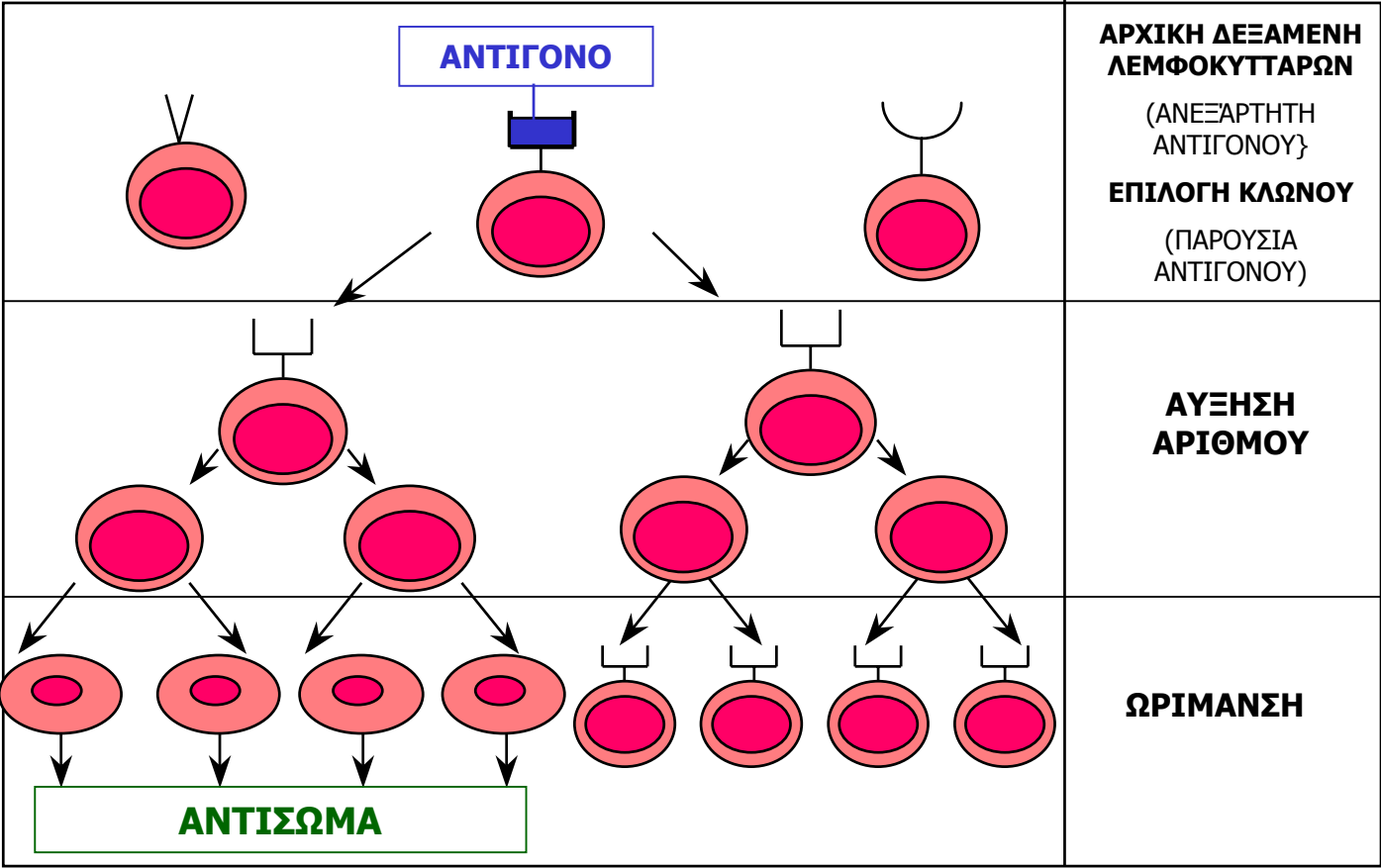


ΚΛΩΝΙΚΗ ΕΠΙΛΟΓΗ



ΕΚΤΕΛΕΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ
(ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΜΕΡΙΚΕΣ ΜΕΡΕΣ)

ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΝΗΜΗΣ
(ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΔΕΚΑΕΤΙΕΣ)

- Το αντιγόνο επιλέγει τα κύτταρα με την κατάλληλη εξειδίκευση και προκαλεί τον πολ/σμό τους και την παραγωγή των αντισωμάτων
- Προϋπόθεση λειτουργίας να υπάρχει μηχανισμός παραγωγής τεράστιου αριθμού διαφορετικών Igs απουσία δυνάμεων επιλογής

ΩΡΙΜΑΝΣΗ B ΚΥΤΤΑΡΩΝ

ΚΥΤΤΑΡΟ

Έκφραση Ig

Προγονικό αιμοποιητικό κύτταρο



Όχι

Κύτταρο Λεμφικής Σειράς



Όχι

Μερικός ανασυνδυασμός γονιδίου βαριάς αλυσίδας

Προ-προ B κύτταρο (pro-B cell)



Όχι

Ολικός ανασυνδυασμός γονιδίου βαριάς αλυσίδας

Προ-B κύτταρο (pre-B cell)



μ βαριά αλυσίδα
+βοηθητική

Ανασυνδυασμός γονιδίου ελαφριάς αλυσίδας

Ανώριμο B κύτταρο



mIgM

Αλλαγή στη συρραφή του RNA

Ωριμο B κύτταρο



mIgM+mIgD

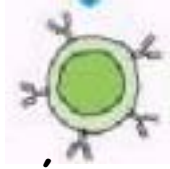
Μυελός
των
οστών

ΩΡΙΜΑΝΣΗ Β ΚΥΤΤΑΡΩΝ

ΚΥΤΤΑΡΟ

Έκφραση Ig

Ωριμο Β κύτταρο



↓ Διέγερση από αντιγόνο

Ενεργοποίηση Β κυττάρου



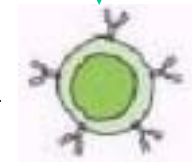
↓ Διαφοροποίηση

Πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν IgM

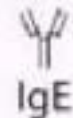


mIgM+mIgD

Μετάπτωση τάξης



Β κύτταρα μνήμης

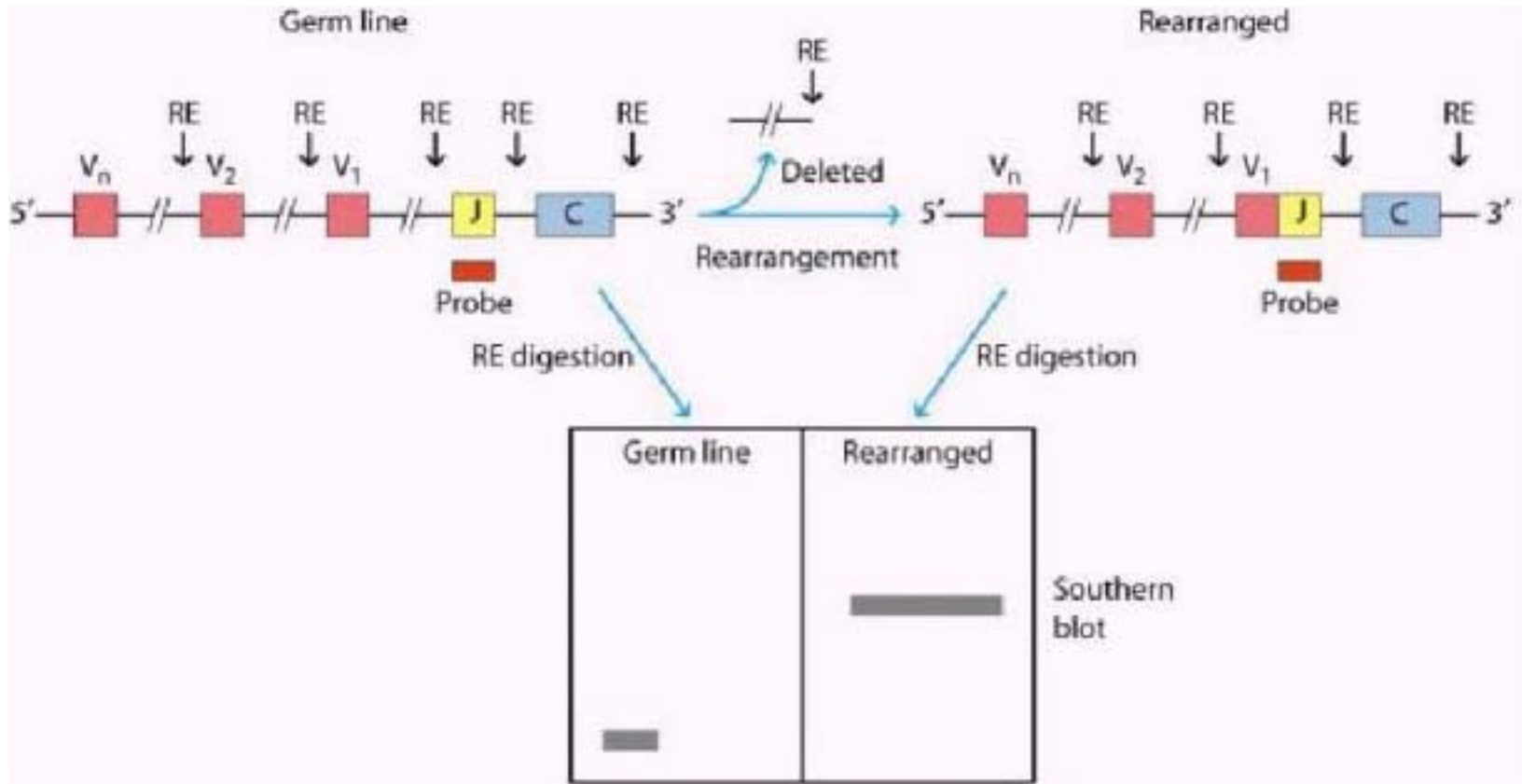


Πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν διάφορους ισότυπους Ig

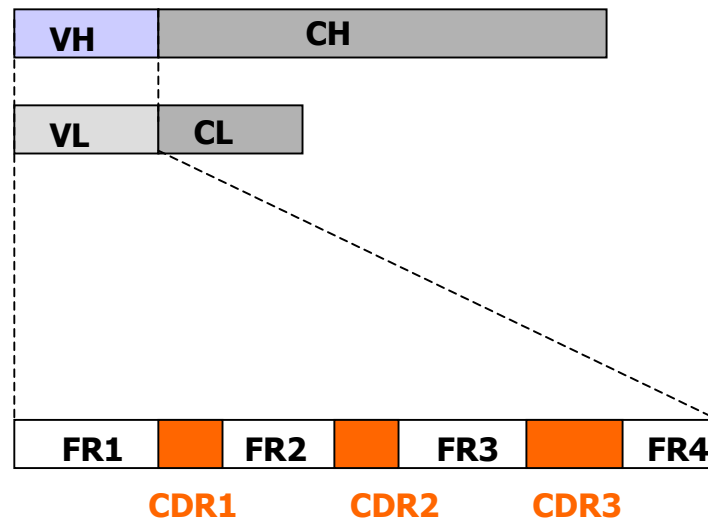
Περιφερικά
λεμφικά
όργανα

Ισότυπος Ab	Υπότυποι	Βαριά αλυσίδα	Συγκέντρωση ορού	Χρόνος Ημιζωής (ημέρες)	Εκκρινόμενη μορφή	Λειτουργία
IgA	IgA 1,2	α (1 ή 2)	3.5	6	<p>Μono, δι, τριμερές</p>	Βλεννογονική ανοσία νεογνική παθητική ανοσία
IgD	-	δ	Ιχνη	3	Όχι	Αντιγονικός Υποδοχέας παρθένων B κυττάρων
IgE	-	ε	0.05	2		Άμεση υπερευαισθησία
IgG	IgG1-4	γ(1,2,3, ή 4)	13,5	23		Ωψωνινοποίηση, ADCC, νεογνική ανοσία, ενεργ. συμπληρώματος
IgM	-	μ	1,5	5		Αντιγονικός Υποδοχέας παρθένων B κυττάρων, ενεργ. συμπληρώματος

Αναδιάταξη των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών: πειραματική προσέγγιση



Μεταβλητότητα αμινοξέων στη μεταβλητή V περιοχή

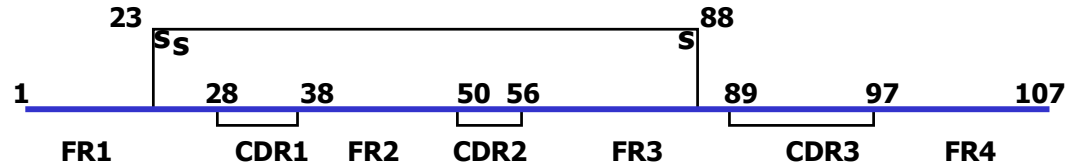


FR: Framework Region = περιοχή πλαισίου

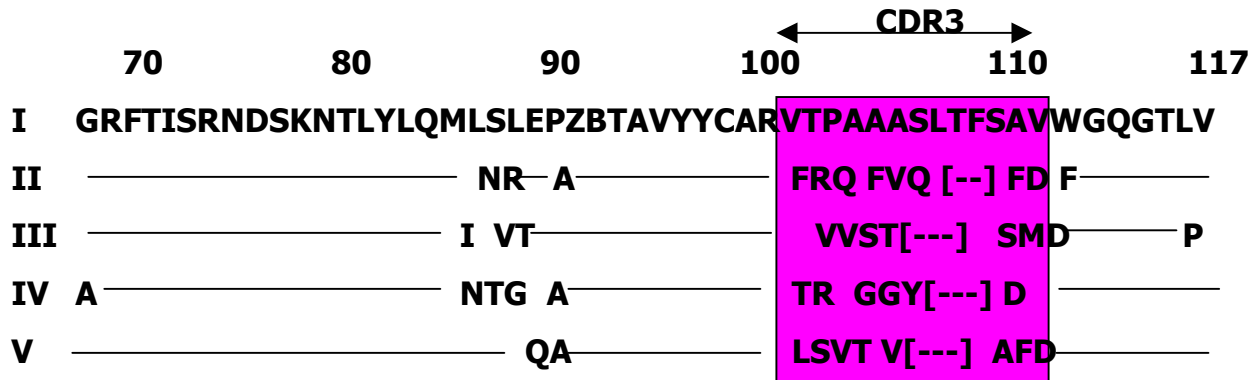
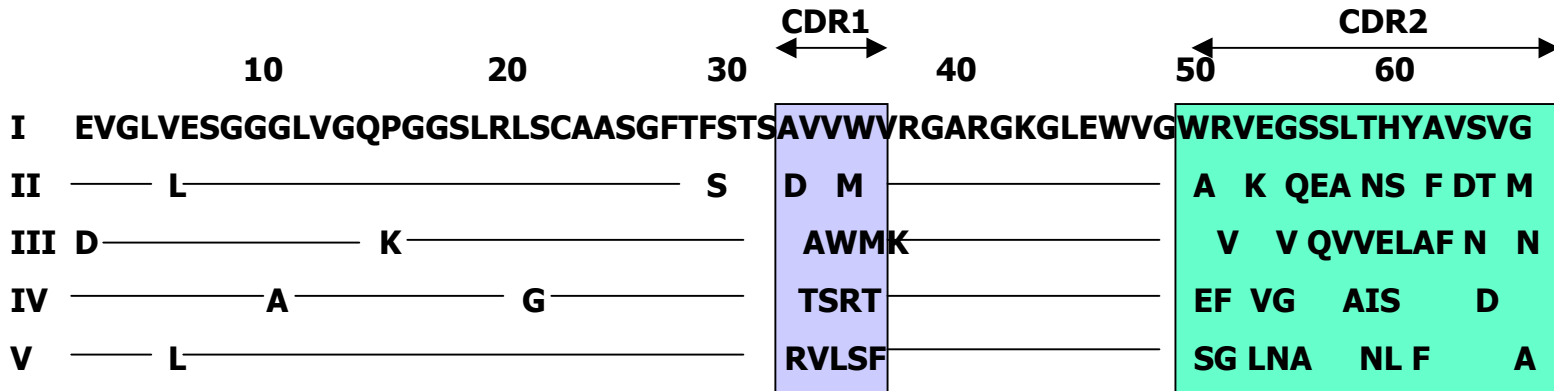
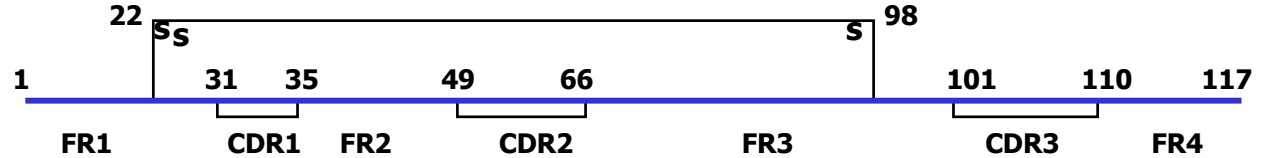
CDR: Complementarity Determining region = περιοχή που καθορίζει συμπληρωματικότητα

Μεταβλητότητα αμινοξέων στη μεταβλητή V περιοχή

Ελαφριά αλυσίδα



Βαριά αλυσίδα



Τοποθέτηση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών στα χρωμοσώματα

ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ		
Γονίδιο	Άνθρωπος	Ποντίκι
λ ελαφριά αλυσίδα	22	16
κ ελαφριά αλυσίδα	2	6
Βαριά αλυσίδα	14	12

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ (ΡΕΠΕΡΤΟΡΙΟ Β ΚΥΤΤΑΡΩΝ)

1. Οργάνωση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών

2. Σωματικός ανασυνδυασμός – Αναδιάταξη γονιδίων

3. Μεταβλητός ανασυνδυασμός (Junctional diversity)

4. Προσθήκη N-νουκλεοτιδικής περιοχής

5. Σωματικές μεταλλάξεις (Somatic mutations)

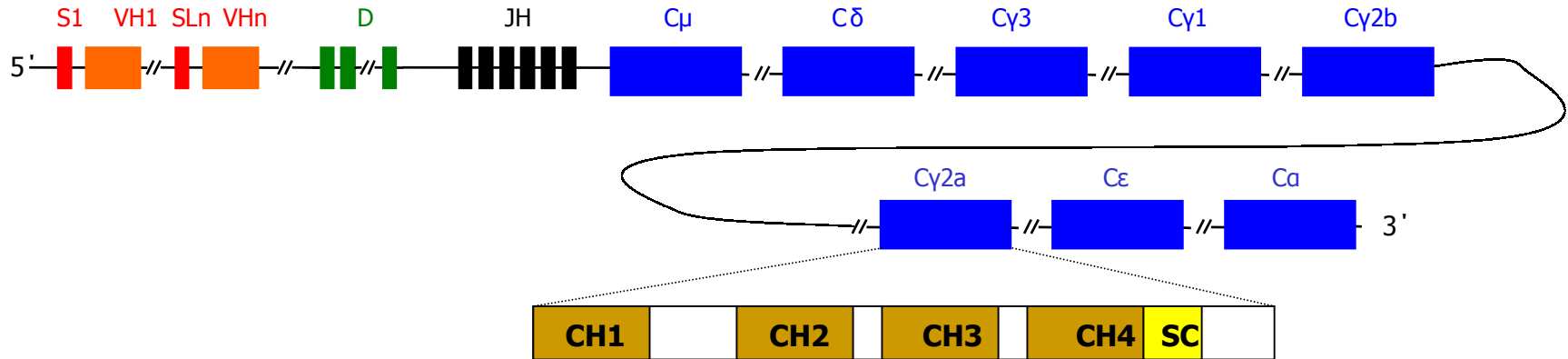
6. Συνδυασμός αλυσίδων

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ (ΡΕΠΕΡΤΟΡΙΟ Β ΚΥΤΤΑΡΩΝ)

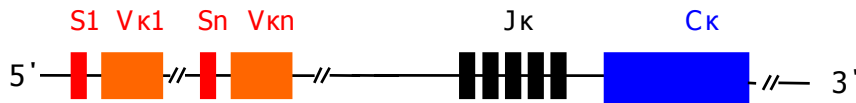
1. Οργάνωση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών

Οργάνωση γονιδίων ανοσοσφαιρινών

Γενετικός τύπος βαριών Η αλυσίδων (χρωμόσωμα 14)



Γενετικός τύπος κ ελαφριών αλυσίδων (χρωμόσωμα 2)



Γενετικός τύπος λ ελαφριών αλυσίδων (χρωμόσωμα 22)



S=πεπτιδιο οδηγός, $n = \sim 100$

V= μεταβλητό γονιδιακό τμήμα, **D**=γονιδιακό τμήμα ετερογένειας

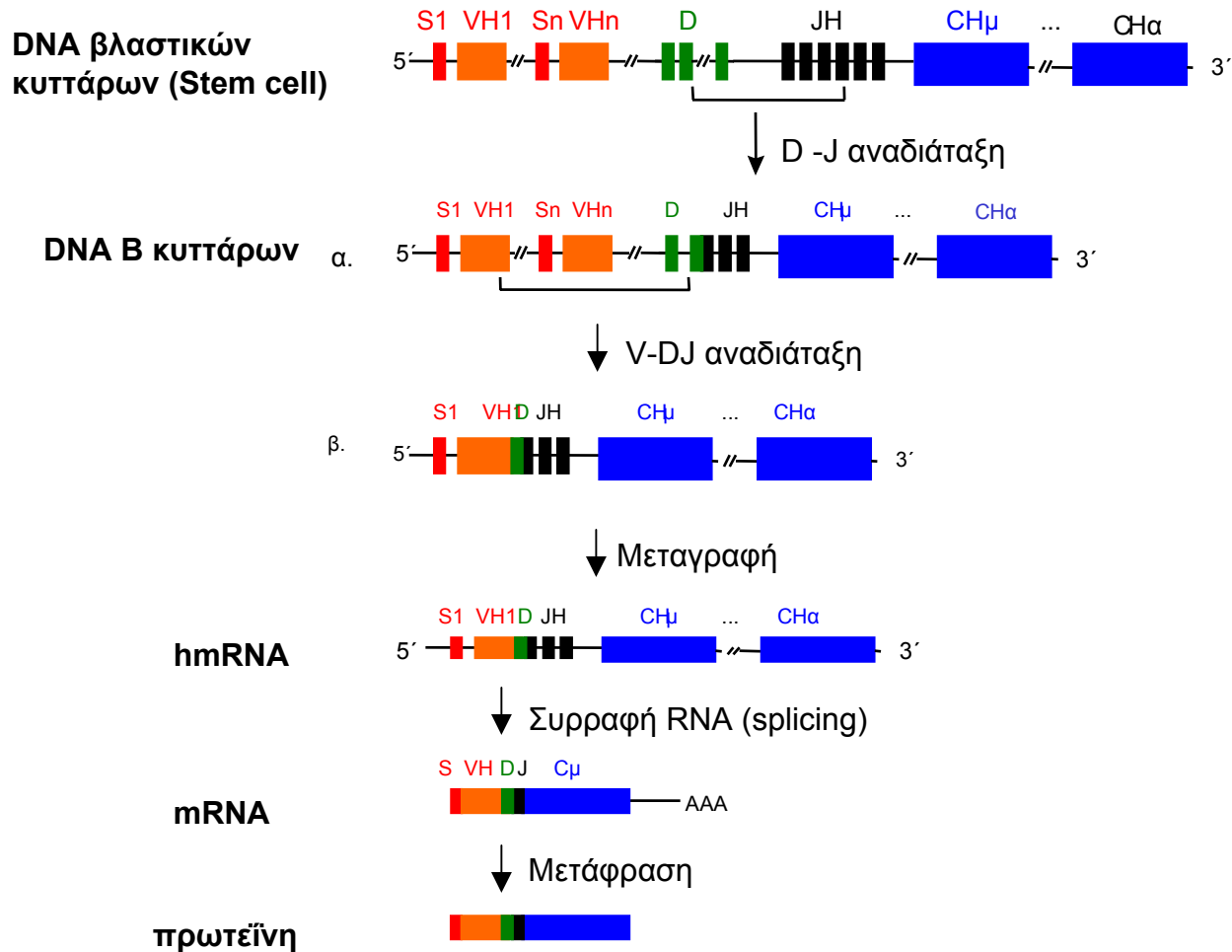
J= συνδετικό γονιδιακό τμήμα, **C**= γονιδιακό τμήμα σταθερής περιοχής

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ (ΡΕΠΕΡΤΟΡΙΟ Β ΚΥΤΤΑΡΩΝ)

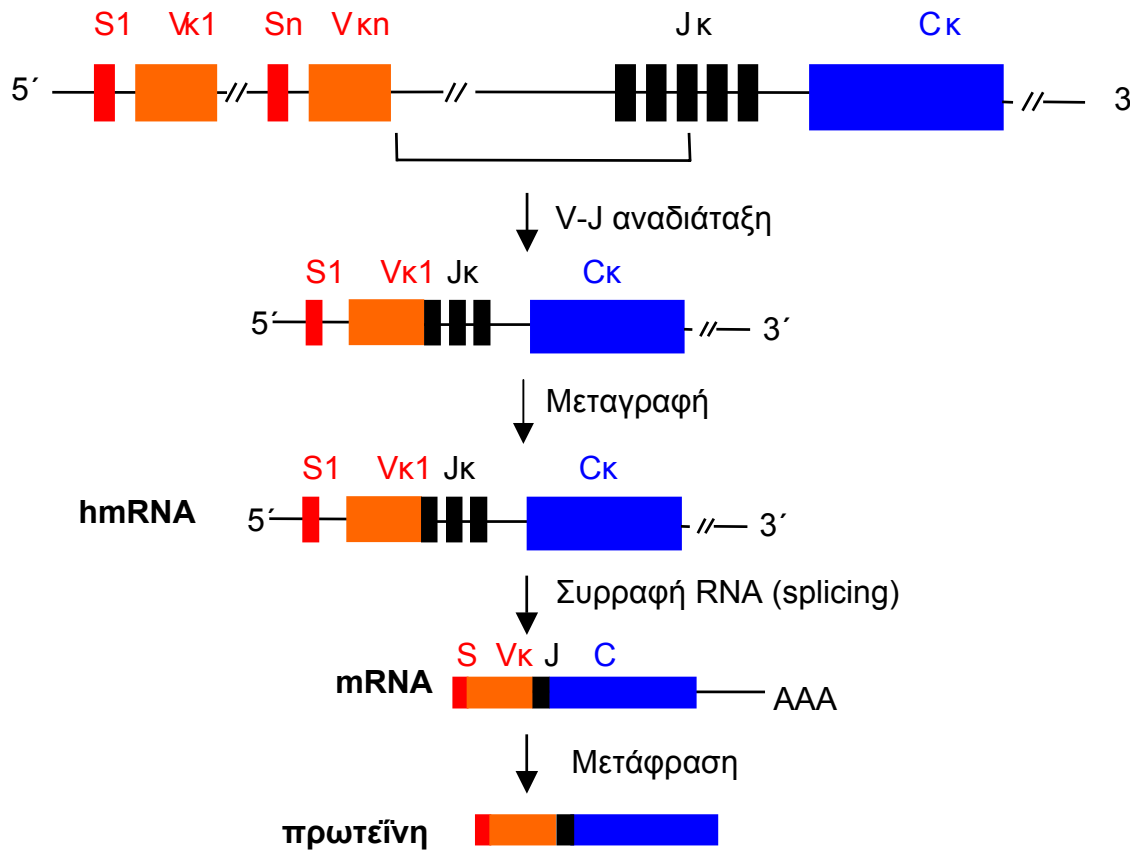
1. Οργάνωση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών

2. Σωματικός ανασυνδυασμός – Αναδιάταξη γονιδίων

Αναδιάταξη των γονιδίων των βαριών αλυσίδων στα Β κύτταρα.



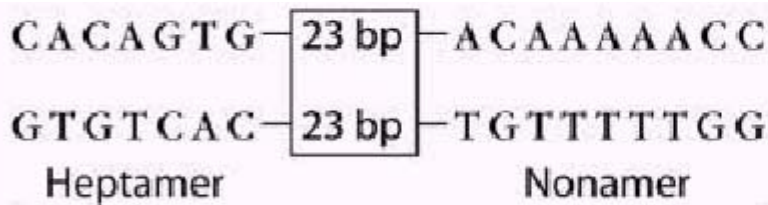
Αναδιάταξη των γονιδίων των ελαφριών κ αλυσίδων στα Β κύτταρα



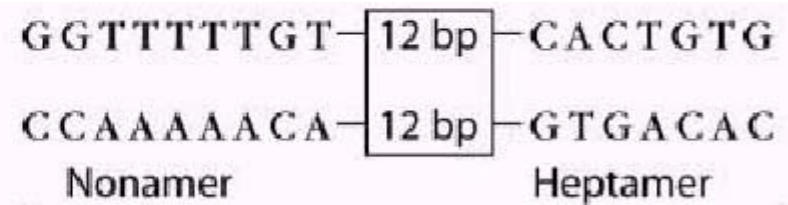
ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ (Recombination Signal Sequences - RSS)

1. Νουκλεοτιδική αλληλουχία των RSSs:

είναι συντηρημένες παλίνδρομες αλληλουχίες
αποτελούν θέσεις πρόσδεσης δύο υπομονάδων ανασυνδυάσης



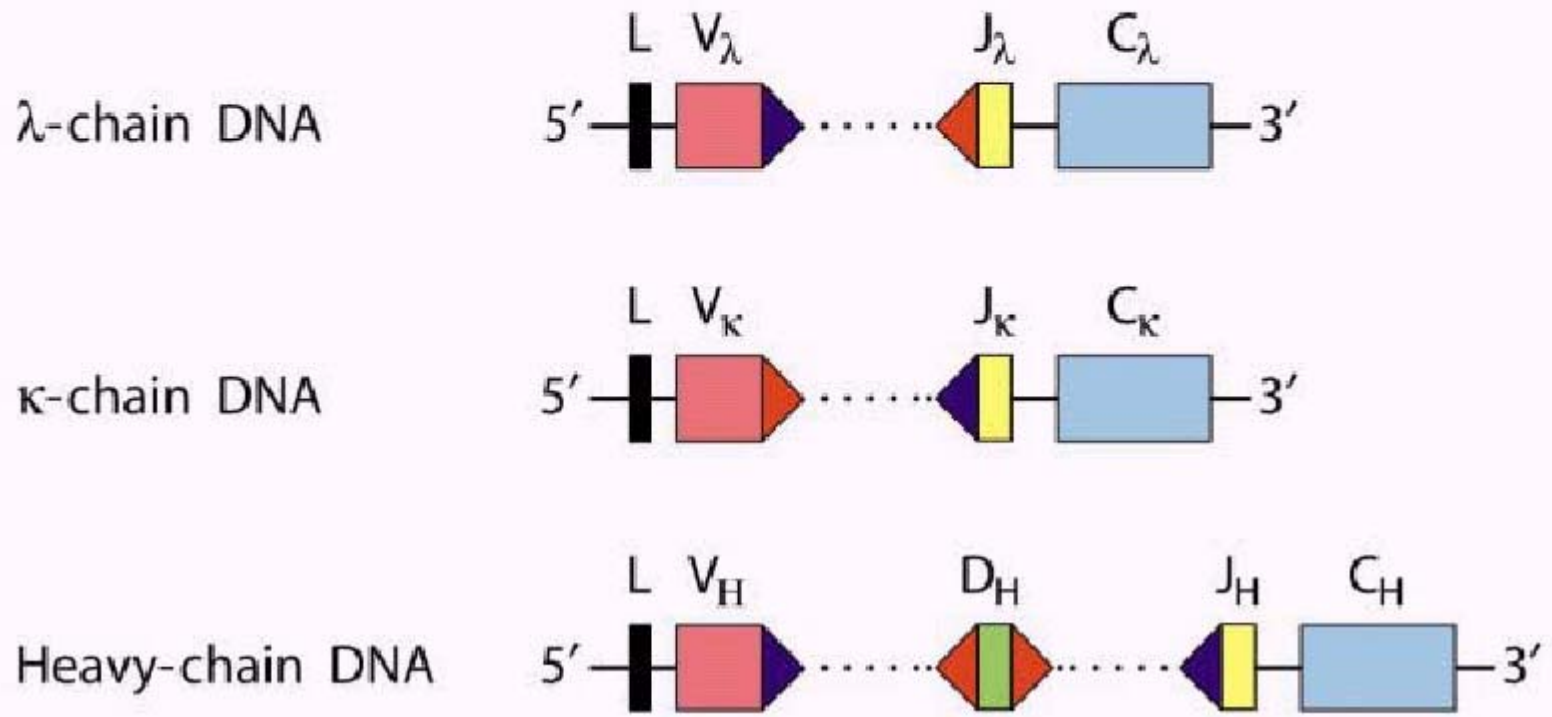
2-στροφές στην έλικα του DNA



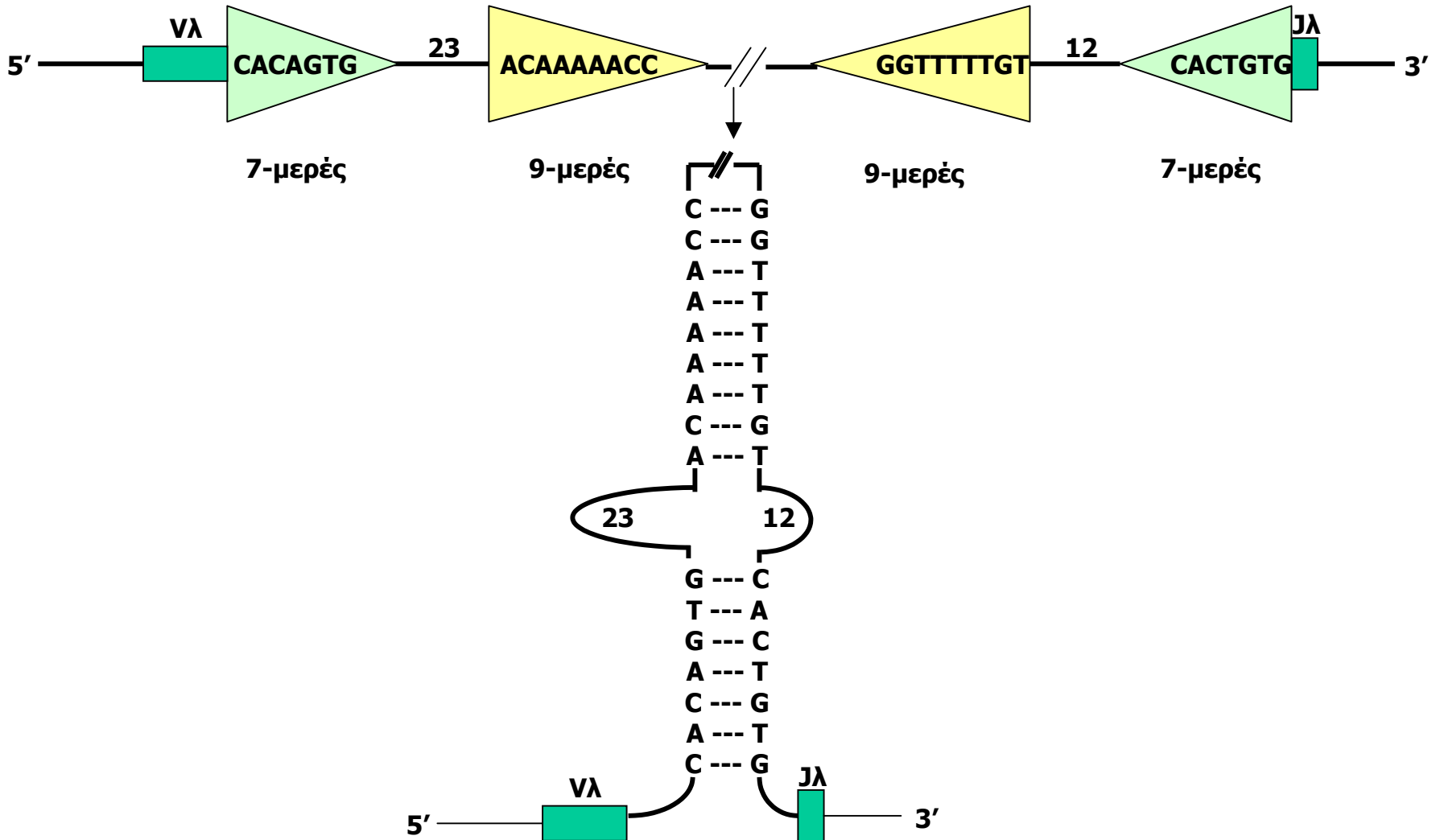
1-στροφή στην έλικα του DNA

ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ (Recombination Signal Sequences - RSS)

(b) Location of RSSs in germ-line immunoglobulin DNA

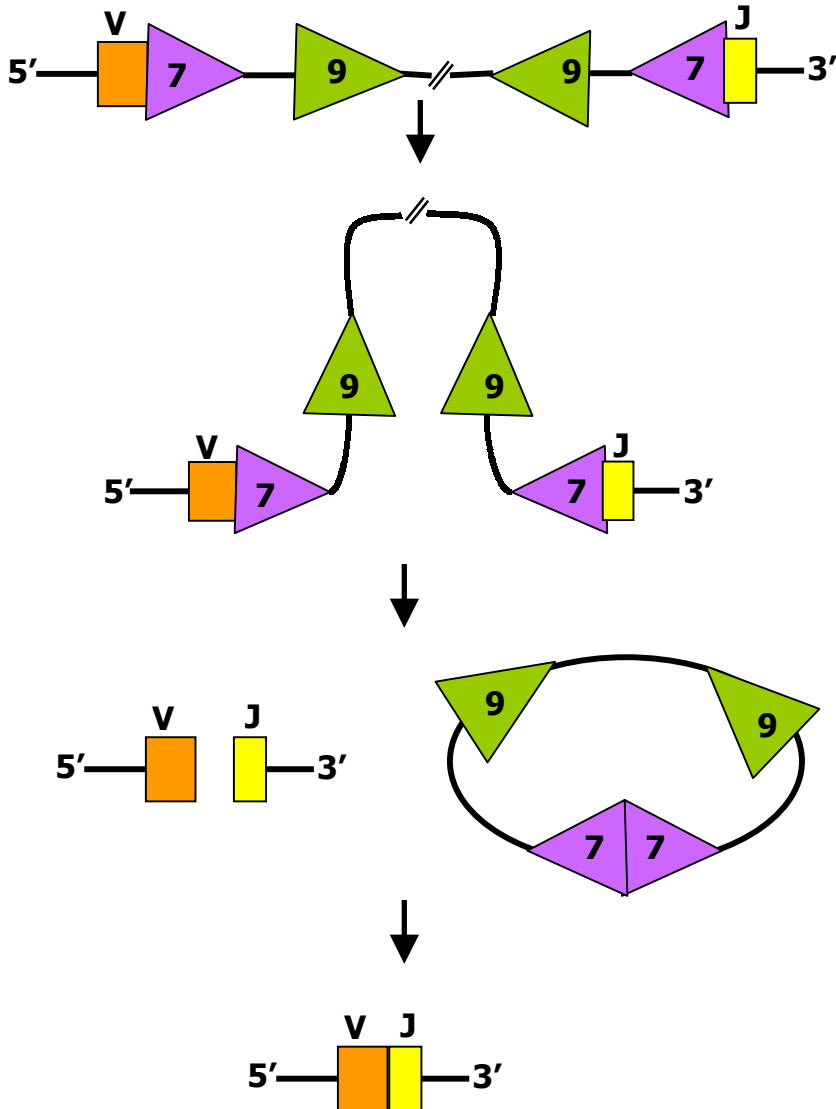


Κανόνας 23/12

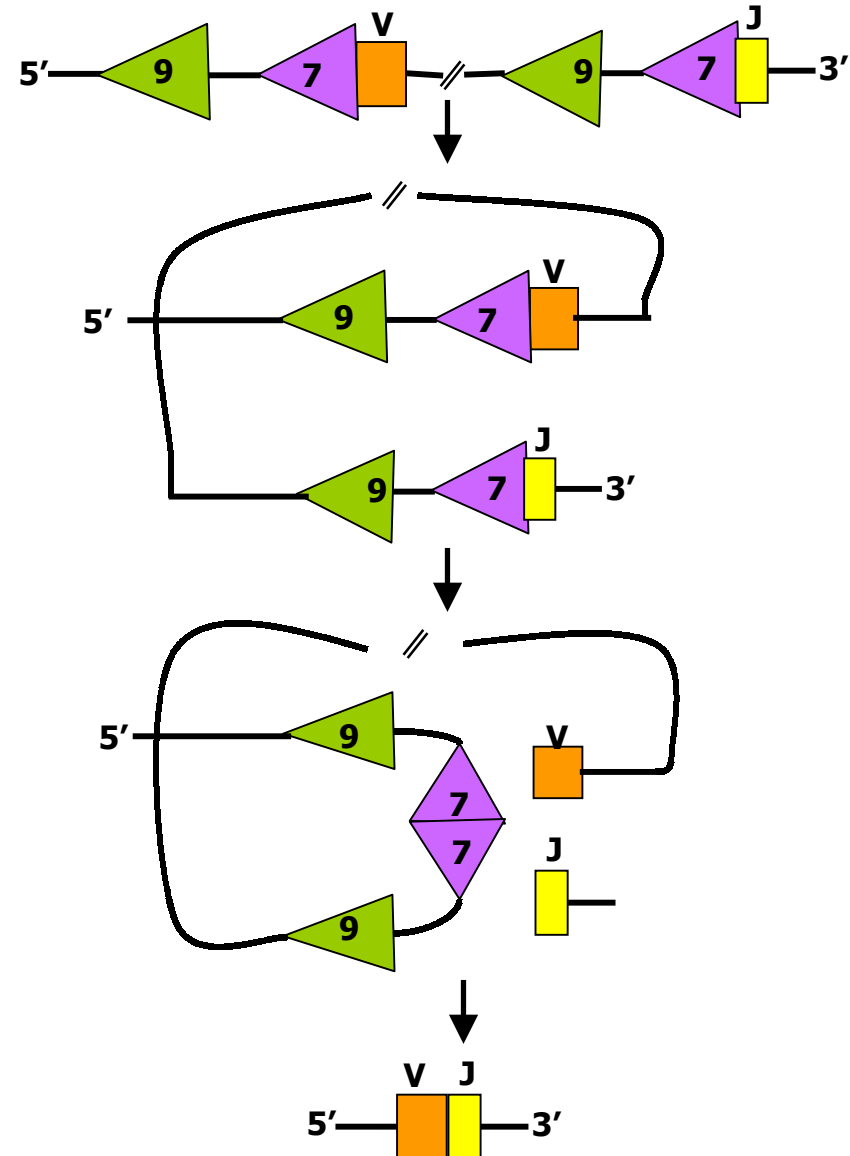


Μηχανισμοί V-J αναδιάταξης

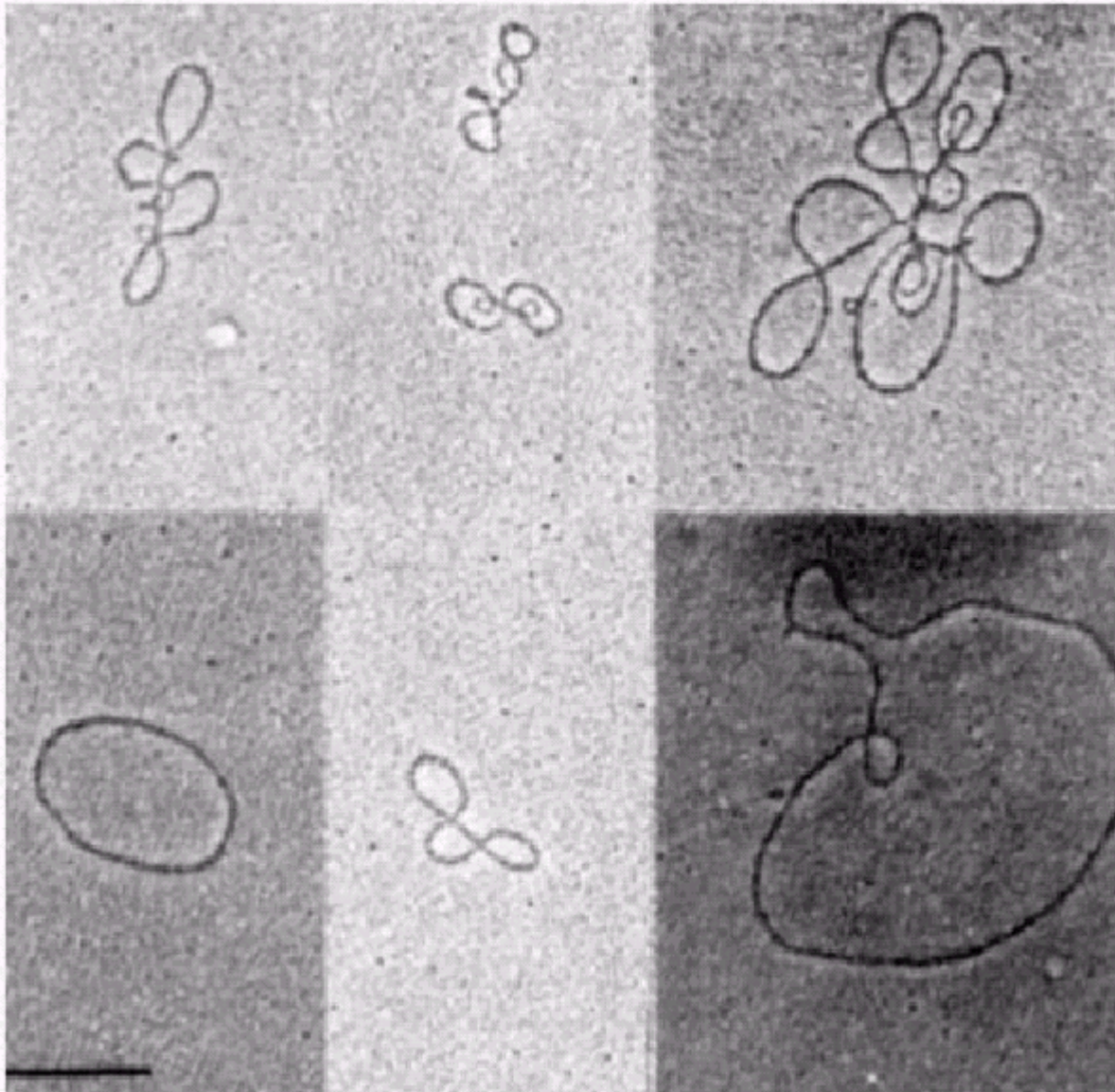
ΕΛΛΕΙΠΤΙΚΟΣ



ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ



Απομόνωση κυκλικού DNA από θυμοκύτταρα στα οποία το DNA που κωδικοποιεί τις αλυσίδες του TCR υφίσταται V-D-J και V-J γονιδιακή αναδιάταξη



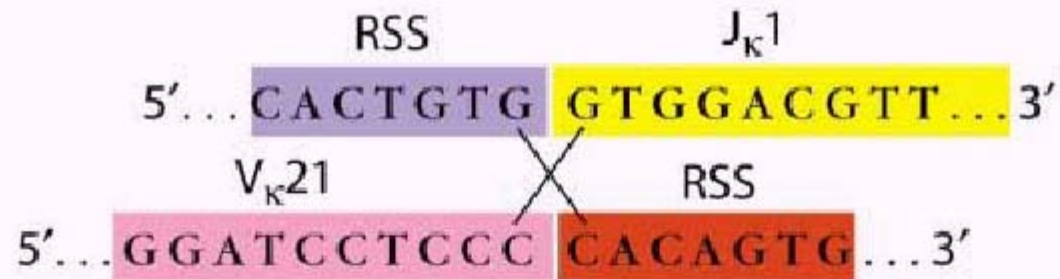
ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ (ΡΕΠΕΡΤΟΡΙΟ Β ΚΥΤΤΑΡΩΝ)

1. Οργάνωση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών

2. Σωματικός ανασυνδυασμός – Αναδιάταξη γονιδίων

3. Μεταβλητός ανασυνδυασμός (Junctional diversity)

3. Μεταβλητός ανασυνδυασμός (Junctional diversity)



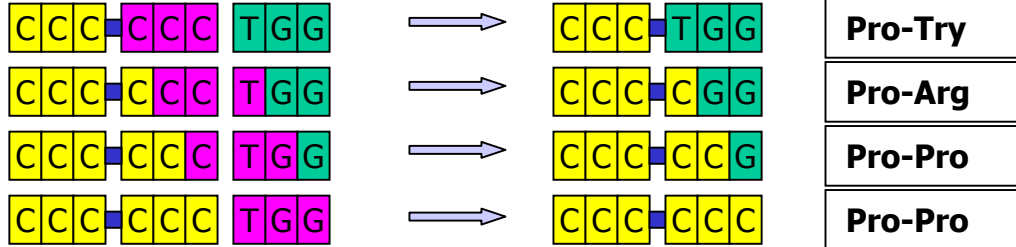
Pre-B cell lines	Coding joints (V _κ 21 J _κ 1)	Signal joints (RSS/RSS)
Cell line #1	5'-GGATCC GGACGTT-3'	5'-CACTGTG CACAGTG-3'
Cell line #2	5'-GGATC TGGACGTT-3'	5'-CACTGTG CACAGTG-3'
Cell line #3	5'-GGATCCTC GTGGACGTT-3'	5'-CACTGTG CACAGTG-3'
Cell line #4	5'-GGATCCT TGGACGTT-3'	5'-CACTGTG CACAGTG-3'

Ελλείψεις νουκλεοτιδίων στις συνδέσεις

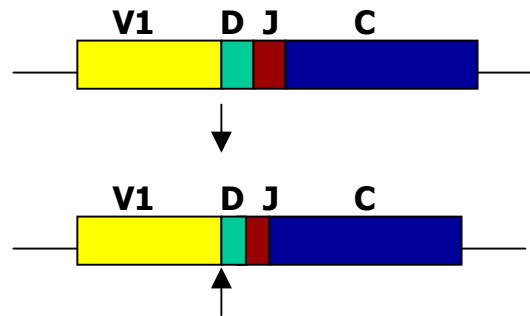
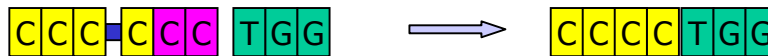
Αλληλουχία βλαστικής
σειράς (germline)



Αλληλουχία κατά
την έκφραση

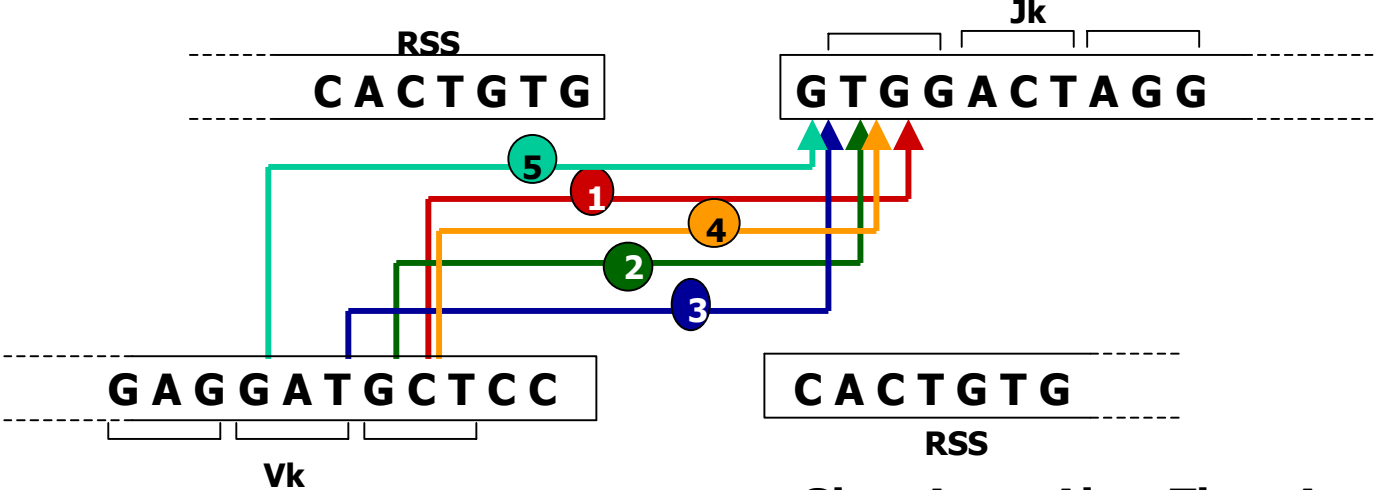


Αλληλουχία εκτός
πλασίου ανάγνωσης



Αφαίρεση νουκλεοτιδίων από νουκλεάσες

Παραγωγικές και μη-παραγωγικές αναδιατάξεις



Παραγωγική αναδιάταξη

Μη-παραγωγική αναδιάταξη

1 Glu Asp Ala Thr Arg
GAGGATGCGACTAGG

2 Glu Asp Gly Thr Arg
GAGGATGGCGACTAG

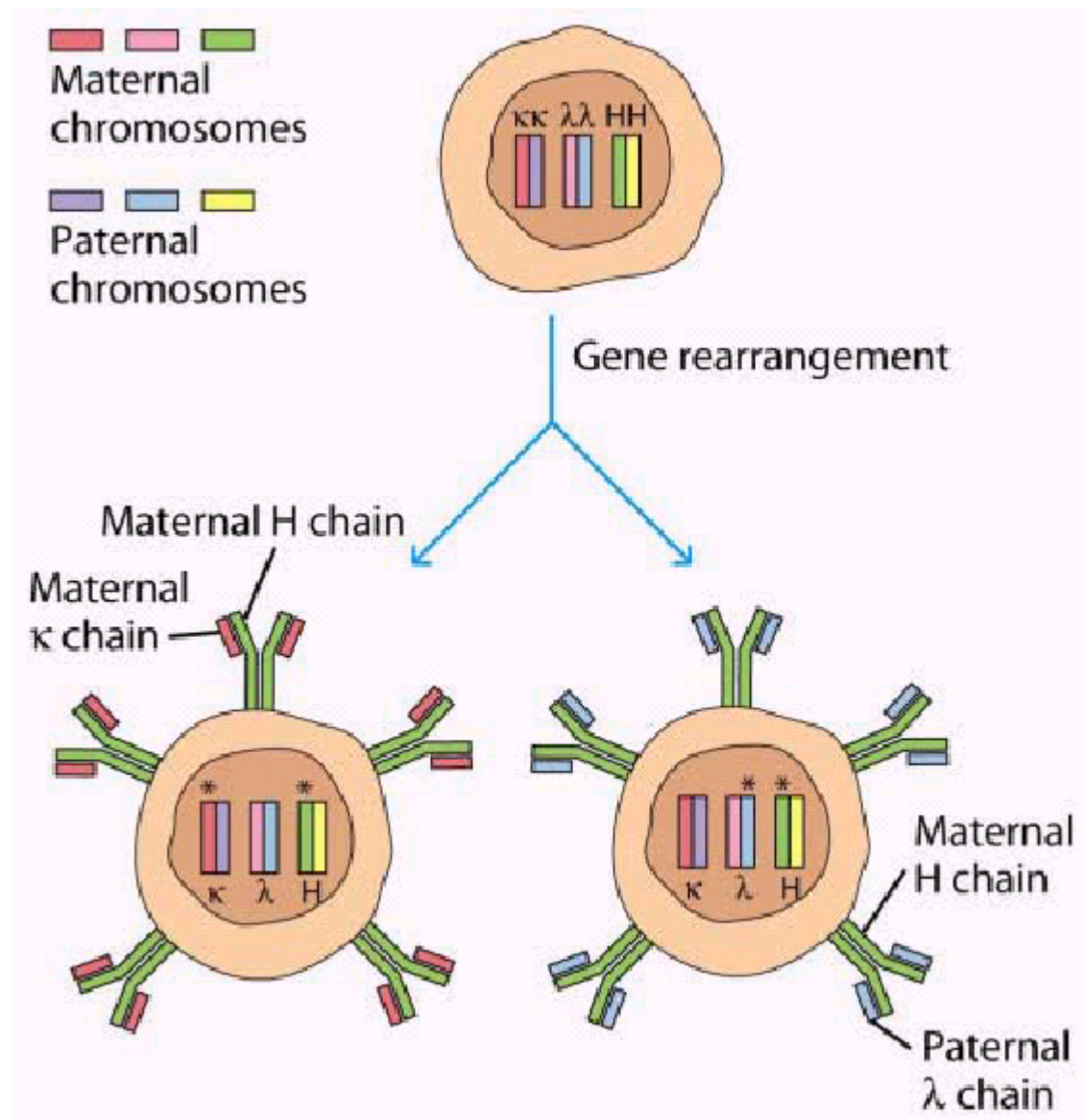
3 Glu Asp Trp Thr Arg
GAGGATTGGACTAGG

4 Glu Asp Ala Asp **stop**
GAGGATGCGGACTAG

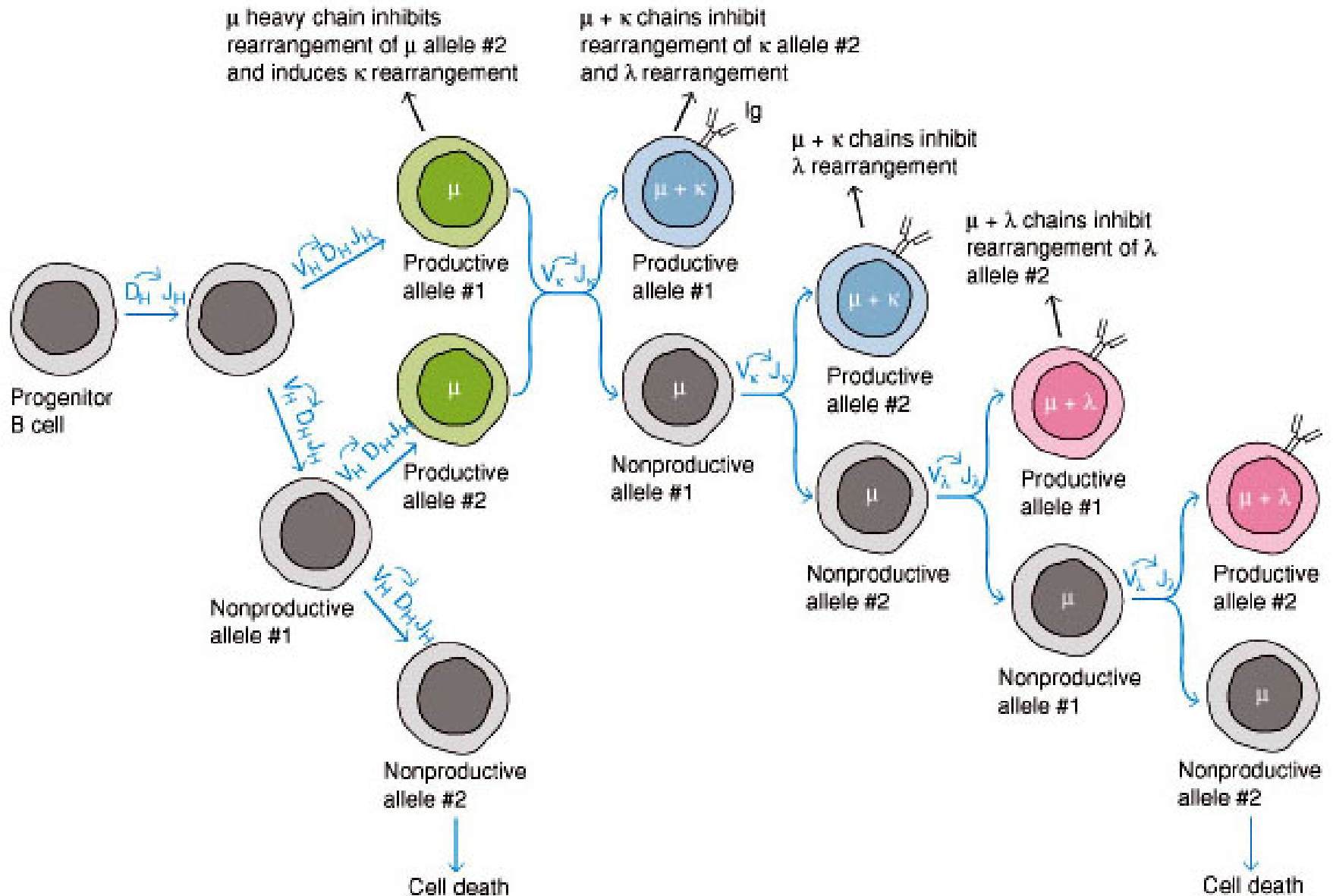
5 Glu Val Asp **stop**
GAGGTGGACTAG

Κατά τον αλληλικό αποκλεισμό στο κύτταρο εκφράζονται μόνο η μια βαριά και η μια ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης από τον ένα γονέα.

Το Β κύτταρο έχει μια μόνο αντιγονική ειδικότητα.



Αλληλικός αποκλεισμός



ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ (ΡΕΠΕΡΤΟΡΙΟ Β ΚΥΤΤΑΡΩΝ)

1. Οργάνωση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών

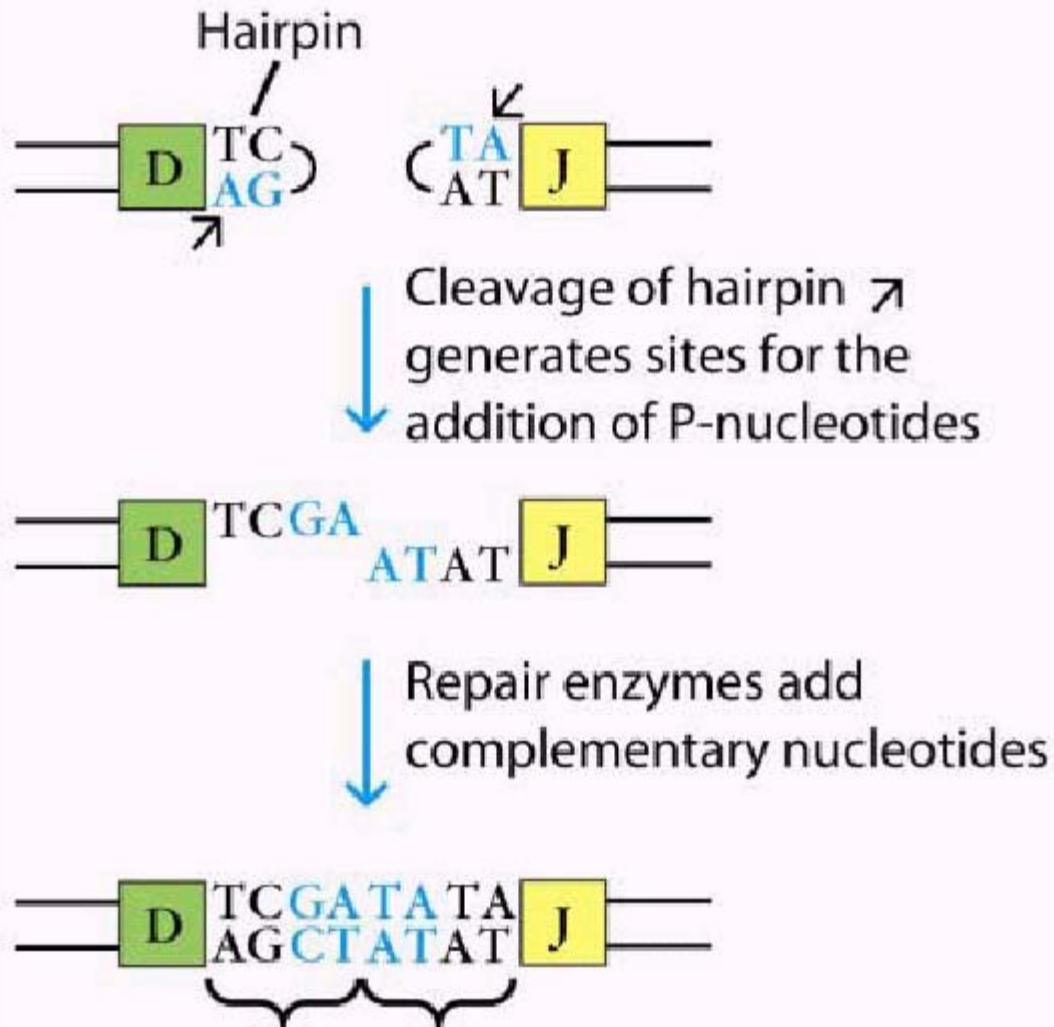
2. Σωματικός ανασυνδυασμός – Αναδιάταξη γονιδίων

3. Μεταβλητός ανασυνδυασμός (Junctional diversity)

4. Προσθήκη N-νουκλεοτιδικής περιοχής

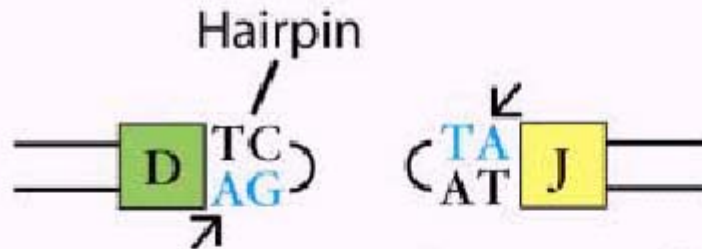
Μηχανισμός Προσθήκης P- νουκλεοτιδίων

(a) P-nucleotide addition



Μηχανισμός Προσθήκης N- νουκλεοτιδίων

(b) N-nucleotide addition



Cleavage of hairpin ↗
generates sites for the
addition of P-nucleotides



Ακροτελική δεοξυνουκλεοτιδυλο-
τρανσφεράση (TdT)

TdT adds N-nucleotides
Repair enzymes add
complementary nucleotides

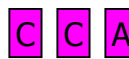


Περιοχή προσθήκης N νουκλεοτιδίων

Αλληλουχία βλαστικής
σειράς (germline)

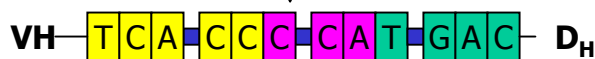


+



Νουκλεοτίδια N περιοχής

Αλληλουχία κατά
την έκφραση



Ser-Pro-His-Asp



Προσθήκη νουκλεοτιδίων ή περιοχή N

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ (ΡΕΠΕΡΤΟΡΙΟ Β ΚΥΤΤΑΡΩΝ)

1. Οργάνωση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών

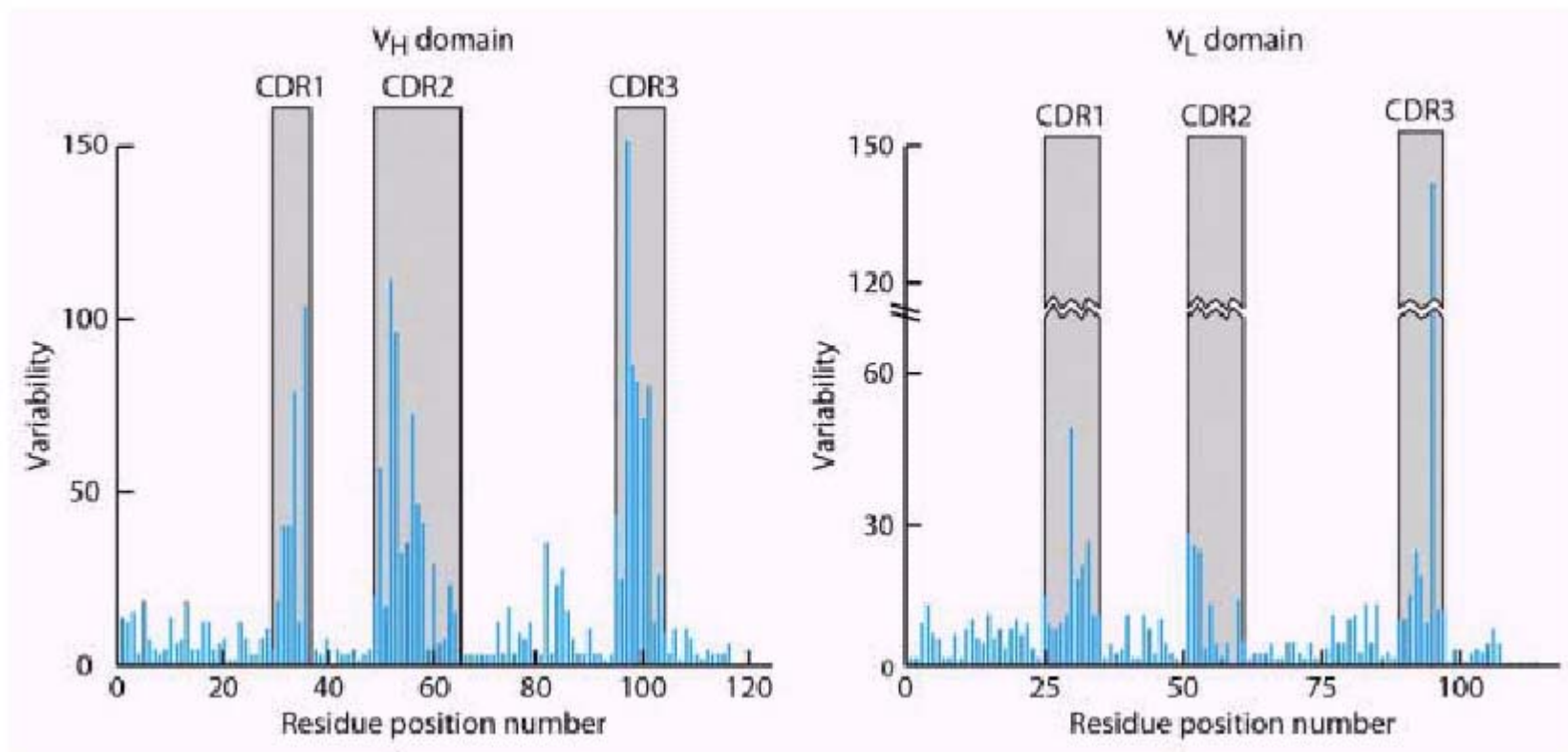
2. Σωματικός ανασυνδυασμός – Αναδιάταξη γονιδίων

3. Μεταβλητός ανασυνδυασμός (Junctional diversity)

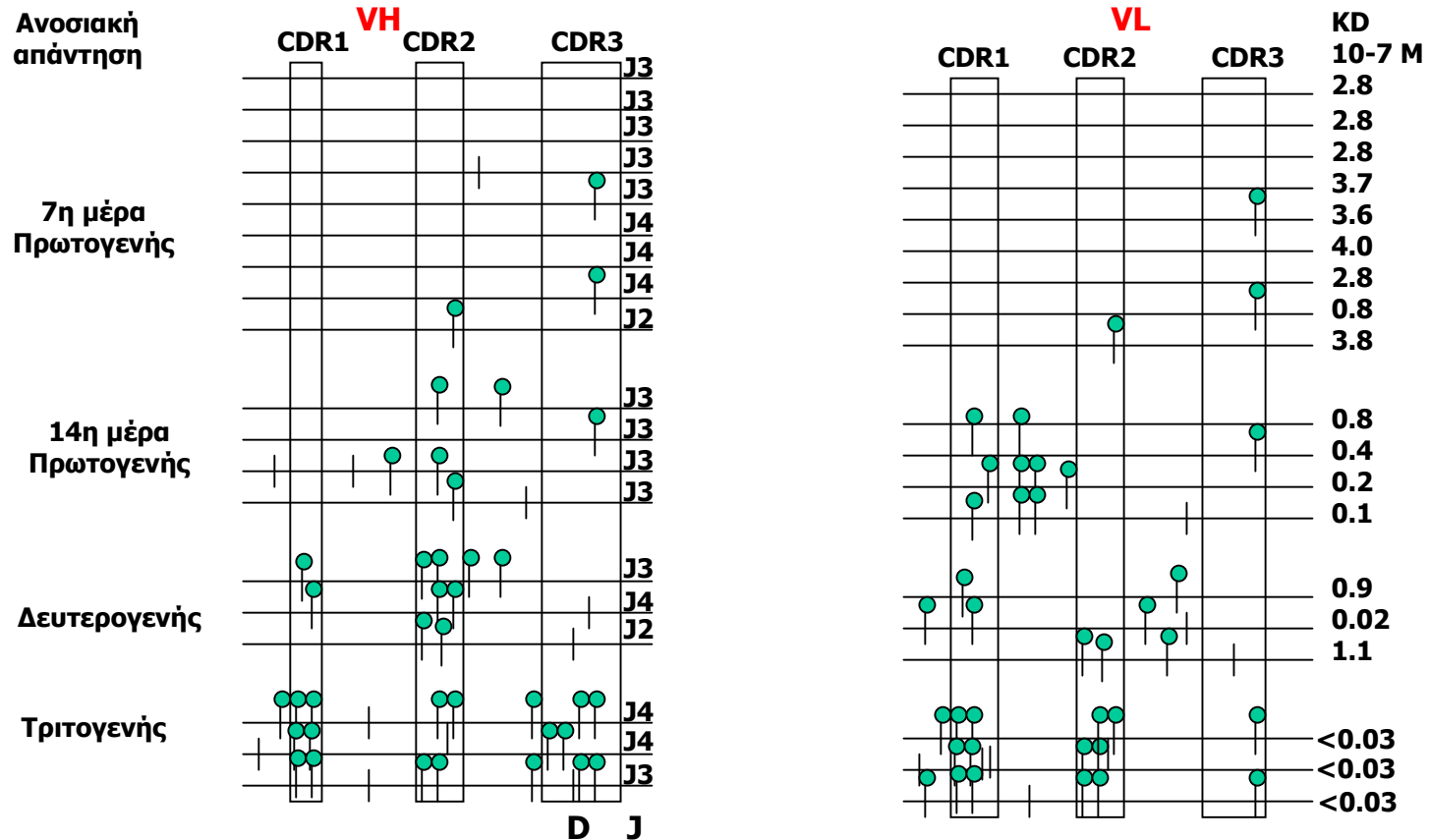
4. Προσθήκη N-νουκλεοτιδικής περιοχής

5. Σωματικές μεταλλαγές (Somatic mutations)

Σωματικές μεταλλαγές στα V γονίδια των ανοσοσφαιρινών (Somatic mutations)



Σωματικές μεταλλάξεις στα V γονίδια των ανοσοσφαιρινών (Somatic mutations)



| Διαφορετικό νουκλεοτίδιο
● Μεταλλαγή που οδηγεί σε διαφορετικό αμινοξύ

Μεταλλάξεις:

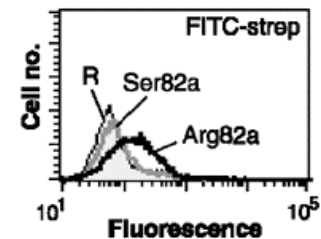
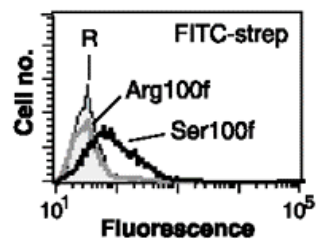
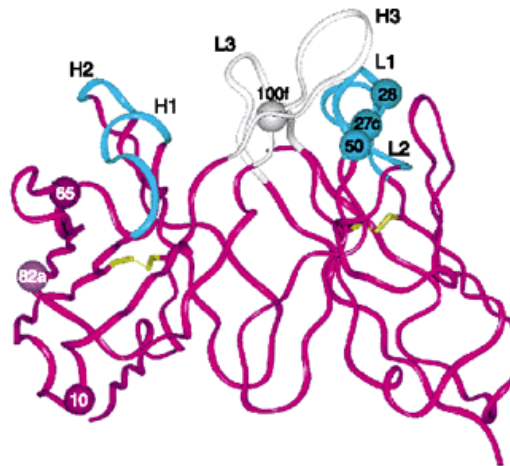
- Σε όλες τις βάσεις
- Μεταλλαγή μετάπτωσης (transition): $P_u \rightarrow P_u, P_y \rightarrow P_y$ ($A \leftrightarrow G, C \leftrightarrow T$)
- Μεταλλαγή μετατροπής (transversion): $P_u \rightarrow P_y, P_y \rightarrow P_u$
- Ενθέσεις
- Ελλείψεις

Heavy chain

		10	18	60	65	82a	100f					
S0	//	QWGAGLLK	PSETLS	//	NYNPSL	KSRV	//	LKLSS	//	GTDGRY	GMD	//
S4,6	//	//	//	//	S	//
S12	//	//	H	//	//	S	//
S13	//	//	H	//	R	//	S	//
S15	//	//	H	R	//	R	//	S	//
S16	//	//	R	//	R	//	S	//
S19	//	R	M	//	R	//	R	//	S	//
		----- CDR2 -----					----- CDR3 -----					

Light chain

			27c	28		50					
S0	//	SGSPGQS	ITISCT	GTSSD	VGGY	NVSW	//	LMIYD	VSNR	PSGI	//
S4	//	FC	//	//
S6,12,13	//	FC	//	A	//
S15,16,19	//	//	//
		----- CDR1 -----					----- CDR2 -----				



ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ (ΡΕΠΕΡΤΟΡΙΟ Β ΚΥΤΤΑΡΩΝ)

1. Οργάνωση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών

2. Σωματικός ανασυνδυασμός – Αναδιάταξη γονιδίων

3. Μεταβλητός ανασυνδυασμός (Junctional diversity)

4. Προσθήκη N-νουκλεοτιδικής περιοχής

5. Σωματικές μεταλλάξεις (Somatic mutations)

6. Συνδυασμός αλυσίδων

ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ ΑΛΥΣΙΔΩΝ

Π.χ. Εαν υπάρχουν

10^4 διαφορετικές ελαφριές αλυσίδες και

10^4 διαφορετικές βαριές αλυσίδες

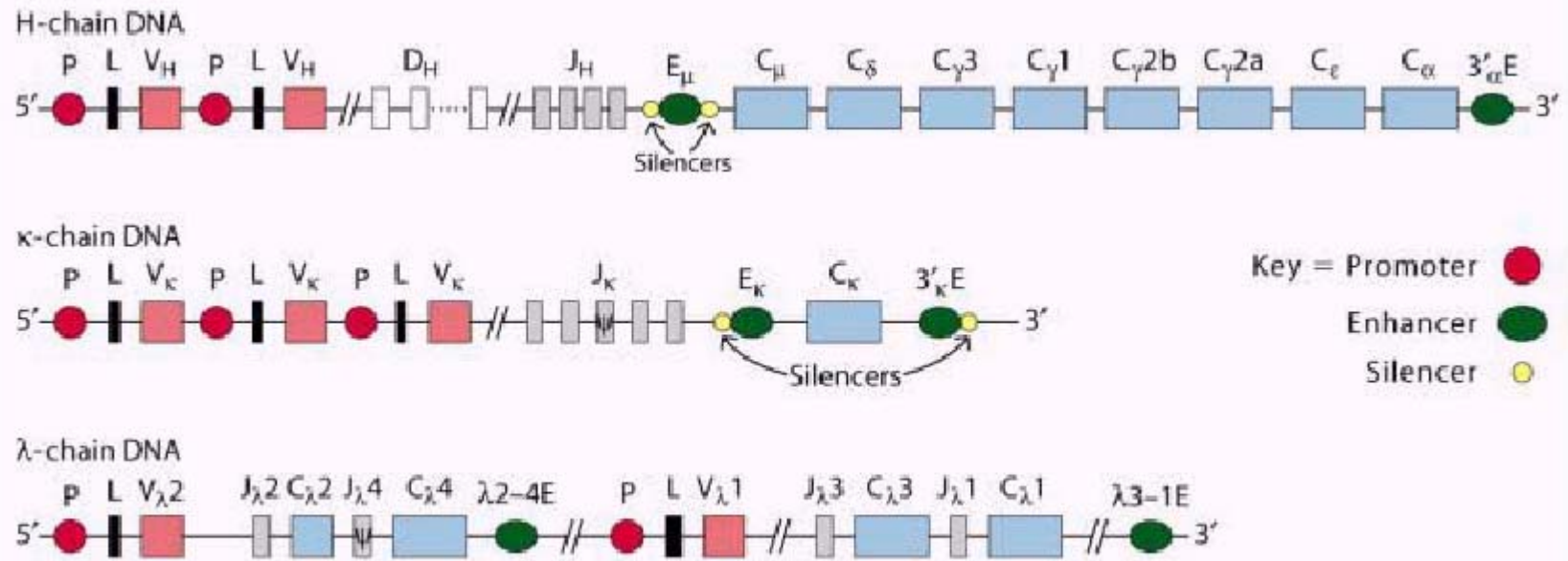
μπορούν να παραχθούν θεωρητικά 10^8 διαφορετικά αντισώματα

ΡΕΠΕΡΤΟΡΙΟ Β ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Στο ποντίκι

Μηχανισμός ποικιλότητας	Βαριά αλυσίδα	Ελαφριά αλυσίδα	
		κ	λ
Αριθμός γονιδιακών τμημάτων			
1. Πολλαπλά γονιδιακά τμήματα			
V	300-1000	300	2
D	13	0	0
J	4	4	4
Πιθανός αριθμός ανασυνδυασμών			
2. Αναδιάταξη V-J και V-D-J	$300 \times 13 \times 4 = 1.6 \times 10^4$	$300 \times 4 = 1.2 \times 10^3$	$2 \times 3 = 6$
3. Μεταβλητός ανασυνδυασμός	+	+	+
4. Προσθήκη N νουκλεοτιδίων	+	-	-
5. Σωματική μεταλλαγή	+	+	+
6. Συνδυαστική σύνδεση	$>1.6 \times 10^4 \times (>1.2 \times 10^3 + >6) \Rightarrow >1.9 \times 10^7$		

Locations of promoters, enhancers, & silencers in mouse heavy chain, κ chain and λ light chain germline DNA.



Variable gene rearrangement moves an enhancer close enough to a promoter to activate transcription from the promoter.

Hence, DNA rearrangement greatly accelerates immunoglobulin gene transcription

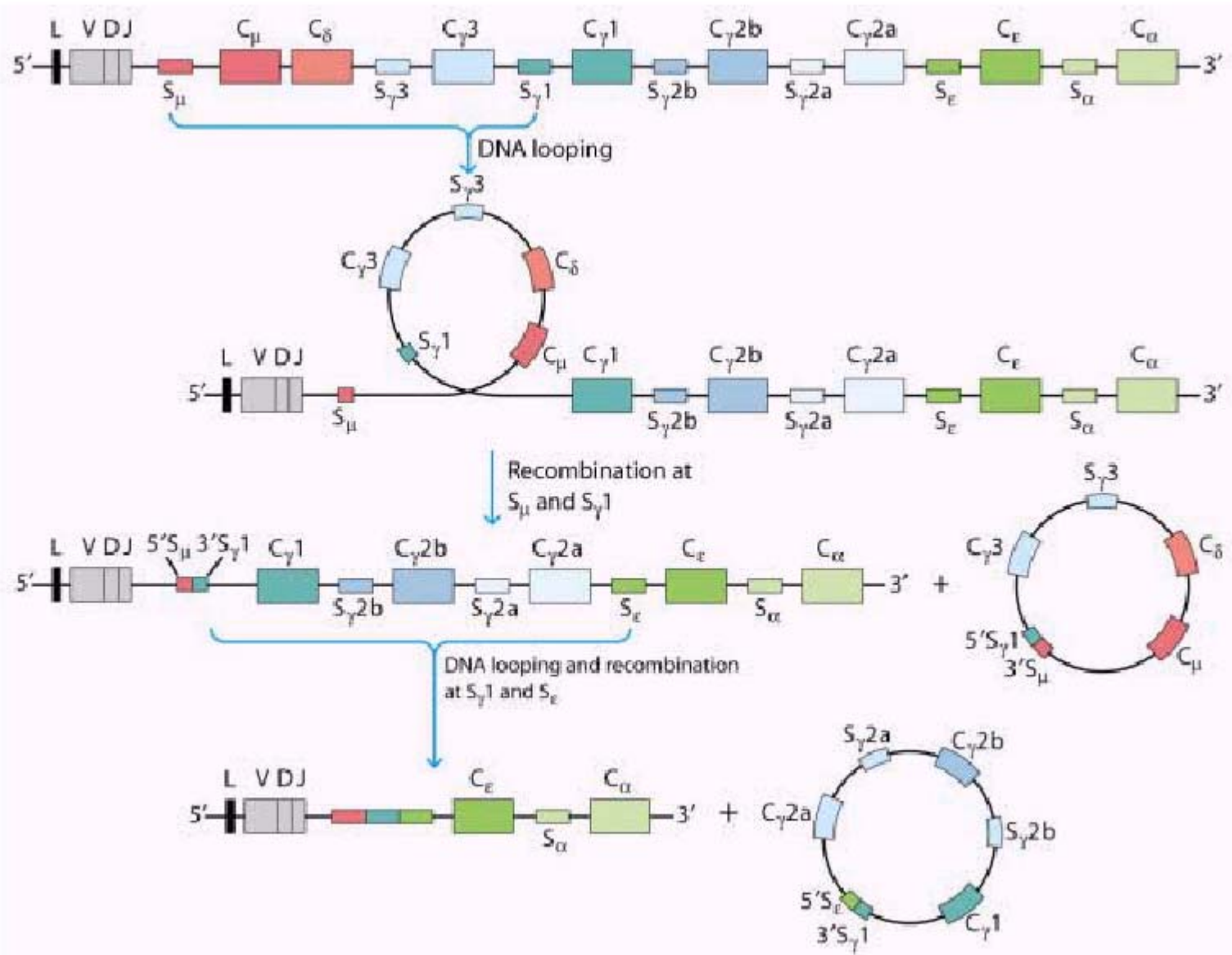
Transcription factors that are important for immunoglobulin gene expression

Oct 2 B-cell specific transcription factor

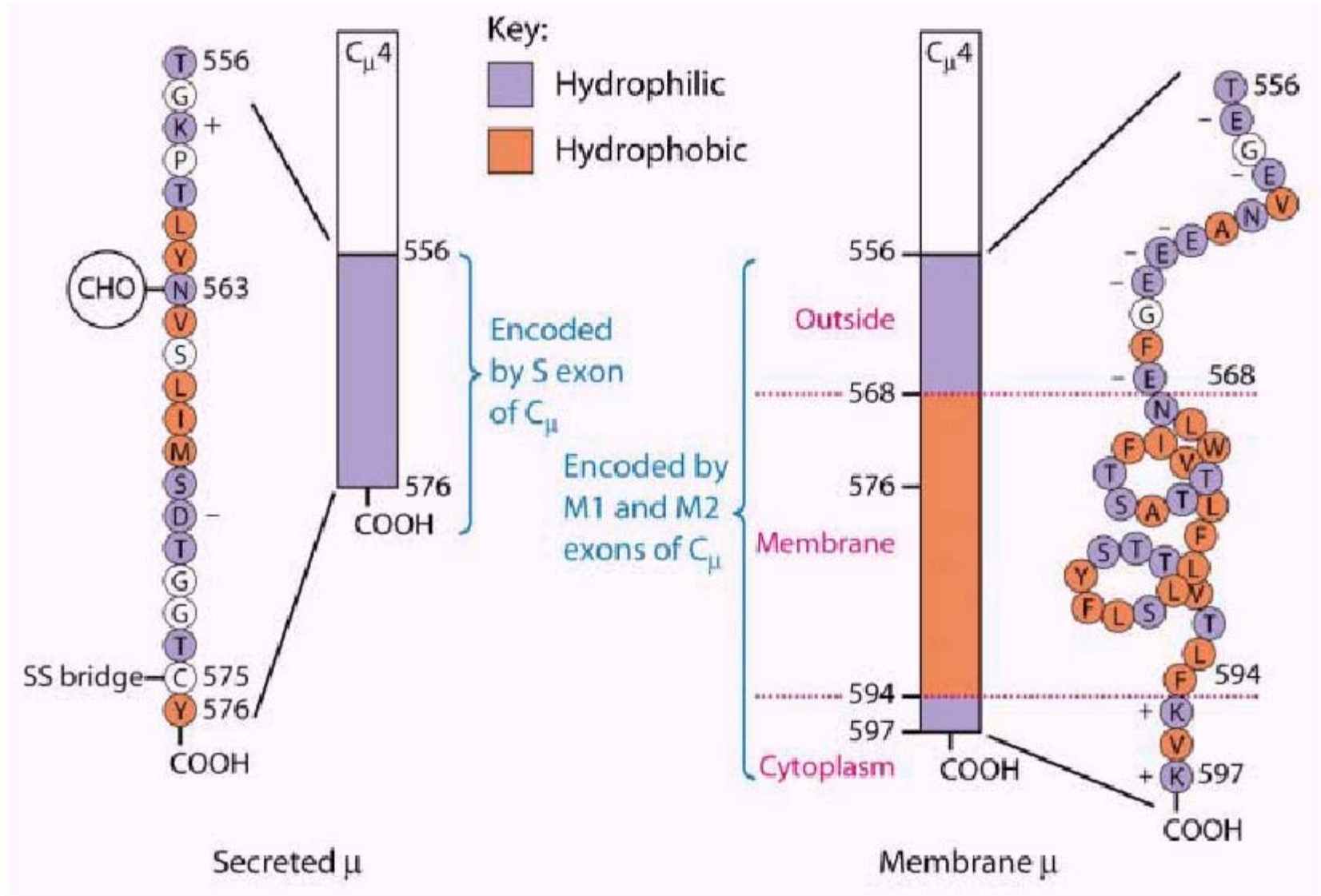
E2A alternatively spliced to give rise to two collaborating proteins. E2A proteins are essential for B-cell development. No B cells in E2A knock-out mice.

Expression of E2A in a T-cell line results in a dramatic increase in the transcription of μ chain mRNA and induction of T cells to undergo DHJH joining.

Proposed mechanism for class switching induced by IL-4 in rearranged immunoglobulin heavy chain genes

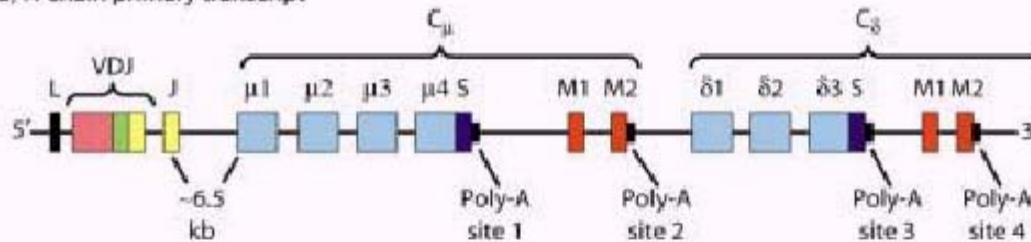


Expression of membrane & secreted forms of immunoglobulin heavy chain

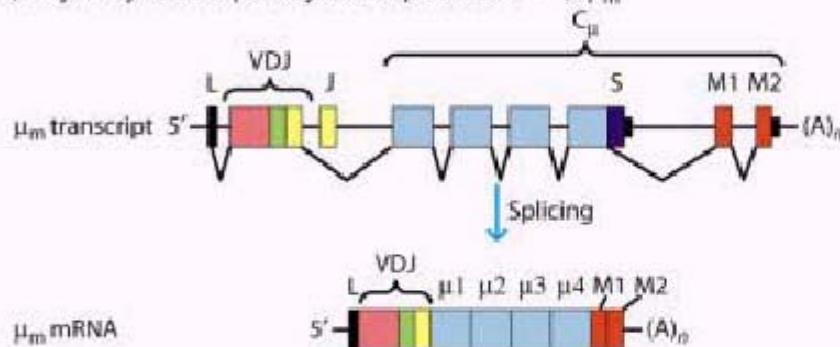


Alternative splicing regulates production of membrane-bound versus secreted μ heavy chain

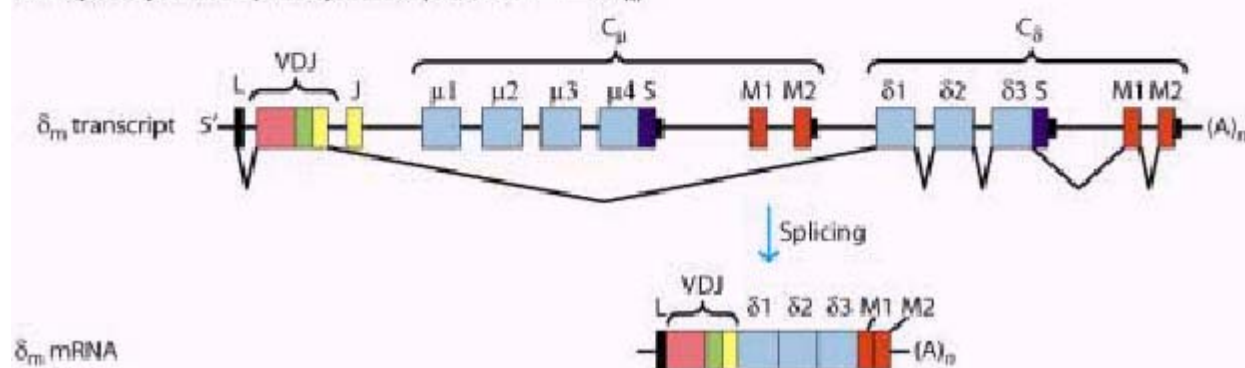
(a) H-chain primary transcript



(b) Polyadenylation of primary transcript at site 2 $\rightarrow \mu_m$

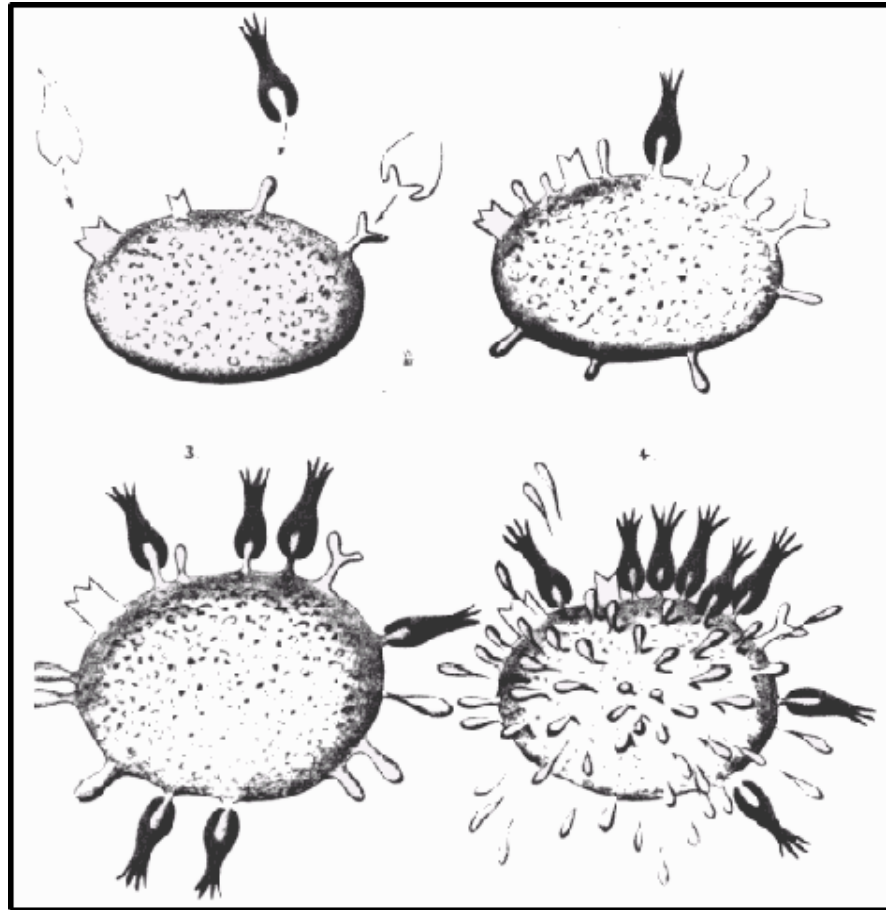


(c) Polyadenylation of primary transcript at site 4 $\rightarrow \delta_m$



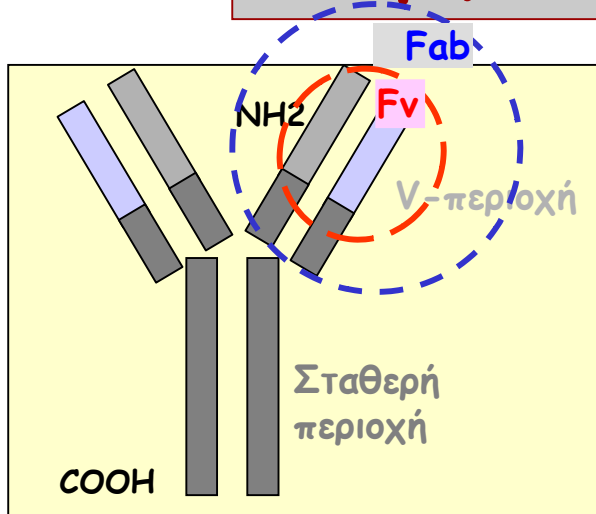


“Μαγικές σφαίρες” = αντισώματα

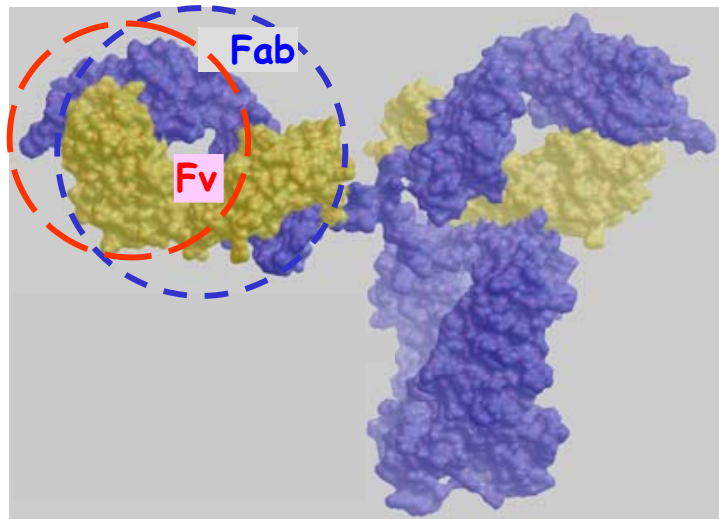
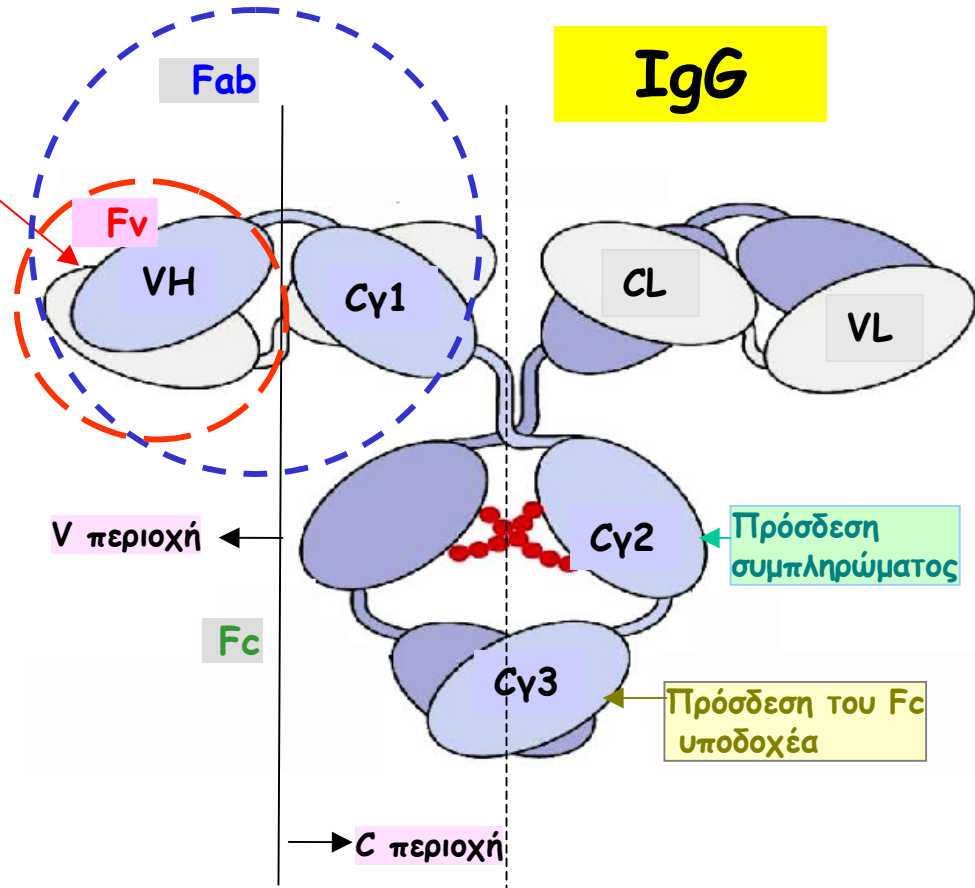


Ο Paul Ehrlich, στις αρχές του προηγούμενου αιώνα, διέτυπωσε τη θεωρία των υποδοχέων (σήμερα γνωστοί ως αντισώματα) που εκκρίνονται από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ως απάντηση σ' ένα ξένο αντιγόνο.

Δομή και λειτουργία των ανοσοσφαιρινών

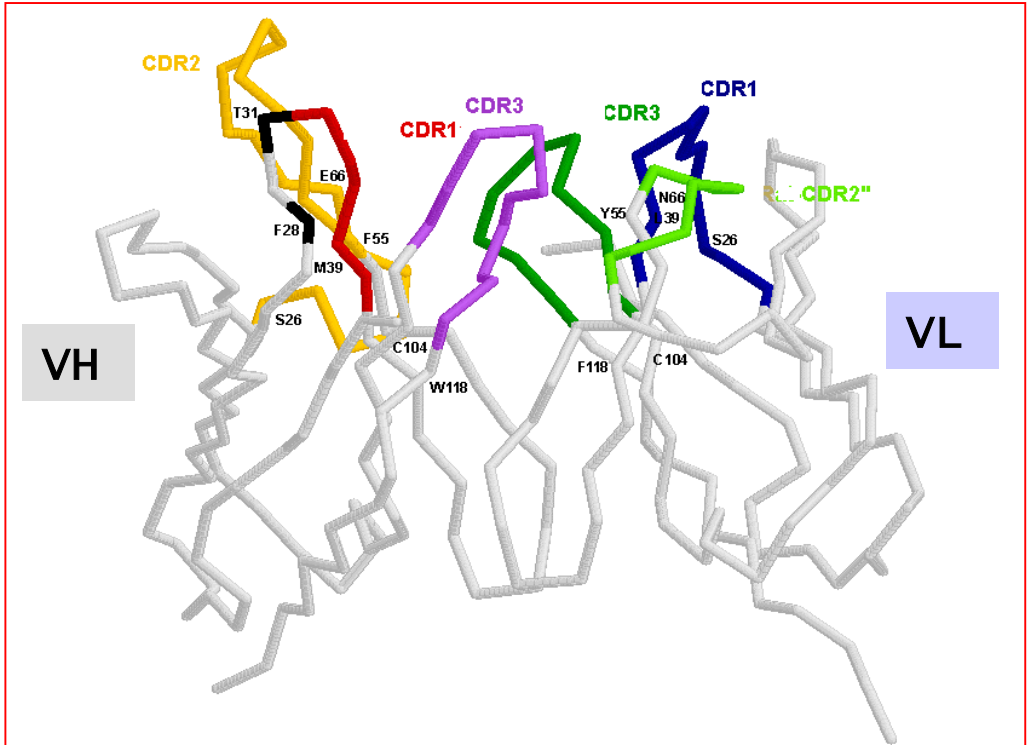
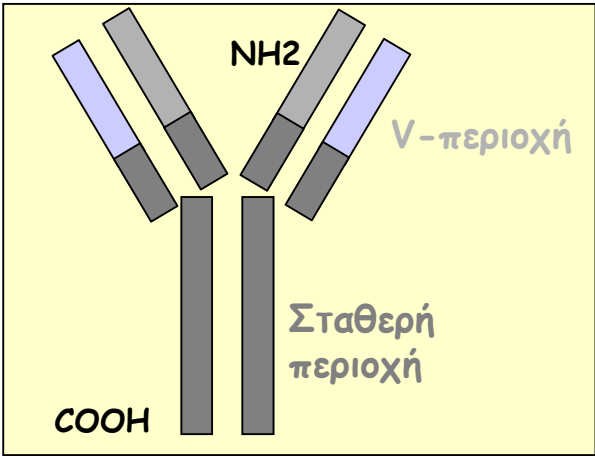


Πρόσδεση αντιγόνου





Δομή V περιοχών των ανοσοσφαιρινών

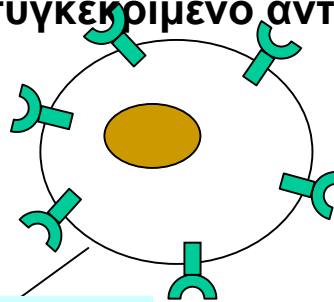
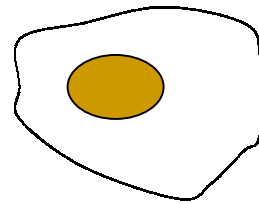


Μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs)

1975: Köhler και Milstein – τεχνολογία μονοκλωνικών αντισωμάτων

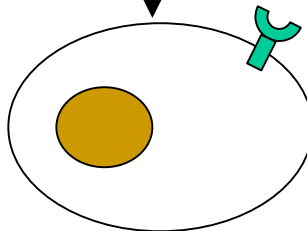
(μία κυτταρική σειρά μπορεί να εκκρίνει αντισώματα μιάς ειδικότητας, δηλαδή να αναγνωρίζει ένα συγκεκριμένο αντιγόνο)

Το νεοπλασματικό κύτταρο διαιρείται επ' άπειρον αλλά δεν παράγει mAbs

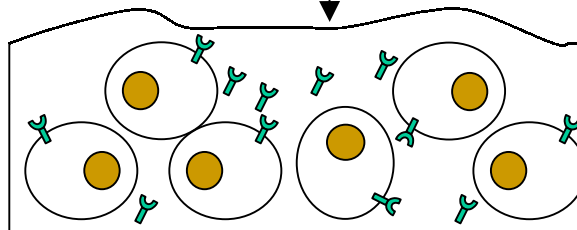


ΣΥΝΤΗΞΗ ΔΥΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Το B-λεμφοκύτταρο ενός ζώου το οποίο έχει ανοσοποιηθεί με ένα αντιγόνο παράγει το ειδικό αντίσωμα, αλλά δεν διαιρείται επ' άπειρον.



Το υβριδικό κύτταρο παράγει ειδικό αντίσωμα και διαιρείται επ' άπειρον.





Χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων

Βιομηχανία: Μαζική παραγωγή αντισωμάτων

Έρευνα: **Λειτουργική ανάλυση μορίων** (βιοχημική και μικροσκοπική ανίχνευση και απομόνωση, διερεύνηση λειτουργίας)

Αναγνώριση μεμβρανικών δεικτών (χαρακτηρισμός συγκεκριμένων κυττάρων κλπ)

Διαγνωστική και Θεραπευτική Ιατρική:

Ανοσοδιάγνωση (λοιμωδών ή συστηματικών νοσημάτων με προσδιορισμό ειδικών αντιγόνων ή αντισωμάτων, διαγνωστική απεικόνιση όγκων, κλπ)

Ανοσοθεραπεία (θεραπεία όγκων, μεταμόσχευση οργάνων, εμβόλια κλπ)



Προβλήματα από τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων στην ιατρική

- Ευαισθητοποίηση του οργανισμού μετά την *in vivo* χορήγηση ξενογενών μονοκλωνικών αντισωμάτων
- Δυσκολία δημιουργίας φυσικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του αντισώματος και του αντιγόνου στόχου
- Αλλαγή στη δομή του αντιγόνου
- Χαμηλή συγγένεια
- Μη ικανοποιητικός ισότυπος
- Μη ικανοποιητικός χρόνος ημιζωής
- Μικρή παραγωγή
- Υψηλό οικονομικό κόστος

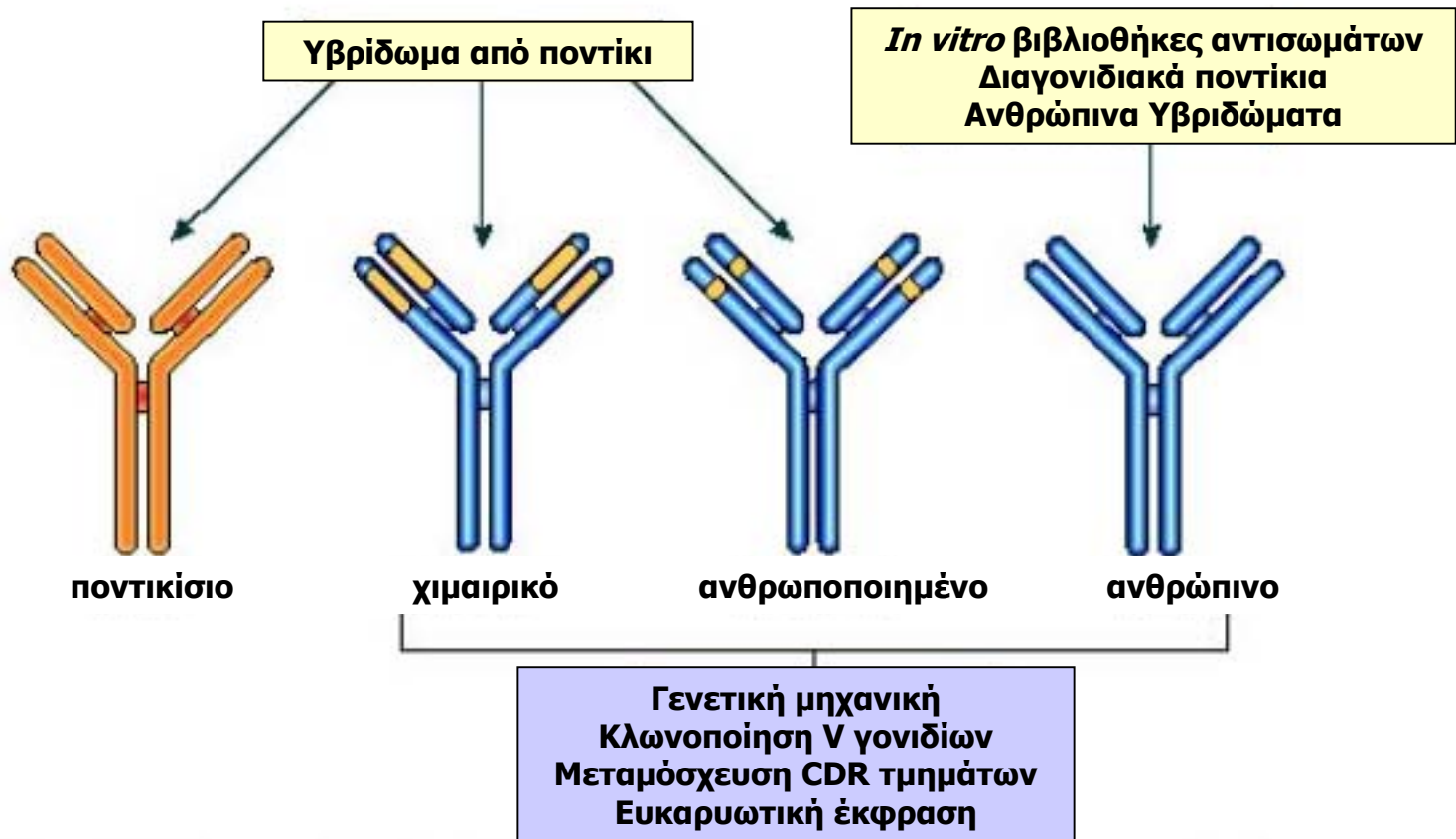


Ανάγκη κατασκευής ανασυνδυασμένων αντισωμάτων ή τμημάτων αντισωμάτων

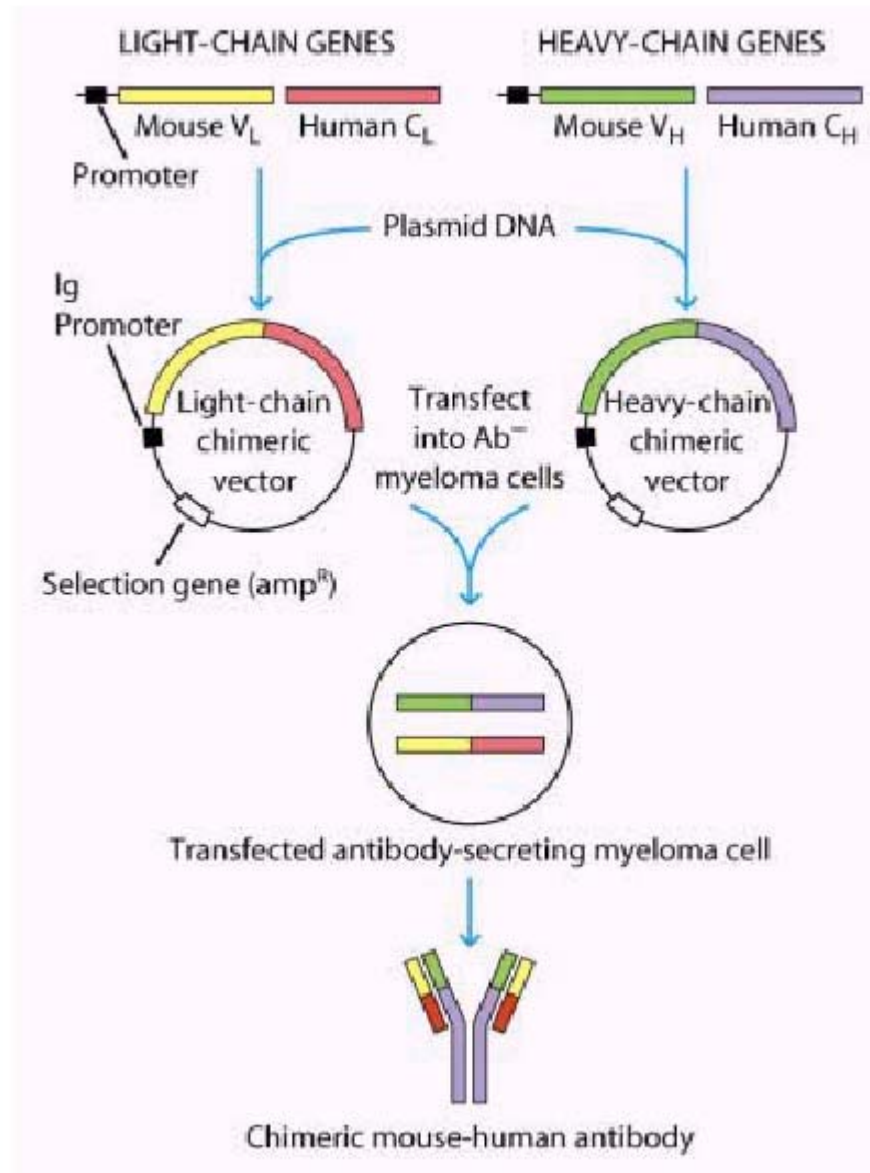
ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

- Κατασκευή **ανοσοσυμβατών** αντισωμάτων
- Αλλαγή **χρόνου ημιζωής**
- Αλλαγή **ισοτύπου**
- **Αύξηση συγγένειας** και ειδικότητας
- Κατασκευή αντισωμάτων με **δύο ειδικότητες**
- Κατασκευή μορίων που έχουν και **άλλες ιδιότητες**
- Αλλαγή **λειτουργικότητας**
- Εύκολη, γρήγορη, **μαζική παραγωγή**
- Χαμηλότερο οικονομικό **κόστος**

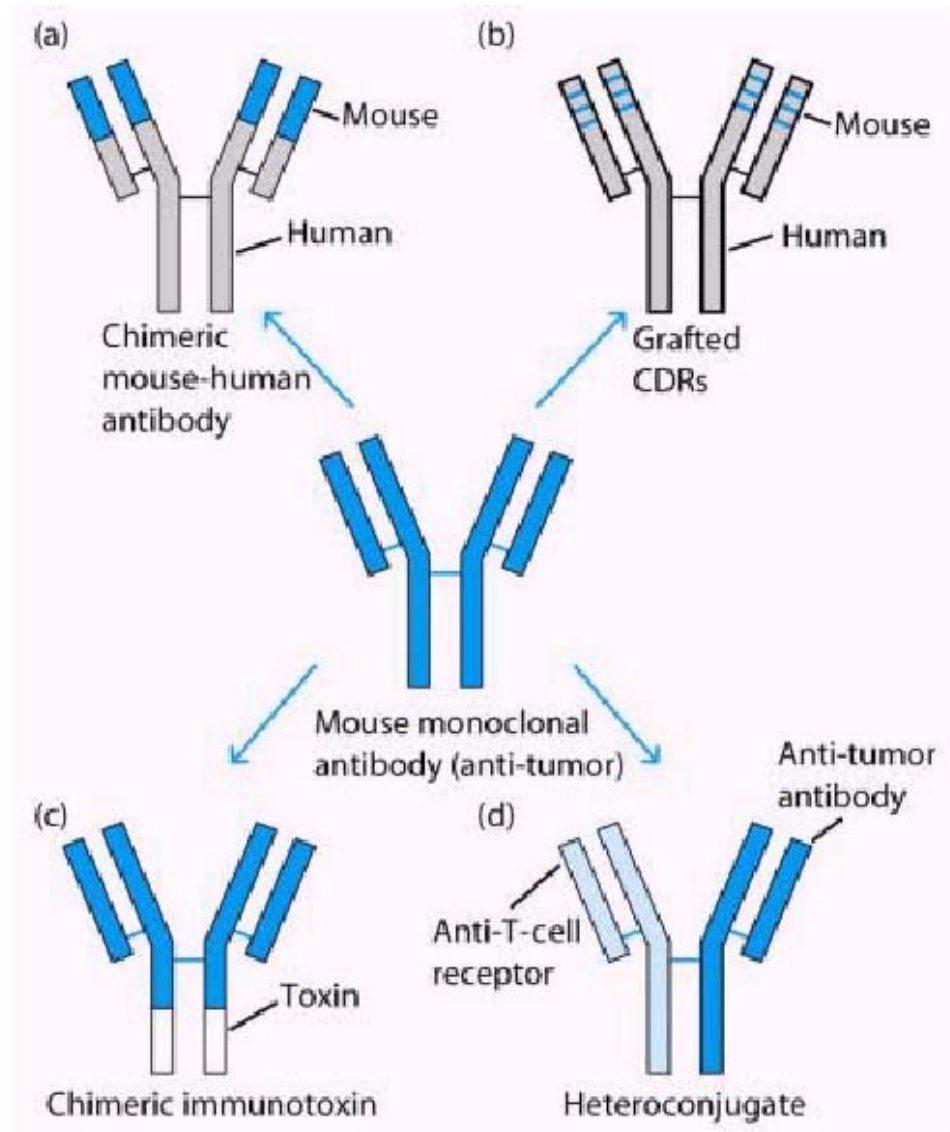
Τροποποιημένα αντισώματα



Κατασκευή χιμαρικών αντισωμάτων

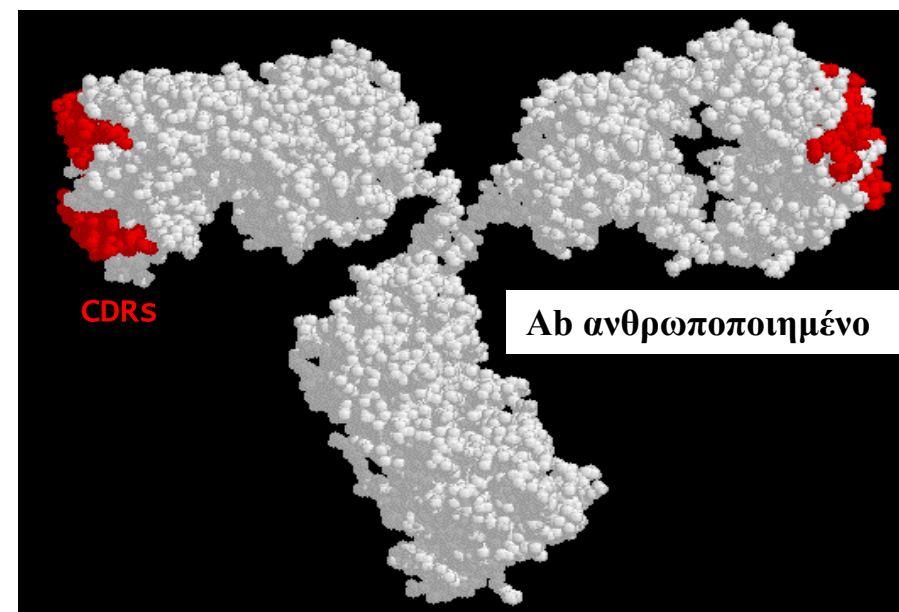
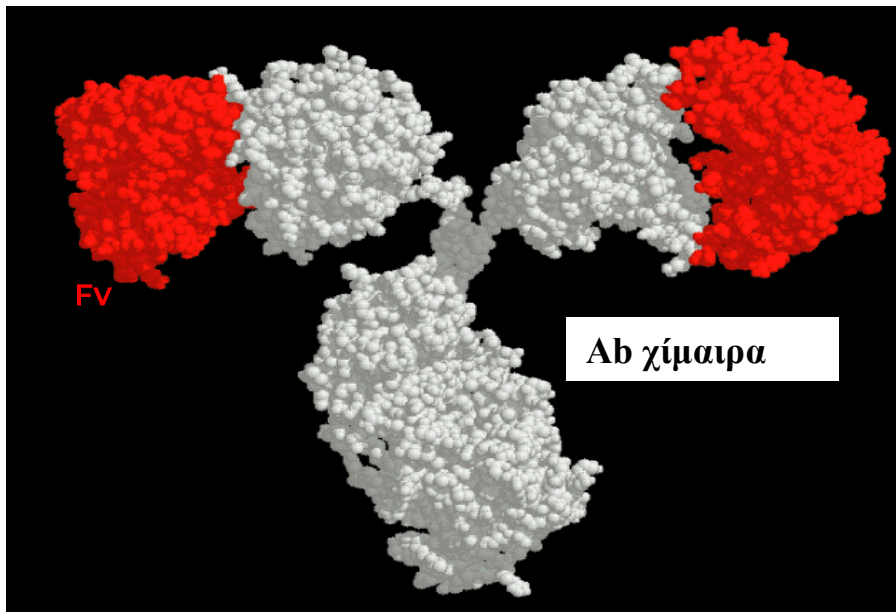
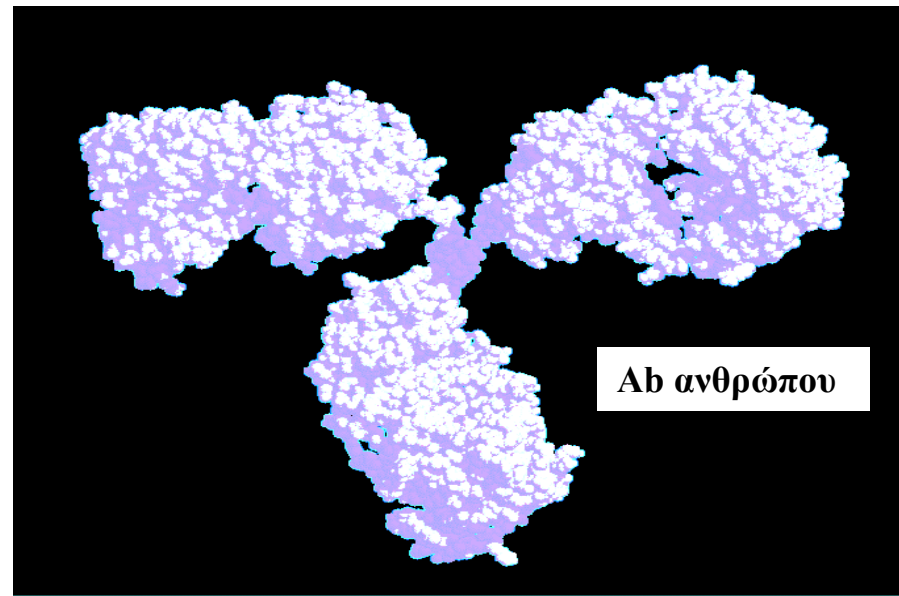
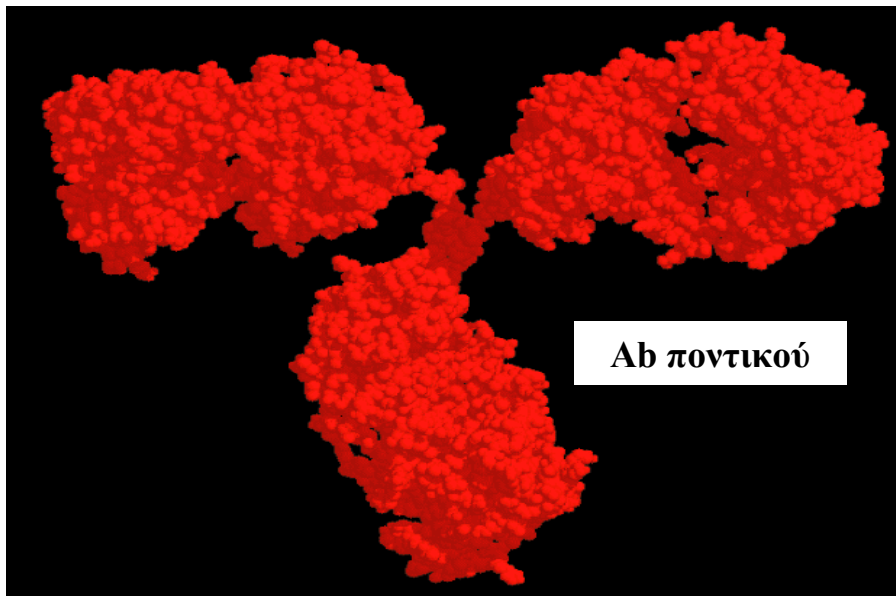


Κατασκευή χιμαιρικών και υβριδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων με τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA



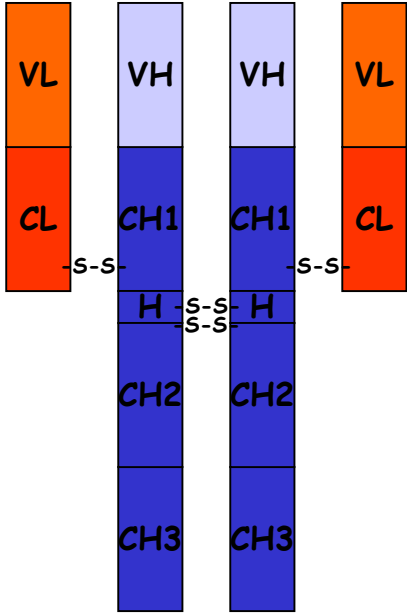


Ανθρωποποιημένα αντισώματα

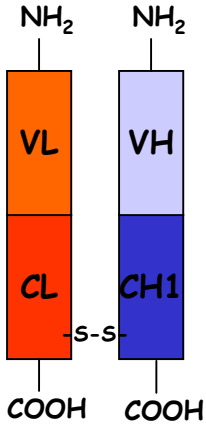




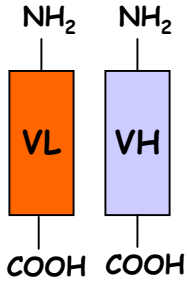
Ανασυνδυασμένα τμήματα αντισωμάτων



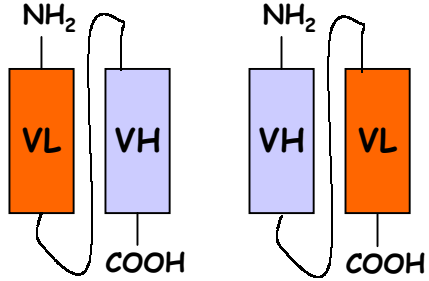
IgG



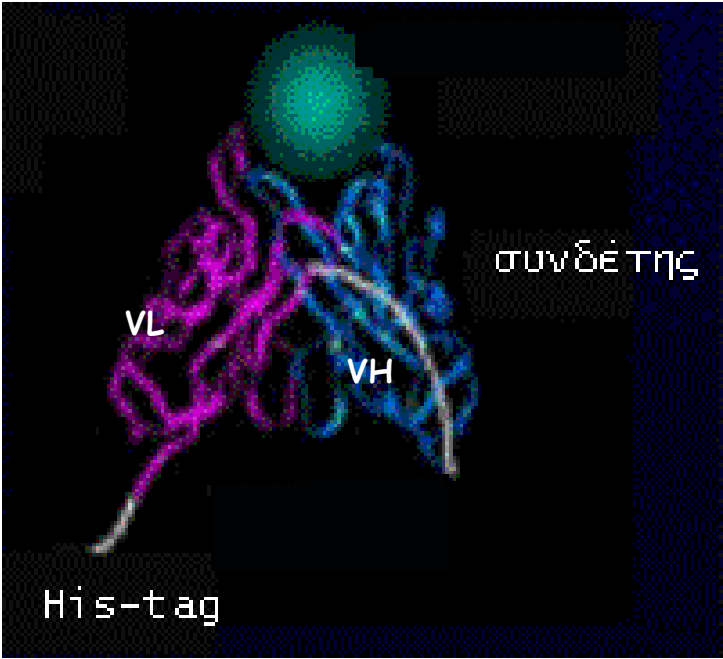
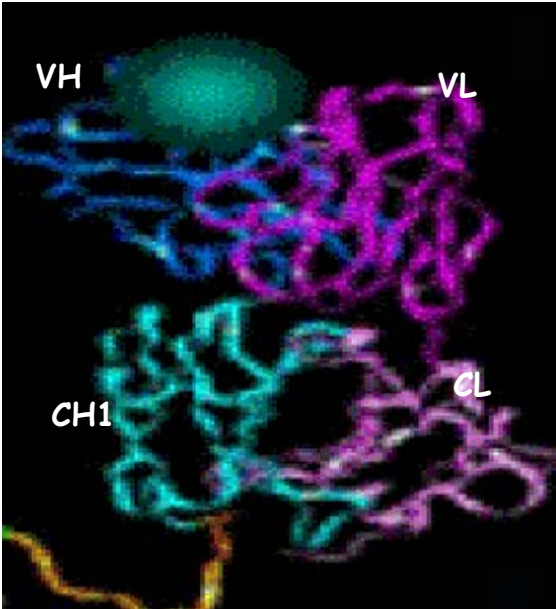
Fab



Fv



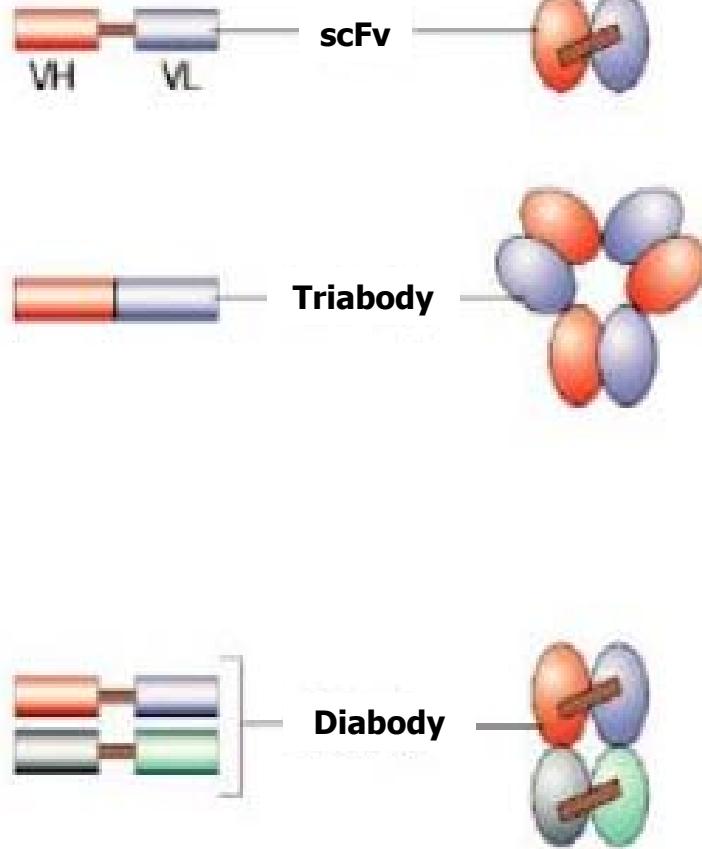
scFv
(single chain Fv)



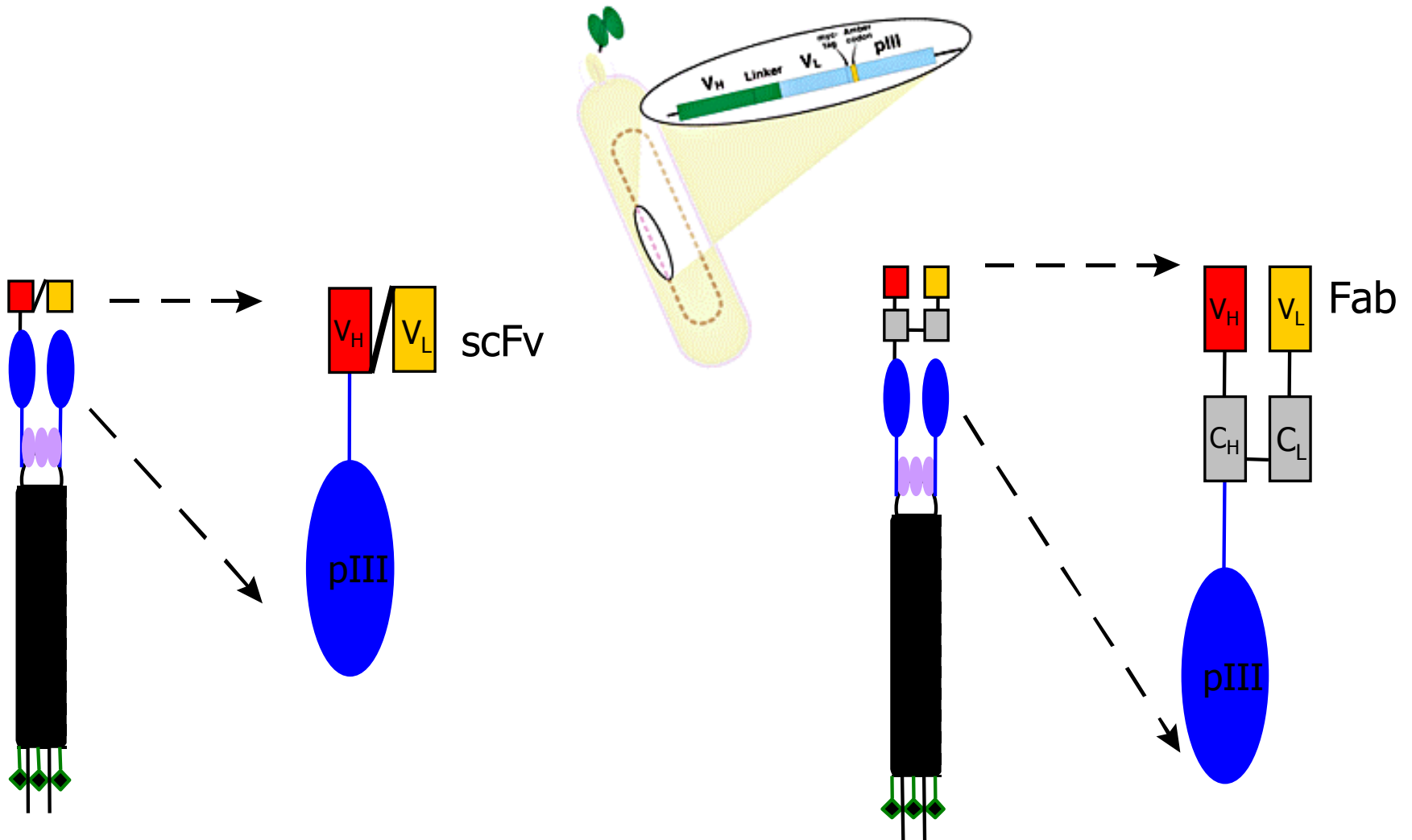
Νεότερες τεχνολογίες Fv τμημάτων

Γονίδια

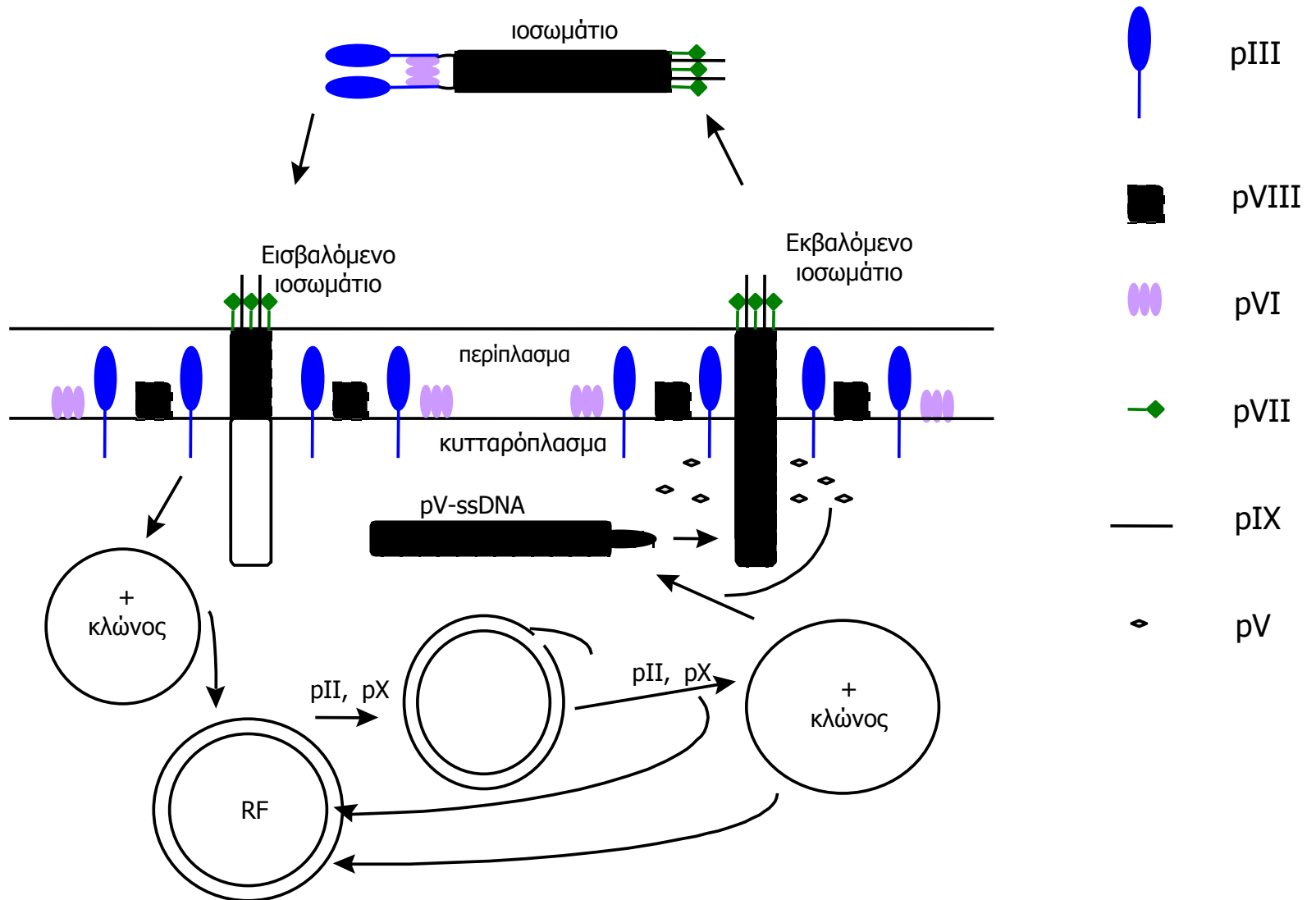
Μορφή



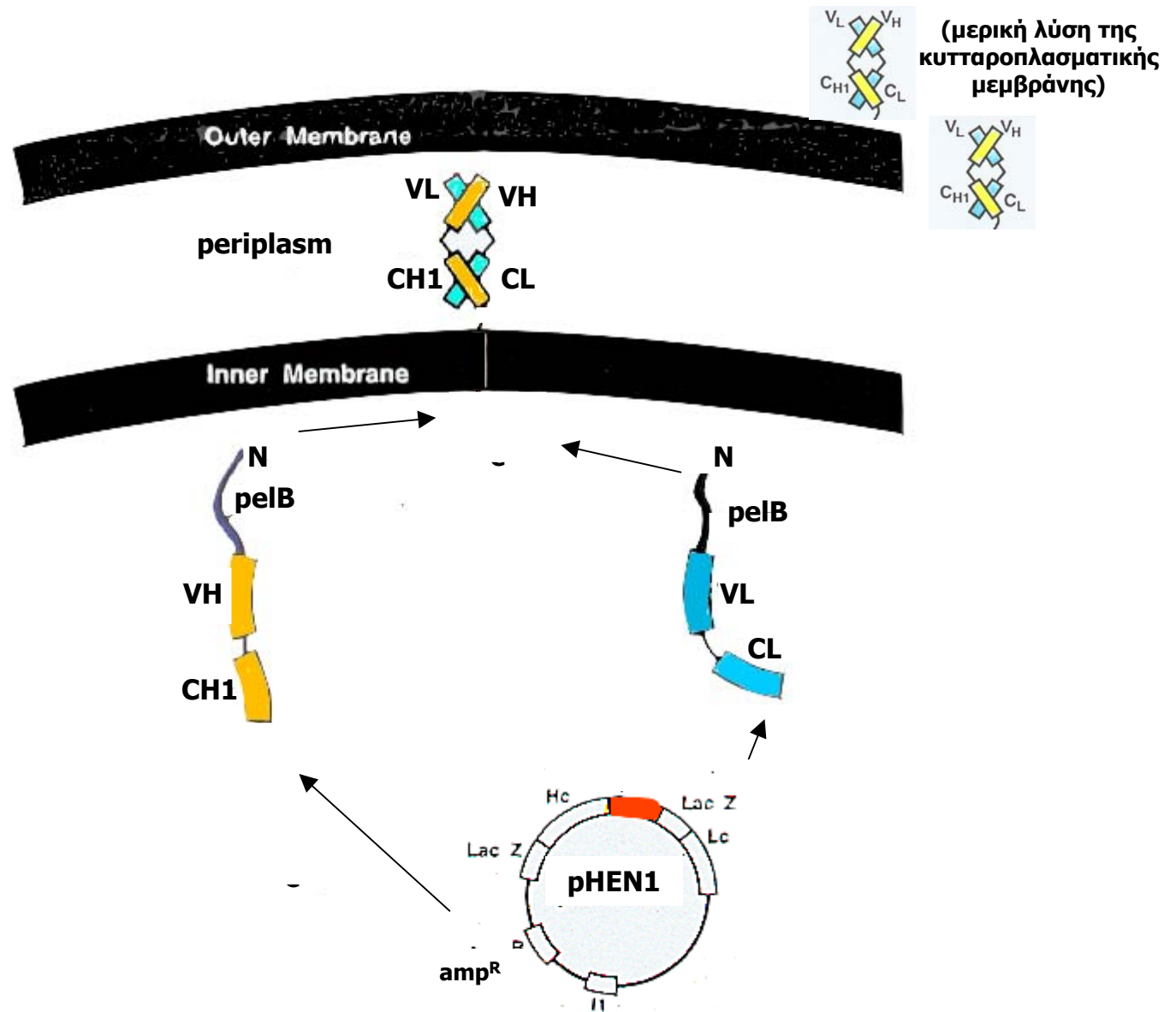
Εκφραση των scFv και Fab τμημάτων των αντισωμάτων στην επιφάνεια νηματοειδών φάγων.



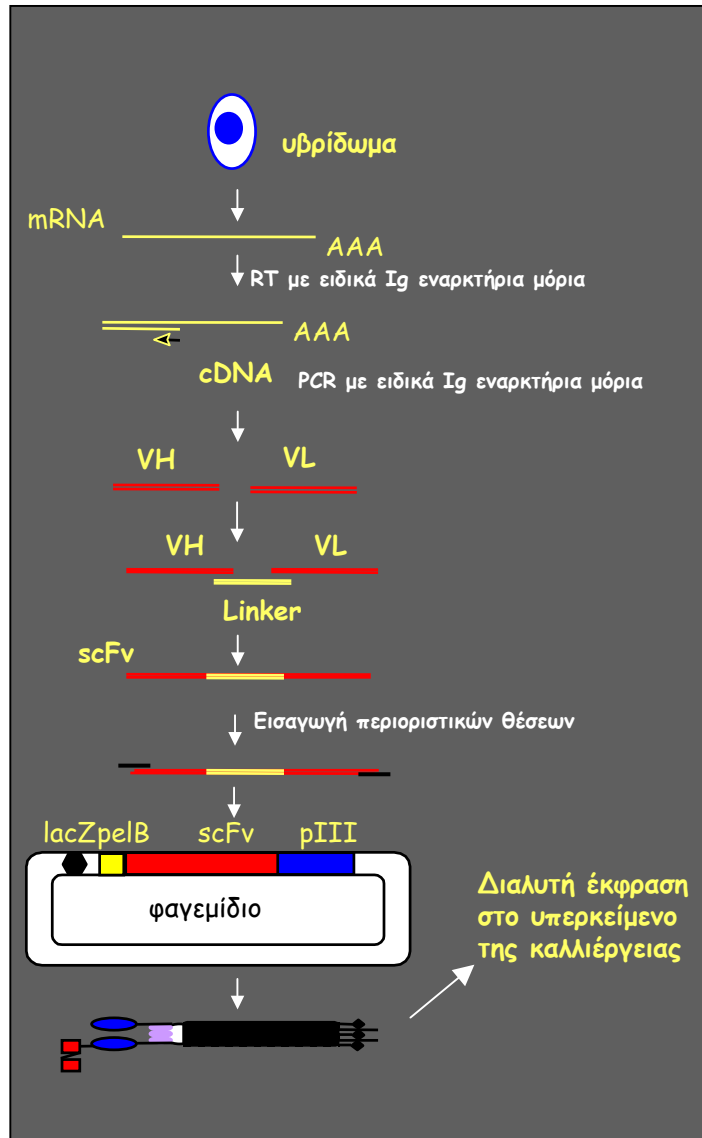
Μολυσματικός κύκλος νηματοειδών φάγων.



Διαλυτή έκφραση τμημάτων αντισώματος σε *E. coli*



Κατασκευή scFv τμήματος του αντισώματος



Κατασκευή Fab βιβλιοθήκης φάγων από Β λεμφοκύτταρα

Β λεμφοκύτταρα

Απομόνωση RNA

Σύνθεση cDNA

RT με ειδικά Ig εναρκτήρια μόρια

Ενζυμική ενίσχυση (PCR)

PCR με ειδικά Ig εναρκτήρια μόρια

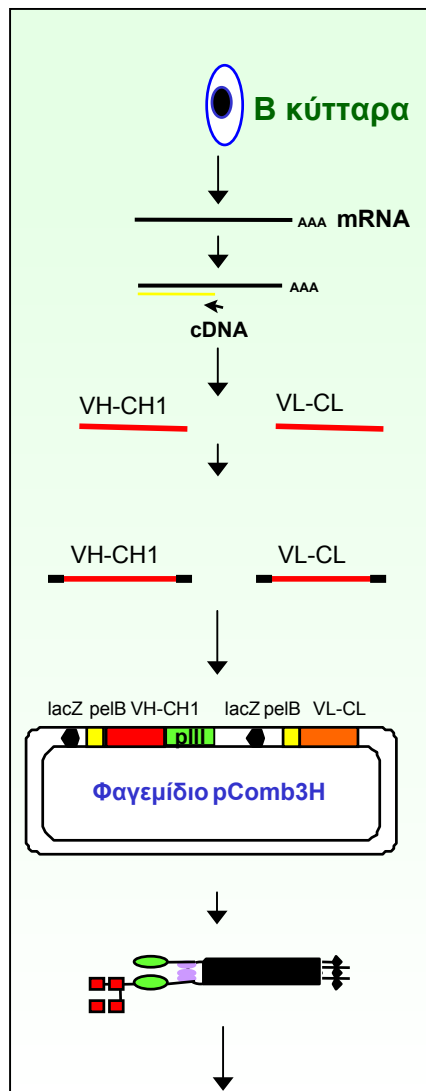
Προσθήκη περιοριστικών θέσεων

Κλωνοποίηση στο φαγεμίδιο
pComb3H

Στάδια PCR: 2

Εναρκτήρια μόρια PCR: 26

Συνδέσεις: 2

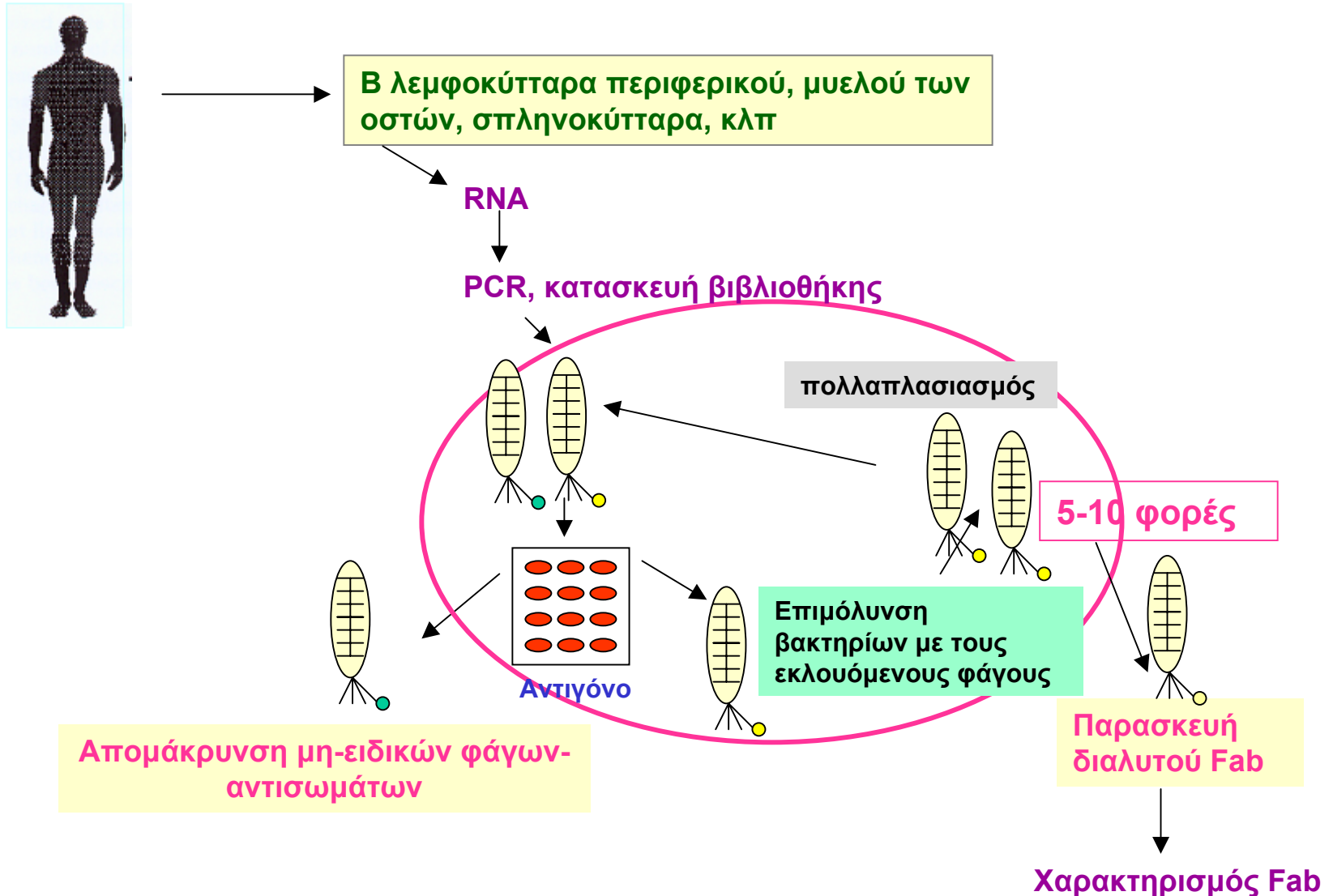


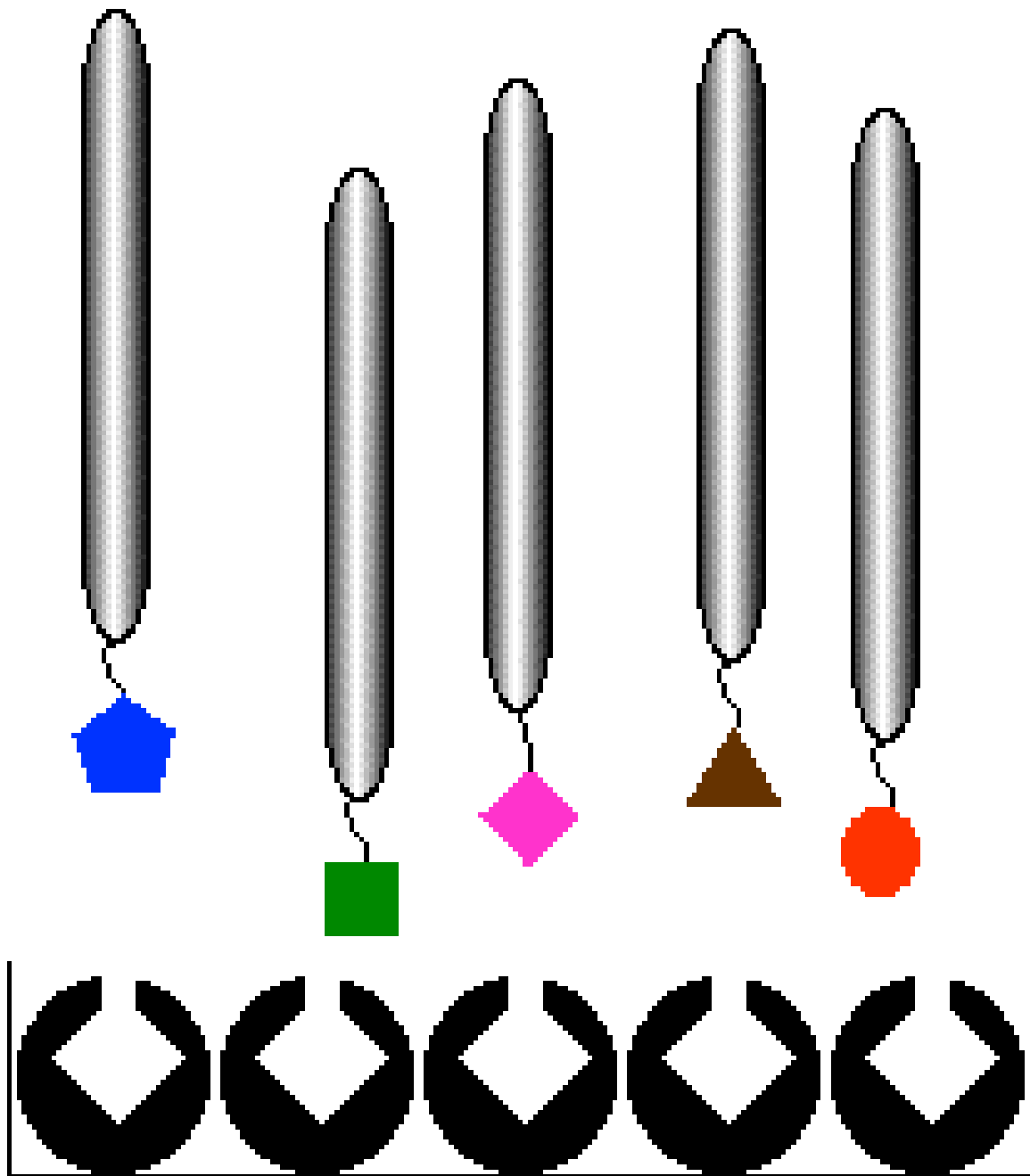
Πολυπλοκότητα βιβλιοθηκών

Βιβλιοθήκη: $1-5 \times 10^7$ cfu/ μ g DNA

Απομόνωση των ειδικών φάγων - αντισωμάτων με "panning"

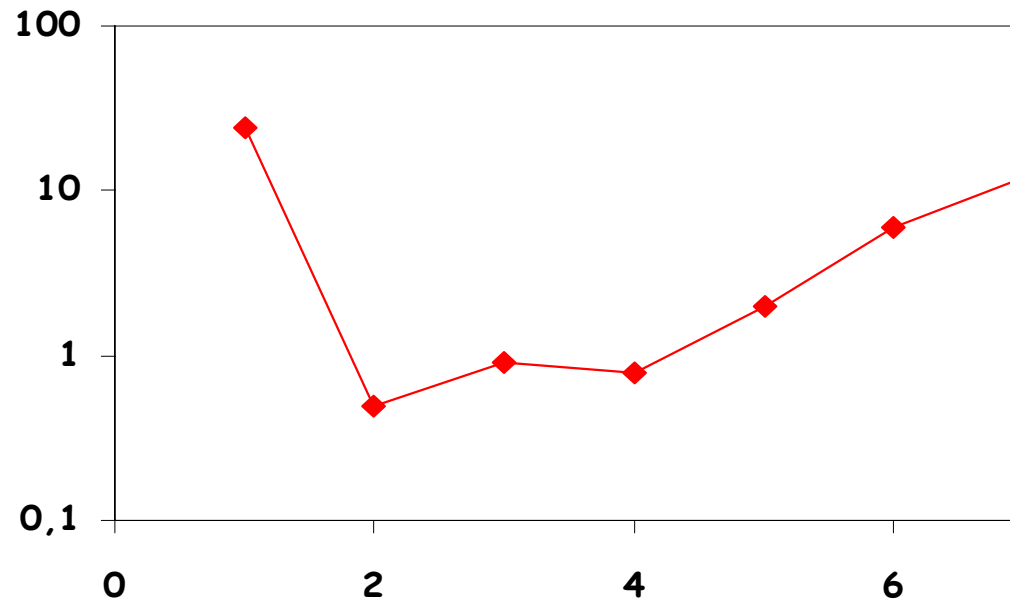
Στρατηγική κλωνοποίησης ανθρώπινων μονοκλωνικών τμημάτων αντισωμάτων από βιβλιοθήκες φάγων-αντισωμάτων





Επιλογή των Fabs (Panning)

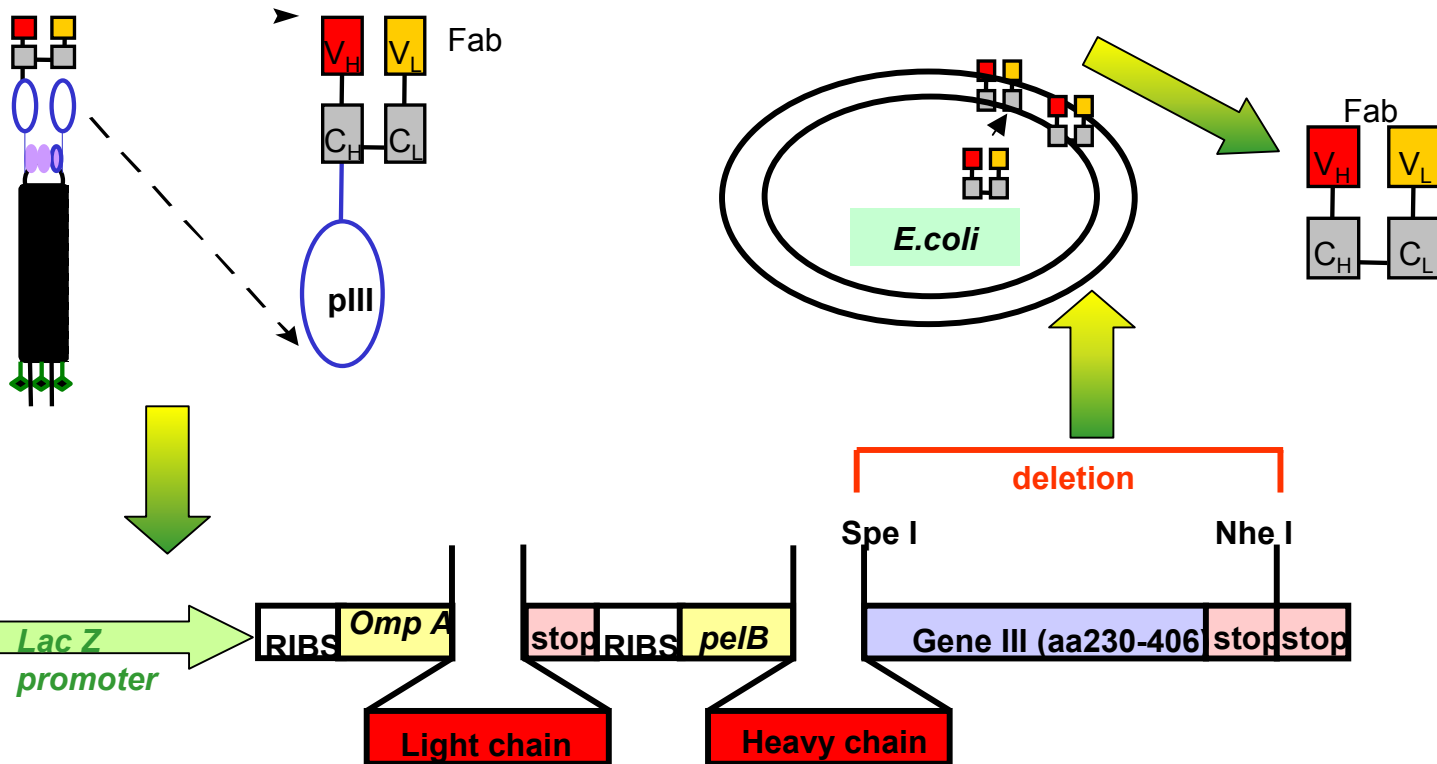
(Εμπλουτισμός φάγων / κύκλο επιλογής)

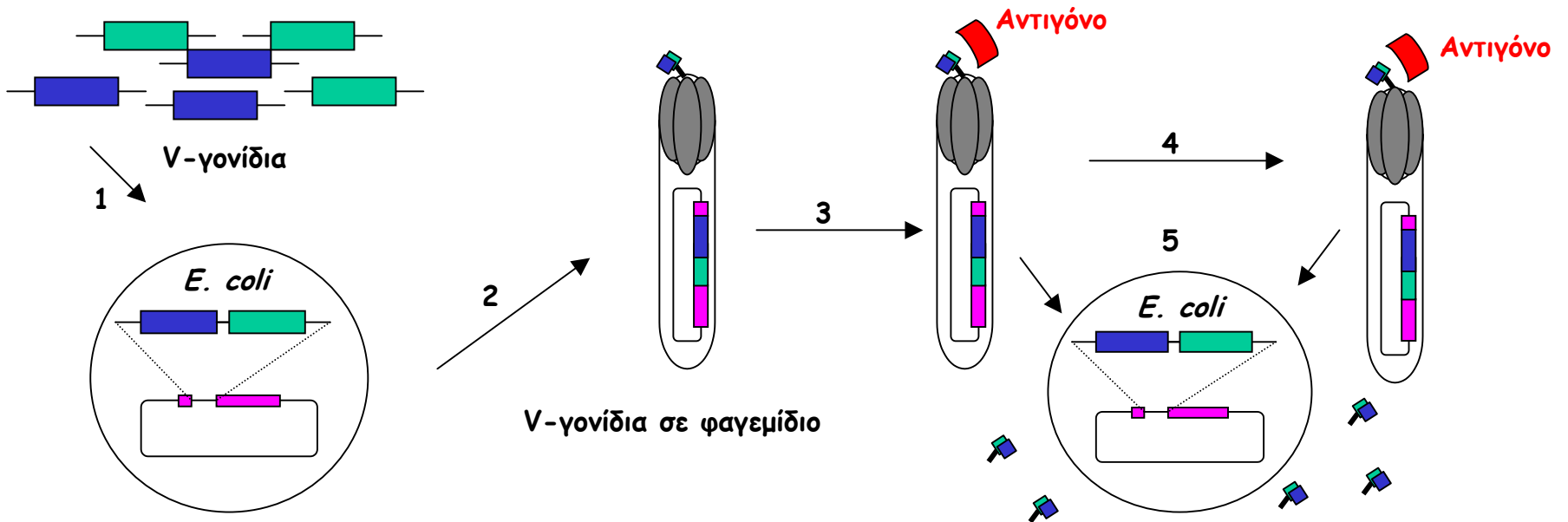
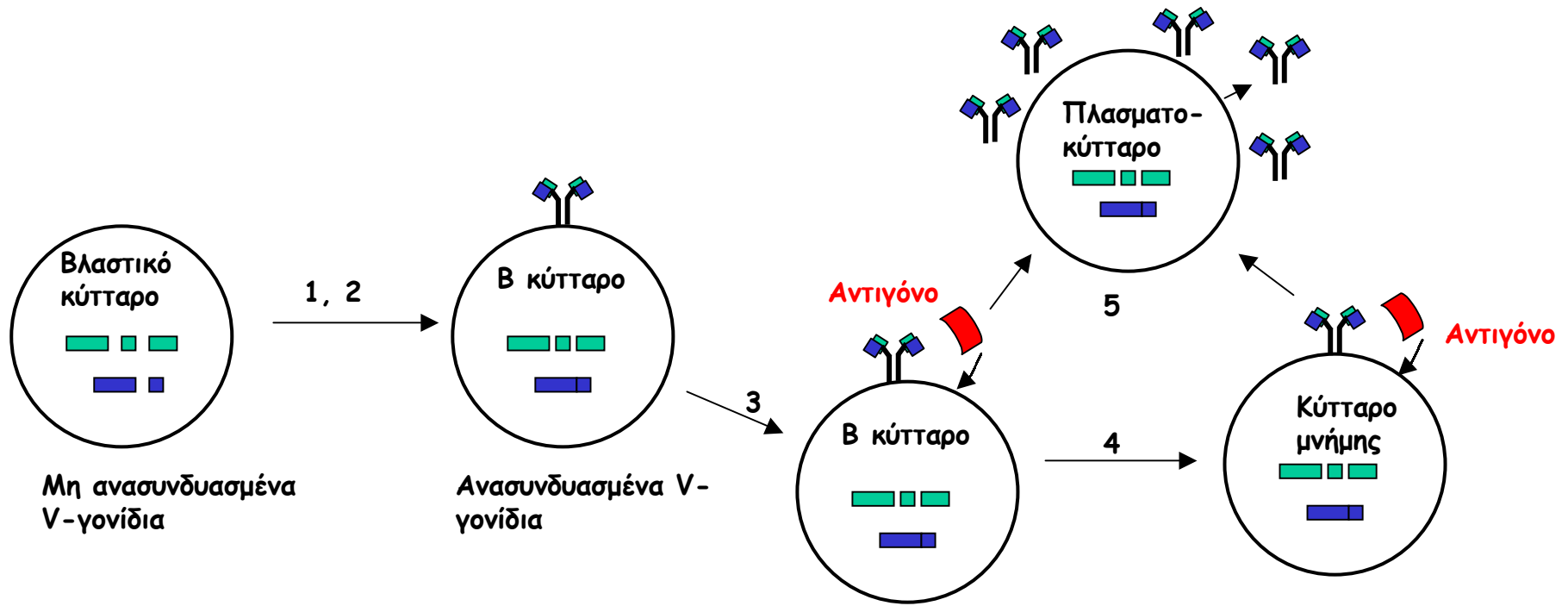


Διαλυτή έκφραση των scFv και Fab τμημάτων των ανοσοσφαιρινών

Από την επιφάνεια των νηματοειδών φάγων

Στο περίπλασμα της *E.coli*





Δ
Η
Μ
Ι
ΟΥ
Υ
Ρ
Γ
ΙΑ

Α
Ρ
Χ
Ι
Κ
ΟΥ

Π
Ε
Ρ
Α
Ι
Τ
Ε
Ρ
Ω

Χ
Ε
Ι
Ρ
Ι
Σ
Μ
Ο
Ι

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

mAb κατασκευασμένα με τον παραδοσιακό τρόπο

ανοσοποίηση με αντιγόνο-στόχο



Απομόνωση σπληνοκυττάρων



Κατασκευή υβριδωμάτων



Διαλογή

Απομόνωση καλύτερου mAb



Χιμαρικό Ab

Ανθρωποποιημένο Ab



Ανθρωποποιημένο mAb: 90-95% ανθρώπινο
Χιμαρικό mAb: 60-70% ανθρώπινο
Η εξειδίκευση και η συγγένεια εξαρτάται από το αρχικό mAb που προέρχεται από το τρωκτικό

Ab εκφρασμένα στην επιφάνεια της ουράς του φάγου

Βιβλιοθήκες αντισωμάτων σε φάγους



Επιλογή στο αντιγόνο-στόχο



Διαλογή

Δημιουργία ποικιλόμορφων



Επιλογή στο αντιγόνο-στόχο



Διαλογή (εκατοντάδες)



Κατασκευή επιθυμητού μορίου
Πλήρως ανθρώπινο mAb
Η εξειδίκευση, η συγγένεια και η βιολογική ενεργότητα εξαρτάται από την ελεγχόμενη διαδικασία επιλογής

Ab από διαγονιδιακά ποντίκια ανοσοποίηση με αντιγόνο-στόχο



Απομόνωση σπληνοκυττάρων



Κατασκευή υβριδωμάτων



Διαλογή

Απομόνωση καλύτερου mAb



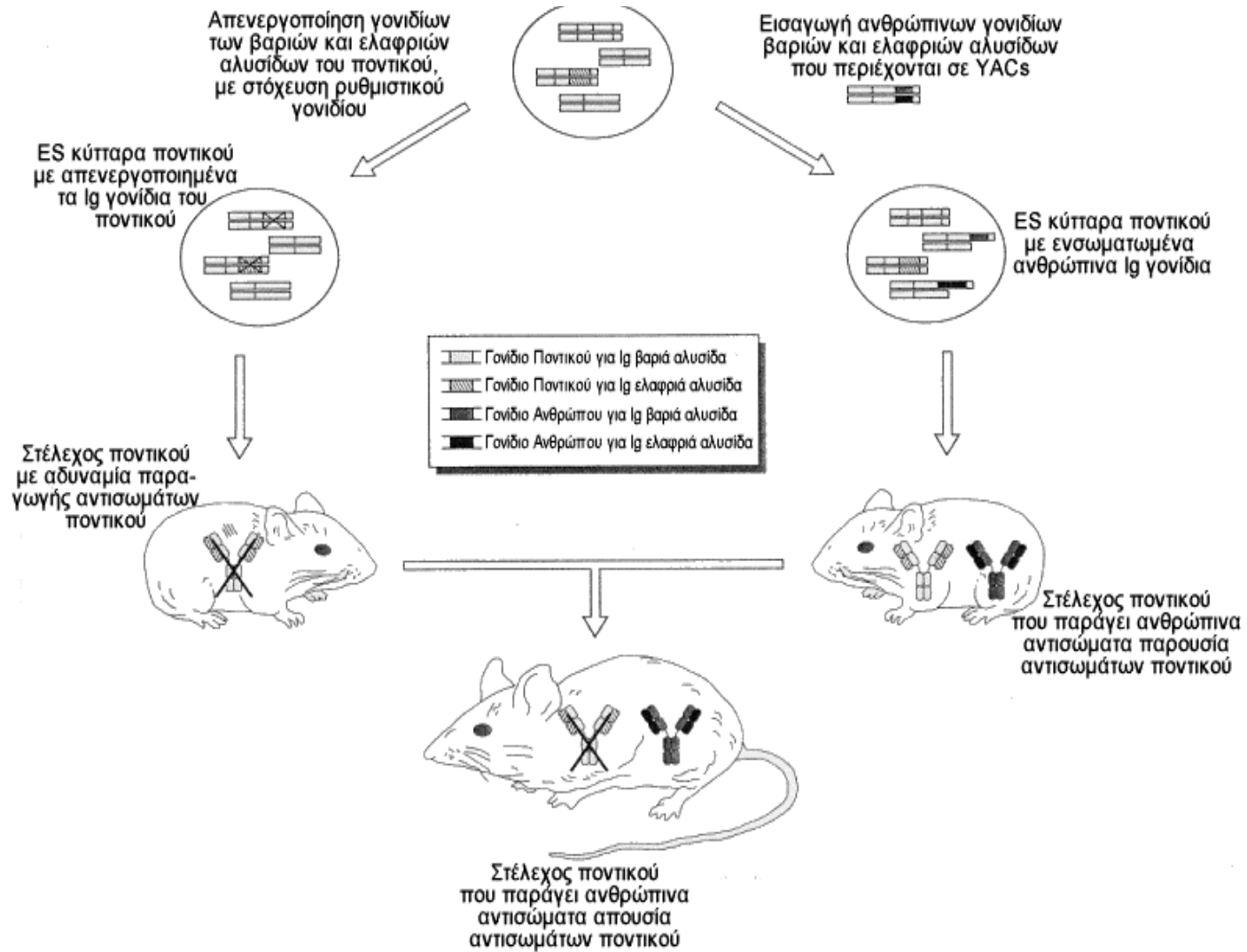
Περιορισμένος αριθμός τροποποιήσεων



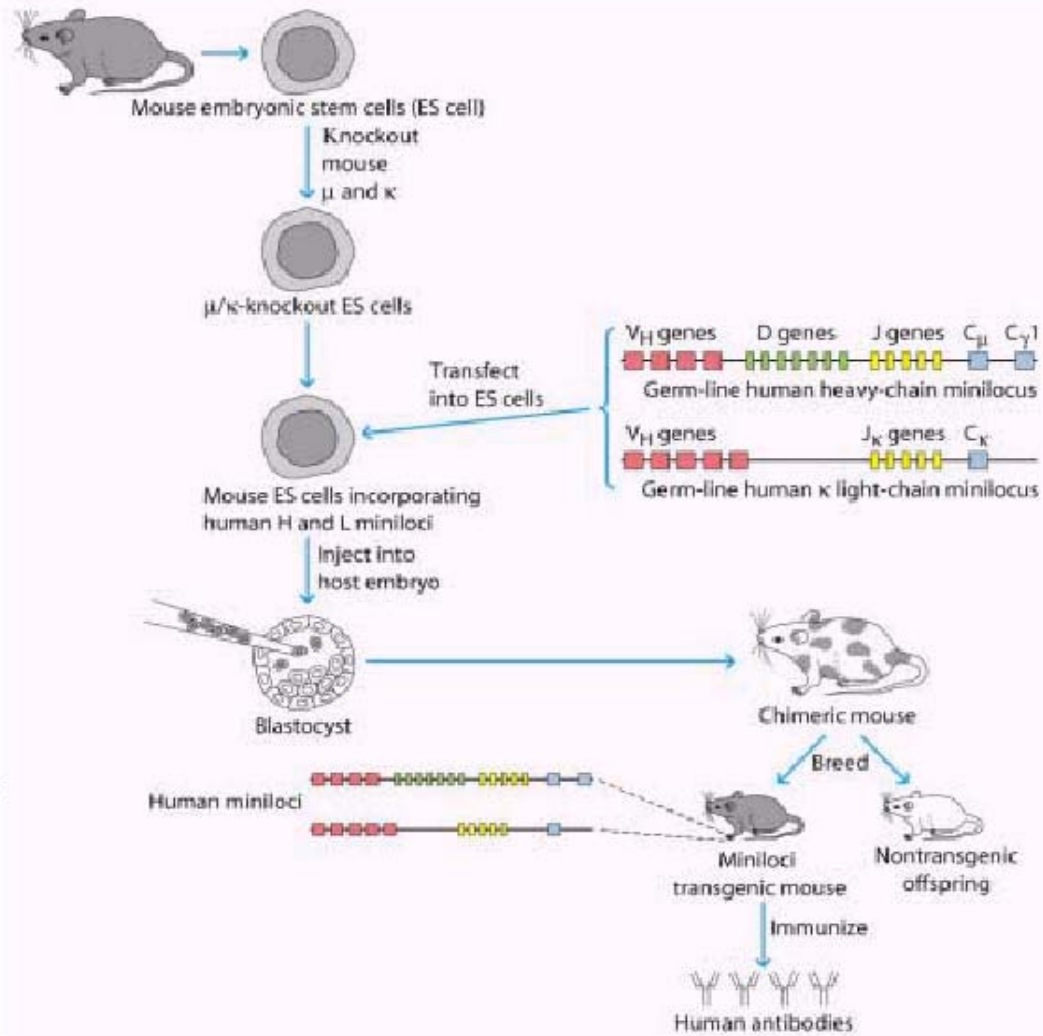
Πλήρως ανθρώπινο mAb
Η εξειδίκευση και η συγγένεια εξαρτάται από την ανοσολογική απάντηση του διαγονιδιακού ποντικού

ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΑΝΘΡΩΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΠΟΝΤΙΚΙΑ

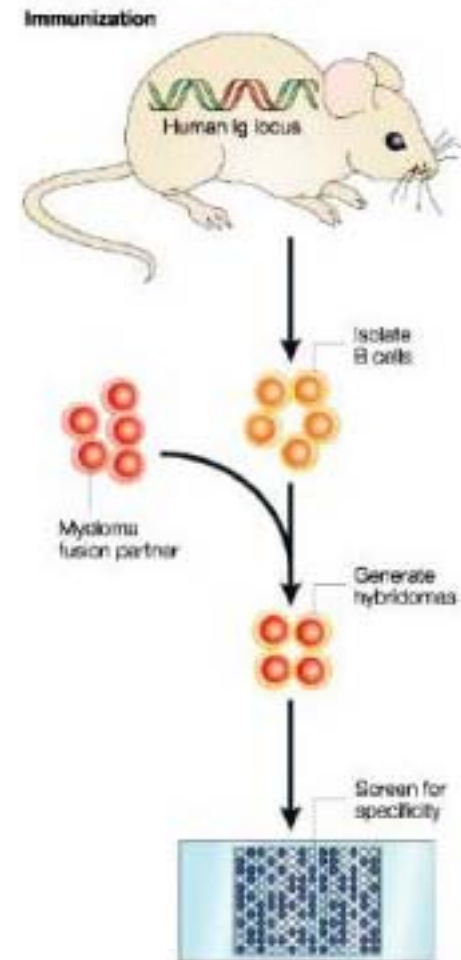
- Τα ενδογενή γονίδια των ανοσοσφαιρινών έχουν αδρανοποιηθεί
- Φέρουν γονιδιακούς τόπους των ανθρώπινων γονιδίων των ανοσοσφαιρινών



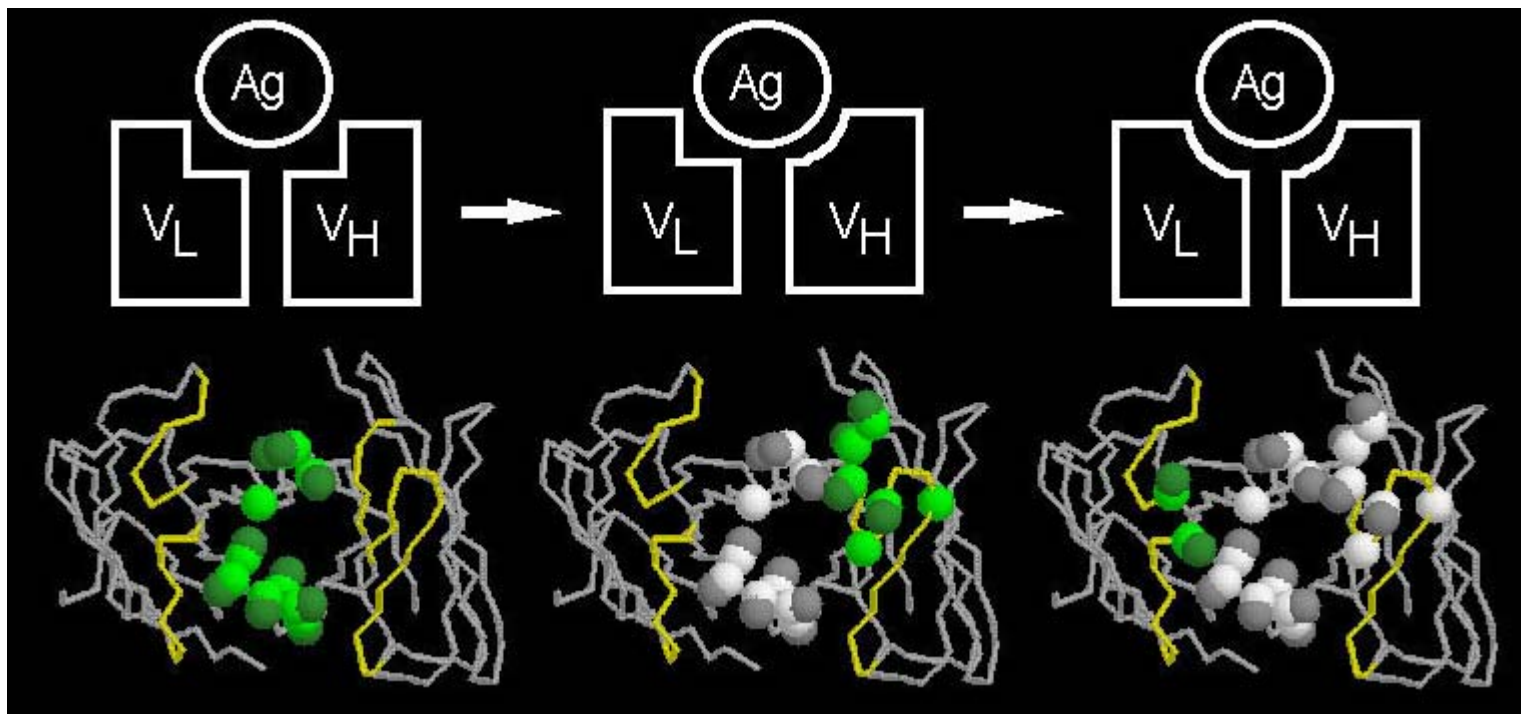
Απομόνωση ανθρώπινων αντισωμάτων από «ανθρωποποιημένα» ποντίκια



Transgenic mouse technology



In vitro ωρίμανση συγγένειας
“chain shuffling”



1η βιβλιοθήκη

2η βιβλιοθήκη

3η βιβλιοθήκη

Η *in vivo* διάγνωση αναπτύσσεται κυρίως με τμήματα αντισωμάτων scFv

- Γρήγορη προσέγγιση του όγκου (το scFv 7 φορές γρηγορότερα από το Fab)
- Καλύτερη απεικόνιση του όγκου
- Γρήγορη απομάκρυνση από τα όργανα, ιστούς
- Αυξημένο ποσοστό που προσεγγίζει τον στόχο

Θεραπευτική προσέγγιση με ανασυνδυασμένα αντισώματα

- I. Μεταμόσχευση οργάνων, ιστών
- II. Προστασία έναντι ιών
- III. Ογκολογία
- IV. Αυτοάνοσα νοσήματα

Clinical applications of mouse & humanized monoclonal antibodies

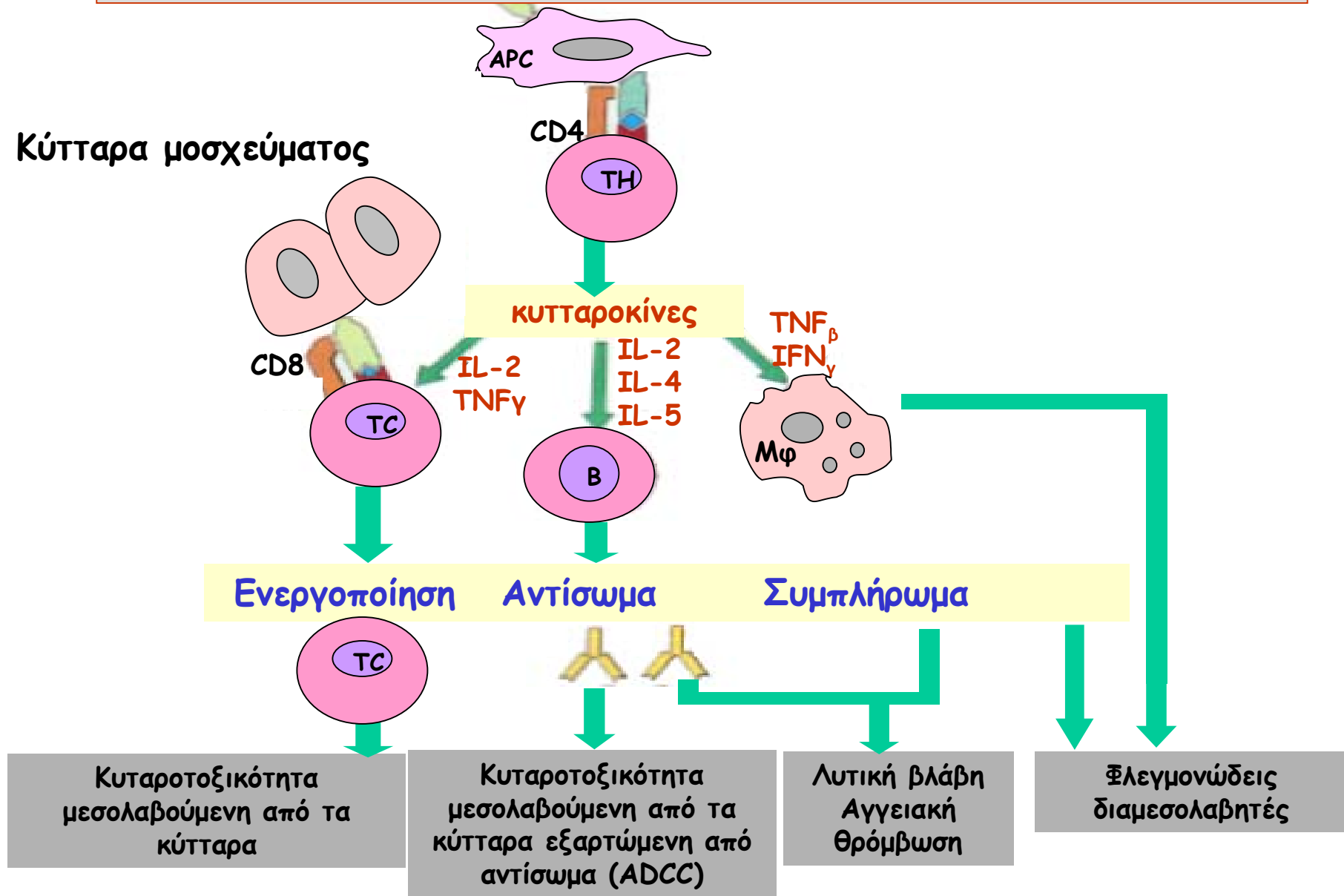
Some monoclonal antibodies in clinical use

Monoclonal antibody [mAB] (Product Name)	Nature of antibody	Target (antibody specificity)	Treatment for
Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3)	Mouse mAB	T cells (CD3, a T cell antigen)	Acute rejection of liver, heart and kidney transplants
Abciximab (ReoPro)	Human-mouse chimeric	Clotting receptor of platelets (GP IIb/IIIa)	Blood clotting during angioplasty and other cardiac procedures
Daclizumab (Zenapax)	Humanized mAB	Activated T cells (IL-2 receptor alpha subunit)	Acute rejection of kidney transplants
Infliximab (Remicade)	Human-mouse chimeric	Tumor necrosis factor, (TNF) a mediator of inflammation. (TNF)	Rheumatoid arthritis and Crohn's disease
Palivizumab (Synagis)	Humanized mAB	Respiratory Syncytial Virus (RSV) (F protein, a component of RSV)	RSV infection in children, particularly infants
Gemtuzumab (Mylotarg)	Humanized mAB	Many cells of the myeloid lineage (CD33, an adhesion molecule)	Acute myeloid leukemia (AML)
Alemtuzumab (Campath)	Humanized mAB	Many types of leukocytes (CD52 a cell surface antigen)	B cell chronic lymphocytic leukemia
Trastuzumab (Herceptin)	Humanized mAB	An epidermal growth factor receptor (HER2 receptor)	HER2 receptor-positive advanced breast cancers
Rituximab (Rituxan)	Humanized mAB	B cells (CD20 a B cell surface antigen)	Relapsed or refractory non-Hodgkins lymphoma
Ibritumomab (Zevalin)	Mouse mAB	B cells (CD20, a B cell surface antigen)	Relapsed or refractory non-Hodgkins lymphoma

SOURCE: Adapted from P. Carter. 2001. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nature Reviews/Cancer* 1:118.

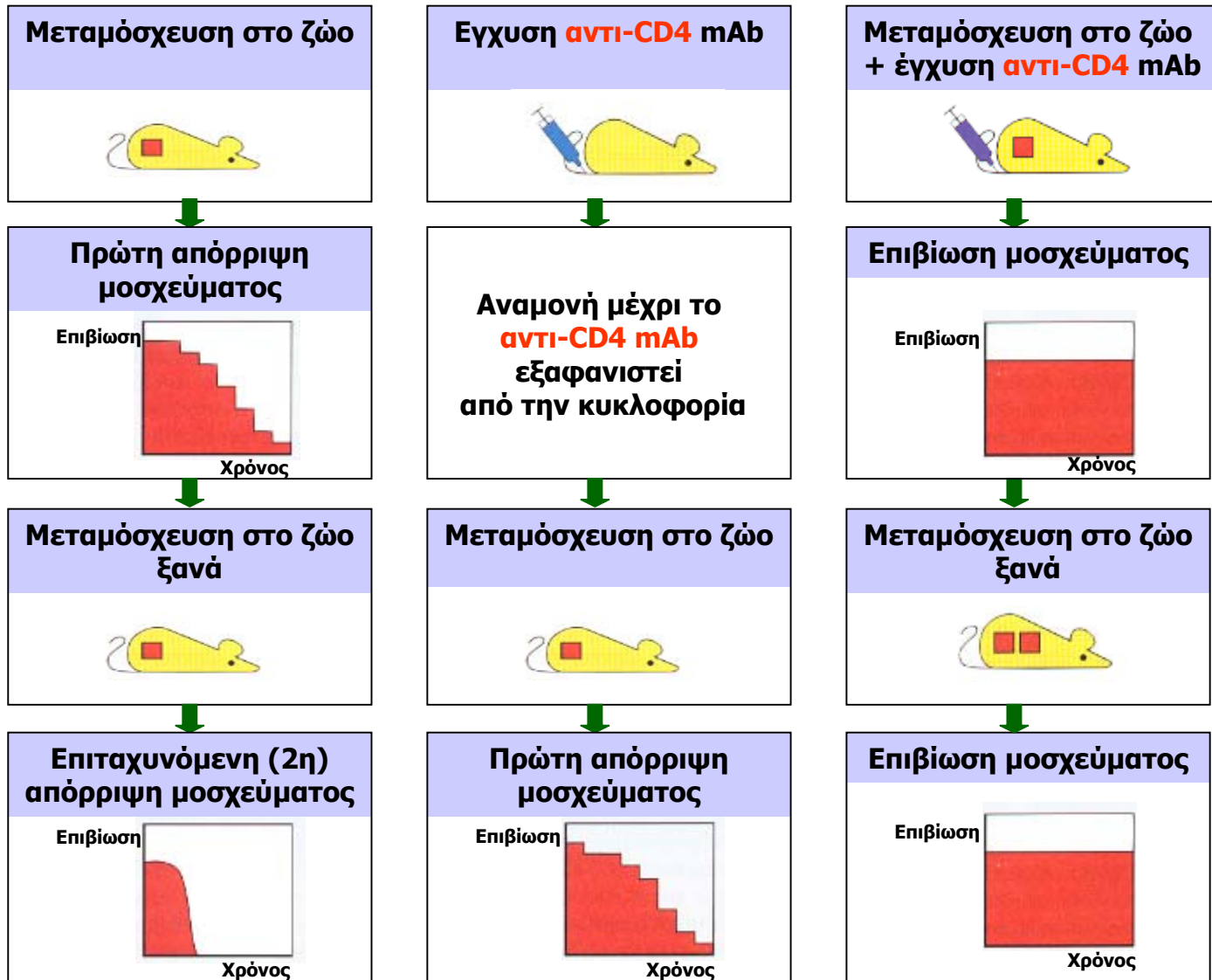
Ανοσολογικά χαρακτηριστικά της απόρριψης

Κύτταρα μοσχεύματος



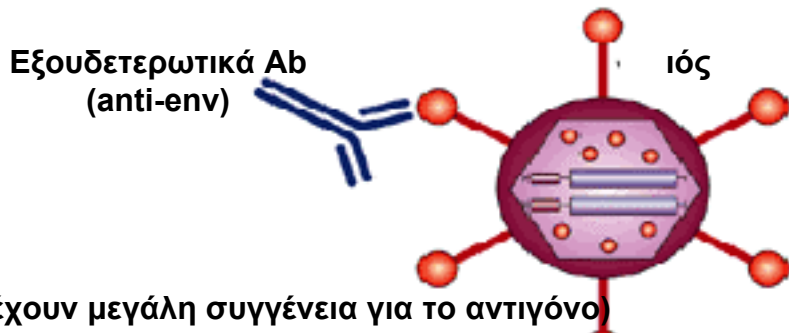
Επιδράσεις στο μόσχευμα

Ανοσοκαταστολή για επιβίωση του μοσχεύματος



ΑΝΤΙ-ΙΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Τα εξουδετερωτικά αντισώματα είναι σημαντικά για προστασία μέσω εμβολίων

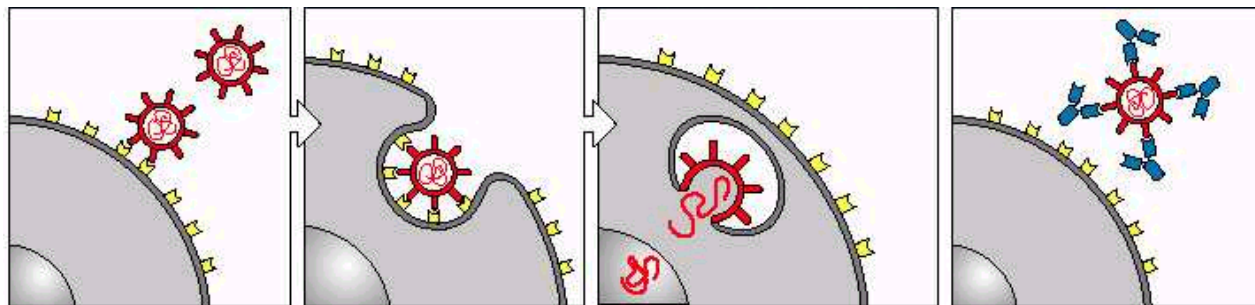
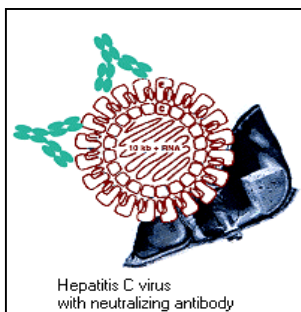


- εξουδετέρωση
- κυτταροτοξικότητα μέσω συμπλήρωτος και φαγοκυττάρωση

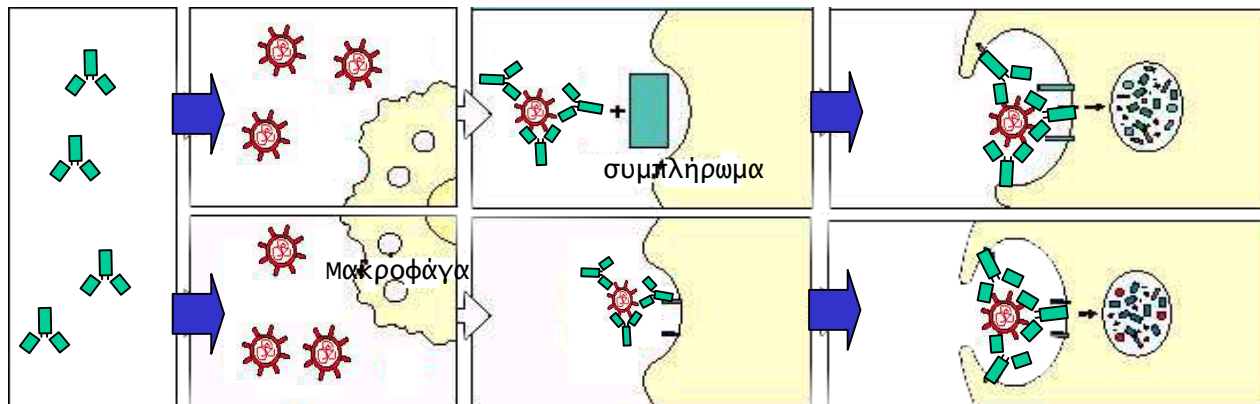
Κυτταρική προστασία από Ab

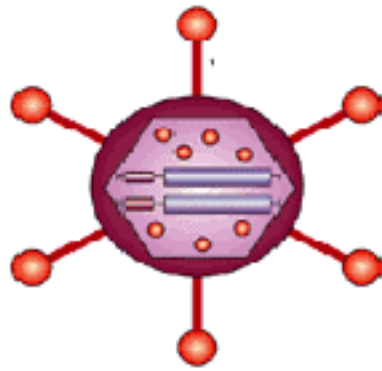
(Πρέπει να έχουν μεγάλη συγγένεια για το αντιγόνο)

Εξουδετέρωση (προκαλούνται αλλαγές στη διαμόρφωση των πρωτεϊνών του φακέλου ή καψιδίου)



ADCC
κλλ
φαγοκυττάρωση

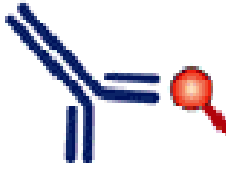




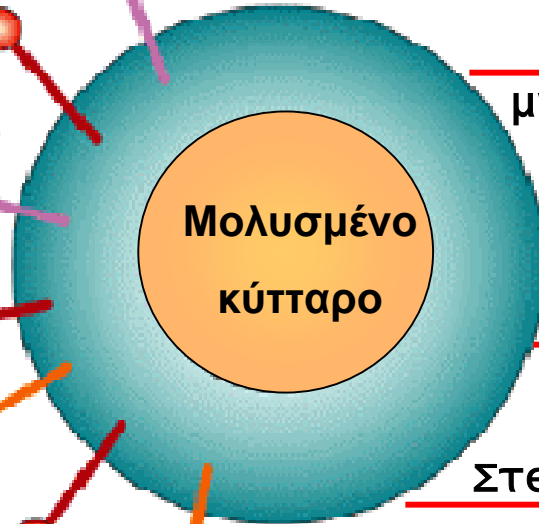
μόλυνση



Εξουδετερωτικά Ab



Μή-εξουδετερωτικά Ab



Δραστικοί
μηχανισμοί μέσω Fc

Κυτταρική λύση

Κυτταρική
σηματοδότηση

Αναστολή ιικής
αντιγραφής

Στερική
παρεμπόδιση;

Αναστολή
απελευθέρωσης
του ιού

Στερική παρεμπόδιση;

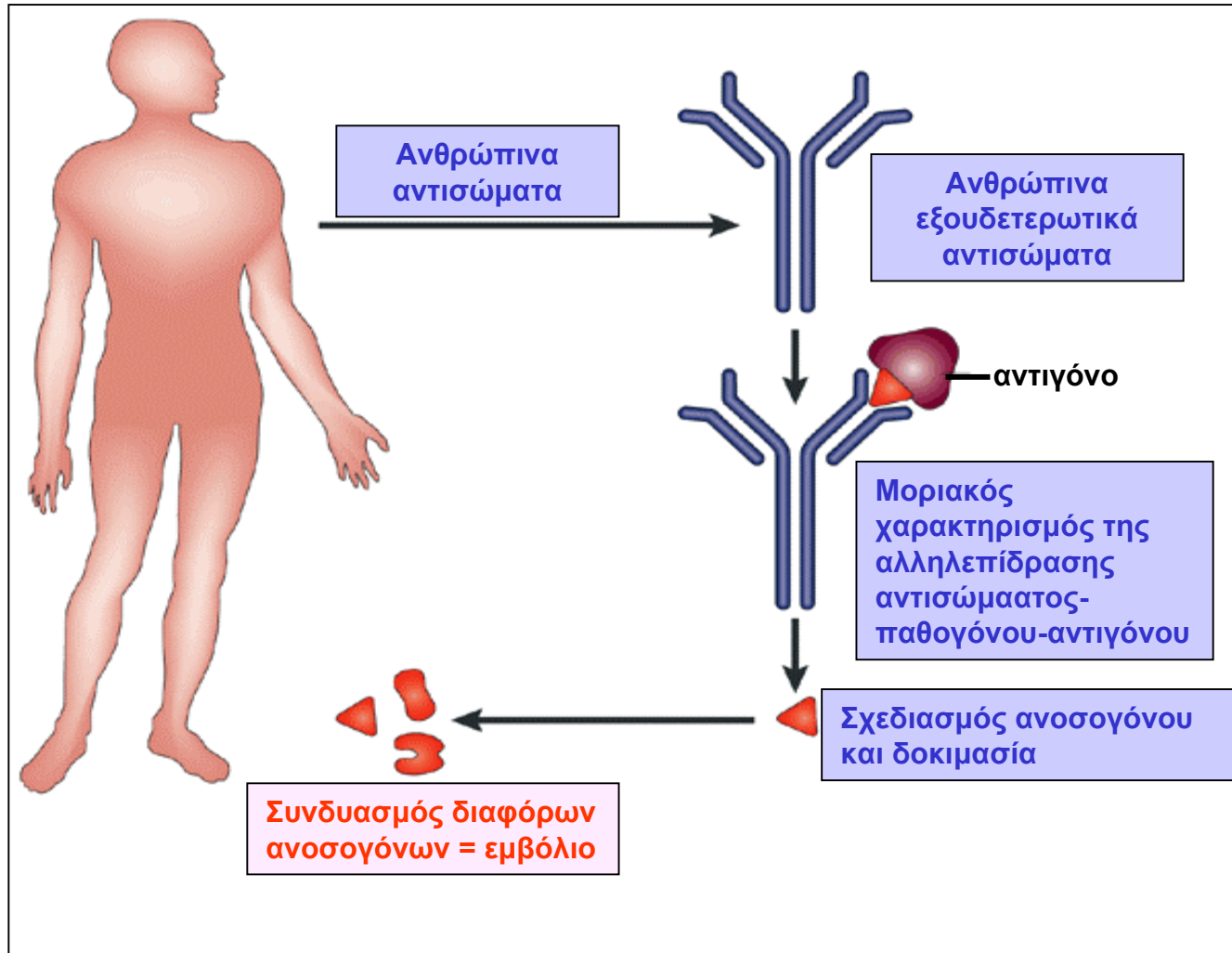
Αναστολή
μεταφοράς από
κύτταρο σε
κύτταρο

Μή-εξουδετερωτικά Ab



ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΜΒΟΛΙΩΝ

Τα εξουδετερωτικά αντισώματα είναι σημαντικά για προστασία μέσω εμβολίων



II. Ογκολογία:

1. Αύξηση δραστικών λειτουργιών

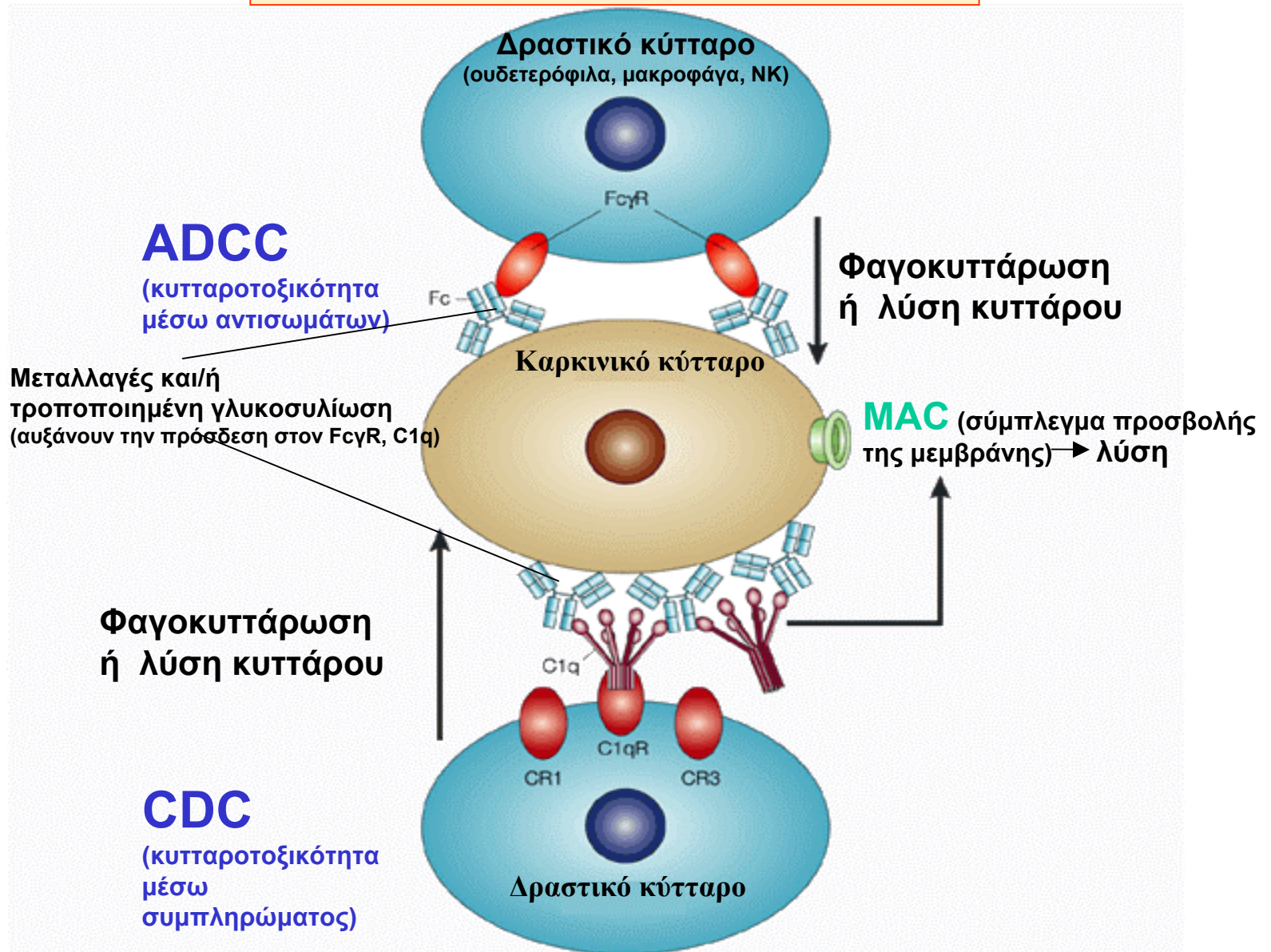
2. Άμεσος οπλισμός των αντισωμάτων

3. Έμμεσος οπλισμός των αντισωμάτων

4. Προ-στόχευση

ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΕ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

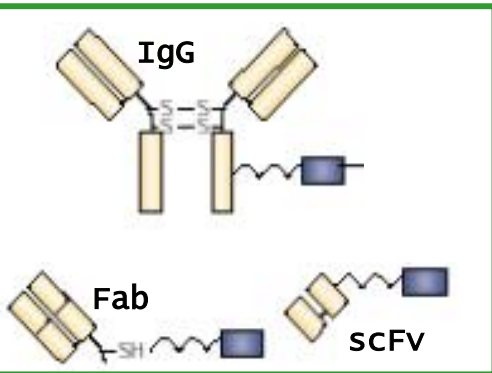
1. Αύξηση δραστικών λειτουργιών



ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΕ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

2. Άμεσος οπλισμός των αντισωμάτων

Το αντιγόνο στόχος πρέπει να εκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα και να απουσιάζει ή να εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα φυσιολογικά κύτταρα)



Μικρά μόρια ή τοξίνες

- Τοξίνη φυτών: ricin A chain
- Βακτηριακή τοξίνη: Pseudomonas exotoxin

Μετά την ενδοκυττάρωση το μόριο απελευθερώνεται από το αντίσωμα και ενεργοποιείται.



ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΗ

ανοσοκυτταροκίνη

- IL-2, IL-12, GM-CSF

• Ενεργοποίηση ανοσοδραστικών κυττάρων (T, B, NK)

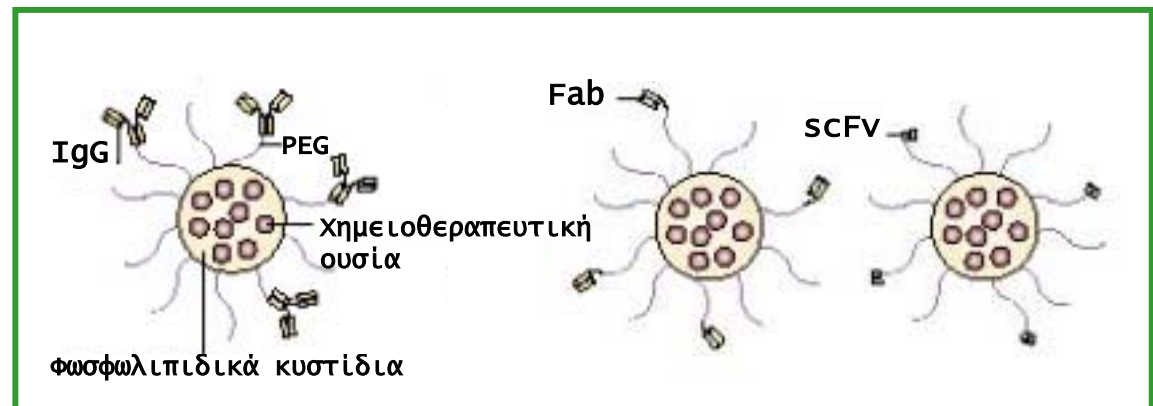
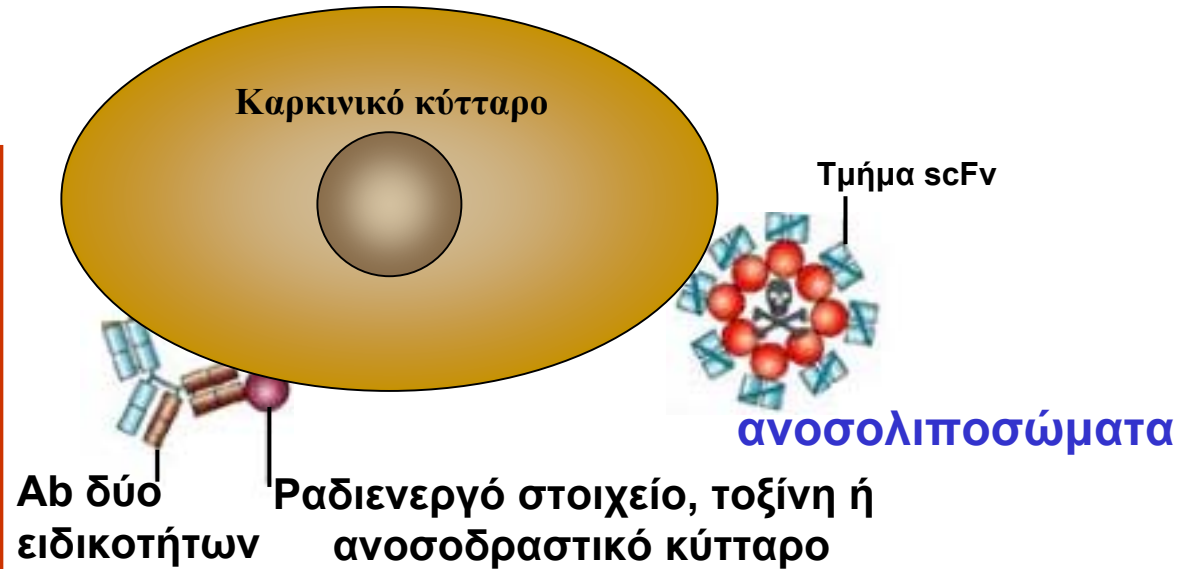
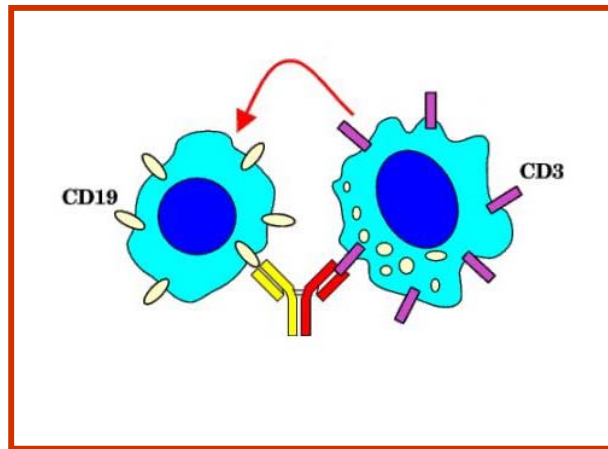
Ραδιενεργό στοιχείο

- ^{131}I , $^{90}\text{yttrium}$, $^{186}\text{rhodium}$, $^{188}\text{rhodium}$: β-σωματίδια (κυτταροτοξικά σε μεγάλη ακτίνα)
- $^{212}\text{Bismuth}$, $^{213}\text{Bismuth}$, $^{211}\text{astotine}$: α-σωματίδια (κυτταροτοξικά σε μικρή απόσταση, ειδικά για μικρομεταστάσεις και νεοπλάσματα)

ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΕ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

3. Έμμεσος οπλισμός των αντισωμάτων

Η απελευθέρωση χημειοθεραπευτικών ουσιών που είναι συμπυκνωμένες σε κάψουλες σε σύγκριση με τις ελεύθερες μειώνουν την κυτταροτοξικότητα



4. Προ-στόχευση

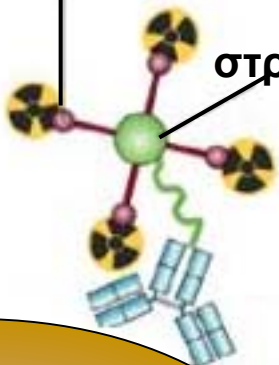
- Απαιτούνται 2-3 συστατικά και θεραπευτικά στάδια
- Μείωση συστηματικής τοξικότητας

• 4-12X αύξηση της συγκέντρωσης στους ιστούς

• 5X μείωση της συγκέντρωσης έξω από τους ιστούς

Βιοτίνη-ραδιενεργό στοιχείο

στρεπταβιδίνη



Καρκινικό κύτταρο

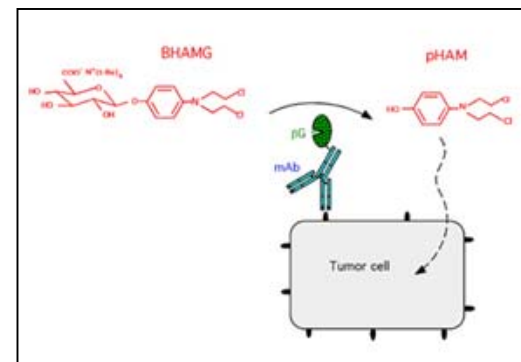
Προφάρμακο

scFv-ένζυμο

φάρμακο

ADEPT (= Ab-dependent enzyme mediated prodrug therapy)

1. Το Ab στοχεύει τον όγκο
2. Αποβολή των ελεύθερων κυκλοφορούντων Ab
3. Χορήγηση ενός κυτταροτοξικού παράγοντα που συλλαμβάνεται ή ενεργοποιείται από το Ab που βρίσκεται είδη στον όγκο.



(Το προφάρμακο ενεργοποιείται μόνο μετά την επαφή με την πρωτεΐνη σύντηξης → ενίσχυση της κυτταροτοξικής δράσης)

Ανοσοθεραπεία μελανώματος

Στο μελάνωμα υπερεκφράζονται τα γλυκολιπίδια GD2 και GM2

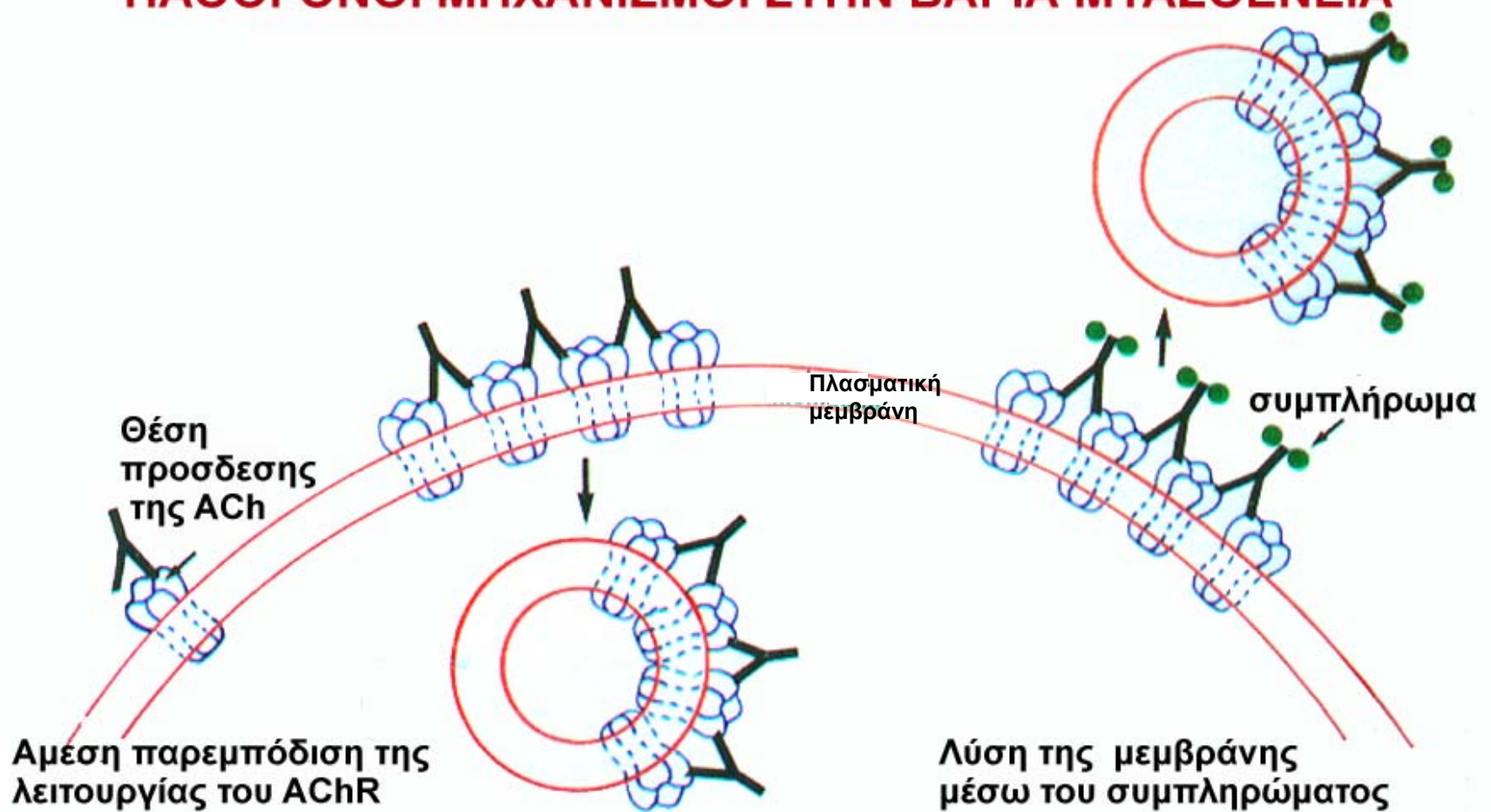


Μελάνωμα το οποίο δεν απάντησε σε ακτινοθεραπεία



Το ίδιο μελάνωμα μετά από τοπική έγχυση αντι-GD2 και αντι-GM2 Abs

ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΒΑΡΙΑ ΜΥΑΣΘΕΝΕΙΑ



ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ

ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

