

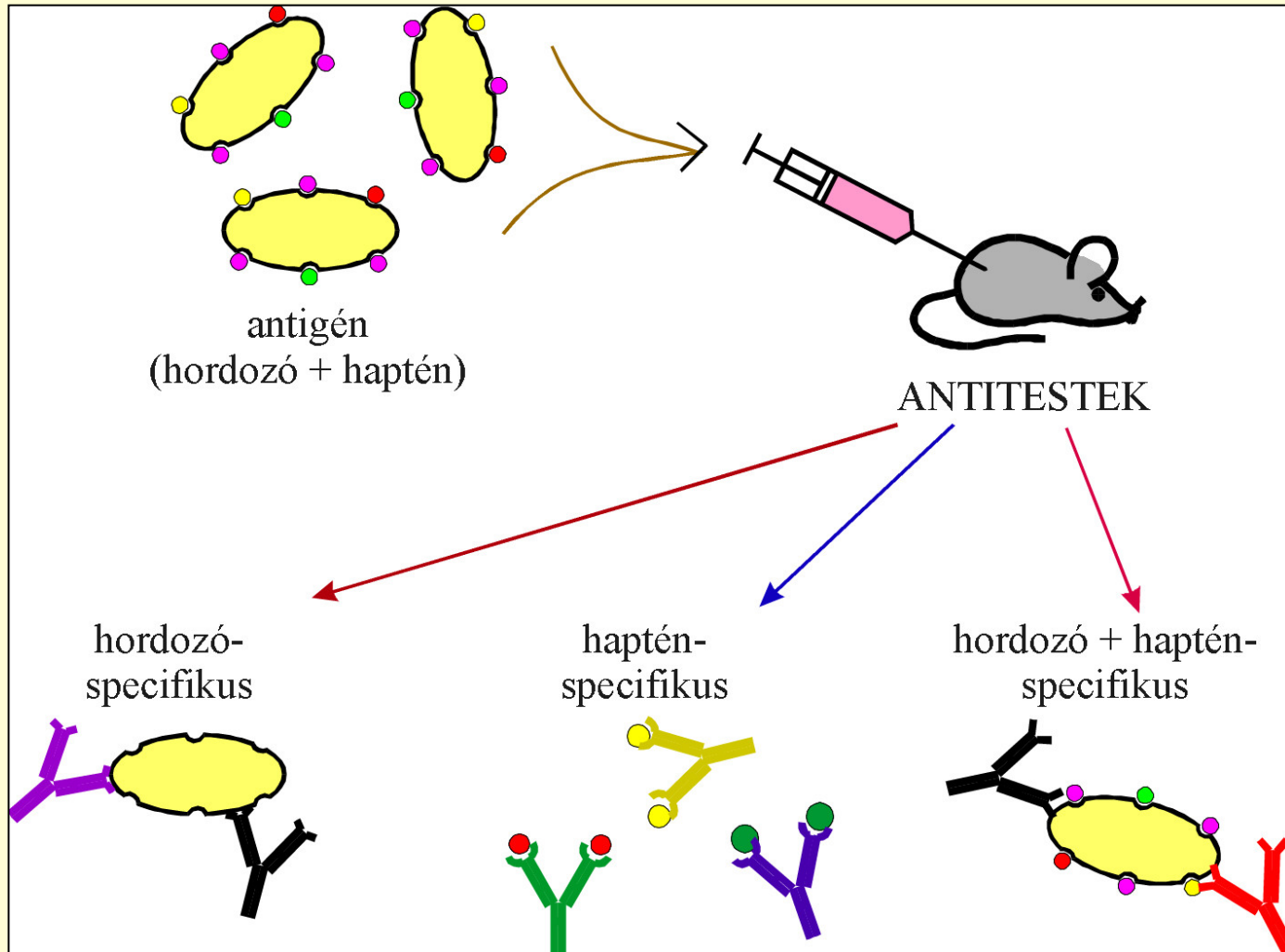
Immunológiai módszerek a klinikai kutatásban

7. előadás

Immunizálás.

Poliklonális és monoklonális ellenanyag előállítása, tisztítása, alkalmazása

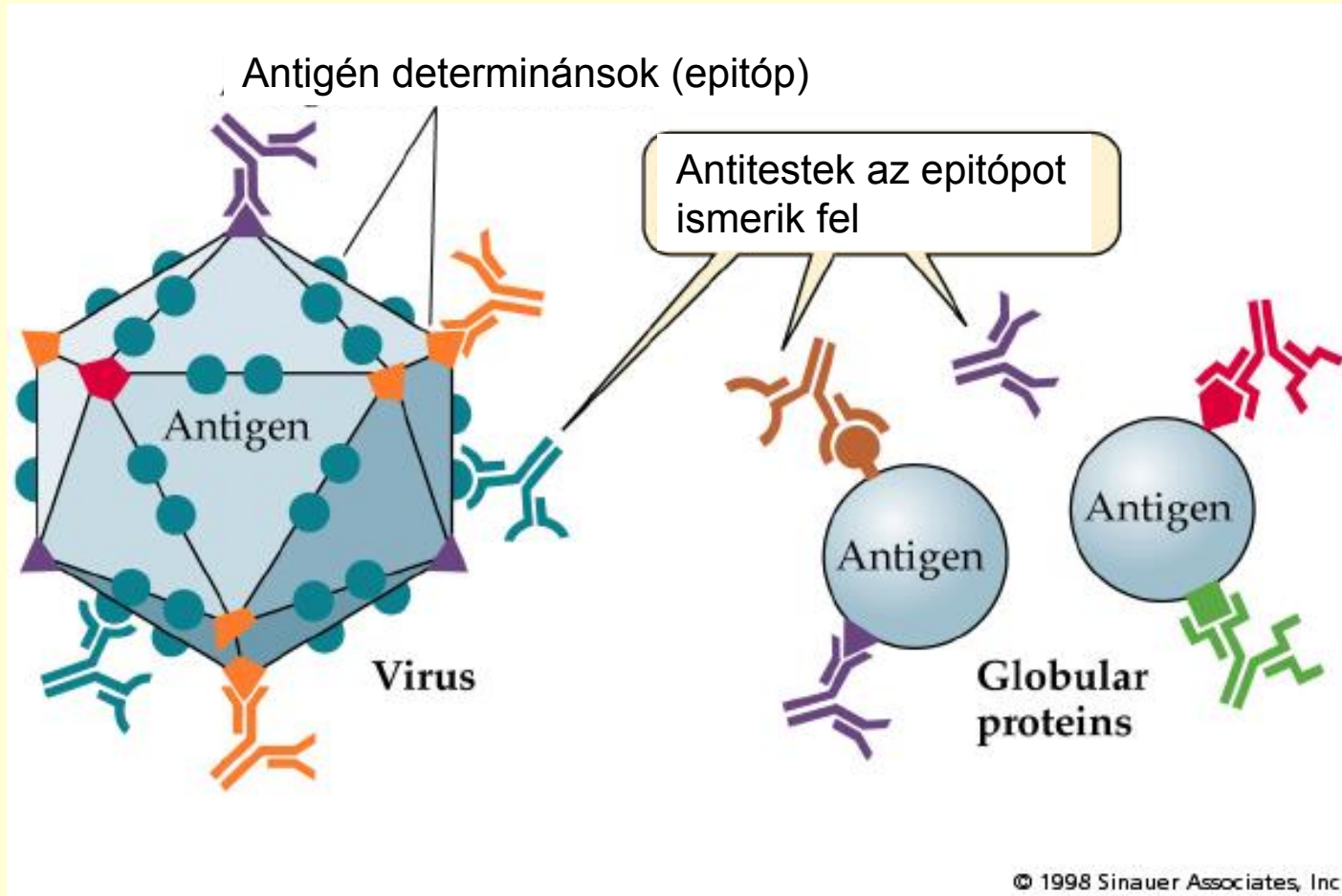
Az antigén (haptén + hordozó) sokféle specificitású ellenanyag képződését indukálja



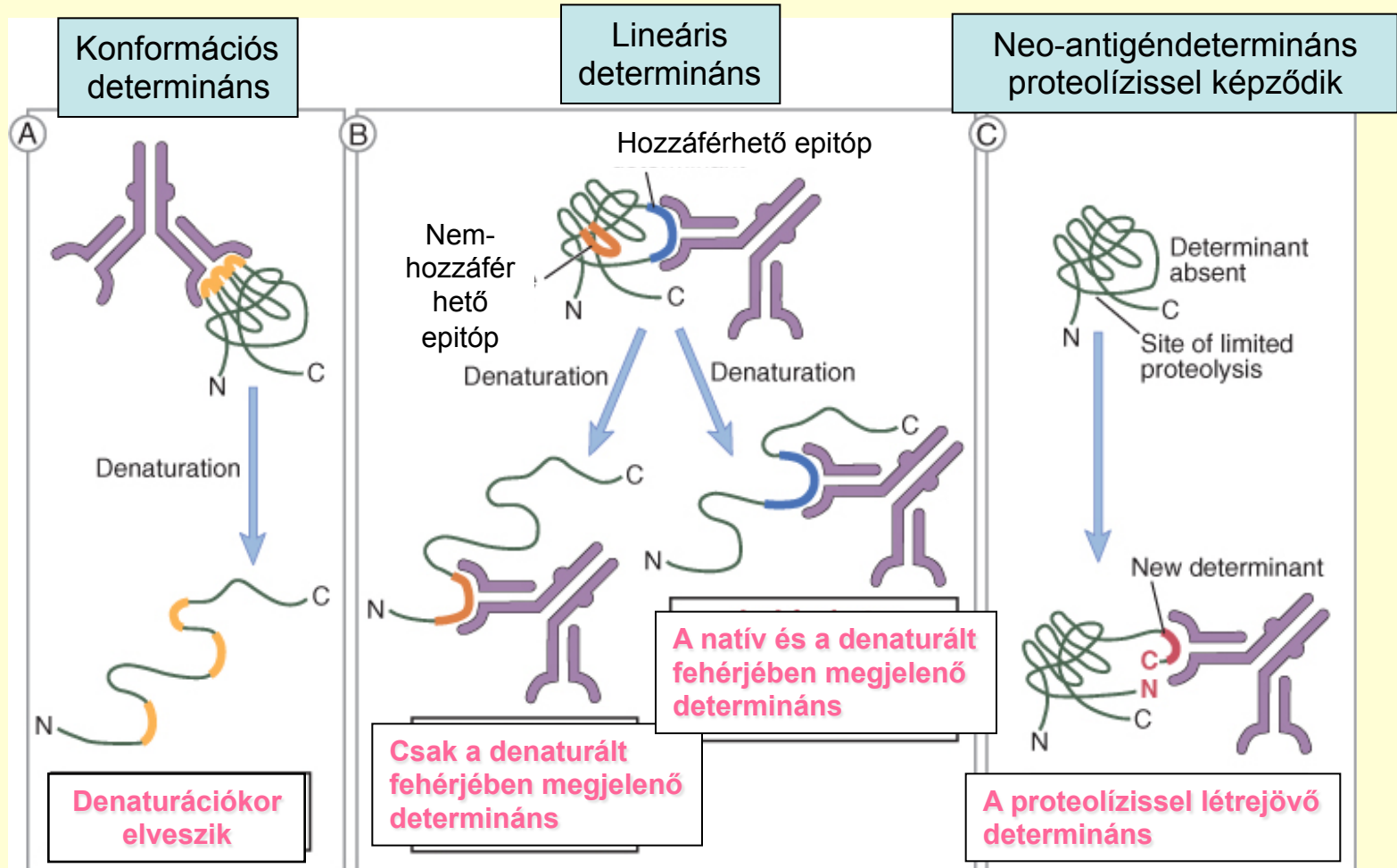
Az immunogenitás befolyásoló tényezők

- **Immunodomináns szakaszok**
- **Kémiai szerkezet** (anorganikus molekulák általában nem antigének, de pl. nehézfémek fehérje komplexei fémallergiát okozhatnak). A legjobb antigének a fehérjék>polypeptidek>polysaccharidok>lipidek>nukleinsavak
- **Fiziko-kémiai természet** (D és L konfiguráció; ortho-, para-, meta pozíció; hydrophil és hydrophob aminosav szekvenciák)
- **Molekulasúly** (nem abszolút kategória)
- **Konformáció szensitivitás** (folding és refolding)
- **Eredet:** auto-, allo-, xeno antigén
- **A bejutás módja és anatómai elhelyezkedése** (pl. perifériás immunreakció és orális tolerancia ugyanarra az antigénre az antigén bemutatás helyétől függően)
- **Dózis függés** (nagy és kisdózis tolerancia)
- **Valencia:** monovalens, bivalens, és multivalens antigének

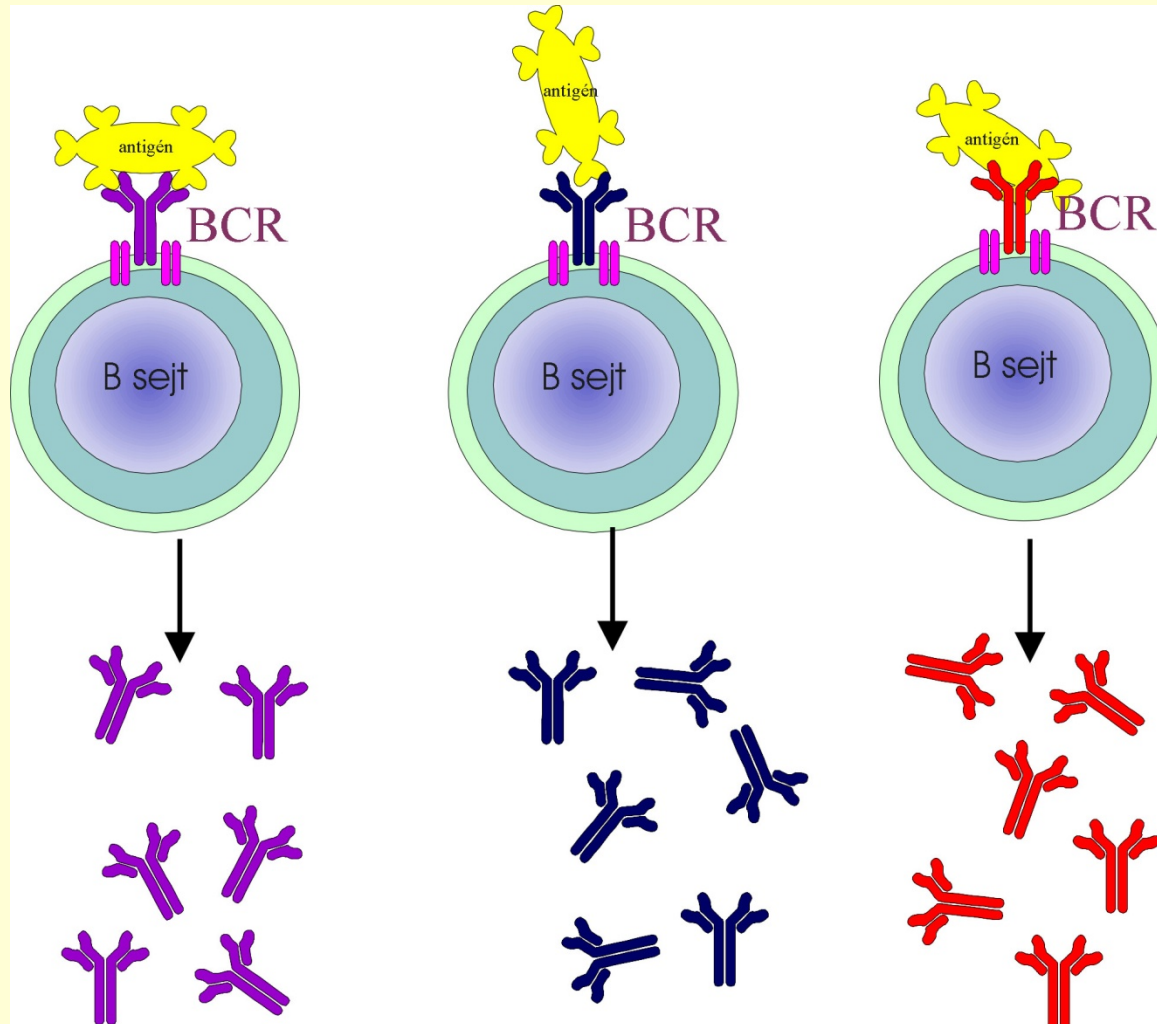
Az antitest a komplex antigén epitópjait (antigén determináns) ismeri fel



Az epitópok (antigén determinánsok) fajtái



A komplex antigén poliklonális immunválaszt vált ki, ami eltérő specificitású ellenanyagok termelődéséhez vezet



Humán antitestek tulajdonságai

	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄	IgM	IgA ₁	IgA ₂	IgD	IgE
Molekulasúly (KDa)	146	146	165	146	970	160	160	184	188
Felnőtt szérumszint (mg/ml)	9	3	1	0,5	1,5	3	0,5	0,03	10 ⁻⁵
Szérum féléletidő (napok)	21	20	7	21	10	6	6	3	2
Complement aktiváció (kalsszikus út)	++	+	+++	+	+++	-	-	-	-
Placenta transzfer	+++	+	++	+/-	-	-	-	-	-
Mucosa transzfer	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+++	+++	-	-
Phagocitákhoz kötődés	+++	++	+++	-	-	++	++	-	+
Hízósejtekhez és bazofilekhez kötődés	-	-	-	-	-	(+)	(+)	-	+++

Antigén ellenanyag kapcsolódás Immunkomplex (IK) képződés

Antigén + ellenanyag

nem kovalens kapcsolódás, reverzibilis

Van der Waals

Coulomb

hidrogén hidak

Precipitáció: oldott antigén + ea

Agglutináció: részecskék (sejtek) + ea

Ellenanyag valenciája:

egy Ig hez kapcsolódó univalens ligandumok száma
(*monovalens, bivalens, pentavalens*)

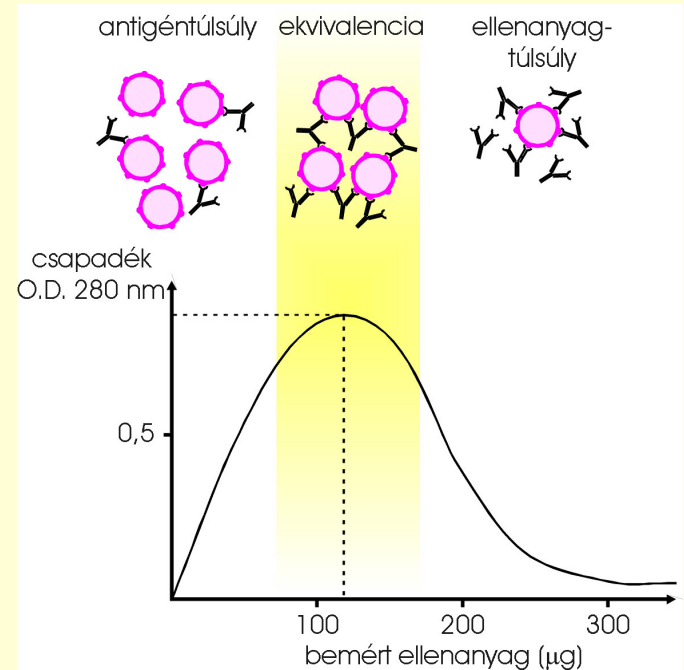
Antigén: általában multivalens (több epitop)

Ellenanyag affinitása (disszociációs konstans, K_d):

ag koncentráció, ami az ag-kötő helyek felét telíti: $10^{-7} - 10^{-11}$ M/liter

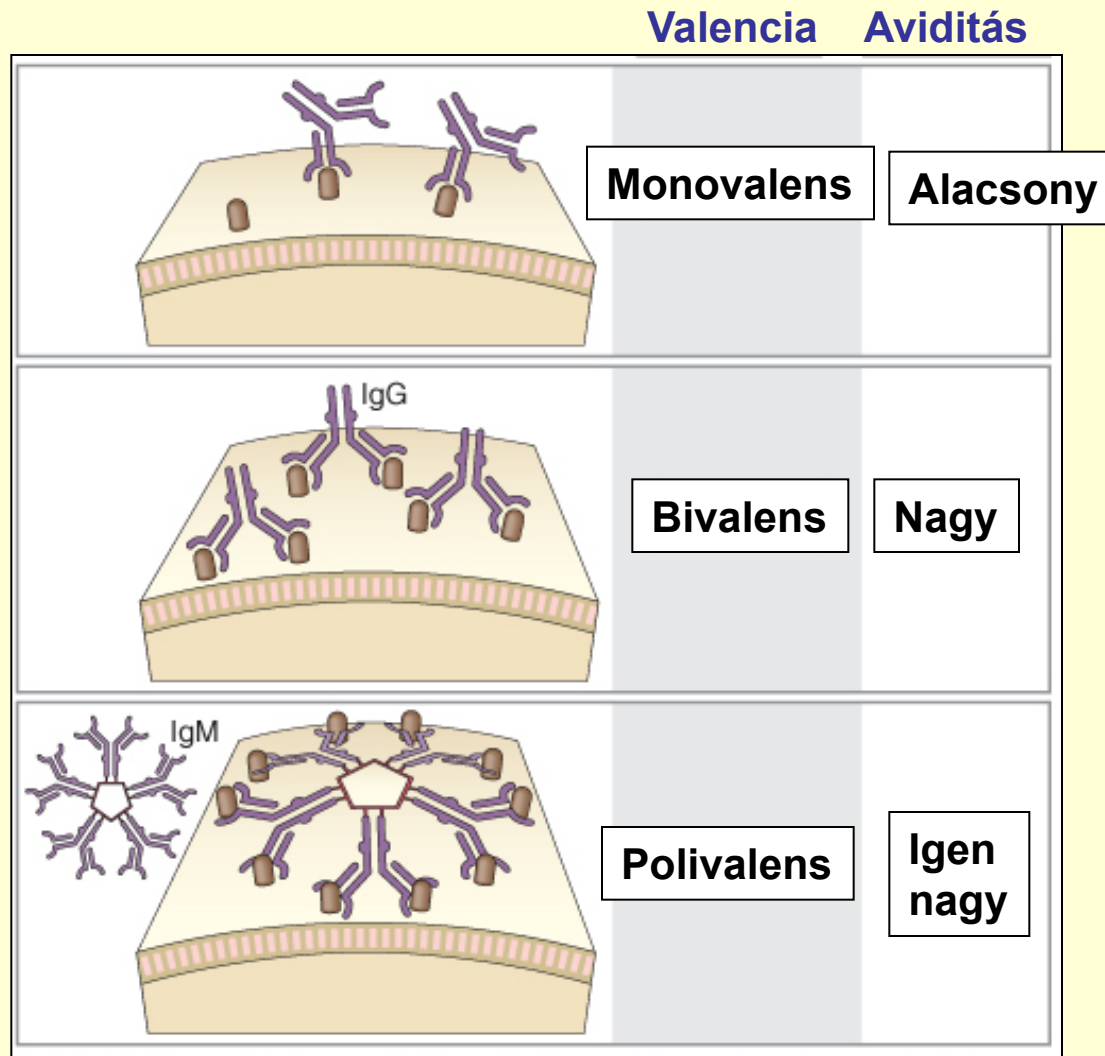
Polivalens szérum: aviditás

(több ellenanyag aviditásának összessége)



Precipitációs görbe

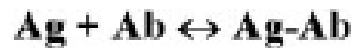
Az Ig valencia és aviditás viszonya



Az antigén-antitest reakció affinitása

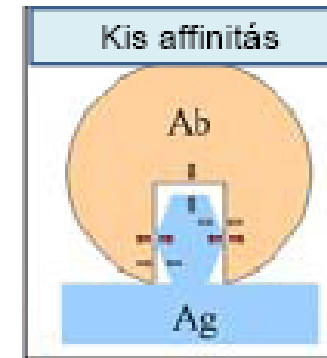
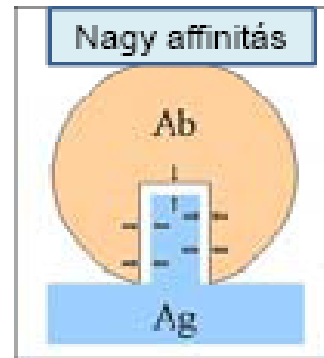
A. Affinitás

Az antitest (**Ab**) affinitása kifejezi, hogy milyen erővel képes kötődni az antigénhez (**Ag**), amelyet az antitest-antigén (**Ag-Ab**) komplex képződésének egyensúlyi állandójával (K_{eq}) írhatunk le.



Az Ag-Ab komplex képződési
állandója:

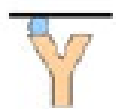
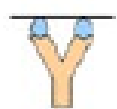
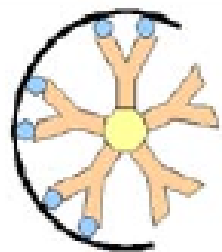
$$K_{eq} = \frac{[Ag-Ab]}{[Ag] \times [Ab]}$$

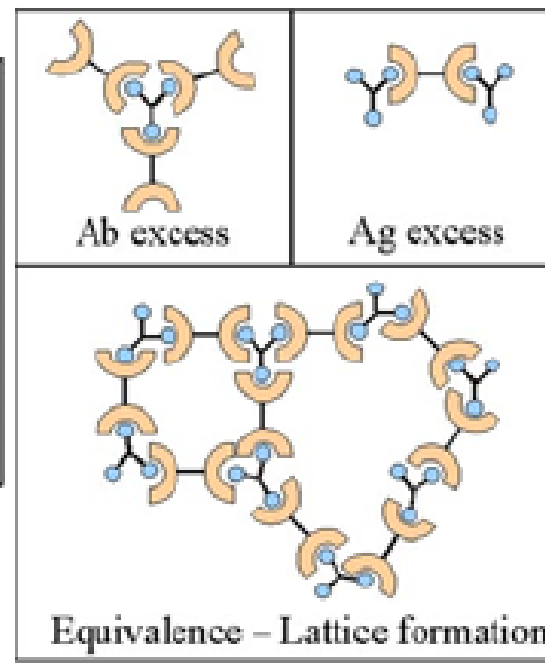


Az antigén-antitest reakció aviditása

B. Aviditás

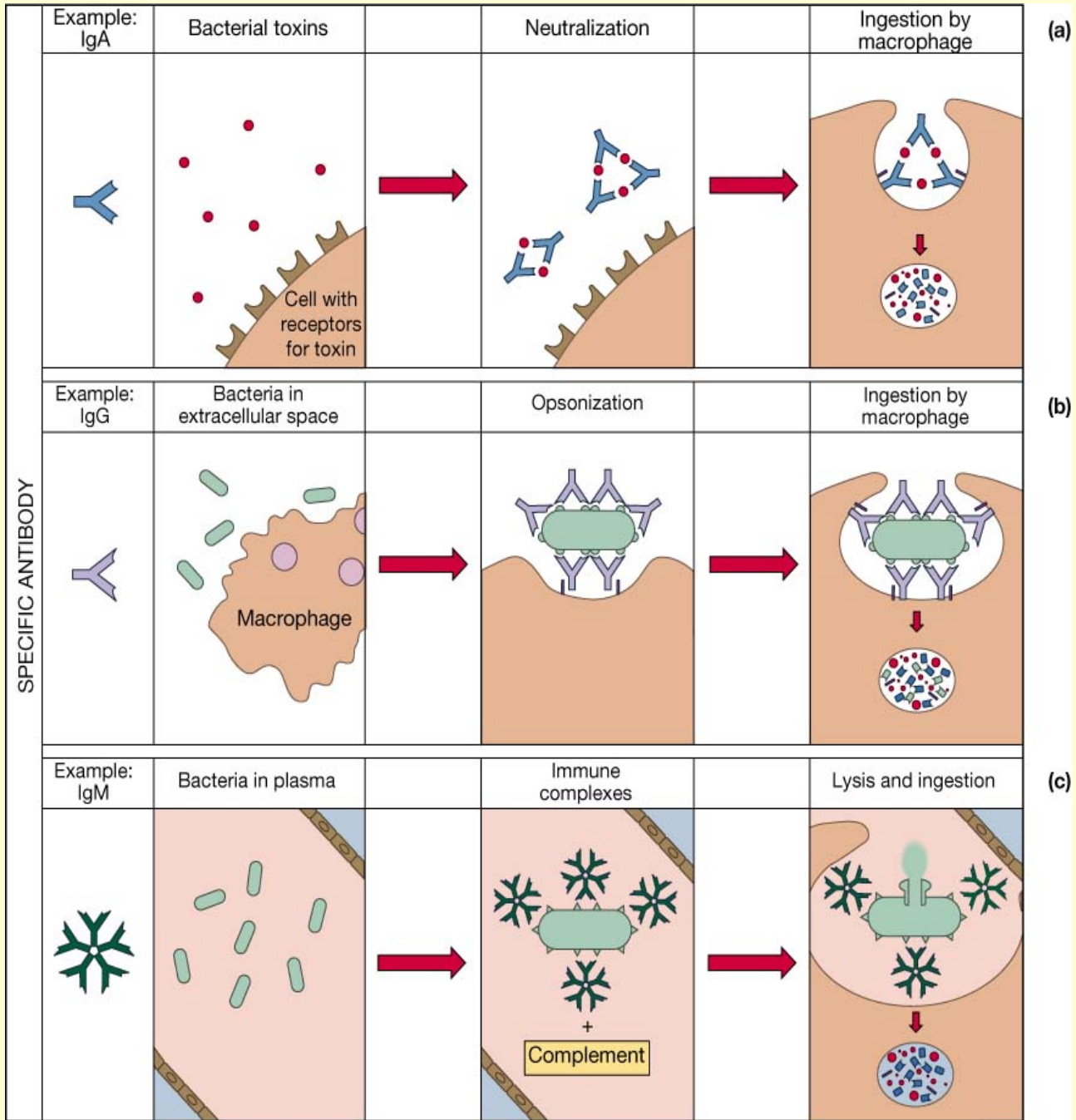
Az aviditás utal a **több kötőhellyel rendelkező antigének** és a **több kötőhellyel rendelkező antitestek** között kialakuló **kötések** együttes erősségére. (Affinitás : egyetlen antitest és antigén között kialakult kötés erősség)

			
$K_{eq} =$	10^4	10^6	10^{10}
	Affinitás	Aviditás	Aviditás



Az antigén-ellenanyag reakciók fajtái

- **Neutralizáció (pl. toxinok, vírusok, baktériumok)**
- **Agglutináció (szolubilis molekulák)**
- **Precipitáció (részecskék, sejtek)**
- **Opszonizáció (nagy partikulumok)**
- **Komplement fixáció**
- **Fc receptor kötés → fagocitózis**

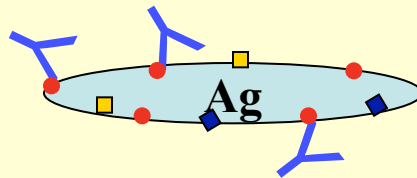


Monoklonális antitest

Poliklonális antitest

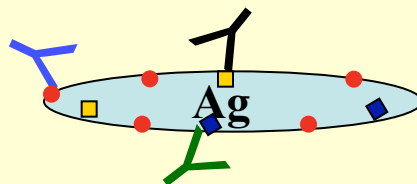
Monoklonális ellenanyag:

- azonos specificitású ellenanyag molekulák,
- egyetlen B-sejtből származó sejtvonal (sejtklón) termeli
- egyetlen epitóp felismerésére képesek



Poliklonális ellenanyag:

- több, eltérő specificitású ellenanyag keveréke,
- több B-sejt klón termékei
- egy adott antigén eltérő epitópjait ismerik fel.



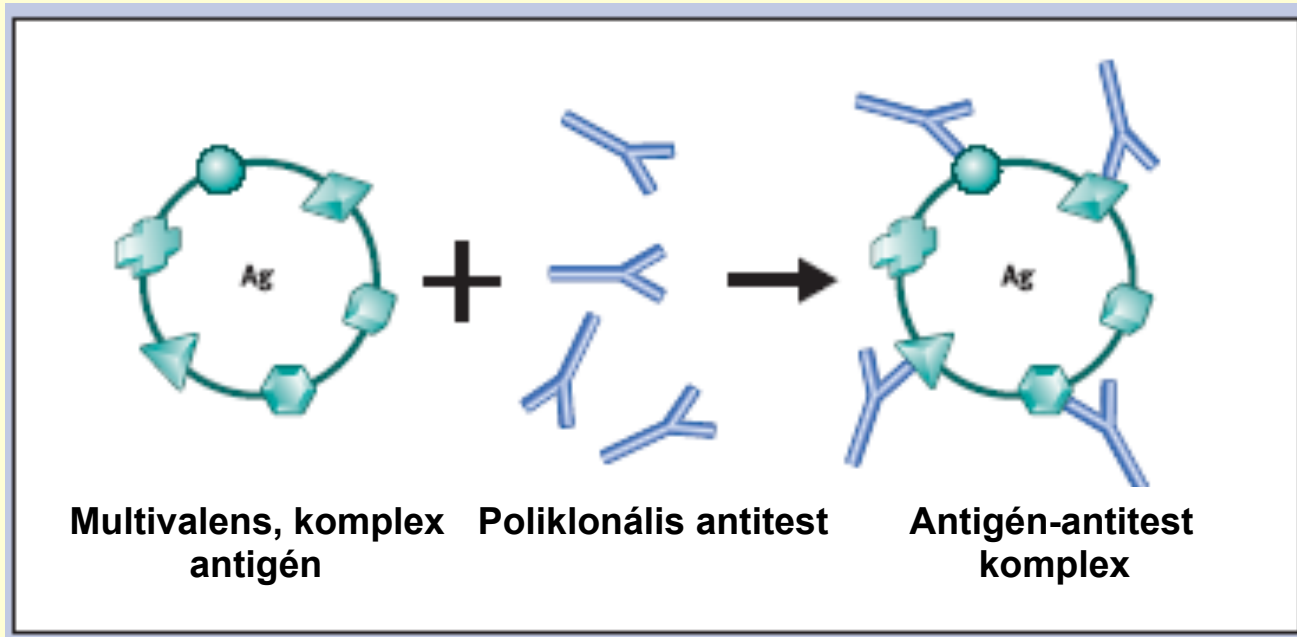
Antitestestek előállítása

- Poliklonális ellenanyagok - antiszérumok
immunizálás
ellenanyag tisztítás
jelölés
- Hybridómák és monoklonális ellenanyagok
antigén tervezés, immunizálás
ellenanyag előállítás és fermentáció
jelölés

A poliklonális ellenanyagok jellemzői

1. vérszérum (változatos idiotípusú, izotípusú és eltérő affinitású ellenanyagok keveréke)
2. az aviditással jellemezhetők
3. standard, ameddig az adott készlet tart

A poliklonális antitest az antigén több epitópját ismeri fel



Immunizálás



Az ellenanyagtermelést befolyásoló tényezők

1. a recipiens
2. az antigén természete
3. az antigén dózisa
4. az antigén bejuttatásának helye
5. adjuvánsok
6. az ismételt immunizálás kinetikája

Immunizálás 1.

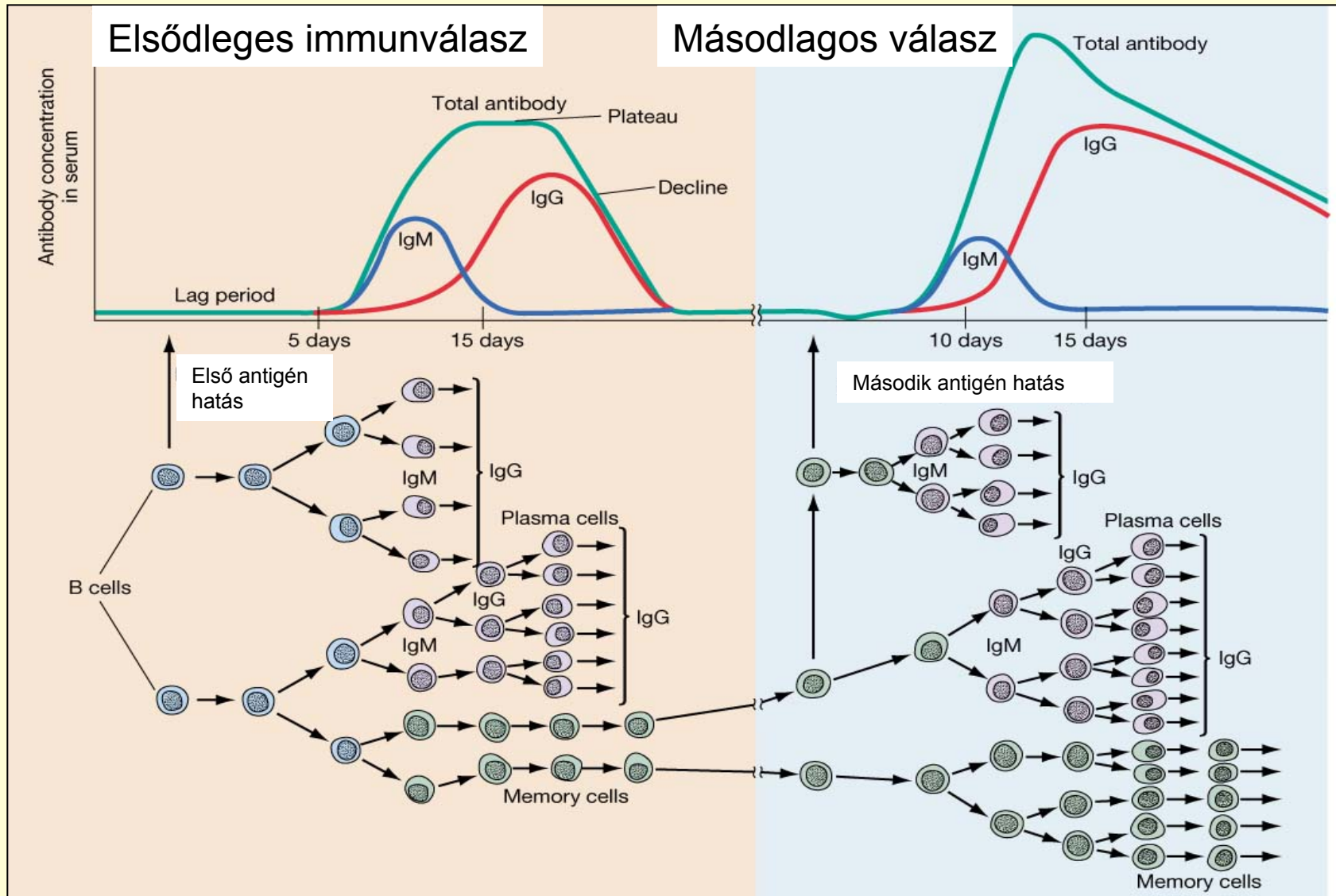
Megfelelő állat kiválasztása:

- Monoklonális antitest – egér v. patkány
- Poliklonális antitest – nyúl, birka, kecske

Antigén:

- haptén (5-10 kD >) – carrier
- natív v. módosított molekulák (beadás: musculárisan, subcután vagy intracután) ill. sejtek (beadás: iv. vagy ip.)

Az ellenanyagválasz kinetikája



Adjuvánsok jellemzői

Lassítják az antigén felszívódását és az immunrendszer nem specifikus stimulációja (makrofág aktiváció) révén **fokozzák** az ellenanyag termelést.

Leggyakoribbak:

- Ásványolaj-alapú, inkomplett adjuvánsok (pl.: inkomplett Freund, Hegedûs)
- Komplet Freund: ásványolaj keverékben szuszpendált, hővel előlt *Mycobacterium tuberculosis*
- Alumínium-hidroxid gél
- Muramil-dipeptid (*Mycobacterium tbc.*)
- Bakt. vakcinák egyidejű adása fokozza az immunogénekkal szembeni antitest termelést. Pl.: *Bordetella pertussis*
- Liposzóma

Hibridóma technika, monoklonális antitestek előállítása

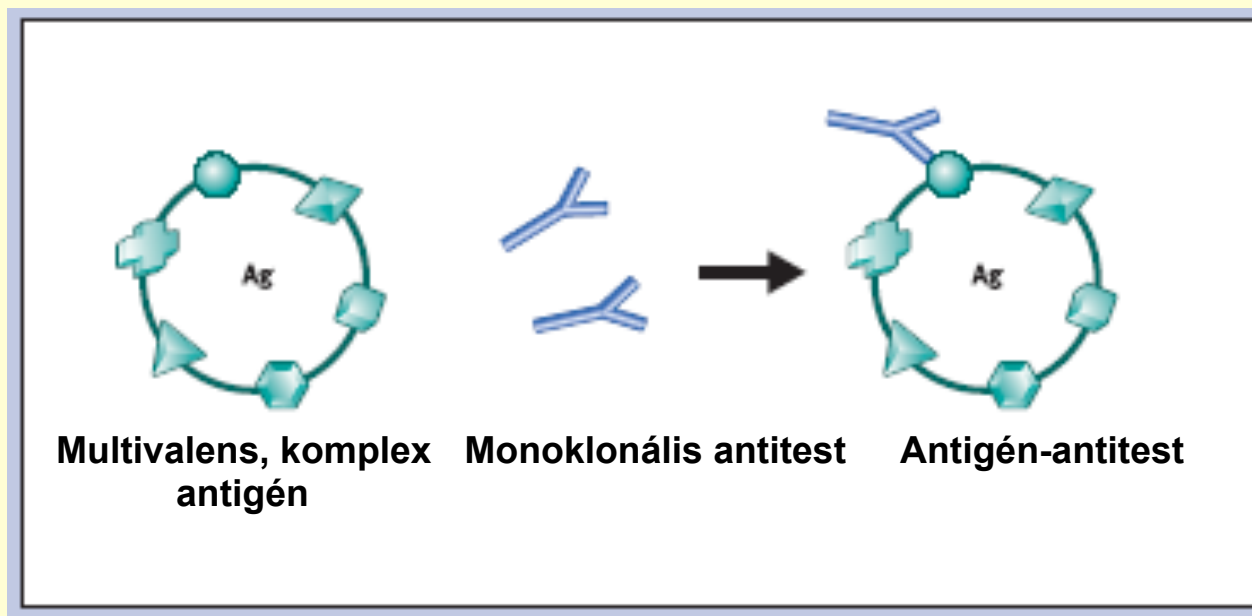
Def.: A hibridóma technika segítségével valamely számunkra immunológiai szempontból értékes tulajdonsággal rendelkező (pl. antitest termelés), de korlátozott élettartamú sejt kiválasztható és korlátlan ideig fenntartható és szaporítható.

A technika lényege, hogy aktivált immunsejteket *in vitro* fúzionáltatunk korlátlanul szaporodó tumorsejtekkel.

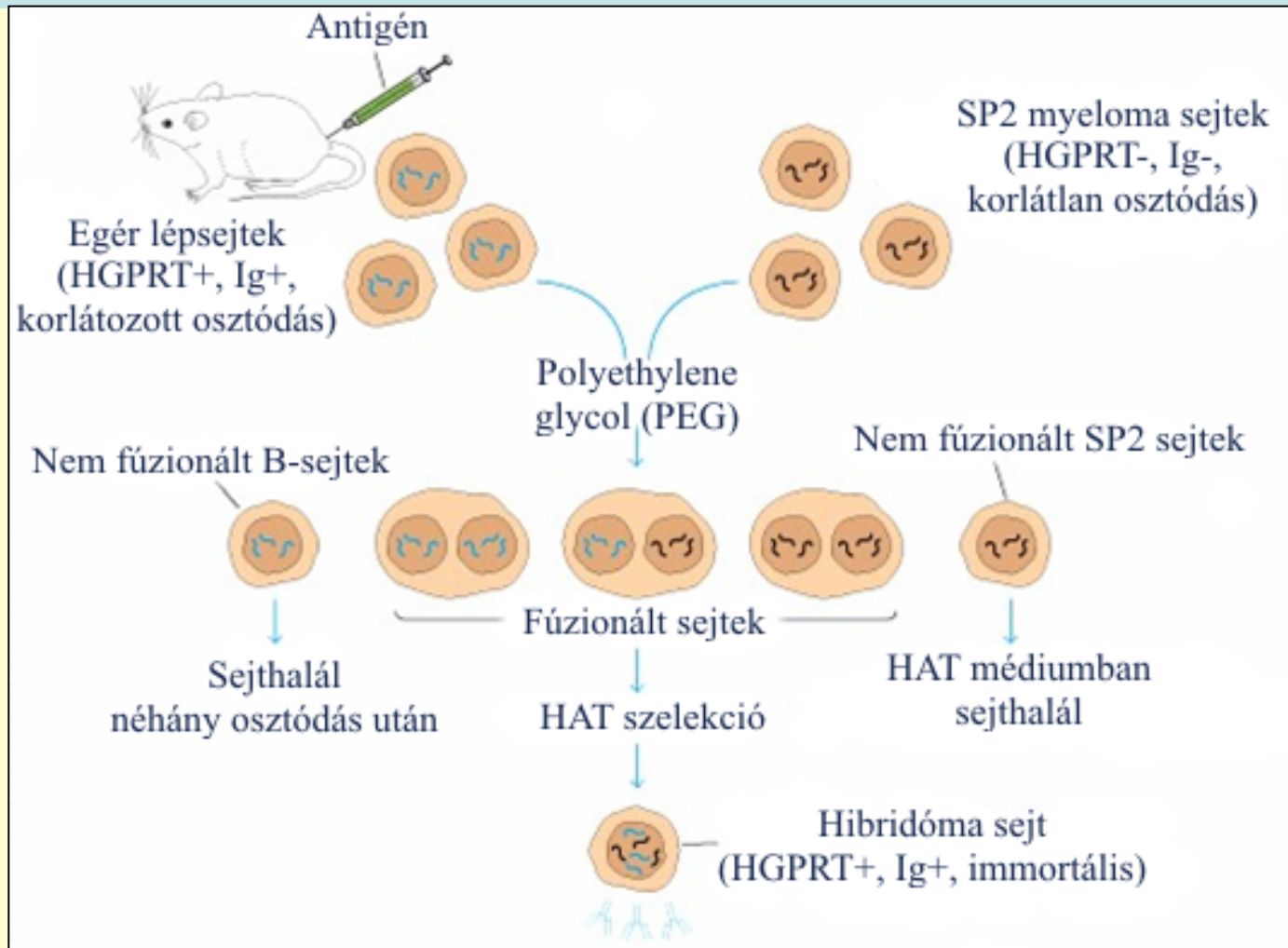
A monoklonális ellenanyagok jellemzői

1. génszintézeti úton előállított ellenanyagok
2. egyetlen epitópra specifikus, teljesen azonos ellenanyag molekulák
3. valódi affinitással jellemezhetők
4. standard, ameddig a sejtvonal fenntartható

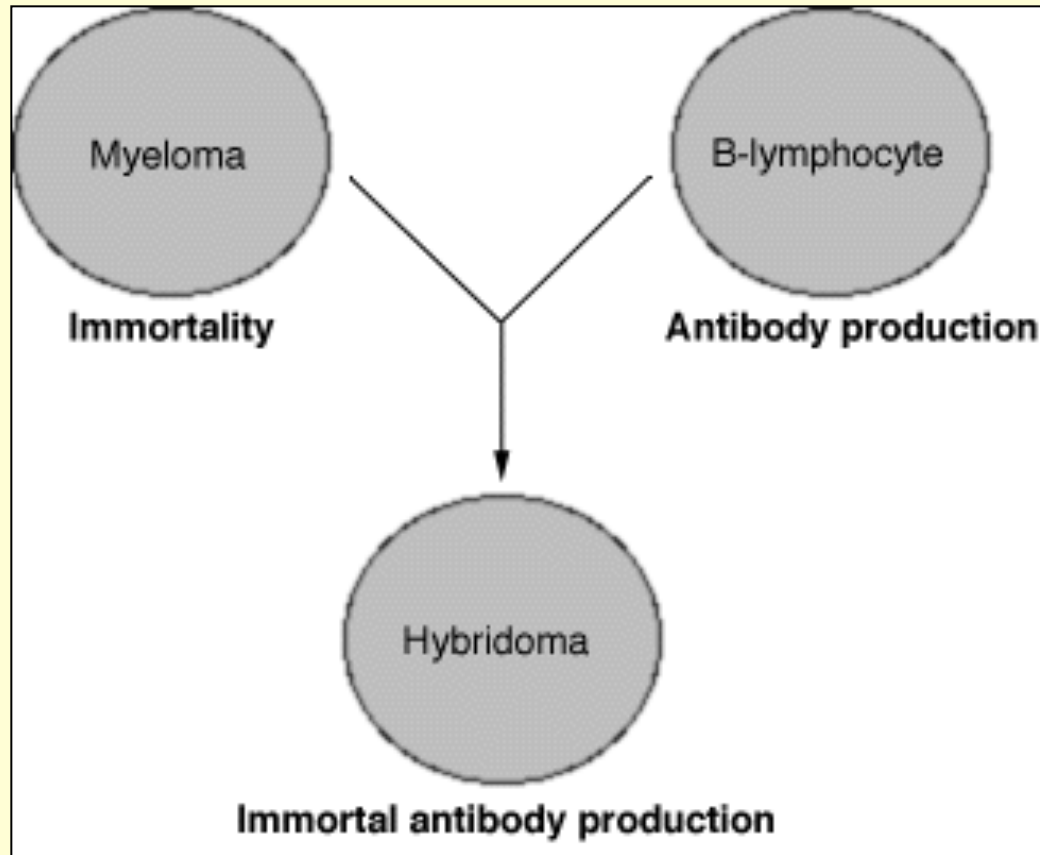
A monoklonális antitest az antigén egyetlen epitópját ismeri fel



A monoklonális ellenanyag előállítása hybridóma technikával



A hybrid sejt hordozza az eredeti két sejt tulajdonságait



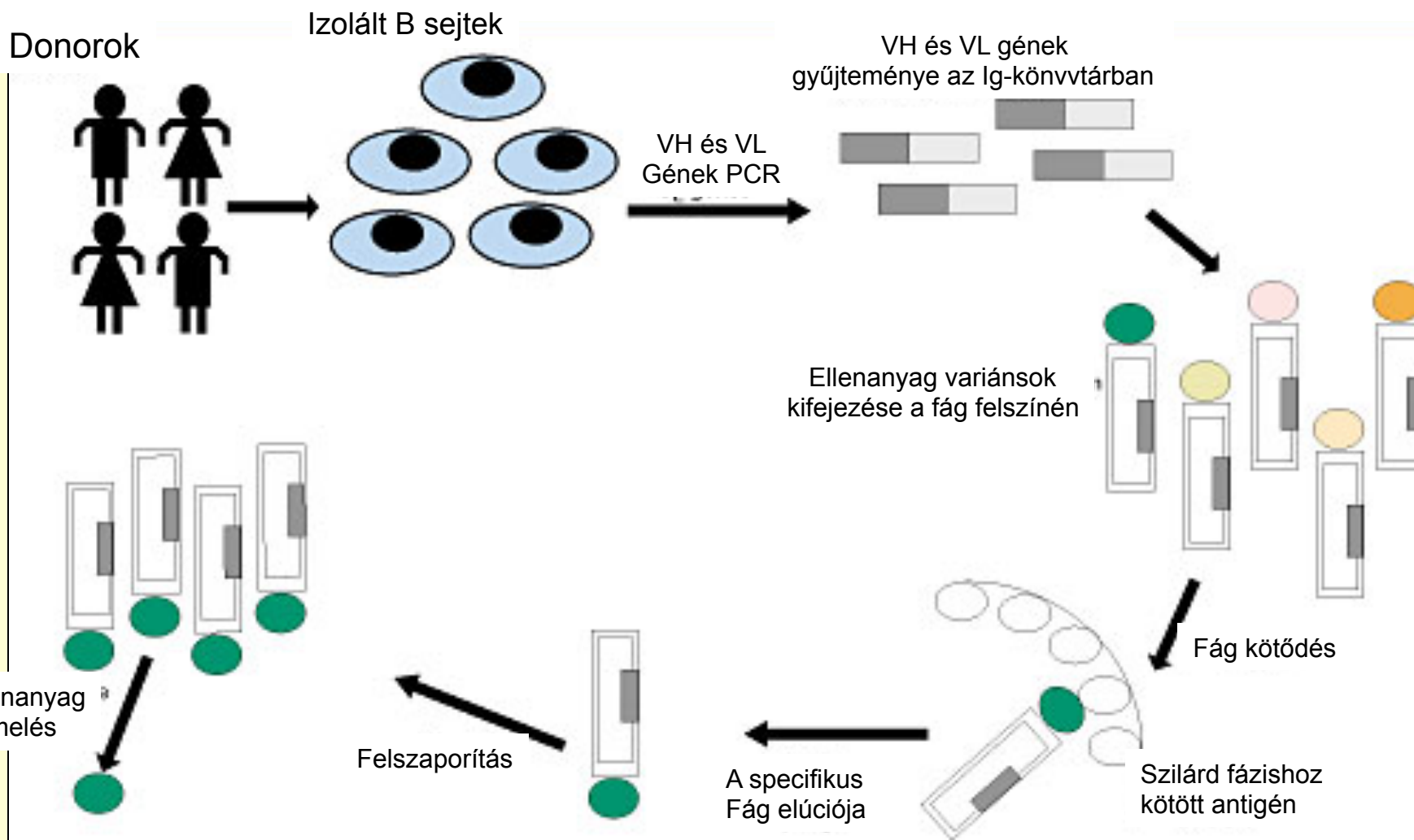
Hybridóma előállítás 1.

1. Sejtfúzió: lépsejt (immunizált állatból) + nem szekretáló egér myeloma (Sp-2/0-Ag14) + PEG
2. Szelekció: A megfelelő kombinációban (lépsejt-Sp-2 hibridek) létrejött hybridsejtek kiválasztása.
 - Az Sp-2 sejtekből hiányoznak a HGPRT és TK enzimek (purin és pirimidin szintézis), a lépsejtek viszont rendelkeznek velük, így megfelelő szelektív tápoldat (HAT) használatával kiválaszthatók a lépsejt-Sp-2 hibridek.
 - Toxin – antitoxin módszer.
 - A fúzió előtt a fúziós partnereket különböző fluoreszcens festékekkel jelöljük, majd FACS-on vélogatjuk ki a kettős fluoreszcenciót mutató hibrideket.

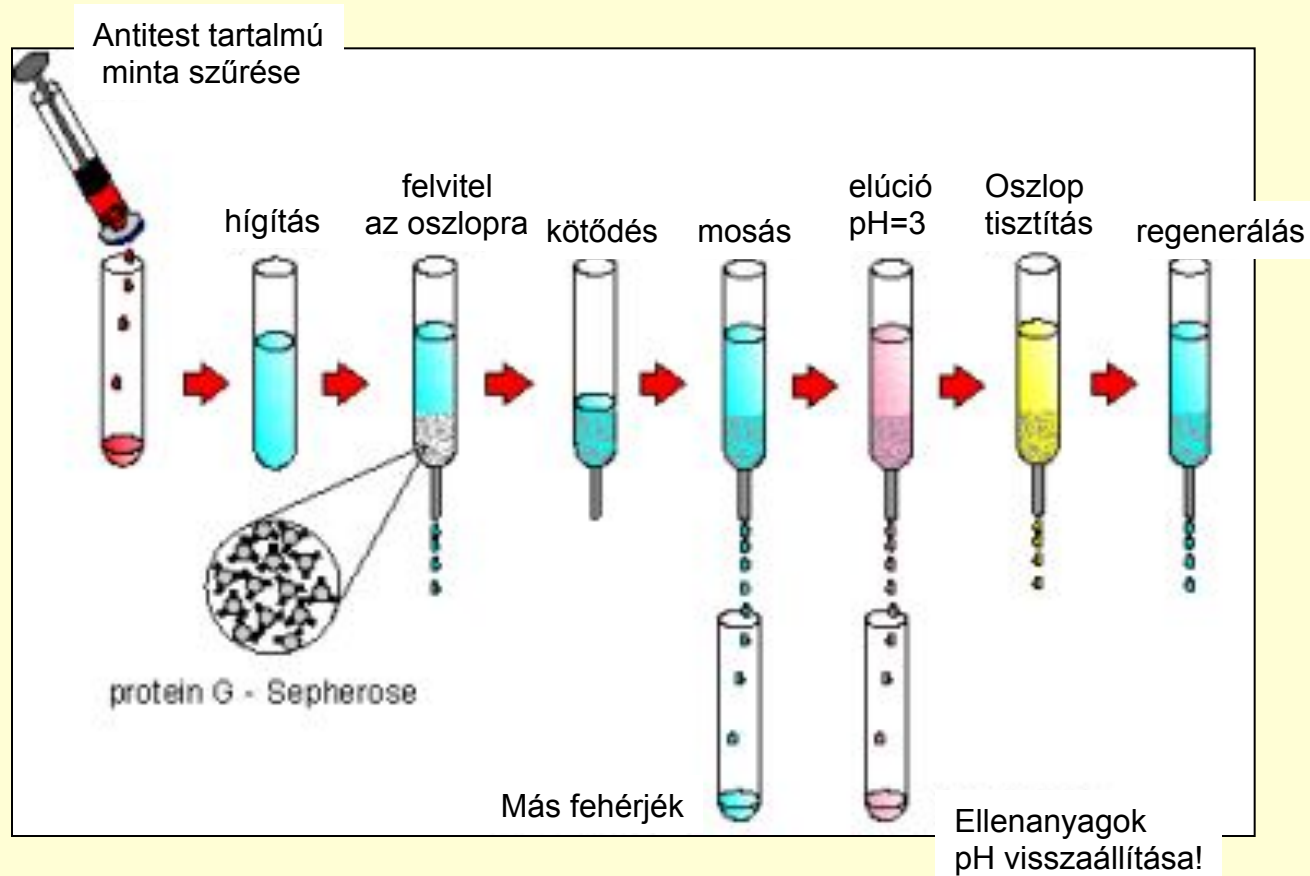
Hybridóma előállítás 2.

3. A megfelelő ellenanyagot termelő hibridsejtek kiválasztása, **tesztelés** (ELISA).
4. **Klónozás**: az antitest termelő sejtek hígítása úgy, hogy 96 lyukú tenyésztő lemezen 1-nél több sejt ne jusson egy lyukba. Ezután ismételt **tesztelés**. Az egy klón által termelt antitest: monoklonális antitest.
5. Antitest termeltetés nagyobb mennyiségben: (1) felülúszó termeltetése hybridóma sejtekkel tenyésztő edényben; (2) hybridóma sejtek beadása ip. egérbe; (3) fermentor.

A fág-display technika ellenanyag előállításra



Ellenanyag tisztítása Protein-G Sepharose affinitás kromatográfiával



A különböző fajok ellenanyagainak affinitása Protein-A és Protein-G-hez

	Protein A	Protein G		Protein A	Protein G
Human IgG1	✓✓✓✓	✓✓✓✓	Rabbit IgG	✓✓✓✓	✓✓✓
Human IgG2	✓✓✓✓	✓✓✓✓	Hamster IgG	✓	✓✓
Human IgG3	✗	✓✓✓✓	Guinea Pig IgG	✓✓✓✓	✓✓
Human IgG4	✓✓✓✓	✓✓✓✓	Bovine IgG	✓✓	✓✓✓✓
Human IgA	✓✓	✗	Sheep IgG	✓/✗	✓✓
Human IgD	✓✓	✗	Goat IgG	✓/✗	✓✓
Human IgE	✓✓	✗	Pig IgG	✓✓✓	✓✓✓
Human IgM	✓✓	✗	Chicken IgG	✗	✓
Mouse IgG1	✓	✓✓			
Mouse IgG2a	✓✓✓✓	✓✓✓✓	<i>Fragments</i>		
Mouse IgG2b	✓✓✓	✓✓✓	Human Fab	✓	✓
Mouse IgG3	✓✓	✓✓✓	Human F(ab') ₂	✓	✓
Mouse IgM	✓/✗	✗	Human scFv	✓	✗
Rat IgG1	✗	✓	Human Fc	✓✓	✓✓
Rat IgG2a	✗	✓✓✓✓	Human κ	✗	✗
Rat IgG2b	✗	✓✓	Human λ	✗	✗
Rat IgG2c	✓	✓✓			
Rat IgM	✓/✗	✗			

Monoklonális antitestek felhasználása

- Preparatív módszerek
 - Proteintisztítás
- Analitikai módszerek (Diagnosztikus célok, kutatás)
 - Limfocita-alcsoportok és klónok azonosítása, izolálása
 - Morfológiai vizsgálatok (tumorok, gyulladás detektálása)
 - Rutin laboratóriumi vizsgálatok - szerológia
- Terápiás célok
 - Daganatok
 - Autoimmun kórképek
 - Gyulladásos betegségek

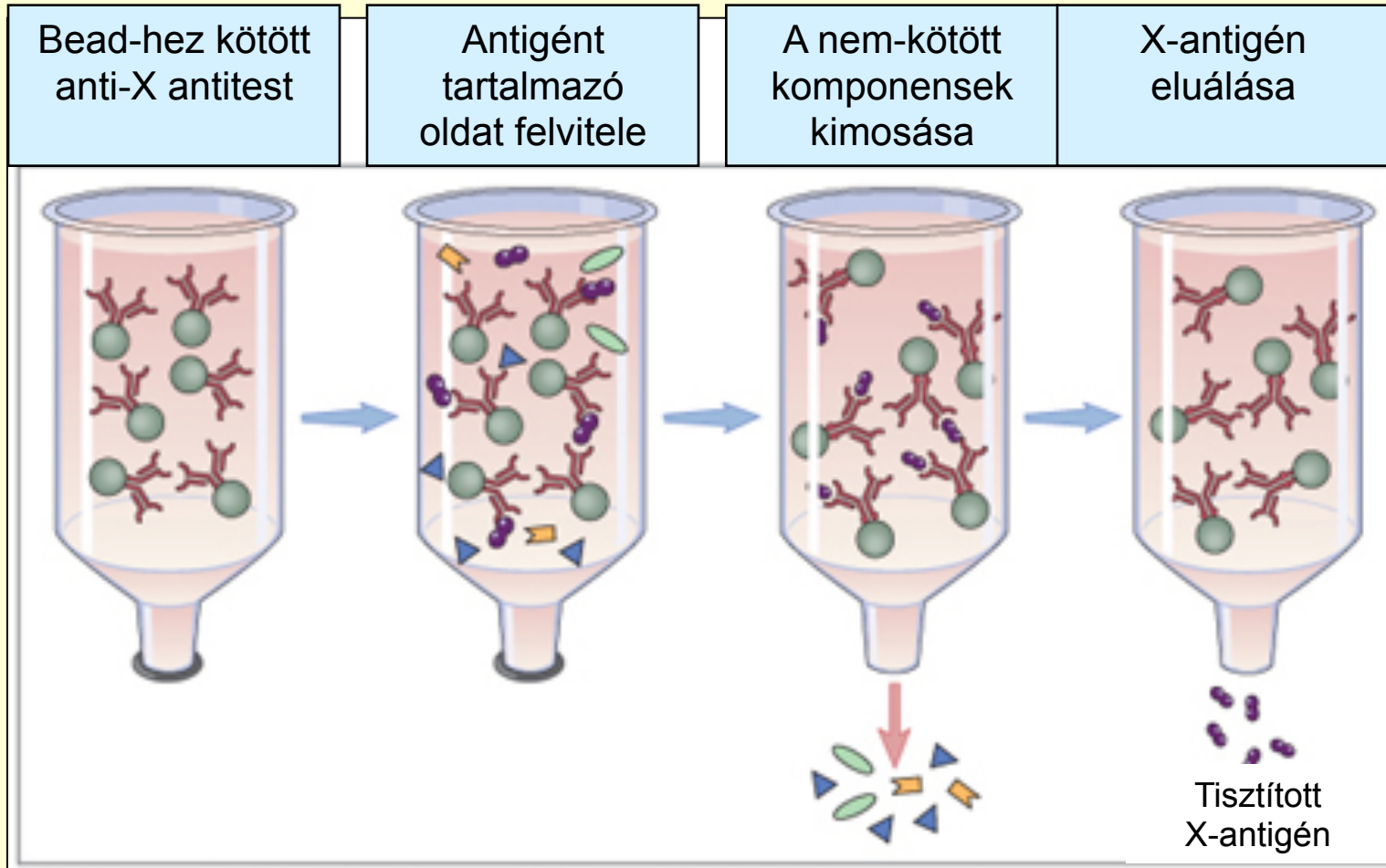


1g arany ~ 5 000Ft

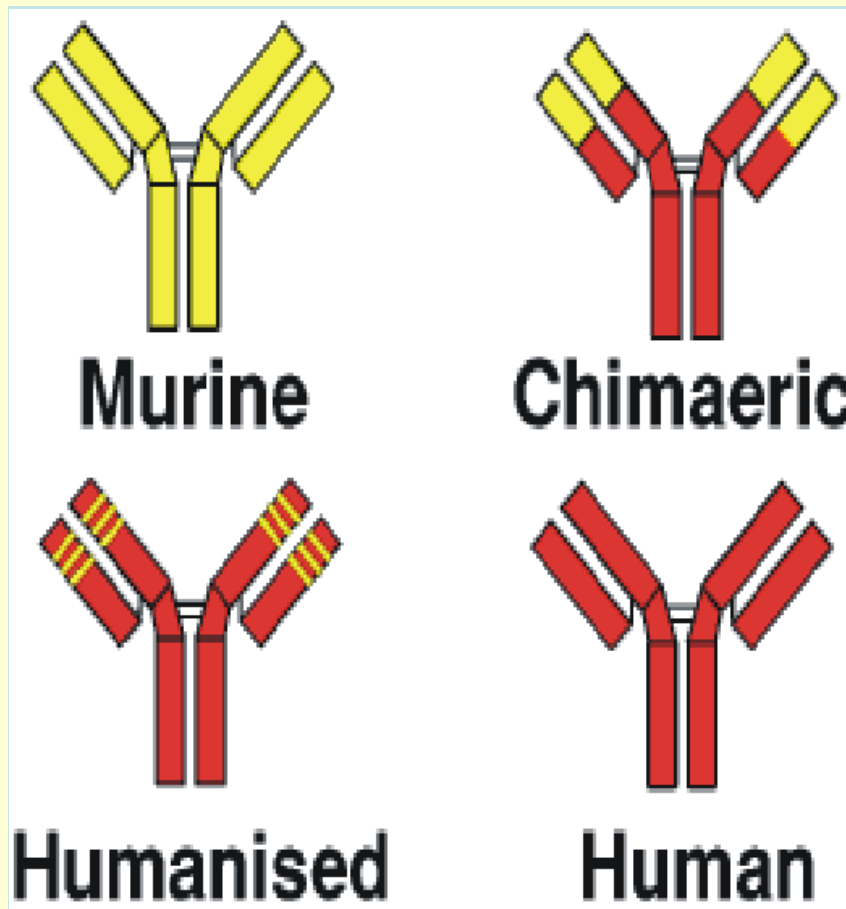
1g mAb ~ 200 000Ft

Ha már megvan a monoklón!

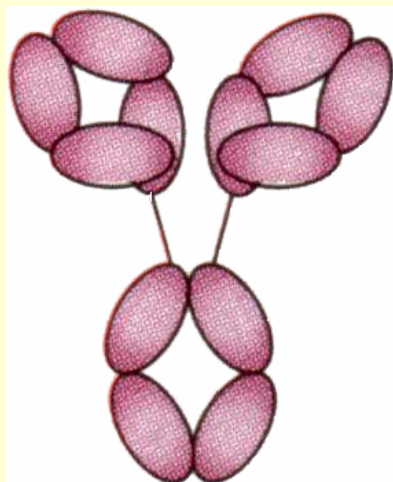
Antigén tisztítása affinitás kromatográfiával



Humanizált antitestek - terapia



Rágcsáló antitestek



A monoklonális antitestekkel történő első terápiás próbálkozásokkor rágcsáló antitesteket használtak.

Az első emberben használt antitest az OKT3 (anti-CD3) volt.

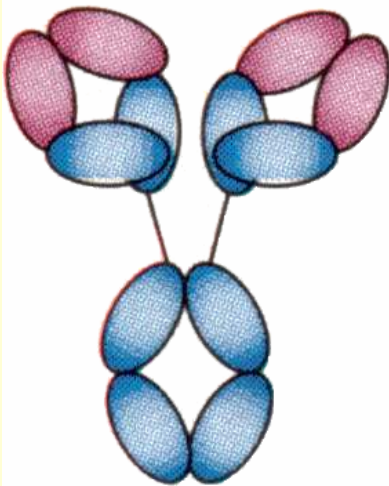
A kezelés hatásos volt számos esetben, ismételt alkalmazáskor azonban súlyos immunreakciók léptek fel.

PROBLÉMA: HAMA (human anti-mouse-antibodies)

Noha konzervált az Ig-ok konstans része, mégis számos különbség van az emberi és a rágcsáló Ig-k között.

HAMA-t 8-12 nappal a kezelés után tudnak kimutatni, a csúcskoncentráció 25-30 nap után van.

Kiméra antitestek



A kiválasztott rágcsláló monoklonális antitest Fv régióját kódoló géneket hozzákapcsolják egy humán antitest Fc részét kódoló génjeihez.

A kiméra antitestek kb. 75%-a humán.

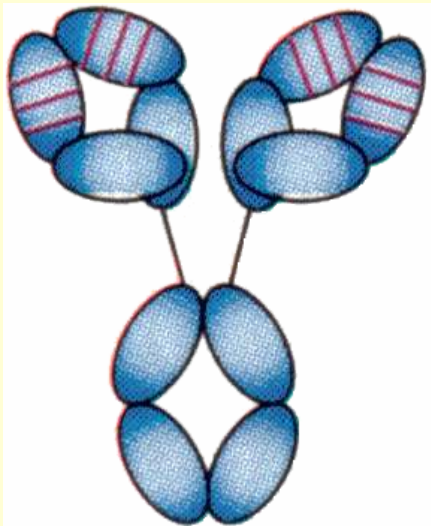
Az antigén specificitása megegyezik az eredeti rágcsláló antitestével azonosak.

Az in vivo féléletideje és az effektor funkciói az eredeti humán antitestével azonosak.

PROBLÉMA: HACA (human anti-chimeric-antibodies)

Kevésbé immunogének, de még mindig szignifikáns antitest választ váltanak ki.

Humanizált antitestek



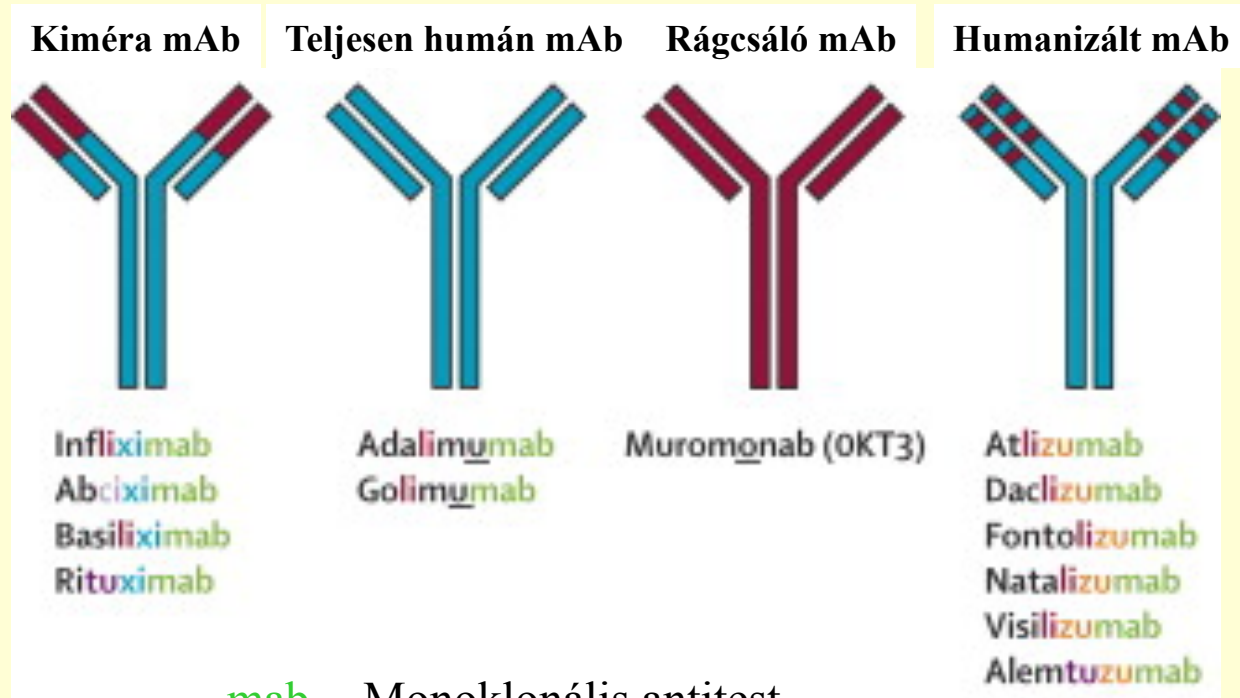
Ha a kiválasztott rágcsáló monoklonális antitestjének csupán a CDR részeit ültetik át egy humán antitestbe humanizált antitesteket kapnak.

A humanizált antitestek > 90%-a humán.

Az antigén specificitása megegyezik az eredeti rágcsáló antitestével azonosak.

Az in vivo féléletideje és az effektor funkciói az eredeti humán antitestével azonosak.

US Food and Drug Administration nevezéktana a Terápiás monoklonális antitestekre



- mab Monoklonális antitest
- xi Kiméra antitest
- zu Humanizált antitest
- li Immunomoduláns antitest
- tu Tumor ellenes antitest
- ci Kardiovaszkuláris betegségben használható antitest
- u Humán
- o Rágcsáló