

Imunoglobuliny

Polyklonální a monoklonální protilátky

Praktikum č. 2

imunoglobuliny

strukturálně příbuzné glykoproteiny produkované plasmatickými buňkami

- **vázané na membránu B lymfocytu**
 - receptory zprostředkující aktivaci B lymfocytu
- **sekretované (rozpuštěné)**
 - mediátory specifické humorální imunity

protilátky

imunoglobuliny namířené proti konkrétnímu antigenu

antigen

z anglického **anti**body **gen**erating substances

struktury, na něž reaguje imunitní systém, a které reaguji s produkty imunitní odpovědi

(jejich součástí jsou antigenní determinanty neboli epitopy)

- **biochemicky**

- proteiny, cukry a jejich komplexy
- čisté lipidy a nukleové kyseliny jsou slabé antigeny

- **původ**

- **exogenní** (mikroorganismy, alergeny, transplantované tkáně)
- **endogenní** (krevně-skupinové substance, nádorové antigeny, „autoantigeny“)

antigenicita a imunogenicita

odlišné pojmy, které se zároveň překrývají

imunogenicita

schopnost antigenu vyvolat imunitní odpověď
(protilátkovou nebo buněčnou, často obě)

antigenicita

schopnost specificky kombinovat finální produkty
imunitní odpovědi

***molekuly se schopností imunogenicity vykazují
antigenicitu, ale naopak to neplatí***

antigenní determinanty (epitopy)

malá oblast molekuly antigenu, kterou rozeznávají receptory lymfocytů nebo protilátky

immunodominantní epitopy

podjednotky antigenní determinant, které jsou nejnadhěji rozpoznány imunitním systémem, a tak mohou nejdíce ovlivňovat specifitu indukované protilátky

receptory lymfocytů T a B poznávají odlišné epitopy antigenních molekul

antigenní determinanty (epitopy)

B lymfocyty

rozpoznávají epitopy na nativní molekule
(sekvenční i konformační)

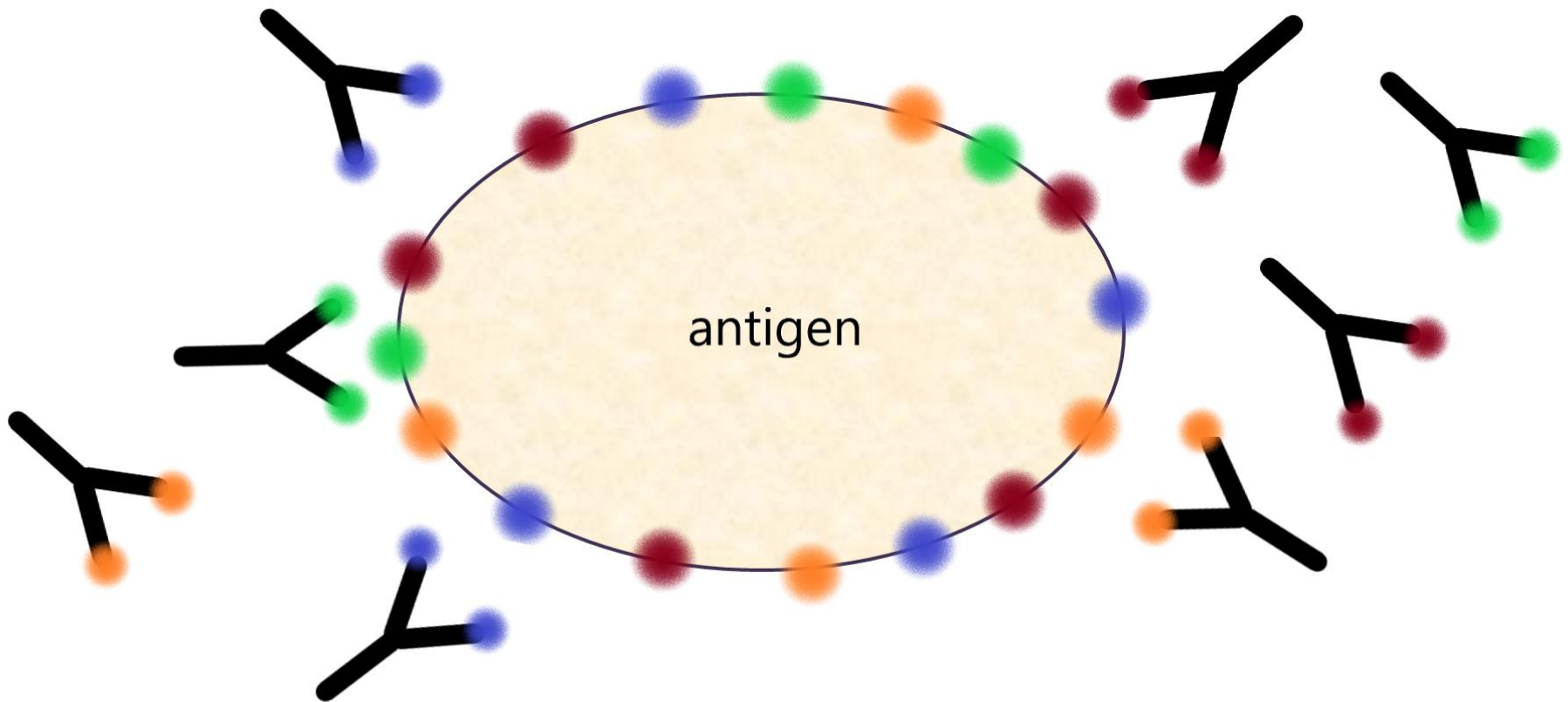
repertoár BCR specifit je cca 10^{11}

T lymfocyty

rozpoznávají většinou lineární peptidy tvořené
intracelulárně procesy (tzv. „přípravou antigenu
k prezentaci“ pomocí antigen prezentujících buněk)

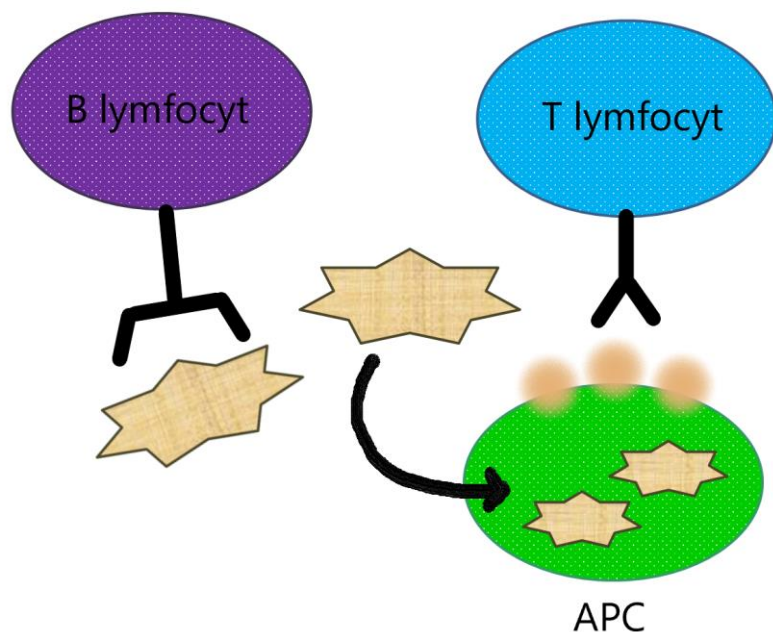
repertoár TCR specifit je cca 10^{15}

antigenní determinanty (epitopy)



„antigen processing“

T lymfocyty nerozpoznávají nativní antigeny, proto je potřebná modifikace antigenu tak, aby byl T lymfocyty rozpoznán



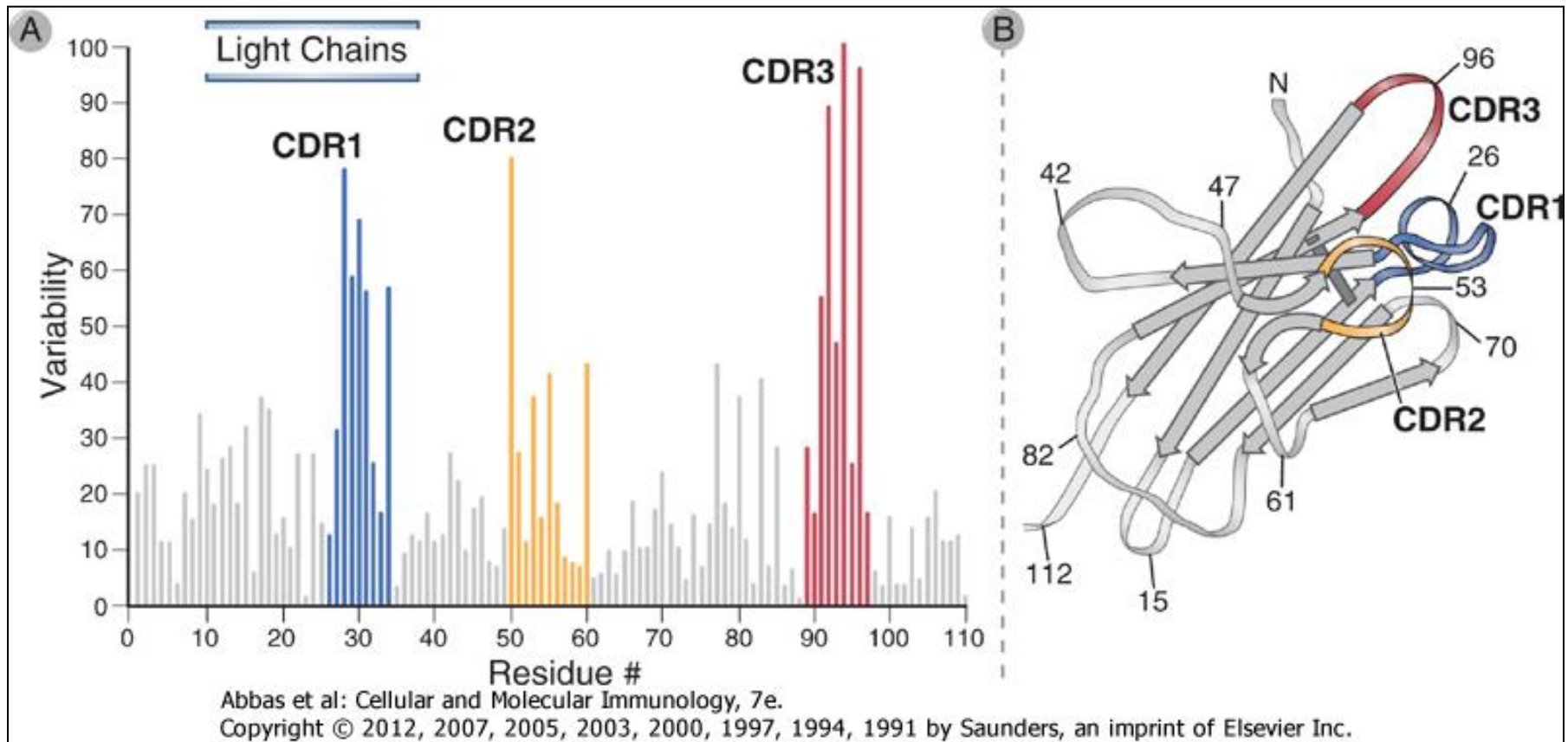
**ANTIGEN
PROCESSING →
příprava antigenu
k prezentaci**

struktura imunoglobulinů

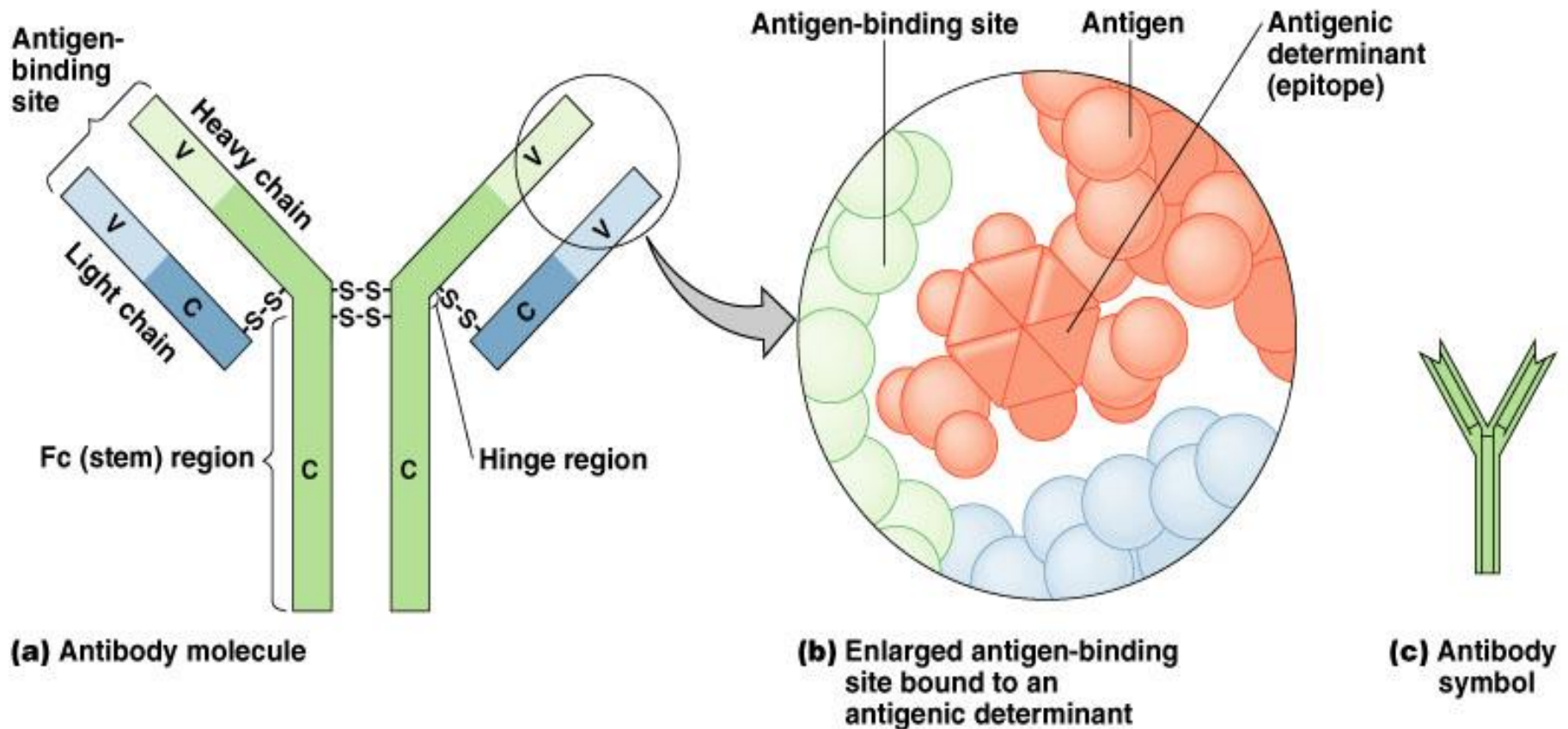
2 identické těžké řetězce (H) a **2 identické lehké řetězce (L)** spojené disulfidickými můstky (tvořené strukturálně podobnými doménami o 110–120 AMK → 2 domény u L; 4–5 domén u H)

- **lehký i těžký řetězec**
 - **variabilní oblast** (VH a VL); N-konec
 - každá oblast obsahuje 3 hypervariabilní úseky (6–10 AMK), které slouží pro vazbu antigenu
 - **konstantní oblast** (CL, CH1–CH3/CH4); C-konec
 - CL kapa nebo lambda lehké řetězce
 - CH izotyp imunoglobulinů (IgG, M, A, E, D) a podtřídy
- flexibilita vazebné části – pantová oblast mezi CH1 a CH2

3 hypervariabilní oblasti imunoglobulinové molekuly



variabilní oblast imunoglobulinové molekuly váže antigenní epitop



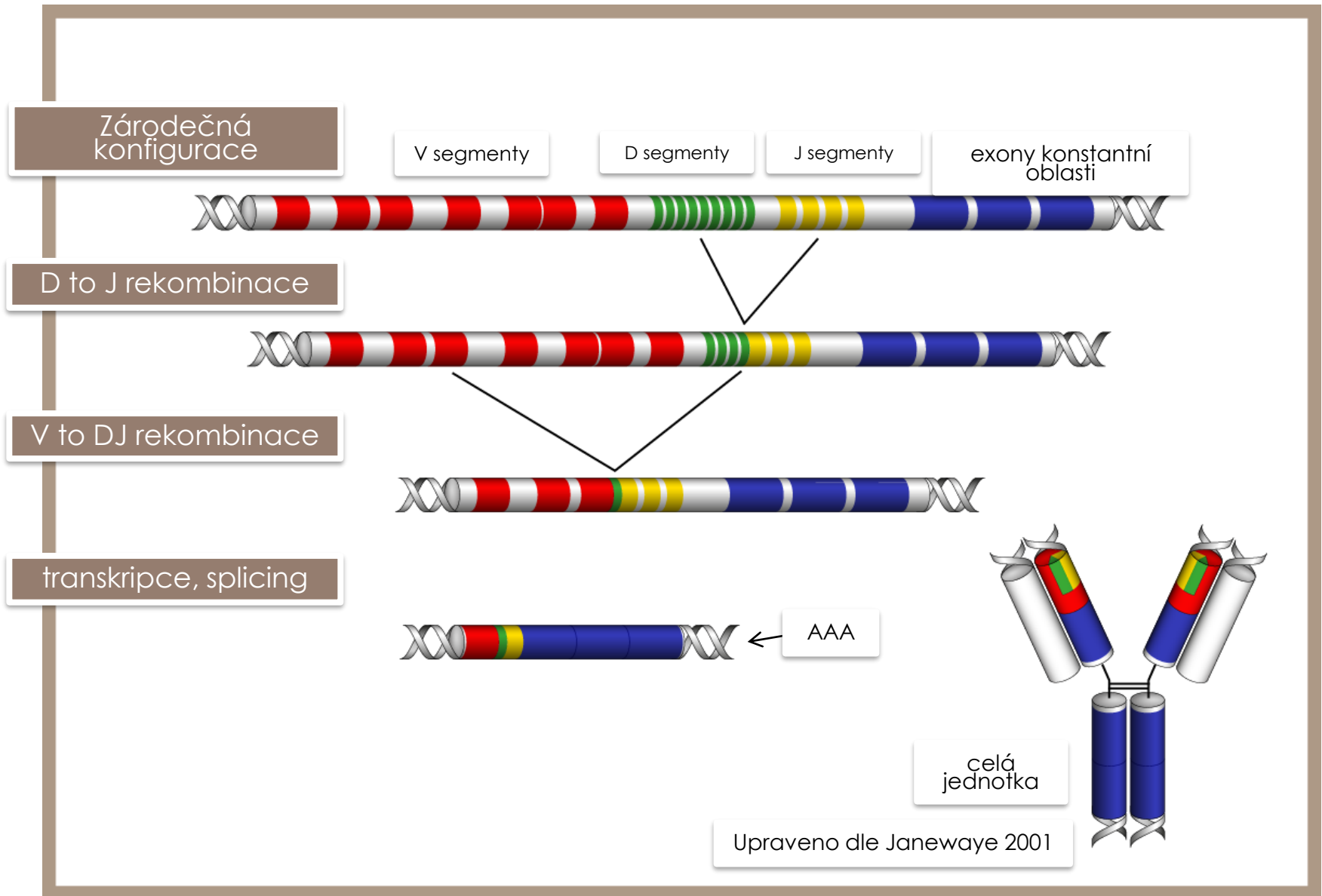
Rearrangement imunoglobulinových genů

VDJ rekombinace

děj, na jehož podkladě jsou vytvářeny komponenty tohoto genového nadrodu, a který je shodný pro vznik TCR a BCR receptorů

- geny pro těžké řetězce na chromozomu 14 se skládají z malých skupin exonů kódujících konstantní oblasti těžkých řetězců a velmi velkého množství genů pro variabilní oblasti
- mezi **V** a **C** geny jsou dvě malé skupiny exonů **D** a **J**
- u jednotlivé buňky je vybrán **jeden gen V oblasti** a spojen s **jedním genem z D a J sad** na stejném chromozomu
- vzniklý **VDJ produkt** je spojen dohromady na úrovni zpracování RNA s C_{μ} (tvorba IgM), s C_{γ} (tvorba IgG)

Rearrangement imunoglobulinových genů



IgG

- nejhojnější imunoglobulin v séru (**7,5 – 15,6 g/l**)
- menší molekula snadno pronikající do tkání
- vyskytuje se ve formě monomeru v sekreční i membránové vázané podobě
- prochází placentou aktivním dějem (v placentě přítomné FcRn receptory pro Fc části IgG)
- nejdelší biologický poločas (**21 dní**)
- **FUNKCE: klíčová úloha v sekundární imunitní odpovědi, aktivace komplementu, opsonizace, neutralizace**

vyskytuje se ve 4 podtřídách (IgG1–IgG4)

podtřídy IgG

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
průměrná koncentrace v séru (g/l)	6,98	3,80	0,51	0,56
poločas rozpadu (dny)	21	21	7/21	21
přechod přes placentu	++++	++	++/++++	+++
Ab proti proteinům	++	+/-	++	++
Ab proti polysacharidům	+	+++	+/-	+/-
Ab proti alergenům	+	(-)	(-)	++
aktivace komplementu (vazba C1q)	++	+	+++	-

IgA

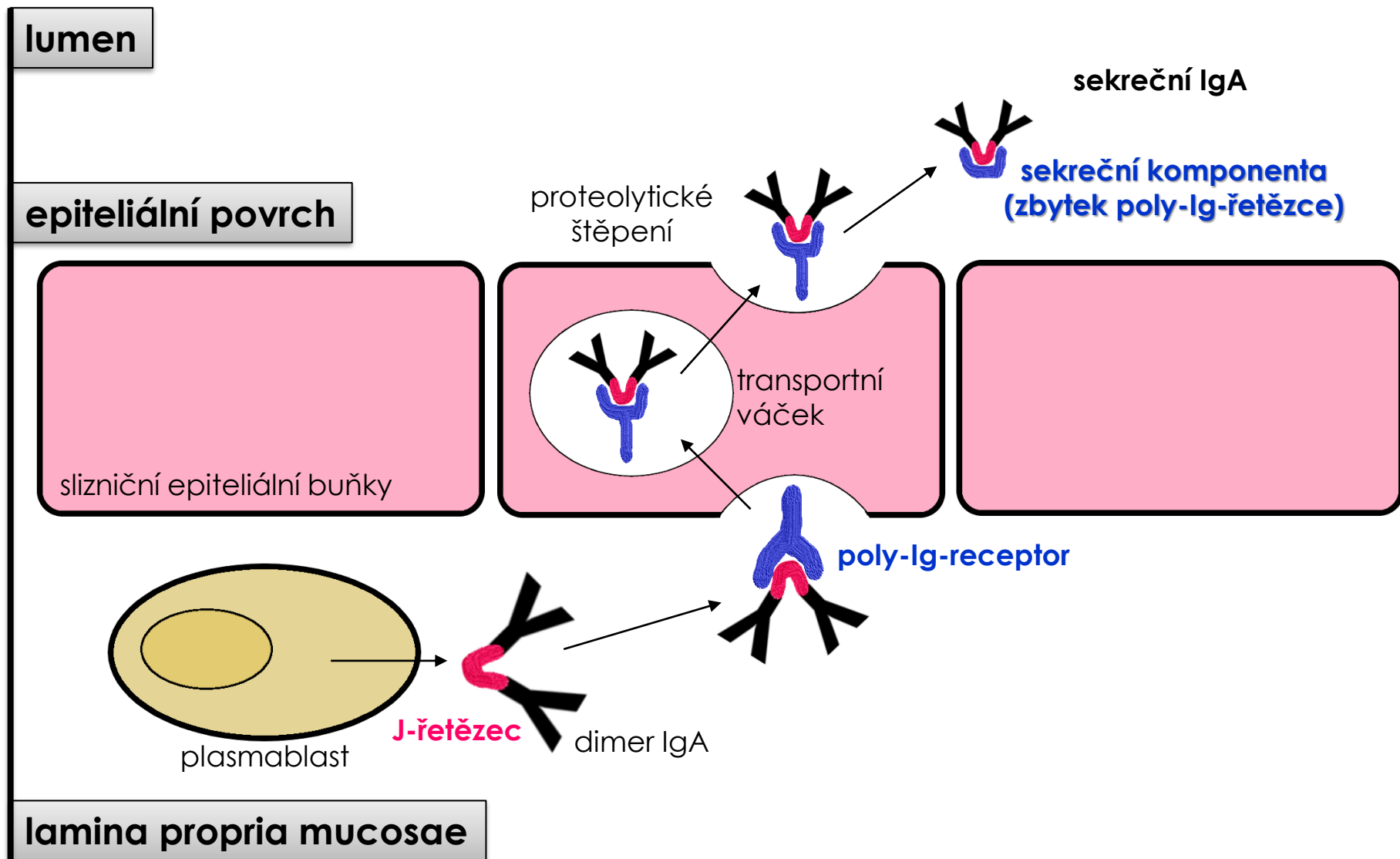
- nejhojnější imunoglobulin na sliznicích, druhý nejhojnější imunoglobulin v séru (**0,82 – 4,53 g/l**)
- vyskytuje se ve formě dimeru (spojení dvou monomerů J řetězcem) v sekreční a monomeru v membránově vázané podobě
- neprochází placentou
- biologický poločas (**6 dní**)
- **FUNKCE: klíčová úloha ve slizniční imunitě; neutralizace, opsonizace, neaktivuje komplement klasickou cestou aktivace**

vyskytuje se ve 2 podtřídách (IgA1–IgA2)

sekreční IgA

- IgA imunoglobuliny jsou produkovány plazmatickými buňkami a B lymfocyty v submukóze
- transportovány na slizniční povrch pomocí transportního Fc receptoru (**poly-Ig-receptor**)
- k transportu dochází přes epitel transcytózou (endocytóza – přeprava v transportním váčku – fúze s lumenální membránou – odštěpení z receptoru proteolýzou)
- část poly-Ig-receptoru zůstává po uvolnění na slizniční povrch součástí dimeru IgA (tzv. **sekreční komponenta**) → ***zajišťuje rezistenci vůči proteázám přítomným na slizničních površích***

proces sekrece IgA



IgM

- velká molekula, která zprostředkovává zejména intravaskulární neutralizaci organismů (v séru **0,46 – 3,04 g/l**)
- vyskytuje se ve formě pentameru (teoreticky 10 vazebných míst) v sekreční a monomeru v membránově vázané podobě
 - tvoří receptor na B-lymfocytech
 - po navázání antigenu zprostředkuje aktivaci B lymfocytů
 - důležitý pro vývoj B lymfocytů
- biologický poločas (**6 dní**)
- **FUNKCE: zajišťuje primární imunitní odpověď, účinná aktivace komplementu (nese 5 vazebných míst pro komplement, proto se významně uplatňuje v aktivaci komplementu klasickou cestou)**

IgE

- v séru a tělních tekutinách jen velmi nízká koncentrace, protože většina IgE se váže na vysokoafinitní receptory na povrchu mastocytů, basofilů a eozinofilů (v séru **0,0003 g/l**; proto **0–100 kU/l**)
- biologický poločas (**2 dny**)
- **FUNKCE: podílí se na zajištění obrany proti parazitárním infekcím**

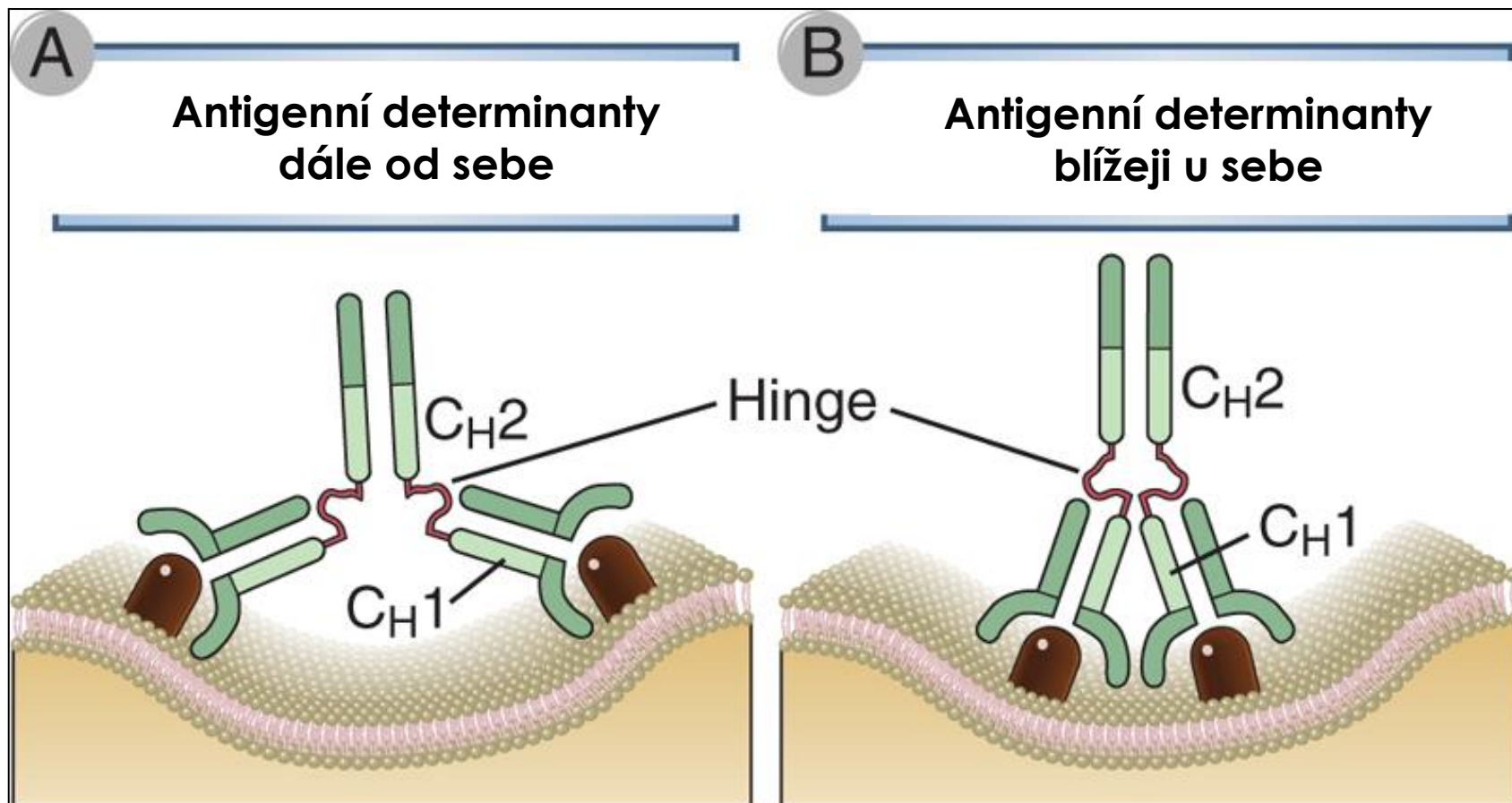
IgD

- v séru a tělních tekutinách jen velmi nízká koncentrace, protože je tvořen vyvíjejícími se B lymfocyty schopnými reagovat s antigenem (v séru **0–100 IU/ml**)
- tento imunoglobulin slouží výhradně jako povrchový receptor pro aktivaci B lymfocytů specifickým antigenem
- biologický poločas (**2,8 dní**)
- **FUNKCE: není známá**

shrnutí biologických funkcí imunoglobulinových molekul

- aktivace komplementového systému (**IgG, IgM**)
- opsonizace (**zejména IgG**)
- neutralizace antigenů (**IgG, IgA, IgM**)
- zábrana adherence (**IgA, IgG**)
- aglutinace, precipitace (**IgG, IgM**)
- degranulace žírných buněk (**IgE**)
- přechod placentou (**IgG**)
- imunoregulace (zejména **IgG**)

flexibilita protilátkové molekuly



Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology, 7e.

Copyright © 2012, 2007, 2005, 2003, 2000, 1997, 1994, 1991 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.

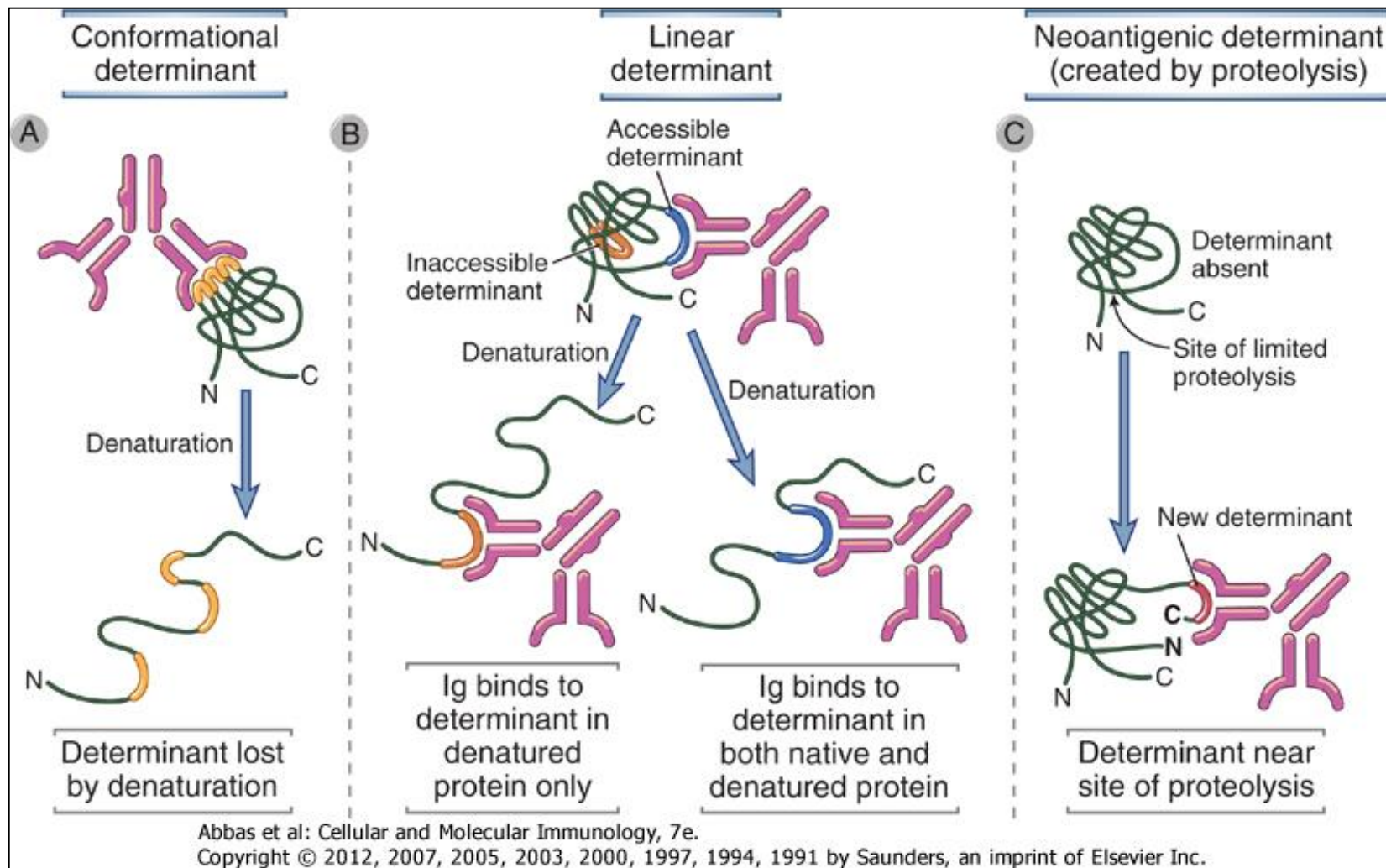
interakce antigenu s protilátkou

- **Nekovalentní vazby:**
 - elektrostatická
 - vodíkové můstky
 - van der Waalsovy síly
 - hydrofobní síly
- **afinita:** síla interakce mezi epitopem a jedním vazebným místem protilátky
- **avidita:** suma všech interakcí mezi protilátkou a antigenem

interakce antigenu s protilátkou

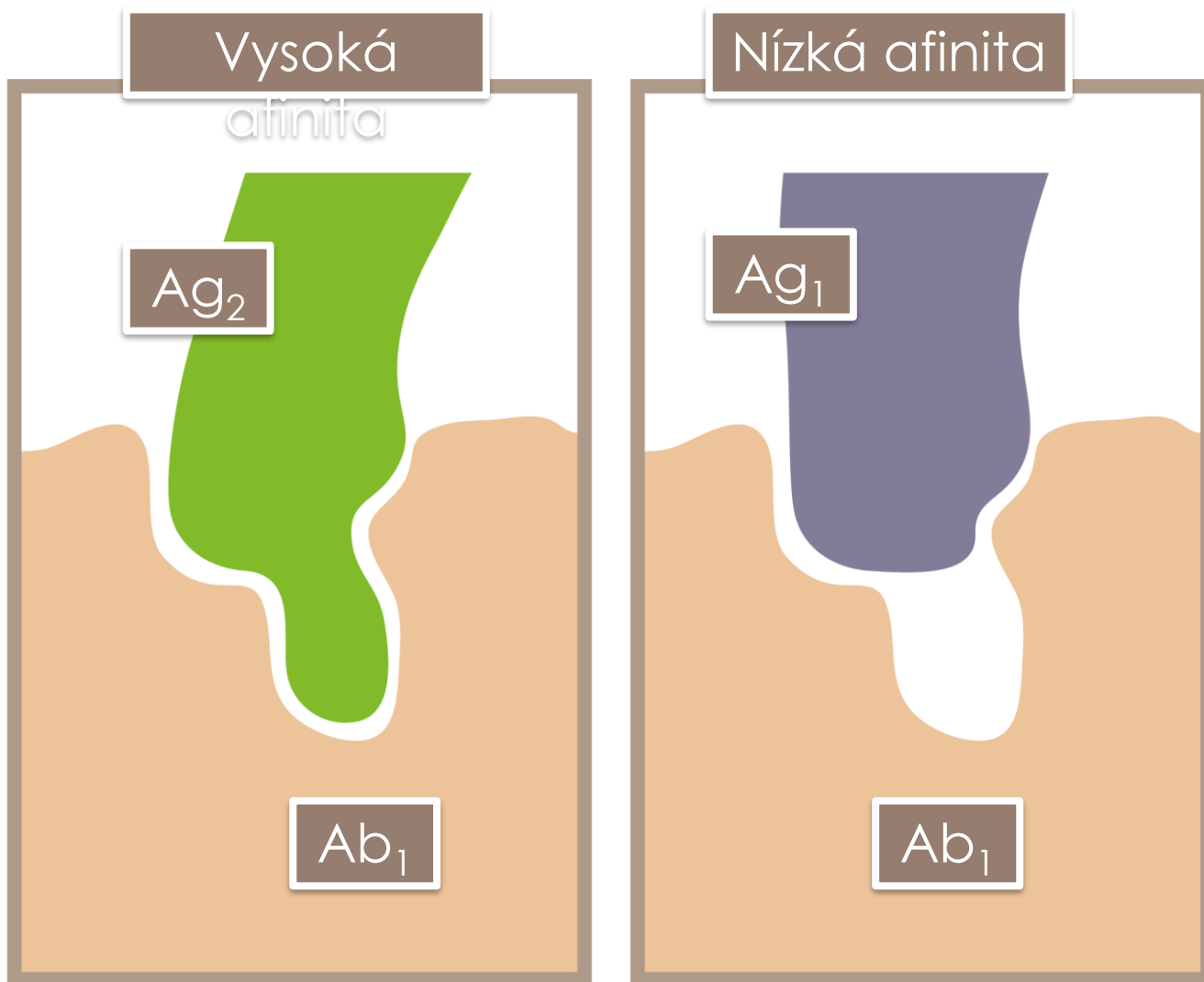
- vysoká diversita protilátek: $> 10^{11}$ různých vazebných míst
- komplementarita vazebného místa protilátky s epitopem antigenu
 - hypervariabilní oblasti VL a VH (CDR1, 2 a 3 – complementarity determining regions)
 - jedinečnost vazebného místa dána procesem VDJ (VJ) rekombinace a somatickými hypermutacemi
- přístupnost epitopů v závislosti na konformaci antigenu

vliv konformace antigenu (přístupnosti epitopu) na vazbu s profilátkou



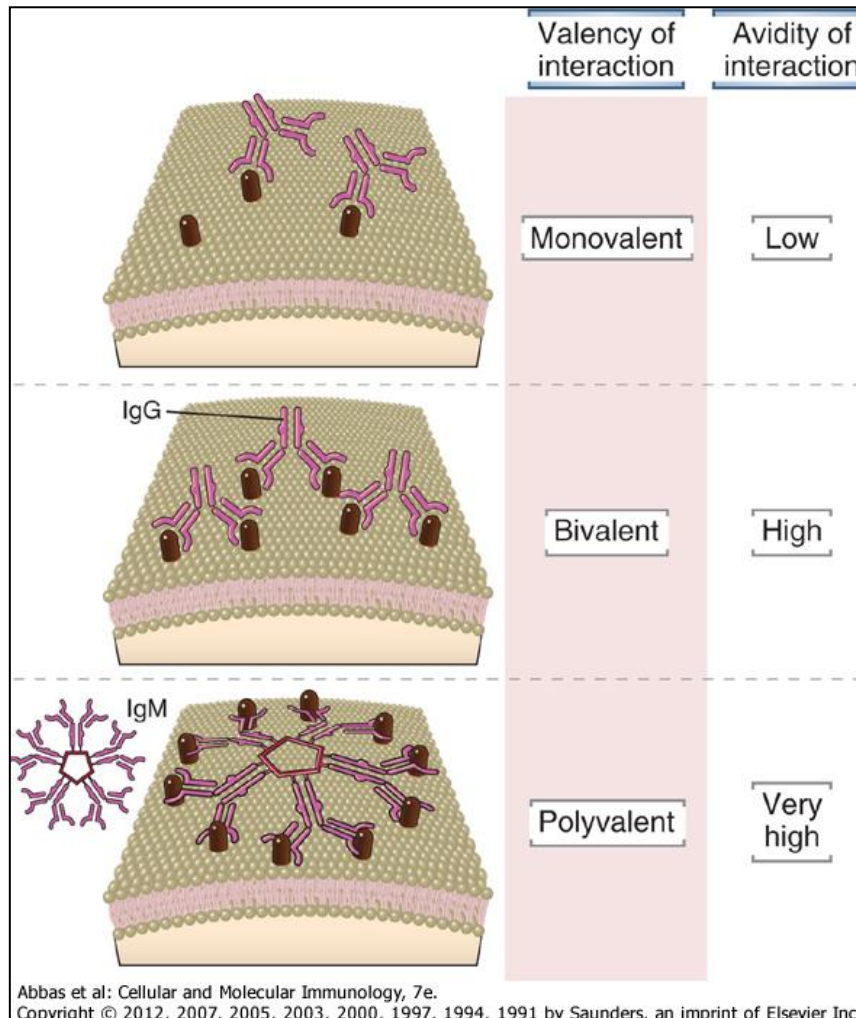
afinita protilátek

vyjadřuje sílu interakce mezi 1 epitopem daného antigenu a vazebným místem protilátky



avidita protilátek

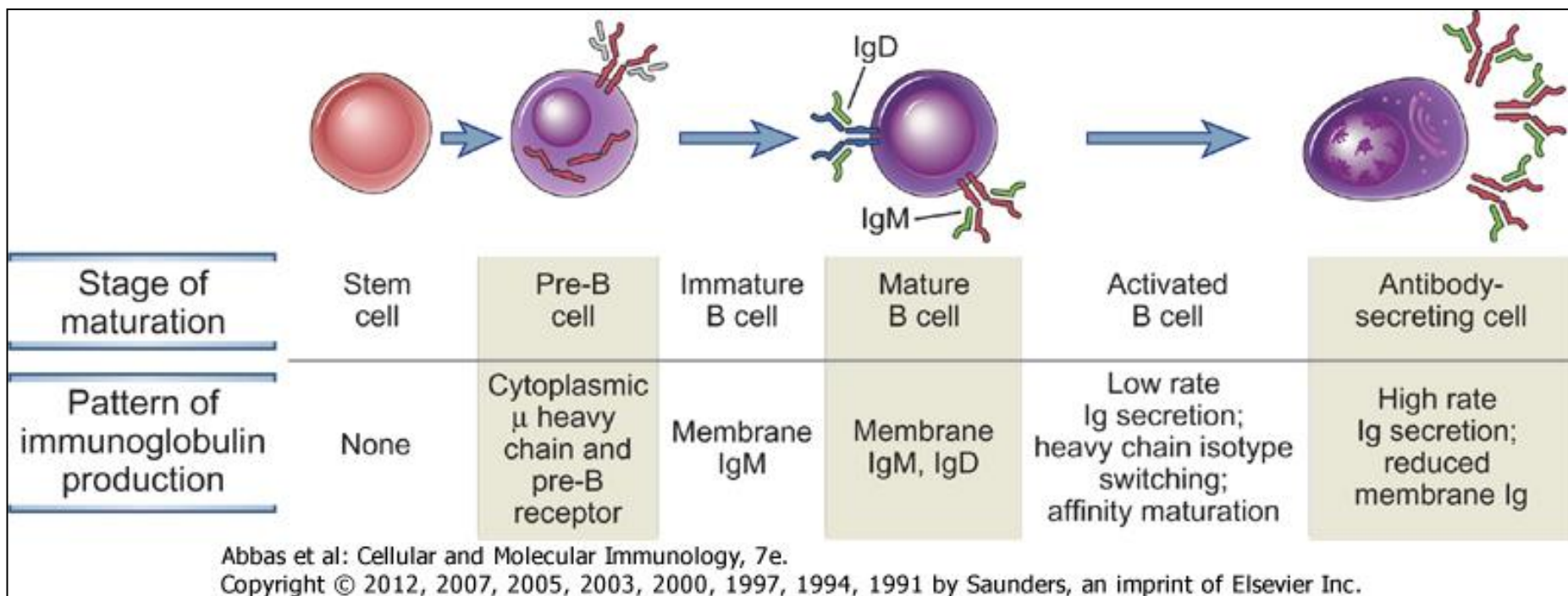
*vyjadřuje sílu interakce polyvalentní protilátky s polyvalentním antigenem
(obsahuje více identických epitopů)*



Vývoj B lymfocytů, tvorba protilátek

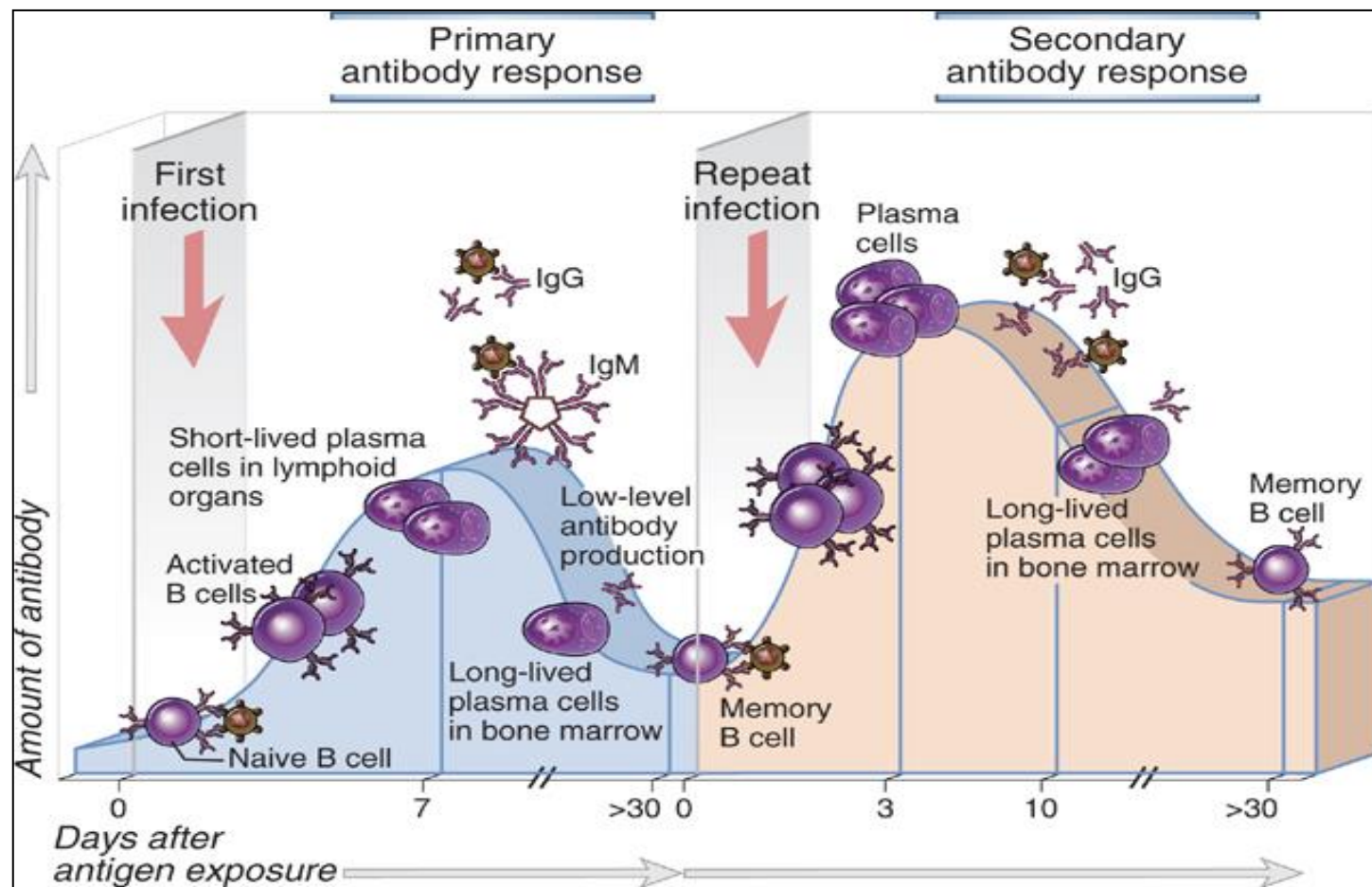
- **pre-B lymfocyty** (syntéza H řetězce IgM, VDJ rekombinace – pre-B receptor)
- **nezralé B lymfocyty** (syntéza H i L řetězců IgM, VDJ (VJ) rekombinace, B-buněčný receptor)
- **zralé B lymfocyty** (exprese IgM a IgD na povrchu B-buněčného receptoru)
- vazba antigenu na BCR – aktivace a postupná diferenciaci B lymfocytů do plazmatických buněk produkujících protilátky, vznik paměťových B lymfocytů
 - vyžívání afinity – somatické hypermutace
 - izotypový přesmyk
 - převaha sekretované formy

exprese imunoglobulinů v průběhu maturace B lymfocytů



VDJ (VJ)
rekombinace

Zrání afinity
Izotypový přesmyk



Feature	Primary response	Secondary response
Peak response	Smaller	Larger
Antibody isotype	Usually IgM > IgG	Relative increase in IgG and, under certain situations, in IgA or IgE
Antibody affinity	Lower average affinity, more variable	Higher average affinity (affinity maturation)
Induced by	All immunogens	Only protein antigens

Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology, 7e.

Copyright © 2012, 2007, 2005, 2003, 2000, 1997, 1994, 1991 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.

PROTILÁTKY

Imunoglobulin namířený proti konkrétnímu antigenu

POLYKLONÁLNÍ

směs imunoglobulinových molekul s různou specificitou (zpravidla proti různým epitopům 1 antigenu)

příprava: **imunizací zvířat**

MONOKLONÁLNÍ

produkt 1 klonu B lymfocytů s jedinečnou specificitou; produkce nádorem z plazmatickým buněk (myelomem)

příprava: **hybridomovou technologií**

Postuláty klonální selekční teorie

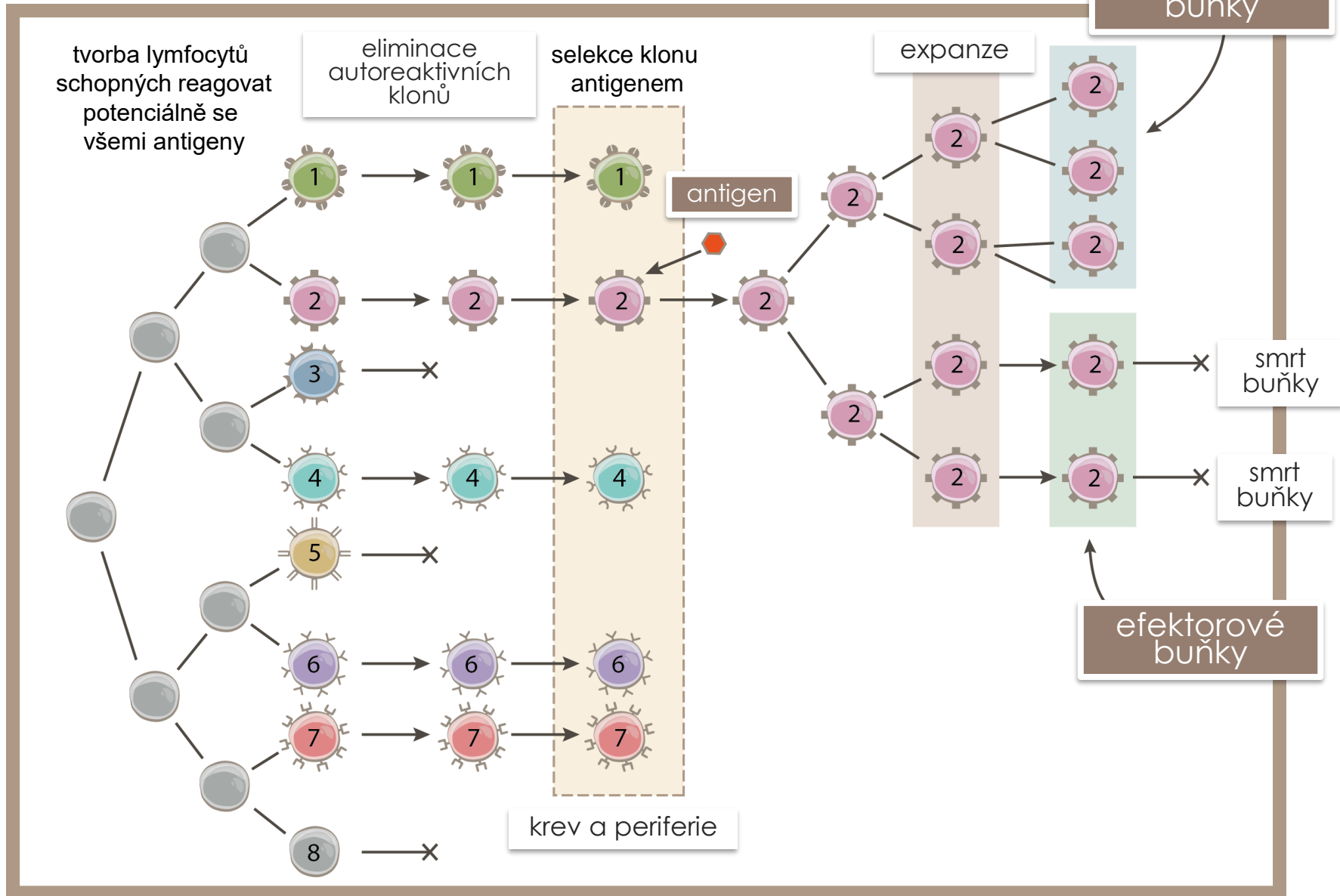
každý lymfocyt má jeden typ receptoru s jedinečnou specificitou

interakce mezi **antigenní molekulou a receptorem** schopným ji vázat vede k **aktivaci lymfocytu**

buňky, které vznikly z aktivovaných lymfocytů **proliferací a diferenciací** mají **receptory stejné specificity**

lymfocyty, které mají receptory pro tělu vlastní antigeny jsou v časném stadiu vývoje lymfoidních buněk odstraněny a tudíž v repertoáru zralých lymfocytů chybí („forbidden clones“)

klonální selekční teorie



Příprava imunoglobulinových preparátů

polyklonální „antiséra“ (hyperimunní séra)

- humánní
- xenogenní
- imunizace zvířat – králík, koza, prase, kůň...

monoklonální protilátky

- myší
- modifikované (chimerické, humanizované, lidské)

Typy „nespecifických“ imunoglobulinových derivátů

intravenózní

5–10% roztok intaktních molekul IgG bez příměsi
ostatních imunoglobulinových tříd

subkutánní

jedná se v podstatě o intravenózní deriváty zahuštěné
na 16 %

intramuskulární

16% roztok převážně IgG

Indikace imunoglobulinové léčby

substituce při nedostatečné tvorbě protilátek

primární imunodeficiencie

sekundární imunodeficiencie

imunoregulace

autoimunitní choroby

vaskulitidy

alergická onemocnění

léčba infekčních chorob

substituce i imunoregulace

monoklonální protilátky

protilátka **pocházející z produkce jednoho klonu aktivovaných B lymfocytů** (respektive jejich efektorových forem – tzv. plazmocytů) po styku s konkrétním antigenním epitopem

tyto protilátky jsou dnes hojně využívány jak v základním výzkumu, tak v medicíně pro značení specifických molekul zejména při diagnostických laboratorních vyšetřeních

příprava monoklonálních protilátek

injekce konkrétního antigenu do experimentálního zvířete

aktivaci B-lymfocytů s následnou produkcí protilátek
(B-lymfocyty odebírány ze **sleziny** nebo **jiného lymfatického orgánu**)

in **vitro fúze** linie **myelomových buněk bez HGPRT a extrahovaných B-lymfocytů** pomocí propylenglykolu

vzniknou **hybridomy**

(nesfúzované plazmocyty jsou in vitro velice konkurenčně slabé, nedělí se a hynou)

příprava monoklonálních protilátek

buněčná kultura je přenesena do média obsahujícího hypoxanthin, aminopterin a thymidin (**HAT-medium**)

tímto **zahynou i nezfúzované myelomové buňky**
(neobsahují enzym HGPRT a nejsou tak schopny využít deriváty purinů v živném HAT-médiu obsažené)

hybridomové buňky naopak díky podílu normálních lymfocytů v genomu obsahují sekvenci pro enzym HGPRT a na HAT-médiu **prosperují a proliferují**

nakonec pomocí speciálních testů z kultury **vyděleny pouze hybridomy produkující jen jeden klon protilátek**
(monoklonální protilátky)

nomenklatura monoklonálních protilátek

- **-mab** (přípona pro monoklonální protilátky nebo jejich fragmenty)
- **-umab** (lidské) **-omab** (myší)
- **-ximab** (chimerické) **-zumab** (humanizované)

(další složky názvu mají vyjadřovat „terče“ :
např. virové-**vir**, nádorové **-tum**, imunologické **-lim**,
kardiovaskulární **-cir**, neurologické **-ner**, apod.)

využití monoklonálních protilátek

diagnostika

- klasifikaci lymfocytů a jiných leukocytů
 - pomocí CD markerů metodou průtokové cytometrie)
- diagnostika infekčních či systémových onemocnění nebo nádorů, pokud jsou známy specifické antigeny (protilátky) vyskytující se u těchto onemocnění (bez ohledu na příčinnou souvislost)
 - imunoanalýza, průtoková cytometrie

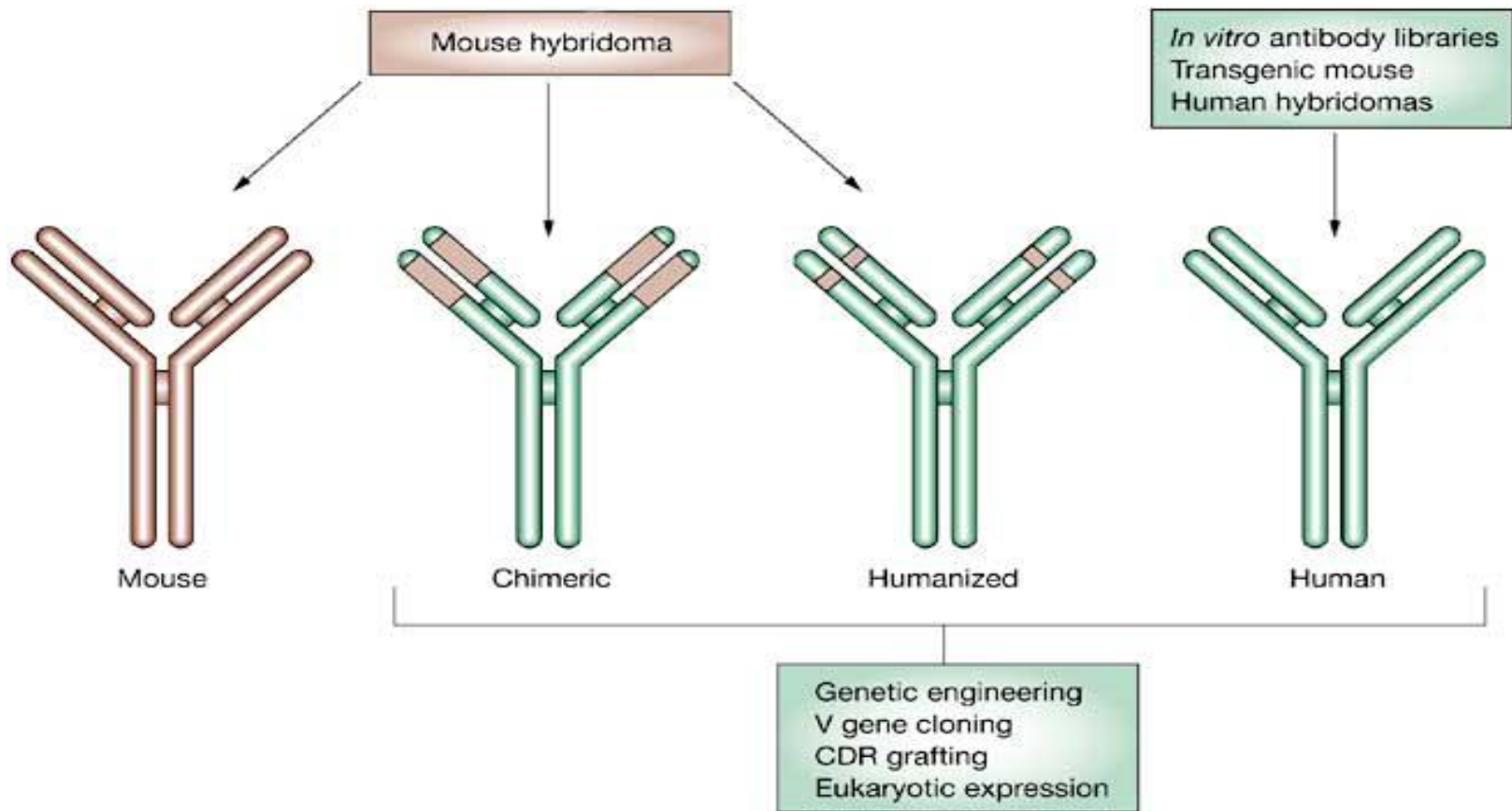
využití monoklonálních protilátek

terapie

- v terapii, k zacílení buněk a molekul důležitých v patogenezi nemocí

výzkum

typy používaných monoklonálních protilátek



Hohlfeld R *et al.* (2005) Drug Insight: using monoclonal antibodies to treat multiple sclerosis; *Nat Clin Pract Neurol* 1 34-44 [doi: 10.1038/ncpneuro0016]

Příklady klinického využití monoklonálních protilátek v léčbě imunopatologických chorob

- **imunosuprese:**

- **anti-CD3** (muromonab; OKT3):
akutní rejekce u orgánových transplantací)
- **anti CD20** (rituximab):
revmatoidní artritida, B-buněčné nádory
- **anti-CD25** (basiliximab, daclizumab):
sclerosis multiplex

- **blokáda prozánětlivých cytokinů: :**

- **anti-TNF- α** (infliximab, adalimumab, golimumab):
revmatoidní artritida, Crohnova choroba, ankylozující spondylitida, psoriatická artritida
- **anti-IL-6** (tocilizumab): revmatoidní artritida, systémová juvenilní idiopatická artritida
- **anti-IL-1** (canakinumab): autoinflamatorní syndromy, systémová juvenilní idiopatická artritida, periodické horečky

Příklady klinického využití monoklonálních protilátek v léčbě imunopatologických chorob

- **blokáda adhezivních molekul:**
 - **anti integrin- $\alpha 4\beta 1$** (natalizumab): **sclerosis multiplex**
 - **anti-CD11a** (efalizumab): **psoriáza**
- **protialergická léčba:**
 - **anti-IgE** (omalizumab): **těžké formy astmatu**
 - **anti-IL4** (dupilumab): **středně těžká až těžká atopická dermatitida**
- **antiagregační léčba:**
 - **anti-trombocytární receptor gpIIb/IIIa**
(abciximab): **prevence ischemických kardiálních komplikací u pacientů podstupujících perkutánní koronární intervenční zákrok, nestabilní angina pectoris**
- **antivirová léčba:**
 - **RS virus** (palivizumab):
prevence infekce respiračním syncytiálním virem

Příklady klinického využití monoklonálních protilátek v léčbě imunopatologických chorob

- **protilátky proti antigenům bílých krvinek:**
 - **anti-CD20** (Rituximab): léčba lymfomů
 - **anti-CD52** (Alemtuzumab): roztroušená skleróza
- **anti-receptorové protilátky:**
 - **anti-human epidermal receptor 2**
(receptor HER-2; trastuzumab):
karcinom prsu, adenokarcinom žaludku
 - **anti-epidermal growth factor**
(receptor EGFR; cetuximab): kolorektální karcinom,
spinocelulární karcinom hlavy a krku