آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال و منوکلونال

(از تولید تا کاربرد)

نگارندگان

دکتر فاطمه رهبری‌زاده
دکتر غلامرضا اسدی کرم
دکتر فاطمه رحیمی جمنانی

۱۳۹۸

سرشناسه: رهبری‌زاده، فاطمه، 1349 -
عنوان و نام پدیدآور: آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال و منوکلونال: از تولید تا کاربرد/ نگارندگان فاطمه رهبری‌زاده، غلامرضا اسدی‌کرم، فاطمه رحیمی‌جمنانی.
مشخصات نشر: تهران: دانشگاه تربیت مدرس، مرکز نشر آثار علمی، 1395.
مشخصات ظاهری: 254ص.: مصور(رنگی)، جدول.
فروست: دانشگاه تربیت مدرس؛ شماره انتشار 199/31.
شابک: 978-600-7589-27-4
وضعیت فهرست نویسی: فیپا
یادداشت: کتابنامه
موضوع: پادتن‌ها
موضوع: Immunoglobulins
موضوع: پادتن‌های تک‌کلنی
موضوع: Monoclonal antibodies
موضوع: ایمنی‌شناسی مولکولی
موضوع: Molecular immunology
شناسه افزوده: اسدی‌کرم، غلامرضا، 1345 -
شناسه افزوده: رحیمی جمنانی، فاطمه، 1360 -
شناسه افزوده: دانشگاه تربیت مدرس. مرکز نشر آثار علمی
شناسه افزوده: Tarbiat Modares University. TMU Press
رده‌بندی کنگره: QR186/7/پ2ر9 1395
رده‌بندی دیویی: 616/079
شماره کتابشناسی ملی: 4275660

انتی‌بادی‌های پلی‌کلونال و منوکلونال (از تولید تا کاربرد)

نگارندگان: دکتر فاطمه رهبری‌زاده، دکتر غلامرضا اسدی کرم، دکتر فاطمه رحیمی جمنانی
ویراستار ادبی و فنی: زهرا نابع
طراح جلد: دکتر سید نجم‌الدین امیرشاه کرمی
صفحه‌آرا: سمیه زهانی
ناشر: مرکز نشر آثار علمی دانشگاه تربیت مدرس
شماره انتشار: ۱۹۹
شماره پیاپی: ۳۶۱
تاریخ انتشار: ۱۳۹۸
شمارگان: ۳۰۰
شابک چاپی: 978-600-7589-27-4 **شابک الکترونیکی: 978-622-8376-49-3**
نوبت چاپ: دوم
کارشناس اجرایی: فاطمه طالبی
ناظر چاپ: مصطفی جانجانی
لیتوگرافی: ایران‌گرافیک
چاپ و صحافی: قشقایی
مرکز پخش: تقاطع بزرگراه‌های آل‌احمد و دکتر چمران،
دانشگاه تربیت مدرس، مرکز نشر آثار علمی، صندوق پستی: ۳۱۸-۱۴۱۱۵
تلفن: ۸۲۸۸۳۰۹۶ **دورنگار:** ۸۲۸۸۳۰۳۲
آدرس اینترنتی فروش: pub.modares.ac.ir

صحت مطالب کتاب بر عهدهٔ نگارندگان است.

تمام حقوق این اثر برای مرکز نشر آثار علمی دانشگاه تربیت مدرس محفوظ است و تکثیر کتاب به هر روشی بدون اجازه کتبی ناشر پیگرد قانونی دارد.

تقدیم

سلام به معلم بزرگ انسانیت حضرت رسول اکرم (ص) سلام به خاندان مطهرش کسی که وجود پاکش قاصد است و همچون زمان حیات مبارکش، امروز نیز هدف دشمنی های پلید ترین خلایق روزگار است ولی این سیه دلان غافلند از اینکه، زلال وجودش مبرا از هر اختلاف است و تاریخ صادق ترین گواه این مدعا است.

بال ملخ به نشانه جسم حقیر ماست

عمریست که مور ملک سلیمان احمدیم

تقدیم به آنان که در سال ها و دوره های مختلف از عمران به ما آموختند، تقدیم به آنان که شیفته آموختن اند.

فهرست مطالب

پیشگفتار ..... ط

فصل ۱- آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال ۱

تعریف واژه‌ها ۱

مقدمه ۵

ایمونوگلبولین‌ها ٦

نواحی ایمونوگلبولین ۸

الف- دومین ۸

ب- ناحیه لولا ۱۰

ج- نواحی متغیر و نواحی بسیار متغیر ۱۲

زیرکلاس‌های ایمونوگلبولین‌ها (انواع ایمونوگلبولین) ۱۳

IgG ۱۳

IgM ۱٤

IgA ۱۵

IgE ۱٦

IgD ۱٦

خواص الکتروفورزی ایمونوگلوبین‌ها ۱٦

تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال ۱۷

انتخاب حیوان ۱۹

ب آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال و منوکلونال (از تولید تا کاربرد)

روش‌های متداول ایمونیزاسیون ۲۱
یاری‌دهندگان ۲۳
تزریق آنتی‌ژن به حیوان آزمایشگاهی ۲۷
خون‌گیری از حیوان آزمایشگاهی ۲۸
تعیین تیتر آنتی‌بادی ۲۹
روش کار (آزمون رادیوایمنواَسی) ۲۹
تعیین میزان واکنش ناخواسته ۳۰
آنالیز اسکات‌چارد ۳۱
تهیه قطعات آنتی‌بادی ۳۲
الف – هضم ایمونوگلبولین‌ها برای تهیه قطعه Fab با استفاده از پاپایین ۳۲
ب- هضم ایمونوگلبولین‌ها برای تهیه $F(ab)_2$ با استفاده از پپسین ۳٤
ذخیره‌سازی آنتی‌بادی‌ها ۳٤
آنتی‌ژن و ایمونوژن ۳٦
آنچه در مورد آنتی‌ژن‌ها باید بدانیم ۳۷
الف- اندازه مولکولی ۳۸
ب- ماهیت ساختار ۳۸
ج- بیگانگی ۳۹
د- پایداری ساختاری ٤۰
هـ- انهدام‌پذیری ٤۰
کنژوگه کردن هاپتن‌ها ٤۰
انواع حامل‌ها ٤۱
اتصال هاپتن به پروتئین‌ها ٤۳
گروه‌های عامل فعال در اتصال مولکول‌های هاپتن به پروتئینی ٤۵
الف- آمین‌ها ٤۵
ب- تیول‌ها ٤٦
ج- کربوهیدرات‌ها ٤۷

روش‌های اتصال هاپتن-پروتئین ٤٨
الف- استفاده از کربودیمید ٤٨
ب- روش گلوتارآلدهید ٤٩
ج- روش بیس-مالیمید ٥٠
د- روش‌هایی که از گروه‌های عاملی متفاوت استفاده می‌شود ٥١
اتصال پروتئین-پروتئین ٥٢
گروه‌های عاملی فعال در متصل کردن پروتئین‌ها ٥٢
الف- آمین‌ها ٥٢
ب- تیول ٥٤
ج- کربوهیدرات‌ها ٥٤
د- سایر گروه‌ها ٥٥
روش‌های اتصال پروتئین - پروتئین ٥٦
الف- روش پریدات ٥٨
ب- روش گلوتارالدهید ٦٠
ج- روش بیس - مالیمید ٦١
د- روش‌های مالیمید – تیول هتروبای فانکشنال و راه‌های وابسته ٦١
اساس سنجش‌های ایمنی ٦٣
طراحی سنجش ٦٤
اَشکال سنجش ٦٥
روش تعیین غلظت مطلوب آنتی‌بادی‌ها ٦٦
نشانه‌های مورد استفاده در سنجش‌های ایمونولوژیکی ٦٧
تهیه استاندارد یا کالیبرانت ٦٨
معرف‌های عمومی در سنجش‌های ایمنی ٧٠
انتخاب محیط زمینه (ماتریکس) ٧١
حذف آنالیت‌های درون سرم با استفاده از ستون ذغال فعال یا ستون سلولز ٧٢
شرایط واکنش و غلظت معرف‌های مناسب در آزمون‌های ایمنی ٧٤

د آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال و منوکلونال (از تولید تا کاربرد)

معتبرسازی سنجش ۷۶
الف- دقت در درون سنجش و بین سنجش ۷۷
ب- Drift ۷۸
ج - مقایسه با روش استاندارد ۷۹
د- بازیابی و آزمایش‌های رقیق‌سازی ۷۹
هـ - فاکتورهای مداخله‌کننده در سنجش‌های ایمنی ۷۹
کاربرد آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال در درمان ۸۱
آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال نوترکیب اختصاصی آنتی‌ژن ۸۴
فرآورده‌های درمانی پلی‌کلونال ۸۷
کاربردهای دفاعی زیستی آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال ۸۹
آینده مواد درمانی پلی‌کلونال ۹۰

فصل ۲- آنتی‌بادی‌های منوکلونال ۹۳
تعریف واژه‌ها ۹۳
مقدمه ۹۴
اصول کلی تولید آنتی‌بادی منوکلونال ۹۵
آماده‌سازی لنفوسیت‌های ایمن ۹۵
تهیه سلول میلوما ۹۷
انتخاب سلول‌های میلوما برای پیوند سلولی ۱۰۲
انواع سلول‌های میلوما ۱۰۳
ادغام یا امتزاج سلولی ۱۰۶
الف- ادغام با ویروس سندایی ۱۰۶
ب- پلی‌اتیلن گلایکول ۱۰۷
ج- امتزاج الکتریکی سلول‌ها ۱۰۸
د- پیوند سلولی به‌وسیله میدان الکتروآکوستیک ۱۰۸
هـ- امتزاج به کمک لیزولسیتین ۱۰۹

محیط انتخابی ۱۰۹
الف- آزاسرین ۱۰۹
ب- آنالوگ‌های فولات ۱۰۹
سلول‌های تغذیه‌ای ۱۱۰
الف- سلول‌های تغذیه‌ای طحال موش ۱۱۱
ب- ماکروفاژهای صفاقی ۱۱۱
ج- سلول‌های تغذیه‌ای تیموسیت‌های موش ۱۱۲
روش‌های غربالگری ۱۱۲
کلون کردن سلول‌ها ۱۱۳
الف- استفاده از آگار نیمه جامد ۱۱۳
ب- رقیق‌سازی متوالی یا آزمون رقت محدود ۱۱٤
ج- FACS (جداسازی سلول‌ها نشان‌دارشده با فلورسنت) ۱۱٤
نگهداری سلول‌ها به‌صورت منجمد ۱۱۵
روش‌های تولید انبوه آنتی‌بادی منوکلونال ۱۱۵
الف- تکثیر کلونی‌ها در آزمایشگاه (*in vitro*) ۱۱۵
ب- تزریق داخل صفاق موش جهت تولید مایع آسیت (*in vivo*) ۱۱۷
تعیین خصوصیات آنتی‌بادی منوکلونال ۱۱۸
تخلیص ۱۱۹
انواع روش‌های تخلیص آنتی‌بادی منوکلونال ۱۱۹
الف- ایجاد رسوب با سولفات آمونیوم یا اسید کاپریلیک ۱۲۰
ب- تخلیص با کروماتوگرافی تعویض یون ۱۲۱
ج- تخلیص با کروماتوگرافی تمایلی به‌وسیله پروتئین A یا G ۱۲۱
د- تخلیص با ایمونوافینیتی کروماتوگرافی ۱۲۲
نگهداری سلول‌ها به‌صورت منجمد ۱۲۲
کاربردهای آنتی‌بادی منوکلونال ۱۲۲
الف- به‌کارگیری در تخلیص ۱۲۲

ب- کاربرد تشخیصی ۱۲۳
ج- کاربرد درمانی ۱۲۳
د- تهیه واکسن ۱۲٤
هـ- دیگر کاربردها ۱۲٤
انواع آنتی‌بادی‌های منوکلونال ۱۲٤
الف- آنتی‌بادی‌های منوکلونال موشی ۱۲۵
ب- آنتی‌بادی‌های منوکلونال انسانی ۱۲۵
ج- تولید هیبریدومای پایدار بین گونه‌ای موش- گاو ۱۲۵
د- تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال در اسب‌ها ۱۲۷
هـ- تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال در سایر جوندگان ۱۲۷
روش‌های دیگر تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال ۱۲۷
۱- مطالعات ترانسفرمه کردن با استفاده از ویروس اپشتین بار به‌منظور نامیرا کردن لنفوسیت‌ها.. ۱۲۸
۲- ایمن کردن لنفوسیت‌های B انسانی در آزمایشگاه *(in vitro)* ۱۲۹
۳- فناوری هیبریدومای انسانی ۱۳۰
٤- فناوری nu- PBL- SCID - mice ۱۳۰
۵- لنفوسیت‌های T کمکی $CD57^+$ در خون محیطی و بافت‌های لنفوئیدی ثانویه ۱۳۰
٦- تولید آنتی‌بادی منوکلونال انسانی به‌وسیله هتروهیبریدوما و هیبرید ـ هیبریدوما ۱۳۱
تولید انبوه آنتی‌بادی منوکلونال؛ *in vivo* و *in vitro* ۱۳۳
مزایای روش‌های *in vitro* ۱۳٤
معایب روش‌های *in vitro* ۱۳٤
مزایای روش *in vivo* ۱۳۵
معایب روش *in vivo* ۱۳٦
کشت انبوه سلول‌های هیبریدوما ۱۳٦
هزینه‌های افزایش مقیاس کشت سلولی ۱۳۷
عوامل مؤثر بر کشت انبوه ۱۳۸
الف- محیط کشت سلولی ۱۳۹

ب- نقش سرم در محیط کشت سلولی ۱٤۰
ج- تغییرات pH محیط ۱٤۲
د- فشار اکسیژن ۱٤٤
هـ- پتانسیل احیا ۱٤٥
راهکارها و روش‌های تولید انبوه آنتی‌بادی‌های منوکلونال ۱٤٦
الف- راهکارهای تولید انبوه در سیستم *in vivo* ۱٤٦
۱- حیوان آزمایشگاهی ۱٤۷
۲- آماده‌سازی حیوان ۱٤۷
۳- تأیید عملکرد تولید توسط رده هیبریدوما ۱٤۸
٤- جمع‌آوری مایع آسیت ۱٤۸
ب- راهکارهای تولید انبوه در سیستم *in vitro* ۱٤۹
انواع کشت انبوه در *in vitro* ۱٥۱
۱- کشت به روش سری ۱٥۱
۲- کشت غیرمداوم توأم با غذارسانی ۱٥۲
۳- کشت به‌روش غذارسانی مداوم ۱٥۲
٤- کشت با جریان مداوم ۱٥۲
فناوری بیوراکتور ۱٥۲
سیستم‌های به‌دام اندازنده سلول‌ها ۱٥۳
الف- الیاف ۱٥۳
ب- محفظه‌های سرامیکی ۱٥٤
ج - بسترهای متخلخل ۱٥٥
انواع بیوراکتورها ۱٥٦
الف- انواع بیوراکتورهای کشت سلول‌های چسبنده ۱٥٦
ب- انواع بیوراکتورهای کشت سلول‌های معلق ۱٥۷
۱- کشت‌های معلق ساکن ۱٥۷
۲- کشت‌های معلق متحرک ۱٥۸

۳- کشت‌های معلق با سیستم نگهداری و تثبیت سلول‌ها ۱۶۱
فرایند بیوراکتوری ۱۶۵
الف- درصد بیان ۱۶۶
ب- درجه خلوص ۱۶۷
ج- بازده تخلیص ۱۶۷
د- بازده فرایند ۱۶۸
پیش پالایش ۱۶۸
الف- جداسازی سلول‌ها ۱۶۹
ب- کاهش حجم ۱۶۹
عملیات پالایش ۱۷۰
تعیین کمیت و فعالیت محصول به‌دست‌آمده ۱۷۲
ذخیره‌سازی و نگهداری ۱۷۲
مزایا و معایب ۱۷۲
کاربردهای آنتی‌بادی‌های منوکلونال ۱۸۰
پیشینه‌ای کوتاه از آنتی‌بادی‌های کنژوگه ۱۸۱
آنتی‌بادی‌های متصل شده (کنژوگه) به عوامل درمانی ۱۸۴
الف- آنتی‌بادی‌های کنژوگه به دارو (کنژوگه‌های آنتی‌بادی- دارو) ۱۸۵
ب- رادیوایمونوکنژوگه‌ها ۱۸۸
ج- آنتی‌بادی‌های کنژوگه به توکسین- ایمونوتوکسین‌ها ۱۹۰
مروری بر آنتی‌بادی‌های منوکلونال درمانی موجود در بازار دارویی دنیا ۱۹۴
آنتی‌بادی‌های منوکلونال درمانی در حال بررسی در فازهای مختلف از کارآزمایی‌های بالینی ۱۹۹
فهرست منابع ۲۰۳
واژه‌نامه فارسی به انگلیسی ۲۱۹
واژه‌نامه انگلیسی به فارسی ۲۲۵
نمایه ۲۳۱

پیشگفتار

پیشرفت‌های علوم مولکولی و علوم سلولی و زیستی در سه دهه اخیر به‌طور قابل توجهی افق‌های دید محققان را گسترده کرده است. مولکول‌های آنتی‌بادی به‌عنوان یکی از با ارزش‌ترین و پرکاربردترین ابزارهای علم بیولوژی نه تنها به‌عنوان یک عامل شناساگر مولکولی با کاربرد تحقیقاتی، بلکه به‌عنوان یک ابزار تشخیصی و درمانی مؤثر به‌کار می‌روند.

در طی سال‌های گذشته در کلاس‌های درس و یا برخورد با دانشجویان و یا علاقه‌مندان علوم‌زیستی مربوطه، بارها درباره کتابی به زبان فارسی در موضوع آنتی‌بادی، که در مورد تولید، کاربرد و درمجموع هر آنچه به آنتی‌بادی مربوط می‌شود، مورد سؤال قرار گرفته‌ایم و همیشه این کاستی در مجموعه کتاب‌های علمی و درسی فارسی زبان حس می‌شد. کتاب پیش‌رو همه مسائل در عرصه آنتی‌بادی را به زبانی شیوا و به‌طور کامل توضیح می‌دهد و روش‌های تولید و موارد کاربرد آنتی‌بادی‌ها را تحلیل کرده است.

اگرچه روش‌های اصلی تولید انواع آنتی‌بادی‌ها تغییر زیادی نکرده است، ولی در این کتاب سعی کردیم که همه این مطالب را در مجموعهٔ دو جلدی جمع‌آوری و به روزرسانی کنیم. این کتاب برای محققان علوم‌زیستی و نیز دانشجویان کارشناسی ارشد (M.Sc.) و دکتری حرفه‌ای و نیز تخصصی (Ph.D.) که به تولید و کاربرد مولکول آنتی‌بادی علاقه‌مند هستند، مفید و قابل استفاده است. نگارش این کتاب به نحوی است که هم برای محققان تازه‌کار و هم برای سروران با تجربه کاربرد دارد. در اغلب موارد سعی شده است که با

توضیحات جامع و کامل راجع‌به موضوع بحث و بررسی انجام شود. البته پیشاپیش متذکر می‌شود که امکان ارائه تمام روش‌ها در این کتاب‌ها غیر ممکن بود، ولی تلاش شد که روش‌های مفید این عرضه تبیین شود. ذکر منابع اصلی در اغلب روش‌ها مشکل بود، زیرا بعضی از آنها تغییر داده شده و اصلاح و بعضی نیز برگرفته از تجربیات شخصی نگارندگان است. در متن کتاب تلاش شده که از لغات متداول فارسی استفاده شود به‌طوری‌که قابلیت درک صحیح موضوع خدشه‌دار نشود، اما در مواردی که لغت انگلیسی متداول‌تر بوده، به‌ناچار از لغات انگلیسی استفاده شده است.

منابع در پایان هر فصل ذکر شده که شامل کتاب و مقاله است.

پس از جمع‌آوری تمام مطالب به‌نظر می‌رسید که بهترین روش دسته‌بندی و تقسیم مجموعه به دو کتاب باشد. کتاب اول با عنوان آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال و منوکلونال (از تولید تا کاربرد). شامل دو فصل جداگانه است؛ فصل اول، آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال و فصل دوم، آنتی‌بادی‌های منوکلونال. همچنین مباحث مربوط به تولید آزمایشگاهی و تولید انبوه آن و کاربردهای انواع آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال و منوکلونال نیز در انتهای کتاب ذکر شده است.

کتاب دوم با عنوان آنتی‌بادی‌های نوترکیب (از تولید تا کاربرد)، است که در آن انواع آنتی‌بادی‌های نوترکیب در جانوران و گیاهان، شامل تعاریف و روش‌های تولید و نیز کاربرد آنها ذکر شده است.

در پایان از هرگونه کاستی در کتاب عذرخواهی می‌نمایم و برای همهٔ همکاران، دانش‌پژوهان و دانشجویان عزیز کشور عزیزمان ایران از خداوند متعال طلب سلامتی و توفیق روزافزون دارم.

فاطمه رهبری‌زاده

عضو هیأت علمی گروه بیوتکنولوژی پزشکی

دانشگاه تربیت مدرس