

GENOVÉ TECHNOLOGIE

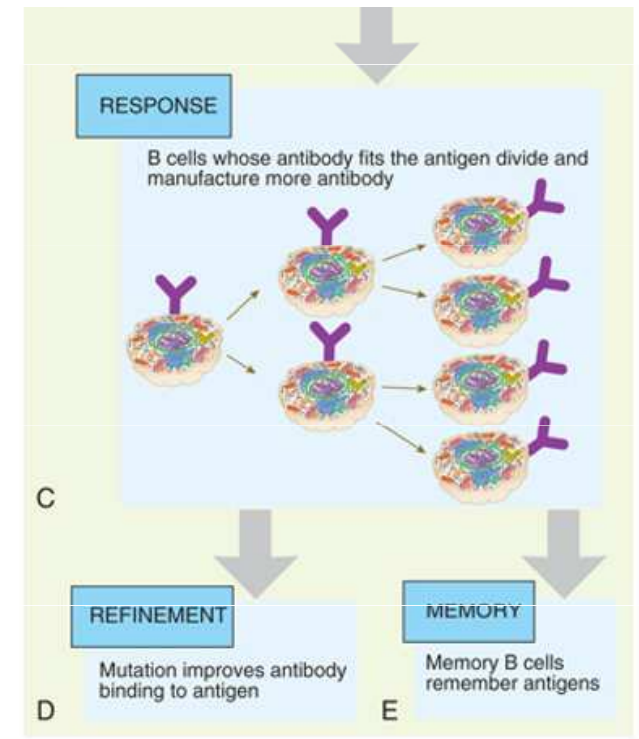
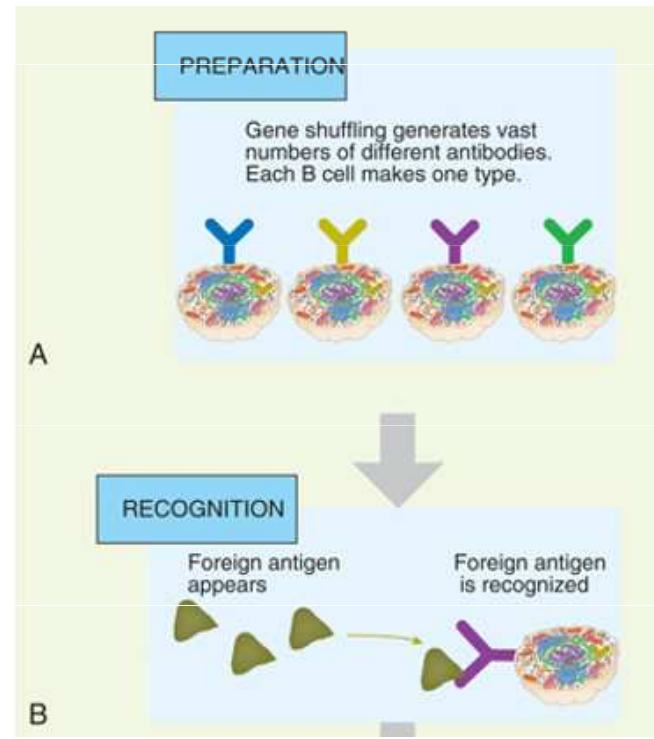
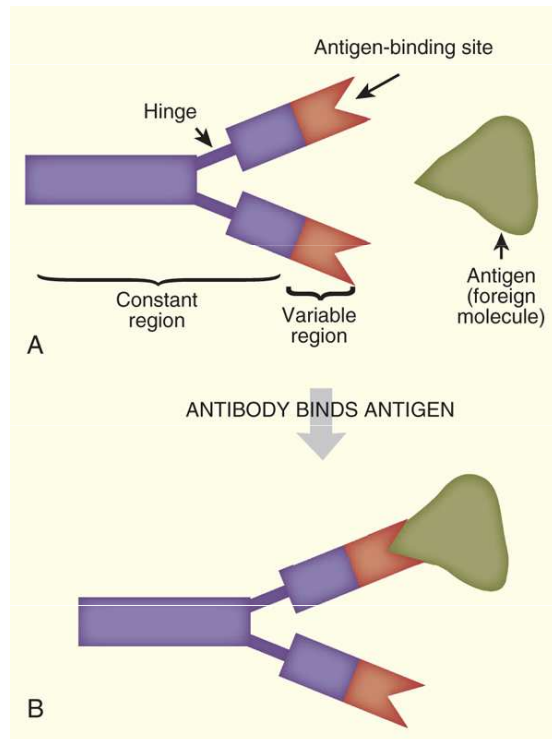
Technologie v imunologii

protilátky (struktura, funkce), cílený návrh protilátek, monoklonální protilátky, ELISA, vakcíny (tvorba a výroba, identifikace potenciálních nových antigenů, DNA vakcíny)

Úvod

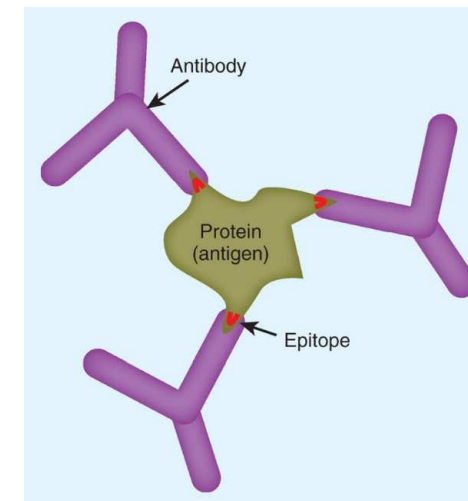
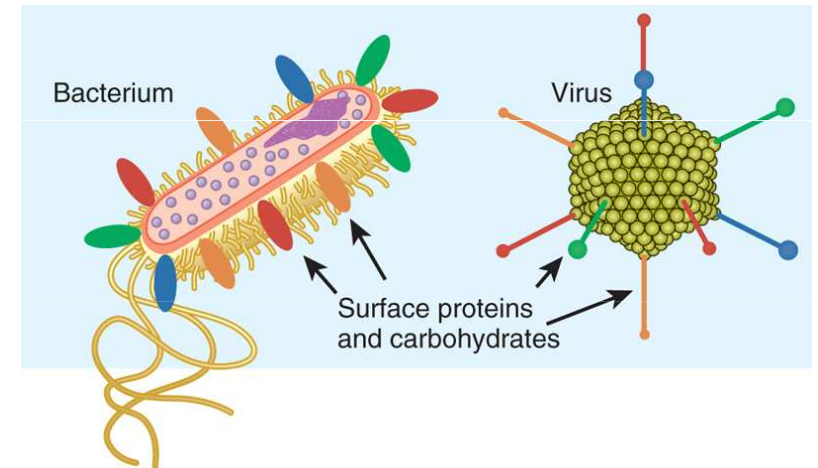
- Okolní prostředí je plné infekčních mikroorganismů a virů
- Ochrana organismu pomocí buněk imunitního systému
- Antigeny – většinou proteiny na povrchu mikroorganismů = aktivace imunitní reakce
- Protilátky – rozeznávají a váží se na antigeny = produkovány B-buňkami adaptivního imunitního systému
- Protilátky většinou sekretovány do lymfy, některé se váží na povrch = B-cell receptory
- Masivní produkce B-buněk produkujících protilátku rozeznávající daný antigen
- Imunitní systém zaznamenává všechny úspěšně použité protilátky = rychlejší a masivnější odpověď

Úvod



Antigen, protilátka, epitop

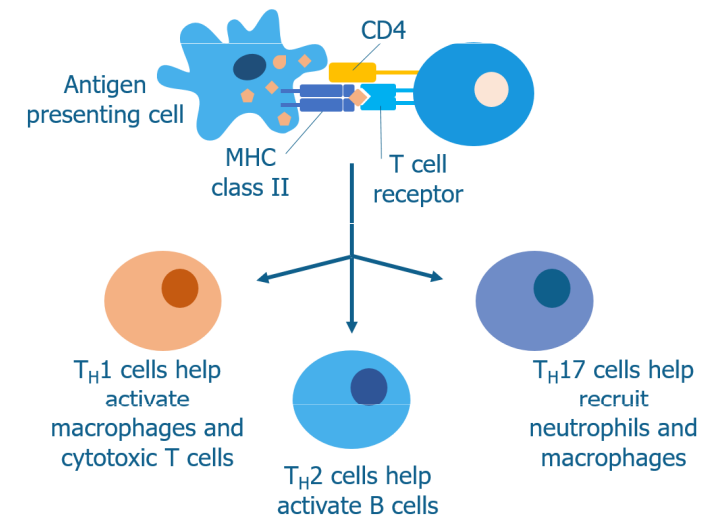
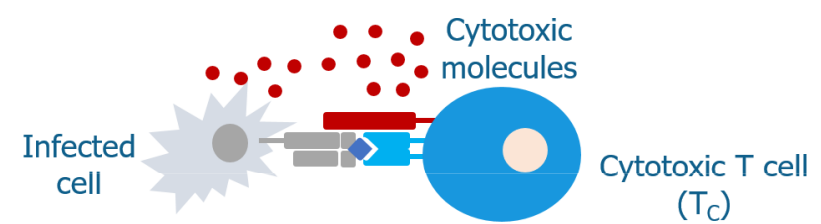
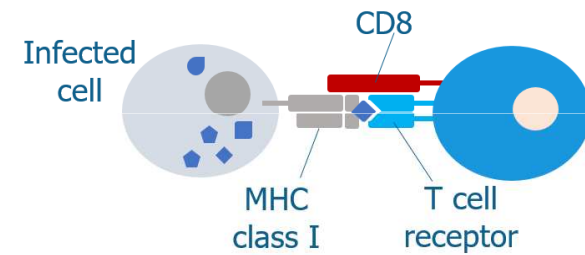
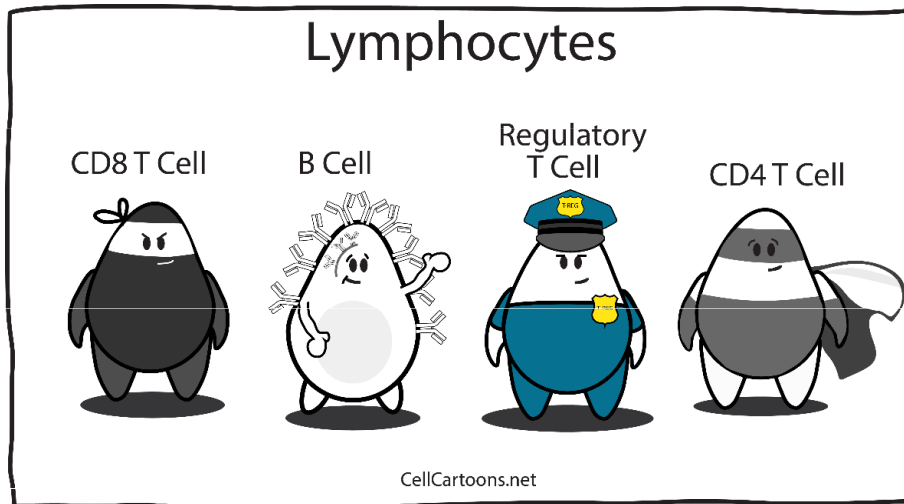
- Antigen – cizorodá molekula aktivující imunitní systém
- Nejsilnější imunitní reakce = glykoproteiny a lipoproteiny
- Velmi často slouží jako antigeny také polysacharidy obsažené na povrchu mikroorganismů
- Jako antigen může rovněž sloužit DNA
- Živočišný imunitní systém je založen na specifické (získané) imunitě dělící se na:
 - humorální imunitu (zprostředkována imunoglobuliny)
 - buněčnou imunitu (T – lymfocyty = T_H a T_C)
- Protilátka = vazba na celé proteiny
- T-lymfocyty = vazba na fragmenty proteinů
- Epitop – oblast proteinu rozpoznávaná protilátkou



T-lymfocyty






- rozpoznávají pouze antigeny exprimované na povrchu ostatních buněk, převážně makrofágů, buněk infikovaných viry nebo B-lymfocyty
- T-lymfocyty rozpoznávají tyto buňky skrze receptorové proteiny třídy I a II hlavních histo-kompatibilních komplexů (MHCs)
- Třída I aktivuje T_H buňky a třída II aktivuje T_C buňky
- MHC receptory jsou kódovány rodinou genů specifických pro každého jedince
- MHC receptory nazýváme také hlavní histokompatibilní systémový komplex HLA

T-lymfocyty

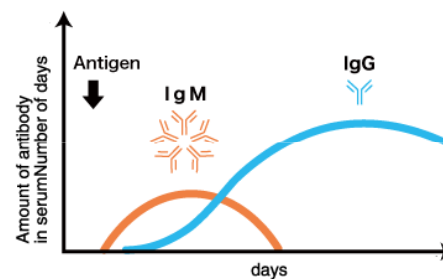


Struktura a funkce imunoglobulinů

- Protilátky děleny do 5 základních tříd
- Nejabundantnější jsou IgG v séru
- Pouze IgG protilátky prochází přes placentu
- IgA – sekreční potilátky důležité v potlačování respiračních a gastrointestinálních infekcí
- IgM – 10 vazných míst = obalení mikroorganismů a stimulace buněk
- IgE – na povrchu žírných buněk, stimulace alergické odpovědi uvolněním histaminu

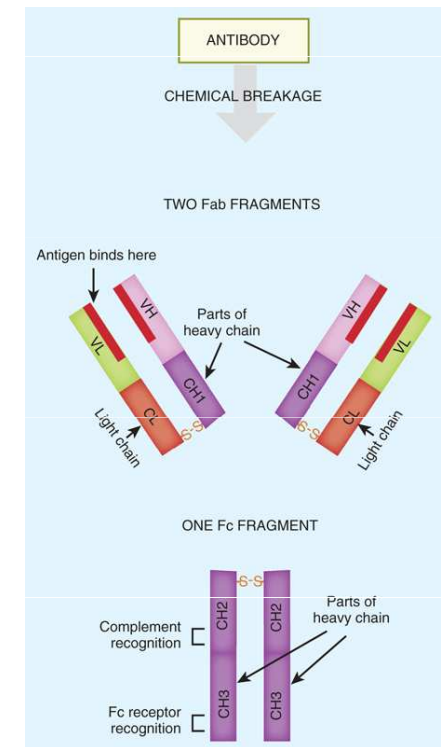
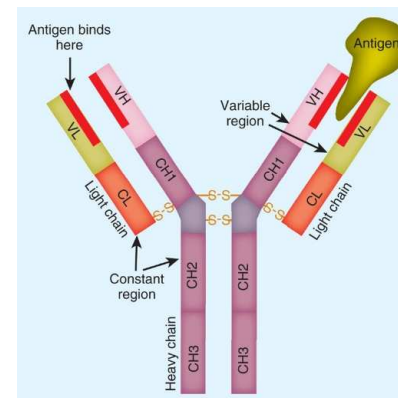
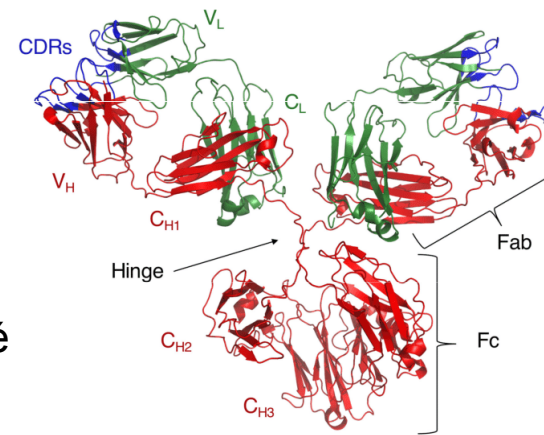
					
	IgM	IgG	IgA	IgE	IgD
Heavy Chain	μ (mu)	γ (gamma)	α (alpha)	ϵ (epsilon)	δ (delta)
MW (Da)	900k	150k	385k	200k	180k
% of total antibody in serum	6%	80%	13%	0.002%	1%
Fixes complement	Yes	Yes	No	No	No
Function	Primary response, fixes complement. Monomer serves as B-cell receptor	Main blood antibody, neutralizes toxins, opsonization	Secreted into mucus, tears, saliva	Antibody of allergy and anti-parasitic activity	B cell Receptor

Levels of circulating antibodies to a specific antigen



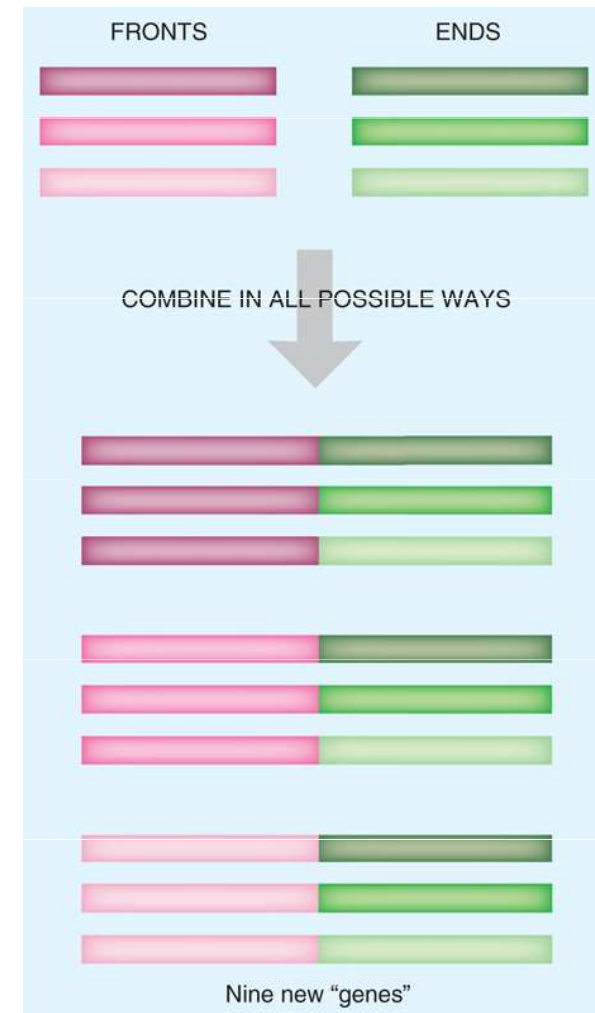
Struktura a funkce imunoglobulinů

- IgG protilátka se skládá ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců
- Lehké řetězce kódovány jedním ze dvou genových lokusů κ nebo λ
- Každý z lehkých a těžkých řetězců se skládá z jedné až čtyřech konstantních oblastí a jedné variabilní
- Variabilní oblasti tvoří tzv. paratop – vazba antigen
- Máme miliony různých variabilních oblastí
- V Pantové oblasti lze protilátku rozdělit chemicky (papainem) na Fc a dva Fab fragmenty



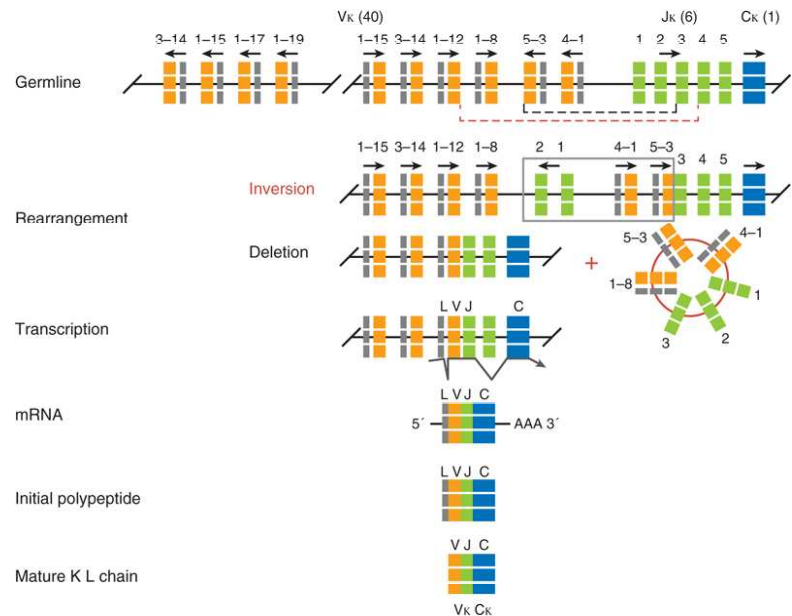
Diverzita protilátek

- Existuje téměř nekonečný počet antigenů = je třeba i téměř nekonečný počet protilátek
- Genetický problém týkající se počtu genů kódujících jednotlivé protilátky
- Celý lidský genom by kódoval jen několik milionů protilátek
- Imunitní systém generuje velké množství sekvencí z relativně malého počtu genů v procesu V(D)J rekombinace
- Imunitní systém skládá geny pro protilátky ze sbírek krátkých DNA segmentů
- V(D)J rekombinace probíhá v kostní dřeni během vývoje B-buněk a je iniciována proteiny RAG1 a RAG2 s následnou NHEJ

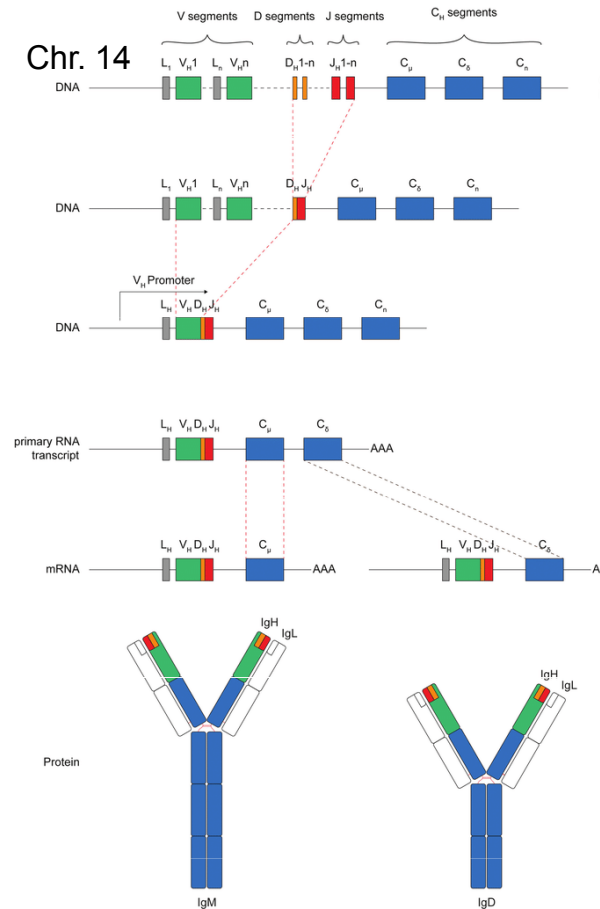


V(D)J recombination

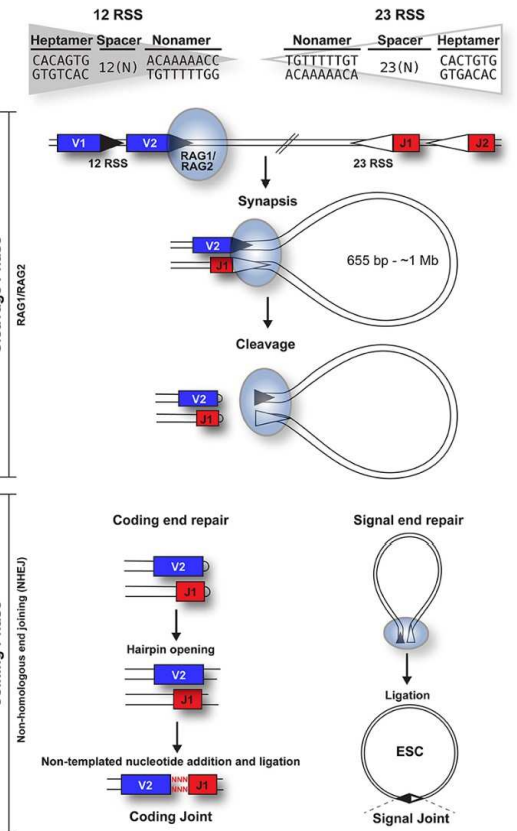
Chr. 2



Chr. 14



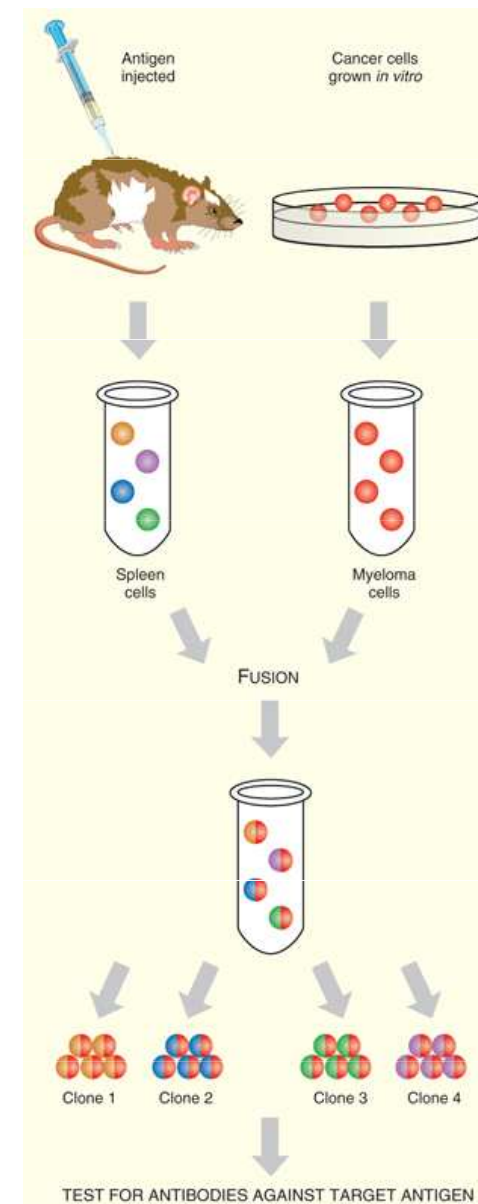
Backhaus et al. 2018



Smith et al. 2019

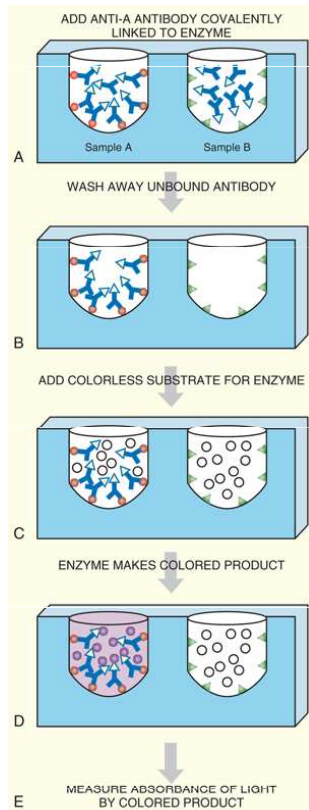
Monoklonální protilátky

- Protilátky nachází široké klinické využití
- Potřeba jedné specifické protilátky proti antigenu
- Jeden antigen má mnoho epitopů = polyklonální protilátky
- Polyklonální protilátky = směs protilátek s různou mírou specifity a vaznosti
- Monoklonální protilátka = jedna konkrétní protilátka z jedné B-buňky
- Životaschopnost B-buněk mimo organismus je velmi nízká = fúze s myelomovými buňkami
- Vzniklou buňku nazýváme hybridom = navždy živá buňka produkující cílenou protilátku

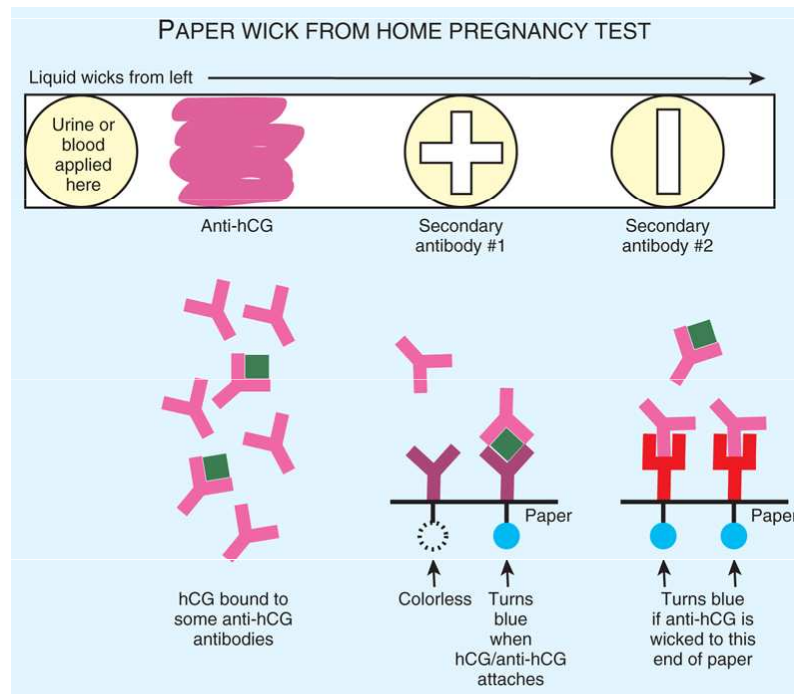


Využití protilátek

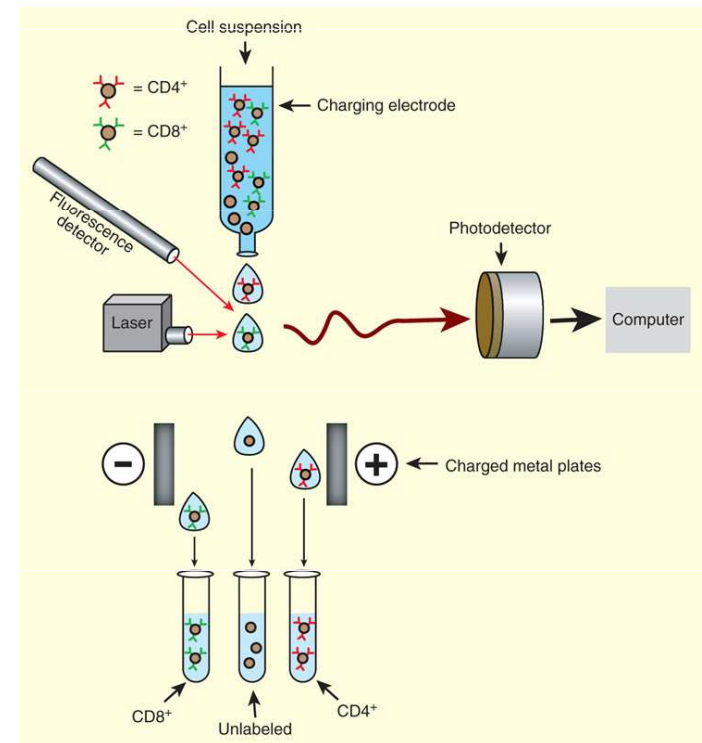
ELISA



Rychlé testy

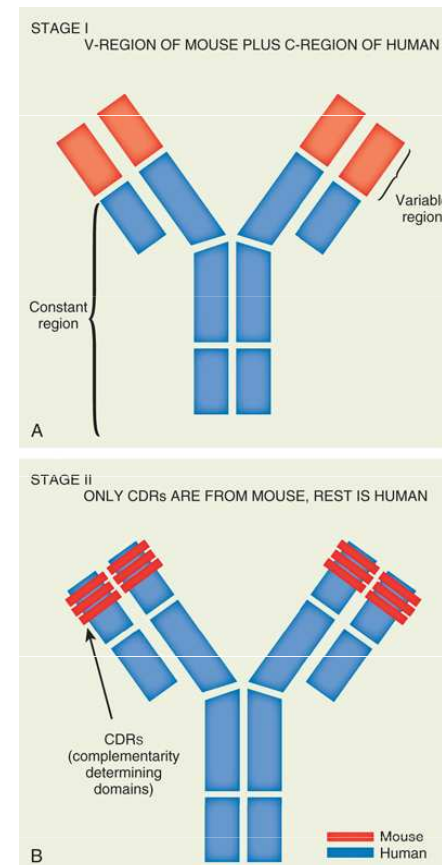


FACS (Fluorescence-activated cell sorting)



“Polidštění“ monoklonálních protilátek

- Lidský imunitní systém rozpoznává myší protilátky
- Několik řešení:
 - Nahrazení C-oblasti lidskou variantou protilátky
 - Nahrazení V-oblastí nezahrnutých v rozpoznání antigenu lidskou variantou
 - Complementarity Determining Region (CDR) – hypervariabilní oblast rozpoznávající Ag

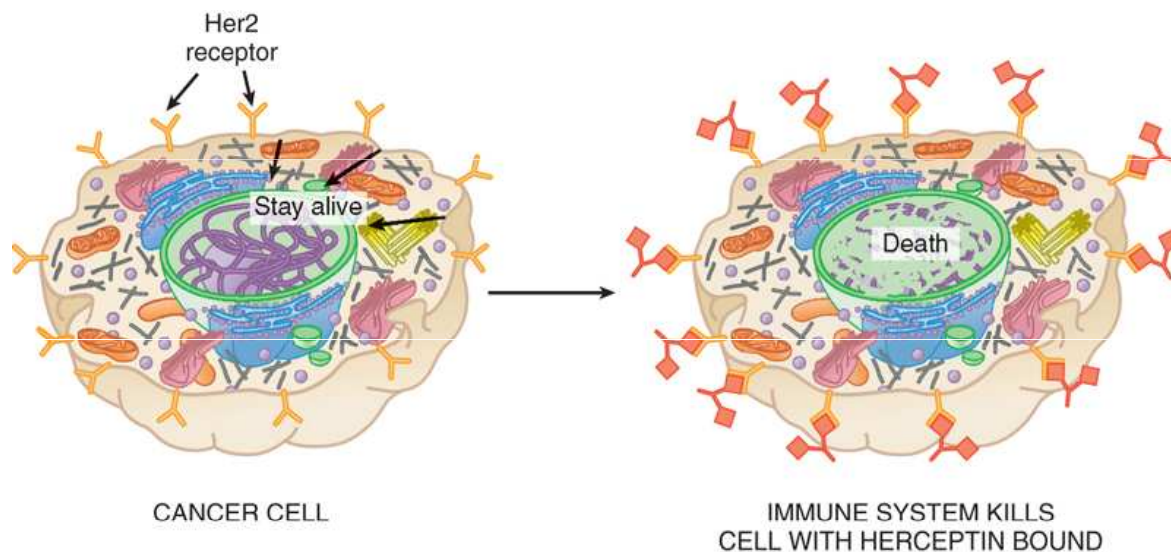


Names	Trade Names	Target	Antibody Format	Malignancy
Bevacizumab	Avastin	VEGF	Humanized IgG1	Glioblastoma, NSCLC, metastatic colon and kidney cancer
Cetuximab	Erbix	EGFR	Chimeric IgG1	Head and neck squamous cell carcinoma, mCRC
Cixutumumab	IMC-A12	IGF1R	Fully human IgG1	Thymic carcinoma, soft tissue sarcomas, osteosarcoma, breast cancer, Ewing's sarcoma
Panitumumab	Vectibix	EGFR	Fully human IgG1	Metastatic colon cancer
Pertuzumab	Perjeta	HER2	Humanized IgG1	Metastatic breast cancer
Ramucirumab	Cyramza	VEGFR2	Human IgG1	Gastric cancer
Trastuzumab	Hereceptin (Herclon)	HER2	Humanized IgG1	Breast cancer, gastric adenocarcinoma, gastroesophageal junction adenocarcinoma
Trastuzumab emtansine	Kadcyla	HER2	Humanized IgG1	Advanced breast cancer

VEGF: vascular endothelial growth factor, NSCLC: non-small cells lung carcinoma, EGFR: epidermal growth factor receptor, mCRC: metastatic colorectal carcinoma, IGF1R: insulin growth factor receptor, HER: human epidermal growth factor receptor, VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor.

Herceptin a Casirivimab

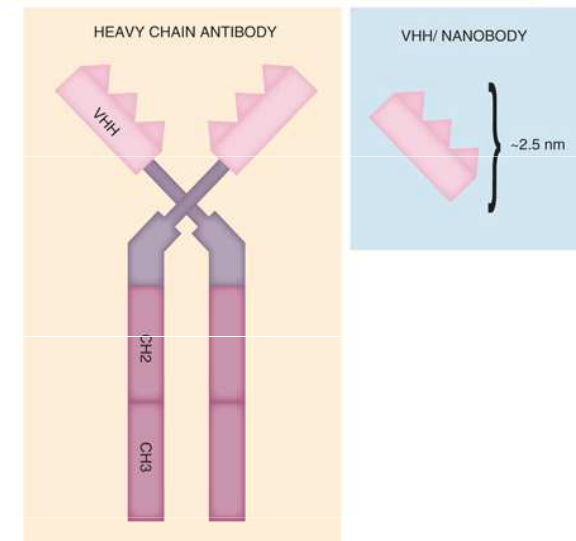
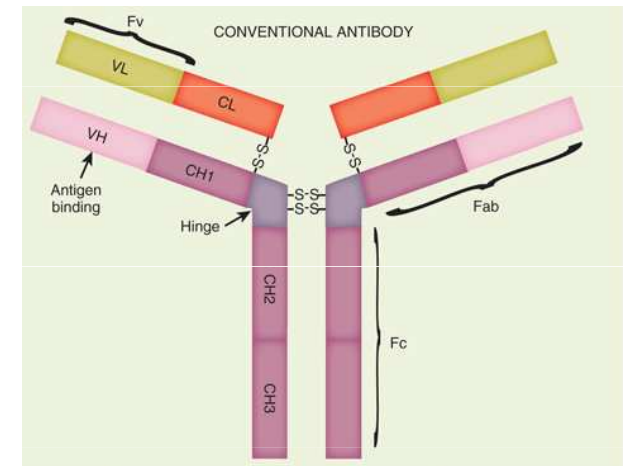
- Monoklonální protilátka rozpoznává receptor HER2 (epidermal growth factor receptor type 2)
- U pacientek s rakovinou prsu je nadprodukce HER2 spojená s rezistencí k chemoterapii
- Vazba protilátek na receptor brání jeho internalizace = lepší účinnost chemoterapie
- Casirivimab - monoklonální protilátky rozpoznávající spike protein koronaviru SARS-CoV-2



Nanobodies

- Protilátky velbloudů, alpak a lam mají pouze těžký řetězec (heavy-chain antibodies, hcAb)
- Antigen váže koncová variabilní oblast těžkého řetězce nazývaná VHH (12-15 kDa)
- Rekombinantní protilátky obsahující pouze tuto část nazýváme nanobodie (Nb)
- VHH oblast má velmi vysokou afinitu pro antigen
- Nanobodie dokáží přecházet do mozku

chromotek
new tools for better research
part of Proteintech Group

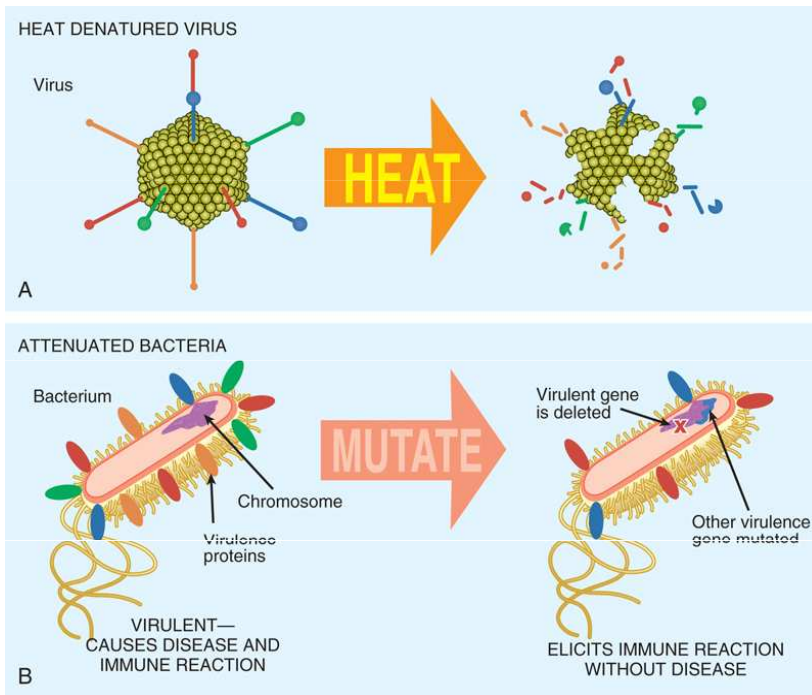


Vakcíny

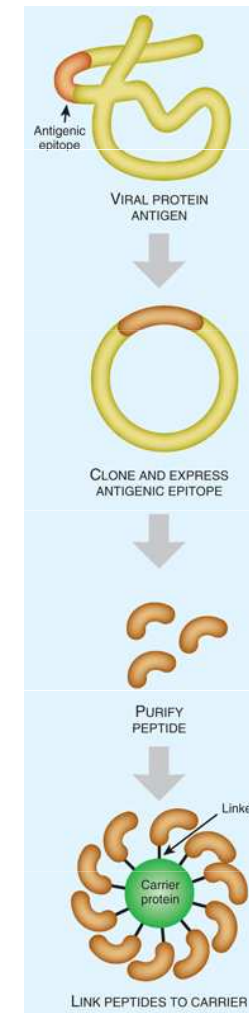
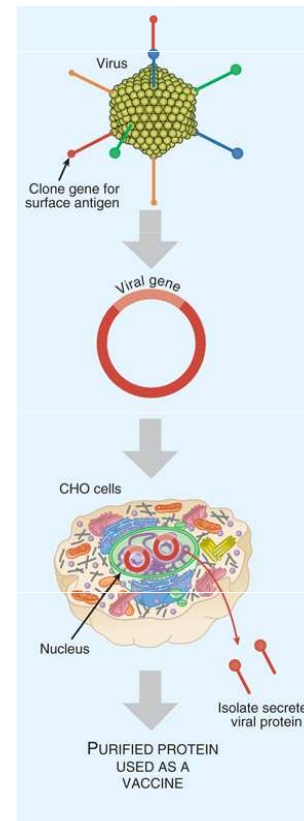
- Imunitní systém si pamatuje cizí antigeny – imunitní paměť
- Imunitní paměť zprostředkovávají speciální paměťové B-buňky
- Vakcíny se skládají z odvozených infekčních agens, které již nemohou způsobit onemocnění, ale jsou stále antigenní
- Vakcíny:
 - atenuované = stále živé patogeny, které však již neprodukují toxiny nebo proteiny způsobující onemocnění
 - podjednotkové = efektivní pouze proti jedné komponentě z patogenu, často nutné použití adjuvans
 - multivalentní = cílí na několik proteinů z jednoho nebo více virů
- Nejlepší imunitní odpověď je indukována většinou vakcínami z atenuovaných mikroorganismů

Vakcíny

Atenuované vakcíny



Subjednotkové vakcíny



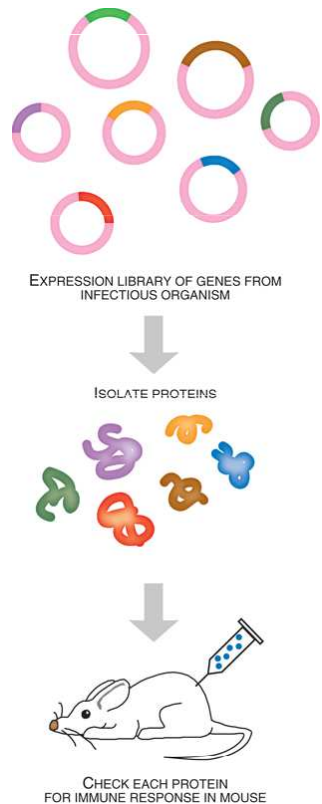
Hledání vhodných antigenů a adjuvans

- Reverzní vakcinologie = postupné klonování genů patogenu a exprese proteinů používaných pro imunizaci (vakcína pro *Neisserie meningitidis* séroskupina B)

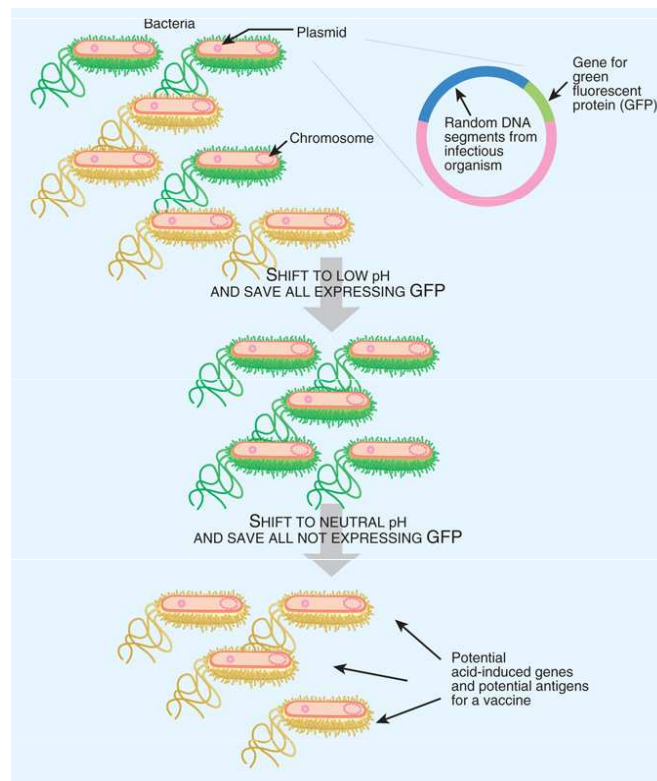
Adjuvant	Composition	Vaccines
Aluminum	One or more of the following: amorphous aluminum hydroxyphosphate sulfate (AAHS), aluminum hydroxide, aluminum phosphate, potassium aluminum sulfate (Alum)	Anthrax, DT, DTaP (Daptacel), DTaP (Infanrix), DTaP-IPV (Kinrix), DTaP-IPV (Quadacel), DTaP-HepB-IPV (Pediarix), DTaP –IPV/Hib (Pentacel), Hep A (Havrix), Hep A (Vaqta), Hep B (Engerix-B), Hep B (Recombivax), HepA/Hep B (Twinrix), HIB (PedvaxHIB), HPV (Gardasil 9), Japanese encephalitis (Ixiaro), MenB (Bexsero, Trumenba), Pneumococcal (Prevnar 13), Td (Tenivac), Td (Mass Biologics), Tdap (Adacel), Tdap (Boostrix)
AS04	Monophosphoryl lipid A (MPL) + aluminum salt	Cervarix
MF59	Oil in water emulsion composed of squalene	Fluad
AS01_B	Monophosphoryl lipid A (MPL) and QS-21, a natural compound extracted from the Chilean soapbark tree, combined in a liposomal formulation	Shingrix
CpG 1018	Cytosine phosphoguanine (CpG), a synthetic form of DNA that mimics bacterial and viral genetic material	Heplisav-B
No adjuvant		ActHIB, chickenpox, live zoster (Zostavax), measles, mumps & rubella (MMR), meningococcal (Menactra, Menveo), rotavirus, seasonal influenza (except Fluad), single antigen polio (IPOL), yellow fever

Hledání vhodných antigenů a adjuvans

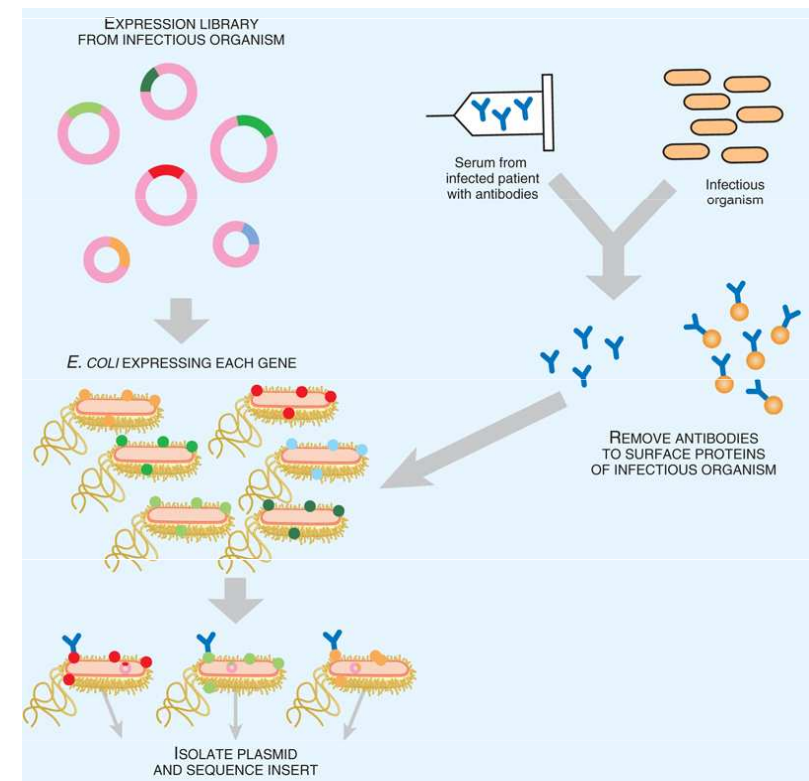
Reverzní vakcinologie



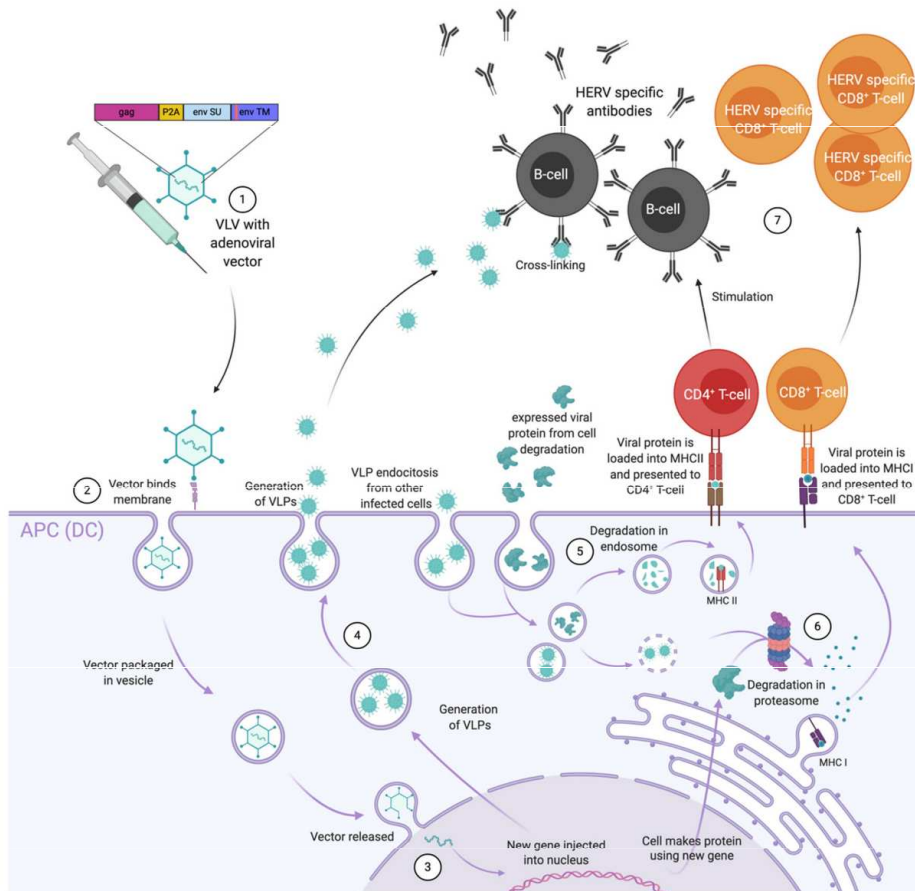
Diferenční fluorescenční indukce (DFI)



In Vivo indukovaná antigenní technologie (IVIAT)

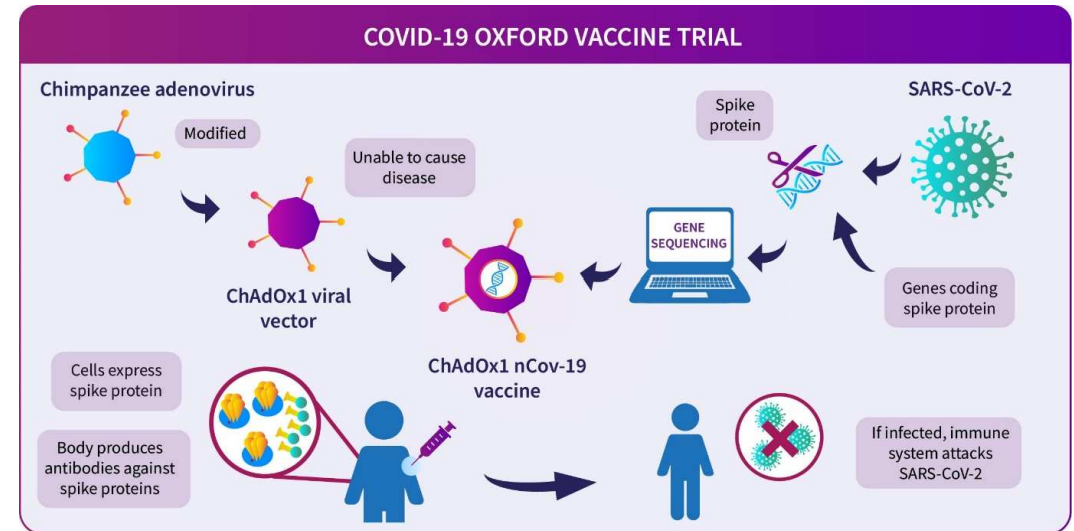


Adenovirové vakcíny



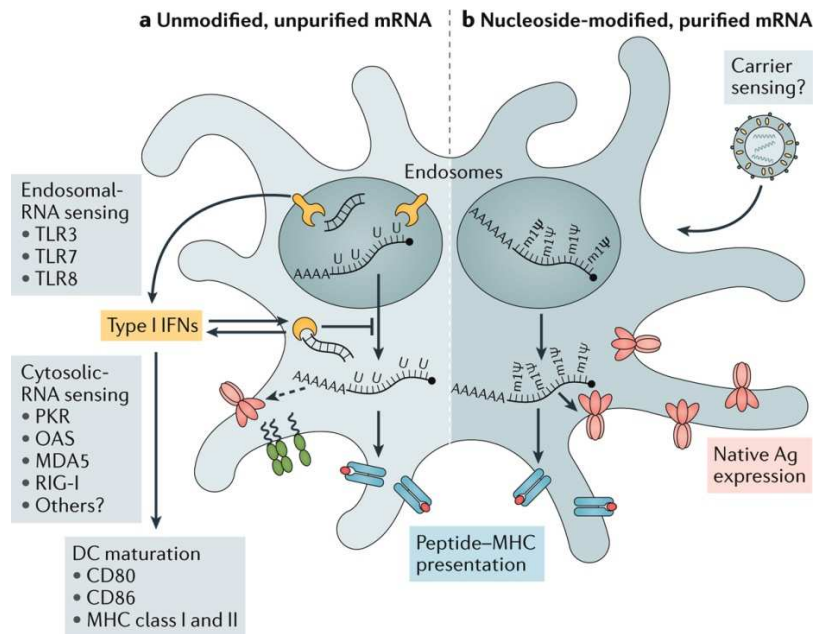
Bermejo et al, 2020

20 GENOVÉ TECHNOLOGIE – Technologie v imunologii

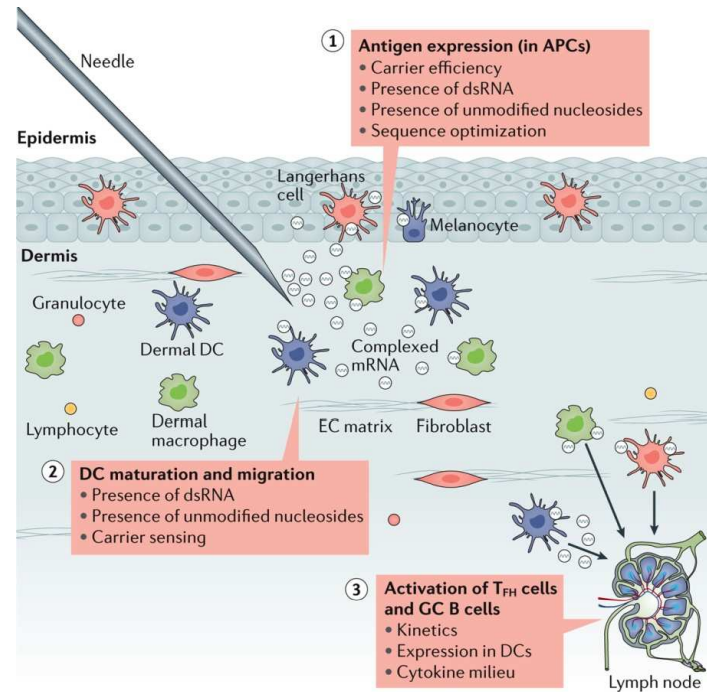


<https://sputnikvaccine.com/about-vaccine/>

mRNA vakcíny



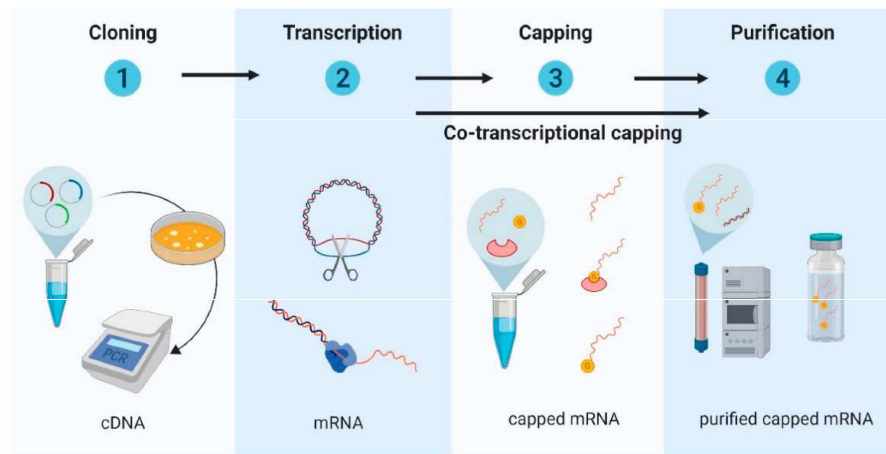
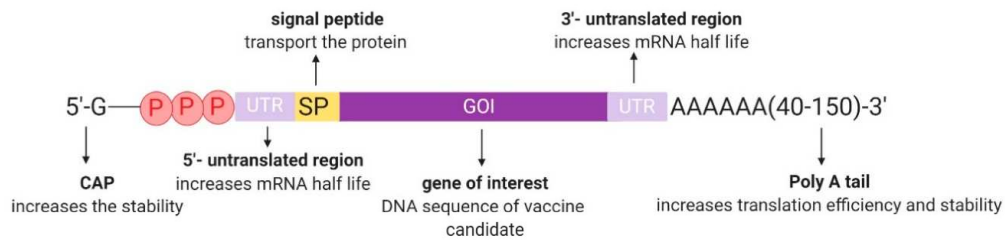
Nature Reviews | Drug Discovery



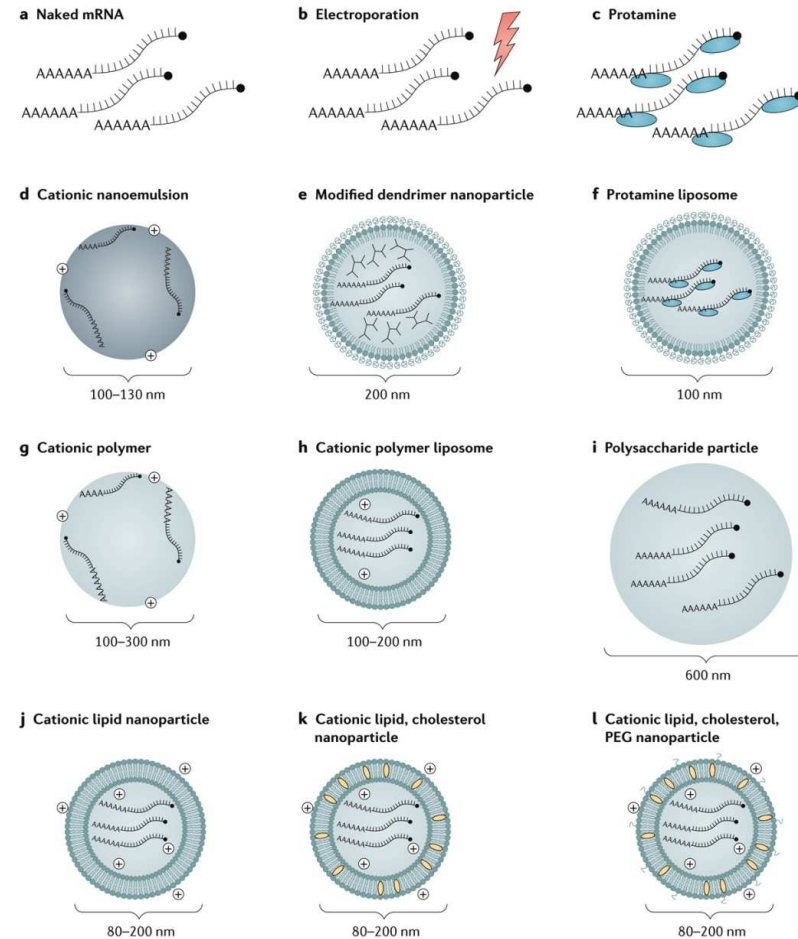
Nature Reviews | Drug Discovery

mRNA vakcíny

mRNA Construct



Versteeg et al, 2019



Nature Reviews | Drug Discovery

MUNI
SCI