.5.	Заключение	162
4.2.	Мониторинг NSE, GFAP, MBP в ЦСЖ и сыворотке крови крыс при моделировании патологических процессов в ЦНС	165
4.2.1.	Методологические аспекты иммуноферментного анализа НСБ в биологических жидкостях	165
4.2.2.	Экспериментальное моделирование гипоксического, ишемического и аутоиммунного повреждений головного мозга	165
4.2.3.	Иммуноферментный анализ NSE, GFAP, MBP в ЦСЖ и сыворотке крови при моделированных поражениях ЦНС	166
4.2.4.	Оценка патогенетической значимости НСБ в биологических жидкостях	173
4.2.5.	Заключение	174

4.3. Исследование проницаемости ГЭБ для моноклональных антител к GFAP и NSE при экспериментальном ишемическом инсульте у крыс	175
4.3.1. Заключение	184
Глава 5. Моноклональные антитела к нейроспецифическим антигенам как векторы при транспортировке микроконтейнерных систем к клеткам-мишеням нервной ткани (В. П. Чехонин, Ю. А. Жирков, О. И. Гурина, Т. Б. Дмитриева, С. В. Лебедев, И. А. Кашпаров, А. В. Семенова, Н. А. Андреева, А. Е. Рябинина, М. А. Максимова, К. А. Буланов, Е. А. Цибулькина, Е. А. Савченко)	185
5.1. Основные аспекты	185
5.2. Состав, структура и образование липосом	196
5.3. Физические свойства липосом	200
5.4. Стерически стабилизированные, или stealth-, липосомы направленного действия	206
5.5. Исследование взаимодействия препарата ПЭГилированных иммунолипосом с астроцитами, леммоцитами и olfactory ensheathing cells в условиях <i>in vitro</i>	213
5.6. Заключение	221
Глава 6. Моноклональные антитела к нейроспецифическим белкам в радиоиммунодиагностике и терапии низкодифференцированных глиом (В. П. Чехонин, В. П. Бакалушев, Г. М. Юсубалиева, К. А. Павлов, О. В. Ухова, А. В. Семенова, О. И. Гурина, Ю. С. Скоблов, В. В. Белопасов)	223
6.1. Прямая конъюгация антител с радиоактивным изотопом	224
6.2. Многокомпонентные системы для радиоиммунной диагностики и терапии («Pretargeting»)	225
6.3. Радиоиммунодиагностика	228
6.4. Радиоиммунотерапия	229
6.5. Радиоиммунолокализация глиобластомы С6 с помощью антител к GFAP и эндотелиальному антигену AMVB1	238
6.6. Направленный транспорт моноклональных антител, меченных йодом-125, в область экспериментальной глиомы С6 <i>in vivo</i>	249
6.7. Заключение	253
Глава 7. Приложение. Методы иммунохимической нейробиологии	255
7.1. Характеристика исследуемого материала	255
7.2. Общие методы, применяемые при очистке белков	256
7.3. Получение антисыворотки к нейроспецифическим белкам, их анализ и стандартизация	261
7.4. Создание гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к НСБ. Выделение моноклональных антител и их характеристика	264*
7.5. Методы иммунохимического анализа	267
7.6. Методы количественного определения белка	274
7.7. Приготовление ПЭГилированных липосом, конъюгированных с антителами к нейроспецифическим белкам	279
Список литературы	285