Vysokoškolské učebné texty

Štruktúra a fyzikálno-chemické vlastnosti imunoglobulínov

Gabriel Žoldák

Košice, 2019

Tieto vysokoškolské učebné texty vznikli vďaka podpore:

Technology and innovation park UPJŠ

CENTER FOR INTERDISCIPLINARY BIOSCIENCES

MINISTERSTVO ŠKOLSTVA, VEDY, VÝSKUMU A ŠPORTU SLOVENSKEJ REPUBLIKY

AGENTÚRA NA PODPORU VÝSKUMU A VÝVOJA

VEGA 1/0175/19

APVV-18-0285

Štruktúra a fyzikálno-chemické vlastnosti imunoglobulínov
Vysokoškolský učebný text

Autor:
RNDr. Gabriel Žoldák, PhD.
Centrum Interdisciplinárnych Biovied, Technologický a inovačný park, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Recenzenti:
RNDr. Rastislav Mucha, PhD.
Biomedicínske centrum SAV Neurobiologický ústav, Slovenská akadémia vied v Bratislave

doc. RNDr. Jozef Hatok, PhD.
Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

RNDr. Ladislav Janovec, PhD.
Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

© Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Všetky práva vyhradené. Toto dielo ani jeho žiadnu časť nemožno reprodukovať, ukladať do informačných systémov alebo inak rozširovať bez súhlasu majiteľov práv. Za odbornú a jazykovú stránku tejto publikácie zodpovedajú autorky. Rukopis neprešiel redakčnou úpravou.

Umiestnenie: www.unibook.upjs.sk
Dostupné od: 09. 12. 2019

ISBN 978-80-8152-810-1 (e-publikácia)

Osnova

1. Imunitný systém a imunoglobulíny
2. Všeobecné vlastnosti imunoglobulínov
3. Štruktúra imunoglobulínov I
4. Štruktúra imunoglobulínov II
5. Chemické a proteolytické štiepenie imunoglobulínov
6. Detekcia imunoglobulínov
7. Čistenie a purifikácia imunoglobulínov
8. Post-translačné modifikácie imunoglobulínov
9. Stabilita a agregácia imunoglobulínov
10. Terapeutické imunoglobulíny

Použité zdroje a autorské práva

POZNÁMKA	ZDROJ
str. 5-100, všeobecný úvod protilátky	Handbook of Immunochemistry, M. Ferenčík, 1993 Springer, ISBN 978-94-010-4678-7
str. 11-112, historický úvod, vlastnosti protilátok	The Immunoglobulins STRUCTURE AND FUNCTION, R. Nezlin, 1998, Academic Press, ISBN 0-12-517970-7
str. 40-42, Springer Nature License Number: 4510181171461	Shaw A, Hoffecker IT, Smyrlaki I, Rosa J, Grevys A, Bratlie D, Sandlie I, Michaelsen TE, Andersen JT, Högberg B. Binding to nanopatterned antigens is dominated by the spatial tolerance of antibodies. Nat Nanotechnol. 2019 Feb;14(2):184-190. doi: 10.1038/s41565-018-0336-3.
str. 40-42, Springer Nature License Number: 4510181171461	Tolar P. Great stretches for your antibody workout. Nat Nanotechnol. 2019 Feb;14(2):101-102. doi: 10.1038/s41565-018-0354-1.
str. 56-57, VDJ proces	Zhang L, Reynolds TL, Shan X, Desiderio S. Coupling of V(D)J recombination to the cell cycle suppresses genomic instability and lymphoid tumorigenesis. Immunity. 2011 Feb 25;34(2):163-74. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.003. Gellert M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. Annu Rev Biochem. 2002;71:101-32. Epub 2001 Nov 9. Review. Fukushima T, Takata M, Morrison C, Araki R, Fujimori A, Abe M, Tatsumi K, Jasin M, Dhar PK, Sonoda E, Chiba T, Takeda S. Genetic analysis of the DNA-dependent protein kinase reveals an inhibitory role of Ku in late S-G2 phase DNA double-strand break repair. J Biol Chem. 2001 Nov 30;276(48):44413-8.
str. 83-84, analýza sekvenčnej variability	Wu TT, Kabat EA. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. J Exp Med. 1970 Aug 1;132(2):211-50.
str. 99-100, Springer Nature License Number 4565830385595	Jones LM, Zhang H, Cui W, Kumar S, Sperry JB, Carroll JA, Gross ML. Complementary MS methods assist conformational characterization of antibodies with altered S-S bonding networks. J Am Soc Mass Spectrom. 2013 Jun;24(6):835-45. doi: 10.1007/s13361-013-0582-4.

Použité zdroje a autorské práva

POZNÁMKA	ZDROJ
str.115-116, štruktúry sekrečného komponentu	Stadtmueller BM, Huey-Tubman KE, López CJ, Yang Z, Hubbell WL, Bjorkman PJ. The structure and dynamics of secretory component and its interactions with polymeric immunoglobulins. Elife. 2016 Mar 4;5. pii: e10640. doi: 10.7554/eLife.10640.
str. 157-186, technické detaily purifikácie IgG	Handbook of Therapeutic Antibodies, S. Dübel, 2007, Wiley-VCH Verlag GmbH
str.161, 3D štruktúra proteínu G	Gronenborn AM, Filpula DR, Essig NZ, Achari A, Whitlow M, Wingfield PT, Clore GM. A novel, highly stable fold of the immunoglobulin binding domain of streptococcal protein G. Science. 1991 Aug 9;253(5020):657-61.
str. 162, 3D štruktúra proteínu G v komplexe s Fc časťou IgG	Sauer-Eriksson AE, Kleywegt GJ, Uhlén M, Jones TA. Crystal structure of the C2 fragment of streptococcal protein G in complex with the Fc domain of human IgG. Structure. 1995 Mar 15;3(3):265-78.
str.166, 3D štruktúra proteínu A	Graille M, Stura EA, Corper AL, Sutton BJ, Taussig MJ, Charbonnier JB,Silverman GJ. Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. Proc Natl Acad Sci USA. 2000 May 9;97(10):5399-404.
str.171, 3D štruktúra proteínu L	Graille M, Stura EA, Housden NG, Beckingham JA, Bottomley SP, Beale D, Taussig MJ, Sutton BJ, Gore MG, Charbonnier JB. Complex between Peptostreptococcus magnus protein L and a human antibody reveals structural convergence in the interaction modes of Fab binding proteins. Structure. 2001 Aug;9(8):679-87.
str. 197, deamidácia IgG, licencia: Creative Commons: CC BY-NC-ND 4.0, Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License	Yan Q, Huang M, Lewis MJ, Hu P. Structure Based Prediction of Asparagine Deamidation Propensity in Monoclonal Antibodies. MAbs. 2018 Aug/Sep;10(6):901-912. doi: 10.1080/19420862.2018.1478646.

Použité zdroje a autorské práva

POZNÁMKA	ZDROJ
str. 214, glykozylácia IgG, Springer Nature License Number: 4598140436475	Jefferis R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. Nat Rev Drug Discov. 2009 Mar;8(3):226-34. doi: 10.1038/nrd2804.
str. 220-233, agregácia terapeutických proteínov	AGGREGATION OF THERAPEUTIC PROTEINS, W. Wang, C.J. Roberts, 2010 by John Wiley & Sons, Inc, ISBN 978-0-470-41196-4
str. 222-223, zoznam peptidových fragmentov náchylných na agregáciu	Wang X, Das TK, Singh SK, Kumar S. Potential aggregation prone regions in biotherapeutics: A survey of commercial monoclonal antibodies. MAbs. 2009 May-Jun;1(3):254-67.
str. 226, identifikácia peptidov tvoriacich fibrily	Thompson MJ, Sievers SA, Karanicolas J, Ivanova MI, Baker D, Eisenberg D. The 3D profile method for identifying fibril-forming segments of proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar 14;103(11):4074-8.
str. 229, oxidácia vody katalyzovaná protilátkami	Nieva J, Wentworth P Jr. The antibody-catalyzed water oxidation pathway--a new chemical arm to immune defense? Trends Biochem Sci. 2004 May;29(5):274-8.
str. 244-246, názvoslovie agregátov	AGGREGATION OF THERAPEUTIC PROTEINS, W. Wang, C.J. Roberts, 2010 by John Wiley & Sons, Inc, ISBN 978-0-470-41196-4
str. 247-251, stabilita IgG, vlastná publikácia, použitie v zmysle pravidiel licenčných podmienok	Nemergut M, Žoldák G, Schaefer JV, Kast F, Miškovský P, Plückthun A, Sedlák E. Analysis of IgG kinetic stability by differential scanning calorimetry, probe fluorescence and light scattering. Protein Sci. 2017 Nov;26(11):2229-2239.
str. 256-264, metódy pre overenie kritických atribútov kvality	State-of-the-Art and Emerging Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization Volume 1. Monoclonal Antibody Therapeutics: Structure, Function, and Regulatory Space, J.E. Schiel, D.L. Davis, O.V. Borisov, 2014 American Chemical Society, ISBN 978-0-8412-3026-2

Použité zdroje a autorské práva

POZNÁMKA	ZDROJ
str. 266-268, názvoslovie terapeutických protilátok	State-of-the-Art and Emerging Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization Volume 1. Monoclonal Antibody Therapeutics: Structure, Function, and Regulatory Space, J.E. Schiel, D.L. Davis, O.V. Borisov, 2014 American Chemical Society, ISBN 978-0-8412-3026-2
str. 278-293, príklady terapeutických proteínov a ich história vedúca k schváleniu na terapeutické použitie	Handbook of Therapeutic Antibodies, S. Dübel, 2007, Wiley-VCH Verlag GmbH
str. 286, 3D štruktúra tumor nekrotického faktora	Eck MJ, Sprang SR. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. J Biol Chem. 1989 Oct15;264(29):17595-605.

1. Imunitný systém a imunoglobulíny

1. Imunitný systém a imunoglobulíny

1.1. Úloha imunitného systému pre život

1.2. Stručný vývoj modernej imunológie

1.3. Vzťah imunológie a ostatných vedeckých oblastí

1.4. B a T lymfocyty

1. Imunitný systém a imunoglobulíny

Ciele

- Pochopiť úlohu imunitného systému
- Získať prehľad historických udalostí smerujúcich k modernej imunológií
- Pochopiť prirodzené procesy produkcie protilátok
- Oboznámiť, sa ako je možné detekovať protilátky a identifikovať patologické procesy ich nadprodukcie

Úloha imunitného systému pre život

3 hlavné mechanizmy potrebné pre život

1. Zdroj voľnej energie na riadenie, reguláciu biochemických reakcií
2. Transkripcia a prenos genetickej informácie
3. Informácia o externom a internom prostredí za účelom regulácie a koordinácie životných procesov

Imunitný systém je základným mechanizmom, ktorý v živých systémoch plní úlohu rozlíšiť vlastné štruktúry/molekuly od nevlastných štruktúr/molekúl.

Mechanizmy odhalenia cudzích molekúl

Základné mechanizmy obrany prítomné už aj u baktérií

1. **Restrikčno-modifikačné systémy:** ochrana pred vniknutím cudzej DNA do baktérie. Ochranný mechanizmus pozostáva z restrikčnej endonukleázy, ktorá sa viaže na krátky úsek a následne štiepi/hydrolyzuje cudziu DNA. Vlastná DNA je chránená pred restrikčnou endonukleázou modifikačným enzýmom, ktorý ju metyluje.

2. **CRISPR/Cas9 adaptívny systém ochrany:** CRISPR je z ang. clustered regularly interspaced short palindromic repeats. Súbor uchovaných DNA fragmentov z vírusov, ktoré napadli baktériu. Tento súbor fragmentov umožňuje rýchlejšie identifikovať a zničiť virálnu DNA po opakovanom napadnutí – analógia imunitnej pamäte u eukaryotov.

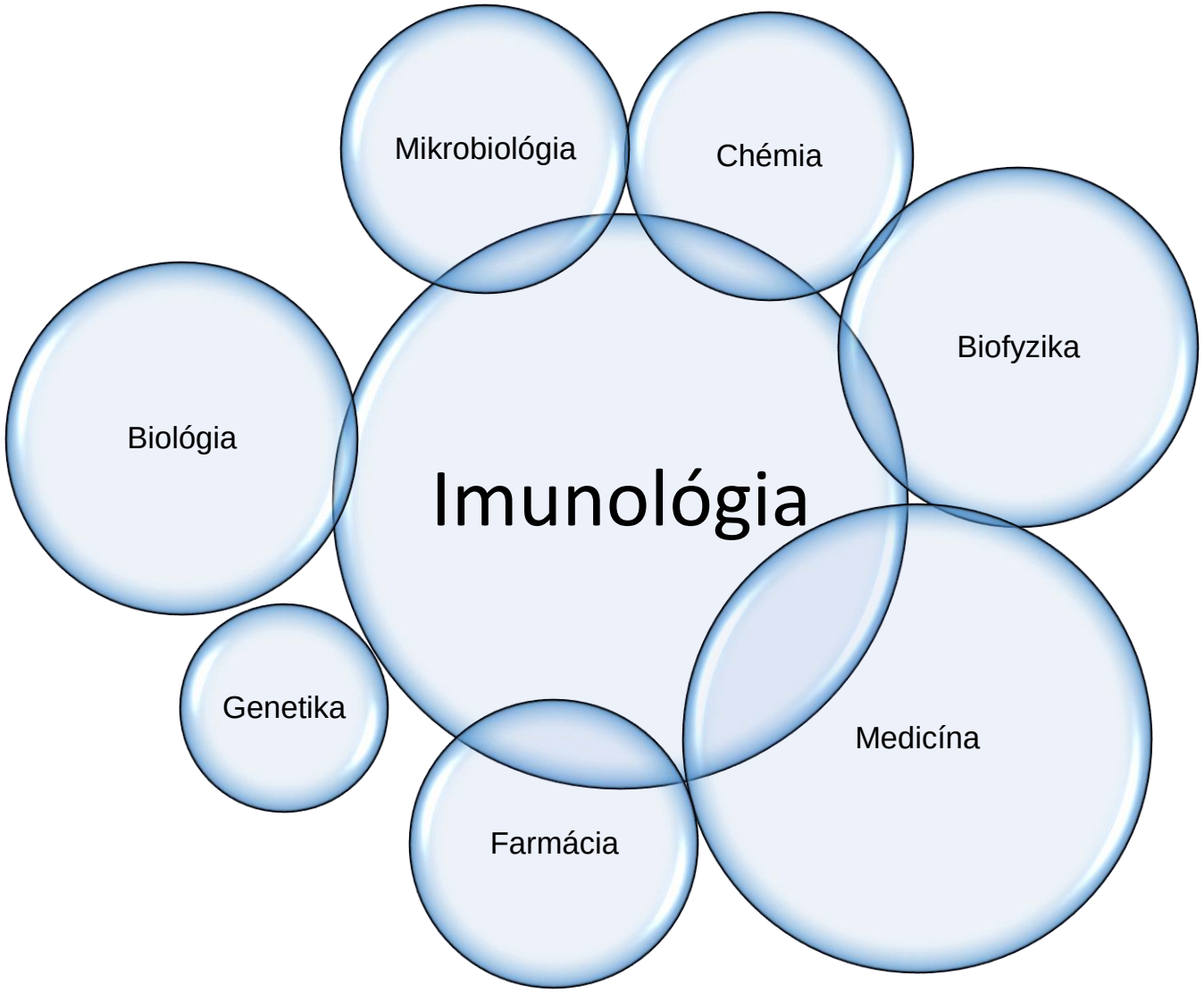
Úloha imunitného systému pre život

Imunitný systém u človeka

môžeme chápať ako difúzny orgán s váhou ca. 1kg, ktorý sa skladá z:

- 10^{12} lymfocytov, ktoré cirkulujú voľne v krvi a v lymfe
- príslušných buniek (makrofágy, leukocyty),
- 10^{20} protilátok
- miliónov ďaších efektorov a iných regulačných látok

Imunológia je interdisciplinárna veda



Stručný vývoj modernej imunológie

1890 EMIL BEHRING, SHIBASABURO KITASATO

- sérum získané z králikov, ktorým bol vstreknutý bakteriálny toxín, dokáže neutralizovať daný toxín
- takto injektované sérum zaručuje dlhodobú odolnosť voči toxínom

Molekuly prítomné v krvi sprostredkúvavajú imúnnu odpoveď proti toxínom

1896 PAUL EHRLICH

- sérum získané z králikov, ktorým bol vstreknutí rastlinný toxín, má taktiež neutralizujúce vlastnosti
- Táto neutralizačná aktivita korelovala s konkrétnou skupinou makromolekúl (antigény)

Bunky majú povrchové receptory, ktoré viažu dané antigény

KONCEPT: VYSOKÁ AFINITA RECEPTOROV K ANTIGÉNOM JE V DÔSLEDKU ŠTRUKTÚRNEJ KOMPLEMENTARITY MEDZI CHEMICKÝMI SKUPINAMI

Stručný vývoj modernej imunológie

1907 SVANTE ARRHENIUS
- vznik novej disciplíny: imunochémia

1920 KARL LANDSTEINER, MICHAEL HEIDELBERGER
- Imúnna odpoveď na polysacharidy ako aj ďalšie chemické látky (haptény)

1930 ELVIN KABAT
- Aktivita protilátok v králičom antisére bola v dôsledku 7S γ -globulínu

1958 RODNEY PORTER
- Štiepenie králičieho imúnoglobulínu použitím enzýmu papaínu: 2 fragmenty
- Fragment Fab:obsahuje jedno väzobné miesto, ktoré interaguje s antigénom

Antigén-špecifické makromolekuly v sére boli identifikované ako špecifická trieda sérových proteínov, ktoré boli nazvané protilátky (antibodies)

Stručný vývoj modernej imunológie

1958 RODNEY PORTER (pokr.)

- Fragment Fc: schopný kryštalizácie, neviaže antigén ale iné dôležité biologické aktivity

GERALD EDELMAN

- Objavil, že ľudský IgG1 sa skladá z ľahkého a z ťažkého reťazca,
- Ľahký a ťažký reťazec sú spojené disulfidickými mostíkmi

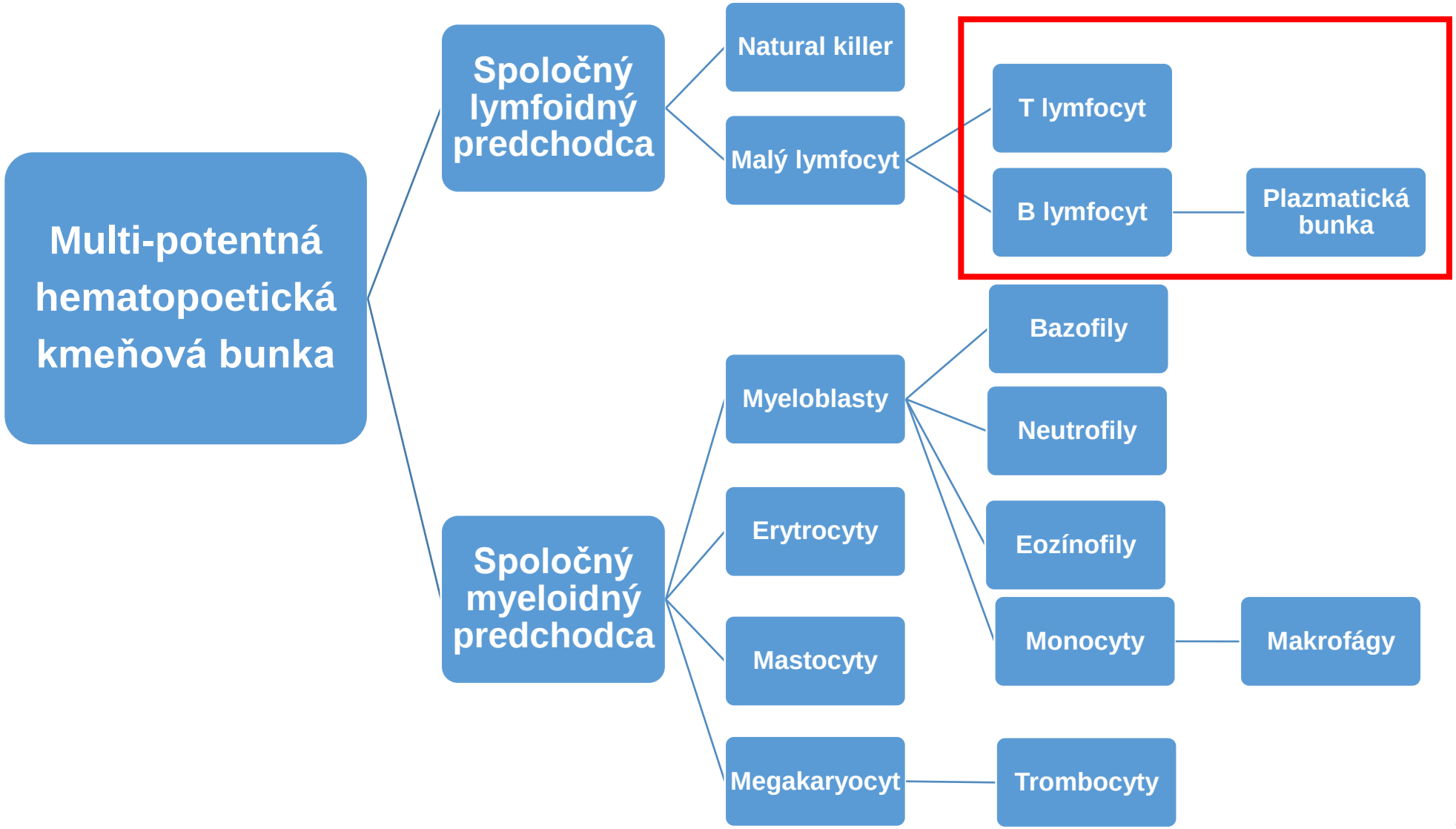
1962 RODNEY PORTER

- Štrukturálny model IgG zložený z 4 reťazcov: 2 identické ťažké reťazce a dve identické ľahké reťazce

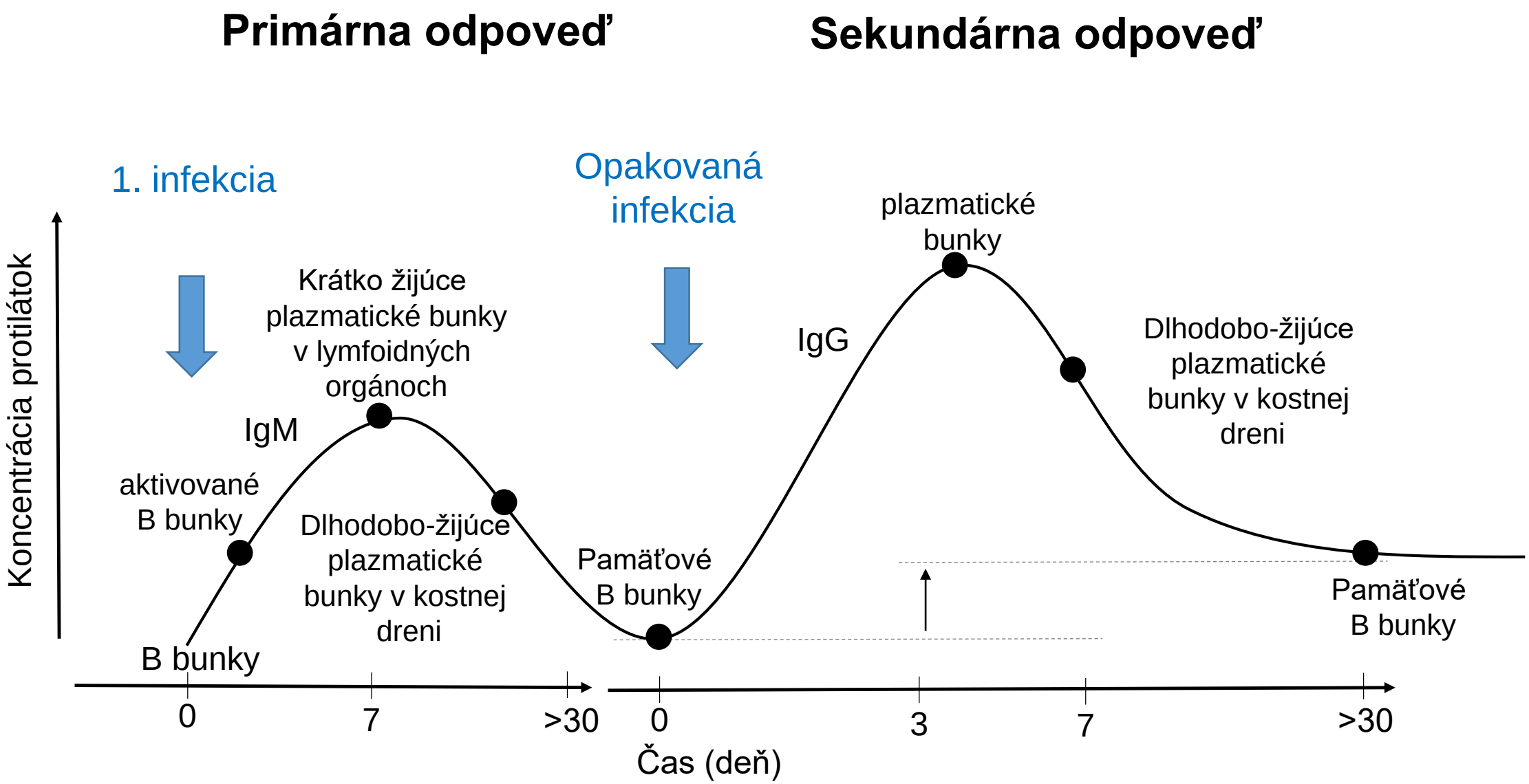
ŠTRUKTURÁLNY MODEL IGG

Štúdium genetických mechanizmov spôsobujúcich diverzitu IgG, biosyntéza, 3D štruktúra....

Prirodzená produkcia imunoglobulínov



Imunitná odpoveď: produkcia protilátok



Imunitná odpoveď: produkcia protilátok

Primárna odpoveď

- Aktivácia B buniek, produkcia protilátok ako odpoveď na extracelulárny patogén
- Nízka koncentrácia protilátok
- Nízka špecifičnosť protilátok
- 5-10 dní potrebných na expresiu
- koncentrácia IgM > koncentrácia IgG
- polysacharidový antigén: IgG, bez T buniek
- proteínový antigén: IgG + T bunky

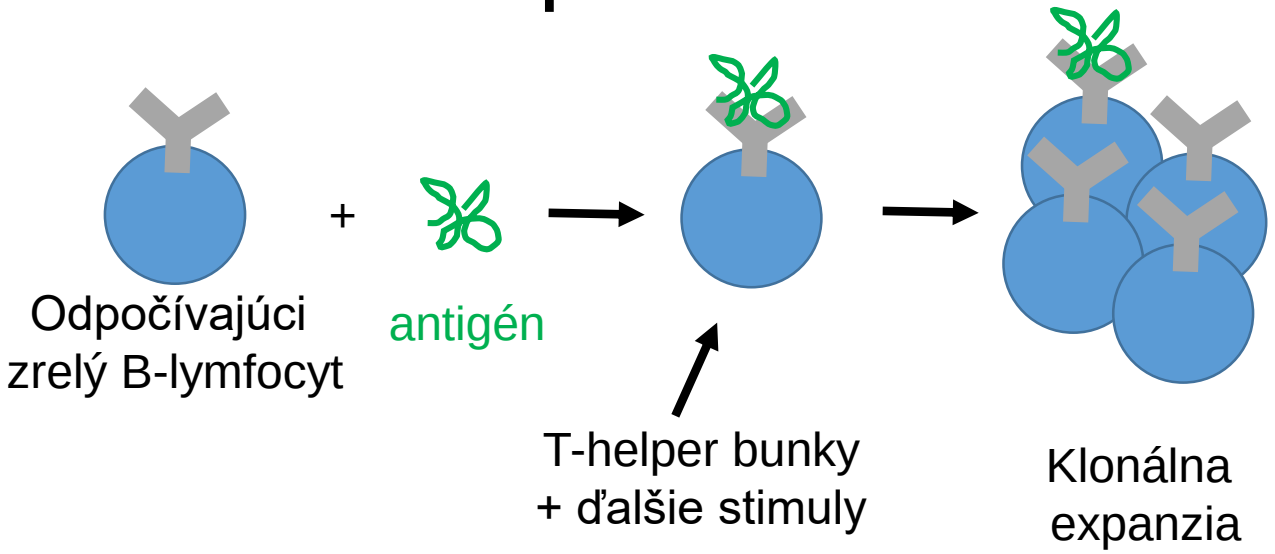
Imunitná odpoveď: produkcia protilátok

Sekundárna odpoveď

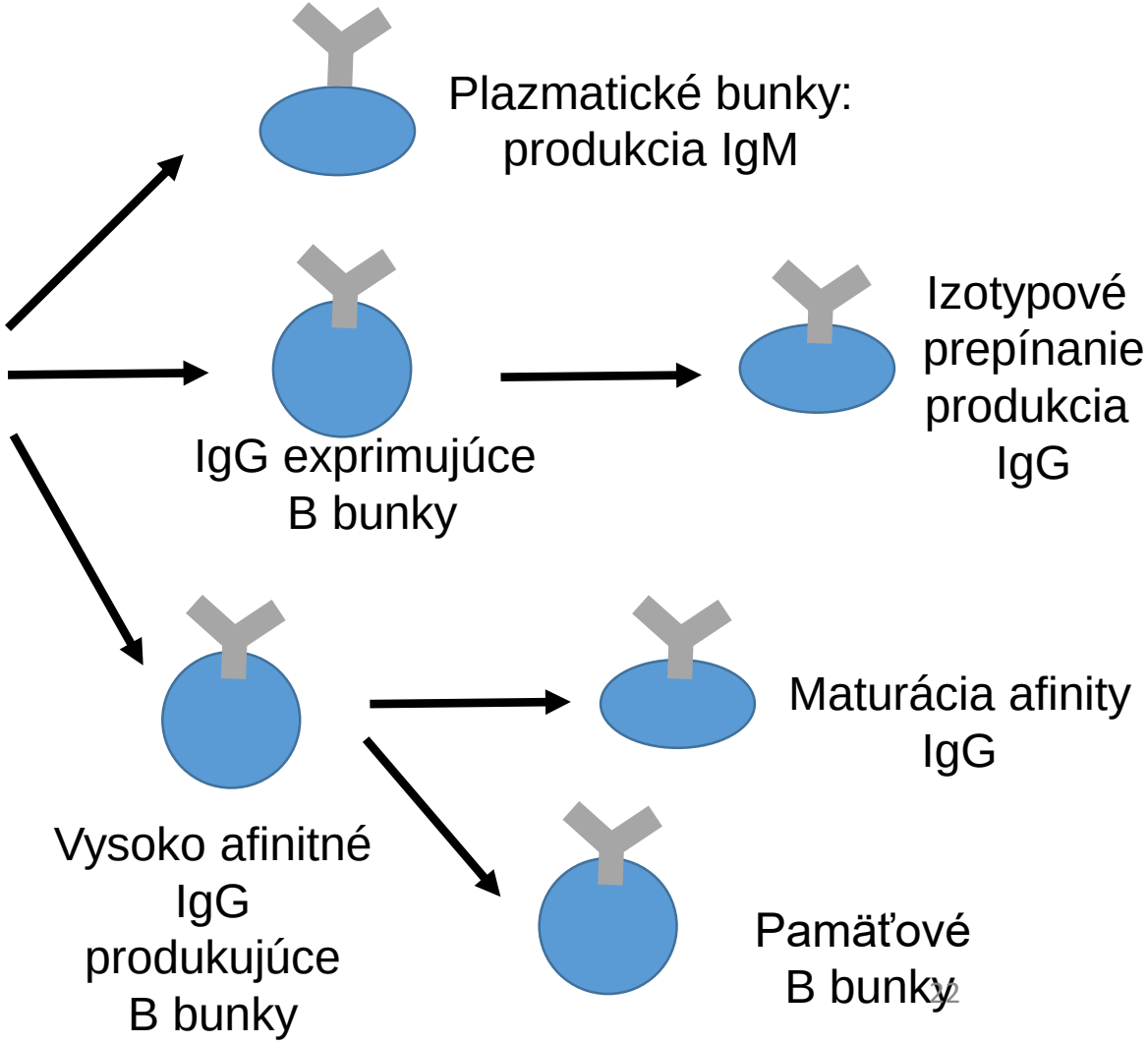
- Vysoká koncentrácia protilátok
- Vyššia špecifičnosť protilátok ako dôsledok maturácie afinity a izotypového prepínania
- 1-3 dni potrebné na expresiu/produkciu
- Zvýšené množstvo IgG

Imunitná odpoveď: expresia protilátok

1. Rozpoznávacia fáza



2. Aktivačná fáza: proliferácia a diferenciácia B buniek



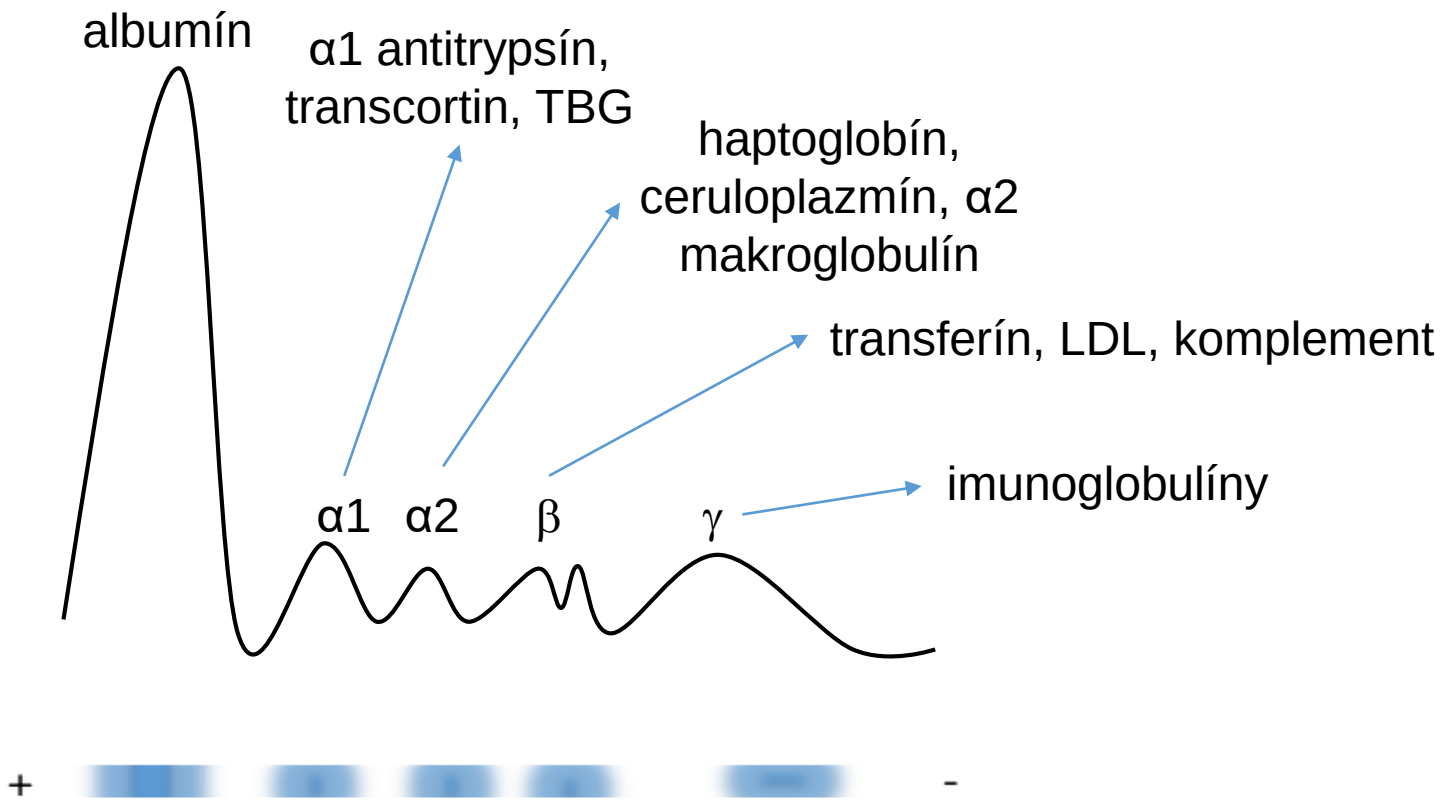
Elektroforéza proteínov krvného séra

Laboratórny test na analýzu špecifických proteínov: globulínov

- Krvné sérum: žltá tekutina získaná po centrifugácií vyzrážanej krvi, (odstránené bunky, zrážacie faktory)
- Elektroforéza: rozdelenie proteínov podľa veľkosti a náboja
- 5 frakcií: albumín, $\alpha 1$, $\alpha 2$, β a γ
- Analýza patologických stavov

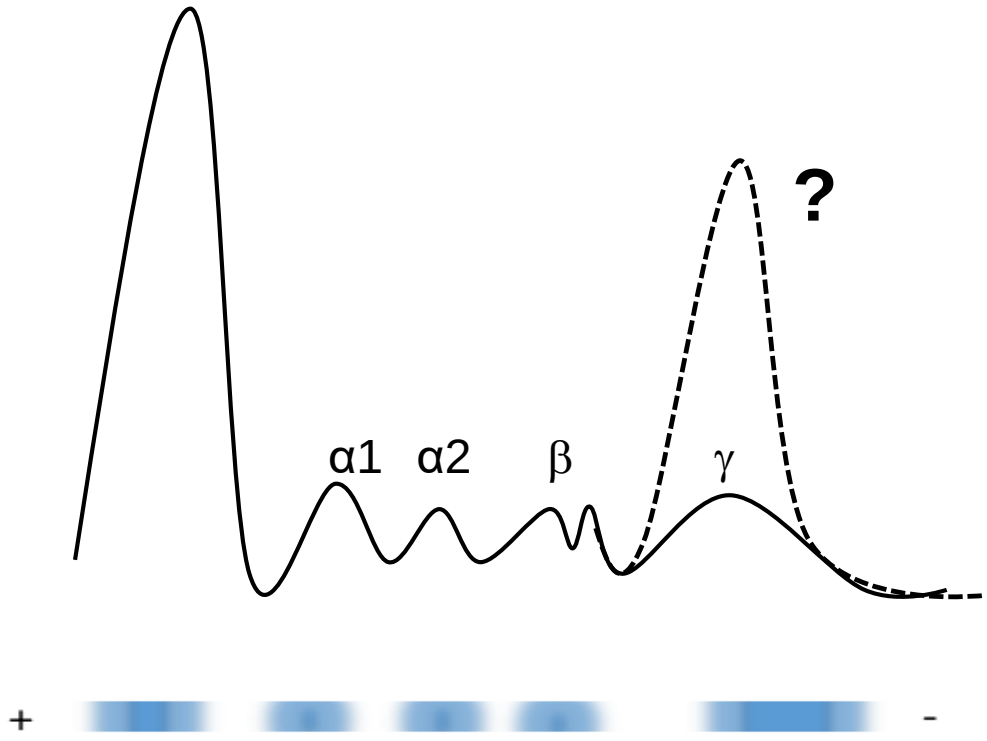
Elektroforéza proteínov krvného séra

- **5 frakcií: albumín, α1, α2, β a γ.**



Elektroforéza proteínov krvného séra

- **5 frakcií: albumín, α1, α2, β a γ**



Elektroforéza proteínov krvného séra

Patologické stavy nadprodukcie imunoglobulínov:

Odborný názov: monoklonálne gammopathie

- Nadprodukcia výhradne ľahkého reťazca: Bence-Jones proteín
- Nadprodukcia výhradne ťažkého reťazca
- Nadprodukcia kompletných protilátok
  - kryoglobulinémia
  - makroglobulinémia, napr. Waldenströmova makroglobulinémia

2. Všeobecné vlastnosti imunoglobulínov

2. Všeobecné vlastnosti imunoglobulínov

2.1. Základna stavba imunoglobulínov

2.2. Polyklonálne a monoklonálne imunoglobulíny

2.3. Označovanie imunoglobulínov

2.4. Typy, triedy a idiotypy imunoglobulínov

2.5. Trieda IgG

2.6. Trieda IgA

2.7. Trieda IgM

2.8. Trieda IgD

2.9. Trieda IgE

2. Všeobecné vlastnosti imunoglobulínov

Ciele

- Pochopiť rozdiel medzi monoklonálnymi a polyklonálnymi protilátkami
- Získať vedomosti o príprave monoklonálnych protilátok
- Pochopiť všeobecné princípy štruktúry protilátok
- Oboznámiť sa s produkciou protilátok v prenatálnom a postnatálnom období

Problém heterogenity imunoglobulínov

Problém: imunoglobulíny pripravené zo séra sú zvyčajne veľmi heterogénne, a teda sa líšia svojimi fyzikálnymi, chemickými a imunologickými vlastnosťami v dôsledku variability aminokyselinového zloženia imunoglobulínov

⇩

Bariéra pre štúdium molekulových princípov funkcie imunoglobulínov

Problém heterogenity imunoglobulínov

Riešenie 1: homogénne imunoglobulíny boli získané zo vzoriek pacientov s mnohonásobnými myelómami a u Waldenströmovej makroglobulinémií. Tieto imunoglobulíny boli produkované jedným klonom transformovaných B lymfocytov.

Mínusy

- ❑ práca s materiálom od pacientov
- ❑ len obmedzené typy imunoglobulínov

Problém heterogenity imunoglobulínov

Riešenie 2: umelo vyvolaný tumor plazmatických buniek u myší produkoval taktiež homogénne imunoglobulíny.

Mínusy

- práca s myšami/potkanmi
- len obmedzené typy imunoglobulínov

Všeobecné vlastnosti imunoglobulínov

Polyklonálne protilátky: Po vniknutí cudzorodej látky do organizmu, sa začne produkcia veľkého počtu protilátok, ktoré rozpoznávajú nezávislé epitopy na antigéne. Epitopy predstavujú väzobné miesta protilátok. Každá špecifická protilátka je produkovaná odlišným klonom plazmatických buniek. Krvné sérum je prirodzeným zdrojom polyklonálnych protilátok, ktoré sa po purifikácií používajú pri imunochemických technikách.

Všeobecné vlastnosti imunoglobulínov

Monoklonálne protilátky: Hybridómne bunky sú získané izoláciou prekurzorov plazmatických buniek, ktoré sú fúzované s „nesmrteľnými“ bunkami. Hybridómne bunky môžu byť získané z namnoženia individuálnej jednej bunky, a teda umožňujú získanie klonov produkujúcich len jeden typ protilátok – monoklonálne protilátky. Hlavnou výhodou monoklonálnych protilátok je ich vysoká špecificita. Monoklonálne protilátky sa bežne získavajú zo supernatantu bunkových kultúr.

Problém heterogenity imunoglobulínov

Riešenie: hybridómna technika

1
- Výber vhodného antigénu (napr. peptid, proteín)
- Imunizácie myš/potkan/králik
- Izolácia buniek sleziny

2
- Príprava „nesmrteľných“ myelómových buniek
- Fúzia s bunkami sleziny

3
- Kultivácia
- Selekcia hybridómov pomocou HAT média
- HAT = hypoxantín-aminopterín-thymidín-ové médium

4
- Testovanie hrubého bezbunkového extraktu a výber bunkovej línie
- Produkcia a sekrécia protilátok
- Purifikácia

monoklonálne protilátky

Problém heterogenity imunoglobulínov (pokr.)

Selekcia hybridómov pomocou HAT média

Aminopterín: Blokuje dihydrofolátreduktázu, a tým kľúčové procesy v metabolických dráhach produkujúcich deoxynukleotidy potrebné pre *de novo* DNA syntézu a pre bunkové delenie. V prípade dodania hypoxantínu a tymidínu z vonkajšieho prostredia sú dNTP produkované tzv. záchrannou cestou (salvage pathway).

Hypoxantín: Prekurzor purínových báz, intermediáty potrebné pre *de novo* syntézu DNA: produkcia deoxynukleotidov pomocou alternatívnej záchrannej cesty.

Tymidín: Intermediáty potrebné pre *de novo* syntézu DNA: produkcia deoxynukleotidov pomocou alternatívnej záchrannej cesty.

Problém heterogenity imunoglobulínov

Selekcia hybridómov pomocou HAT média

- **B lymfocyty zo sleziny:** Krátky životný cyklus, prirodzene zomrú.
- **Nesmrteľné myelómové bunky:** Majú odstránený enzým potrebný pre alternatívnu záchranu syntézu deoxyribonukleotidov (salvage pathway) – v prítomnosti aminopterínu bunky umierajú, keďže nevedia prejsť bunkovým delením.
- **Hybridómy:** Fúzia B buniek a myelómových buniek umožňuje vďaka genetickej informácií z B buniek *de novo* DNA syntézu, ktorá umožňuje funkčnú záchrannú metabolickú dráhu, ktorá nie je zablokovaná aminopterínom a je navyše podporovaná prítomnosťou hypoxantínu a tymidínu v médiu.

Všeobecné vlastnosti imunoglobulínov

Imunoglobulíny: Y

- Heterodiméry zložené z 4 polypeptidových reťazcov
- 2 ťažké reťazce (H z ang. heavy), ca. 50-60 kDa: 445-576 aminokyselín
- 2 ľahké reťazce (L z ang. light), ca. 23 kDa: 215 aminokyselín
- H reťazec a L reťazec sú navzájom spojené disulfidickými väzbami
- Sú špecificky glykozylované dvomi alebo viacerými cukrovými zvyškami – zvyčajne na ťažkom reťazci
- Niektoré tzv. membránové formy majú na C konci peptidovú časť, ktorá definuje ich umiestnenie v rámci bunkovej membrány (napr. B-bunky)

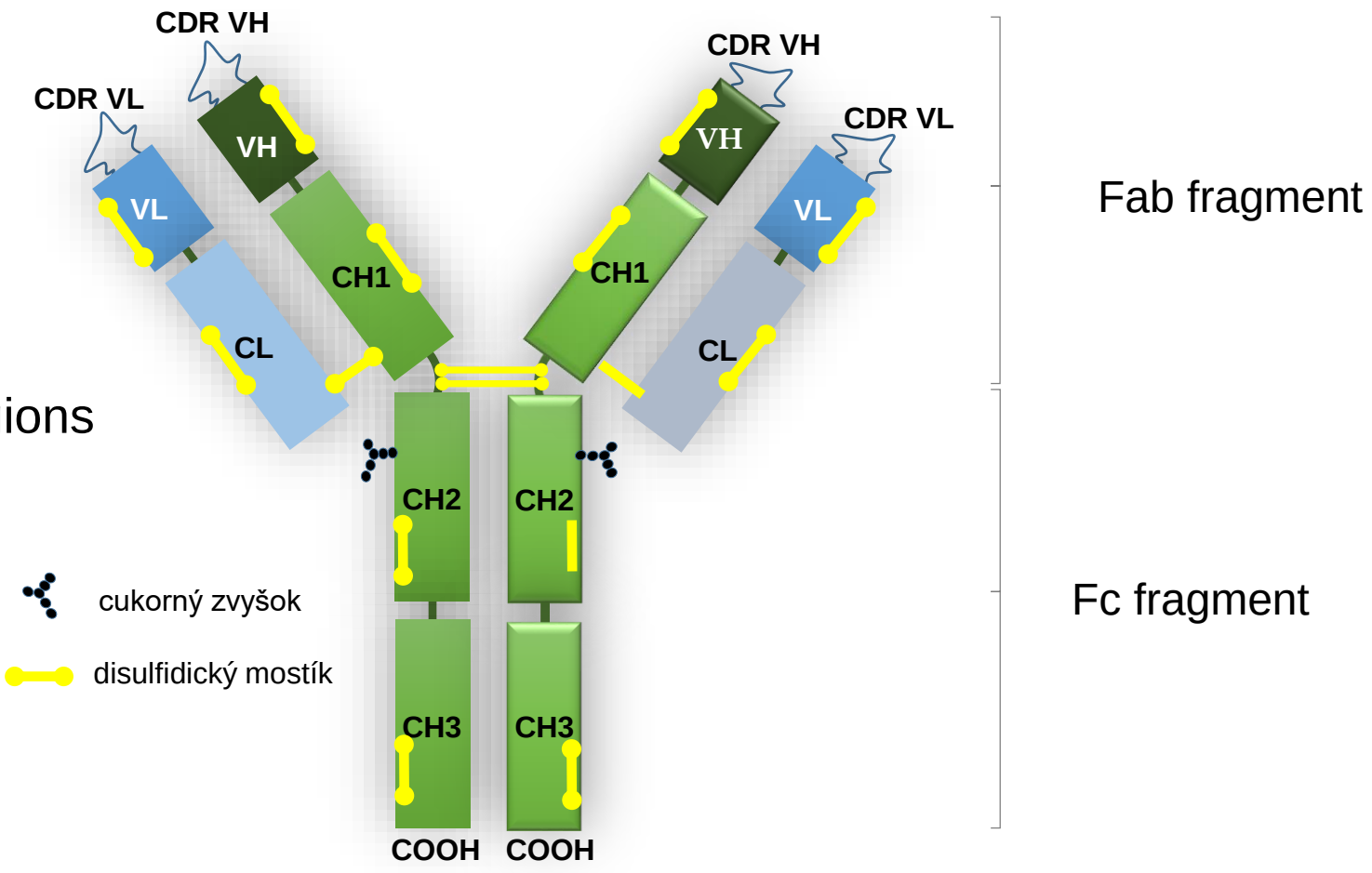
Všeobecné vlastnosti imunoglobulínov (pokr.)

Polymérne imunoglobulíny:

- sa skladajú z 2-6 podjednotiek, každá podjednotka obsahuje 4 polypeptidové reťazce
- obsahujú dodatočne 1-2 peptidové reťazce, ktorých úlohou je tvorba a stabilizácia polymérnej formy IgG

Všeobecné vlastnosti imunoglobulínov

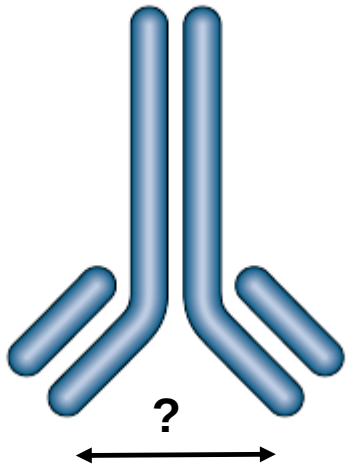
Základná štruktúra imunoglobulínov



CDR: z ang. complementarity determing regions
VH: z ang. variable heavy chain
VL: z ang. variable light chain
CH: z ang. constant heavy chain
CL: z ang. constant light chain

Všeobecné vlastnosti imunoglobulínov

Aká je fyzická vzdialenosť medzi dvoma antigén viažucimi miestami?



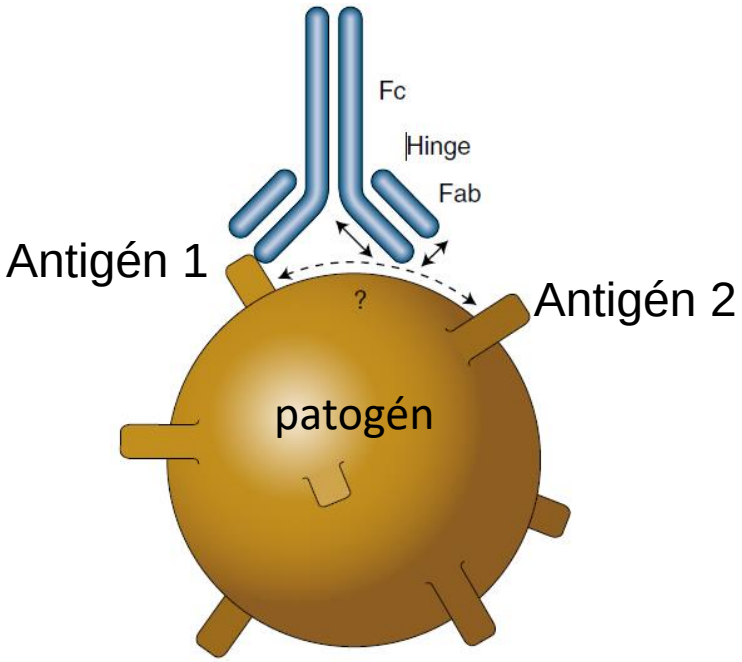
Biofyzikálne merania

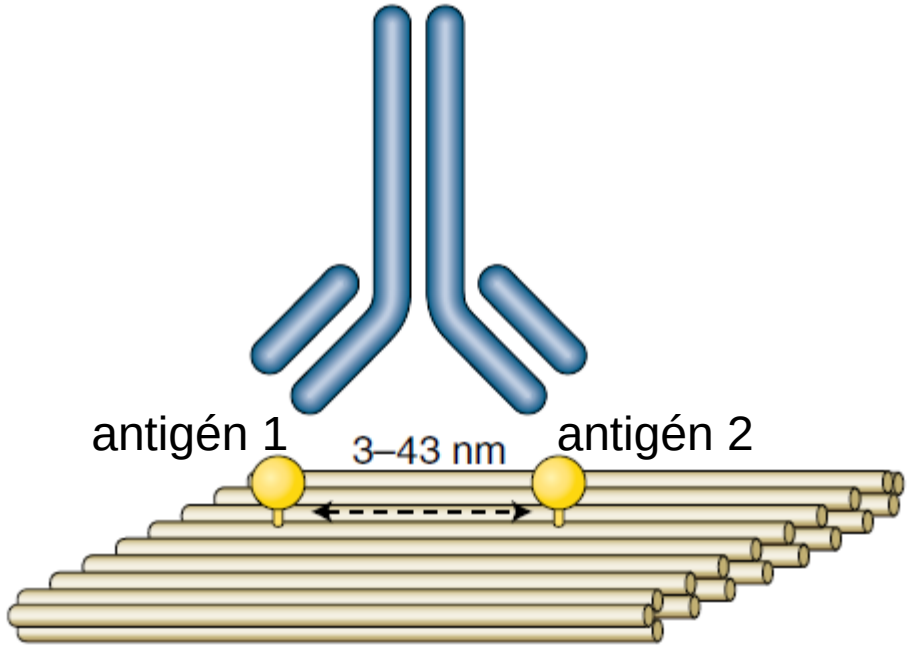
- Fluorescenčný rezonančný transfer energie (FRET)
- Elektrónová mikroskopia
- DNA origami

Shaw A, Hoffecker IT, Smyrlaki I, Rosa J, Grevys A, Bratlie D, Sandlie I, Michaelsen TE, Andersen JT, Högberg B. Binding to nanopatterned antigens is dominated by the spatial tolerance of antibodies. Nat Nanotechnol. 2019 Feb;14(2):184-190. doi: 10.1038/s41565-018-0336-3.
Tolar P. Great stretches for your antibody workout. Nat Nanotechnol. 2019 Feb;14(2):101-102. doi: 10.1038/s41565-018-0354-1.

Všeobecné vlastnosti imunoglobulínov

Aká je fyzická vzdialenosť medzi dvoma antigén viažucimi miestami?





DNA origami

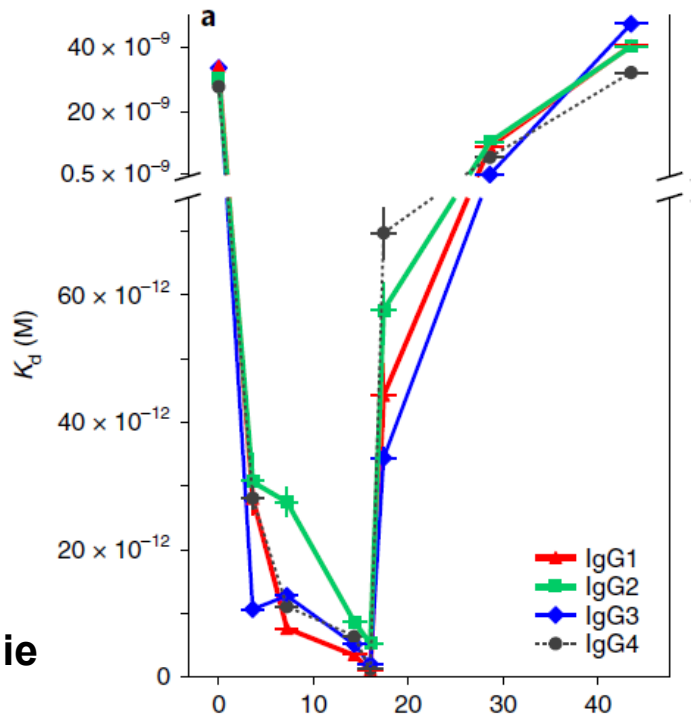
Shaw A, Hoffecker IT, Smyrlaki I, Rosa J, Grevys A, Bratlie D, Sandlie I, Michaelsen TE, Andersen JT, Högberg B. Binding to nanopatterned antigens is dominated by the spatial tolerance of antibodies. Nat Nanotechnol. 2019 Feb;14(2):184-190. doi: 10.1038/s41565-018-0336-3.
Tolar P. Great stretches for your antibody workout. Nat Nanotechnol. 2019 Feb;14(2):101-102. doi: 10.1038/s41565-018-0354-1.

Všeobecné vlastnosti imunoglobulínov

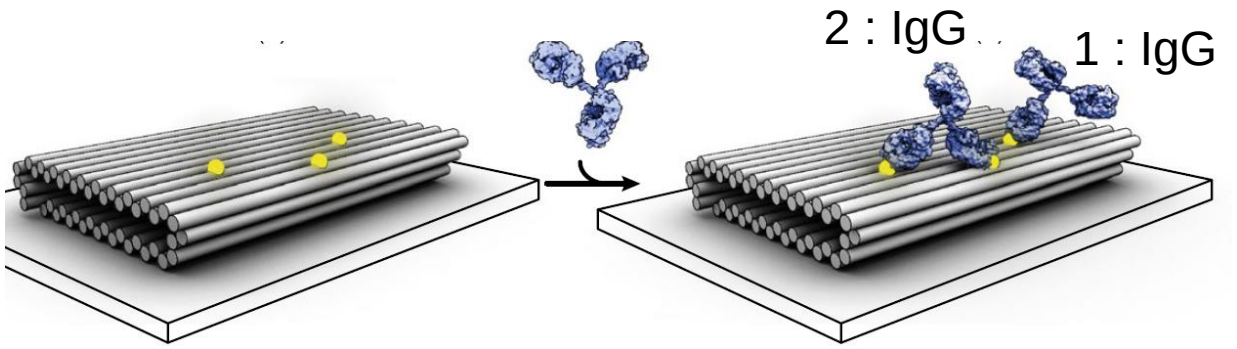
Aká je fyzická vzdialenosť medzi dvoma antigén viažucimi miestami?

silné viazanie

veľmi silné viazanie



Vzdialenosť medzi antigénmi



- pri ca. 16 nm vzdialenosti antigénov dochádza k najsilnejšiemu viazaniu IgG
- IgM dokáže viazať obidva antigény s rozstupom 3-17 nm

Shaw A, Hoffecker IT, Smyrlaki I, Rosa J, Grevys A, Bratlie D, Sandlie I, Michaelsen TE, Andersen JT, Högberg B. Binding to nanopatterned antigens is dominated by the spatial tolerance of antibodies. Nat Nanotechnol. 2019 Feb;14(2):184-190. doi: 10.1038/s41565-018-0336-3.
Tolar P. Great stretches for your antibody workout. Nat Nanotechnol. 2019 Feb;14(2):101-102. doi: 10.1038/s41565-018-0354-1.

Triedy imunoglobulínov

Základné delenie imunoglobulínov

- 5 základných tried (izotypov): IgG, IgA, IgM, IgD, IgE

Ťažké reťazce sa líšia: primárna štruktúra, zloženie cukrov, antigénne vlastnosti

Ľahké reťazce: dva typy lambda(λ) alebo kappa (κ), ktoré sa líšia primárnou štruktúrou a antigénnymi vlastnosťami

Pomer κ:λ sa líši u jednotlivých druhov:

- 60:40 – u človeka
- 95:5 – myš, potkan, králik
- Prevažne len λ – mačka, pes, kura

Tabuľka: Vlastnosti hlavných typov imunoglobulínov

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Molekulový vzorec	$\kappa_2\gamma_2$ $\lambda_2\gamma_2$ monoméry	$\kappa_2\alpha_2$ $\lambda_2\alpha_2$ monoméry, diméry (SC,+J reťazec)	$\kappa_2\mu_2$ $\lambda_2\mu_2$ pentaméry (+J reťazec), hexaméry	$\kappa_2\delta_2$ $\lambda_2\delta_2$ monoméry	$\kappa_2\varepsilon_2$ $\lambda_2\varepsilon_2$ monoméry
Podtriedy	γ1-4	α1-2	-	-	-
Molekulová hmotnosť	150 kDa	160 kDa	950 kDa	180 kDa	190 kDa
Hladina v sére	10 mg/ml	2 mg/ml	1,2 mg/ml	0,04 mg/ml	$3x10^{-4}$ mg/ml
Polčas degradácie	23 dní	5-6 dní	5 dní	2,8 dní	2,5 dňa
Obsah oligosacharidov	3%	7,5%	12%	12%	12%

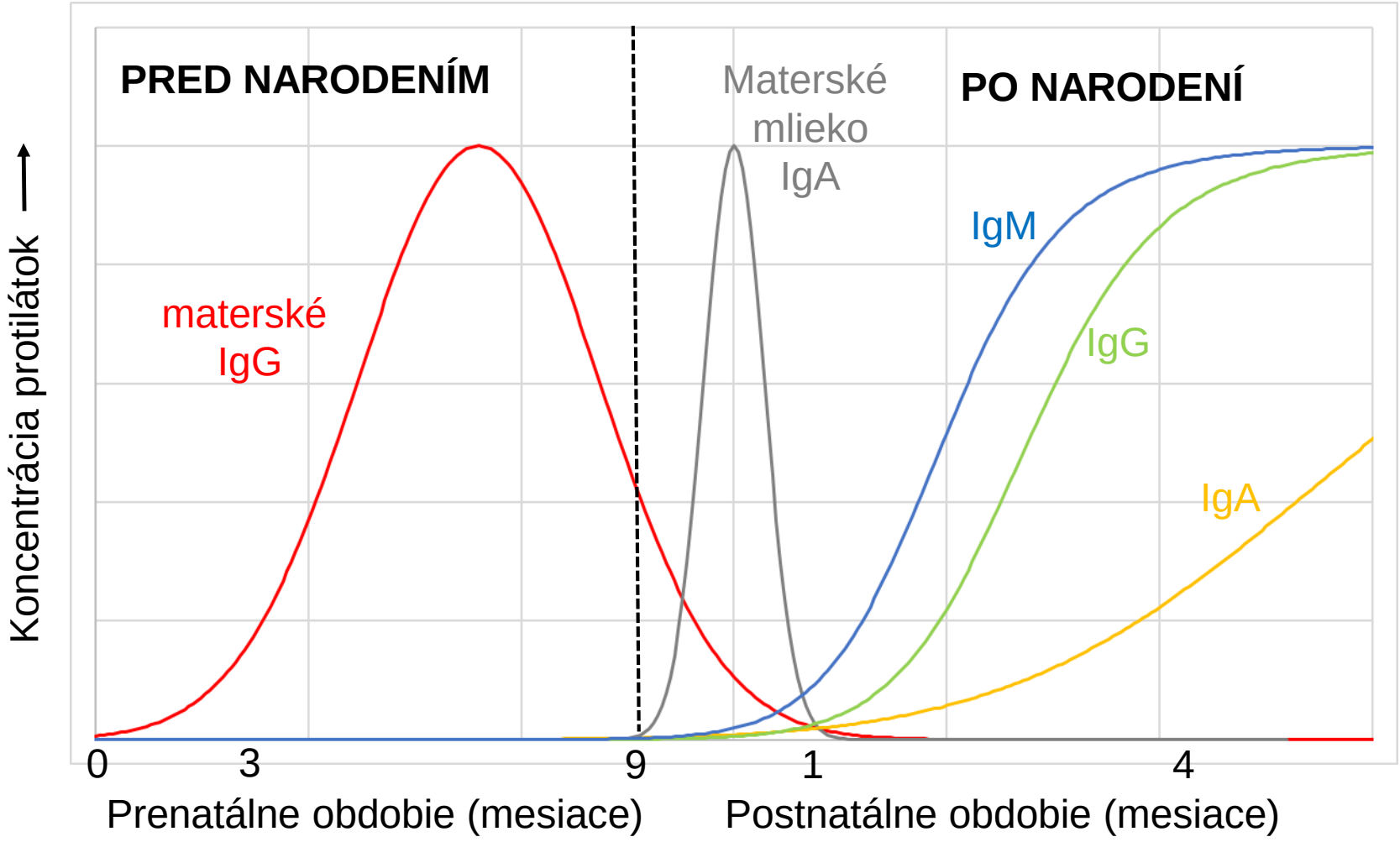
Triedy imunoglobulínov

Základné triedy imunoglobulínov

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
	$\kappa_2\gamma_2$ $\lambda_2\gamma_2$ monoméry	$\kappa_2\alpha_2$ $\lambda_2\alpha_2$ monoméry, diméry (SC,+J reťazec)	$\kappa_2\mu_2$ $\lambda_2\mu_2$ pentaméry (+J reťazec), hexaméry	$\kappa_2\delta_2$ $\lambda_2\delta_2$ monoméry	$\kappa_2\varepsilon_2$ $\lambda_2\varepsilon_2$ monoméry
Štruktúra:					
Izoelektrický bod	5,0-9,5	5,2-6,0	5,1-7,8	5,0-9,5	5,0-9,5

Všeobecné vlastnosti imunoglobulínov

Produkcia imunoglobulínov počas prvých mesiacov od narodenia



Triedy imunoglobulínov

Ľahké reťazce: <u>génová organizácia u ľudí</u>

- Rozloženie do 3 segmentov: V (z ang. *variable*), J (z ang. *junction*) a C (z ang. *constant*) gény
- 73 génov kódujúcich V segment: 40 Vκ, 33 Vλ
- 9 génov kódujúcich J segment: 5 Jκ a 4 Jλ
- 6 génov kódujúcich C segment: 1 Cκ a 5C λ
- Lokalizácia IGK (kappa reťazec, 2p11.2), a IGL (lambda reťazec, 22q11.2)

Triedy imunoglobulínov

Ťažké reťazce: <u>génová organizácia u ľudí</u>

- rozloženie do 4 segmentov: V (z ang. *variable*), J (z ang. *junction*), D (diversity) a C (z ang. *constant*) gény
- 45 génov kódujúcich V segment
- 6 génov kódujúcich J segment
- C segment: pre každý izotyp t.j. 5
- IGH (heavy – ťažký reťazec, 14q32.33)

Všeobecné vlastnosti imunoglobulínov

IgA2m

Imunoglobulín (Ig)

Trieda (G, A, M, D, E)

Podtrieda (1, 2...)

Alelická varianta

Ľudské Ig

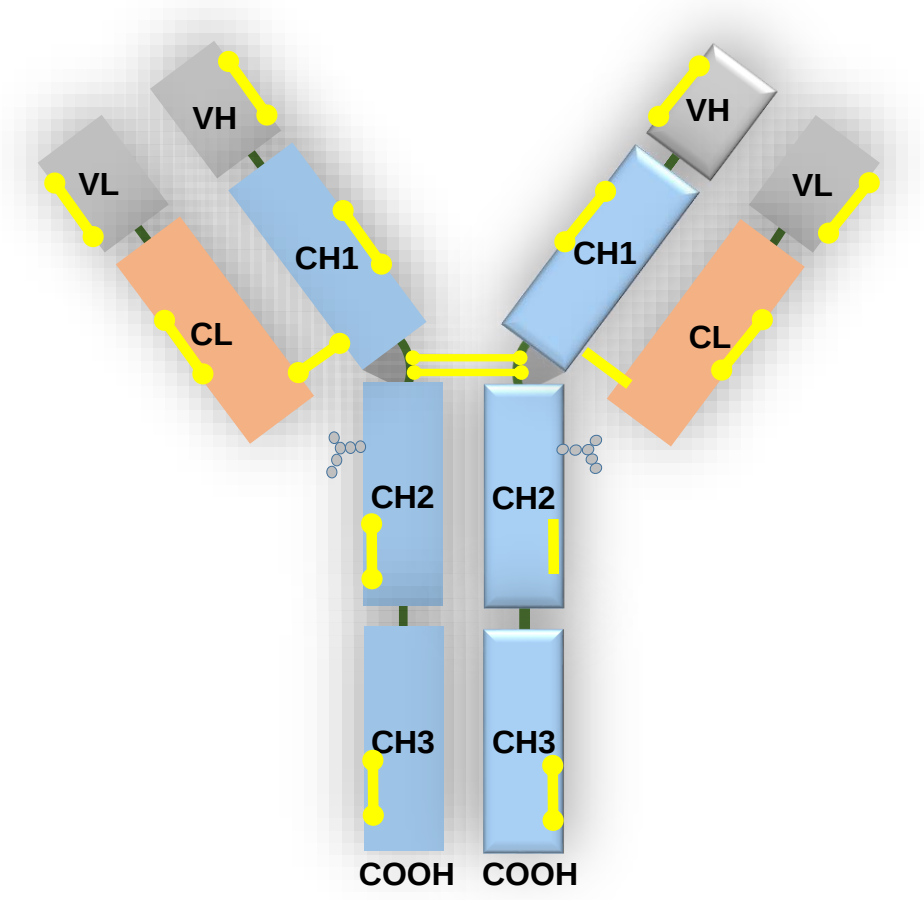
Ťažké reťazce (G → γ, A → α , M → μ, D → δ, E → ε)

Ľahké reťazce (λ, κ)

Názvoslovie a pojmy u imunoglobulínov

Pojem: izotyp (trieda)

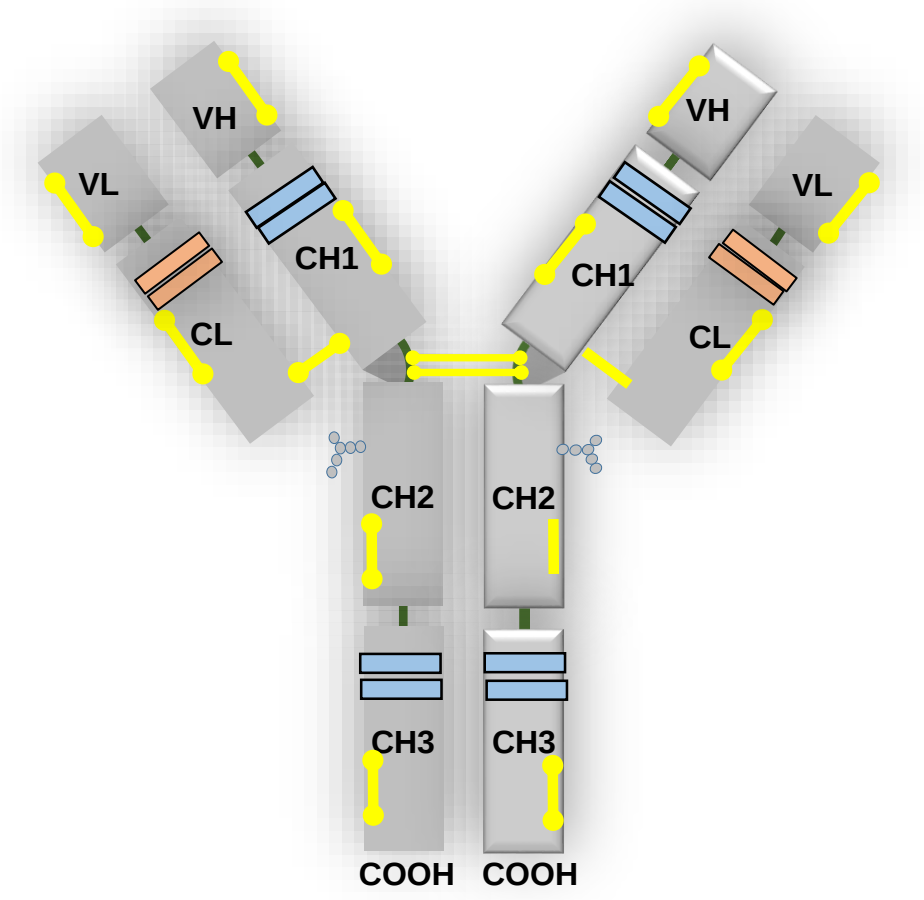
- Produkt rozličných štruktúrnych génov, C_H a C_L
- U človeka 5 tried: IgA, IgG, IgM, IgE, IgM
- Rovnaké u jedincov toho istého živočíšneho druhu



Názvoslovie a pojmy u imunoglobulínov

Pojem: allotyp

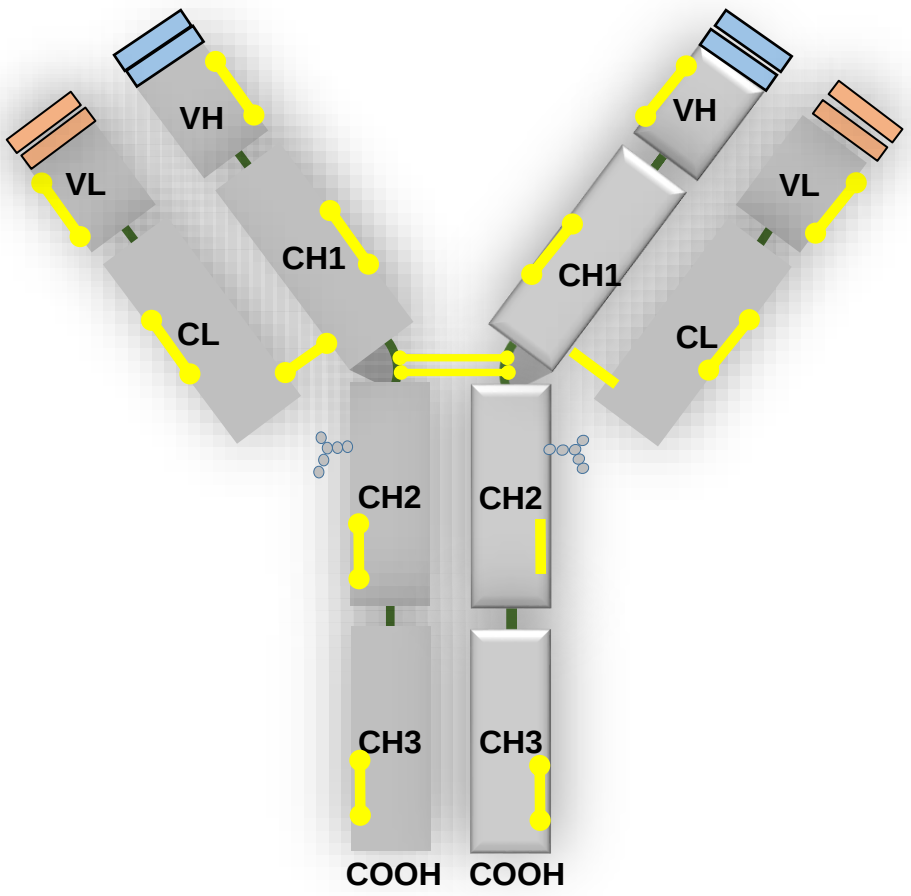
- Len u niektorých jedincov toho istého živočíšneho druhu
- Môže byť nápomocná pri určovaní otcovstva
- Produkty rôznych allel toho istého štruktúrneho génu
- U človeka typické: Gm (H, ťažký reťazec) a Km (L, ľahký reťazec)



Názvoslovie a pojmy u imunoglobulínov

Pojem: idiotyp

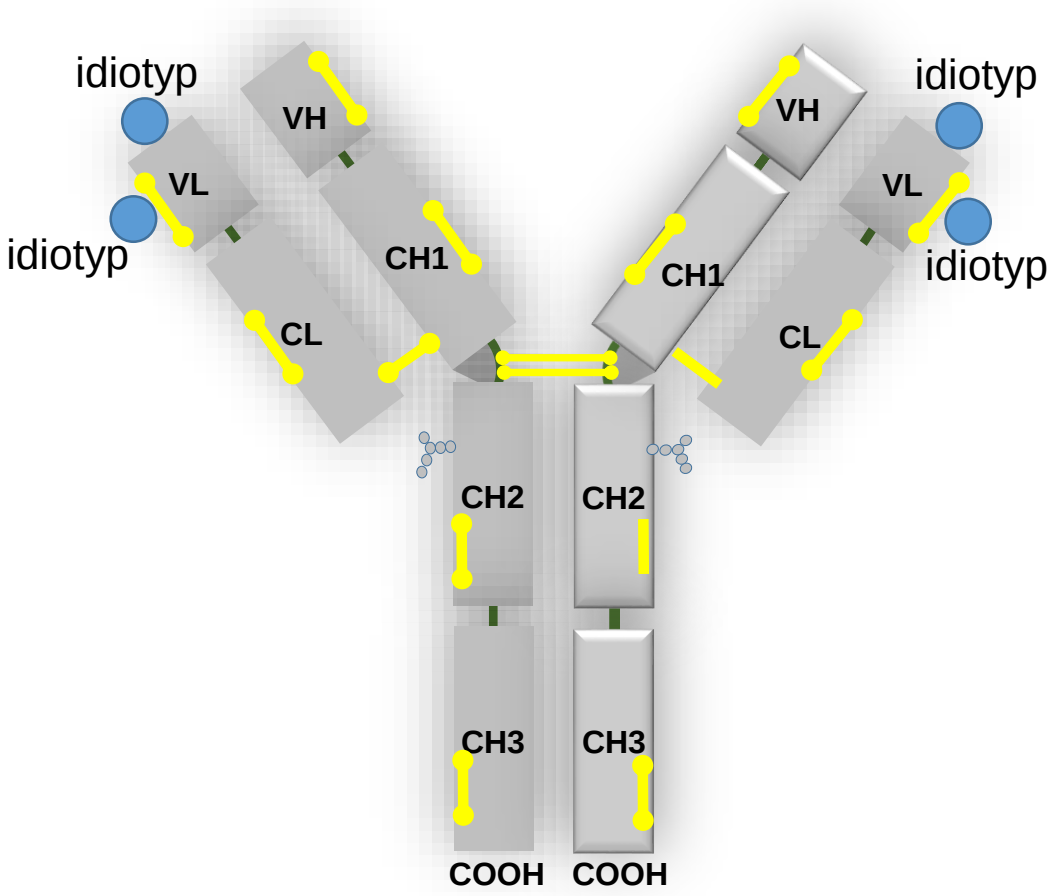
- Hypervariabilné oblasti – antigén viažúce miesto
- Individuálne idiotypy – v organizme určitého jedinca
- Všeobecné idiotypy – u viacerých jedincov



Názvoslovie a pojmy u imunoglobulínov

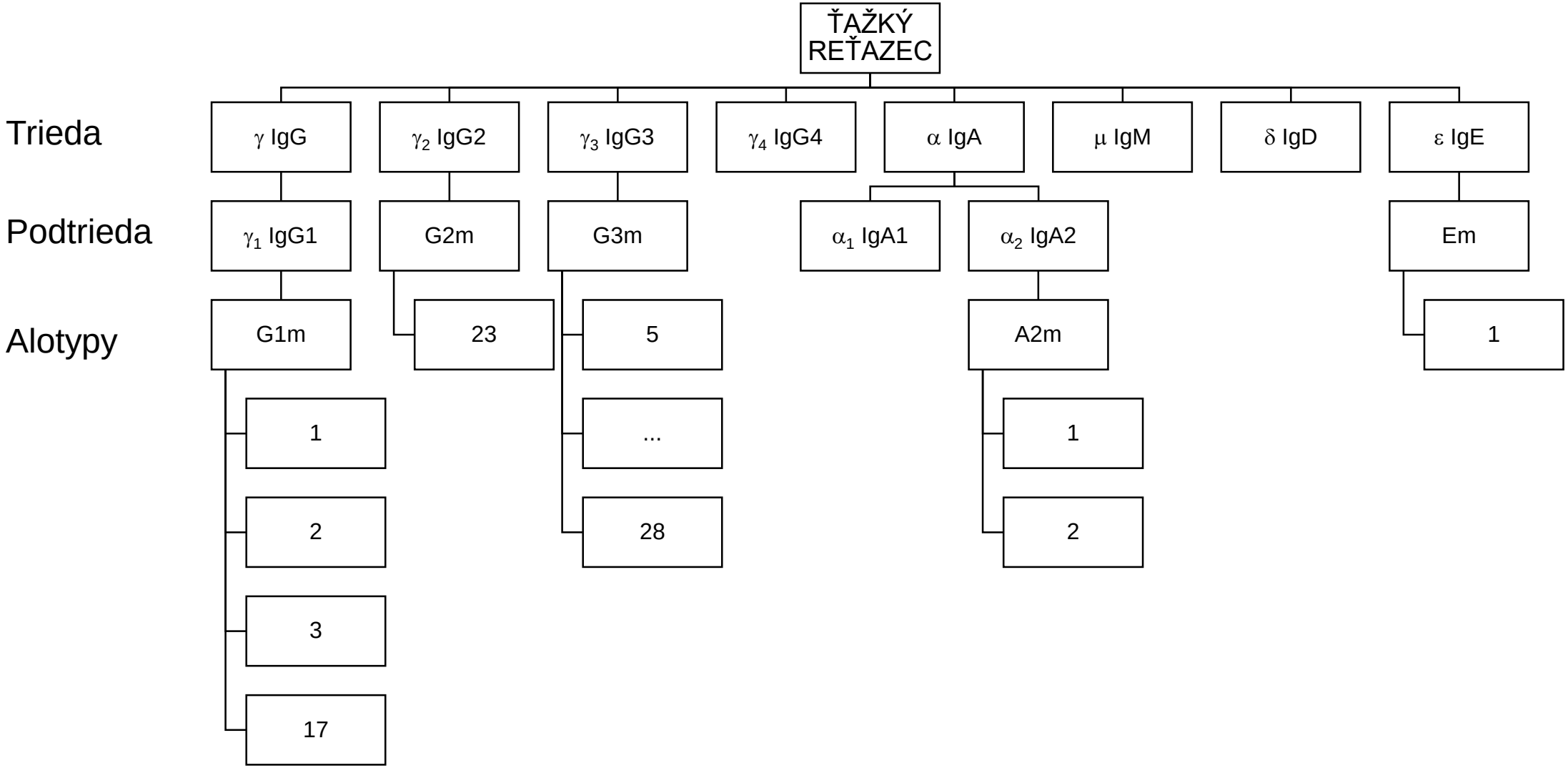
Pojem: idiotyp a anti-idiotyp

- Tvorba nadbytočných protilátok môže vyústiť do patologických stavov
- Anti-idiotypová protilátka predstavuje mechanizmus pre kontrolu koncentrácie protilátok (idiotypov) po zneškodnení agensu
- Anti-idiotop rozpoznáva paratopové miesto priamo resp. v blízkosti antigén viažúceho miesta
- o.i. Praktické využitie pre farmakokinetické sledovanie, imuno-assay



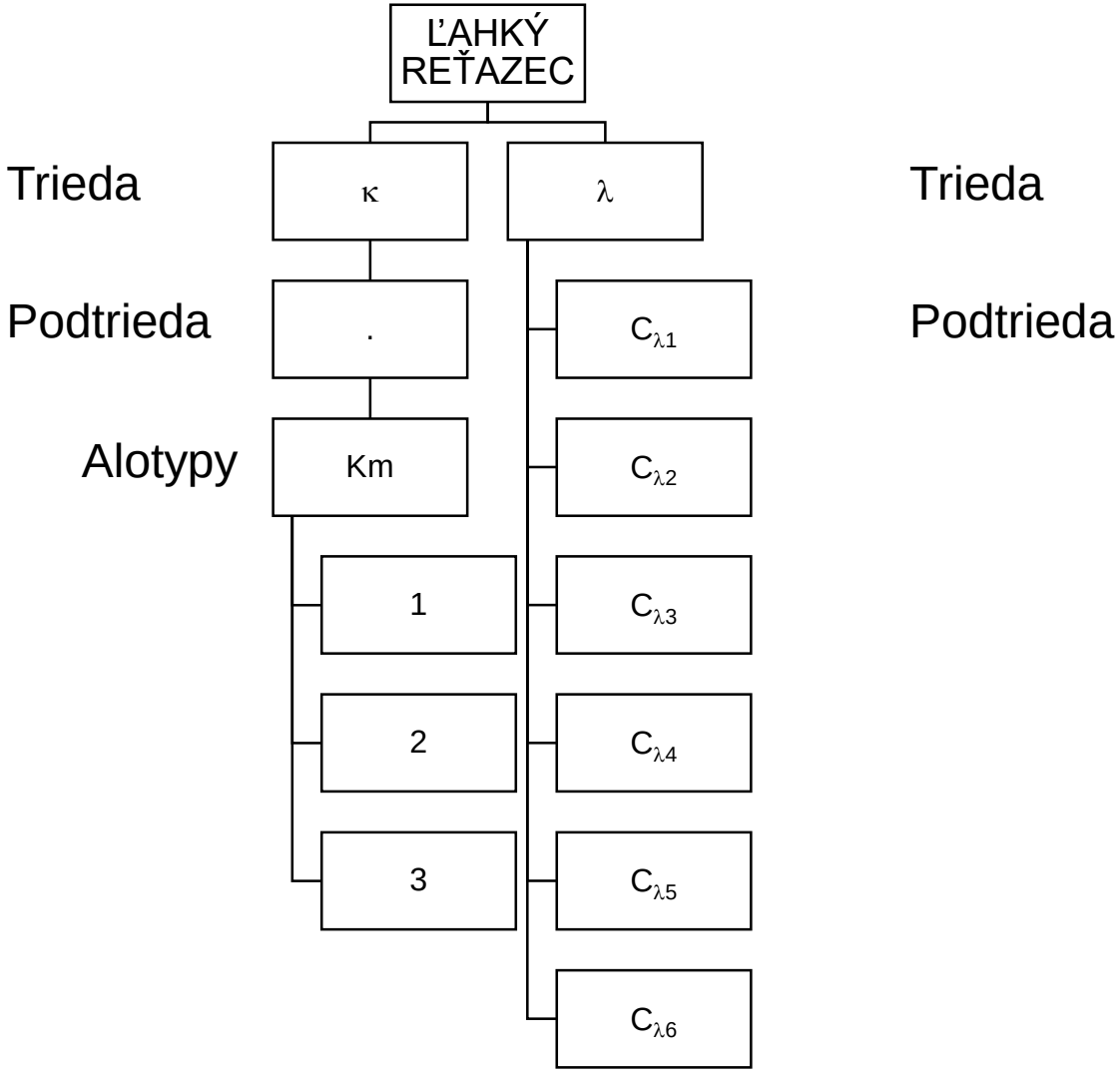
Názvoslovie a pojmy u imunoglobulínov

Zhrnutie



Názvoslovie a pojmy u imunoglobulínov

Zhrnutie



V(D)J rekombinácia a somatické hypermutácie – zdroj variability protilátok

Jednotlivé časti protilátok sú kódované odlišnými segmentami DNA, ktoré sa počas vývoja lymfocytu spájajú procesom zvaným V(D)J rekombinácia (z ang. variable-diversity-joining).

V prvom kroku RAG-1 a RAG-2 endonukleázy (z ang. recombination activating genes) rozpoznávajú špecifické sekvencie, ktoré slúžia ako signály pre rekombináciu a následne štiepia DNA, pričom vzniká zlom v obidvoch vláknach DNA.

Rekombinácia je ukončená spojením DNA vlákien pomocou NHEJ mechanizmu (z ang. nonhomologous end joining) alebo homológnou rekombináciou (HR).

Zhang L, Reynolds TL, Shan X, Desiderio S. Coupling of V(D)J recombination to the cell cycle suppresses genomic instability and lymphoid tumorigenesis. Immunity. 2011 Feb 25;34(2):163-74. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.003.
Gellert M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. Annu Rev Biochem. 2002;71:101-32. Epub 2001 Nov 9. Review.
Fukushima T, Takata M, Morrison C, Araki R, Fujimori A, Abe M, Tatsumi K, Jasin M, Dhar PK, Sonoda E, Chiba T, Takeda S. Genetic analysis of the DNA-dependent protein kinase reveals an inhibitory role of Ku in late S-G2 phase DNA double-strand break repair. J Biol Chem. 2001 Nov 30;276(48):44413-8.

V(D)J rekombinácia a somatické hypermutácie – zdroj variability protilátok

RAG -2 proteín je silne kontrolovaný počas bunkového cyklu – nekontrolovaná aktivita vedie k závažným defektom a potenciálne k tvorbe tumoru.

U cicavcov NHEJ mechanizmus dominuje počas G1 fázy a skorej S fázy a HR sú spolu so NHEJ aktívne v neskorej S a v G2 fáze.

Variabilné oblasti Ig génov prechádzajú procesom deaminácie deoxycytidínu, ktorá vedie k somatickej hypermutácií.

Deaminácia IgV lokusu je katalyzovaná AID deaminázou (z ang. activation-induced deaminase) prítomnou výhradne v B lymfocytoch.

Zhang L, Reynolds TL, Shan X, Desiderio S. Coupling of V(D)J recombination to the cell cycle suppresses genomic instability and lymphoid tumorigenesis. Immunity. 2011 Feb 25;34(2):163-74. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.003.
Gellert M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. Annu Rev Biochem. 2002;71:101-32. Epub 2001 Nov 9. Review.
Fukushima T, Takata M, Morrison C, Araki R, Fujimori A, Abe M, Tatsumi K, Jasin M, Dhar PK, Sonoda E, Chiba T, Takeda S. Genetic analysis of the DNA-dependent protein kinase reveals an inhibitory role of Ku in late S-G2 phase DNA double-strand break repair. J Biol Chem. 2001 Nov 30;276(48):44413-8.

Zhrnutie hlavných črt jednotlivých typov: IgG

Imunoglobulíny G, IgG

- Hlavná trieda imunoglobulínov – takmer 75% sérových imunoglobulínov
- Obsahuje 2 ľahké a 2 ťažké reťazce, ktoré obsahujú identické antigén viažúce miesta
- Pri elektroforéze sérových proteínov v alkalickom pH IgG sa pohybuje najpomalšie
- Obsahuje ca. 3% oligosacharidov
- V prípade sekundárnej imunizácie B lymfocyty produkujú takmer výhradne IgG
- IgG dokáže preniknúť do placenty a dokáže vstúpiť aj do extravaskulárnych priestorov

Zhrnutie hlavných črt jednotlivých typov: IgG

Imunoglobulíny G, IgG

- IgG sa viaže na Fc_{γ} receptory, ktoré sú prítomné na povrchu makrofágov a iných buniek – signál, ktorý spúšťa deštrukciu nebezpečných zárodkov

- U človeka existujú 4 podtriedy IgG líšiace sa primárnou štruktúrou v ťažkom reťazci. U králika je len jeden podtyp, 2 podtypy u ovce a 5 u koňa

- U γ1 disulfidický mostík medzi ľahkým a ťažkým reťazcom vytvára cysteín 220, u ostatných podtried je to cysteín 131

Vlastnosti podtried IgG

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
% v sére z celkových IgG	66	23	7	4
Počet disulfidických mostíkov	2	4	11	2
Viazanie na proteín A	+	+	-	+
Viazanie na proteín G	+	+	+	+
Väzba na **FCγRI** **FCγRII** **FCγRIII**	 + + +	 - - -	 + + +	 + - -

Vlastnosti podtried IgG

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Gm allotypy	4	1	13	-
Veľkosť pántovej oblasti	15	12	62	12
CDC	+++	+	++	-
ADCC	+++	+/-	++	-

CDC: z ang. complement-dependent cytotoxicity je funkčná vlastnosť protilátok, ktoré po naviazaní na antigén spúšťajú klasickú komplementovú dráhu, pričom vzniká terminálny komplementový komplex (TCC). TCC komplex vytvára transmembránové helixy, čo vedie k lýze a usmrteniu cieľovej (patogénnej) bunky.

ADCC: z ang. antibody-dependent cellular cytotoxicity, je funkčná vlastnosť protilátok, ktorých Fc časti sú po naviazaní na antigén rozpoznané bunkami imunitného systému (napr. natural killer, NK bunky), pričom tieto bunky aktívne usmrcujú cieľové (patogénne) bunky.

Databáza sekvencií imunoglobulínov

https://www.uniprot.org/

Príklad sekvencie imunoglobulínu

>sp|P01857|IGHG1_HUMAN Immunoglobulin heavy constant gamma 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGHG1 PE=1 SV=1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Databáza sekvencií imunoglobulínov

Variabilita v izoelektrickom bode ťažkých reťazcov: pomer **Arg+Lys** a **Asp+Glu**

IGHG1

Počet aminokyselín: 330
Molekulová hmotnosť: 36105,91
Vypočítané pI: 8,46

Zloženie aminokyselín:

Ala (A)	13	3,9%
Arg (R)	**6**	**1,8%**
Asn (N)	15	4,5%
Asp (D)	**13**	**3,9%**
Cys (C)	9	2,7%
Gln (Q)	11	3,3%
Glu (E)	**17**	**5,2%**
Gly (G)	18	5,5%
His (H)	9	2,7%
Ile (I)	5	1,5%
Leu (L)	26	7,9%
Lys (K)	**28**	**8,5%**
Met (M)	2	0,6%
Phe (F)	10	3,0%
Pro (P)	31	9,4%
Ser (S)	39	11,8%
Thr (T)	26	7,9%
Trp (W)	5	1,5%
Tyr (Y)	12	3,6%
Val (V)	35	10,6%

IGHG4

Počet aminokyselín : 327
Molekulová hmotnosť : 35940,56
Vypočítané pI : 7,18

Zloženie aminokyselín :

Ala (A)	11	3,4%
Arg (R)	**8**	**2,4%**
Asn (N)	14	4,3%
Asp (D)	**12**	**3,7%**
Cys (C)	9	2,8%
Gln (Q)	12	3,7%
Glu (E)	**20**	**6,1%**
Gly (G)	18	5,5%
His (H)	7	2,1%
Ile (I)	4	1,2%
Leu (L)	25	7,6%
Lys (K)	**24**	**7,3%**
Met (M)	3	0,9%
Phe (F)	12	3,7%
Pro (P)	29	8,9%
Ser (S)	42	12,8%
Thr (T)	25	7,6%
Trp (W)	5	1,5%
Tyr (Y)	12	3,7%
Val (V)	35	10,7%

Zhrnutie hlavných črt jednotlivých typov: IgA

Imunoglobulíny A, IgA

- Dôležitá úloha pri mukozálnej imunite
- Najviac produkovaný imunoglobulín: výskyt v sére, črevach, exokrinné vylučovanie ako napr. sliny, kolostrum, materské mlieko a slzy.
- Je produkovaný gastrointestinálnymi lymfatickými tkanivami
- Črevná sústava a mukozálne povrchy predstavujú viac než 20x povrchu kože

Zhrnutie hlavných črt jednotlivých typov: IgA

Imunoglobulíny A, IgA

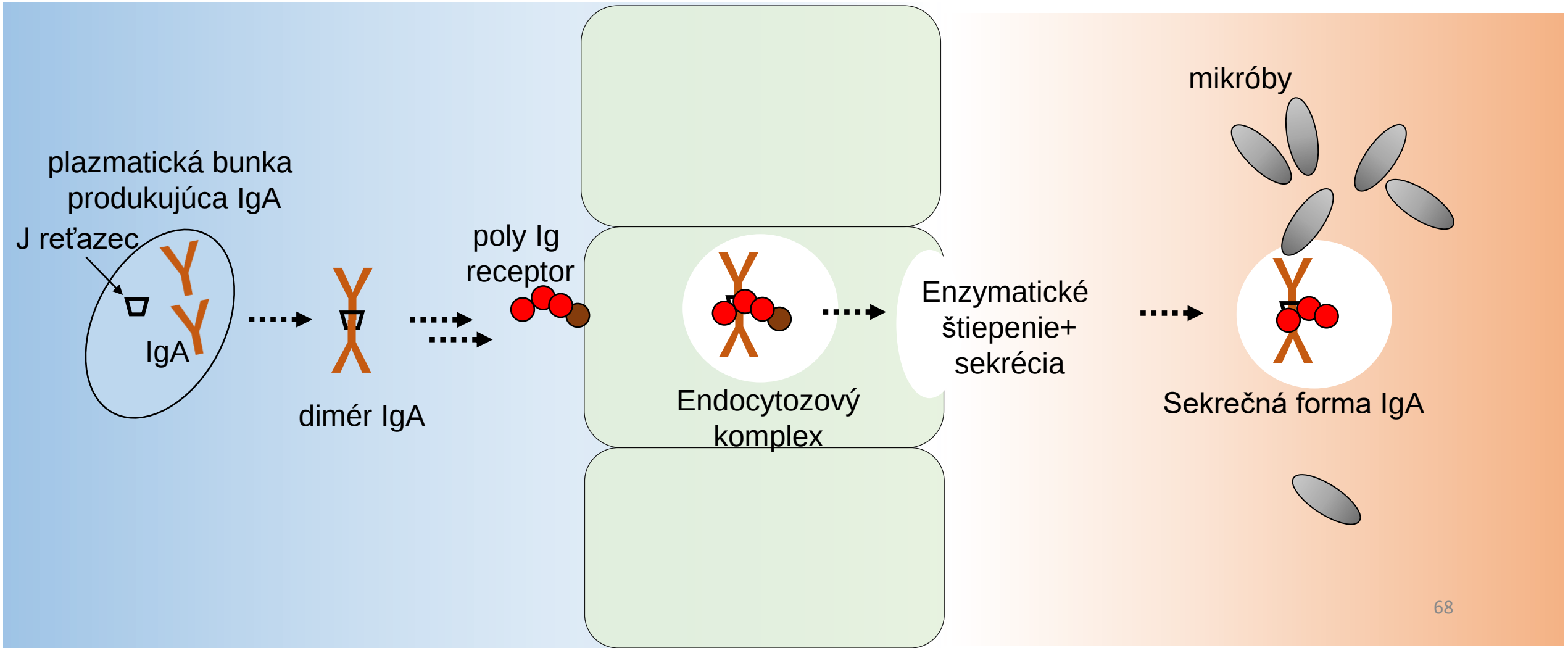
- IgA zabraňujú prieniku mikroorganizmov do mukózneho priestoru, a tým bránia ich invázií do tela
- Sérové IgA sú väčšinou monomérne (80%)
- Úroveň produkcie IgA je rovnaká ako u IgG, ale v sére je koncentrácia IgA hladina nižšia než koncentrácia IgG v dôsledku zrýchleného odbúravania IgA

Zhrnutie hlavných črt jednotlivých typov: IgA

Imunoglobulíny A, IgA

- V sekrétoch je IgA hlavne v dimérnom stave a v menšej miere ako trimér a tetramér
- Diméry a vyššie formy IgA vznikajú po odstránení J (z ang. joining) reťazca a SC (z ang. secretory component) časti.
- U človeka existujú dve IgA podtriedy, IgA1 a IgA2, pričom IgA2 existuje v dvoch allelických variantách A2m(1) a A2m(2)
- IgA1 sa líši od IgA2 na 22 pozíciach a deléciou 13 aminokyselín v tzv. pántovej oblasti
- IgA1 sa vyskytuje predovšetkým v sére ca. 90%, zatiaľ čo 60% IgA v gastrointestinálnom trakte patrí do IgA2 podtriedy

Zhrnutie hlavných črt jednotlivých typov: IgA



Zhrnutie hlavných črt jednotlivých typov: IgM

Imunoglobulíny M, IgM

- Charakteristický svojou vysokou molekulovou hmotnosťou tzv. makroglobulín
- Skladá sa z 5 až 6-tich podjednotiek (IgM monomérov)
- IgM monomér sa skladá z 2 ľahkých a 2 ťažkých reťazcov
- IgM sa nachádzajú v sére v nízkych koncentráciach
- Každý pentamérny IgM sa skladá z celkovo 10 ťažkých reťazcov (μ), 10 ľahkých reťazcov a jedného spojujúceho reťazca (J – z ang. joining)
- V princípe IgM pentamér môže viazať až 10 malých antigénov (hapténových skupín), ale v dôsledku priestorového usporiadania je možná väzba len 5 antigénov

Zhrnutie hlavných črt jednotlivých typov: IgM

Imunoglobulíny M, IgM

- V dôsledku mnohonásobnej prítomnosti väzobných miest sú IgM extrémne efektívne pri aglutinácií a cytolytických reakciách
- B bunky vylučujú funkčne aktívny IgM hexamér, ktorému chýba J reťazec (ca. 5% z celkového IgM)
- Obsahuje až 12% oligosacharidov – silne glykozylovaný
- Je veľmi efektívny aktivátor komplementačnej kaskády – napr. jediná molekula IgM aktivuje komplement C1, čo je napríklad dosiahnuté len viacerými IgG

Zhrnutie hlavných črt jednotlivých typov: IgD

Imunoglobulíny D, IgD

- Minoritná trieda imunoglobulínov
- 2 ťažké a 2 ľahké reťazce $2\delta+2L$
- Extrémne citlivé na proteolýzu
- Môže sa viazať do bunkovej membrány pomocou glykozyl fosfatidylinozitolovej kotvy
- V membránovej forme sú IgD spolu s IgM prítomné na povrchu membrán maturovaných B-lymfocytov a slúžia ako antigénová špecifická časť
- Na povrchu B buniek je množstvo IgD asi o rád nižšie ako IgM

Zhrnutie hlavných črt jednotlivých typov: IgE

Imunoglobulíny E, IgE

- Minoritná trieda imunoglobulínov
- 2 ťažké a 2 ľahké reťazce 2ε+2L
- Dôležitý účastník alergických reakcií
- Fc časť IgE sa viaže na $Fc_{\varepsilon}R$, ktoré sú na povrchu bazofilov a mastocytov
- Interakcia membránovej formy IgE s antigénom spúšťa uvoľnenie chemických signálnych molekúl: histamín, leukotriény, prostaglandíny a chemotaktické faktory
- Spomínané signálne molekuly iniciujú alergické a zápalové procesy a slúžia ako chemoatraktanty pre ostatné bunky
- Hladina IgE počas alergickej reakcie stúpa až niekoľko stonásobne, čo sa využíva pri diagnostike alergických reakcií

Zhrnutie hlavných čŕt jednotlivých typov: IgE

Imunoglobulíny E, IgE

- Bola popísaná aj druhá izoforma ε reťazca, ktorá má pozmenený C koniec – obsahuje 6 dodatočných aminokyselín, čo je skôr typické pre μ a α
- Táto druhá forma IgE je sekrétovaná B-bunkami
- Jednotlivé formy sa líšia rozsahom glykozylácie

3. Štruktúra imunoglobulínov I

3. Štruktúra imunoglobulínov I

3.1. Hlavné charakteristiky štruktúry imunoglobulínov

3.2. Kombinácia homológnych štruktúrnych podjednotiek

3.3. Špecifická organizácia disulfidických mostíkov

3.4. Kombinácia sekvenčne variabilných a sekvenčne konštantných oblastí

3.5. Špecifická pántova oblasť sa nachádza v strede ťažkého reťazca

3.6. Disulfidické mostíky medzi dvoma ťažkými reťazcami

3.7. Ostatné štrukturálne charakteristiky imunoglobulínov

3. Štruktúra imunoglobulínov I

Ciele

- ❑ Pochopiť hlavné charakteristiky štruktúry Ig
- ❑ Získať vedomosti o úlohe disulfidických mostíkov
- ❑ Pochopiť základné princípy 3D štruktúry Ig domén
- ❑ Oboznámiť sa ako charakterizovať variabilné oblasti v imunoglobulínoch

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Hlavné charakteristiky štruktúrnej organizácie

1) Kombinácia homológnych štrukúrnych podjednotiek
2) Špecifická organizácia disulfidických mostíkov
3) Kombinácia sekvenčne variabilných a sekvenčne konštantných oblastí
4) Špecifická pántova oblasť sa nachádza v strede ťažkého reťazca
5) Disulfidické mostíky medzi dvoma ťažkými reťazcami

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Hlavné charakteristiky štruktúrnej organizácie

1) Kombinácia homológnych štrukúrnych podjednotiek

- Primárna štruktúra imunoglobulínov poukazuje na prítomnosť homológnych podjednotiek s veľkosťou ca. 110 aminokyselín
- V rámci takejto podjednotky je vytvorená disulfidická väzba, ktorá spája 60 aminokyselín v rámci reťazca
- Homológne podjednotky sú štruktúrne podobné a patria do imunoglobulínového typu zbalenia
- Ťažký reťazec má 4 homológne podjednotky, ľahký reťazec má 2 homológne podjednotky

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Hlavné charakteristiky štruktúrnej organizácie

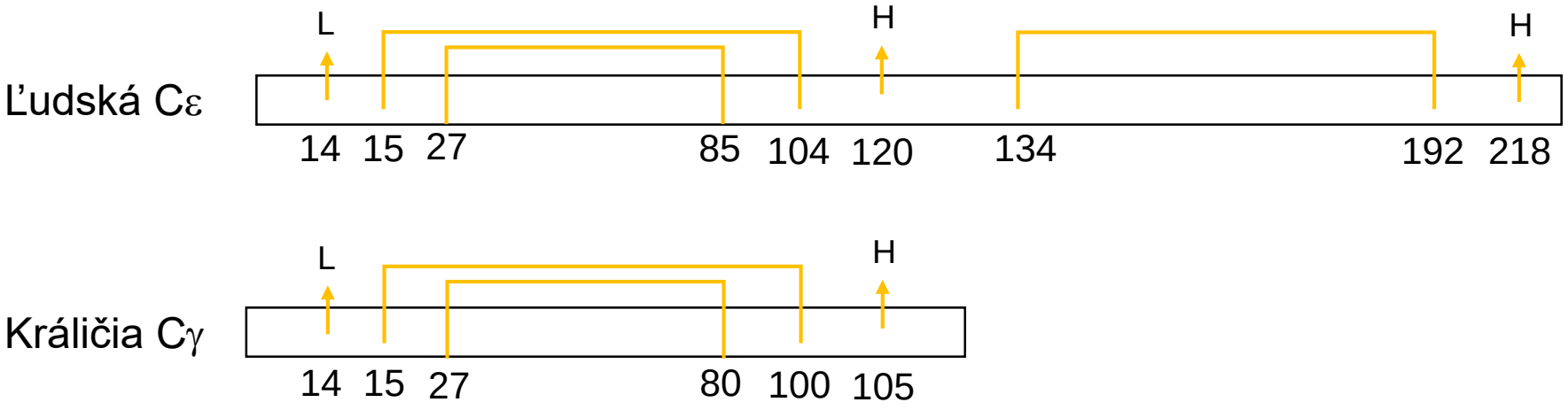
2) Špecifická organizácia disulfidických mostíkov

- Každá homológna podjednotka obsahuje jednu disulfidickú väzbu, ktorá je symetrická pozdĺž podjednotky.
- Výnimka je C_H1 u ľudskej IgE a aj u IgG obojživelníkov, sliepky, králika, ktoré obsahujú dodatočne ešte ďalšie disulfidické väzby
- Reťazce králičích imunoglobulínov majú dodatočne disulfidické väzby spájajúce konštantné a variabilné oblasti
- Takmer všetky disulfidické väzby medzi ťažkými reťazcami sa nachádzajú v pántovej oblasti

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Hlavné charakteristiky štruktúrnej organizácie

2) Špecifická organizácia disulfidických mostíkov



Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Hlavné charakteristiky štruktúrnej organizácie

3) Kombinácia sekvenčne variabilných a sekvenčne konštantných oblastí

- Niektoré časti polypeptidového reťazca sa vyznačujú veľkou variabilitou a niektoré sú nemenné
- Z toho bolo odvodené rozdelenie na variabilné oblasti V (V, z ang. variable) a konštantné C (C, z ang. constant) oblasti
- Variabilné oblasti určujú schopnosť imunoglobulínov viazať antigény, konštantná oblasť určuje triedu resp. podtriedu, ku ktorej daný imunoglobulín patrí
- Štruktúra konštantnej časti má za úlohu tzv. efektorovú funkciu

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Hlavné charakteristiky štruktúrnej organizácie

4) Špecifická pántova oblasť sa nachádza v strede ťažkého reťazca

- V strede ťažkého reťazca sa nachádza oblasť, ktorá nemá homológiu s inými časťami reťazca
- Táto tzv. pántova oblasť (ca. 15 aminokyselín) je variabilná v závislosti od triedy a podtriedy ťažkého reťazca
- IgM a IgE nemajú typickú pántovú oblasť namiesto toho sa tam nachádzajú homologické podjednotky. Naopak u IgD je pántova oblasť dlhšia - 64 aminokyselín
- Pántova oblasť je náchylná na proteolýzu a chemické štiepenie. Úloha: pravdepodobne potreba flexibility a ohybnosti niektorých častí IgG

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Hlavné charakteristiky variabilnej V oblasti:

Ťažký reťazec obsahuje len jednu variabilnú oblasť V_H

Ľahký reťazec môže byť tvorený dvoma variabilnými oblasťami: V_κ a V_λ

- Na základe vzájomnej podobnosti je možné variabilné oblasti rozdeliť do rodín.
- Členovia týchto rodín majú viac ako 70% vzájomnú podobnosť
- Napríklad v prípade ľudských V_H je možné ich začleniť do 6 rodín

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Hlavné charakteristiky variabilnej V oblasti :

- Na posúdenie variability jednotlivých pozícií v rámci polypeptidového reťazca bol zavedený parameter variability.
- Parameter variability je definovaný ako počet odlišných aminokyselín nájdených na danej pozícii vydelený frekvenciou najčastejšej nájdenej aminokyseliny na danej pozícií

$$variabilita = \frac{počet\ odlišných\ aminokyselín\ na\ danej\ pozícii}{frekvencia\ najčastejšie\ sa\ vyskytujúcej\ aminokyseliny\ na\ danej\ pozícií}$$

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Hlavné charakteristiky variabilnej V oblasti:

Príklad: Analýzou 63 proteínových sekvencií sa zistilo, že na pozícií *7* sa vyskytuje 41x serín a okrem serínu sa našli na danej pozícií ešte ďalšie 3 aminokyseliny (Pro, Thr, Asp).

Hodnota variabilného parametra je daná pomerom medzi počtom odlišných aminokyselín: 4 a frekvenciou najčastejšej aminokyseliny: 41/63 = 0,65

Variabilita na danej pozícií je teda 4/0,65 = 6,15

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Hlavné charakteristiky variabilnej V oblasti:

1. Distribúcia variabilných častí ukázala, že variabilita nie je distribuovaná náhodne ale je centrovaná v troch klastroch, ktoré boli nazvané hypervariabilné sekvencie

2. Tieto hypervariabilné klastre definujú komplementaritu určujúcu oblasť (CDR z ang. complementarity determing regions), ktorá je zodpovedná za interakciu s antigénom

3. Tieto klastre sú lokalizované okolo pozície 30 (CDR1), 50-60 (CDR2) a 90-100 (CDR3)

4. CDR3 sa vyznačuje najväčšou variabilitou v zložení ako aj v samotnej dĺžke

5. Vysoká variabilita je v dôsledku výmeny, delécie a inzercie aminokyselin

6. Mimo CDR sú ostatné oblasti viac konzervované a sú rozdelené do 4 FR (z ang. framework region) oblastí

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Hlavné charakteristiky variabilnej V oblasti:

1. Variabilná časť obsahuje konzervované motívy:

   - V_H obsahuje konzerovaný motív Trp/Phe-Gly-X-Gly (pozícia 103-106) ako aj motív Gly-Leu-Glu-Trp-Leu/Ile (pozícia 44-48)

   - V_L obsahuje konzervované motívy na pozíciách 98-101 a 44-48

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Hlavné charakteristiky konštantnej C oblasti:

Ťažký reťazec pozostáva z 3-4 homológnych podjednotiek

Ľahký reťazec má C oblasť, ktorá sa skladá len z jednej homológnej podjednotky

- Homológia medzi variabilnou a konštantnou časťou je nízka ca. 15%
- Homológia medzi konštantnými oblasťami u odlišných imunoglobulínov je signifikantná ca. 30%
- Homológia medzi konštantnými oblasťami u odlišných IgG podtried je vysoká 90%
- Podobne aj 3D štrukúra u jednotlivých homológnych oblastí je podobná

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Hlavné charakteristiky pántovej oblasti:

- Ide o oblasť približne v strede ťažkého reťazca medzi Fab a Fc fragmentom
- Umožňuje pohyblivosť segmentov a podjednotiek oblastí potrebných na funkciu protilátok viazať dva fyzicky vzdialené antigény
- Niektoré myelómové proteíny majú odstránenú túto pántovú oblasť

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

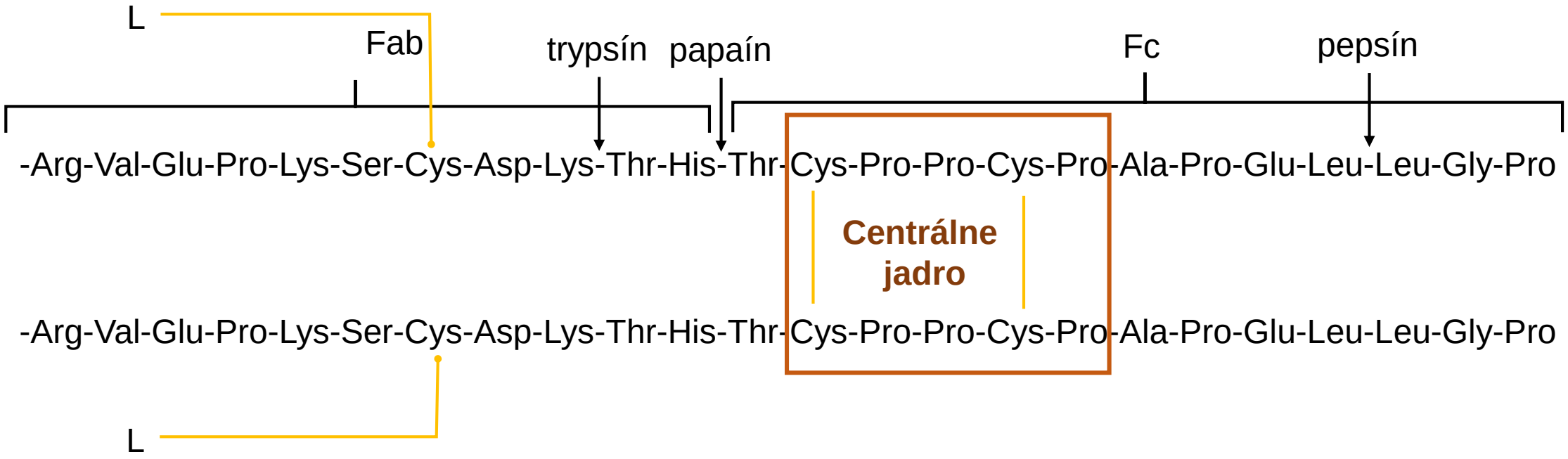
Hlavné charakteristiky pántovej oblasti:

Celá pántová oblasť (221-237) môže byť rozdelená na 3 úseky:

- Horný úsek (221-225) je tvorený od konca Fab fragmentu po prvú disulfidickú väzbu medzi ťažkými reťazcami
- Centrálne polyprolínové jadro (226-229)
- Dolný úsek je tvorený časťou od poslednej disulfidickej väzby a začiatkom Fc

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Hlavné charakteristiky pántovej oblasti:



Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Hlavné charakteristiky pántovej oblasti:

Horný úsek:

- Tvorí mini helix s nízkou stabilitou a vysokou dostupnosťou pre molekuly rozpúšťadla, vyskytuje sa aj u iných podtried, ale nie u IgA
- Práve táto časť umožňuje segmentálnu flexibilitu podjednotiek v rámci Fab

Centrálne jadro:

- Predstavuje rigídnu časť tvorenú dvoma paralelnými polyprolínovými helixami, ktoré sú spojené disulfidickými väzbami
- Počet disulfidických väzieb sa mení v závislosti od triedy, podtriedy a organizmu
- U IgG3 sú prítomné 4 repetície centrálneho úseku, čo pravdepodobne spôsobuje u tejto podtriedy citlivosť na proteolýzu

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Hlavné charakteristiky pántovej oblasti:

Centrálne jadro:

- Variabilita sekvencie bohatej na cysteín a prolín

Porovnanie centrálnej časti – jadra IgG u rôznych organizmov	
Ľudský IgG1	CPPC
Ľudský IgG2	CCVECPPC
Ľudský IgG3	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)x3
Ľudský IgG4	CPSC
Králičí IgG	C
Myšací IgG1	CKPCIC
Myšací IgG2a	CPPCKC
Myšací IgG2b	CPPCKECHKC
Myšací IgG3	C
Potkaní IgG1	CKPCIC
Potkaní IgG2a	CGC
Potkaní IgG2b	CPTCPTCHKC
Potkaní IgG2c	CSC

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Hlavné charakteristiky pántovej oblasti:

<u>IgD:</u>

- U IgD je pántová oblasť nezvyčajne dlhá – až 64 aminokyselín
- N-terminálna časť je priestorovo blízko k O-spojeným oligosachardom a je viac menej chránená pred proteolýzou
- Na druhej strane je C-terminálna časť silne nabitá a citlivá na proteolýzu

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Hlavné charakteristiky pántovej oblasti:

<u>IgA:</u>

- U IgA1 je prítomná duplikácia oktapeptidu Pro-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Pro-Ser
- U IgA2 je táto sekvencia nahradená penta-prolínovým motívom
- 5 oligosacharidov je prítomných v pántovej oblasti, čo zvyšuje odolnosť voči bakteriálnym proteázam prítomným na mukozálnej membráne

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Hlavné charakteristiky pántovej oblasti:

<u>IgM a IgE:</u>

- U týchto Ig sa nenachádza pántova oblasť
- Namiesto tejto oblasti majú tieto Ig extra konštantné domény $C\mu2$ a $C\varepsilon2$

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

5) Disulfidické mostíky medzi ťažkými reťazcami

- Vlastnosti disulfidického mostíka:
  - Medzi 2 cysteínovými zvyškami
  - Dihedrálny uhol medzi Cβ−Sγ−Sγ−Cβ atómami je približne ±90°
  - Intracelulárne prostredie je silne redukčné, a teda exponovaný disulfidický mostík je nestabilný
- Počet a množstvo disulfidických mostíkov varíruje medzi izoformami a medzi jednotlivými druhmi Ig
  - Ich počet je variabilný: 1-11
  - Napr. IgG1+IgG4 majú 2, IgG3 má 11, IgE má 2
  - IgM má disulfidický mostík na C-konci

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

5) **Disulfidické mostíky** (4 rovnovážne konštanty)

Konformačná rovnováha

Natívny stav (N)
(N z ang. native)

$\updownarrow K_{unf}$

Rozbalený stav (U)
(U z ang. unfolded)

vs.

Chemická rovnováha

tiolová skupina
(-SH x2)

$\updownarrow$

Disulfidický mostík
(-S-S-)

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

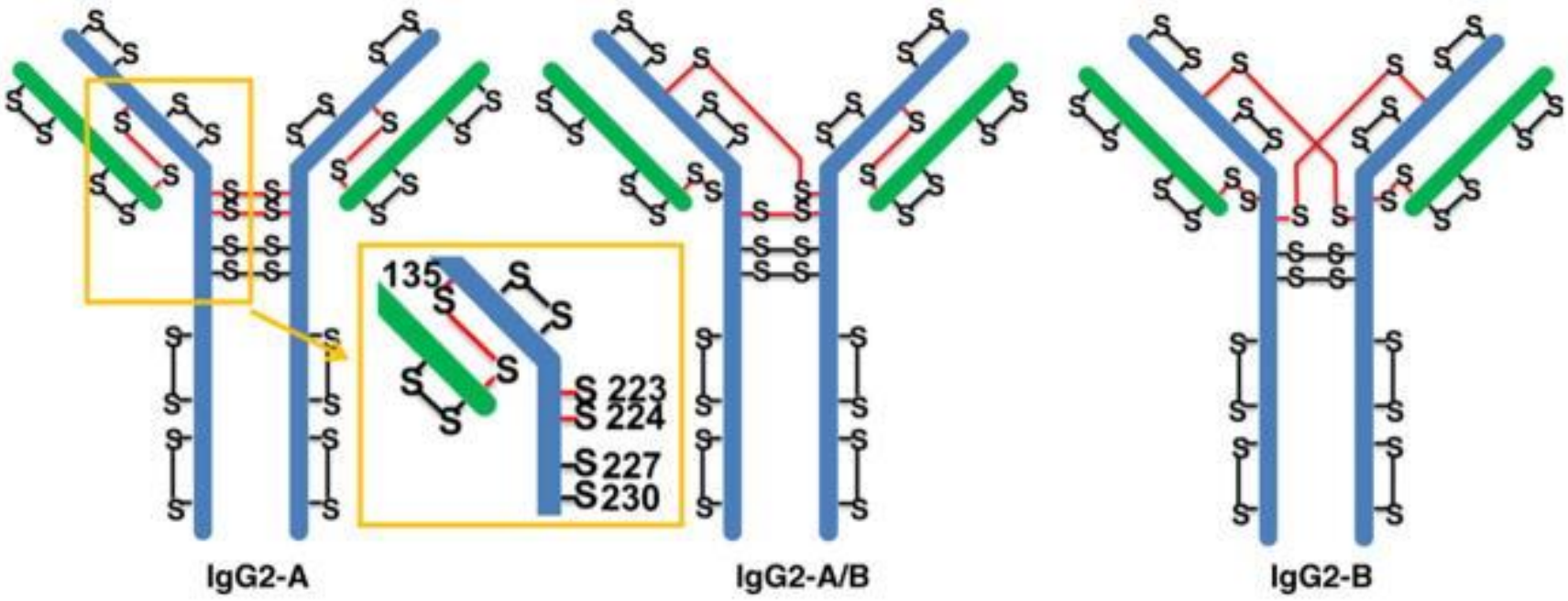
5) Disulfidické mostíky medzi ťažkými reťazcami

Tabuľka. Disulfidické mostíky medzi ťažkými reťazcami imunoglobulínov	
IMUNOGLOBULÍN	Počet disulfidických mostíkov
človek	
IgG1	2
IgG2	4
IgG3	11
IgG4	2
IgM	3
IgA	2
IgD	1
IgE	2
Myš	
IgG1, 2a, 2b	3
IgG3	2
Zajac	
IgG	1

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

5) Disulfidické mostíky medzi ťažkými reťazcami

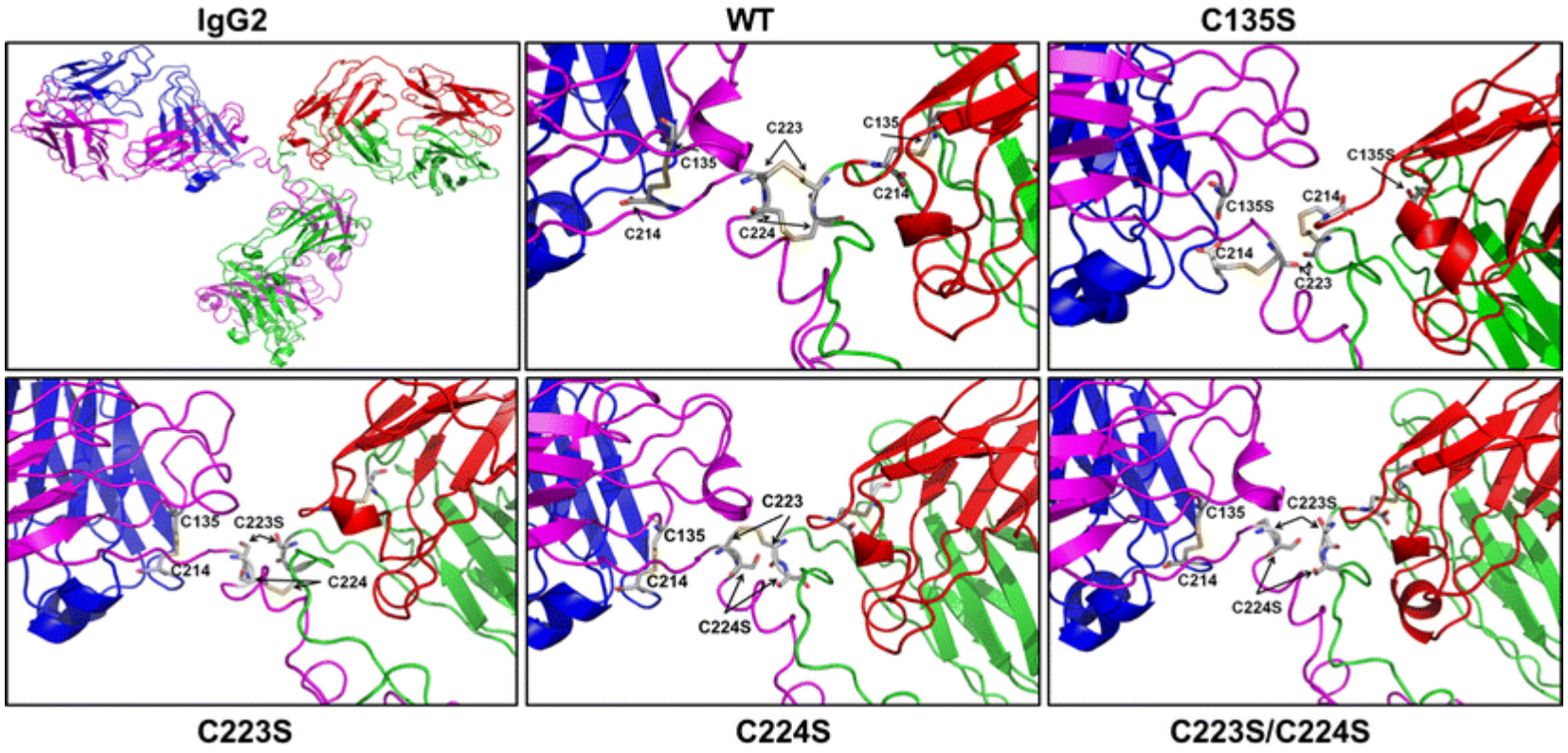
Disulfidické izoméry IgG2



Jones LM, Zhang H, Cui W, Kumar S, Sperry JB, Carroll JA, Gross ML. Complementary MS methods assist conformational characterization of antibodies with altered S-S bonding networks. J Am Soc Mass Spectrom. 2013 Jun;24(6):835-45. doi: 10.1007/s13361-013-0582-4.

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

5) Disulfidické mostíky medzi ťažkými reťazcami



Jones LM, Zhang H, Cui W, Kumar S, Sperry JB, Carroll JA, Gross ML. Complementary MS methods assist conformational characterization of antibodies with altered S-S bonding networks. J Am Soc Mass Spectrom. 2013 Jun;24(6):835-45. doi: 10.1007/s13361-013-0582-4.

4. Štruktúra imunoglobulínov II

4. Štruktúra imunoglobulínov II

4.1. Ostatné charakteristiky štruktúrnej organizácie

4.2. Imunoglobulínové domény

4.3. Konštantné oblasti

4.4. Variabilné oblasti

4.5. Vodíkové väzby

4.6. van der Waalsove interakcie

4. Štruktúra imunoglobulínov II

Ciele

- ❑ Pochopiť úlohu sekrečného komponentu
- ❑ Získať vedomosti o úlohe J-reťazca pri IgA
- ❑ Pochopiť význam jednotlivých typov interakcií pre štruktúru Ig
- ❑ Oboznámiť sa s rozdielnou vizualizáciou štruktúr

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Ostatné charakteristiky štruktúrnej organizácie

1. Sekrečný koncový chvost
2. Membránové segmenty
3. J-reťazec
4. Sekrečný komponent

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Sekrečný koncový chvost

- Ťažké reťazce u IgA a IgM obsahujú na C-konci dodatočné rozšírenie o 18 aminokyselín
- Táto koncová časť nemá homológiu k žiadnej časti ťažkého reťazca
- Vzájomne sú koncové časti IgM a IgA veľmi podobné, 11 aminokyselín je identických
- Cysteínový zvyšok v rámci tejto koncovej časti (Cys 575 u IgM, Cys 495 u IgA) vytvára disulfidickú väzbu medzi ťažkým reťazcami v polymérnych stavoch.

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Sekrečný koncový chvost

- Nahradenie cysteínu (Cys 575 u IgM, Cys 495 u IgA) za serín resp. odstránenie tejto koncovky zabraňuje vzniku dimérov resp. vznikajú monoméry ako aj IgG fragmenty

- Táto koncovka interaguje s J-reťazcom ale nie je absolútne nevyhnutným komponentom. Zlúčenie koncového chvosta k IgG spôsobilo produkciu IgG v polymérnej forme, ale neviazalo sa na J-reťazec

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Sekrečný koncový chvost

- IgM koncová časť obsahuje konzervované glykozylačné miesto Asp-563 (prítomné aj u IgA s výnimkou myšacej IgA)

- Toto miesto je dôležité pre interakciu s J-reťazcom – po nahradení inou aminokyselinou, ktorá zabraňuje glykozylácií nedochádza k inkorporácií J-reťazca

- V endoplazmickom retikule dochádza ku viazaniu koncovej časti na Hsp70-proteín, zvaný Bip, čím sa obmedzuje sekrécia nespolymerizovaných IgM monomérov

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Membránové segmenty

- Imunoglobulíny ukotvené k membráne obsahujú namiesto sekrečnej koncovky tzv. membránové segmenty

- Membránové imunoglobulíny lokalizované na vonkajšej bunkovej membráne slúžia ako antigén rozpoznávajúce časti u B-lymfocytových antigénových receptorov

- Membránové formy obsahujú na C-konci ich ťažkého reťazca dodatočné aminokyseliny, ktoré sa skladajú z extracelulárneho spojovníka, hydrofóbneho transmembránového segmentu a intracelulárnej časti

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Membránové segmenty

- Transmembránové segmenty sa skladajú z 25-526 aminokyselín a sú podobné u ťažkých reťazcov - 13 aminokyselín je úplne identických pre všetky izotypy
- Tieto vysoko konzervované časti interagujú s antigénovým receptorom B buniek
- Transmembránové segmenty sú prekvapivo dosť hydrofilné (na rozdiel od membránových proteínov)

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

J-reťazec

- Je syntetizovaný v plazmatických bunkách, 137 aminokyselín
- Nie je homológny k iným proteínom alebo imunoglobulínom
- Je glykozylovaný, obsahuje jeden N-spojený oligosacharid obsahujúci 5 sacharidových zvyškov
- 3D štrukúra pozostáva z dvoch domén a každá doména obsahuje špecifický cysteín, ktorým sa viaže na IgM podjednotku
- Tento reťazec je integrálnou súčasťou polymérnych foriem IgA a IgM

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

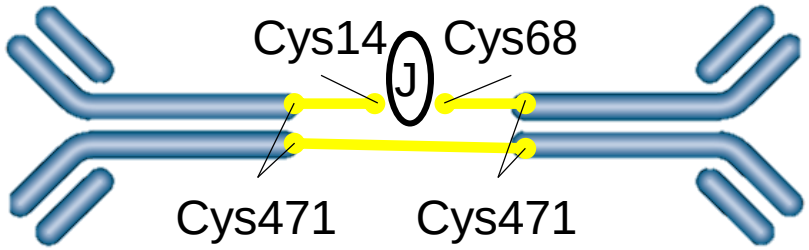
J-reťazec

- Ak B-lymfocyt produkuje veľké množstvo J-reťazca, IgM sa nachádzaju ako pentaméry
- J-reťazec sa nachádza obklopený v 5-člennom kruhu Fc_{μ}
- V neprítomnosti J-reťazca IgM sa nachádza ako hexamér
- IgM-J komplexy sú oveľa efektívnejšie pri aktivácií komplementačnej kaskády

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

J-reťazec

- J-reťazec nie je nevyhnutný pre dimerizáciu IgA, ale je potrebný pre viazanie sekrečného komponentu a je potrebný pre transport sérového IgA do žlče
- J-reťazec spája konce IgA monomérov



Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Sekrečný komponent

- U polymérnych IgA prítomných v externých sekrétoch bol nájdený v komplexe s ďalším proteínom tzv. sekrečný komponent (SC z ang. secretory component)
- U ľudí je tvorený 558 aminokyselinami a skladá sa z 5 segmentov, ktoré sú navzájom homológne ako aj homológne k variabilnej časti imunoglobulínov
- Prítomný ako heterogénne glykozylovaný proteín v dvoch formách: 80 kDa a 55 kDa, pričom 55 kDa forme chýba v strede reťazca jedna doména
- Obidve formy viažu IgA s rovnakou efektivitou
- Viazanie je realizované cez kovalentnú väzbu: disulfidický mostík Cys311 v časti $C_{\alpha}2$ IgA a Cys-467 lokalizovaný v rámci SC
- Existujú aj nekovalentné komplexy: napr. u králikov

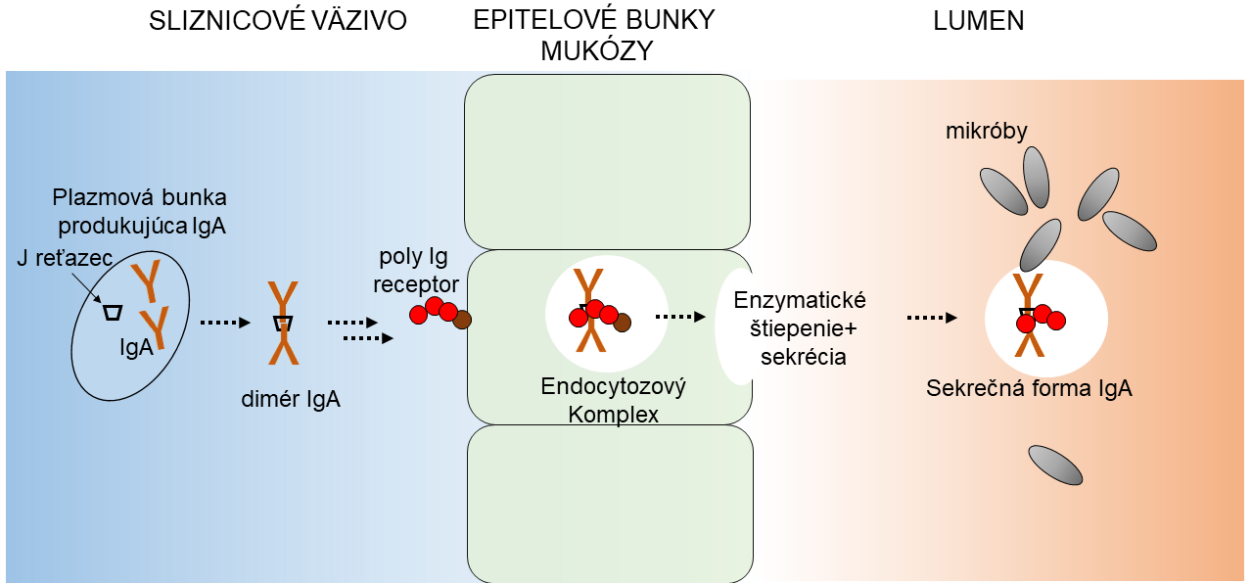
Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Sekrečný komponent

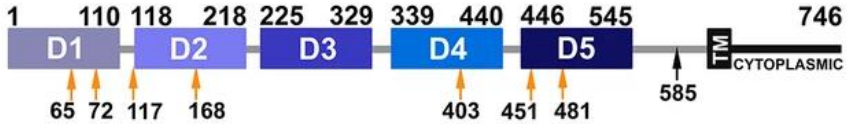
- SC je ektoplazmatická časť transportného receptora, ktorý špecificky prenáša polymérne formy imunoglobulínov IgA a IgM cez epitelové bunky do externých sekrétov
- SC je syntetizovaný epitelovými bunkami, potom je prenesený na povrch bunky kde slúži ako receptor pre polymérne imunoglobulíny
- SC v komplexe s imunoglobulínmi je procesom endocytózy internalizovaný a prenesený do apikálneho povrchu bunky
- V apikálnej časti bunky je časť SC proteolyticky odštiepená, čím sa uvoľní SC s naviazaným imunoglobulínom
- Komplex SC s imunoglobulínom je stabilizovaný cez vysoko konzervovanú časť prvej domény SC (pozícia 15-57)

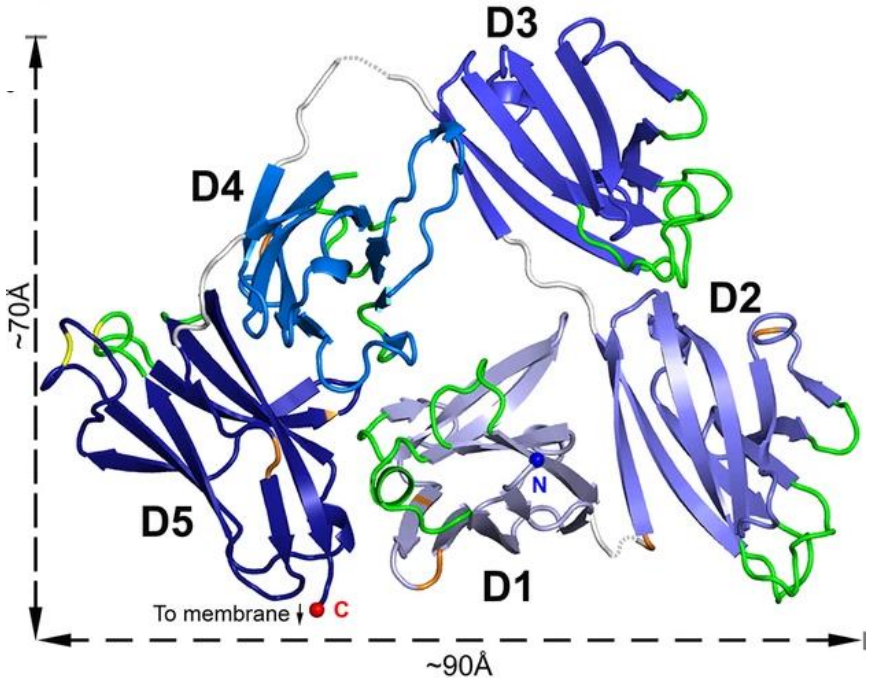
Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Sekrečný komponent



Organizácia poly-Ig receptora

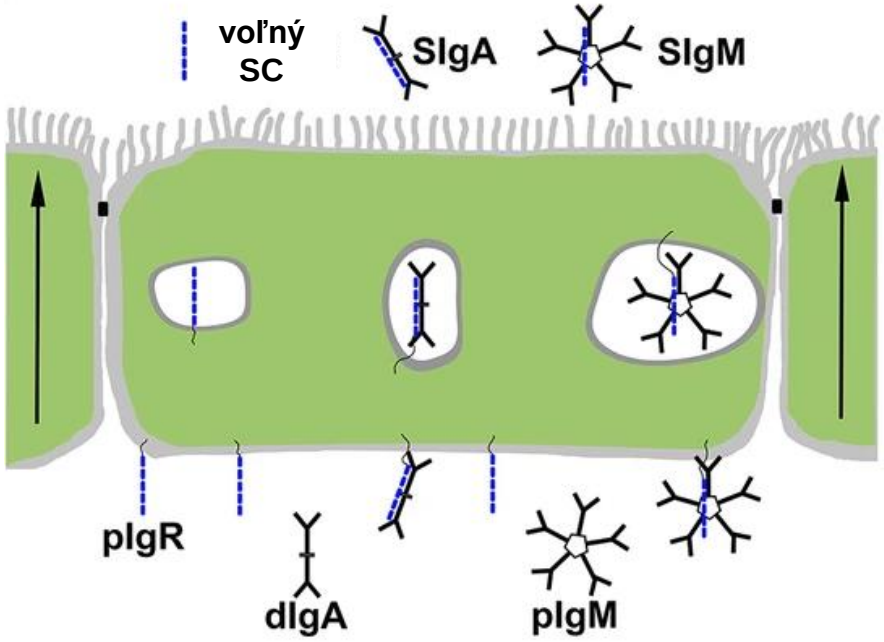




Stadtmueller BM, Huey-Tubman KE, López CJ, Yang Z, Hubbell WL, Bjorkman PJ. The structure and dynamics of secretory component and its interactions with polymeric immunoglobulins. Elife. 2016 Mar 4;5. pii: e10640. doi: 10.7554/eLife.10640.

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Sekrečný komponent



- pIgR je glykozylovaný membránový proteín
  - Ektodoména s 5 opakujúcimi sa IgG podobnými doménami (D1-D5)
  - 23 aminokyselín dlhá transmembránová doména
  - 103 aminokyselínová intracelulárna doména
- Transportný cyklus pIgR
  - Naviazanie diméru IgA alebo polyméru IgM
  - Komplex transcytozuje na apikálny povrch buniek
  - Proteáza odštiepi pIgR ektodoménu (od teraz označovanú ako sekrečný komponent)
  - Uvoľnenie do mukózneho priestoru

Stadtmueller BM, Huey-Tubman KE, López CJ, Yang Z, Hubbell WL, Bjorkman PJ. The structure and dynamics of secretory component and its interactions with polymeric immunoglobulins. Elife. 2016 Mar 4;5. pii: e10640. doi: 10.7554/eLife.10640.

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

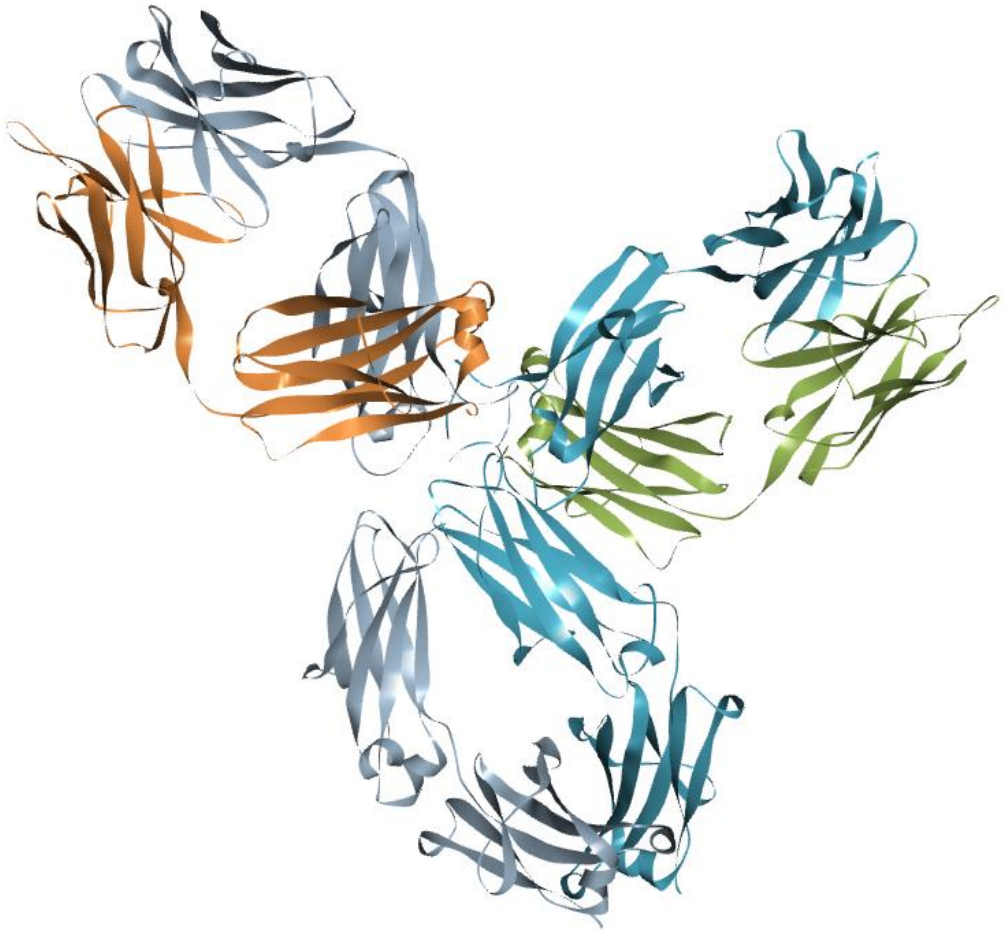
Imunoglobulínové domény

- Homológne jednotky nájdené v ľahkom a ťažkom reťazci pozostávajú z tzv. imunoglobulínovej domény (Ig doména)
- Ig doména je kompaktne zbalená globula s rozmermi 40x25x25 Å
- Je tvorená antiparalelnými β-skladanými reťazcami (7 v C-doméne a 9 vo V-doméne)
- β-skladané reťazce veľmi tesne vzájomne interagujú a sú spojené konzervovanou disulfidickou väzbou
- Bočné reťazce aminokyselín vytvárajú hydrofóbne jadro
- Tvorba VL-VH páru takmer nemá žiaden vplyv na štruktúru Ig domén

Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Imunoglobulínové domény

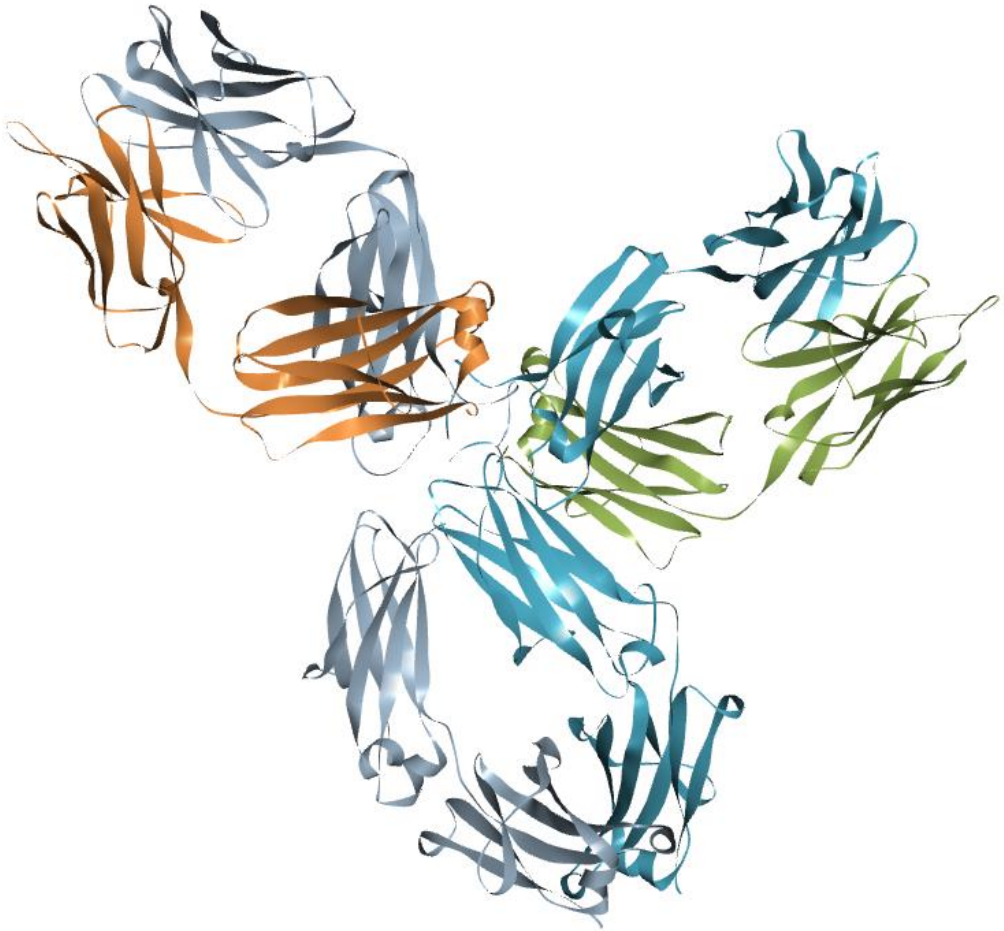
- 3D štruktúra: ľahký a ťažký reťazec
- typické vlastnosti imunoglobulínového typu zbalenia
- dimérna štruktúra



Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Konštantné oblasti

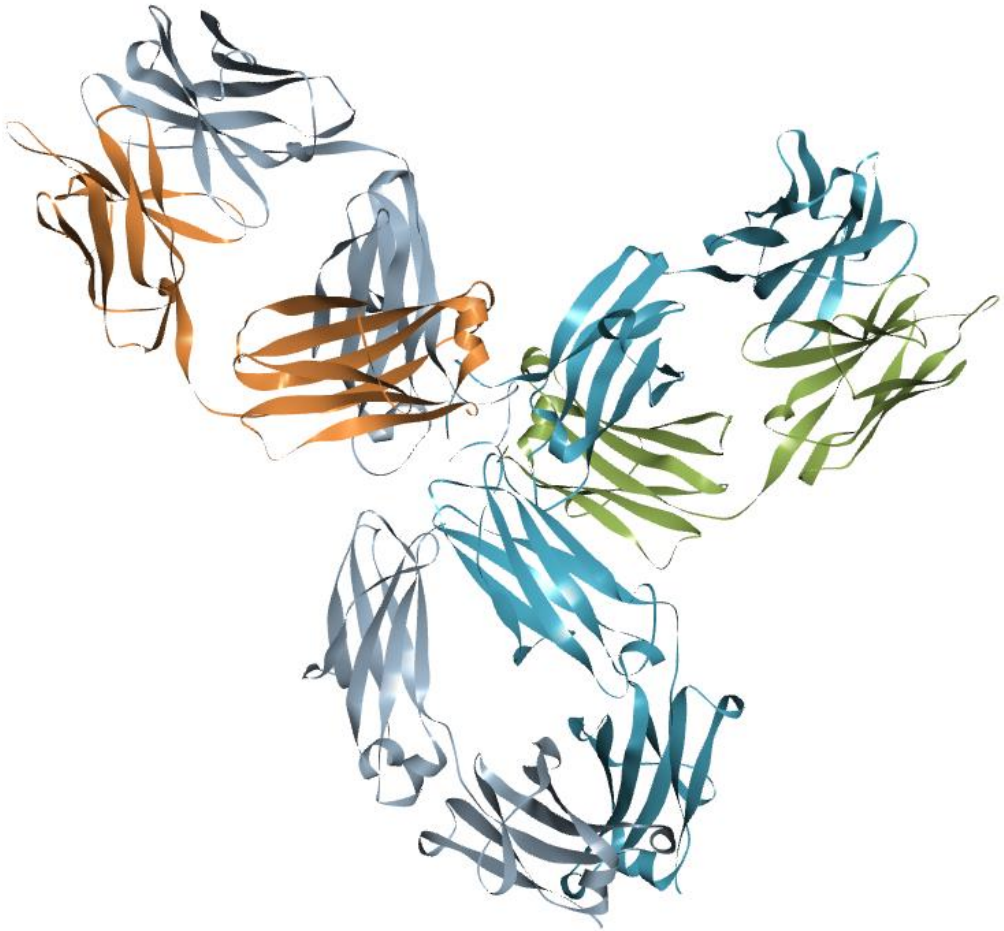
- Ig doménu môžeme rozdeliť na dve časti: jedna časť sa skladá z 3 β-reťazcov a druhá časť je zvyčajne tvorená 4 β-reťazcami
- U C_H2 je aj prvá časť tvorená 4 reťazcami, ktoré sú navzájom spojené
- β-reťazce sú spojené krátkymi sekvenciami tzv. slučkami (loops), ktoré zvyčajne nemajú sekundárnu štruktúru
- Výnimočné sa nachádzajú veľmi krátke helikálne úseky



Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Variabilné oblasti

- Sú štruktúrne odlišné od Ig domén konštantných oblastiach
- Slučky sú výrazne dlhšie, dva dodatočne β-reťazce sú vložené do podštruktúr Ig domén
- 6 predĺžených slučiek VH a VL (CDR) je sústredených do spoločne vytvoreného priestoru a interagujú s antigénom

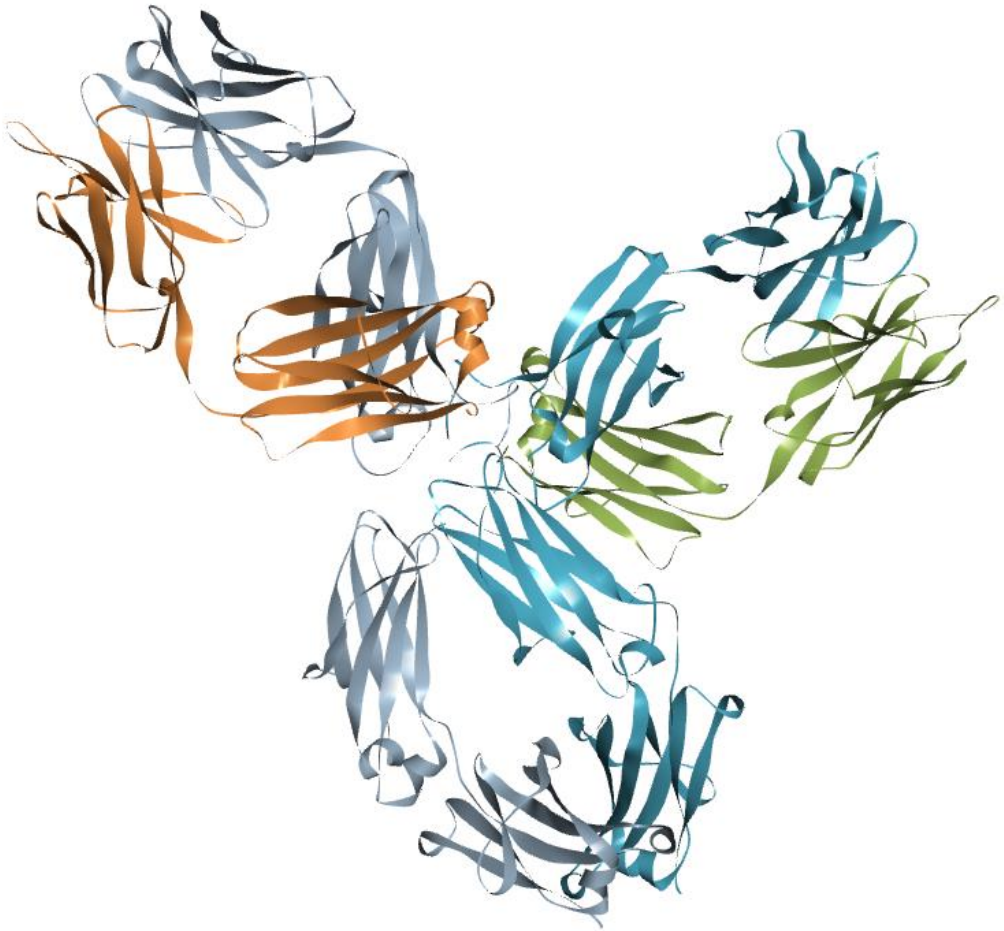


Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Variabilné oblasti

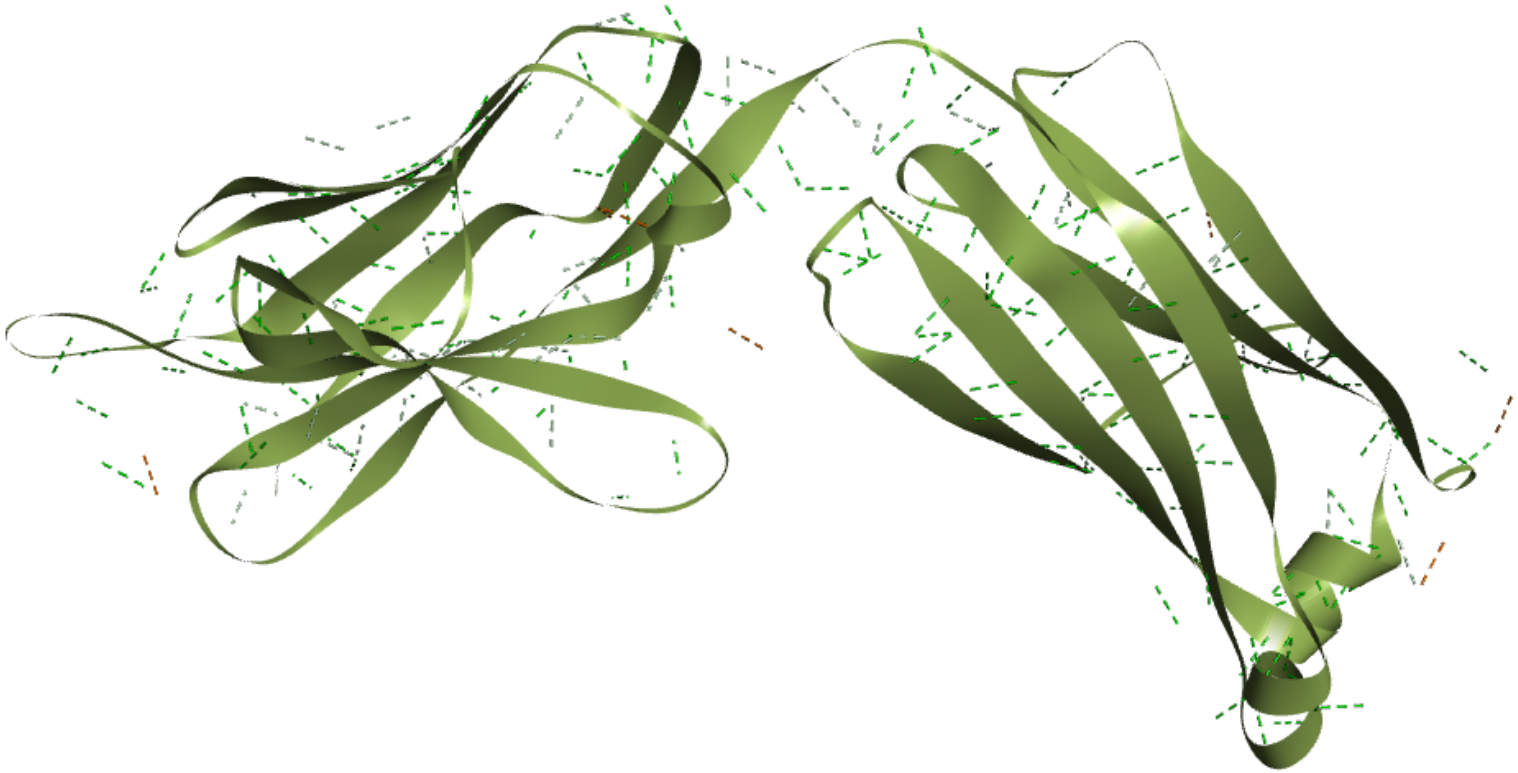
- CDR slučky sú najpohyblivejšími časťami V-domény, môžu sa vyskytovať vo viacerých konformáciách, pričom ligand môže selektívne viazať jednu z nich

- Stabilita domény je primárne určená disulfidickým mostíkom



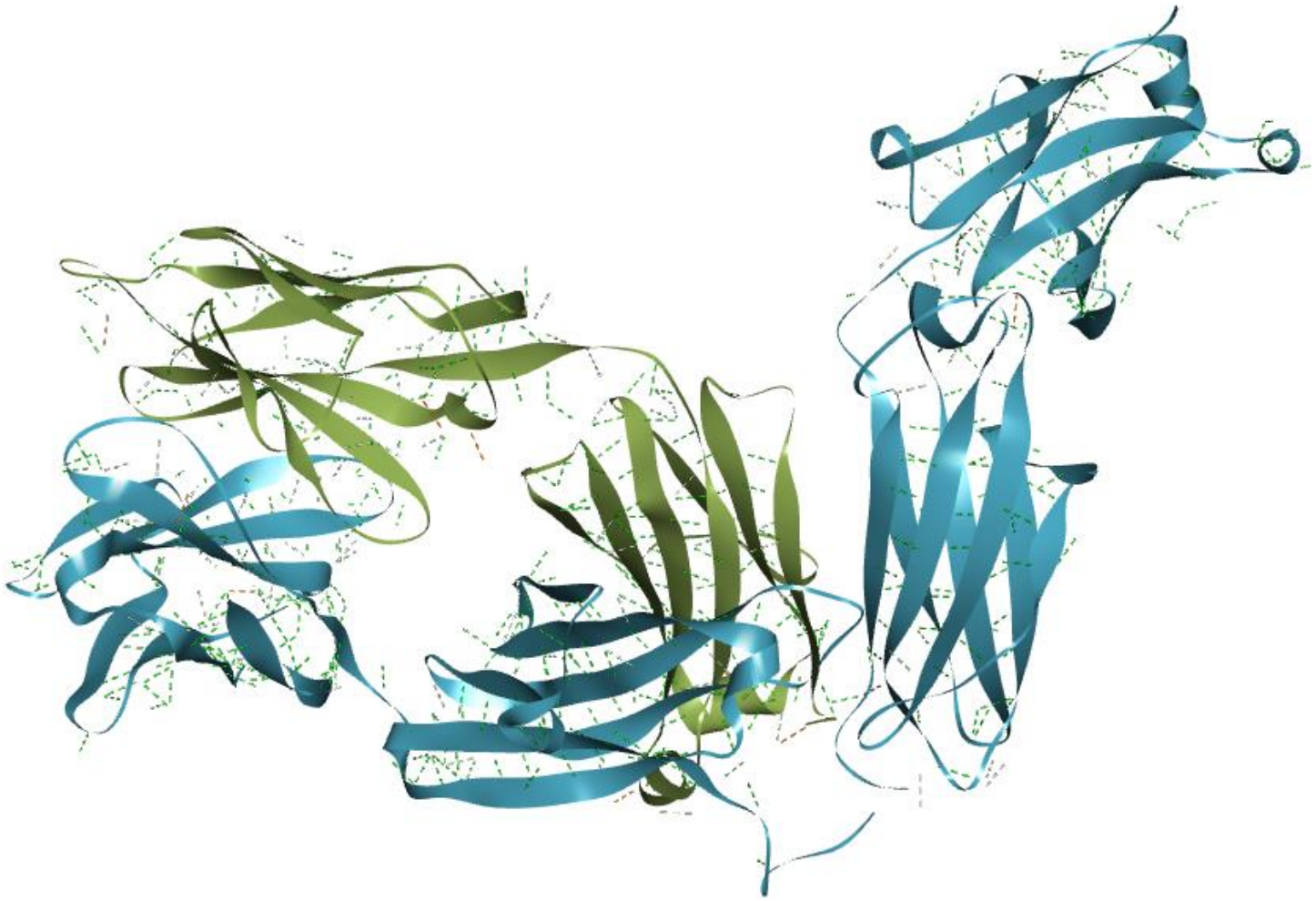
Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Vodíkové väzby: ľahký reťazec



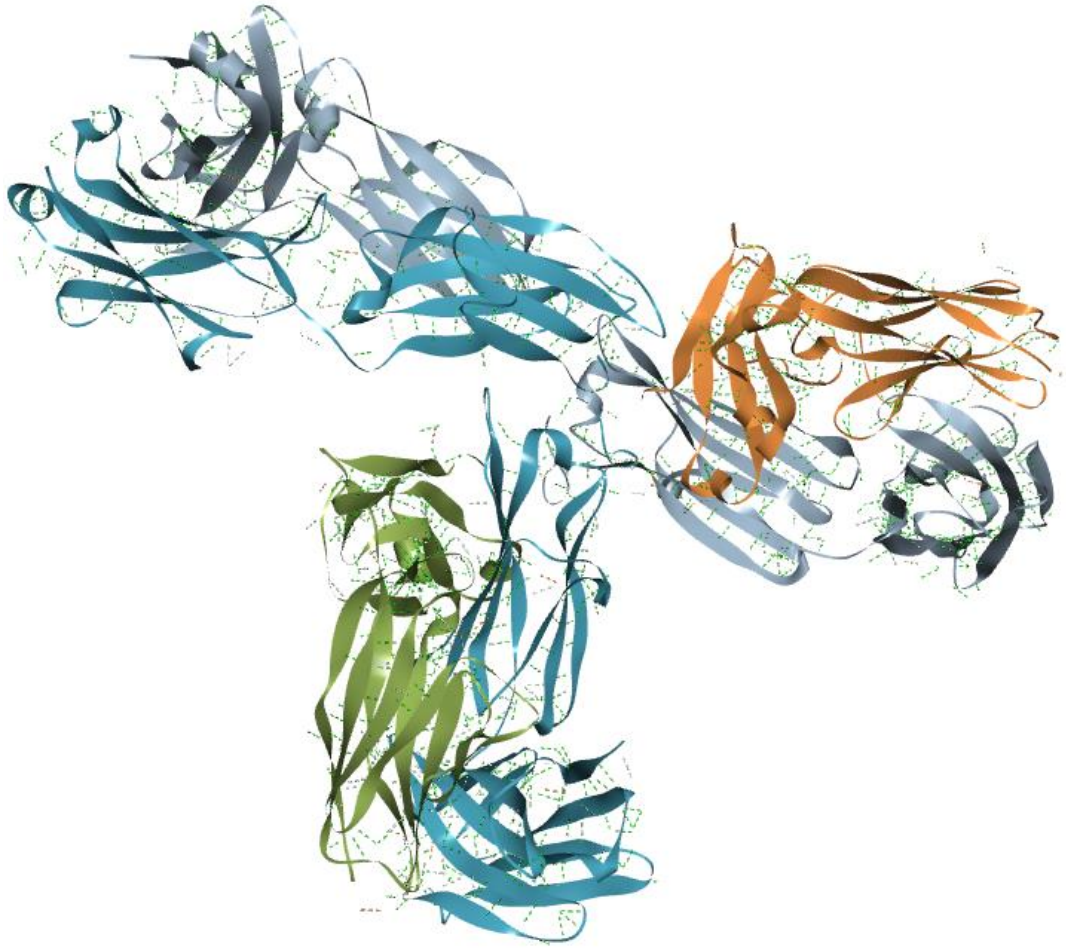
Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Vodíkové väzby: medzi ľahkým a ťažkým reťazcom



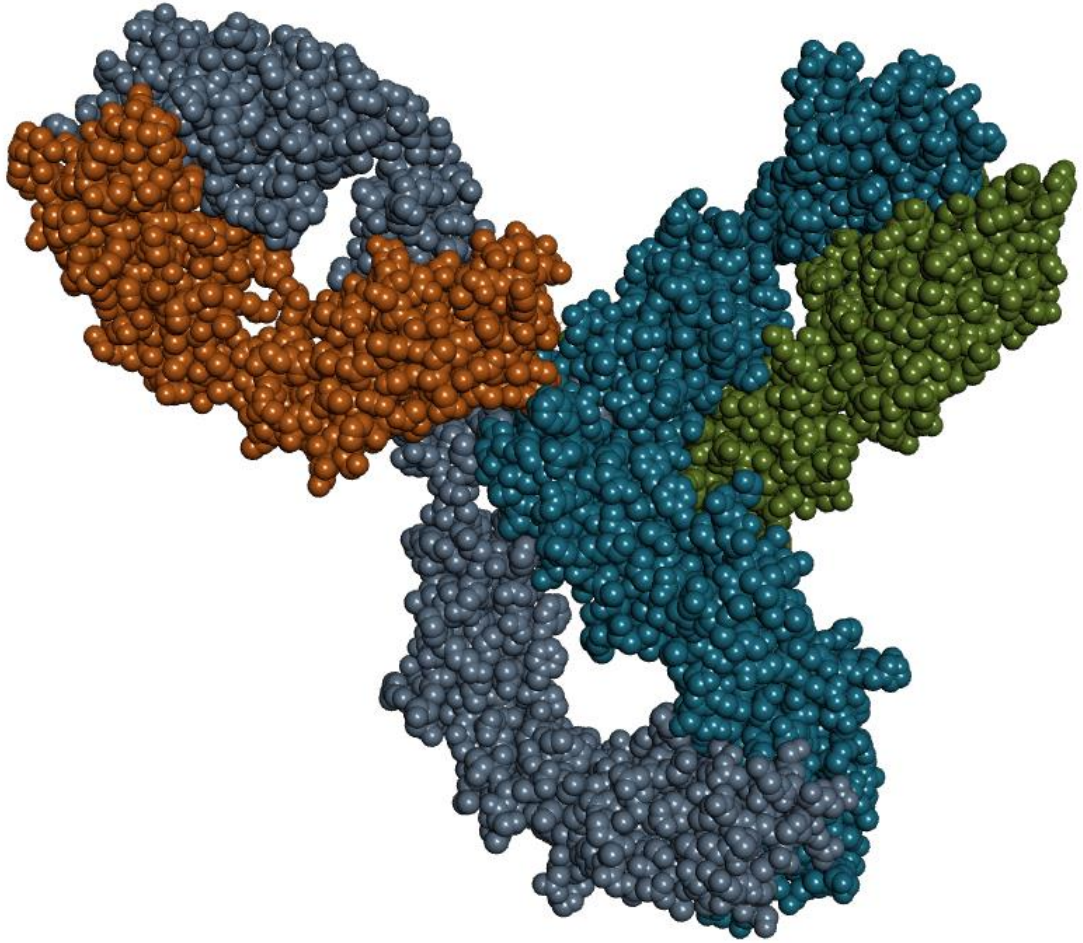
Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Vodíkové väzby: stabilizácia diméru medzi ľahkým a ťažkým reťazcom



Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

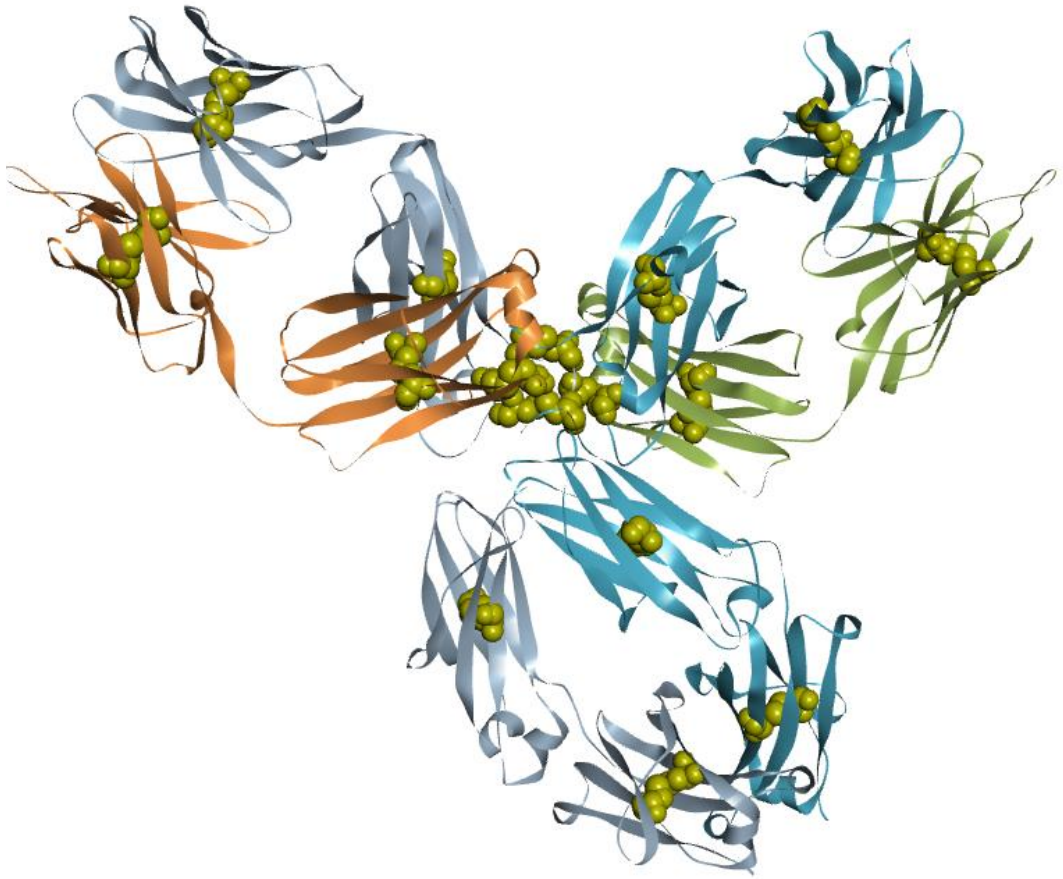
Van der Waalsove interakcie: molekulový povrch IgG



Všeobecná štruktúrna organizácia imunoglobulínov

Kontakty medzi doménami

- Rozdelenie podľa organizácie β- reťazcov na C-podobné alebo V-podobné
- V-podobné domény majú 65-75 aminokyselín medzi 2 cysteínmi, ktoré tvoria vnútromolekulový disulfidický mostík
- C-podobné domény majú zvyčajne len 55-60 aminokyselín medzi 2 cysteínmi, ktoré tvoria vnútromolekulový disulfidický mostík



5. Chemické a proteolytické štiepenie imunoglobulínov

5. Chemické a proteolytické štiepenie imunoglobulínov

5.1. Princíp štiepenia imunoglobulínov

5.2. Proteolytické štiepenie: papaín a trypsín

5.3. Proteolytické štiepenie: pepsín

5.4. IgA štiepiace enzýmy

5. Chemické a proteolytické štiepenie imunoglobulínov

Ciele

- Pochopiť princíp proteolytického štiepenia imunoglobulínov
- Získať vedomosti o príprave definovaných fragmentov IgG
- Pochopiť citlivosť jednotlivých imunoglobulínov na proteázy
- Oboznámiť sa s bakteriálnymi proteolytickými enzýmami, ktoré boli vyvinuté proti IgA

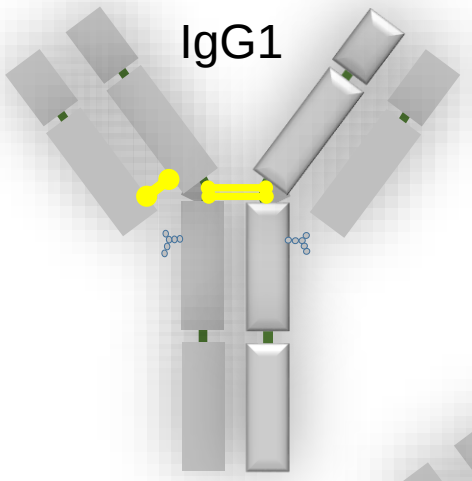
Proteolytické fragmenty imunoglobulínov

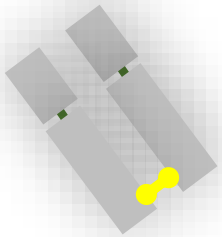
Princíp: Imunoglobulíny je možné proteolyticky štiepiť, pričom vznikajú definované imunoglobulínové fragmenty

Štiepenie proteázami

- Imunoglobulíny sa skladajú z kompaktných domén, ktoré sú odolné voči proteázam
- Štiepenie prebieha medzi oblasťami, ktoré spájajú domény napr. v strede ťažkého reťazca sa nachádza oblasť, ktorá je veľmi citlivá na proteolýzu
- Potrebná je prítomnosť sekvencie/motívu, ktorý rozpoznávajú proteázy
- Typicky sa využívajú enzýmy: papaín, trypsín, chymotrypsín a pepsín

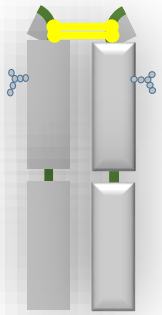
Proteolytické fragmenty imunoglobulínov





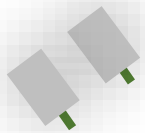
Fab

- Papaín
- Trypsín
- Chymotrypsín



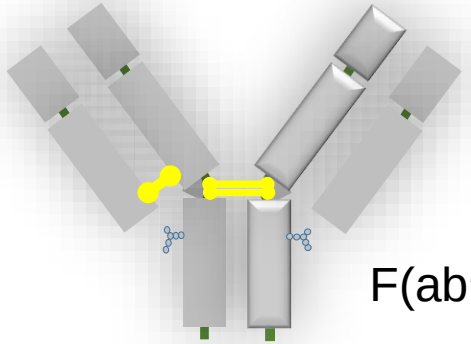
Fc

- Papaín



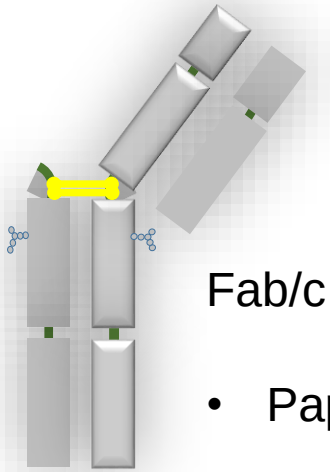
Fv

- Pepsín



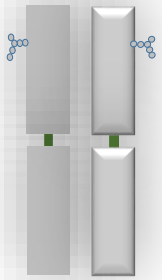
$F(ab')_2$

- Papaín
- Trypsín
- Chymotrypsín



Fab/c

- Papaín

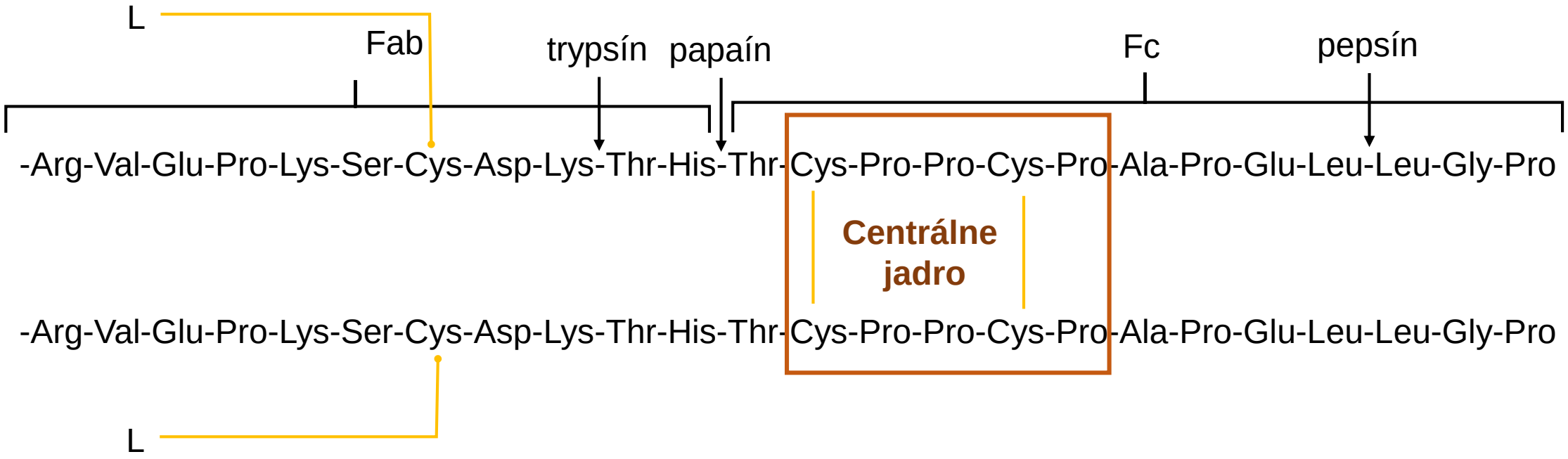


pFc′

- Pepsín

Proteolytické fragmenty imunoglobulínov

Hlavné charakteristiky pántovej oblasti:



Proteolytické fragmenty IgG

Papaín a trypsín

- Štiepia γ-reťazce pri N-konci disulfidických mostíkov, pričom vznikajú dva univalentné Fab fragmenty a jeden Fc fragment
- Fab fragmenty majú schopnosť viazať antigén
- Štiepenie IgG je urýchlené prítomnosťou činidiel, ktoré redukujú disulfidické mostíky ako napr. β-merkaptoetanol, DTT
- Citlivosť na proteolytické enzýmy závisí od podtriedy IgG: bez redukčných činidiel sú štiepené len IgG1 a IgG3
- IgG2 a IgG4 sa štiepia len v prítomnosti redukčných činidiel
- Fab je odolný voči ďalšiemu štiepeniu, pričom Fc je možné štiepiť v kyslom pH

Proteolytické fragmenty IgG

Pepsín

- Štiepi v tzv. pántovej oblasti z C-konca disulfidického mostíka spájajúceho ťažké reťazce
- Po štiepení v kyslom pH 4-4,5 vzniká bivalentný $F(ab)_2$ ako aj C doména ťažkého reťazca – pFc.
- Pri tomto postupe je C_H2 doména kompletne rozštiepená, čo je spôsobené citlivosťou Fc fragmentu voči pepsínu pri nízkom pH (<5,1)
- Pridaním redukčných činidiel k $F(ab)_2$ dochádza k vratnému rozrušeniu disulfidického mostíka a následne k tvorbe univalentného Fab
- Popísaný postup je typický pre IgG1, pričom u IgG2 dochádza ku kompletnej degradácií

Proteolytické fragmenty u imunoglobulínov

Proteázy štiepia ostatné imunoglobulíny

- **IgM:** Fab, $F(ab)_2$, Fc_5
- **IgA:** Fab, pričom Fc je degradovaný papaínom
- **IgE:** Fab, Fc
- **IgD:** je extrémne citlivý na proteolýzu a rýchlo vznikajú Fab a Fc fragmenty

Proteolytické fragmenty u imunoglobulínov (pokr.)

Proteázy štiepiace IgA

- Existujú špeciálne proteázy u patogénych baktérií, ktoré degradujú ľudské IgA1, čím umožňujú kolonizáciu alebo infekciu ľudských mukozálnych povrchov
- Napr. patogény spôsobujúce meningitídu, respiračné, urogenitálne choroby a zubné plaky

Proteolytické fragmenty u imunoglobulínov (pokr.)

Proteázy štiepiace IgA

- Bakteriálne proteolytické enzýmy štiepia Pro-Ser resp. Pro-Thr peptidovú väzbu
- Táto väzba je prítomná v IgA1 pántovej oblasti, ale chýba v prípade IgA2

C. ramosum *S. pneumoniae* *H. influenzae* *N. meningitidis* *N. gonorrhoese*

IgA1 -Cys-Pro-Val-Pro-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Pro-Ser-Pro-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Pro-Ser-Pro-Ser-Cys

IgA2(m1) -Cys-Pro-Val----------Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Cys

IgA2(m2) -Cys-Arg-Val----------Pro-Pro-Pro-Pro-Pro-Cys

Chemické štiepenie imunoglobulínov

- **Štiepenie IgG pomocou brómkyánu**

  - Tuhá, toxická látka
  - Reakcia s metionínovým zvyškom
  - Štiepenie polypeptidového reťazca a vznik 2 fragmentov
  - C-terminálny fragment + N-terminálny fragment s modifikovaným C-koncom

- Štiepenie IgG pomocou brómkyánu bromidu v miernych podmienkach (podmienky, ktoré nevedú k denaturácií) vedie k vzniku bivalentného fragmentu $F(ab)_2$, ktorý viaže antigény
- Tento fragment má väčšiu molekulovú hmotnosť ako bivalentný fragment získaný štiepením pepsínom

Chemické štiepenie imunoglobulínov

- **Kombinované štiepenie IgG**

  - Kombinovaným štiepením je možné získať fragmenty Fab/c
  - V prvom kroku sú IgG redukované v miernych podmienkach použitím DTT resp. sulfitom
  - Následná reakcia cysteínu s kyselinou 2-nitro-5-tiokyanatobenzoóvou alebo KCN za vzniku kyanocysteínu.
  - Fab/c fragment sa získa bázou-katalyzovaným štiepením peptidovej väzby SCN modifikovaného zvyšku v pántovej oblasti ťažkého reťazca

6. Detekcia imunoglobulínov

6. Detekcia imunoglobulínov

6.1. Imunoabsorbcia

6.2. Imunoprecipitácia

6.3. Metóda ELISA

6.4. Mikroaglutinačná metóda

6.5. Detekcia konformačne poškodených imunoglobulínov

6. Detekcia imunoglobulínov

Ciele

- ❑ Pochopiť jednotlivé stratégie pri sledovaní Ig
- ❑ Získať vedomosti o metóde založenej na imunoprecipitácií
- ❑ Pochopiť rozdiely medzi jednotlivými ELISA metódami
- ❑ Oboznámiť sa s mikroaglutinačnou metódou

Detekcia imunoglobulínov

Problém: imunoglobulíny sa v biologických vzorkách nachádzajú spoločne s inými molekulami

Potreba vyvinúť špecifické metódy, ktoré umožnia ich detekciu

Imunoabsorpcia Imunoprecipitácia ELISA Mikroaglutinácia

Detekcia imunoglobulínov

Imunoabsorpcia

- Anti-Ig protilátka alebo antigén sa imobilizuje na nerozpustný nosič (povrch, brómkyánom aktivovaná sepharóza)
- Biologická vzorka je inkubovaná s takýmto nosičom pričom dochádza k absopcii len žiadúcich imunoglobulínov na nosič
- Premývanie povrchu a následne uvoľnenie imunoglobulínu pomocou zmeny fyzikálno-chemických podmienok (napr. pH)
- Množstvo naviazaných imunoglobulínov sa určí štandardnými metódami na detekciu proteínov
  - Citlivosť môže byť mnohonásobne vylepšená použitím rádioaktívneho značenia

Detekcia imunoglobulínov

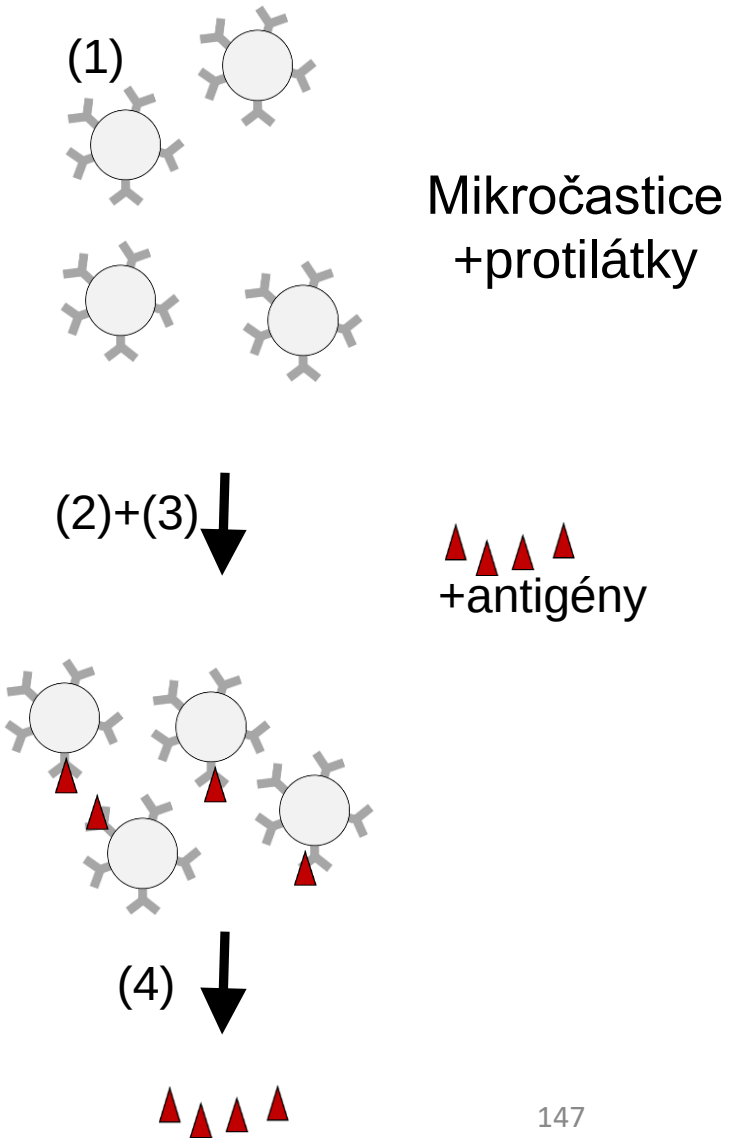
Príklad: celulóza ako nosič pre imunoabsorbent

- Výhoda použitia celulózových nosičov pre preparatívne ako aj analytické účely
- Takmer žiadna nešpecifická väzba proteínov na celulózový nosič
- Ľahká príprava matrixu napr. mikročastice dialdehyd celulózy, ktorá sa vyznačuje aj vynikajúcimi skladovacími vlastnosťami
  - Nosič nesmie nešpecificky viazať biologicky materiál
  - Nebezpečenstvo falošnej reaktivity

Detekcia imunoglobulínov

Imunoprecipitácia

1. Protilátka kovalentne naviazaná na mikročasticu
2. Tvorba komplexu antigén-protilátka
3. Precipitácia a premývanie
4. Elúcia zmenou podmienok (pH, denaturačné činidlá)



Detekcia imunoglobulínov

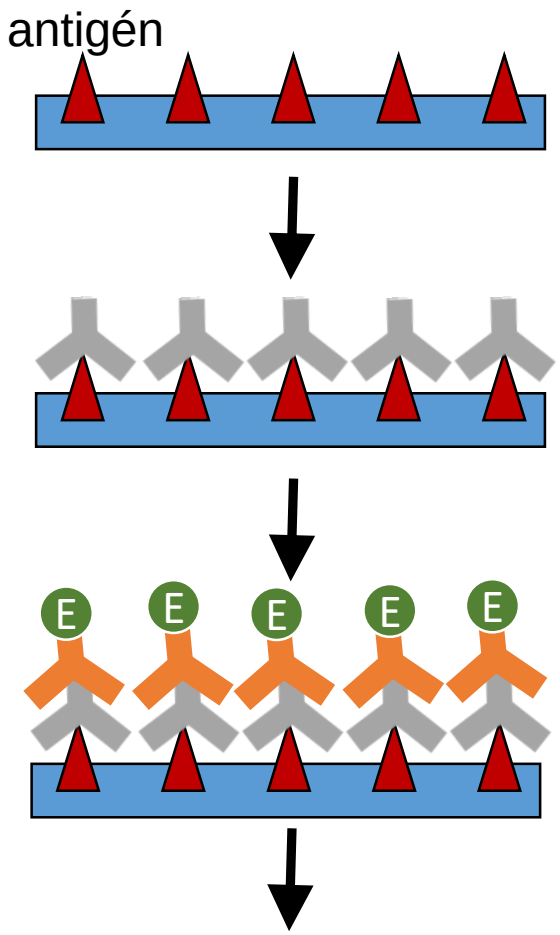
ELISA metódy

1. Nepriama ELISA metóda
   - Použitie: skríning protilátok, mapovanie epitopov
   - Potrebný materiál: chemicky čistý antigén, testovacie roztoky, protilátka s konjugovaným enzýmom
   - Potreba veľkého množstva antigénu

2. Priama kompetitívna ELISA metóda
   - Použitie: skríning protilátok, detekcia rozpustných antigénov
   - Potrebný materiál: chemicky čistý antigén, testovacie roztoky, protilátka s konjugovaným enzýmom
   - Rýchla dvojkroková metóda, meranie krížovej reaktivity

Detekcia imunoglobulínov

Nepriama ELISA metóda



- Nosič (modifikovaný povrch)
- Inkubácia s protilátkou
- Inkubácia so sekundárnou protilátkou+enzým

Pridanie substrátu a sledovanie zmien farby, fluorescencie

Detekcia imunoglobulínov

ELISA metóda

- Metódy detekcie
  - Kolorimetrická
  - Chemiluminiscenčná
  - Fluorescenčná
  - Bioluminiscenčná
  - Chemifluorescenčná
  - Autoradiografia
  - Imuno-Au značenie

Detekcia imunoglobulínov

ELISA metódy

3. Sendvičová metóda
   - Použitie: skríning protilátok, detekcia rozpustných antigénov
   - Potrebný materiál: zachytávajúca protilátka, testovacie roztoky, protilátka s konjugovaným enzýmom
   - Jedna z najcitlivejších metód, veľké množstvo čistej špecifickej protilátky

4. Dvojitá sendvičová metóda
   - Použitie: skríning protilátok, detekcia rozpustných antigénov
   - Potrebný materiál: zachytávajúca protilátka, testovacie roztoky, protilátka s konjugovaným enzýmom
   - Nie je potrebný vyčistený antigén, zdĺhavá 5-kroková metóda

Detekcia imunoglobulínov

ELISA metódy

5. Priama bunková metóda
   - Použitie: skríning buniek produkujúcich daný antigén, meranie produkcie antigénu
   - Potrebný materiál: bunky produkujúce daný antigén, protilátka s konjugovaným enzýmom
   - Jedna z najcitlivejších metód pre robustné testovanie zmiešanej heterogénnej populácie buniek

6. Nepriama bunková metóda
   - Použitie: skríning protilátok proti bunkovým antigénom
   - Potrebný materiál: bunky pre imunizáciu, testovacie roztoky, protilátka s konjugovaným enzýmom
   - Nemusí detegovať antigény s nízkou mierou produkcie a tým pádom s nižšiu hustotou

Detekcia imunoglobulínov

Mikroaglutinačná metóda

- Metóda stanovenia IgG v komplexnom prostredí, rádovo 20-300 ng/ml
- Monodisperzné polystyrénové mikročastice pokryté anti-IgG, ktoré absorbujú pri 340-405 nm
- V prítomnosti IgG, mikročastice agregujú a klesá absorbancia (340-405 nm)
- Porovnaním s kalibračnou krivkou je možné určiť koncentráciu IgG

7. Čistenie a purifikácia imunoglobulínov I

7. Čistenie a purifikácia imunoglobulínov

7.1. Purifikácia protilátok pomocou afinitnej chromatografie

7.2. Využitie proteínu A

7.3. Využitie proteínu G

7.4. Využitie proteínu L

7.5. Ďalšie postupy pri príprave čistých protilátok

7. Čistenie a purifikácia imunoglobulínov

Ciele

- Pochopiť jednotlivé stratégie pri čistení Ig
- Získať vedomosti a prehľad o jednotlivých čistiacich stratégiách
- Pochopiť rozdiely medzi SEC a HIC postupoch
- Oboznámiť sa s technickými postupmi používanými pri čistení protilátok

Izolácia imunoglobulínov

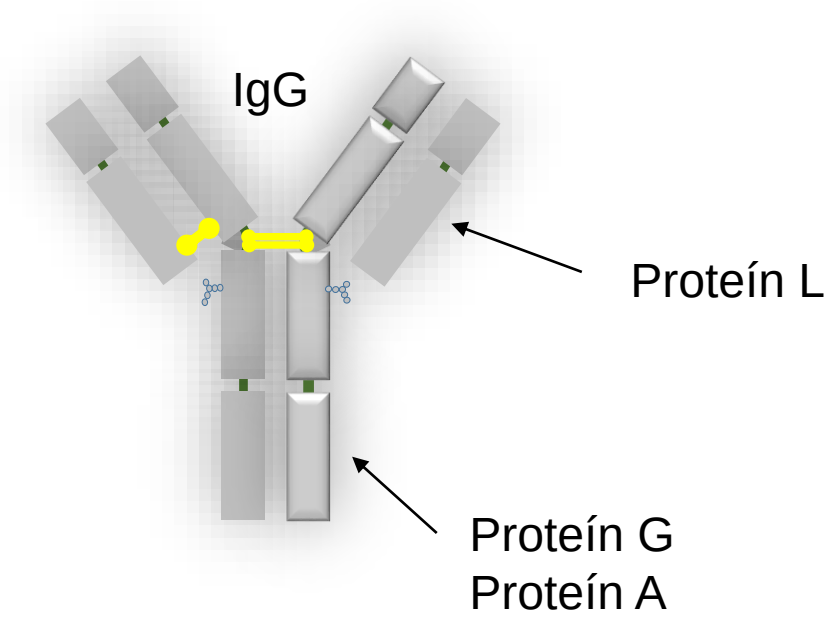
Problém: imunoglobulíny sa prirodzene nachádzajú spoločne s inými molekulami (sérum, supernatant produkujúcich buniek)

Potreba vyvinúť špecifické metódy, ktoré umožnia ich izoláciu

Izolácia imunoglobulínov

Príklad izolácie imunoglobulínov IgG

1. Precipitácia síranom amónnym
2. Chromatografické oddelenie pomocou DEAE celulózy
3. Afinitná chromatografia pomocou sepharózy s imobilizovaným proteínom G, A alebo L
   - Napr. IgG3 nereaguje s proteínom A, čo umožňuje jeho oddelenie od ostatných IgG

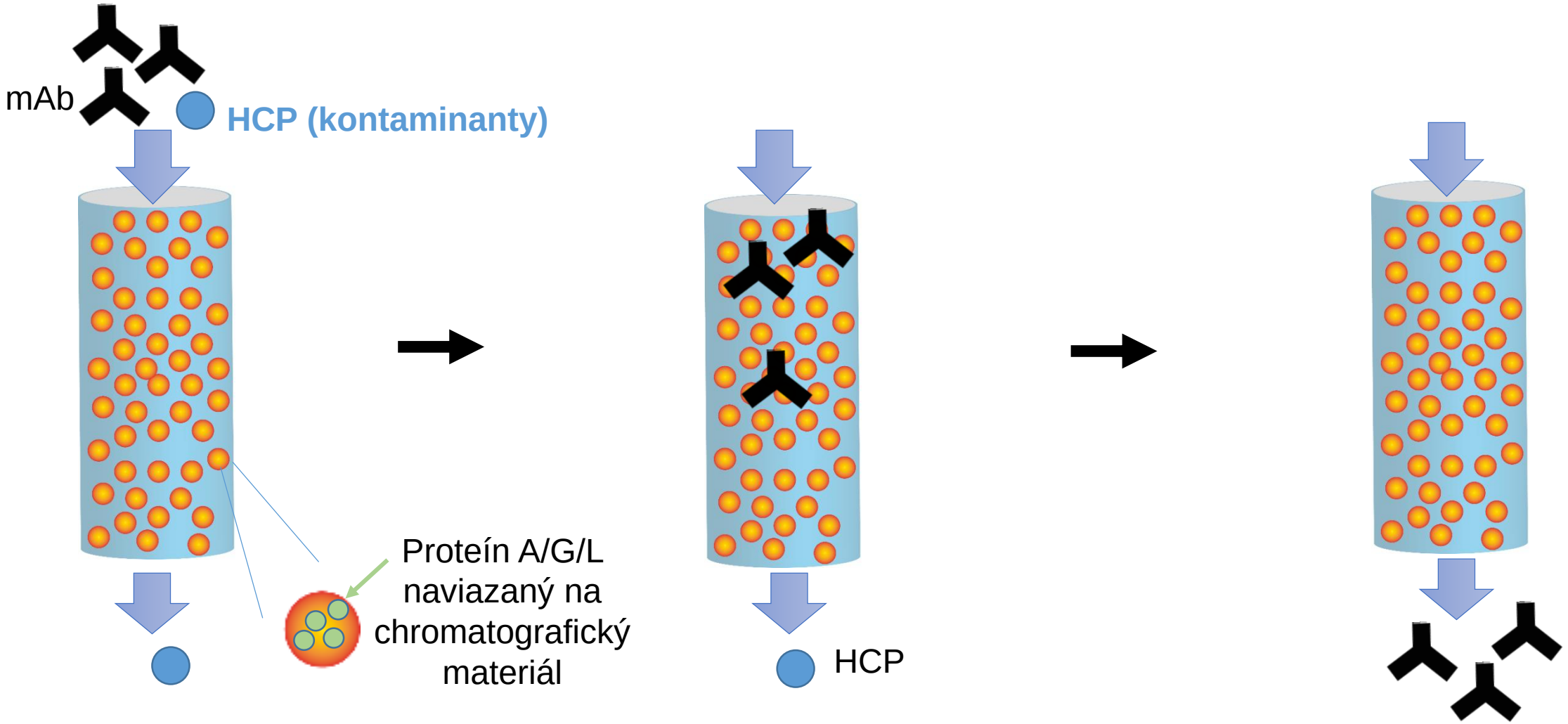


Izolácia imunoglobulínov: afinitná chromatografia

1. Krok: naviazanie

2. Krok: vymývanie tlmivým roztokom

3. Krok: eluovanie pri pH 3,0



Izolácia imunoglobulínov

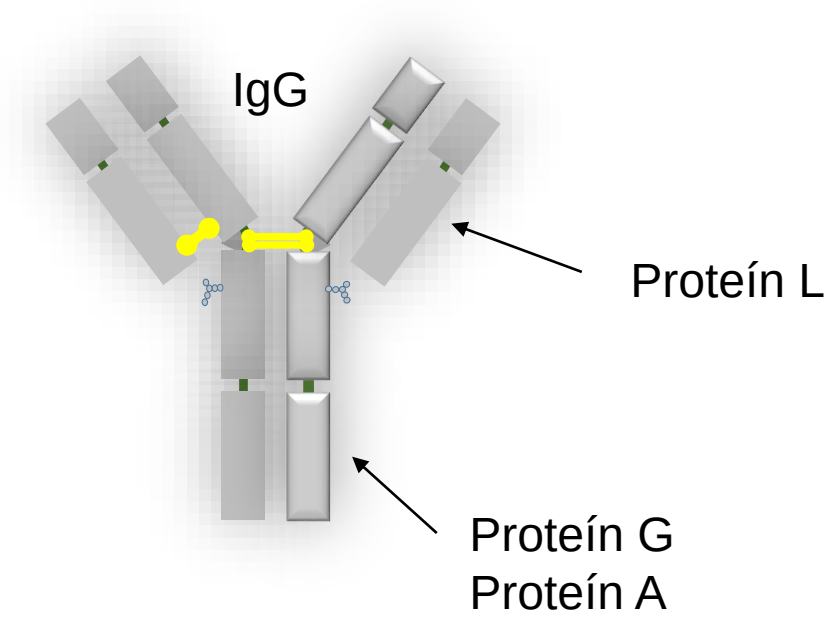
Proteín G

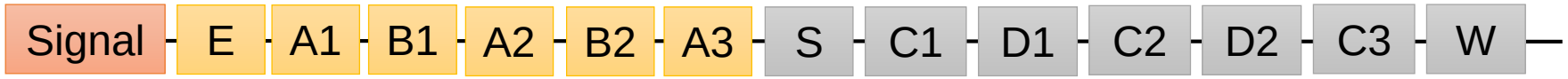
		Proteín G
Ľudské IgG	$IgG_{1,2,4}$	+++
	IgG_3	+++
	IgM, IgA, IgE, IgD	+
	Fab, $F(ab')_2$	+
	scFv	-
Polyklonálne imunoglobulíny	Myš	++
	Potkan	++
	Zajac	+++
	Koza, krava	++
	Prasa	+

Izolácia imunoglobulínov

Proteín G

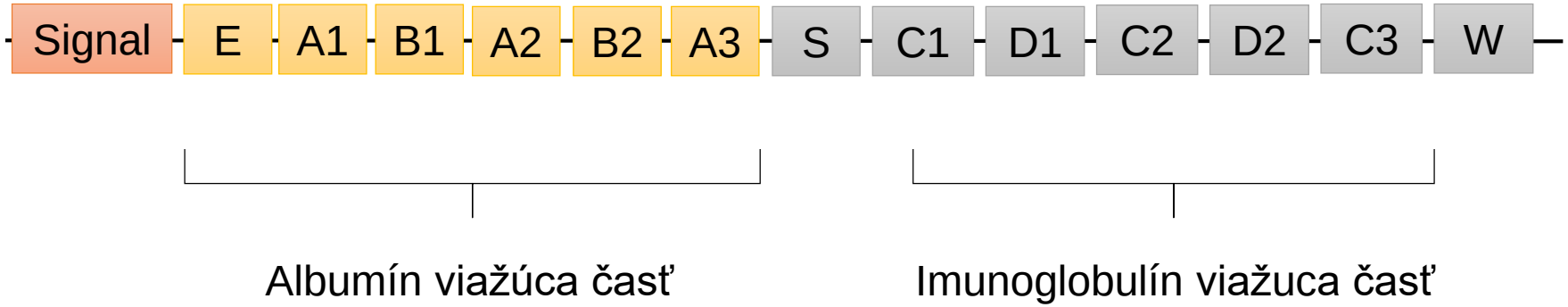
- 516 aminokyselín (P06654), 47 kDa
- Imunoglobulín viažúci proteín z povrchu streptokokálnych baktérií (C a G skupina)
- Využitie pri čistení protilátok
- Viaže ľudský sérový albumín
- Signálna sekvencia + 13 domén



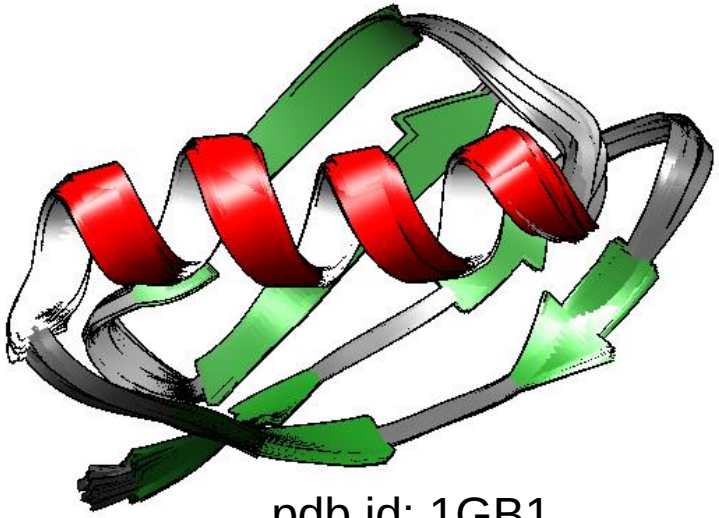


Izolácia imunoglobulínov

Proteín G



- Signálna sekvencia – export z cytoplazmy
- E-A3 sú zodpovedné za viazanie albumínu
- S-C3 sú zodpovedné za viazanie imunoglobulínu

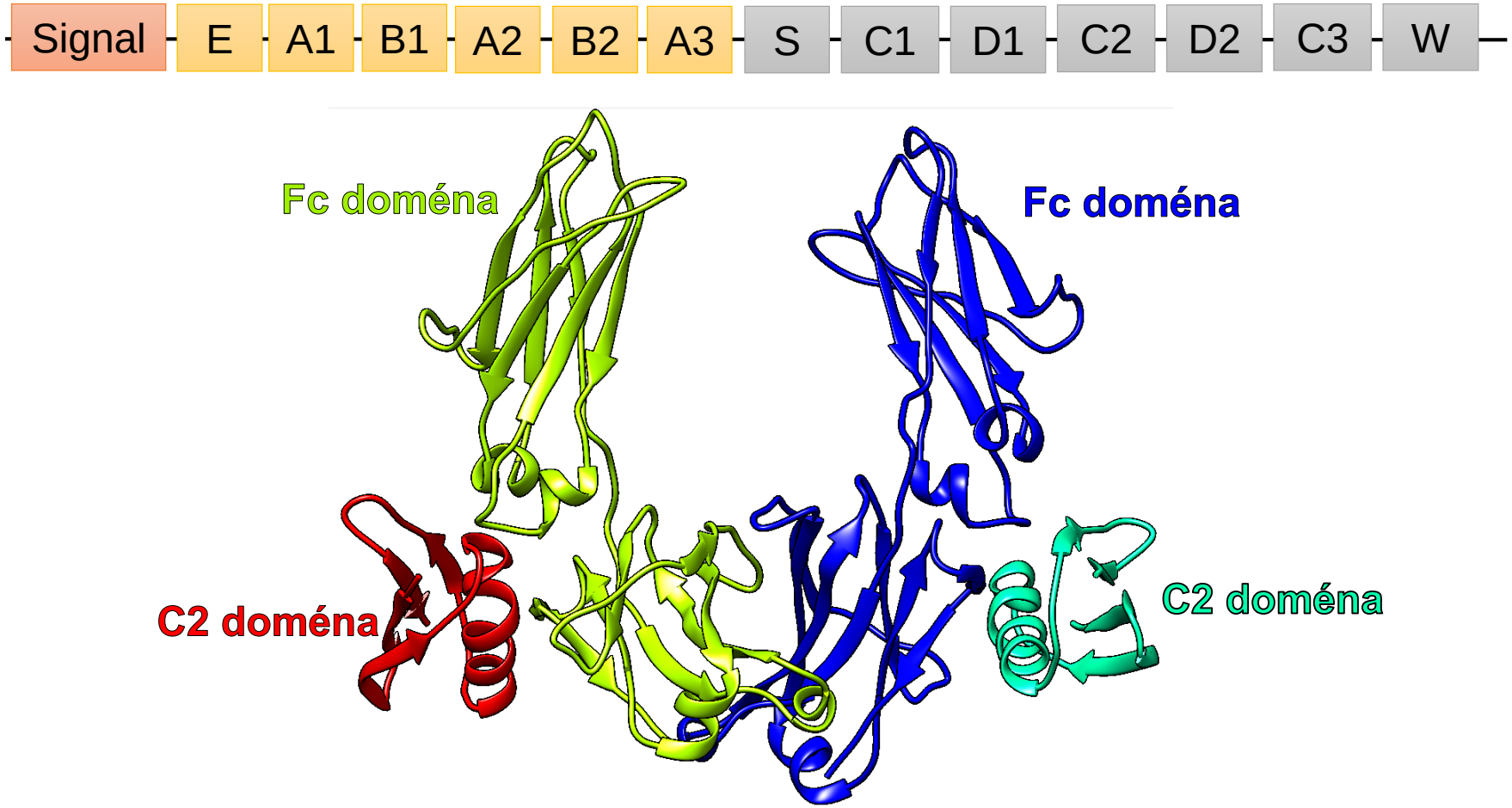


pdb id: 1GB1

B1 doména 228-282

Izolácia imunoglobulínov

Proteín G



pdb id: 1FCC

Proteín G C2 doména (372-427) + Fc časť ľudského IgG (121-326)

Izolácia imunoglobulínov

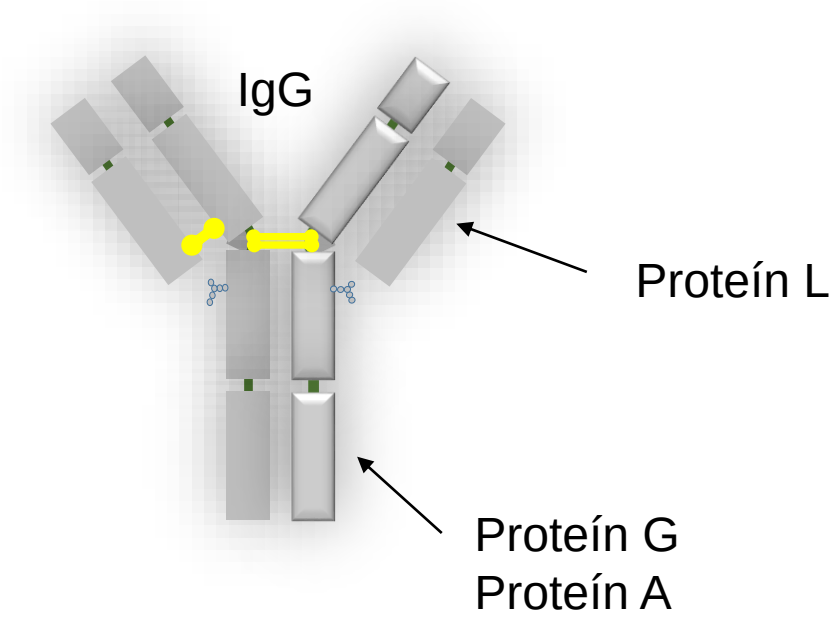
Proteín A

		Proteín A
Ľudské IgG	$IgG_{1,2,4}$	+++
	IgG_3	-
	IgM, IgA, IgE, IgD	+
	Fab, $F(ab')_2$	+
	scFv	+
Polyklonálne imunoglobulíny	Myš	++
	Potkan	+
	Zajac	++
	Koza, krava	+
	Prasa	+

Izolácia imunoglobulínov

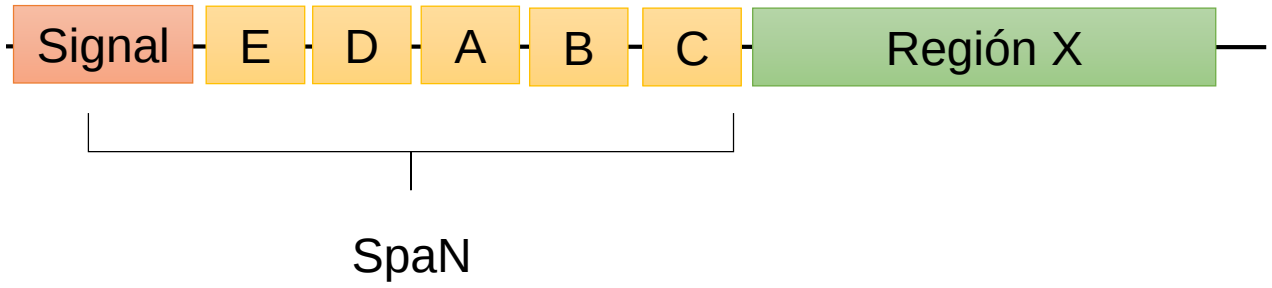
Proteín A

- 516 aminokyselín (P02976), 56 kDa
- Imunoglobulín viažúci sa proteín z povrchu *Staphylococcus aureus*
- Gén *spa* súčasť dvojkomponentového systému ArlS-ArlR
- Využitie: preferenčná voľba pre čistenie protilátok, imunofarbenie
- Signálna sekvencia + 6 oblastí



Izolácia imunoglobulínov

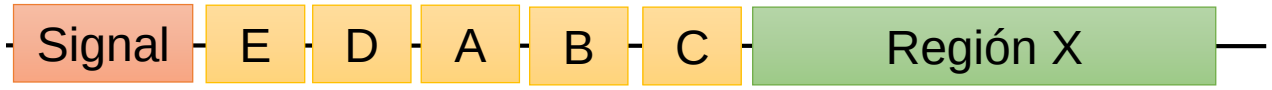
Proteín A

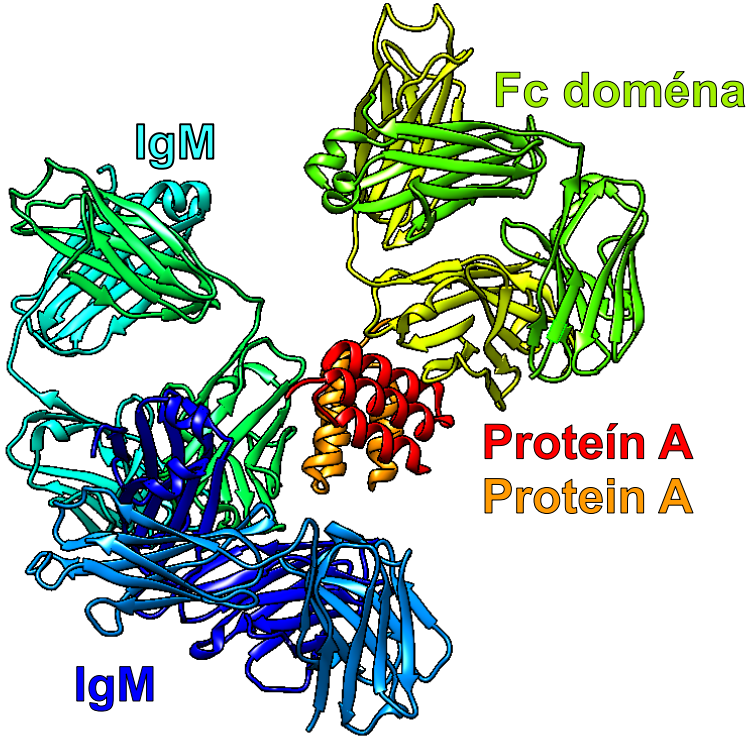


- Signálna sekvencia – export z cytoplazmy
- E-C sú imunoglobulínom podobné domény
- Región X potrebný na uchytenie k bunkovej stene

Izolácia imunoglobulínov

Proteín A





pdb id: 1DEE

Proteín A (100-153)+ IgM

Príprava čistých protilátok

Podmienky potrebné na naviazanie a elúciu protilátok z afinitnej chromatografie na báze proteínu A			
	Podtrieda	pH potrebné na naviazanie proteínu A	pH potrebné na elúciu
Homo sapiens	IgG1 IgG2 IgG3 IgG4	6,0-7,0 6,0-7,0 8,0-9,0 7,0-8,0	3,5-4,5 3,5-4,5 <7,0 3,0-6,0
Mus musculus	IgG1 IgG2a	8,0-9,0 7,0-8,0	4,5-6,0 3,5-6,5
Rattus rattus	IgG1 IgG2a IgG2b IgG3	>9,0 >9,0 >9,0 8,0-9,0	7,0-8,0 <8,0 <8,0 3,0-4,0+3 M izotiokyanát draselný

Izolácia imunoglobulínov

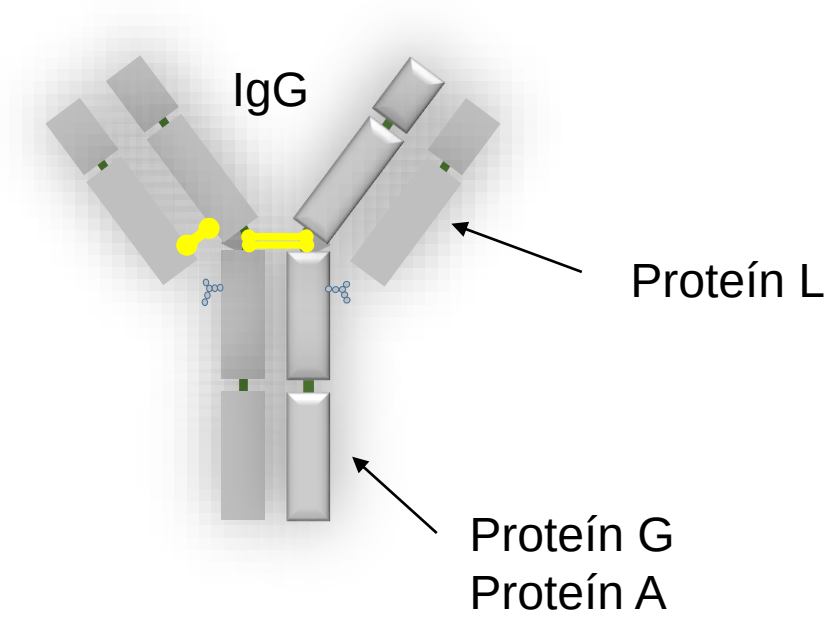
Proteín L

		Proteín L
Ľudské IgG	$IgG_{1,2,4}$	+++
	IgG_3	+++
	IgM, IgA, IgE, IgD	++
	Fab, $F(ab')_2$	++
	scFv	+++
Polyklonálne imunoglobulíny	Myš	++
	Potkan	++
	Zajac	+
	Koza, krava	-
	Prasa	++

Izolácia imunoglobulínov

Proteín L

- Izolovaný z povrchu baktérie *Peptostreptococcus magnus*
- Viaže sa na ľudský ľahký reťazec typu kappa okrem podtypu VkII
- Široká škála imunoglobulínov: IgG, IgM, IgA, IgE a IgD, scFv a Fab fragmenty
- 719 aminokyselín
- 5 častí + signálna sekvencia na lokalizáciu



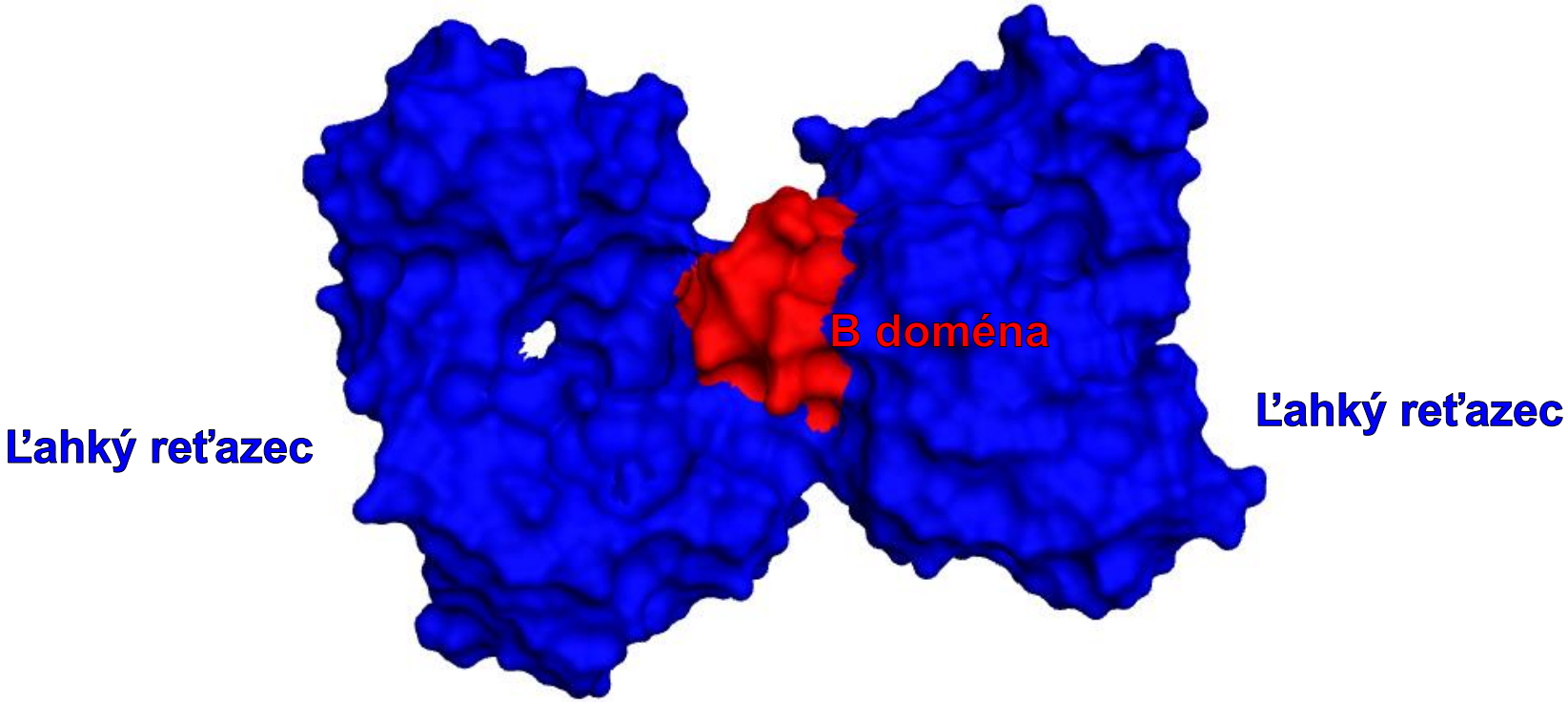
Izolácia imunoglobulínov

Proteín L

- 5 domén + signálna sekvencia na lokalizáciu (1-26)
- Časť A: doména 79 aminokyselín
- Časť B: 5 homológnych domén, ktoré sa viažu na ľahký reťazec, 72-76 aminokyselín
- Časť C: 52 aminokyselín
- Časť W: hydrofilná na prolín bohatá sekvencia
- Časť M: hydrofóbna membránová kotva

Izolácia imunoglobulínov

Proteín L



pdb id: 1HEZ

Izolácia imunoglobulínov

Tabuľka: Proteíny A, G a L a ich využitie pri viazaní imunoglobulínov

		Proteín A	Proteín G	Proteín L
Ľudské IgG	$IgG_{1,2,4}$	+++	+++	+++
	IgG_3	-	+++	+++
	IgM, IgA, IgE, IgD	+	+	++
	Fab, $F(ab')_2$	+	+	++
	scFv	+	-	+++
Polykolnálne imunoglobulíny	Myš	++	++	++
	Potkan	+	++	++
	Zajac	++	+++	+
	Koza, krava	+	++	-
	Prasa	+	+	++

Izolácia imunoglobulínov

Izolácia imunoglobulínov IgA

- Využíva sa rastlinný lektín Jacalin (P18670)
  - 133 aminokyselín, 14 kDa
  - skladá sa z domén viažúcich manózu
  - tetramérna štruktúra
  - vysoko špecifický pre *O*-spojené oligosacharidy vyskytujúce sa v IgA1

Príprava čistých protilátok

Bunkové línie na produkciu syntetických protilátok

- CHO
  - Imortalizovaná bunková línia z ovária čínskeho škrečka (z ang. chinese hamster ovary)
- NS0
  - Bunková línia odvodená z myšacieho myelómu, prirodzene produkujúca protilátky

- Sp2/0
  - Bunková línia odvodená z myšacieho myelómu po fúzií s BALB/c myšacími bunkami sleziny, neprodukujúca protilátky
  - BALB myš – laboratórne množená albíno (-ALB) myš, počiatočné B je odvodené od mena Halsey J. Bagg zakladateľa tejto laboratórnej línie

Príprava čistých protilátok

Spôsoby prípravy

- Protilátky ako aj ich fragmenty sa pripravujú z natívnych alebo rekombinantných zdrojov

Zdroj	Molekulárny typ	Kontaminácie	Množstvo
Ľudské sérum	Polyklonálne IgG, IgM, IgA, IgD, IgE	Albumín, transferín, sérové proteíny, α2-makroglobulín	IgG 8–16 mg/ml, IgM 0,5–2 mg/ml, IgA 1–4 mg/ml, IgE 10–400 ng/ml, IgD do 0,4 mg/ml
Hybridoma: bunkové kultúry + zvieracie sérum	Monoklonálne	Fenolová červeň, albumín, transferín, prirodzené zvieracie IgG	~1mg/ml
Hybridoma: bunkové kultúry bez zvieraceho séra	Monoklonálne	Albumín, transferín	~0,05 mg/ml
Vaječný žĺtok	IgY	Lipidy, lipoproteíny a vitellin	3-4 mg/ml

Príprava čistých protilátok

Spôsoby prípravy

- Protilátky ako aj ich fragmenty sa pripravujú z natívnych alebo rekombinantných zdrojov

Zdroj	Molekulárny typ	Kontaminácie	Množstvo
Extracelulárny proteín exprimovaný v supernatante	Fab a (Fab´)2	Bakteriálne proteíny, biomolekuly, nízka miera nečistôt	V závislosti od expresného systému
Intracelulárna expresia proteínov		Bakteriálne resp. fágové proteíny	V závislosti od expresného systému

Príprava čistých protilátok

Spôsoby prípravy

- Extrakčné procesy podľa stupňa intenzity rozrušenia biologického materiálu
  - Šetrné postupy (napr. osmotický šok, enzymatické štiepenie)
  - Stredne intenzívne postupy (drvenie pomocou piesku)
  - Vysoko intenzívne postupy (ultrazvuk, Manton-Gaulin homogenizer)

Príprava čistých protilátok

Spôsoby prípravy

- Extrakčné procesy podľa stupňa intenzity rozrušenia biologického materiálu

Extrakcia musí byť urobená dostatočne rýchlo a pri nízkych teplotách v prítomnosti vhodného tlmivého roztoku, ktorý je potrebný na udržanie pH a iónovej sily a taktiež pre stabilizáciu vzorky.

Ak sa z buniek uvoľní DNA, tak lyzát sa stáva príliš viskózny, čo sťažuje ďalší postup. V takom prípade je potrebná

- sonifikácia, a/alebo
- pridanie Dnázy (10 μg/ml) + Mg^{2+} ióny

Príprava čistých protilátok

- Extrakčné procesy

Extrakčný proces	Typické podmienky	Zdroj	Komentár
Lýza buniek, osmotický šok	2 obj. vody k 1 objemu pred-pripravených buniek	*E. coli* periplazma	Nízky výťažok Výrazne redukované uvoľňovanie proteáz
Enzymatické štiepenie	Lyzozým 0,2 mg/ml, +37°C, 15 minút	Baktérie, intracelulárne prostredie	Len laboratórne výťažky, často je potrebné kombinovať s mechanickým rozrušením
Rozotieranie resp. drtenie so pieskom	Manuálne resp. podľa manuálu	Baktérie	
Ultrazvuk	Podľa manuálu	Bunkové suspenzie: intracelulárne proteíny, inklúzne telieska	V menšej škále, uvoľnené nukleové kyseliny zvyšujú viskozitu, inklúzne telieska musia byť opätovne solubilizované
Manton-Gaulin homogenizer	Podľa manuálu	Bunkové suspenzie	pri produkcii vo veľkej škále
French press	Podľa manuálu	Baktérie	

Príprava čistých protilátok

Spôsoby prípravy

Úprava vzorky pred chromatografiou

- Prítomnosť mikročastíc môže spôsobiť upchatie chromatografickej kolóny
- Výber veľkosti filtra súvisí s veľkosťou častíc chromatografického materiálu

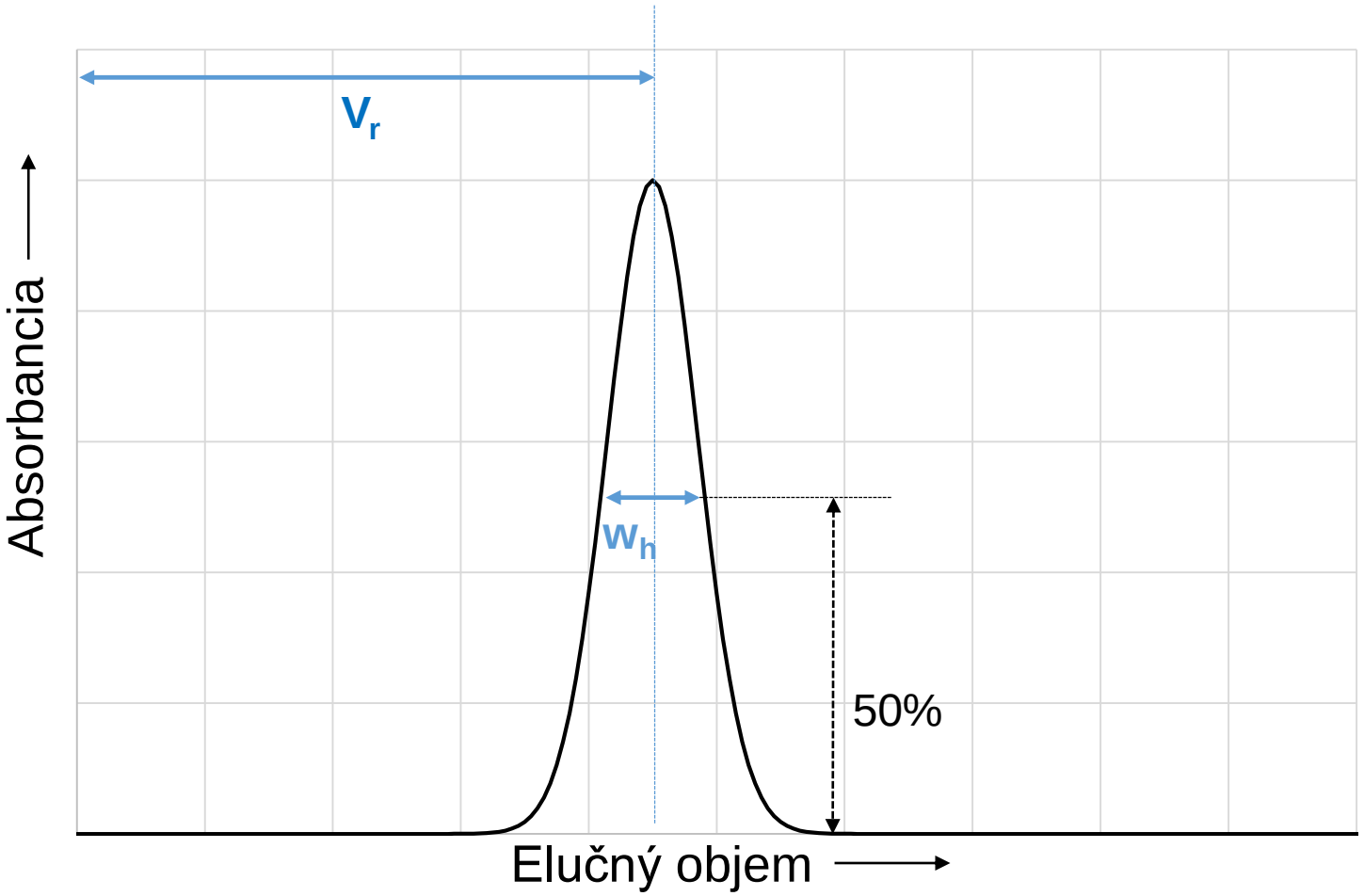
Nominálna veľkosť pórov filtra	Veľkosť častíc chromatografického média
1 µm	90 µm
0,45 µm	34 µm
0,22 µm	3-15 µm

Príprava čistých protilátok

Indukovaná precipitácia protilátok

Precipitant	Komentár
Síran amónny	Stabilizuje natívny proteín, odstraňuje lipidy, koncentrácia IgG by mala byť väčšia ako 1 mg/ml, vhodné na zakoncentrovanie proteínu
Kyselina kaprylová	Koncentrácia IgG by mala byť väčšia ako 1 mg/ml, proteín ostáva v supernatante
Polyetylén glykol	Stabilizuje proteín, IgM precipituje rýchlejšie ako IgG
etakridín	Toxický, precipituje lipidy, DNA virálne častice, endotoxíny

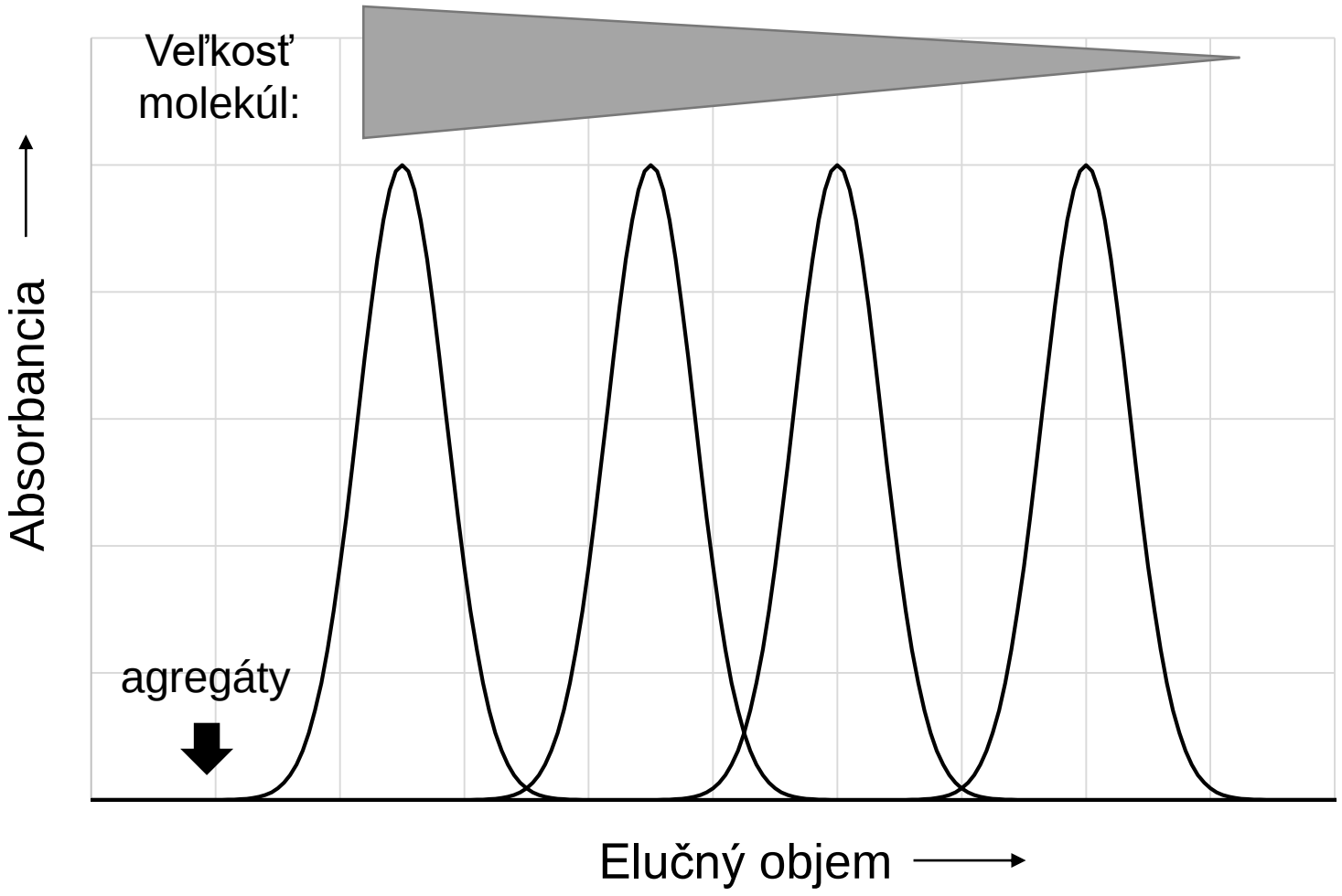
Príprava čistých protilátok: SEC chromatografia



- V_R: eluovaný objem od začiatku až do maxima elučného pásu
- Wh: šírka elučného pásu pri polovičnej výške elučného pásu
- N: počet teoretických priehradiek

$$N = 5.54 \times (V_r/w_h)$$

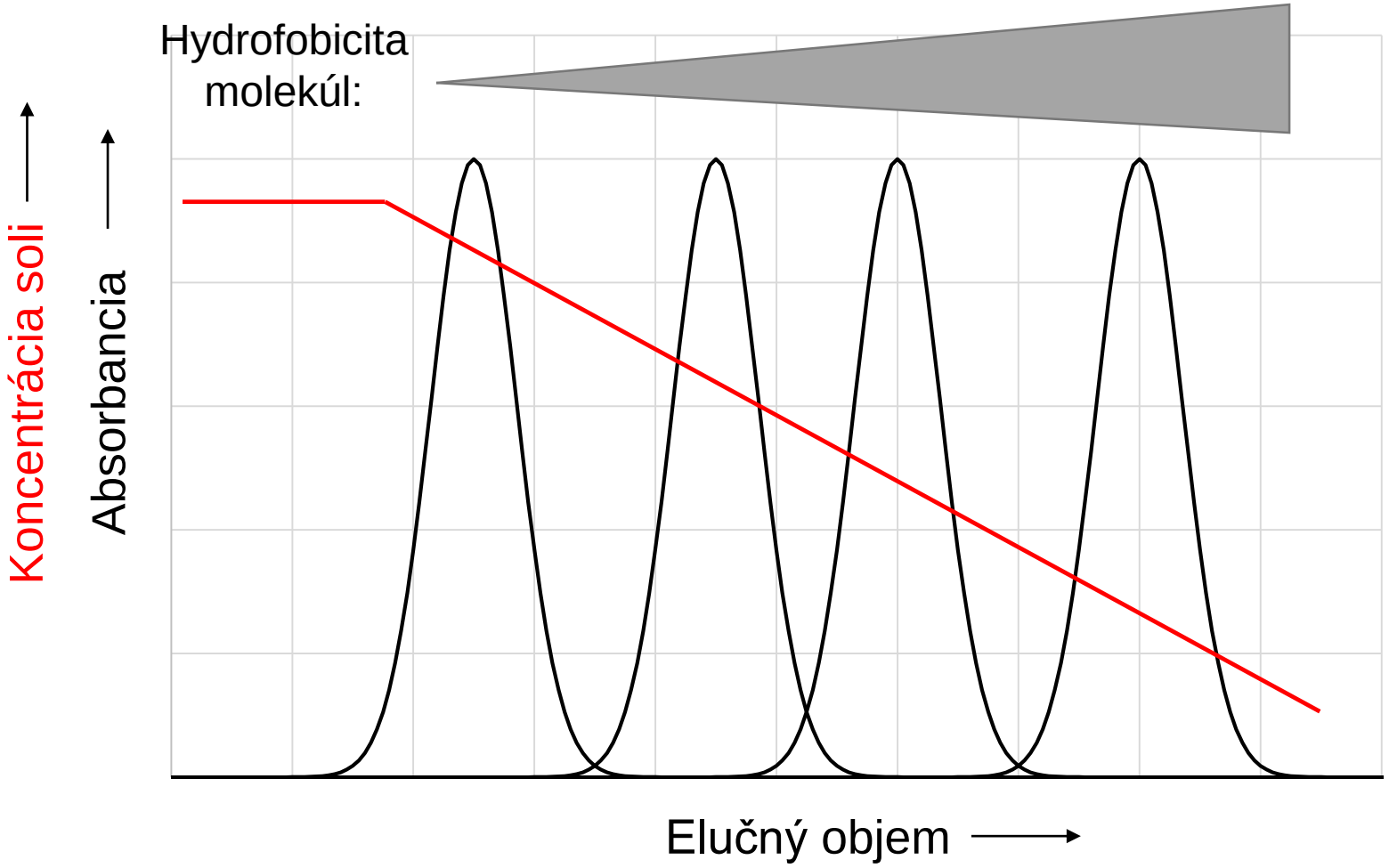
Príprava čistých protilátok: SEC chromatografia



Typický materiál

- ❑ Superdex
- ❑ Sepharóza
- ❑ Sephakryl

Príprava čistých protilátok: HIC chromatografia



Typický materiál

- ❑ Fenyl-sepharóza
- ❑ Butyl-sepharóza
- ❑ Polystyrén-divinyl benzén

Príprava čistých protilátok

Porovnanie priemyselnej veľkovýroby pre 100 g IgG: HIC vs. SEC

	Hydrofóbna interakčná chromatografia (HIC)	Separačná gélová chromatografia (SEC)
Objem kolóny (L)	4	40
Rozmery kolóny (cm)	14x26	20x120
Počiatočná koncentrácia produktu (g/l)	10	25
Počet cyklov	1	4
Náklady na chromatografický material (EUR)	7 200	80 000
Výťažok (%)	85	80
Procesný čas (hod.)	0,75	17

Porovnanie jednotlivých izolačných metód

1) **Precipitácia síranom amónnym (citlivosť: ● ● ● ● ●)**
   - ❑ Výsledná čistota a výťažok závisí od viacerých faktorov (pH, teplota, čas)
   - ❑ Prvotný krok pred chromatografickými metódami
   - ❑ Nízka špecificita, nízka finančná náročnosť, potreba centrifugácie
2) **Gélová chromatografia (citlivosť: ● ● ● ● ●)**
   - ❑ Delenie na základe veľkosti a tvaru molekúl
   - ❑ Stredná špecificita, často použtívaná v poslednom kroku izolácie
3) **Ιónomeniče (citlivosť: ● ● ● ● ● ●)**
   - ❑ Chromatografia založená na počte nábitých častíc na povrchu molekúl
   - ❑ Vysoka špecificita, veľké rozdiely medzi jednotlivými kvalitou pevnej fázy (Q vs. MonoQ)
4) **Afinitná chromatogracia (citlivosť: ● ● ● ● ●)**
   - ❑ Vysoká špecificita založená na interakcií medzi proteínmi alebo ligandmi,
   - ❑ Finančne nákladná pevná fáza obsahujúca biologicky materiál, nízka stabilita
   - ❑ Často jednokroková izolácia, časová úspora
5) **HIC chromatografia (citlivosť: ● ● ● ● ●)**
   - ❑ Stredne špecifická metóda využívajúca rozdielnu hydrofobicitu proteínového povrchu
   - ❑ Stredná finančná náročnosť

8. Posttranslačné modifikácie imunoglobulínov

8. Posttranslačné modifikácie imunoglobulínov

8.1. Všeobecný prehľad PTM

8.2. PTM u monoklonálnych protilátok (amidácia, izomerizácia)

8.3. Glykozylácia protilátok

8.4. Sekvenčné variácie protilátok

8. Posttranslačné modifikácie imunoglobulínov

Ciele

- ❑ Pochopiť chemickú diverzitu posttranslačných modifikácií
- ❑ Získať základné vedomosti o chemických reakciách
- ❑ Pochopiť princípy detekcie posttranslačných modifikácií
- ❑ Oboznámiť sa s pojmom CQA

Posttranslačné modifikácie

Posttranslačné modifikácie (PTM) zohrávajú kľúčovú úlohu pri dynamických bunkových procesoch, regulujú génovú expresiu, proteínovú aktivitu, lokalizáciu, degradáciu a proteín-proteín interakcie. Typické PTM zahŕňajú fosforyláciu, SUMOyláciu, glykozyláciu, metyláciu, ubiquitináciu, acetyláciu, palmitoyláciu. V súčasnosti je známych viac ako 500 druhov PTM.

Posttranslačné modifikácie imunoglobulínov

PTM ovplyvňujú stabilitu a reprodukovateľnosť agregácie Ig. V prípade terapeutických protilátok je obzvlášť dôležitá reprodukovateľnosť a kontrola vlastností protilátok počas farmaceutickej výroby. Kontrola niektorých PTM je súčasťou protokolov monitorujúcich kritický atribút kvality CQA (z. ang. critical quality attribute) terapeutických protilátok. Na detekciu PTM sa využívajú chromatografické metódy a hmotnostná spektrometria.

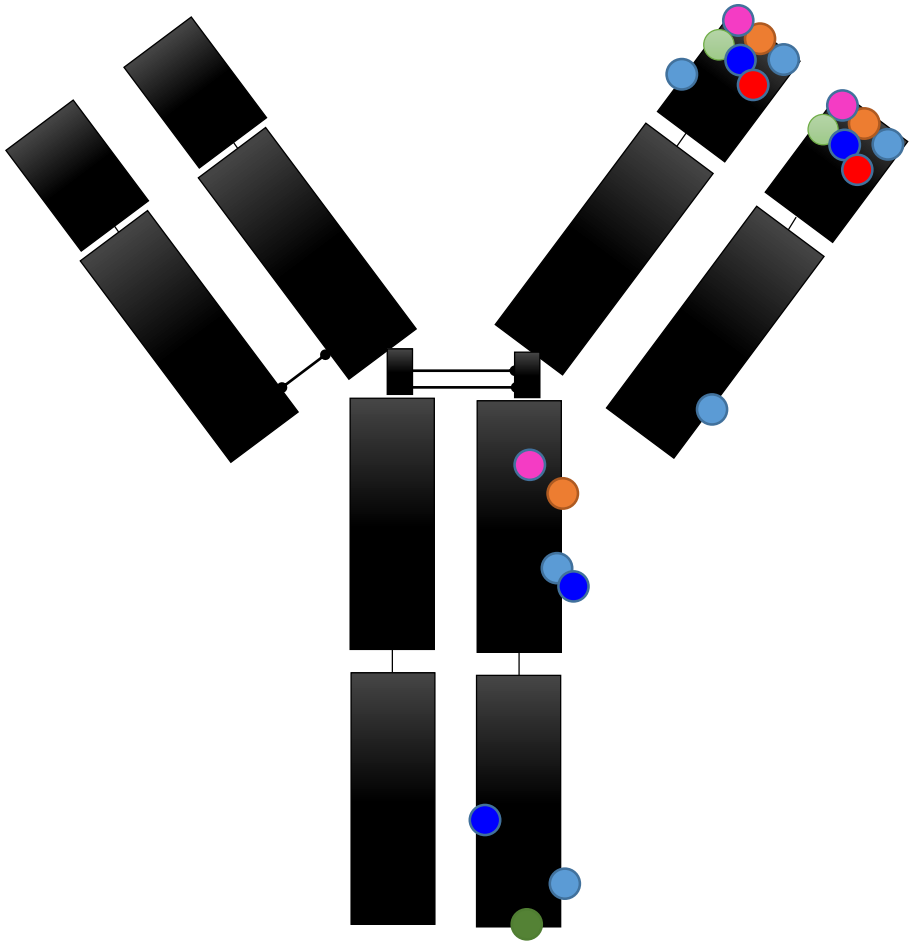
CQA (z. ang. critical quality attribute)

Kritické atribúty kvality (CQA) sú chemické, fyzikálne, biologické a mikrobiologické vlastnosti, ktoré môžu byť definované, merané a kontinuálne monitorované pre zabezpečenie kvality finálneho farmaceutického produktu.

Posttranslačné modifikácie imunoglobulínov

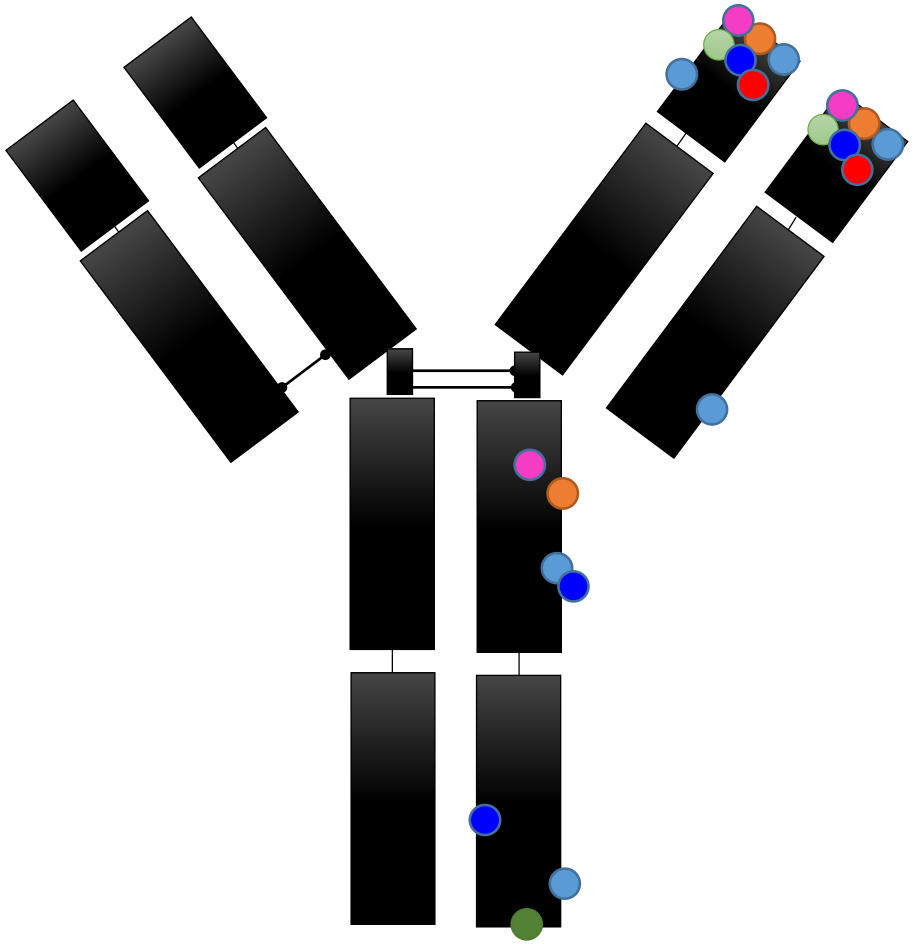
1. Deamidácia
2. Pyroglutamát
3. C-terminálny lyzín (prítomný/neprítomný)
4. Oxidácia
5. Voľná tiolová skupina (cysteín)
6. Izomerizácia
7. Glykácia
8. N-glykozylácia

Posttranslačné modifikácie imunoglobulínov



- deamidácia
- N-glykozylácia
- izomerizácia
- voľná tiolová skupina
- oxidácia
- pyroglutamát
- C-terminálny lyzín (prítomný/neprítomný)

Posttranslačné modifikácie: deamidácia

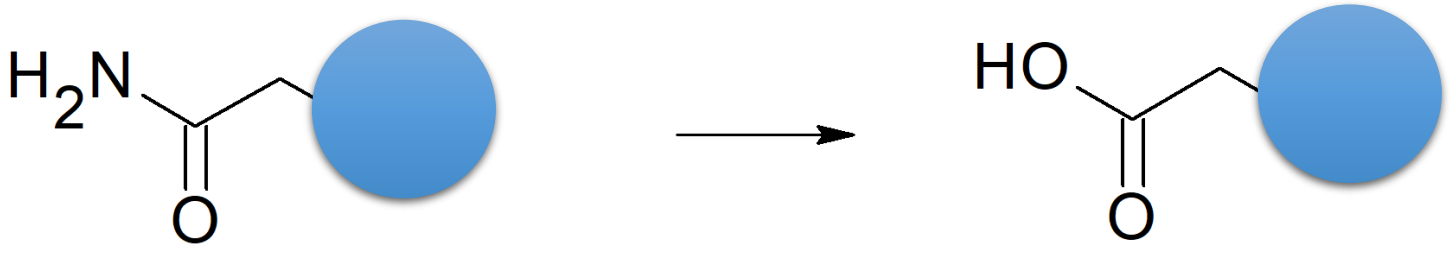


deamidácia

- Deamidácia proteínu znamená stratu amidovej skupiny buď z asparagínu alebo glutamínu, čím dochádza k poškodeniu bočného reťazca a zmene jeho fyzikálno-chemických vlastností
- Deamidácia Asp102 u herceptínu znižuje potenciu liečiva
- Zmena asparagínu na aspartát a glutamínu na glutamát
- Reakcia prebieha cez sukcinimidový intermediát
- Patrí ku kritickým atribútom kvality CQA
- Zmena v molekulovej hmotnosti: +0,98 (podobne ako premena na izoaspartát)

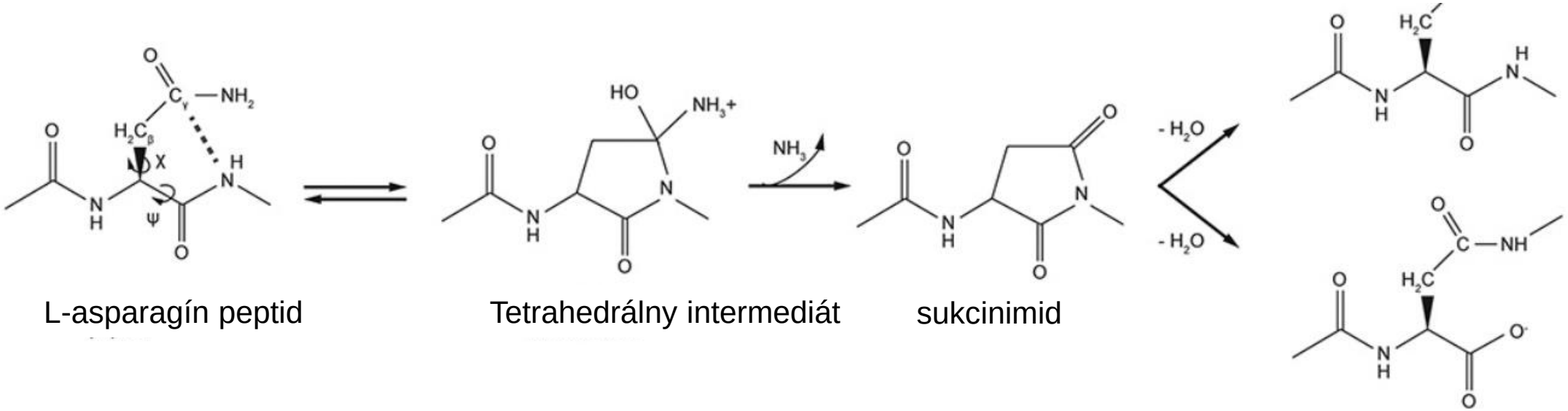
Posttranslačné modifikácie: deamidácia

- deamidácia proteínu



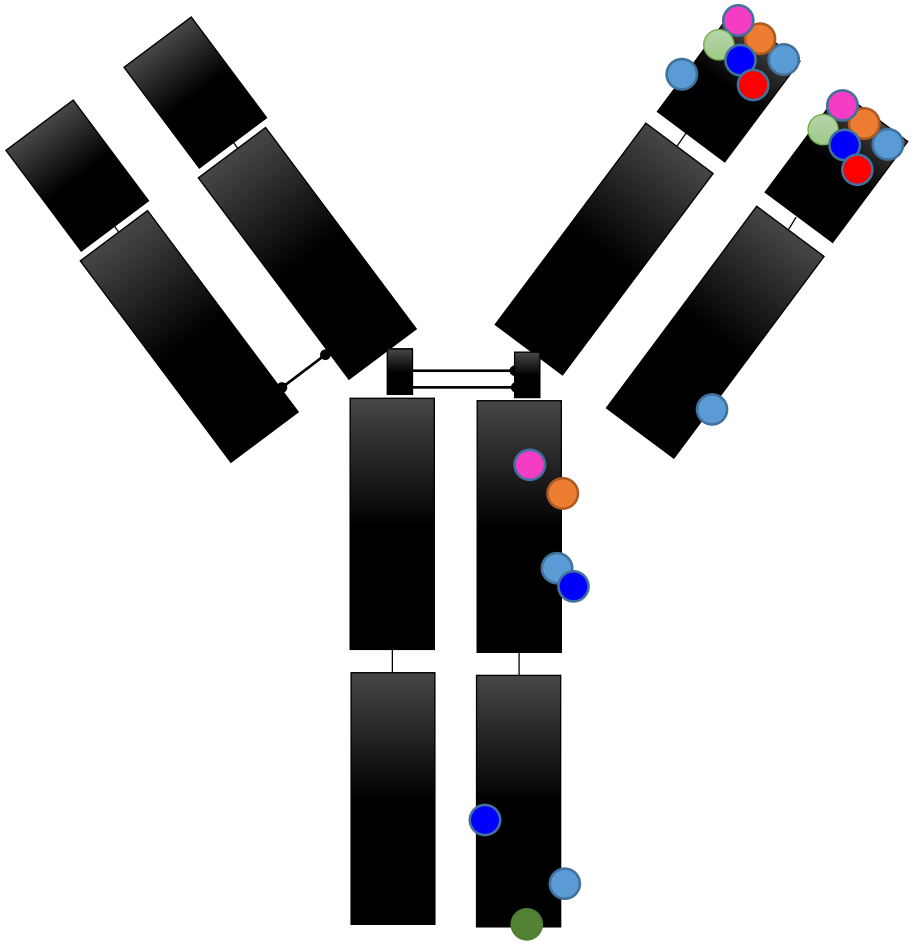
Posttranslačné modifikácie: deamidácia

- deamidácia proteínu – mechanizmus



Yan Q, Huang M, Lewis MJ, Hu P. Structure Based Prediction of Asparagine Deamidation Propensity in Monoclonal Antibodies. MAbs. 2018 Aug/Sep;10(6):901-912. doi: 10.1080/19420862.2018.1478646.

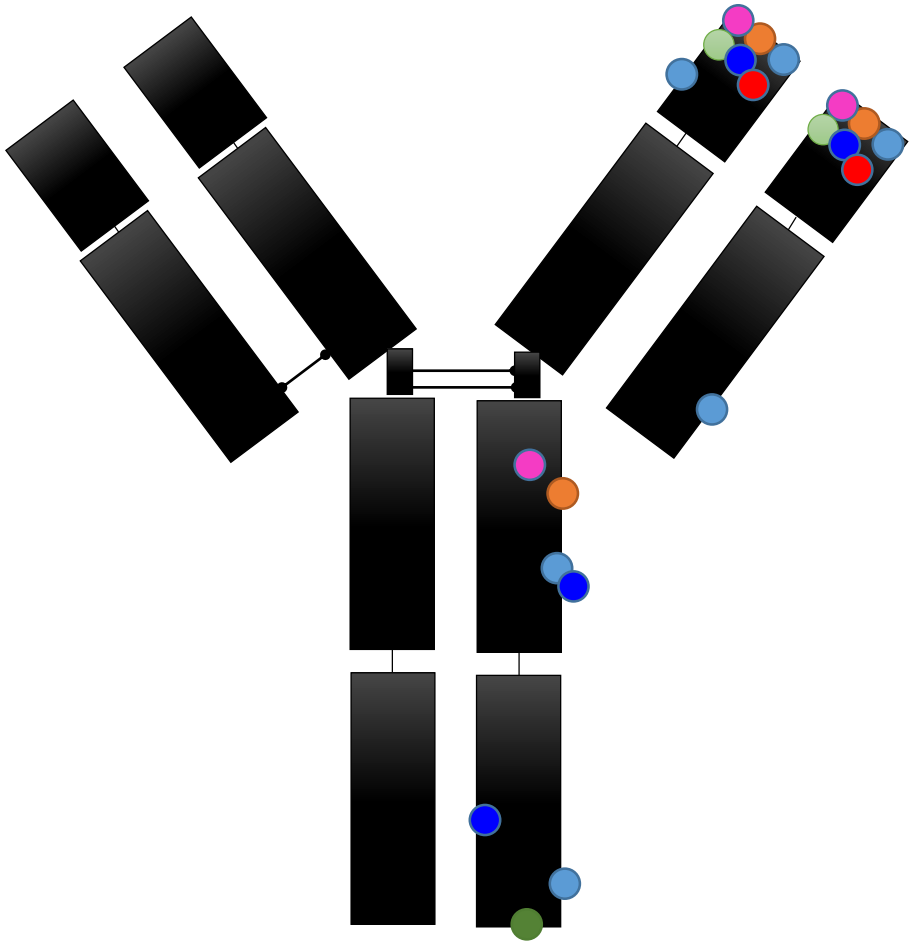
Posttranslačné modifikácie: izomerizácia



izomerizácia

- Deamidácia asparagínu a izomerizácia aspartátu je intramolekulová reakcia, ktorá prebieha bez prítomnosti enzýmov
- Mechanizmus zahŕňa cyklický imidový intermediát
- Závisí od pH, primárnej štruktúry a dielektrickej konštanty rozpúšťadla
- Kritický atribút kvality, CQA

Posttranslačné modifikácie: pyroglutamát

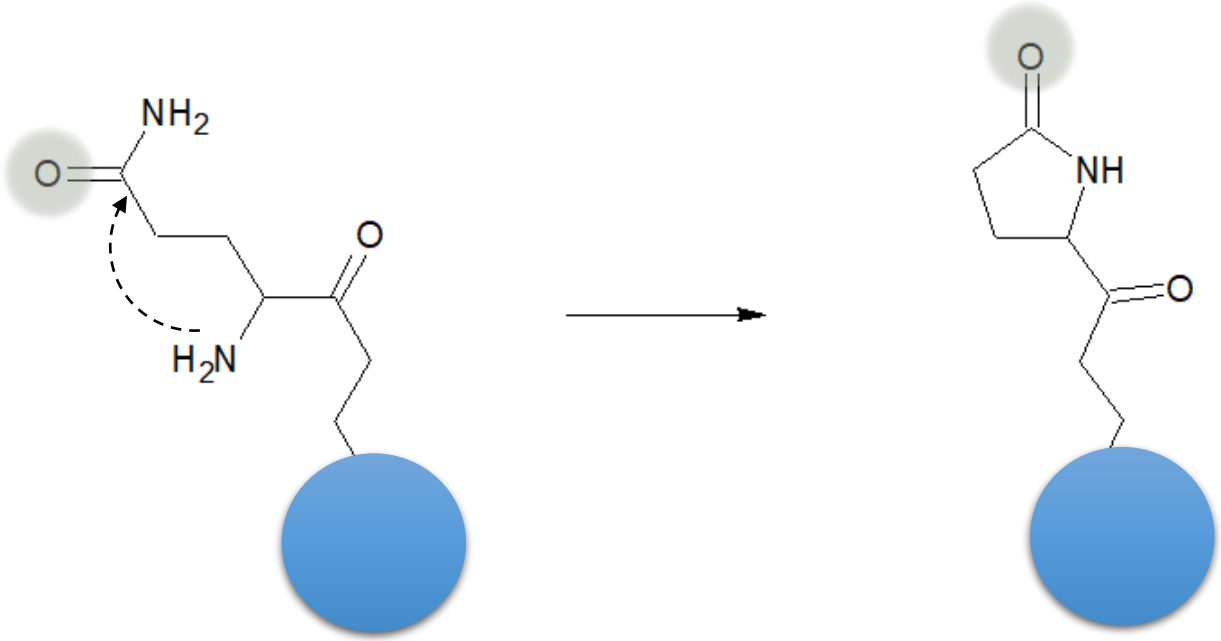


pyroglutamát

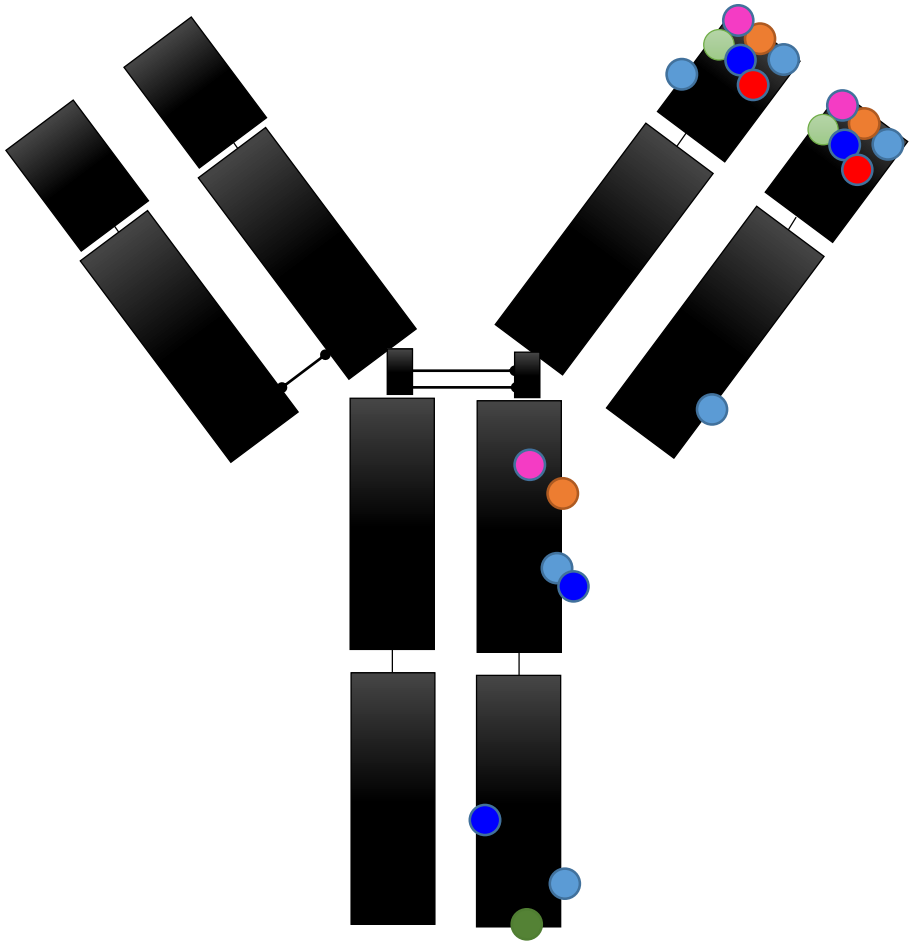
- Pyroglutamát (pyroGlu) je cyklická aminokyselina lokalizovaná na N-konci proteínov
- Vzniká premenou glutamátu alebo glutamínu, čím dochádza k lokálnej zmene fyzikálno-chemických vlastností
- V niektorých prípadoch dochádza k zvýšeniu stability IgG a ich odolnosti voči peptidázam
- Reakcia prebieha sponntánne alebo za pomoci enzýmu glutaminyl cyklázy
- Je takmer na 95% prítomná u N-koncových Gln Ig
- Zmena v molekulovej hmotnosti: -17,0

Posttranslačné modifikácie: pyroglutamát

- Vznik pyroglutamátu



Posttranslačné modifikácie: C-terminálny lyzín

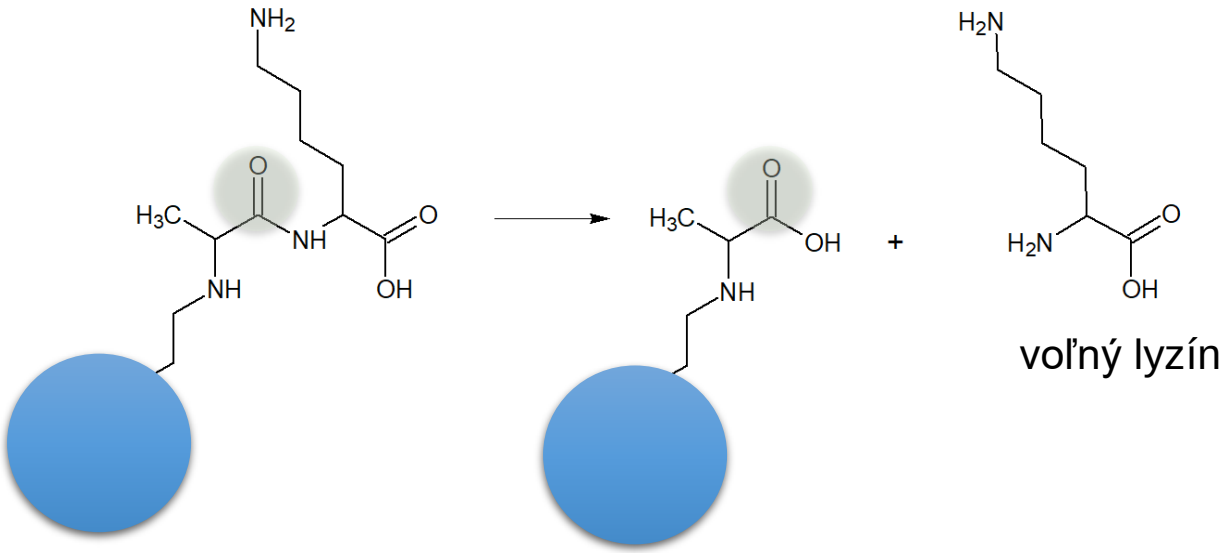


● C-terminálny lyzín (prítomný/neprítomný)

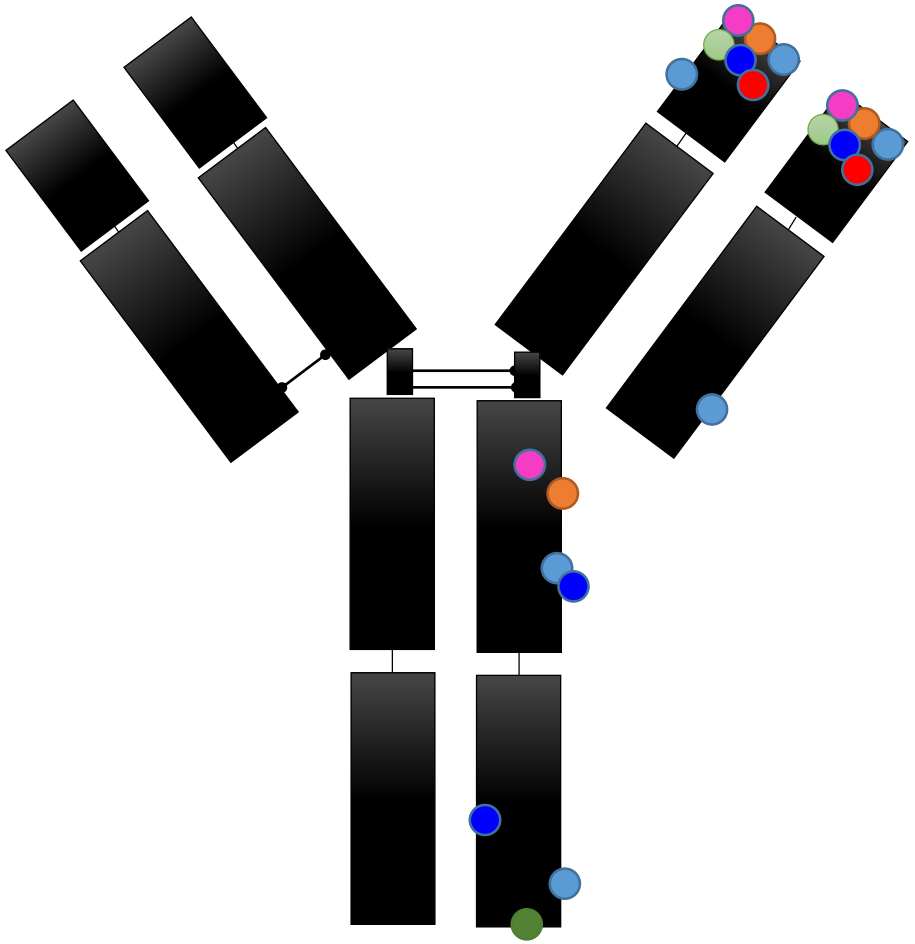
- C-koncový lyzín môže byť odstránený aktivitou karboxypeptidázou 6 resp. inými bázickými peptidázami
- Endogénne protilátky v sére majú úplne odstránený lyzín na C konci ťažkého reťazca (CH3), vzniká nový C-koniec
- Pri produkcii v bunkových kultúrach (CHO) je tento proces neúplný, pri rekombinantnej expresií v *E.coli* terminálny lyzín nie je odstránený
- Nie je považovaný za CQA
- Zmena v molekulovej hmotnosti: -128.1

Posttranslačné modifikácie: C-terminálny lyzín

- Odštiepenie C-koncového lyzínu



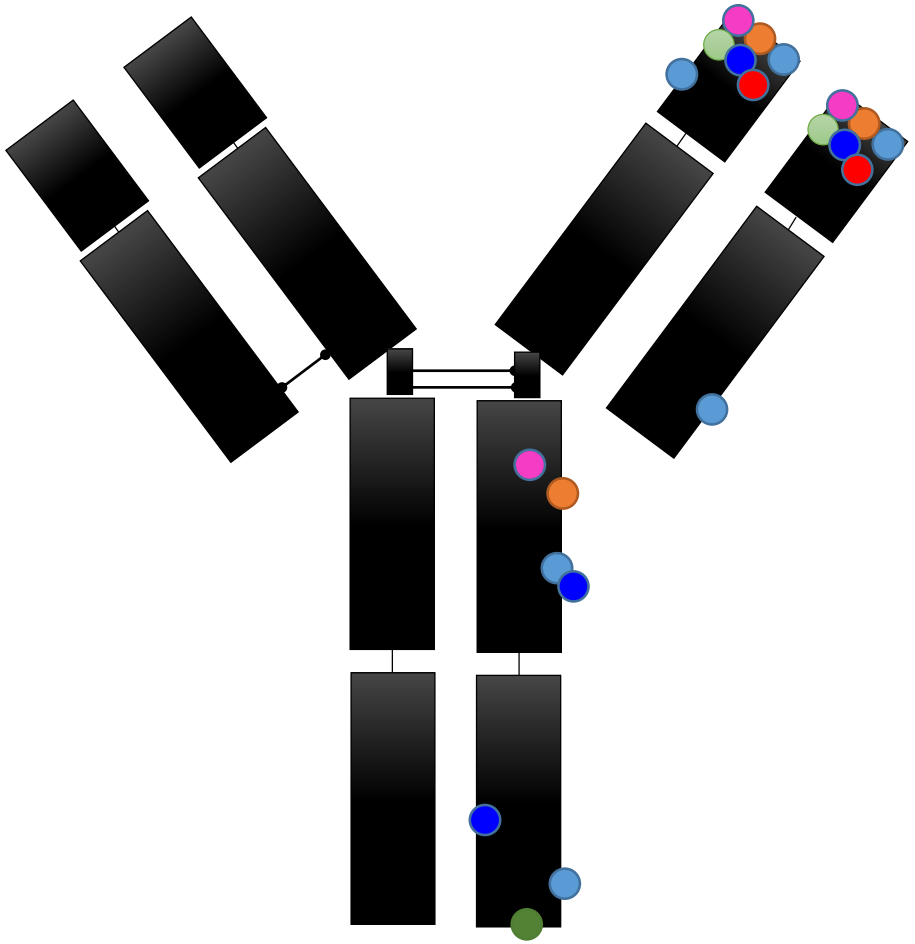
Posttranslačné modifikácie: oxidácia



oxidácia

- Oxidácia bočného reťazca aminokyselín: cysteín, histidín, tryptofán, tyrozín, metionín
- Štandardne prebieha najrýchlejšie reakcia s cysteínom a metionínom. V prípade metionínu vzniká metionín sulfoxid a ďalej na metionín sulfón. Reakcie oxidácie prebiehajú v prítomnosti voľných kyslíkových radikálov
- Reakcie *in vivo* prebiehajú viac-menej nekontrolovane
- Reakcie *in situ* využívajú H_2O_2, terc-butyl hydroperoxid, 2,2′-azobis(2-amidinopropán) (AAPH), žiarenie, ozón

Posttranslačné modifikácie: oxidácia

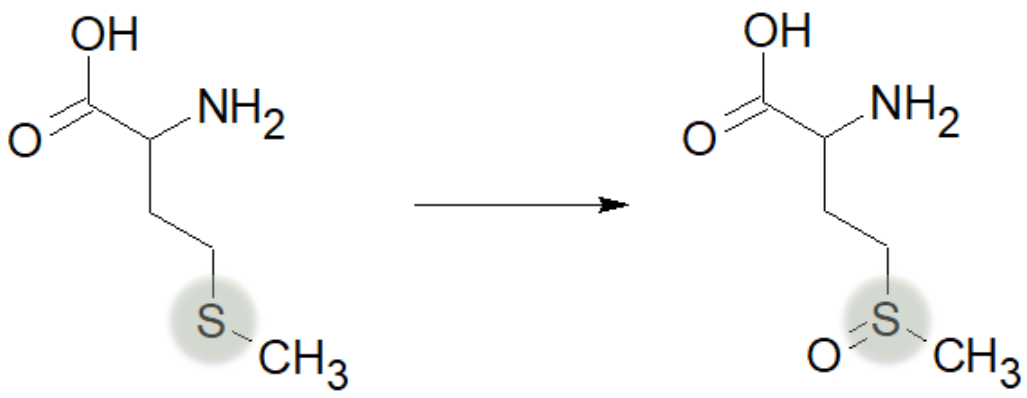


oxidácia

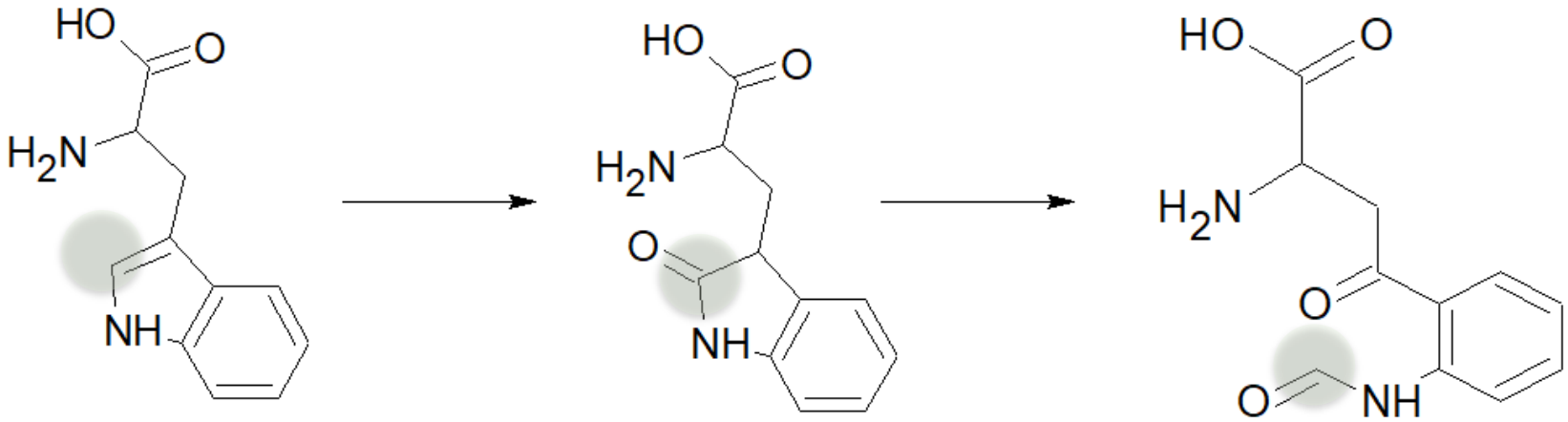
- Oxidácia výrazne ovplyvňuje lokálne vlastnosti a tým aj štruktúru Ig
- Zmena v molekulovej hmotnosti: +16 resp. (32 u dvojnásobnej oxidácií tryptofánu)
- Príklad: ľudský IgG1 obsahuje 2 Met, ktoré sú veľmi ľahko oxidovateľné. Oxidácia týchto metionínov spôsobuje zvýšenú rýchlosť agregácie, posun teploty prechodu a zvýšenie rýchlosti deamidácie IgG

Posttranslačné modifikácie: oxidácia

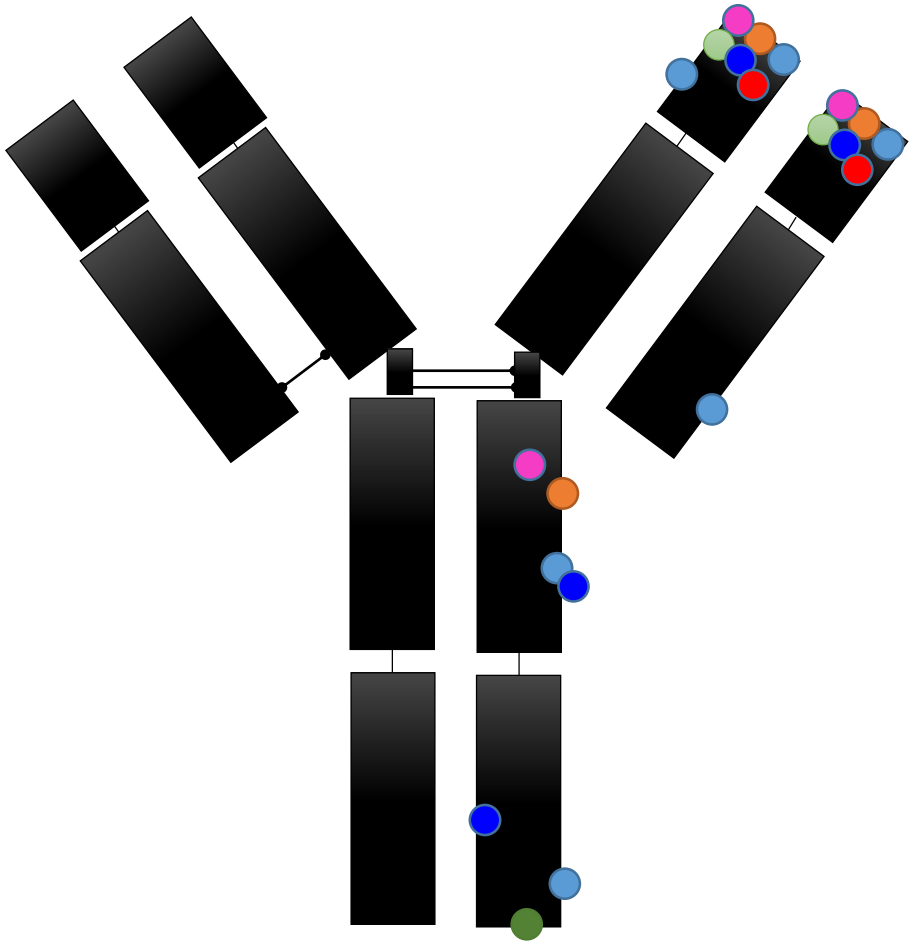
- Oxidácia metionínu



- Oxidácia tryptofánu



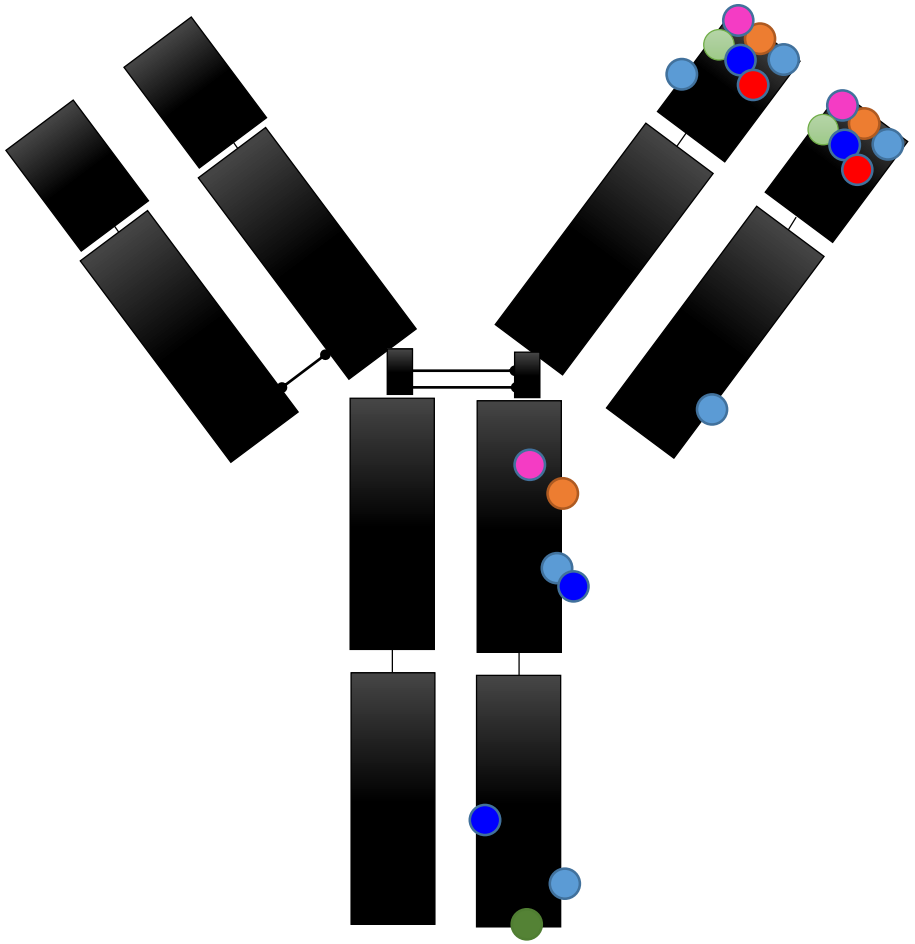
Posttranslačné modifikácie: voľný cysteín



voľná tiolová skupina

- Voľný cysteínový bočný reťazec obsahuje tiolovú skupinu, ktorá je vysokoreaktívna a môže tvoriť:
  - zmiešané tiolové páry
  - nesprávne disulfidické mostíky a ich izoformy
  - kovalentné väzby s ostatnými molekulami protilátok/proteínov/cysteínu a odvodených nízkomolekulových zlúčenín
- Štandardne prebieha najrýchlejšie reakcia s povrchovými a dostupnými reaktívnymi tiolovým skupinami
- Reaktivita je ovplyvnená sekundárnou, terciárnou aj kvartérnou štruktúrou

Posttranslačné modifikácie: voľný cysteín



voľná tiolová skupina

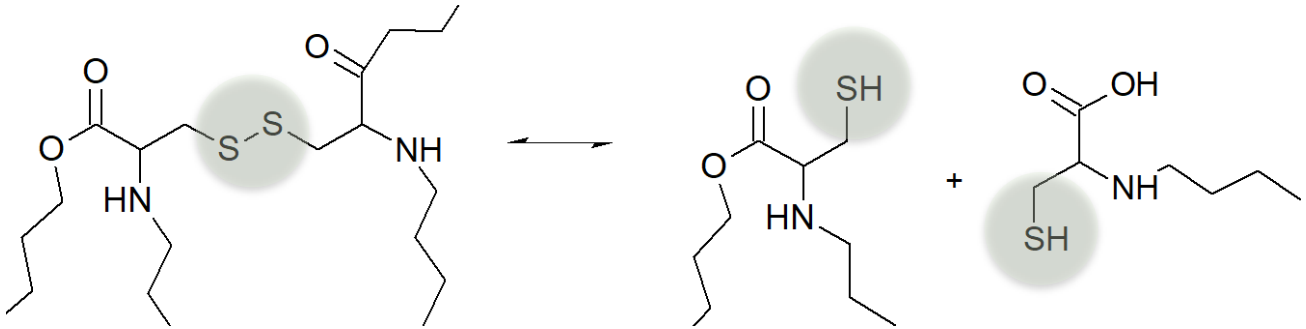
- Reakcie *in vivo* prebiehajú viac-menej nekontrolovane sú však vo väčšine prípadov termodynamicky nevýhodné v redukčnom bunkovom prostredí

- Inzercia atómu síry medzi disulfidický mostik je pomerne častá u monoklonálnych protilátok napr. medzi ťažkými reťazcami. Ich frekvencia môže byť až 35%

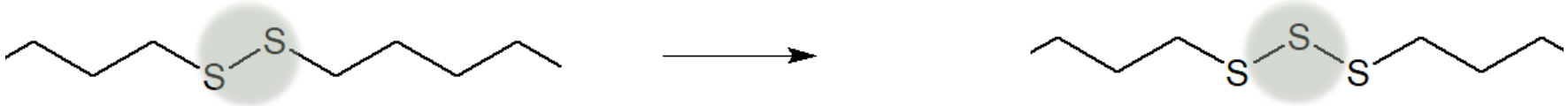
- Zmena v molekulovej hmotnosti: +120 (+cysteín), +32 tvorba trisulfidov, -32 vznik tioéterov

Posttranslačné modifikácie: voľný cysteín

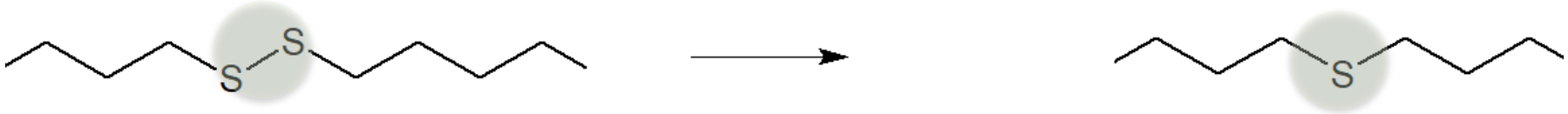
- Vznik sulfhydrylu



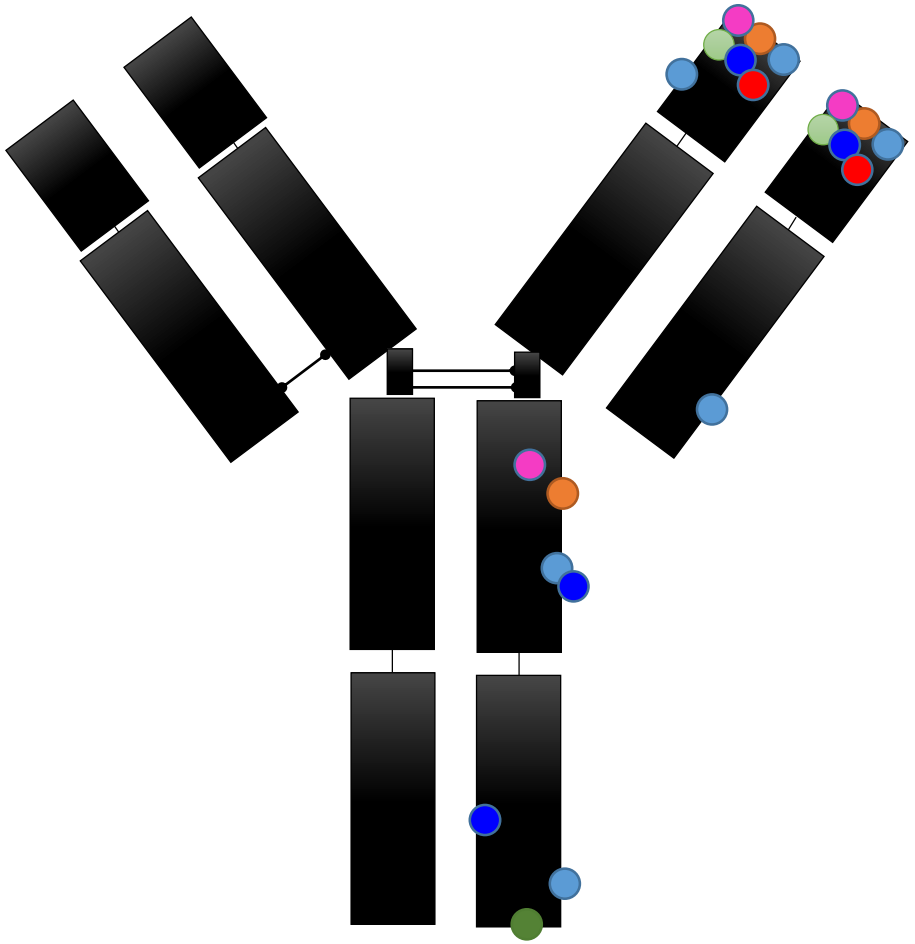
- Vznik trisulfidov



- Vznik tioéteru

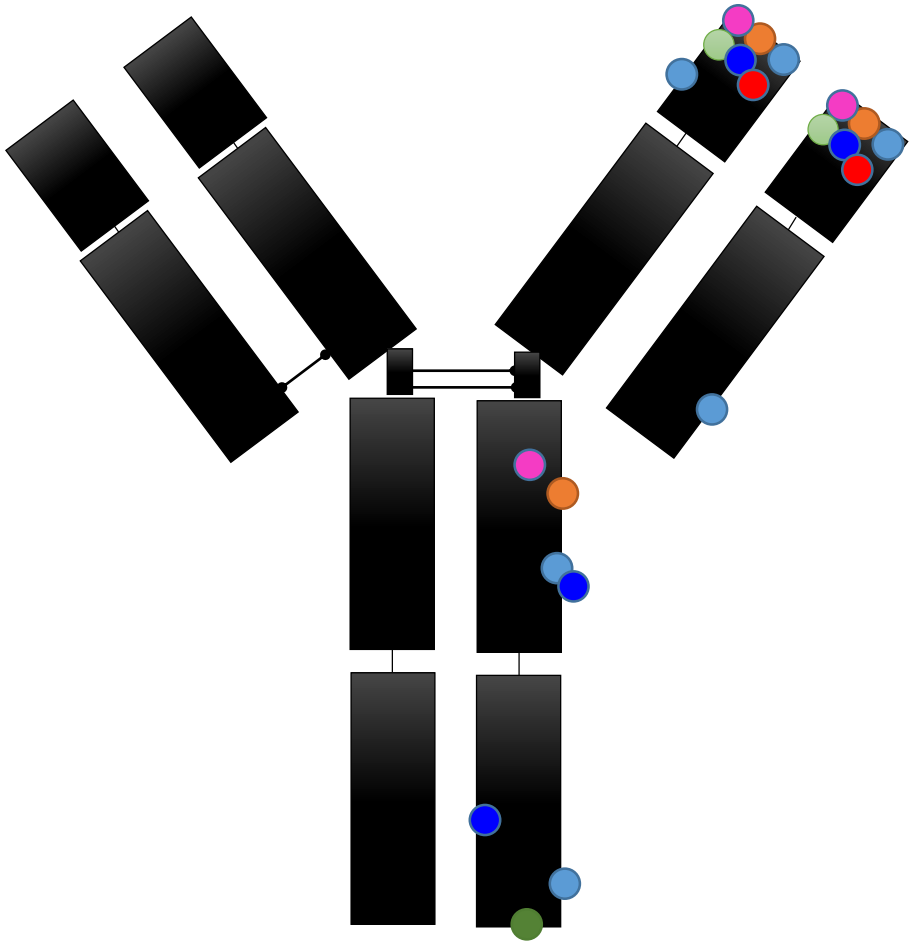


Posttranslačné modifikácie: glykácia



- Glykácia je adičná reakcia monosacharidu a aminovej skupiny tzv. Maillardova reakcia bez prítomnosti enzýmov
- K tomuto dochádza pri kondenzačnej reakcii, pri ktorej karbonylová skupina redukujúceho cukru reaguje s voľnou amino skupinou
- N-koniec proteínu, lyzín, a čiastočne aj arginín
- Typický produkt glykácie: N-fruktozyl-Lys (+162 Da)

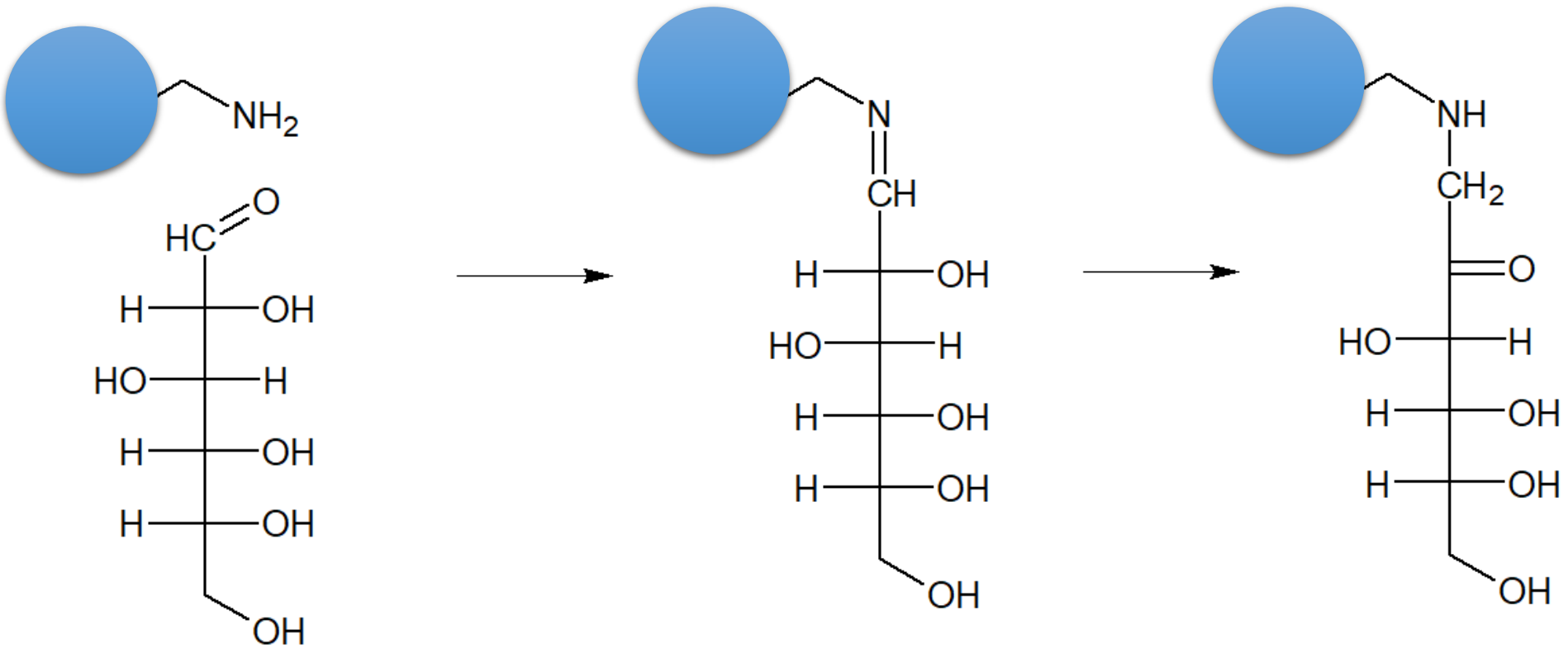
Posttranslačné modifikácie: glykácia



- V prvom medzikroku sa vytvorí nestabilná Schiffová báza, ktorá neskôr prechádza na ketoaminovú formu nazývanú Amadoriho produkt
- Po glykácií dochádza k zmene náboja
- Ku glykácií dochádza napr. v médiu bunkových kultúr v dôsledku prítomnosti glukózy a galaktózy

Posttranslačné modifikácie: glykácia

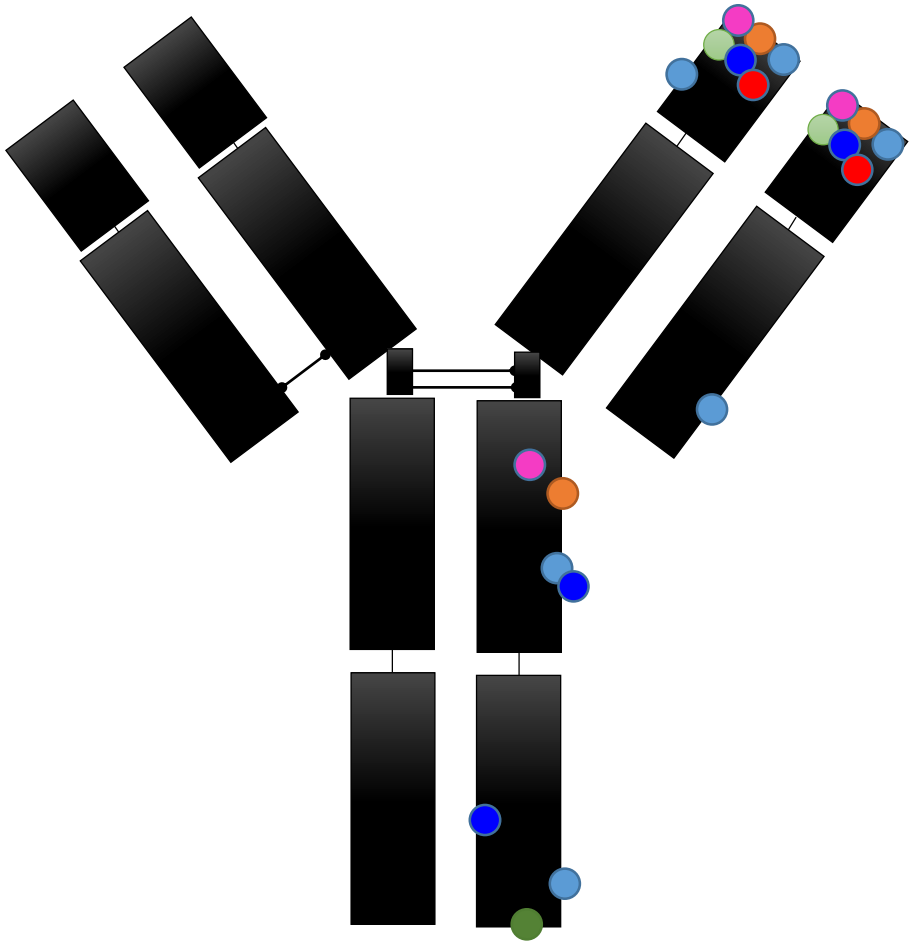
- Glykácia proteínu



Schiffová báza

Amadoriho produkt

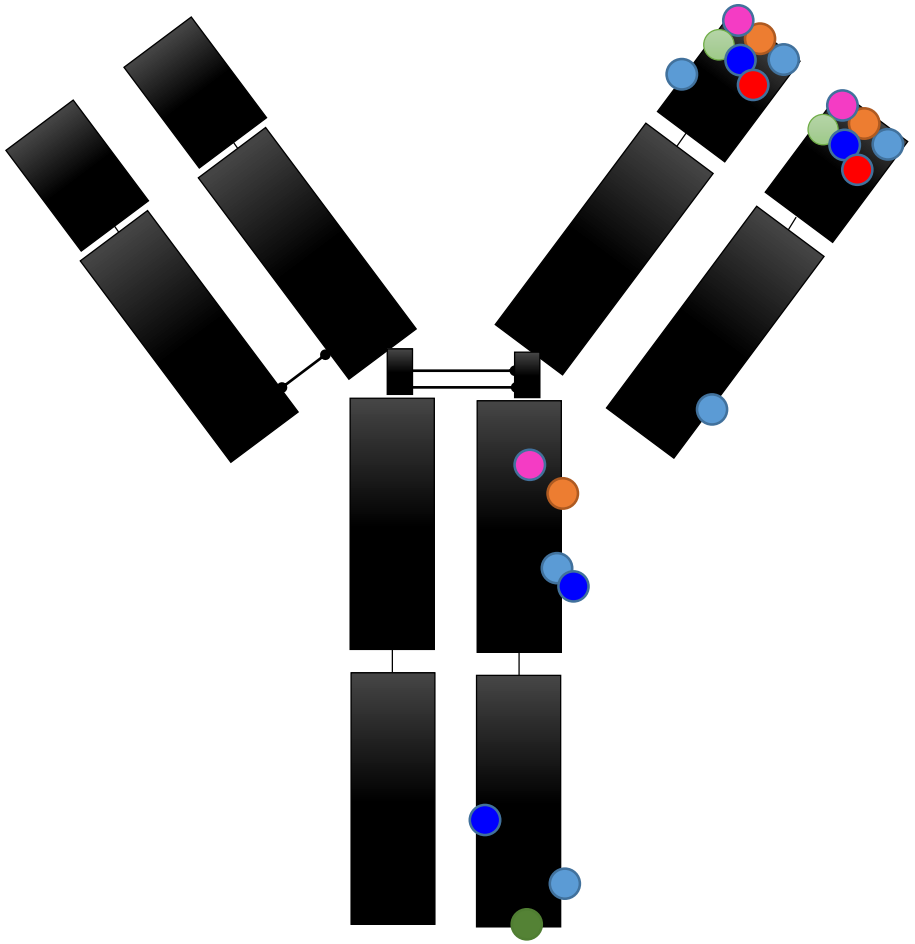
Posttranslačné modifikácie: glykozylácia



N-glykozylácia

- Špecifická N-glykozylácia amidovej skupiny asparagínu
- Potrebná na efektorovú funkciu protilátok a pre funkčnú imunitnú odpoveď
- Typicky je to Asn297 – existuje viac než 500 glykoforiem, závisí od aktivity galaktotransferázy v B lymfocytoch
- Taktiež variabilná oblasť môže byt modifikovaná, čo môže mať pozitívny/negatívny efekt na viazanie antigénu
- Glykozylácia môže byť asymetrická

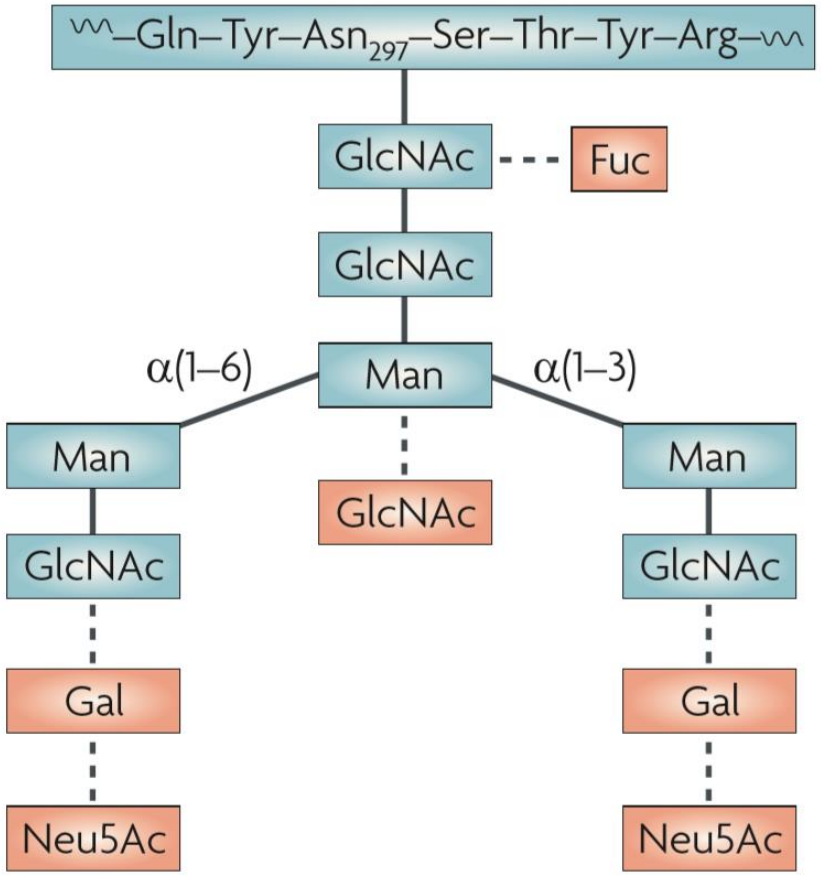
Posttranslačné modifikácie: glykozylácia



N-glykozylácia

- Patrí medzi CQA
- Sacharidové zvyšky majú približne 1000 Da
- Adícia prebieha v endoplazmatickom retikulu (ER) a Golgiho aparáte (GA)
- Ig je prenášaná postupne cez drsné ER → *cis* GA → mediálne GA → *trans* GA → exocytóza
- Glykozylácia je potrebná na:
  - Aktiváciu komplementu
  - ADCC (z ang. antibody-dependent cell cytotoxicity)
  - Endocytózu imúnitného komplexu
  - Inhibíciu B-lymfocytov

Posttranslačné modifikácie: glykozylácia



- Typická štruktúra sacharidových zvyškov – typické vetvenie tzv. dvojitej anténovej štruktúry
- Jadro tvorené 7 sacharidovými zvyškami (v modrých obdlžníkoch)
- Fuc – fukóza, Gal – galaktóza, GlcNAc vetviacy zvyšok N-acetylglukózamínu, a sialové kyseliny napr. kyselina N-acetylneuramínová
    - G0,G1,G2 sú monosacharidy s 0,1,2 galaktózami
    - V prípade prítomnosti fukózy značenie je G0F
    - G0B – prítomnosť rozdeľujúcej GlcNac

Jefferis R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. Nat Rev Drug Discov. 2009 Mar;8(3):226-34. doi: 10.1038/nrd2804.

Sekvenčné variácie protilátok

- Tyr → Gln
  - H376 u IgG1 anti-Her2, 1-27 %
  - Genetický pôvod (polyklonálnosť) zámena kodónu TAT → CAC

- 24 aminokyselinová inzercia
  - medzi VH-CH1, IgG1 anti IGF-1R, výskyt >50%
  - Chyba pri splicingu, translácia intrónu

- Phe → Leu
  - 11. pozícia od N konca, fúzia peptidu a mAb, 7-10 %
  - Genetický pôvod, somatická mutácia, zámena kodónu TTC → CTC

- Ser → Asn
  - Pri AGC kodóne, IgG1, IgG4, 0,01-0,2 %
  - Chybná translácia

Sekvenčné variácie protilátok

- Phe → Tyr
  - Rôzne miesta, bez špecificity ku kodónu, IgG1
  - Nedostatok fenylalanínu v médiu

9. Stabilita a agregácia imunoglobulínov

9. Stabilita a agregácia imunoglobulínov

9.1. Interné a externé faktory spúšťajúce agregáciu

9.2. Mechanizmy agregácie

9.3. Nástroje pre charakterizáciu agregátov

9.4. Klasifikácia proteínových agregátov

9.5. Štúdium stability protilátok - príklad

9. Stabilita a agregácia imunoglobulínov

Ciele

- ❑ Pochopiť faktory ovplyvňujúce agregáciu imunoglobulínov
- ❑ Získať prehľad o vonkajších faktoroch spúštajúcich agregáciu
- ❑ Pochopiť mechanizmy agregačných dráh
- ❑ Oboznámiť sa s klasifikáciou agregátov

Agregácia IgG je dôsledok viacerých faktorov

Proces agregácie je dôsledok interných a externých faktorov

1. Interné faktory: proteínová štruktúra, sekvencia aminokyselín

2. Externé faktory: bezprostredné okolie proteínu

   - Teplota
   - Chemické zloženie rozpúšťadla, v ktorom je proteín rozpustený
   - Procesné kroky (fermentácia, expresia, mechanické otrasy)
   - Fyzicky stav a chemické zloženie proteínu v pevnom skupenstve

Interné faktory agregácie: sekvenčná variabilita

Sekvenčná hypervariabilita IgG a agregácia

1. Peptidové sekvencie majú odlišnú náchylnosť k agregácií
2. Sekvencie s vysokou prirodzenou nerozpustnosťou sa nazývajú APR (agregation prone regions)
3. CDR oblasti a priľahlé β-reťazce obsahujú APR pravdepodobne ako vedľajší, neželaný efekt ich molekulovej funkcie

Interné faktory agregácie: sekvenčná variabilita

Príklady agregujúcich častí

Por.č.	Pozícia v rámci imunoglobulínov	Sekvenčný motív
1.	Ľahký reťazec, CDR slučka 2 (L2)	LLIYSASFLY VLIYF
2.	Ľahký reťazec, CDR slučka 3 (L3)	LGIYF
3.	Ľahký reťazec, predchádza CDR oblasť slučka 3 (L3)	YCQQNNN
4.	Ľahký reťazec, CL doména	SVFIFP SVFIF
5.	Ľahký reťazec, CL doména	VVCLL
6.	Ťažký reťazec, slučka 1 (H1)	-IFTDF---YYWTWI
7.	Ťažký reťazec, slučka 2 (H2)	IGAIY IGYIY
8.	Ťažký reťazec, slučka 2 (H2)	TTEYN

Interné faktory agregácie: sekvenčná variabilita

Príklady agregujúcich častí

Por.č.	Pozícia v rámci imunoglobulínov	Sekvenčný motív
9.	Ťažký reťazec, v oblasti po CDR slučke 2 (H2)	VTMLV
10.	Ťažký reťazec, prechádza CDR slučka 3 (H3)	IYYCV
11.	Ľahký reťazec, CDR oblasť slučka 3 (L3)	VVYYSNSYWYF
12.	CH2 doména	SVFLFPP
13.	CH2 doména	VLMISL
14.	CH2 doména	IVTCVVV
15.	CH2 doména	VVSVLTVL
16.	CH3 doména	GSFFLYS

Interné faktory agregácie: sekvenčná variabilita

Nástroje na predikciu APR v primárnej sekvencií IgG

1. PAGE: softvérový nástroj na predikciu agregačnej schopnosti a rýchlosti

2. TANGO: algoritmus založený na štatistickej mechanike, ktorý identifikuje beta-agregujúce oblasti. Použitých 179 peptidov z rôznych zdrojov. 92% úspešná predikcia

3. Zyggregator: softvérový nástroj na predikciu schopnosti zbalenia ako aj pravdepodobnosti chybného zbalenia

4. Aggrescan: softvérový nástroj na výpočet náchylnosti na agregáciu IgG odvodený z *in vivo* experimentov

Interné faktory agregácie: sekvenčná variabilita

Nástroje na predikciu APR v primárnej sekvencií IgG

1. PASTA: identifikuje oblasti, ktoré by sa mohli párovať, a tým aj podporovať cross-β štruktúrne motívy, ktoré sú asociované s amyloidnými fibrilami. K výpočtu párovacích energíi použili ca. 500 vysokokvalitných 3D štruktúr. 80 percentná úspešnosť

2. SALSA: využíva predikciu tvorby β-štruktúr pomocou Chou-Fasman metódy

3. AMYLPRED: konsezuálny nástroj využívajúci 5 metód: TANGO, AGGRESCAN, Zyggregator, SALSA, PASTA

4. 3D profilovacie metódy a náchylnosť k tvorbe fibríl podľa kryštálovej štruktúry fibríl hexapeptidu NNQQNY (Thompson et al. 2006). V princípe sa nahradí NNQQNY hexepeptid iným hexapeptidom a počíta sa energia pomocou RosettaDesign. 80 % úspešnosť identifikácie fibrilizujúceho peptidu

Interné faktory agregácie: sekvenčná variabilita

Nástroje na predikciu APR v primárnej sekvencií IgG

1. Defekty v hustote zbalenia proteínu môžu pomôcť identifikovať APR
2. APR v imunoglobulínoch môžu odlišne reagovať v dôsledku odlišného štruktúrneho kontextu
3. Simulácie molekulovej dynamiky môžu napomôcť identifikovať APR a nukleačné zárodky

Externé faktory agregácie

1. Teplota
2. Svetlo
3. pH
4. Zloženie tlmivého roztoku
5. Koncentrácia zložiek tlmivého roztoku
6. Iónová sila
7. Celková koncentrácia proteínu
8. Povrch a rozhranie vzduch/voda
9. Kovové ióny
10. Organické rozpúštadlá
11. Šarža proteínu
12. Aditíva
    - Soli
    - Konzervačné chemikálie
    - Surfaktanty
13. Procesné faktory
    - Opätovné zbaľovanie
    - Rozmrazovacie cykly
    - Mechanické otrasy
    - Miešanie
    - Strižné sily
    - Tlak
    - Vákuové sušenie
    - Sušenie za mrazu
    - Sprejové sušenie
    - Sprejové sušenie za mrazu
    - Metóda rekonštitúcie
    - Rekonštitučné médium
    - Iné procesy ako emulzifikácia

Externé faktory agregácie

14. Faktory počas skladovanie v tuhom stave

- ❑ Metódy vysušovania
- ❑ Tzv. pH v tuhom (lyofilizovanom) stave
- ❑ Pomer excipientov
- ❑ Kombinácia excipientov
- ❑ Typ excipientov
  - Nízkomolekulové látky (mannitol, trehalóza)
  - Vysokomolekulové látky (dextrán, Tween)

Externé faktory agregácie

Príklad: svetlo ako externý faktor – fotostabilita protilátok

- Predpísané testovanie fotostability látok a liečiv podľa ICH Q1B
- Viditeľné svetlo: viac ako 1.2×10^6 lux-hodín a UV svetlo: 200 W h/m^2
- Niektoré protilátky sú citlivé na svetlo, pričom produkujú reaktívne kyslíkové molekuly (singletový kyslík, peroxid vodíka, hydroxylové radikály)
- Protilátkami katalyzovaná oxidácia vody (ACWO – antibody catalyzed water oxidation) schématická reakcia:

$$^1O_2 + H_2O \rightarrow \rightarrow \rightarrow \; H_2O_2 + {}^3O_2$$

  – možný problém pri príprave stabilnej formy terapeutickej protilátky
  – pravdepodobne biologický význam ako súčasť imunitnej obrany (singletový kyslík vzniká v aktivovaných fagocytoch)

Nieva J, Wentworth P Jr. The antibody-catalyzed water oxidation pathway--a new chemical arm to immune defense? Trends Biochem Sci. 2004 May;29(5):274-8.

Mechanizmy agregácie Ig

Podľa charakteru počiatočnej konformácie

1. Agregácia ako dôsledok asociácie natívnych IgG molekúl
2. Agregácia ako dôsledok asociácie tzv. nie natívnych IgG molekúl

Podľa charakteru finálnych foriem

1. Agregácia IgG vedúca k nerozpustným časticiam
2. Agregácia IgG vedúca k rozpustným časticiam

Agregácia IgG má komplexný priebeh

Asociácie natívnych foriem - multimerizácia

(A) silná vysoko-špecifická asociácia zbalených foriem

- Príklad: trans-thyretin, P22 tailspike, Arc represor
- Hodnota Kd konštanty nízka, okolo 1 nM

(B) slabá asociácia zbalených foriem

- Monoméry interagujú slabými koloidálnymi silami
- Nešpecifické kontakty medzi monomérmi
- Hodnota Kd konštanty vysoká, rádovo 0,1-1 mM

Agregácia IgG má komplexný priebeh

Asociácia nenatívnych foriem prebieha cez intermediátne stavy

- nenatívny reaktívny monomér: kľúčový intermediát pravdepodobne v rovnováhe s natívnym stavom (čiastočne rozbalený intermediát, molten-globule stav)
- nukleus – efektívne nevratný intermediátny stav (v princípe môže ísť o vratný intermediát, ale v dôsledku rýchleho rastu je jeho existencia veľmi krátka, a teda nedochádza k vratnej disociácii k predchádzajúcemu kroku)
- rast agregátov: 3 možné scenáre

Agregácia IgG má komplexný priebeh

Asociácia nenatívnych foriem prebieha cez intermediátne stavy

- rast agregátov: 3 možné scenáre

  (1) agregáty zostávajú rozpustné, ale výrazne nerastú

  (2) agregáty zostávajú rozpustné, ale vznikajú HMW (high molecular weight) formy

  (3) agregáty na začiatku sú rozpustné molekulárne formy, ktoré neskôr interagujú a dochádza k ich fázovému oddeleniu, čo vedie k tvorbe nerozpustných, viditeľných častíc resp. precipitátov

Nástroje pre charakterizáciu Ig agregátov

Nástroje pre charakterizáciu Ig agregátov

- Vizuálna charakterizácia
- Elektrická impedancia
- Rozptyl svetla
- Mikroskopia
- Reológia
- Chromatografické metódy
- Elektroforéza
- Kalorimetria
- Centrifugačné metódy
- Spektroskopické metódy

Nástroje pre charakterizáciu agregátov

1. **Vizuálna charakterizácia**: voľným okom

2. **Počítanie častíc:** elektrická impedancia (počet častíc v objemovej jednotke, kvantifikácia,10^{-6} m škála)

3. **Rozptyl svetla**:

- ❑ statický rozptyl svetla (veľkosť a tvar častíc)
- ❑ dynamický rozptyl svetla (veľkosť a relatívna distribúcia tvar častíc)
- ❑ turbidimetria (odhad veľkosti a relatívna distribúcia)

4. **Mikroskopia**:

- ❑ svetelná mikroskopia (určenie tvaru a veľkosti, kvantifikácia na 10^{-6} m škále)
- ❑ elektrónová mikroskopia (tvar a veľkosť nerozpustných agregátov, 10^{-9} m škála)
- ❑ atómová silová mikroskopia (tvar a veľkosť nerozpustných agregátov, 10^{-9} m škála, morfológia)

Nástroje pre charakterizáciu agregátov

5. Reológia: dynamický rheometer (strižný modul, proteín-proteín interakcie)

6. Chromatografické metódy

- SEC gélová chromatografia (veľkosť a možnosť kvantifikácie, rozpustné malé častice)
- RP HPLC reverzná chromatografia (kvantifikácia a agregačné izoformy)
- AFFF asymetrická frakčná toková metóda (určenie veľkosti a kvantifikácia malých a veľkých častíc)

7. Elektroforéza

- SDS-PAGE (určenie veľkosti a povahy agregátov, kvantifikácia čiastočne možná)
- Natívna PAGE (agregačný proces a mechanizmus vzniku)
- Kapilárna elektroforéza (agregačný proces a mechanizmus vzniku)
- Elektroforéza založená na mikrofluidnom čipe (vysoká kapacita vzoriek, agregačný proces a mechanizmus vzniku)

8. Kalorimetria: diferenčne skenujúca kalorimetria (teplotne indukované rozbaľovanie proteínov a ich agregácia)

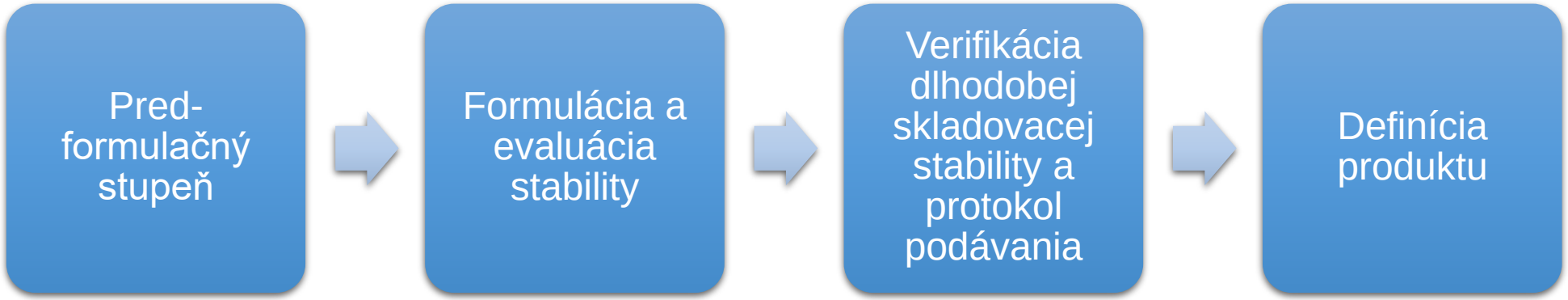
Nástroje pre charakterizáciu agregátov

9. Centrifugačné metódy: analytická centrifúga (veľkosť, molekulová hmotnosť a tvar)

10. Spektroskopické metódy

- FTIR infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou (agregačný proces, mechanizmus a zmena v sekundárnej štruktúre)
- CD - kruhový dichroizmus (agregačný proces, zmeny v sekundárnej a terciárnej štruktúre)
- Fluorescencia (agregačný proces)
- UV-VIS apsorpčná detekcia rozpustných a nerozpustných agregátov
- NMR (tvorba agregátov)

Stabilita a agregácia počas jednotlivých stupňov vývoja



Stabilita a agregácia počas jednotlivých stupňov vývoja

Predformulačný stupeň:

- Zozbieranie kľúčových fyzikálno-chemických vlastností proteínov: veľkosť, čistota proteínu, izoelektrický bod
- Odhad agregačného správania na základe štruktúry
- Určenie rozpustnosti a agregačnej tendencie pri rôznych pH a iónových silách a počas viacnásobných rozmrazovacích cyklov a počas mechanických otrasov

Formulacia a evaluácia stability:

- Preskúmanie vplyvu formulačných premených na agregáciu proteínov: pH, tlmivý roztok, soli, excipienty
- Vplyv procesných krokov na agregáciu
- Definícia podávanej formy (kvapalné alebo tuhé skupenstvo)

Stabilita a agregácia počas jednotlivých stupňov vývoja

Verifikácia dlhodobej skladovacej stability a protokol podávania

- Štúdia dlhodobej stability
- Overenie kompatibility proteínu s plánovaným uchovaním v kontajneri/ampulke, vrátane plánovaných pomôcok na podávanie (napr. hadičky, infúzne vrecúško).
- Overenie rangu a limitov komponentov formulačného zloženia
- Určenie skladovateľnosti (časový interval) produktu

Definícia produktu

- Definícia zloženia produktu, prípravných krokov, skladovacích podmienok a administratívny protokol

Klasifikácia proteínových agregátov

CLRS klasifikácia proteínových agregátov

C	Konformácia
L	Typ väzby
R	Reverzibilita
S	Veľkosť

Klasifikácia proteínových agregátov

Štyri Kategórie

1. Konformácia

   - Natívna – C_n (agregáty s natívnou sekundárnou a terciárnou štruktúrou)
   - Nenatívna – C_u (agregáty s porušenou/zmenenou sekundárnou a terciárnou štruktúrou)

2. Typ väzby

   - Kovalentné prepojenie resp. neoddeliteľné monomérne jednotky – L_c (agregáty sú udržiavané kovalentnými väzbami, disulfidickými mostíkmi a v prítomnosti denaturačných činidiel nedochádza k oddeleniu monomérov)
   - Fyzikálne prepojenie cez nekovalentné, disociovateľné interakcie – L_p (agregáty sú držané pokope nekovalentnými väzbami – elektorostatickými interakciami, vodíkovou väzbou, po pridaní denaturačného činidla ako SDS, močovina, guanidínium chlorid dochádza k disociácií podjednotiek)

Klasifikácia proteínových agregátov

3. Reverzibilita

- Vratné reverzibilné agregáty – R_r (dochádza k disociácii agregátov po návrate z prostredia, ktoré iniciovali vznik agregátov)
- Nevratné ireverzibilné agregáty – R_i (agregáty zostávajú stabilné aj po zmene podmienok, ktoré iniciovali agregáciu)

4. Veľkosť

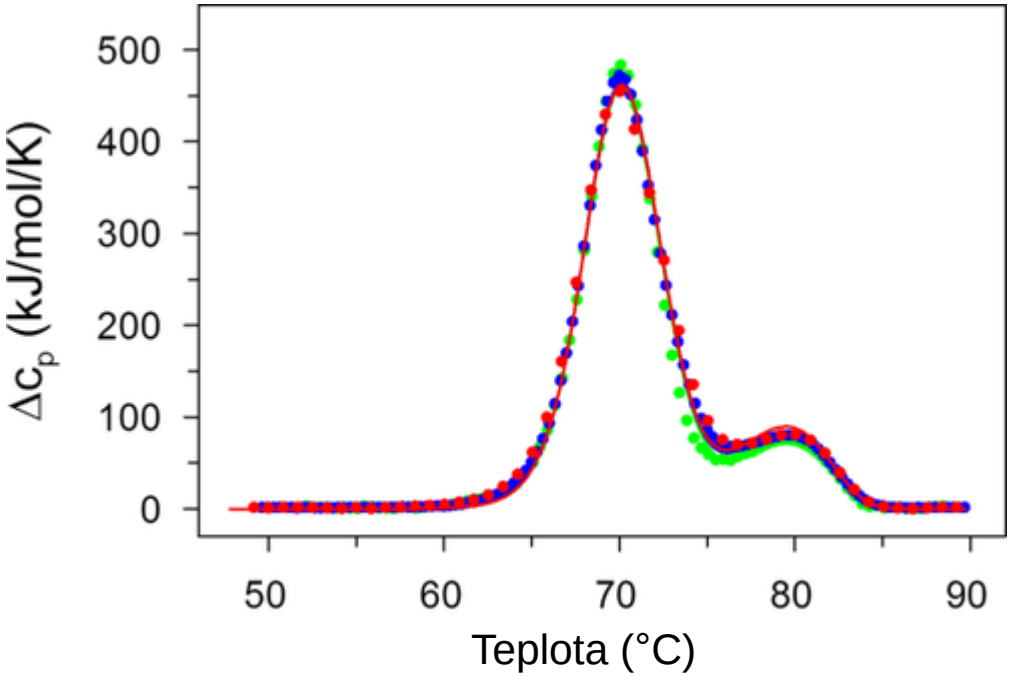
- Rozpustné agregáty – S_s (typické oligomérne agregáty ako napr. dimér, trimér, ktoré nie sú viditeľne voľným okom ani pod obyčajným mikroskopom a prechádzajú 0,2 μm filtrom.
- Rozpustné agregáty so známym číslom oligomérov – S_{sn} (n=1,2...typické oligomérne agregáty s definovaným počtom monomérnych jednotiek ako napr. dimér, trimér, ktoré nie sú viditeľné voľným okom.
- Sub-viditeľné častice – S_{sv} (typická veľkosť 0,1-100 μm, pri vysokej koncentrácií je badateľná turbidita, zákal, po zriedení však ostáva roztok číry)
- Viditeľné agregáty – S_v (agregáty typicky väčšie ako 100 μm, ktoré sú viditeľné voľným okom a pod svetelným mikroskopom)

Štúdium stability protilátok - príklad

Štúdium stability protilátok - príklad

Mikrokalorimetrický záznam protilátky IgG6B3 pri koncentráciách 0,5 (zelená), 5 (modrá) a 15 (červená) mg/ml vo fosfátovom tlmivom roztoku, pH 7,4. Experimentálne údaje sú popísané 4-stavovým kinetickým modelom (plná červená čiara).

$$N \leftrightarrow U \rightarrow D \rightarrow F$$

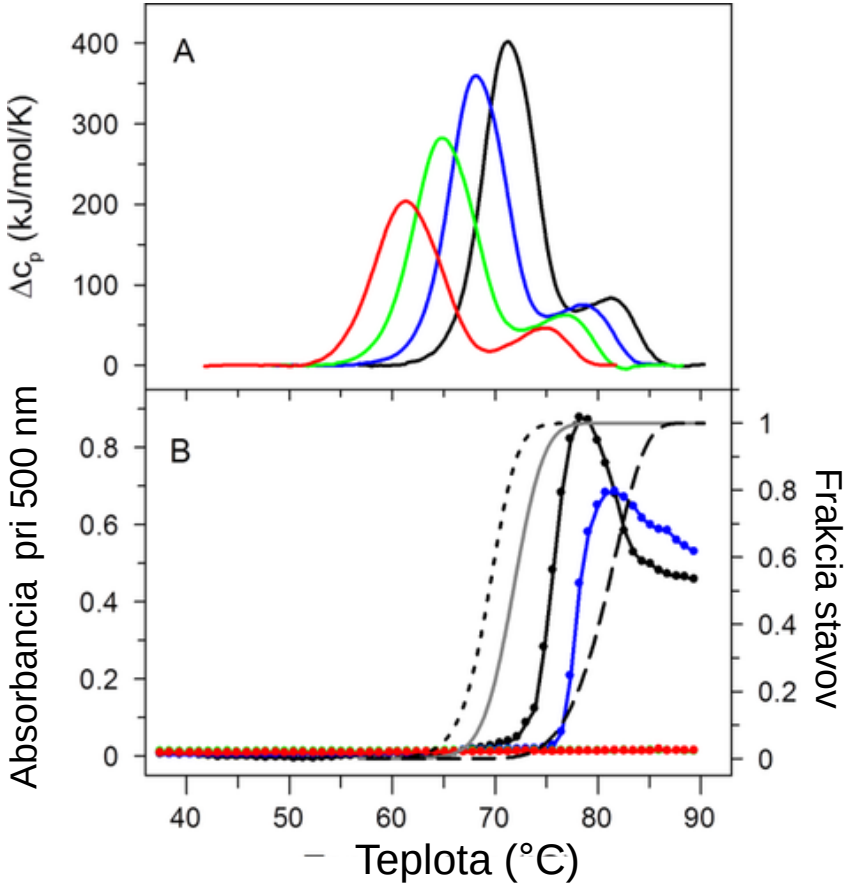


- Teplotné profily sú nezávislé od koncentrácie proteínu

Nemergut M, Žoldák G, Schaefer JV, Kast F, Miškovský P, Plückthun A, Sedlák E. Analysis of IgG kinetic stability by differential scanning calorimetry, probe fluorescence and light scattering. Protein Sci. 2017 Nov;26(11):2229-2239.

Štúdium stability protilátok - príklad

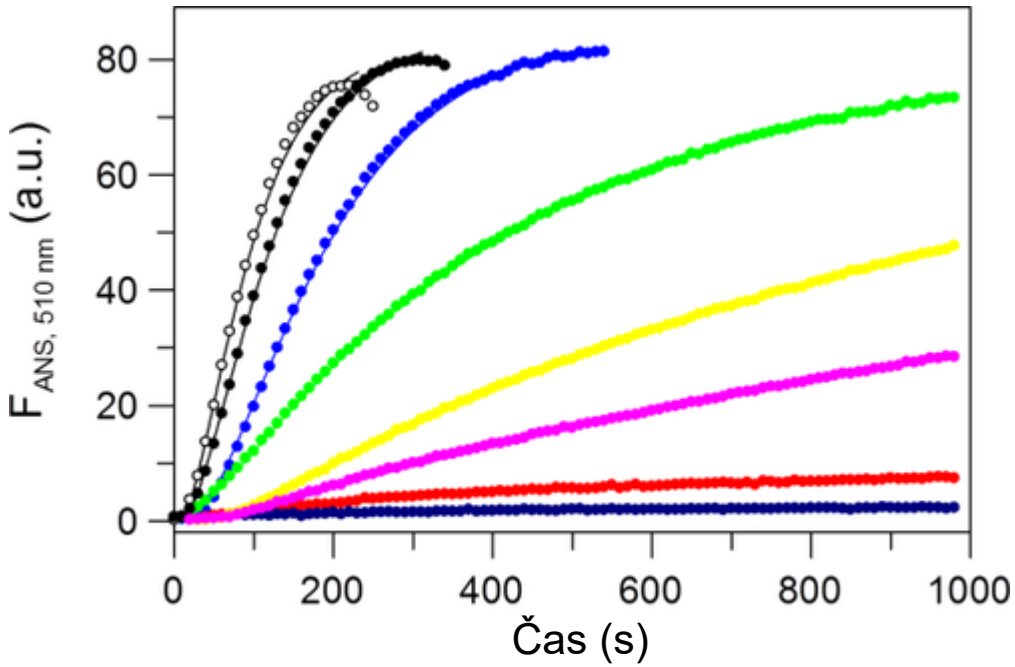
(A) Mikrokalorimetrický záznam protilátky IgG6B3 resp. (B) absorbancia/turbidimetria pri 500 nm v prítomnosti močoviny: 0 (čierna čiara), 1 (modrá čiara), 2 (zelená čiara), 3 (červená čiara) mol/dm^3. V obrázku (B) sú uvedené aj teplotné závislosti populácie jednotlivých stavov: U+D+F (bodkovaná čiara), D+F (sivá plná čiara) a F (čierna prerušovaná čiara).



Nemergut M, Žoldák G, Schaefer JV, Kast F, Miškovský P, Plückthun A, Sedlák E. Analysis of IgG kinetic stability by differential scanning calorimetry, probe fluorescence and light scattering. Protein Sci. 2017 Nov;26(11):2229-2239.

Štúdium stability protilátok - príklad

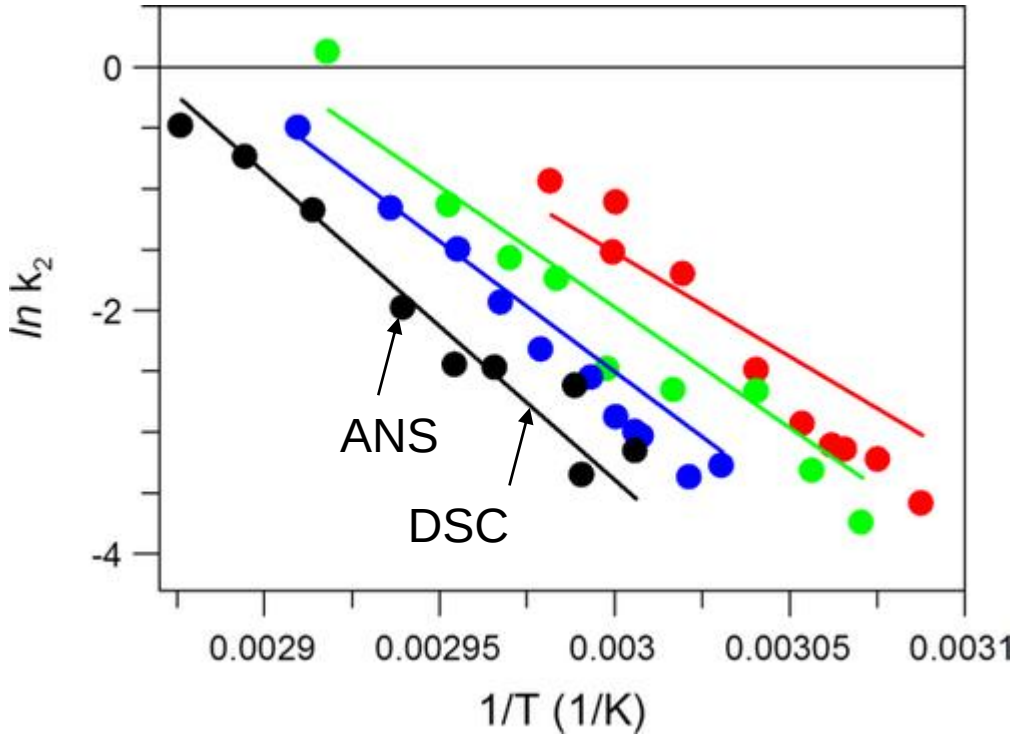
Časový priebeh fluorescencie ANS v prítomnosti IgG6B3 pri teplotách: 74,5 °C (biele symboly), 72,3 °C (čierne symboly), 70,0 °C (modré symboly), 67,0 °C (zelené symboly), 65,3 °C (žlté symboly), 64,0 °C (fialové symboly), 61,4 °C (červené symboly) a 59,5 °C (tmavo modré symboly).



Nemergut M, Žoldák G, Schaefer JV, Kast F, Miškovský P, Plückthun A, Sedlák E. Analysis of IgG kinetic stability by differential scanning calorimetry, probe fluorescence and light scattering. Protein Sci. 2017 Nov;26(11):2229-2239.

Štúdium stability protilátok - príklad

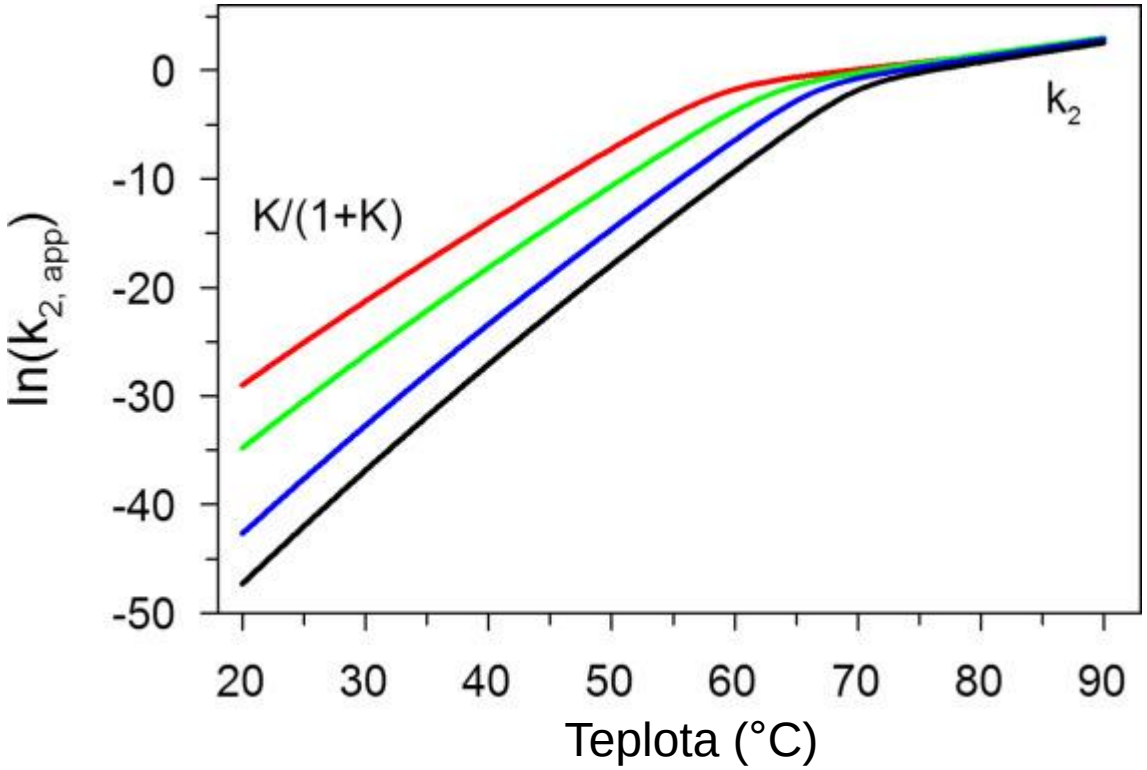
Teplotná závislosť rýchlostnej konštanty inaktivácie získaná pomocou kinetiky viazania ANS pri rôznych koncentráciách močoviny: 0 (čierne symboly), 1 (modré symboly), 2 (zelené symboly) a 3 M (červené symboly) a odvodená rýchlostná konštanta z fitovania 4-stavového modelu mikrokalorimetrického záznamu pri rôznych koncentráciách močoviny: 0 (čierna čiara), 1 (modrá čiara), 2 (zelená čiara) a 3 M (červená čiara).



Nemergut M, Žoldák G, Schaefer JV, Kast F, Miškovský P, Plückthun A, Sedlák E. Analysis of IgG kinetic stability by differential scanning calorimetry, probe fluorescence and light scattering. Protein Sci. 2017 Nov;26(11):2229-2239.

Štúdium stability protilátok - príklad

Teplotná závislosť inaktivácie využitím analýzy 4-stavového modelu mikrokalorimetrického záznamu pri rôznych koncentráciách močoviny: 0 (čierna čiara), 1 (modrá čiara), 2 (zelená čiara) a 3 M (červená čiara).



Nemergut M, Žoldák G, Schaefer JV, Kast F, Miškovský P, Plückthun A, Sedlák E. Analysis of IgG kinetic stability by differential scanning calorimetry, probe fluorescence and light scattering. Protein Sci. 2017 Nov;26(11):2229-2239.

10. Terapeutické imunoglobulíny

10. Terapeutické imunoglobulíny

10.1. Atribúty kvality mAbs

10.2. Názvoslovie terapeutických mAbs

10.3. Zoznam a príklady terapeutických mAbs

- TRASTUZUMAB
- ADALIMUMAB

10. Terapeutické imunoglobulíny

Ciele

- Pochopiť ako sú jednotlivé metódy využívané na overenie atribútov kvality v rámci kategórie ICH Q6B
- Porozumieť názvosloviu terapeutických protilátok
- Získať prehľad o účinku vybraných terapeutických protilátok

Pred aplikáciou terapeutických mAb: CQA

Pred aplikáciou terapeutických mAb: CQA

Kategória	Atribút produktu	Test	Účel	ICH Q6B Kategória	Procesné operácie ovplyvňujúce CQA
Veľkosť	Agregácia	SEC chromatografia	Detekcia produktom spôsobených nečistôt	Identita, čistota, stabilita	Formulácia, „upstream“, „downstream“ procesy, skladovanie, naplnenie
		Gélová elektroforéza		Identita, čistota, stabilita	
		Analytická ultracentrifúga		Identita, čistota	
		SEC+MALS		Identita, čistota	

Pred aplikáciou terapeutických mAb: CQA

Kategória	Atribút produktu	Test	Účel	ICH Q6B Kategória	Procesné operácie ovplyvňujúce CQA
Veľkosť	Skrátenie	IEX chromatografia+/- karboxypeptidáza	Detekcia izoforiem	Identita, čistota, stabilita	„Upstream“ procesy, skladovanie,
		Izoelektrická fokusácia +/- karboxypeptidáza	Vzory nábojových izoforiem	Identita, čistota, stabilita	
		Peptidové mapovanie s hmotnostnou spektrometriou	Overenie primárnej štruktúry, identifikácia posttranslačných modifikácií	Identita, čistota, stabilita	

Pred aplikáciou terapeutických mAb: CQA

Kategória	Atribút produktu	Test	Účel	ICH Q6B Kategória	Procesné operácie ovplyvňujúce CQA
Veľkosť	Fragmentácia	SEC	Detekcia produktom spôsobených nečistôt – fraagmentov a agregátov	Identita, čistota, stabilita	„Upstream“, „downstream“ procesy, skladovanie,
		Gélová elektroforéza		Identita, čistota, stabilita	
		Analytická ultracentrifúga		Identita, čistota,	
		Peptidové mapovanie s hmotnostnou spektrometriou	Overenie primárnej štruktúry + PTM	Identita, čistota, stabilita	
		HPLC na princípe reverznej fázy	Fragmenty a izomerizácia	Identita, čistota,	

Pred aplikáciou terapeutických mAb: CQA

Kategória	Atribút produktu	Test	Účel	ICH Q6B Kategória	Procesné operácie ovplyvňujúce CQA
Veľkosť	Celková hmotnosť	Q-TOF hmotnostná spektrometria	Meranie celkovej molekulovej hmotnosti	Identita	„upstream“
		Rozptyl svetla	Meranie celkovej molekulovej hmotnosti	Identita	

Pred aplikáciou terapeutických mAb: CQA

Kategória	Atribút produktu	Test	Účel	ICH Q6B Kategória	Procesné operácie ovplyvňujúce CQA
Náboj	Deamidácia	IEX chromatografia	Detekcia nábojových izoforiem	Identita a čistota	„upstream“, „downstream“ procesy, skladovanie
		Izoelektrická fokusácia	Vzory nábojových izoforiem		
		Peptidové mapovanie s hmotnostnou spektrometriou	Overenie primárnej štruktúry + PTM		
	Kyselina sialová	obsah kyseliny sialovej	Určenie obsahu kyseliny sialovej	Identita	„Upstream“

Pred aplikáciou terapeutických mAb: CQA

Kategória	Atribút produktu	Test	Účel	ICH Q6B Kategória	Procesné operácie ovplyvňujúce CQA
Primárna štruktúra	Identita	Peptidové mapovanie s hmotnostnou spektrometriou	Overenie primárnej štruktúry + PTM	Identita a čistota	„Upstream“ procesy a skladovanie
		Analýza zloženia aminokyselín	Meranie zloženia aminokyselín	Identita	„Upstream“ procesy
		N-terminálne sekvenovanie	Zistenie zloženie N konca	Identita	
		Imunoesej	Špecifická imunoreaktivita	Identita	
	Disulfidické mostíky	Určenie disulfidických mostíkov	Overenie správnosti vytvorených disulfidických mostíkov	Identita	„Upstream“ procesy a skladovanie

Pred aplikáciou terapeutických mAb: CQA

Kategória	Atribút produktu	Test	Účel	ICH Q6B Kategória	Procesné operácie ovplyvňujúce CQA
PTM	Glykácia	Peptidové mapovanie s hmotnostnou spektrometriou	Overenie primárnej štruktúry + PTM	Identita, čistota, stabilita	„Upstream“ procesy a skladovanie
		Bóritanová HPLC	Detekcia glykácie	Identita, čistota	„Upstream“ procesy a skladovanie
	Glykozylácia	Kompozičná analýza monosacharidov	Kvantifikácia obsahu monosacharidov	Identita	„Upstream“ procesy
		Profil oligosacharidov	Získanie vzorov oligosacharidových profilov		
		Obsah galaktózy	Obsahu galaktózy		
		Obsah fukózy	Obsahu fukózy		
	Izomerizácia	HPLC na princípe reverznej fázy	Detekcia produktových fragmentov a izomerizácie	Identita, čistota	„Upstream“, „downstream“ procesy, skladovanie

Pred aplikáciou terapeutických mAb: CQA

Kategória	Atribút produktu	Test	Účel	ICH Q6B Kategória	Procesné operácie ovplyvňujúce CQA
PTM	Oxidácia	Peptidové mapovanie, MS	Overenie primárnej štruktúry + PTM	Identita, čistota, znečistenie	„upstream“, „downstream“ procesy, skladovanie
	Tioéter	Gélová elektroforéza	Detekcia produktových fragmentov a agregátov	Identita, čistota, stabilita	
Vyššie úrovne štruktúr	Konformácia	Kruhový dichroizmus	Detekcia zmien v sekundárnej štruktúre	Identita	„upstream“ procesy
		FTIR	Zmeny sekundárnej/ terciárnej štruktúre		
		DSC	Zmeny v terciárnej štruktúre		
		Bio/väzobný test	Bioaktivita	Identita, potencia	„upstream“, „downstream“ procesy, skladovanie, náplňovanie, formulácia

Pred aplikáciou terapeutických mAb: CQA

Kategória	Atribút produktu	Test	Účel	ICH Q6B Kategória	Procesné operácie ovplyvňujúce CQA
Vyššie úrovne štruktúr	Konformácia	X-ray kryštalografia	Zmeny v terciárnej, kvartérnej štruktúre	Identita	„Upstream“ procesy
	Efektorová funkcia	Viazanie Fc receptora	Určenie Fc funkcie	Potencia	
		Viazanie komplementu	Určenie Fc funkcie	Potencia	

Názvoslovie terapeutických mAb

Názvoslovie terapeutických mAb

V dôsledku vysokej špecificity a teda individuálnosti terapeutických mAb je aj ich pomenovanie jedinečné

Názvy terapeutických mAb sú zvyčajne dvojaké:

1. Komerčné obchodné názvy s ochranou známkou, ktorá je vlastníctvom firmy

2. Systémové označenie podľa International Nonproprietary Names (INN) programu (bez vlastníckeho práva nejakej firmy)

Herceptin® vs. trastumzumab

Názvoslovie terapeutických mAb

V dôsledku vysokej špecificity a teda individuálnosti terapeutických mAb je aj ich pomenovanie jedinečné

Pravidlá INN

1. Prefix
2. Séria subsystémov (cieľová trieda antigénov+organizmus od ktorého bol mAb odovodený)
3. Suffix

Prefix-SubstemA-SubstemB-suffix

Názvoslovie terapeutických mAb

V dôsledku vysokej špecificity a teda individuálnosti terapeutických mAb je aj ich pomenovanie jedinečné

Prefix-SubstemA-SubstemB-suffix.

Prefix	SubstemA	SubstemB	suffix
Jedinečný indikátor	-b(a)- bakteriálny -c(i)- kardiovaskulárny -tox(a)- toxín	-u- ľudský -xi- chimérny -xizu- chimérny humanizovaný	mab

Zoznam terapeutických mAbs

Zoznam terapeutických mAbs

Obchodné meno	Systémové označenie	Cieľová molekula	Izotyp	Schválenie FDA	Terapeutická indikácia podľa FDA
Orthoclone®K3®	muromonab -CD3	CD3	Myšacia IgG2a	1986	Odmietnutie transplantátu
ReoPro®	abciximab	GPIIb/IIIa	Chimérny Fab	1994	Vysoko riziková angioplastika
Zenapax®	daclizumab	CD25	Humanizované IgG1	1997	Odmietnutie transplantátu
Herceptin®	trastuzumab	HER-2	Humanizované IgG1κ	1998	Rakovina prsníka, metastázujúca rakovina žalúdka, gastrálny adenokarcinóm
Remicade®	infliximab	TNF-α	Chimérné IgG1κ	1998	Crohnová choroba, ulceratívna kolika, reumatická artiritída, psoriatická artritída

Zoznam terapeutických mAbs

Obchodné meno	Systémové označenie	Cieľová molekula	Izotyp	Schválenie FDA	Terapeutická indikácia podľa FDA
Simulect®	basiliximab	CD25	Chimérné IgG1κ	1998	Odmietnutie transplantátu
Synagis®	palivizumab	RSV F proteín	Humanizovaný IgG1κ	1998	Respiračný syncycyálny vírus
Campath®	alemtuzumab	CD52	Humanizovaný IgG1κ	2001	Chronická lymfotická leukémia
Humira®	adalimumab	TNF-α	Humanizovaný IgG1κ	2002	Reumatická artritída, psoriatická artritída, Crohnová choroba
Zevalin®	ibritumomab tiuxetán	CD20	Myšacia IgG1κ	2002	Non-Hodgkinov lymfóm

Zoznam terapeutických mAbs

Obchodné meno	Systémové označenie	Cieľová molekula	Izotyp	Schválenie FDA	Terapeutická indikácia podľa FDA
Bexxar®	tositumomab Iód-131 tositumomab	CD20	myšacia IgG2aλ	2003	Non-Hodgkinov lymfóm
Xolair®	omalizumab	IgE	Humanizovaný IgG1κ	2003	Astma
Avastin®	bevacizumab	VEGF	Humanizovaný IgG1κ	2003	Metastazujúca kolorektálna rakovina, rakovina pľúc, metastazujúca rakovina prsníka, renálny karcinóm
Erbitux®	cetuximab	EGFR	chimérny IgG1κ	2004	Kolorektálna rakovina, karcinómy hlavy a krku
Tysabri®	natalizumab	VLA-4	Humanizovaný IgG4κ	2004	Opakujúca sa skleróza multiplex, Crohnová choroba

Zoznam terapeutických mAbs

Obchodné meno	Systémové označenie	Cieľová molekula	Izotyp	Schválenie FDA	Terapeutická indikácia podľa FDA
Lucentis®	ranibizumab	VEGF-A	Humanizovaný IgG1κ	2006	Degenerácia makuly a makulárne edémy
Soliris®	eculizumab	Komplement C5	Humanizovaný IgG2κ	2007	Hemoglobinúria
Cimzia®	certolizumab pegol	TNF-α	Humanizovaný Fab IgG1κ	2008	Crohnová choroba, reumatická artritída
Arzerra®	ofatumumab	CD20	ľudský IgG1κ	2009	Chronická lymfatická leukémia
Ilaris®	canakinumab	IL-1β	ľudský IgG1κ	2009	Kryopyrín asociované periodické syndrómy (chladom indukovaná zápalová reakcia)

Zoznam terapeutických mAbs

Obchodné meno	Systémové označenie	Cieľová molekula	Izotyp	Schválenie FDA	Terapeutická indikácia podľa FDA
Simponi®	golimumab	TNF-α	Ľudský IgG1κ	2009	Reumatická artritída, psoriatická artritída
Stelara®	ustekinumab	IL-12, IL-23	Ľudský IgG1κ	2009	Plaková psoriáza
Actemra®	tocilizumab	IL-6	Humanizovaný IgG1κ	2010	Reumatická artritída
Prolia® Xgeva®	denosumab	RANKL	Ľudský IgG2κ	2010	Post-menopauzálna osteoporéza
Benlysta®	belimumab	BlysS	Ľudský IgG1λ	2011	Lupus
Yervoy®	ipilimumab	CTLA-4	Ľudský IgG1κ	2011	Melanóm

Zoznam terapeutických mAbs

Obchodné meno	Systémové označenie	Cieľová molekula	Izotyp	Schválenie FDA	Terapeutická indikácia podľa FDA
Adcetris®	brentuximab	CD30	Chiméra IgG1κ ADC	2011	Hodgkin lymfóm
Perjeta®	pertuzumab	HER2	Humanizované IgG1κ	2012	HER2+ metastatická rakovina prsníka
Raxibacumab®	raxibacumab	PA *B. anthracis*	Ľudský IgG1λ	2012	Antrax
Gazyva®	obinutuzumab	CD20	Humanizované IgG1	2013	Chronická lymfatická leukémia
Kadcyla®	ado-trastuzumab emtansine	HER2	Humanizované IgG1 ADC	2013	HER2+ metastatická rakovina prsníka
Cyramza®	ramucirumab	VEGFR2	Ľudský IgG1	2014	Rakovina žalúdka

Zoznam terapeutických mAbs

Skratky	Plný názov (angl.)
CD	Cluster of differentiation
GPIIb/IIa	Glycoprotein IIb/IIa
HER-2	Human epidermal growth factor receptor 2
TNF	Tumor necrosis factor
RSV F proteín	F protein of respiratory syncytial virus
IgE	Immunoglobulín E
VEGF	Vascular endothelial growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
VLA-4	Very late antigen
IL	Interleukin
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
BlysS	B-lymphocyte stimulator
PA of B. anthracis	Protective antigen of Bacillus anthracis
CTLA	Cytotoxic-lymphocyte antigen
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor 2

Príklady terapeutických mAbs – HERCEPTIN® TRASTUZUMAB

Príklady terapeutických mAbs – HERCEPTIN® TRASTUZUMAB

- Celosvetovo rakovina prsníka - 1 milión žien, 40% morbidita v dôsledku ochorenia
- Progresia rakoviny prsníka je zadelená do 5 stupňov v závislosti od veľkosti tumoru, zahrnutia lymfatických uzlín a rozšírenia rakovinových buniek do ostatných orgánov
- Stupeň 0-2 sú označované ako skoré fázy, 3 – lokálne pokročilé, 4 pokročilý stupeň (MBC metastatic breast cancer)
- U 20-30% dochádza k nadmiernej produkcií povrchového receptora HER-2 (z ang. Human epidermal growth factor receptor 2). Nadmierna produkcia HER-2 je spojená s agresívnym správaním tumoru. Prítomnosť HER-2 sa určuje pomocou imunohistochémie, DNA technológií FISH (z ang. fluorescence in-situ hybridisation)
- Herceptin® (Trastuzumab; Genentech/Roche) je humanizovaná anti-HER2 protilátka typu IgG1

Príklady terapeutických mAbs – HERCEPTIN® TRASTUZUMAB

- Herceptin® (Trastuzumab; Genentech/Roche) je produkovaný v CHO bunkách
- Trastuzumab je 95% ľudského a 5% myšacieho pôvodu
- Trastuzumab je produkovaný v CHO bunkách po transfekcií plazmidom obsahujúcim ľahký a ťažký reťazec
- Protinádorový efekt trastuzumabu je dosiahnutý rekrutovaním a infiltráciou leukocytov a NK buniek do nádorových buniek
- V kombinácií s chemoterapiou trastuzumab inhibuje anti-apoptotický efekt HER-2, a tým dochádza k spusteniu apoptotického procesu
- Trastuzumab znižuje fosforyláciu a signalizáciu HER-2, internalizáciu z membrány, inhibíciu konštitutívneho štiepenia metaloproteinázami a zabránenie dimerizácií

Príklady terapeutických mAbs – HERCEPTIN® TRASTUZUMAB

- Trastuzumab bol schválený FDA v 1998, EMA v roku 2000 pre HER2+ MBC indikáciu

- Licencia bola udelená na základe testovania trastuzumab:
  - ako druhá/tretia línia terapie (pozri referenciu: Cobleigh a kol. 1999)
  - ako prvá línia terapie trastuzumab+chemoterapia, štúdia H0648g

- 2006 bola liečba pomocou trastuzumab schválená aj pre HER2+ skorý stupeň rakoviny prsníka (EBC z ang. early breast cancer)

Príklady terapeutických mAbs – HERCEPTIN® TRASTUZUMAB

- Účinnosť a bezpečnosť trastuzumabu (4 mg/kg uvádzacia dávka a následne týždenná dávka 2mg/kg telesnej hmostnosti) bola testovaná v multi-centrickej otvorenej v jednovetvovej štúdií u 222 HER-2+ MBC žien s progresiou po absolvovaných 1 až 2 chemoterapických režimoch. U 68% pacientiek bola predtým podávaná viacnásobná chemoterapia: 94% pacientkám bola podávaná antracyklinová liečba, 67% pacientkám boli podané taxány. V „intent-to-treat“ populácií (podľa pôvodného začlenenia) bola v 8 prípadoch dosiahnutá kompletná a v 26 prípadoch bola dosiahnutá čiastočná odozva. Stredná hodnota prežitia bola s trastuzumabom výrazne vyššia (9 mesiacov) ako u výhradne chemoterapickom režime/režimoch (5,2 mesiacov).

- Trastuzumab mono- alebo kombinovaná terapia je vo všeobecnosti dobre znášaná. Medzi vedľajšie účinky patria problematické reakcie spojené s infúziou a srdcové príhody

- Srdcové príhody su asociované s predchádzajúcou liečbou antracyklínom, pričom dochádza k zhoršeniu kardiotoxických vlastností antracyklínov

Príklady terapeutických mAbs – HERCEPTIN® TRASTUZUMAB

Trastuzumab ľahký reťazec:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGT
DFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC

Trastuzumab ťažký reťazec:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFT
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Príklady terapeutických mAbs – HUMIRA® ADALIMUMAB

Príklady terapeutických mAbs – HUMIRA® ADALIMUMAB

- Adalimumab (Humira; Abbott Laboratories, Abott Park IL, USA) je prvá plne humánne rekombinantná protilátka typu IgG1:κ konštantné regióny, Adalimumab je neodlíšiteľný od ľudského IgG1 a má polčas odbúravania 2 týždne

- Inhibícia tumor nekrózneho faktora alfa: TNFα
  - Ostatné predchádzajúce anti-TNF obsahovali sekvencie z myšacích protilátok, a teda aj zvýšený potenciál tvorby imunitnej odpovede, a tým spôsobené obmedzenie pre dlhodobé užívanie
  - ADALIMUMAB je možné podávanie +/- imunosupresívum methotrexát na potlačenie potenciálnej imunogenicity preparátu pri dlhodobom používaní

Príklady terapeutických mAbs – HUMIRA® ADALIMUMAB

- Protilátka bola zostrojená pomocou fágového displeja
  - selekcia z repertoára fágov s rôznymi VH a VL doménami na povrchu a následná selekcia na viazanie ľudského TNF
  - Na počiatku sa vychádzalo z myšacej anti-human TNF protilátky
  - Myšacie VH a VL boli osobitne párované s repertoárom obsahujúcim ľudské sekvencie
  - Po selekcii boli získané VH a VL spárované, čím vznikla rýdzo humánna protilátka

- Adalimumab je produkovaný v CHO bunkách po transfekcii plazmidom obsahujúcim ľahký a ťažký reťazec

Príklady terapeutických mAbs – HUMIRA® ADALIMUMAB

pdb id: 1TNF

Cieľová molekula: TNFα

- TNF je proteín produkovaný v tele ako ochrana proti infekciám a poraneniam, proti zápalom
- TNF ako cytokinín interaguje s endoteliovými bunkami (EC), fibroblastami (Fib), lymfocytmi (Ly), dendrickými bunkami (DC) ako aj ďalšími komponentmi imunitného systému, ktoré sú súčasťou kaskády odpovedajúcej na poranenia
- TNF zahajuje akumuláciu zápalových buniek, aktivuje adhézne molekuly endoteliových buniek a zahajuje syntézu interleukínov 1, 6.

- 157 aminokyselín, 17,35 kDa podjednotka
- Kvartérna štruktúra: trimér
- Jelly-roll (roládová) štruktúra

Príklady terapeutických mAbs – HUMIRA® ADALIMUMAB

- Chronicky zvýšená hladina TNF sa pokladá za patogénny komponent chorôb: reumatická artritída (RA), psorióza, Crohnová choroba.

- Podporné údaje o kauzálnosti TNF

  - Vysoké koncentrácie TNF v kĺbovom maze u pacientov s RA diagnózou
  - V zvieracích RA modeloch prítomnosť TNF urýchľuje chorobu
  - V zvieracích RA modeloch podanie anti-TNF spomaľuje chorobu

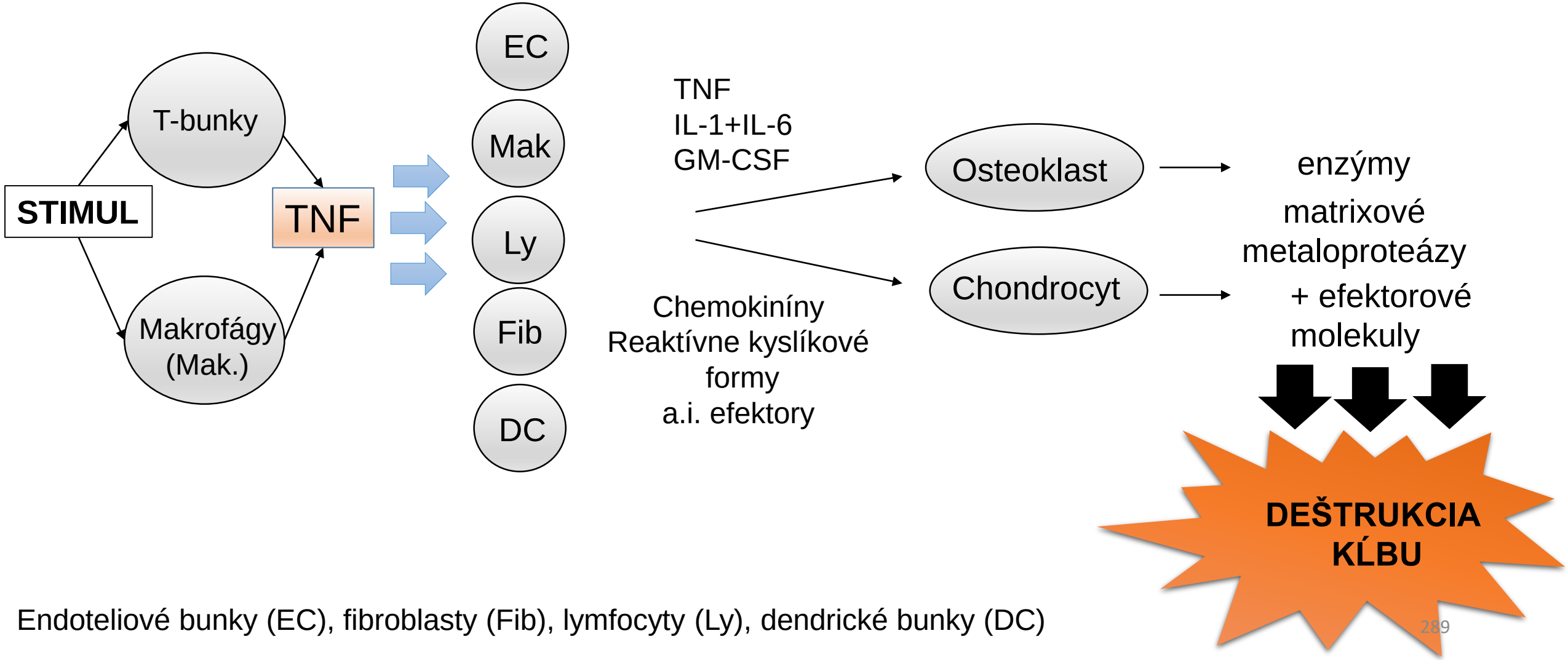
- Adalimumab sa viaže na rozpustný TNF s afinitou 10^{-10} mol/dm^3

- Adalimumab neutralizuje aj membránovú formu TNF

- Viazanie adalimumab na TNF zabraňuje interakcií s TNF-RI/II povrchovými receptormi

- Adalimumab neutralizuje TNF pro-zápalové aktivity a adalimumab sa neviaže a nie je schopný inaktivácie lymfotoxínu (TNF-β)

Príklady terapeutických mAbs – HUMIRA® ADALIMUMAB



Endoteliové bunky (EC), fibroblasty (Fib), lymfocyty (Ly), dendrické bunky (DC)

Príklady terapeutických mAbs – HUMIRA® ADALIMUMAB

- Vplyv adalimumab na pacientov s RA

- Klinická štúdia fáza 1., jedna dávka, placebo kontrolovaná štúdia (pozri referenciu: den Broeder a kol. 2002)

- 0,5, 1, 3, 5 a 10 mg/kg adalimumab alebo placebo

- Evaluácia po 1 týždni
  - U všetkých dávok bol pozorovaný pokles hladiny C-reaktívneho proteínu CRP a rýchlosť sedimentácie erytrocytov ESR
  - Pokles IL-6, IL-1 receptor antagonist, IL-1β mRNA pokles
  - Hladina metaloproteáz klesla (MMP-1 a-3) počas doby 6 mesiacov

- Adalimumab vykazuje lineárnu farmakokinetiku (nezávislá od dávkovania)
  - 40 mg jedna dávka podkožná aplikácia
  - 64% biologická dostupnosť (ekvivalencia)
  - Maximálna koncentrácia 4,7$\pm$1,6 μg/ml sa dosiahne za 131 $\pm$ 56 hodín

Príklady terapeutických mAbs – HUMIRA® ADALIMUMAB

- Analýza bezpečnosti zahŕňa viac ako 10^5 PY (z ang. patient-years), keďže ide o dlhodobé uživanie lieku

- Bezpečnosť: menej ako 10% pacientov vykazovalo vedľajšie účinky, hlavným vedľajším účinkom je nebezpečenstvo závažných infekcií ako napr. tuberkulózy, oportunistických infekcií, sklerózy, autoimunitných ochorení, zhubných ochorení

Príklady terapeutických mAbs – HUMIRA® ADALIMUMAB

Adalimumab ľahký reťazec:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC

Adalimumab ťažký reťazec:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGR
FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Vysvetlenie niektorých pojmov

- Interleukíny sú skupinou patriacou medzi cytokíny (sekretované proteíny, signálne molekuly)
  - Produkované leukocytmi
  - U človeka ca. 50 typov IL
  - Rozdelenie medzi 4 hlavné skupiny: IL1-podobné cytokíny, helikálne cytokíny 1. triedy (IL4-podobné,IL6/12-podobné), helikálne cytokíny 2. triedy (IL10-like and IL28-like) a IL17-podobné cytokíny.
  - 15-25% sekvenčná podobnosť medzi rôznymi IL

- Chemokíny sú skupinou chemotaktických cytokínov (sekretované proteíny, signálne molekuly)
  - Sú chemoatraktanty, rekrutujú leukocyty, monocyty, neutrofily
  - Úloha pri angiogenéze, zápalové procesy
  - 8-10 kDa, obsahujú 4 cysteíny v konzervovanej oblasti
  - 2 skupiny: homeostatické a zápalové, 4 podrodiny CXC, CC, CX3C, XC

- MMPs sú matrixové metaloproteázy, ktoré štiepia kolagénové vlákna (I, II, III) a podieľajú sa na rozklade extracelulárneho matrixu napríklad pri remodelácií tkanív, počas embryogenézy. Mechanické pôsobenie zvyšuje produkciu MMPs.

Vysvetlenie niektorých pojmov

- Reaktívne kyslíkové formy sú reaktívne zlúčeniny obsahujúce kyslík. Typické príklady sú peroxid, superoxid, hydroxylový radikál, singletový kyslík

- Osteoklast je multinukleárna (~5 jadier) kostná bunka, ktorá produkuje kolagenázu a acidifikuje prostredie čím rozkladá kosťové tkanivo. Týmto spôsobom sa reguluje hladina vápnika v krvi. Je veľká 150-200 μm. Vo vnútri osteoklastu sa nachádzajú vakuoly s kyslou fosfatázou. Pre osteoklastgenézu je potrebná prítomnosť RANKL. Špeciálny typ osteoklastu je odontklast, čo je bunka, ktorá absorbuje korene mliečných zubov.

- Chondrocyt je základná bunka chrupavky

Štruktúra a fyzikálno-chemické vlastnosti imunoglobulínov
Vysokoškolský učebný text

Autor: RNDr. Gabriel Žoldák, PhD.

Vydavateľ: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach
Vydavateľstvo ŠafárikPress

Vydanie: prvé
Rok vydania: 2019
Počet strán: 295
Rozsah: 3 AH

ISBN 978-80-8152-810-1 (e-publikácia)