

# GENOVÉ TECHNOLOGIE

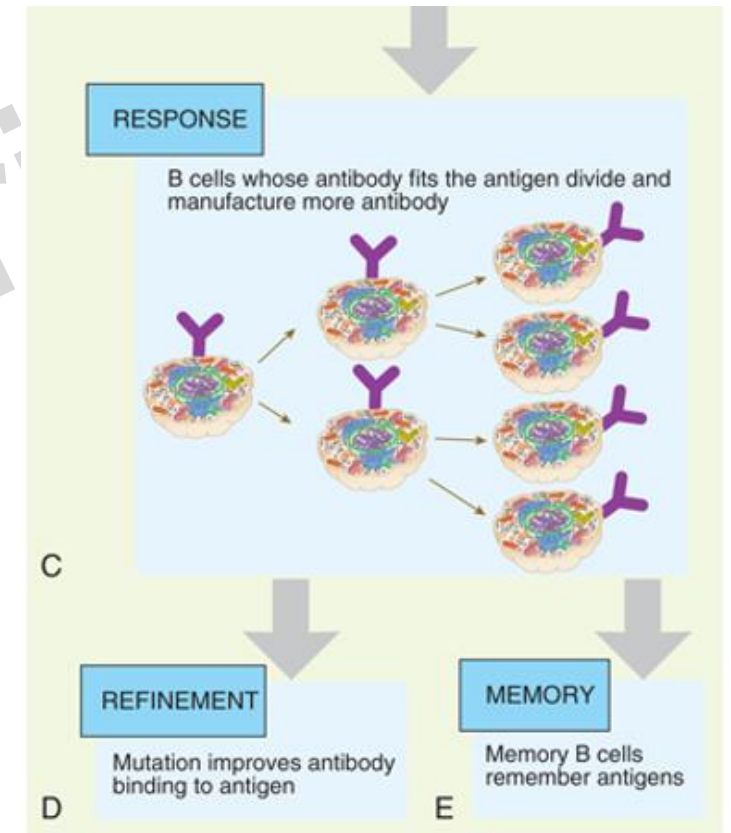
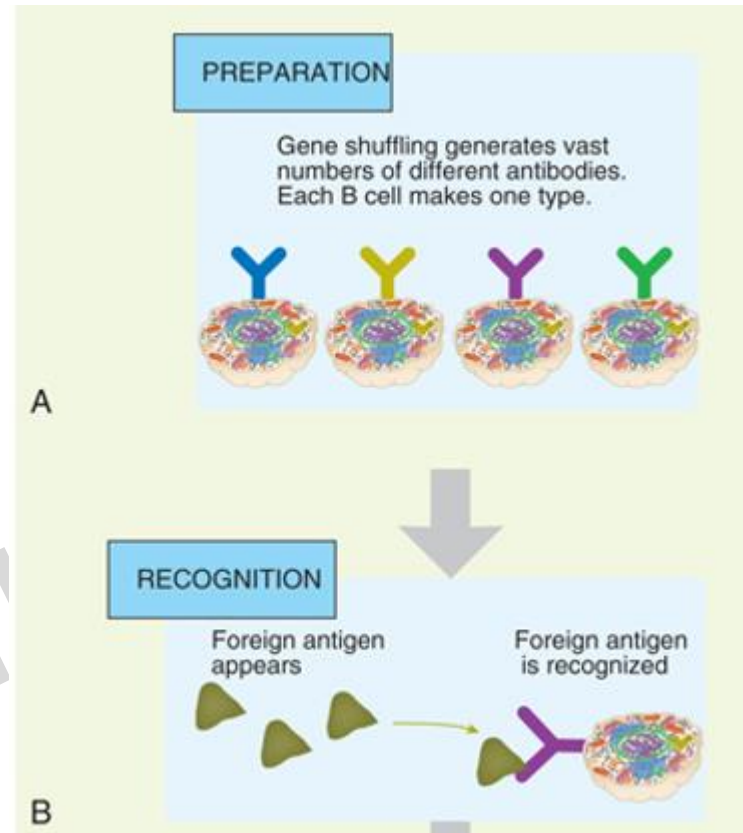
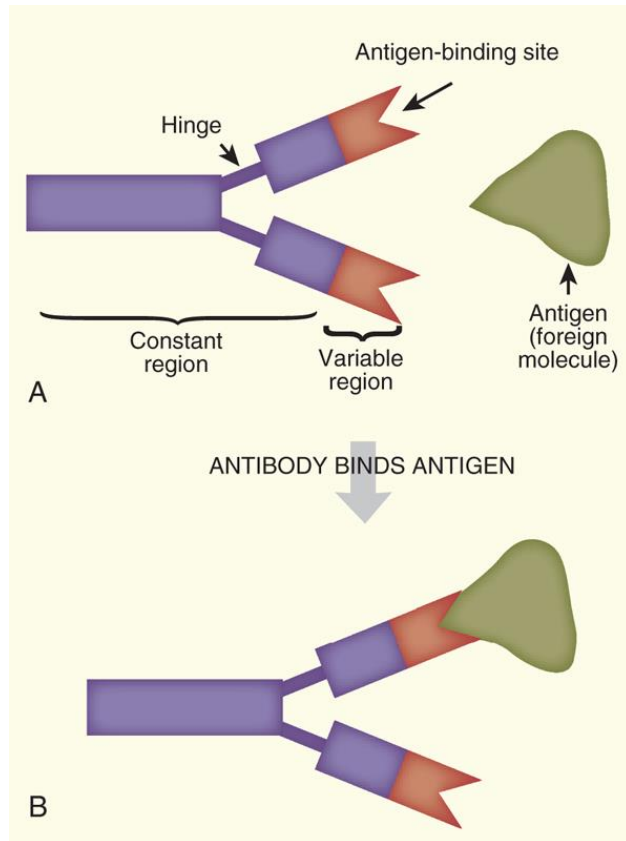
## Technologie v imunologii

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

# Úvod

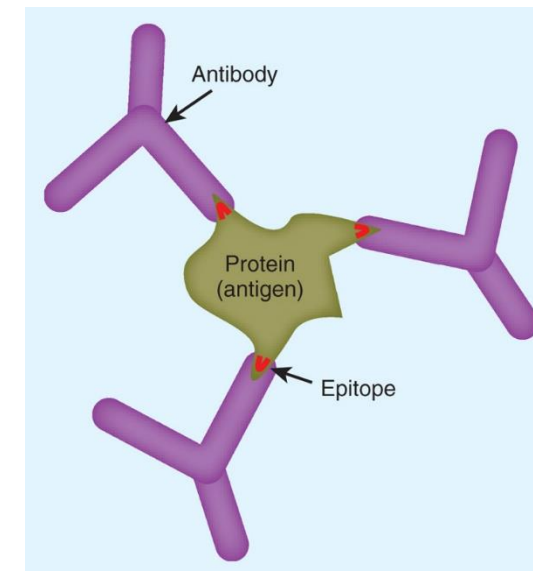
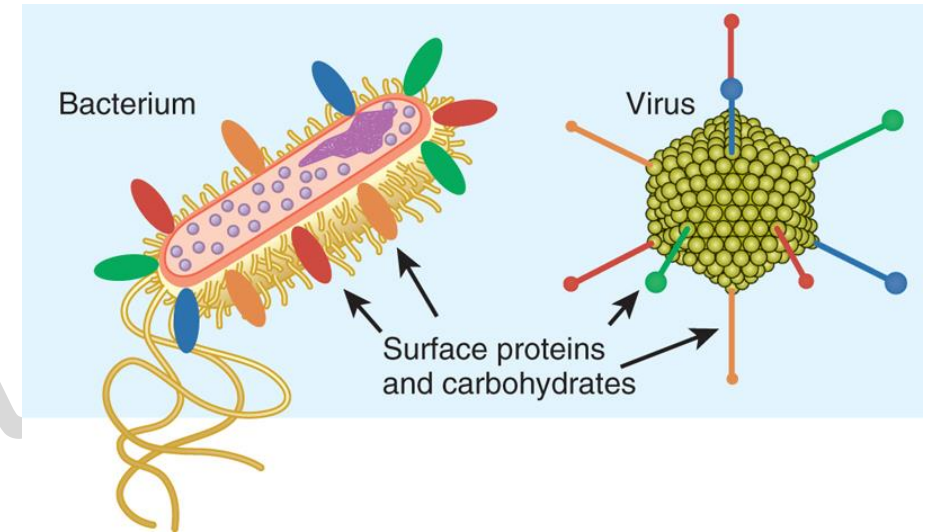
- Okolní prostředí je plné infekčních mikroorganismů a virů
- Ochrana organismu pomocí buněk imunitního systému
- Antigeny – většinou proteiny na povrchu mikroorganismů = aktivace imunitní reakce
- Protilátky – rozeznávají a váží se na antigeny = produkovány B-buňkami adaptivního imunitního systému
- 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

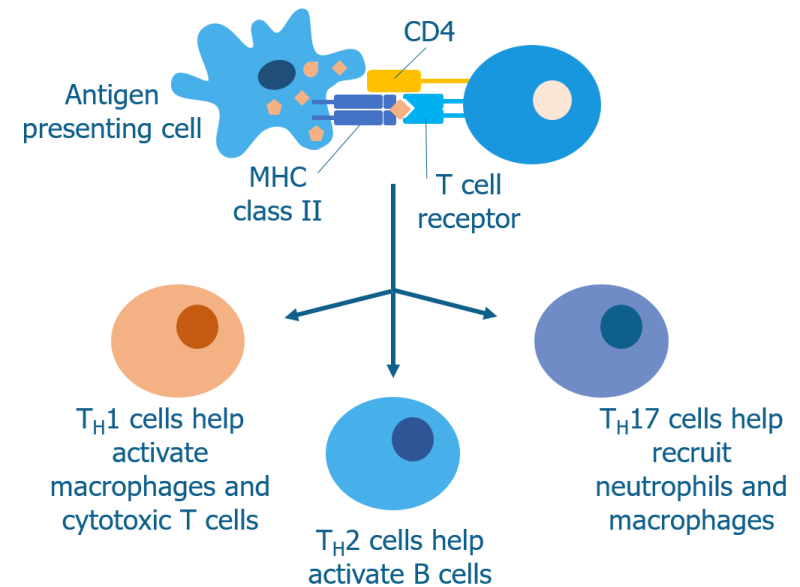
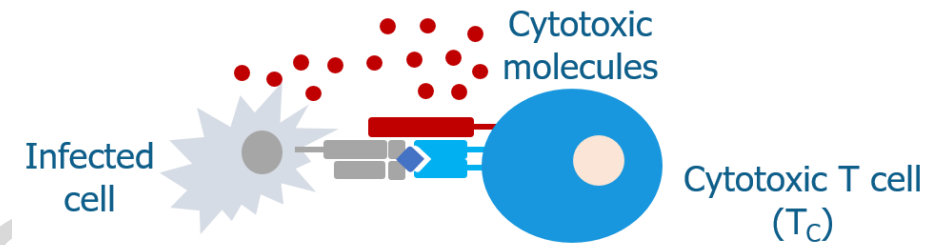
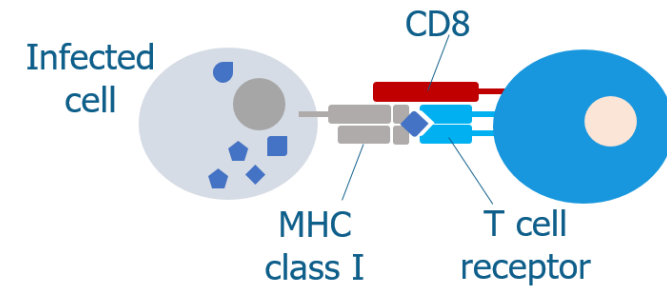
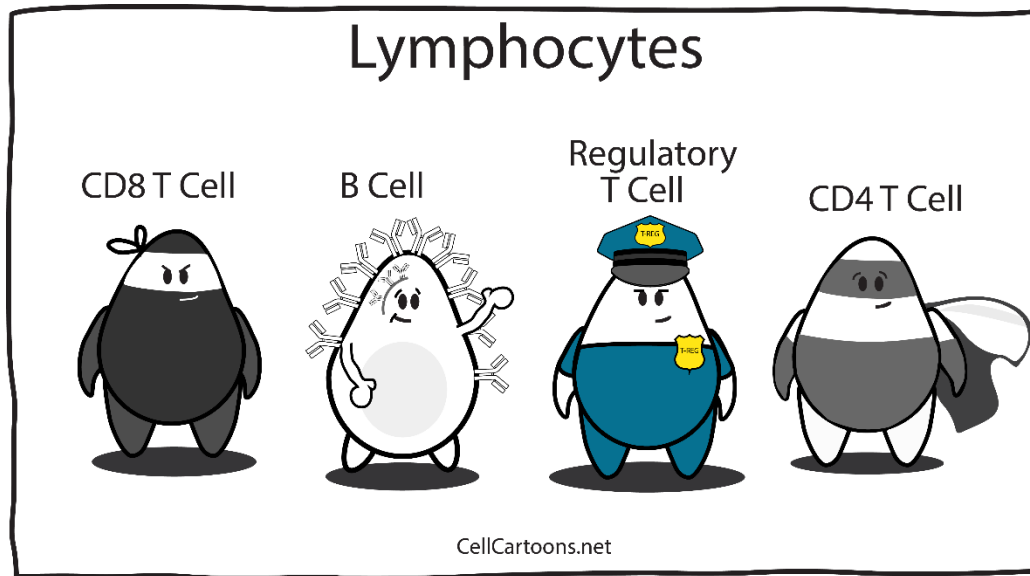
- Antigen – cizorodá molekula aktivující imunitní systém
- Nejsilnější imunitní reakce = glykoproteiny a lipoproteiny
- Velmi často slouží jako antigeny také polysacharidy obsažené na povrchu mikroorganismů
- Jako antigen může rovněž sloužit DNA
- Živočišný imunitní systém je založen na specifické (získané) 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

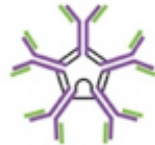




- rozpoznávají pouze antigeny exprimované na povrchu ostatních buněk, převážně makrofágů, buněk infikovaných viry nebo B-lymfocyty
- T-lymfocyty rozpoznávají tyto buňky skrze receptorové proteiny třídy I a II hlavních histo-kompatibilních komplexů (MHCs)
- Třída I aktivuje  $T_H$  buňky a třída II aktivuje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

# T-lymfocyty

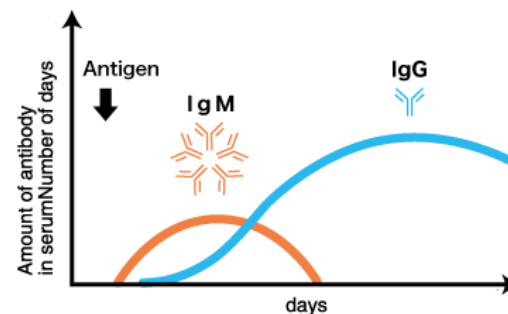


# Struktura a funkce imunoglobulinů

- Protilátky děleny do 5 základních tříd
- Nejabundantnější jsou IgG v séru
- Pouze IgG protilátky prochází přes placentu
- IgA – sekreční protilátky 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

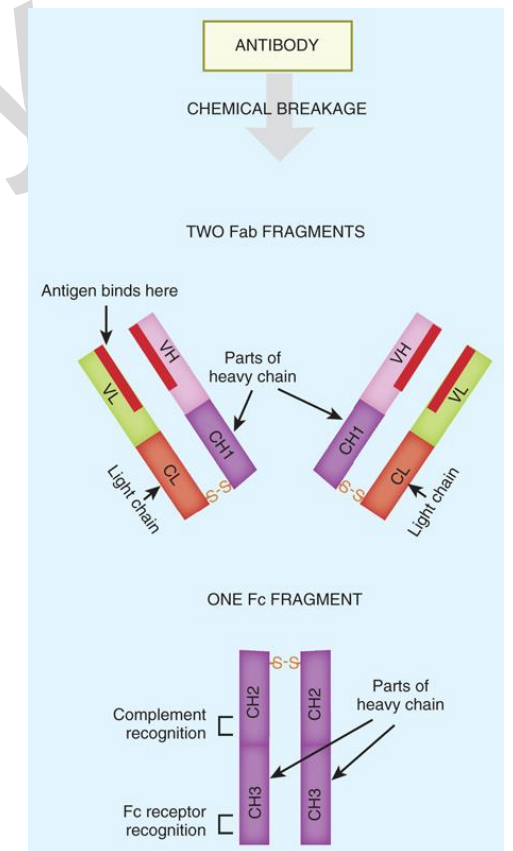
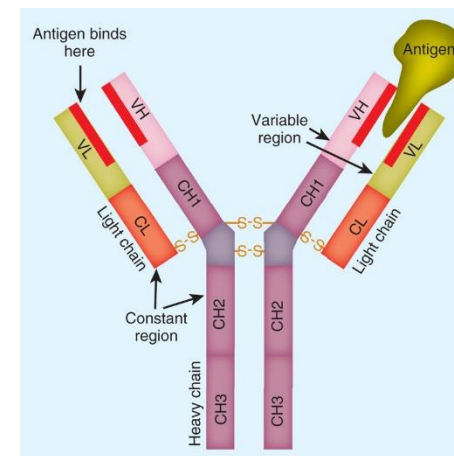
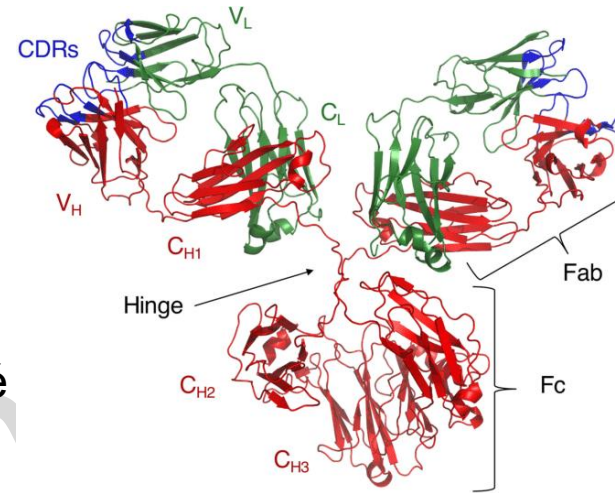
					
	IgM	IgG	IgA	IgE	IgD
<b>Heavy Chain</b>	μ (mu)	γ (gamma)	α (alpha)	ε (epsilon)	δ (delta)
<b>MW (Da)</b>	900k	150k	385k	200k	180k
<b>% of total antibody in serum</b>	6%	80%	13%	0.002%	1%
<b>Fixes complement</b>	Yes	Yes	No	No	No
<b>Function</b>	Primary response, fixes complement. Monomer serves as B-cell 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

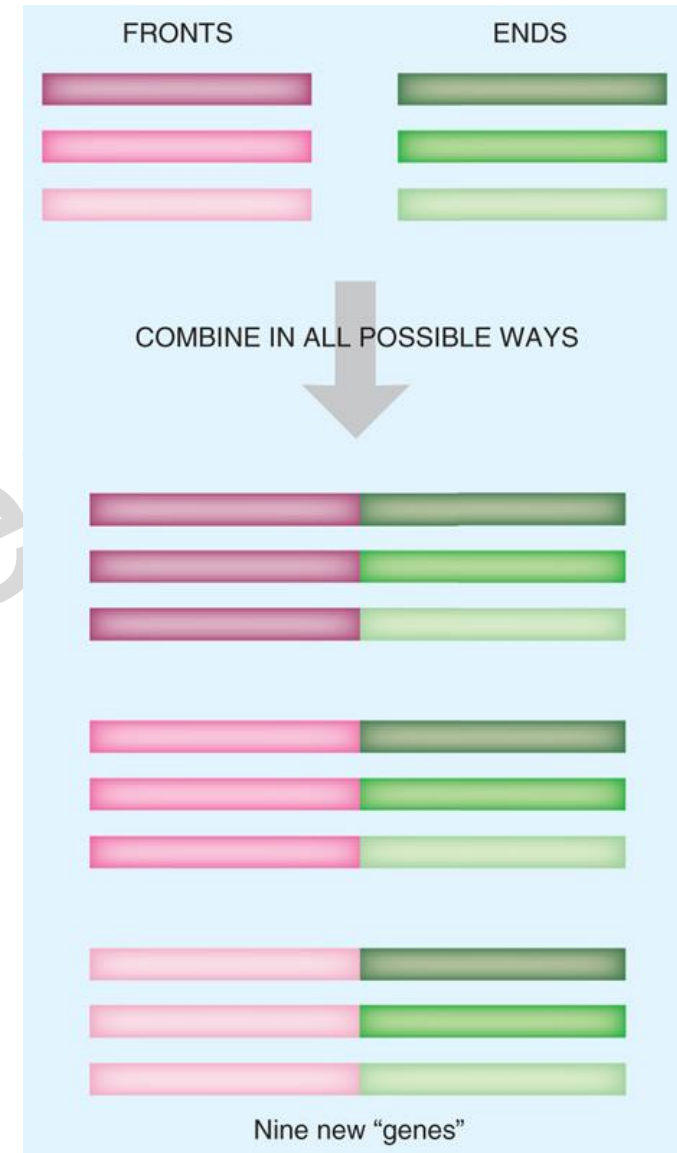
- IgG protilátka se skládá ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců
- Lehké řetězce kódovány jedním ze dvou genových lokusů  $\kappa$  nebo  $\lambda$
- Každý z lehkých a těžkých řetězců se skládá z jedné až čtyřech konstantních oblastí a jedné variabilní
- Variabilní oblasti tvoří tzv. paratop – vazba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





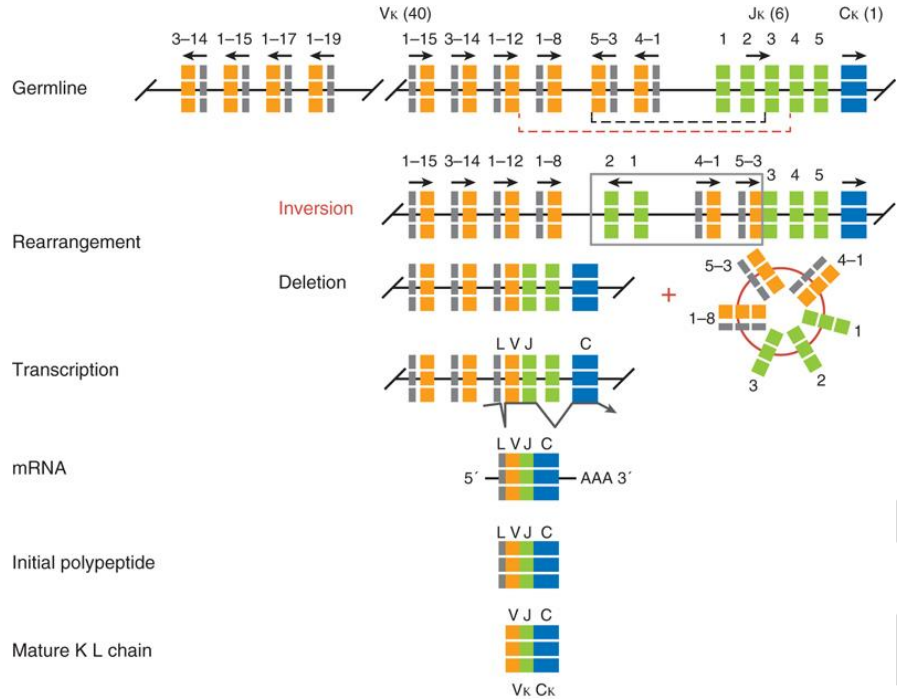
# Diverzita protilátek

- 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 miliónů 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

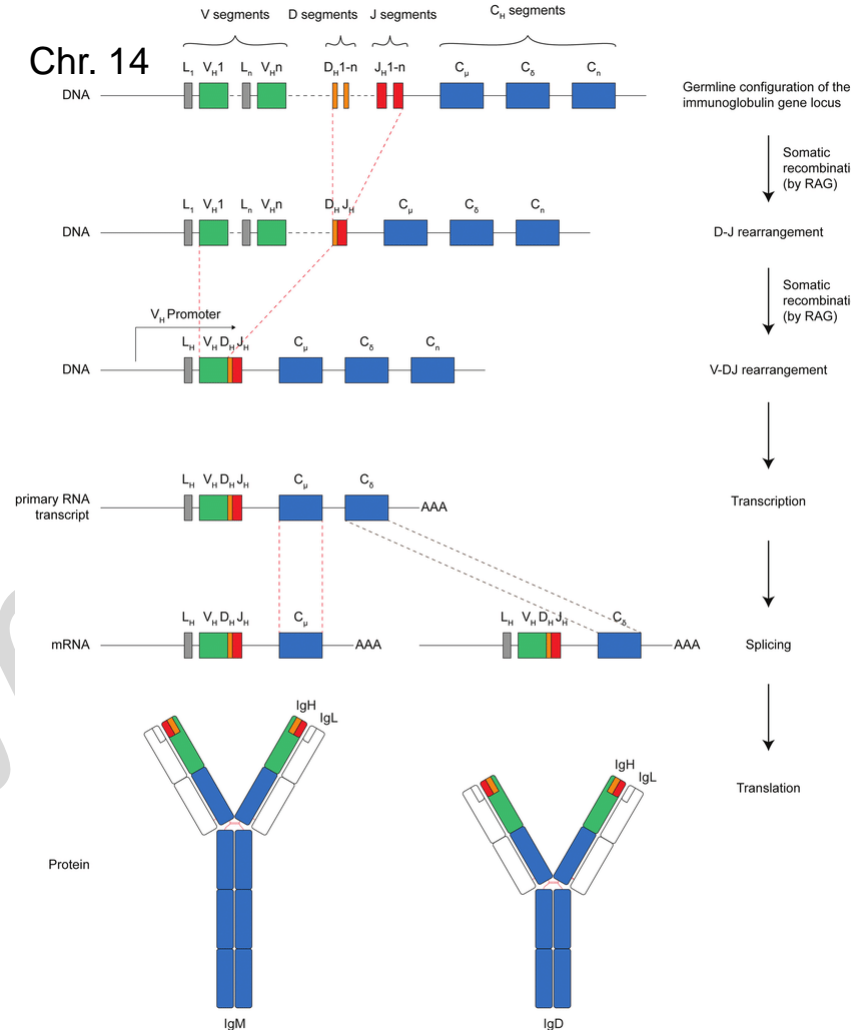


# V(D)J rekombinace

Chr. 2



Chr. 14



Germline configuration of the immunoglobulin gene locus

Somatic recombination (by RAG)

D-J rearrangement

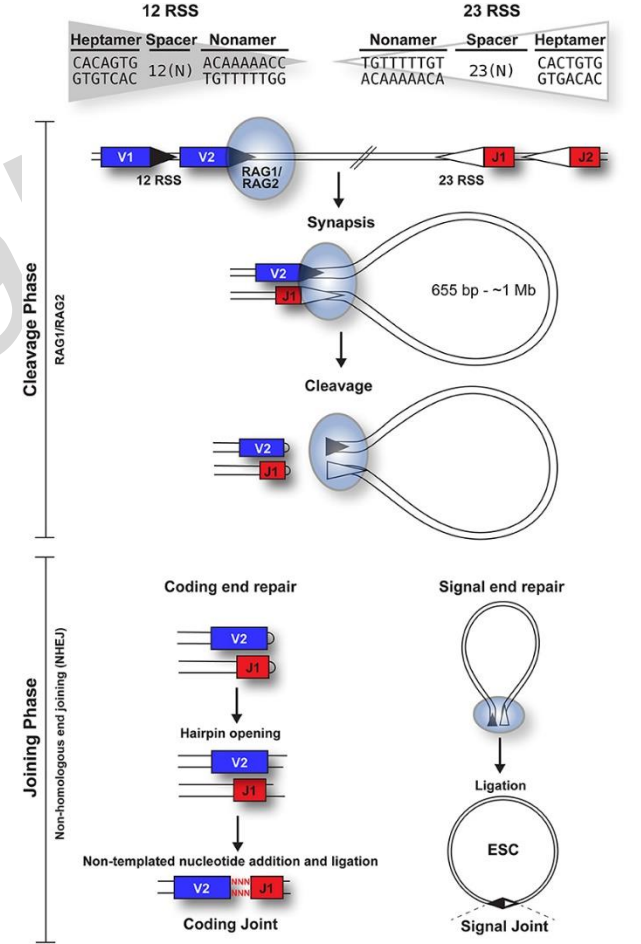
Somatic recombination (by RAG)

V-DJ rearrangement

Transcription

Splicing

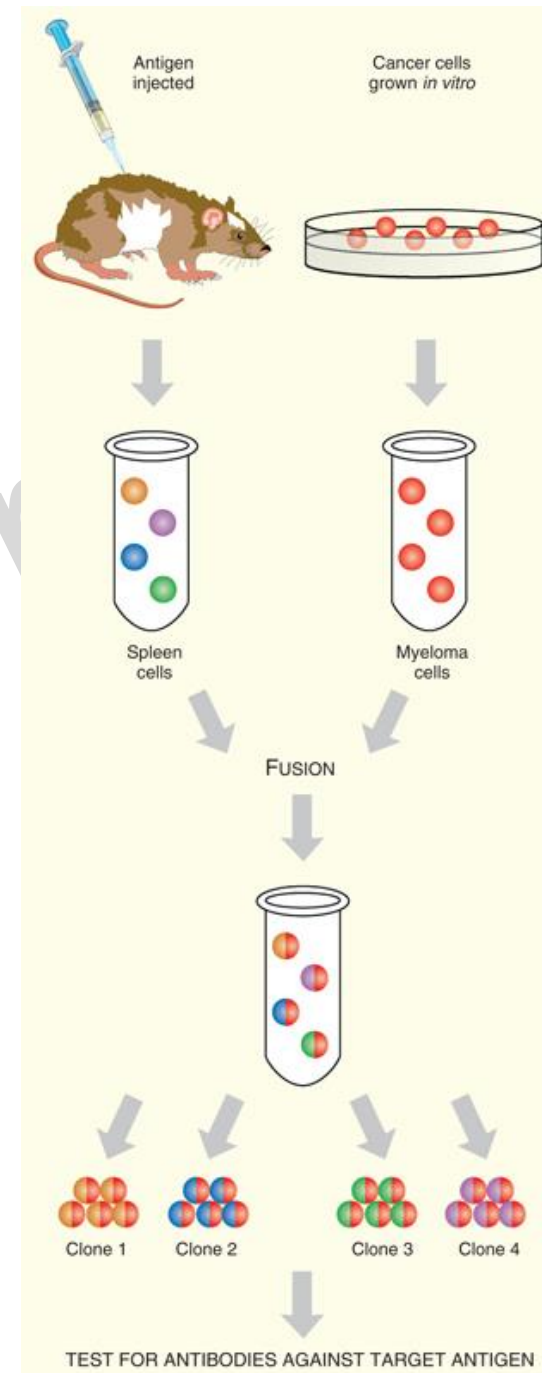
Translation



Smith et al. 2019

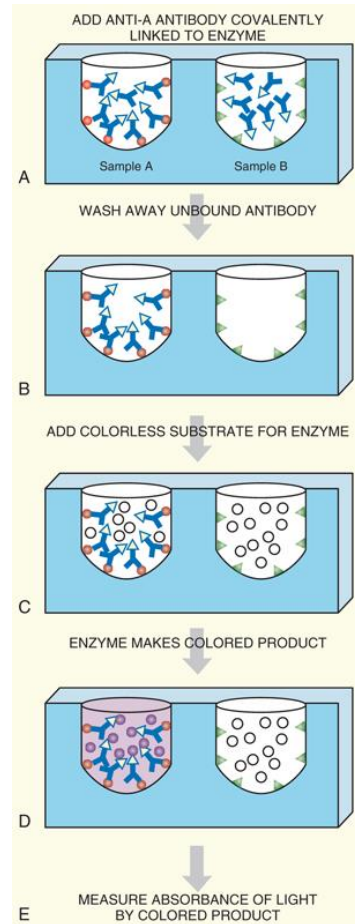
# Monoklonální protilátky

- 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

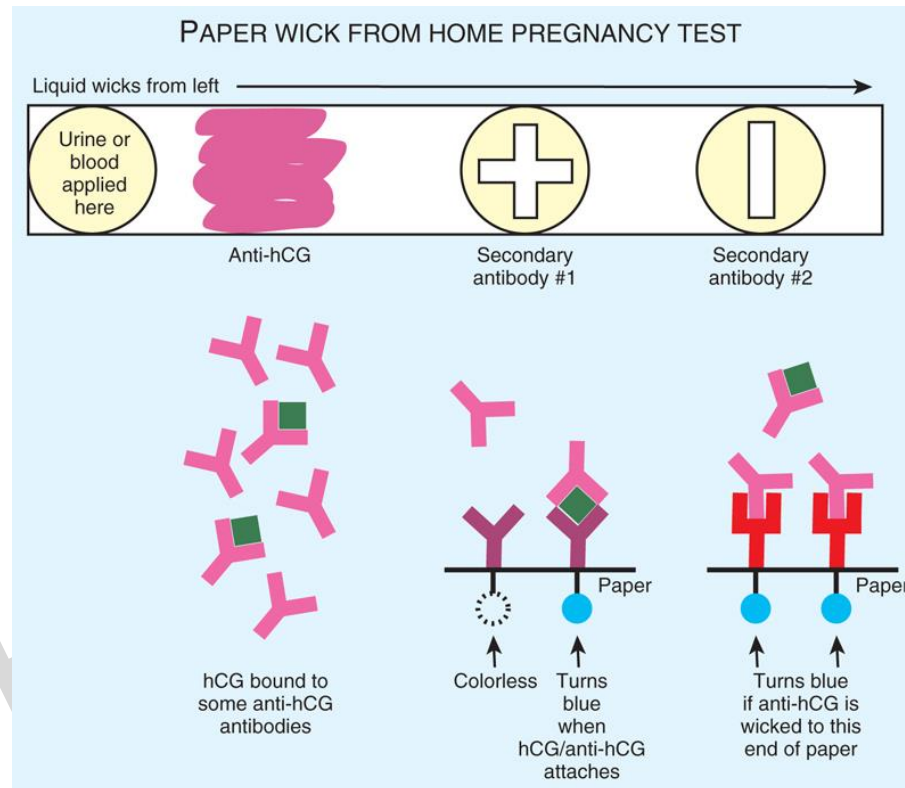


# Využití protilátek

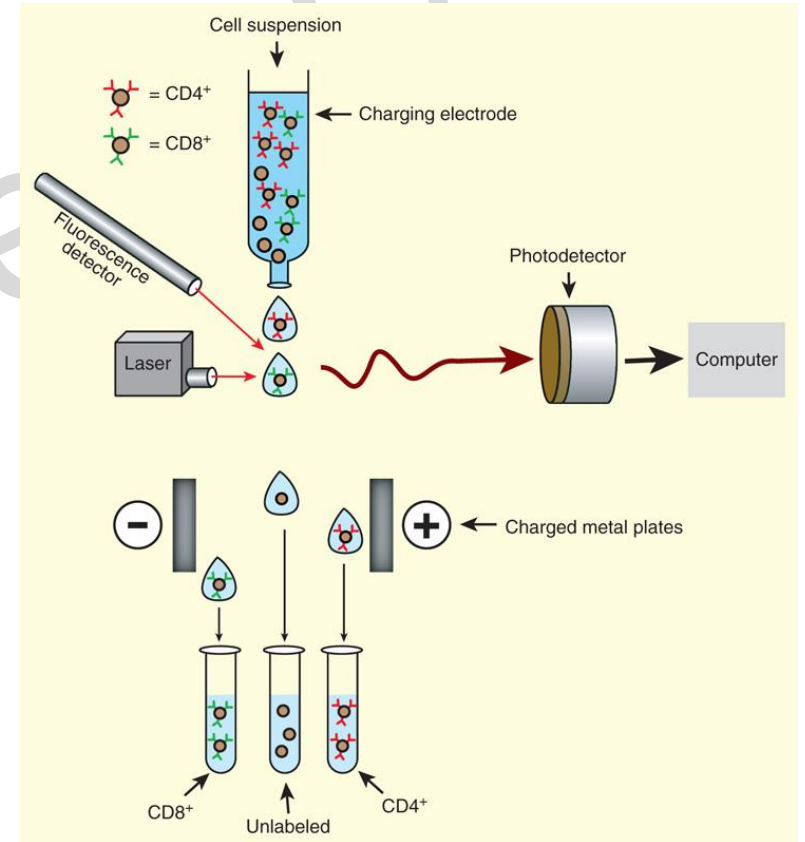
## ELISA



## Rychlé testy

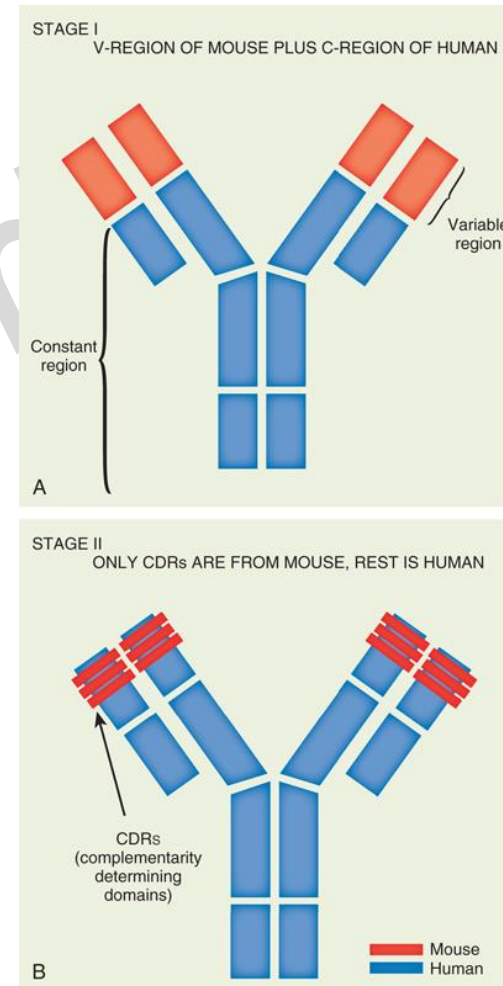


## FACS (Fluorescence-activated cell sorting)



# “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

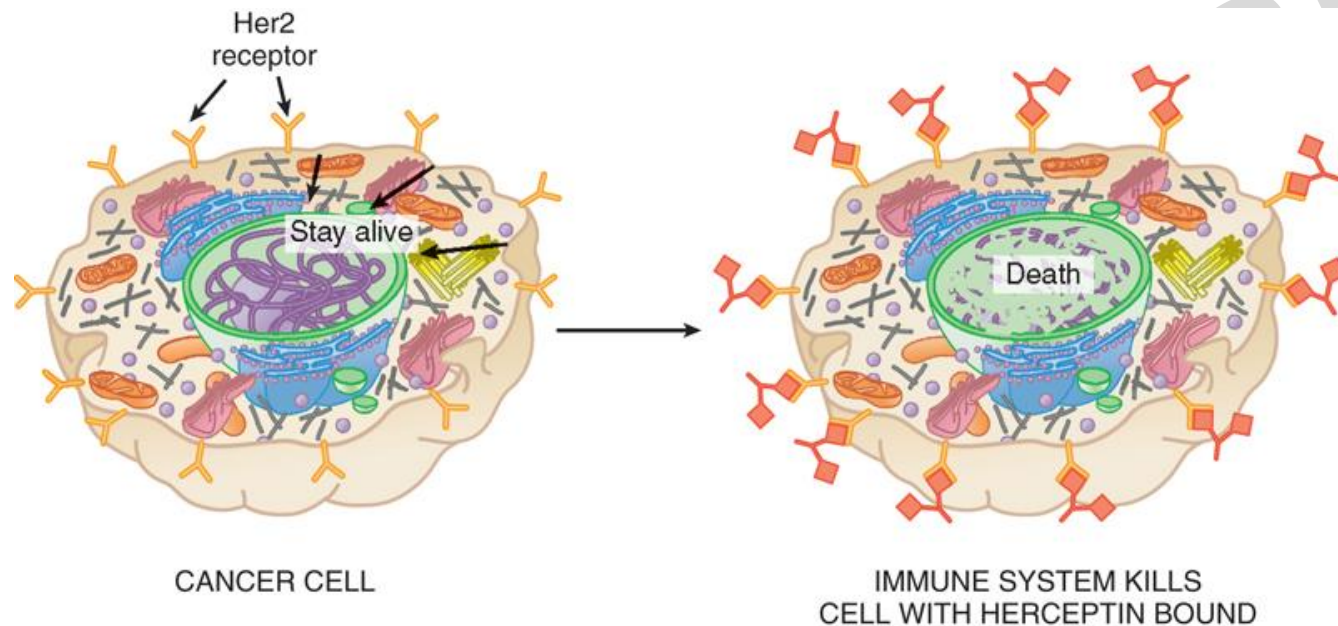


Names	Trade Names	Target	Antibody Format	Malignancy
<b>Bevacizumab</b>	Avastin	VEGF	Humanized IgG1	Glioblastoma, NSCLC, metastatic colon and kidney cancer
<b>Cetuximab</b>	Erbix	EGFR	Chimeric IgG1	Head and neck squamous cell carcinoma, mCRC
<b>Cixutumumab</b>	IMC-A12	IGF1R	Fully human IgG1	Thymic carcinoma,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

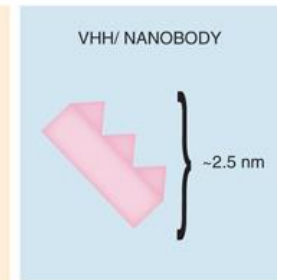
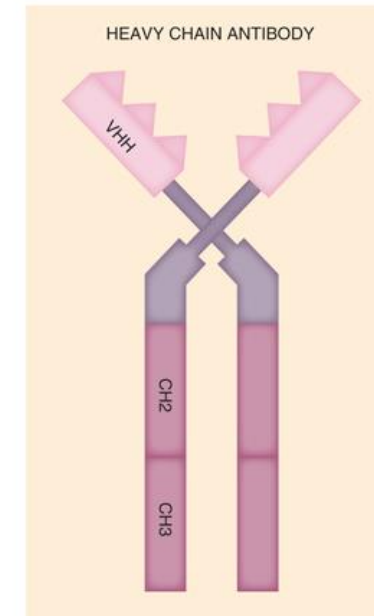
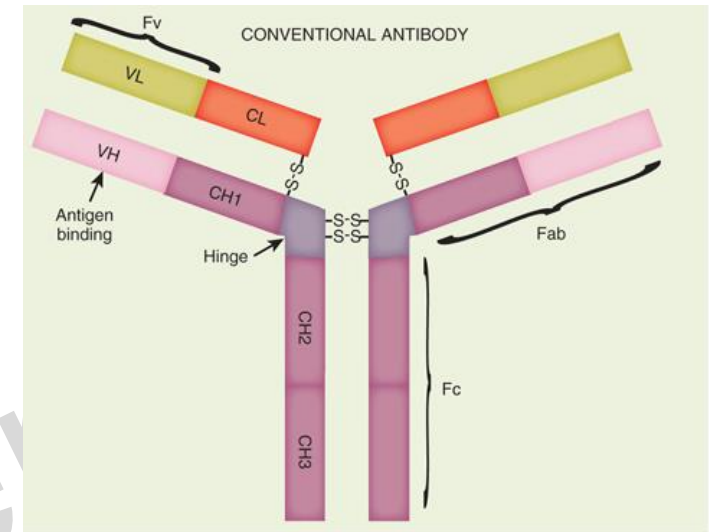
- Monoklonální protilátka rozpoznává receptor HER2 (epidermal growth factor receptor type 2)
- U pacientek s rakovinou prsu je nadprodukce HER2 spojená s rezistencí k chemoterapii
- Vazba protilátek na receptor brání jeho internalizace = lepší účinnost chemoterapie
- Casirivimab - monoklonální protilátky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

**γchromotek**  
new tools for better research  
part of Proteintech Group



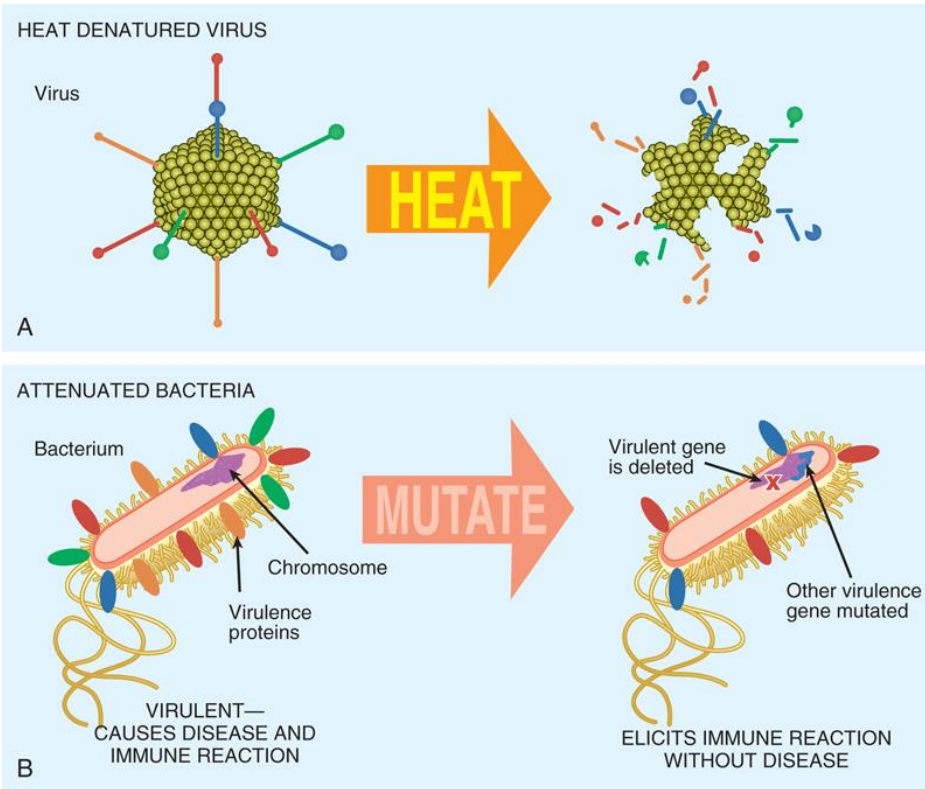
# Vakcíny

- 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

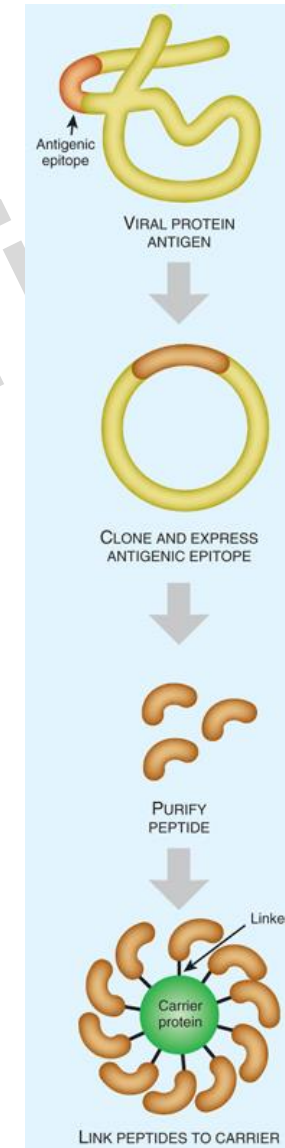
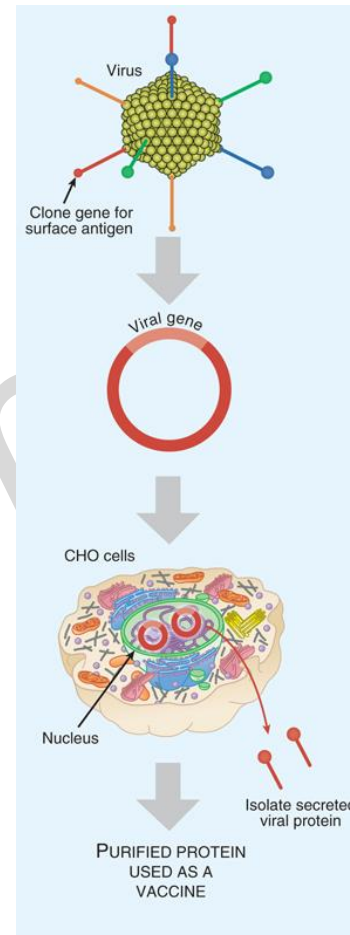


# Vakcíny

## Atenuované vakcíny



## Subjednotkové vakcíny



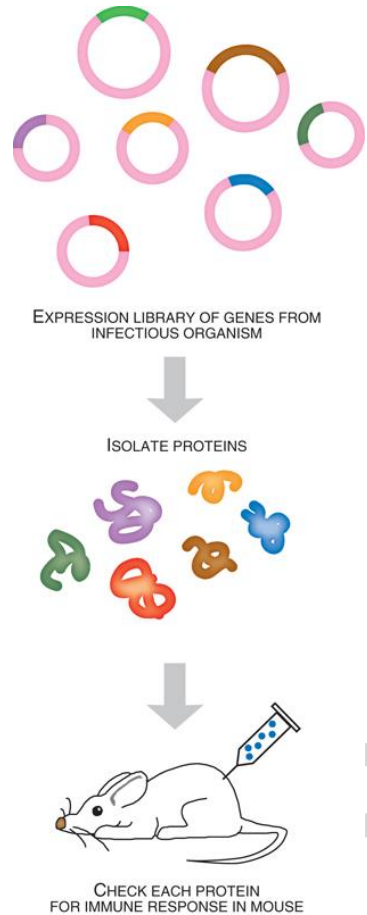
# Hledání vhodných antigenů a adjuvans

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

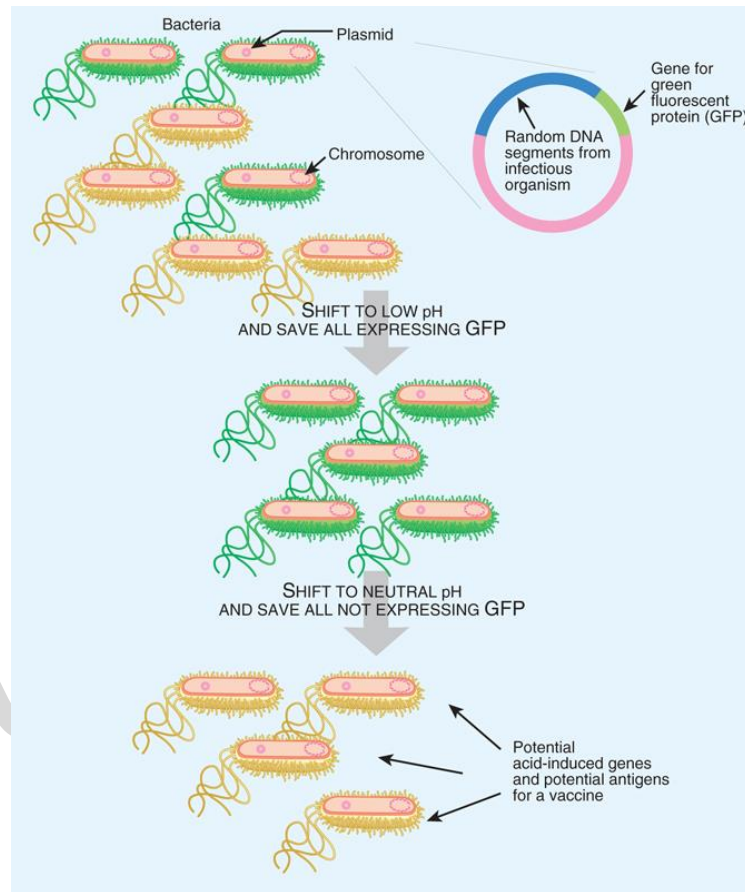
Adjuvant	Composition	Vaccines
<a href="#">Aluminum</a>	One or more of the following: amorphous aluminum hydroxyphosphate sulfate (AAHS), aluminum hydroxide, aluminum phosphate, potassium aluminum sulfate (Alum)	Anthrax, DT, DTaP (Daptacel), DTaP (Infanrix), DTaP-IPV (Kinrix), DTaP-IPV (Quadacel), DTaP-HepB-IPV (Pediatrix), 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 (Pneumovax 13), Td (Tenivac), Td (Mass Biologics), Tdap (Adacel), Tdap (Boostrix)
<a href="#">AS04</a>	Monophosphoryl lipid A (MPL) + aluminum salt	Cervarix
<a href="#">MF59</a>	Oil in water emulsion composed of squalene	Fluad
<a href="#">AS01B</a>	Monophosphoryl lipid A (MPL) and QS-21, a natural compound extracted from the Chilean soapbark tree, combined in a liposomal formulation	Shingrix
<a href="#">CpG 1018</a>	Cytosine phosphoguanine (CpG), a synthetic form of DNA that mimics bacterial and viral genetic material	Hepelisav-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

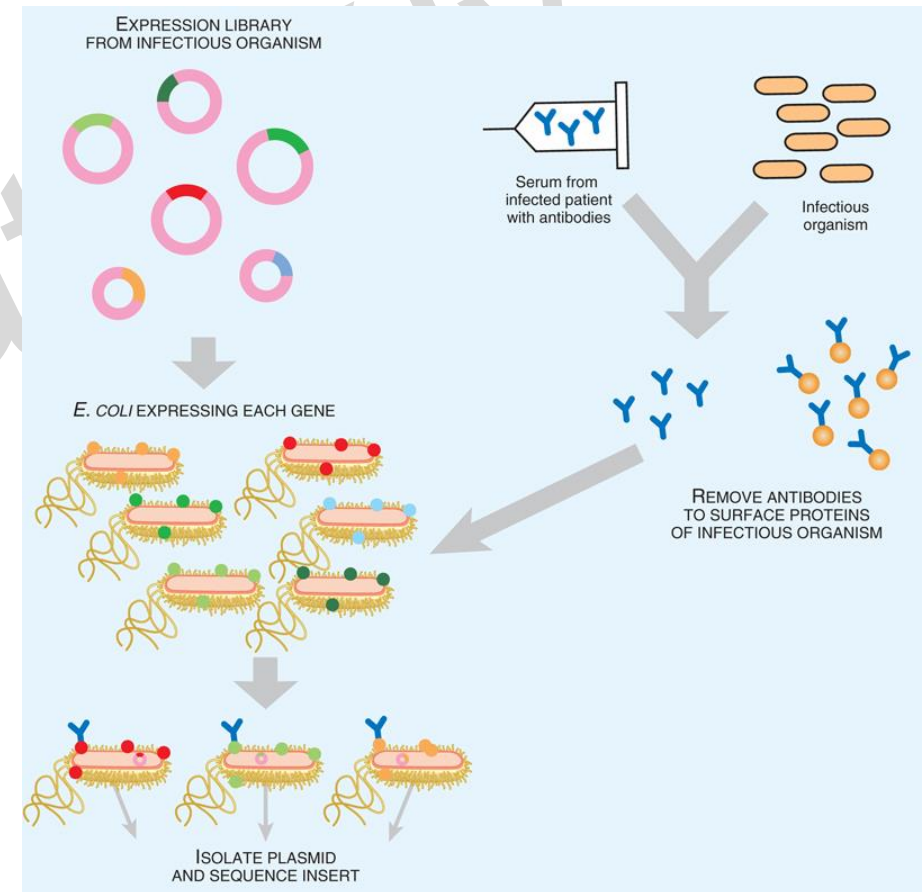
Reverzní vakcinologie



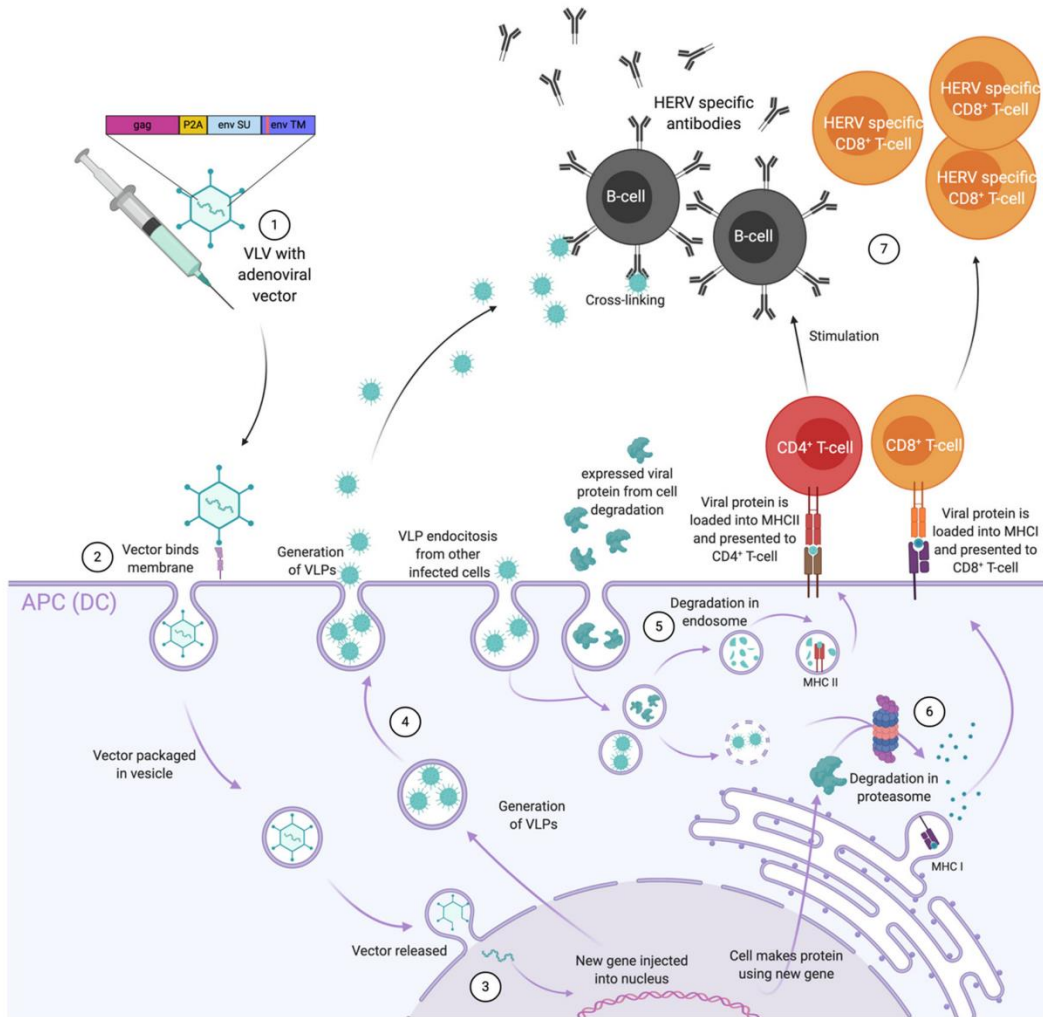
Diferenční fluorescenční indukce (DFI)



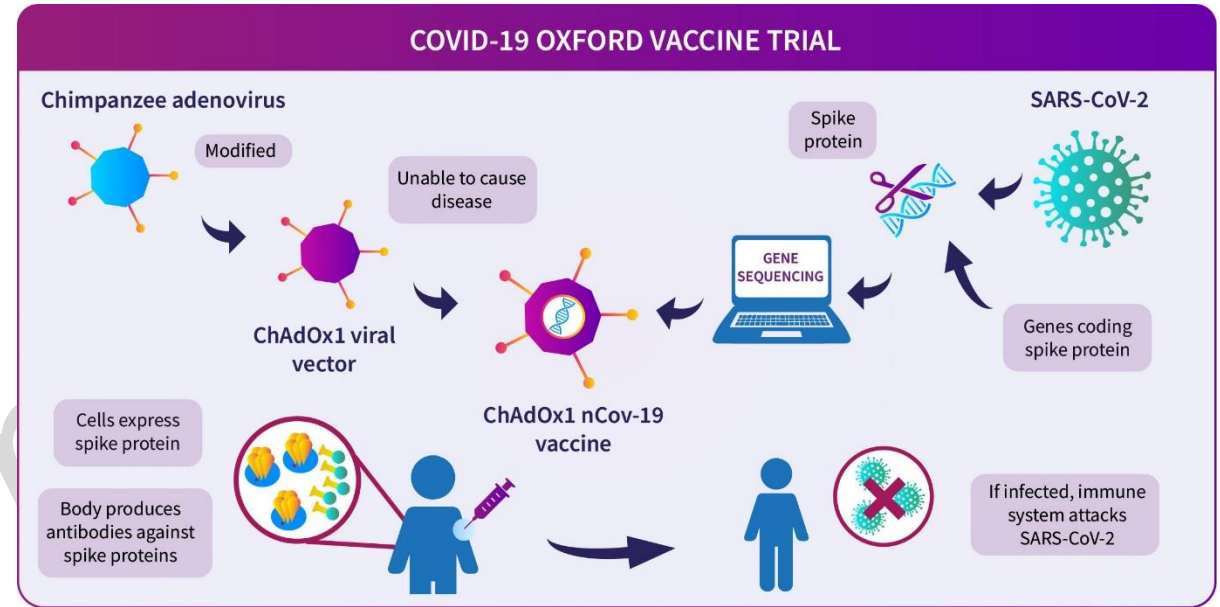
In Vivo indukovaná antigenní technologie (IVIAT)



# Adenovirové vakcíny

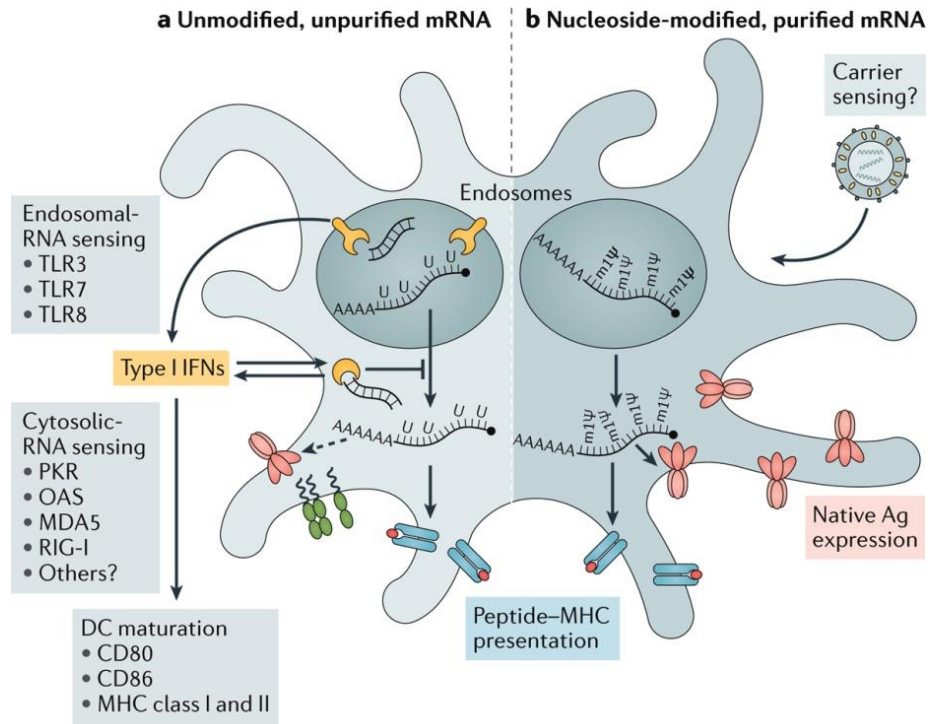


Bermejo et al, 2020

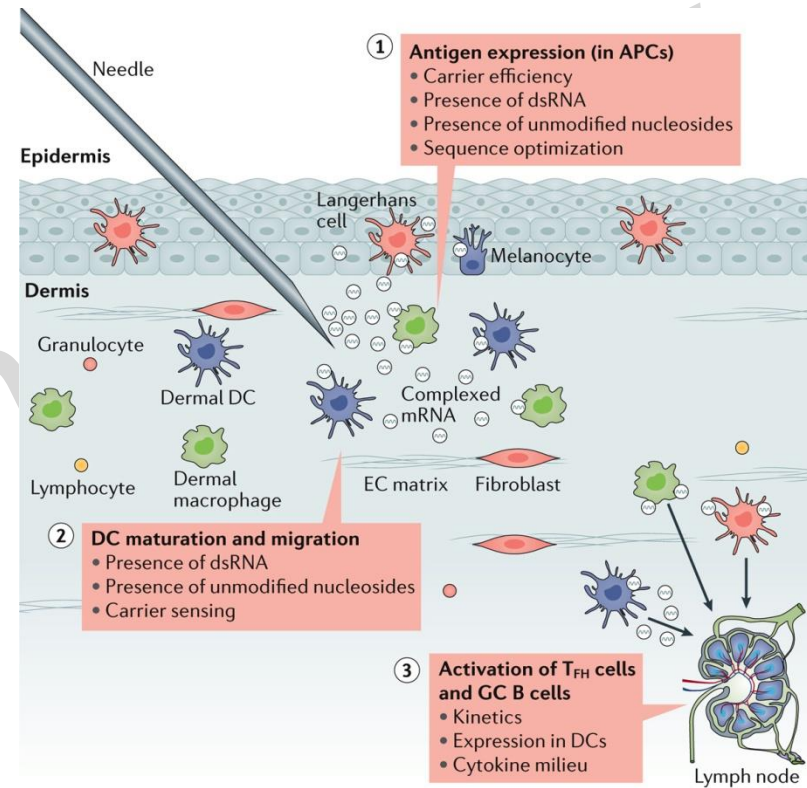


<https://sputnikvaccine.com/about-vaccine/>

# mRNA vakcíny



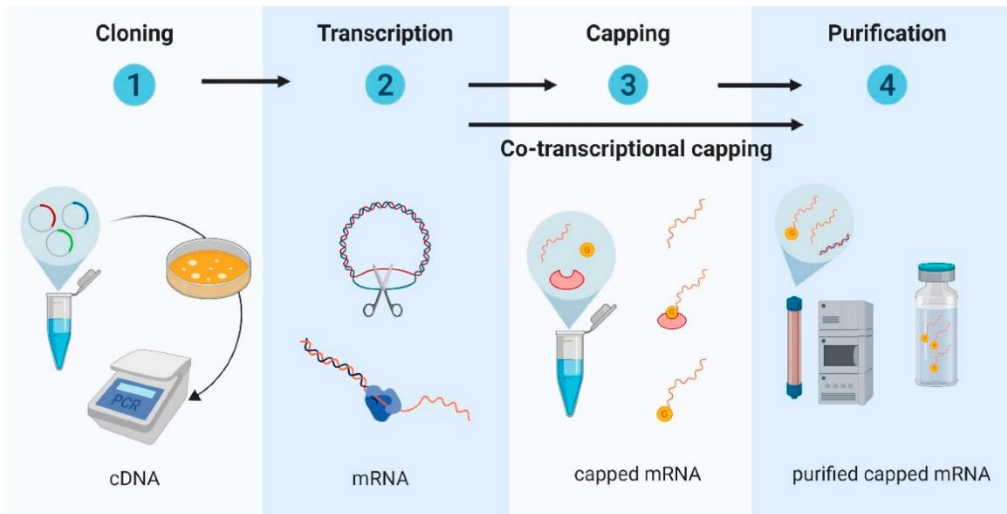
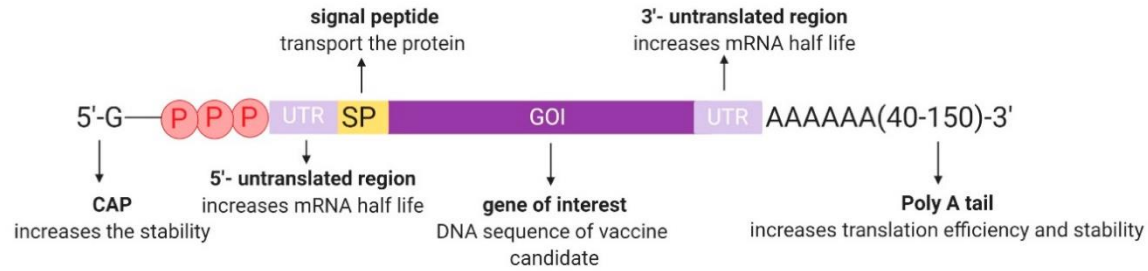
Nature Reviews | Drug Discovery



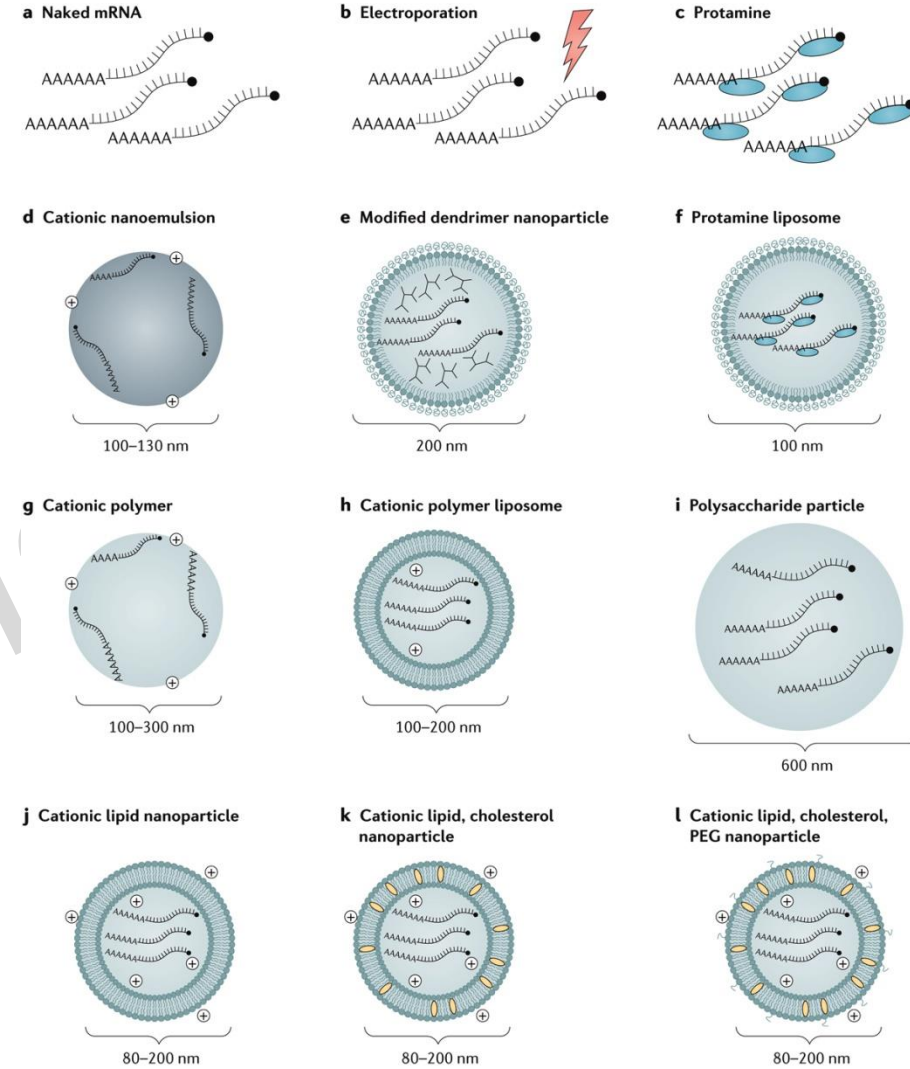
Nature Reviews | Drug Discovery

# mRNA vakcíny

## mRNA Construct



Versteeg et al, 2019



Nature Reviews | Drug Discovery