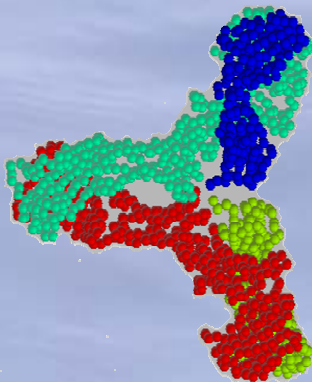
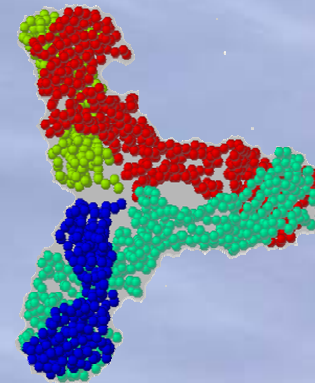


# Az ellenanyagok orvosi- biológiai alkalmazása



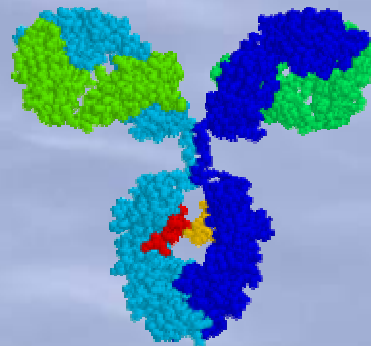
PhD kurzus  
2011/2012 II. félév



# Ellenanyagok előállítása, tisztítása, jelölése, fragmentálása

## Monoklonális vs. poliklonális ellenanyagok

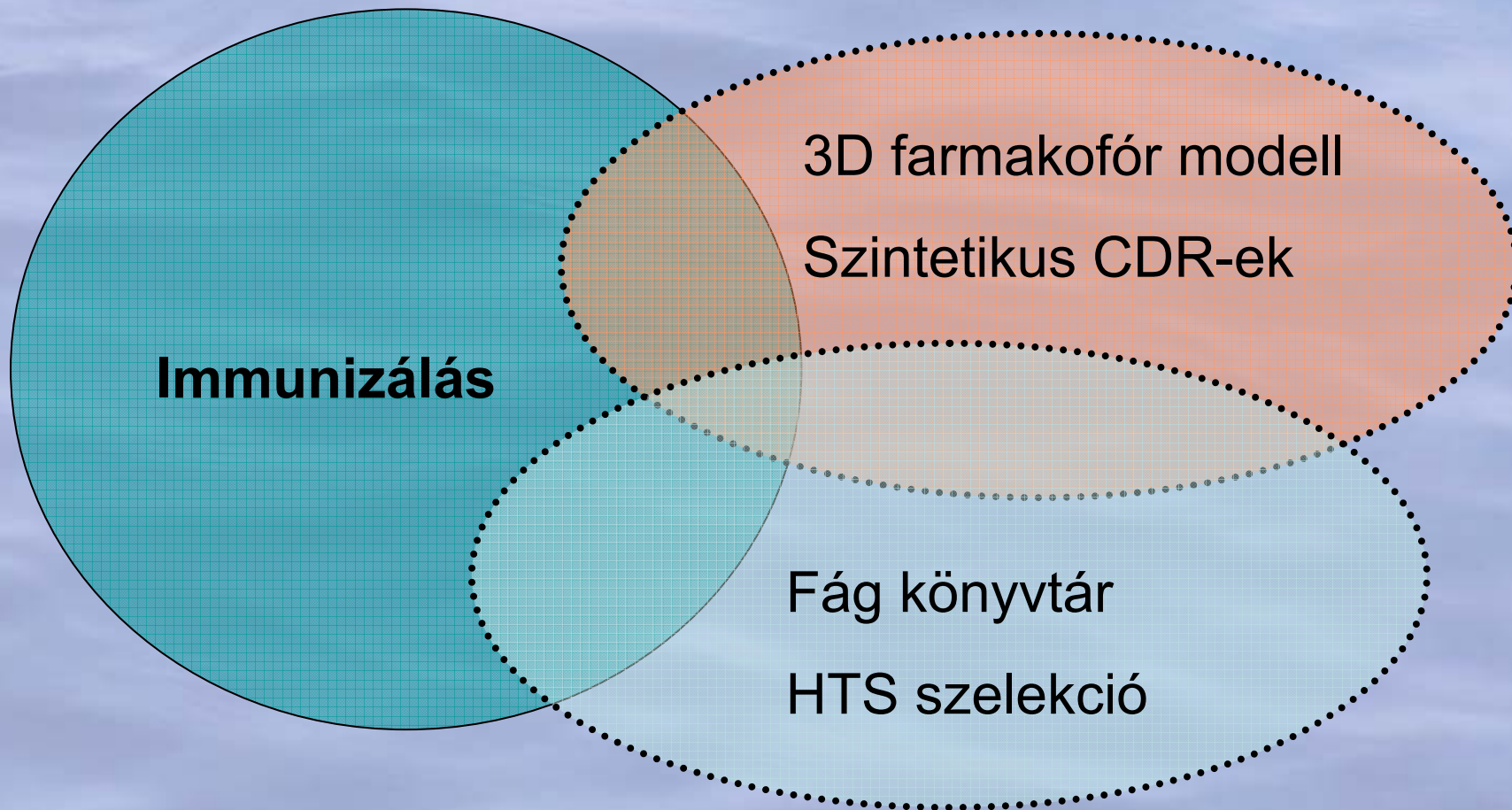
---



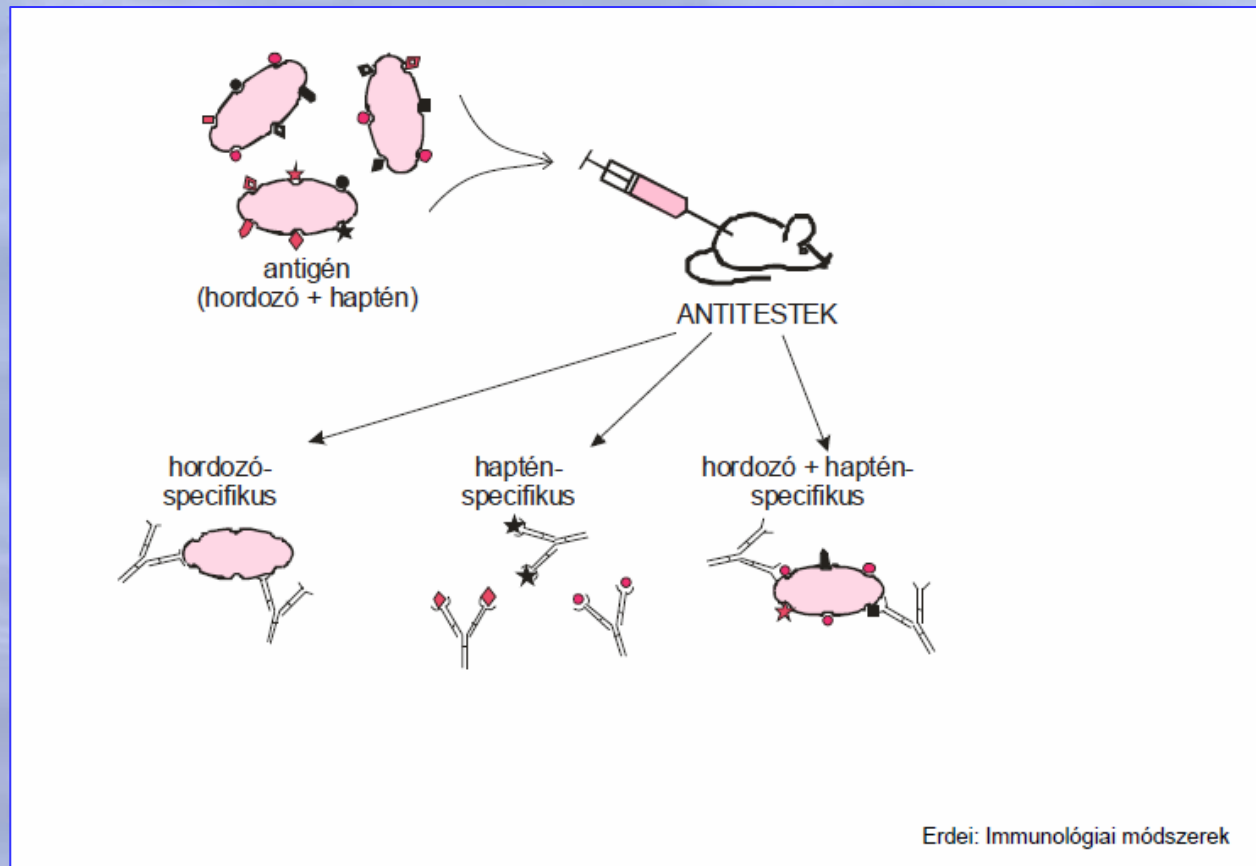
# Ellenanyagok előállítása

# Elvi lehetőségek

---



# Ellenanyag előállítás - immunizálás



- Antigenitás (kémiai természet, filogenetikai távolság, biológiai viselkedés)
- Antigén bejuttatási helye, módja, antigén mennyisége
- Adjuvánsok alkalmazása

# Adjuvászok

---

## Hatás

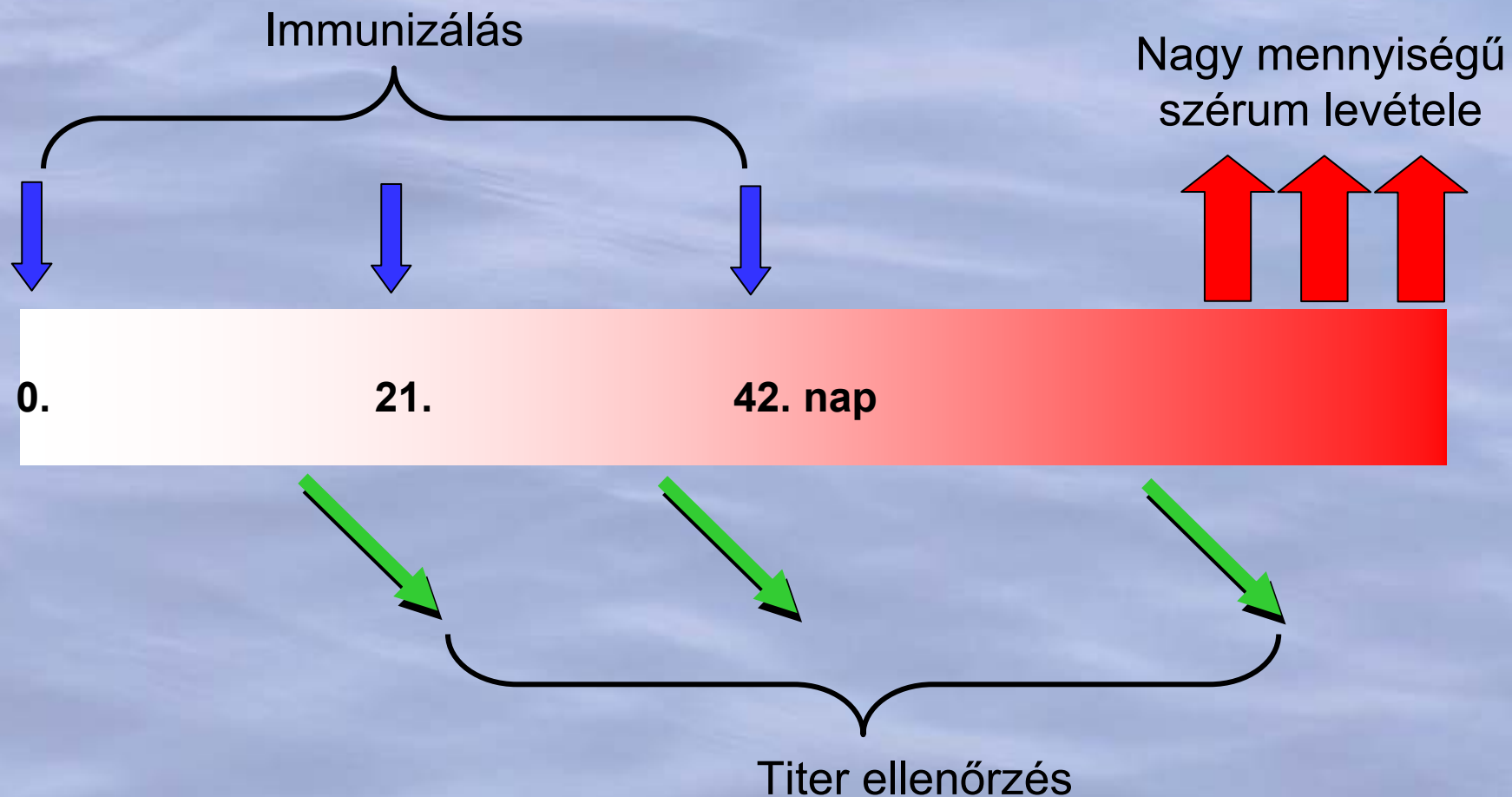
- Gyulladást idéznek elő („veszélyes környezet” stimulus)
- Depót képeznek, lassítják a felszívódást, lebomlást

## Típusai

- Freund-adjuvász (olaj alapú, +/- *M. tuberculosis* sejtfal)
- Alumínium-hidroxid (?) +/- bakteriális komponensek
- ISCOM (Immune Stimulating Complexes)
- Szabadalmaztatott kémiai adjuvászok (TiterMax, RAS)
- Biológiai adjuvászok (C3dg bevont Ag)

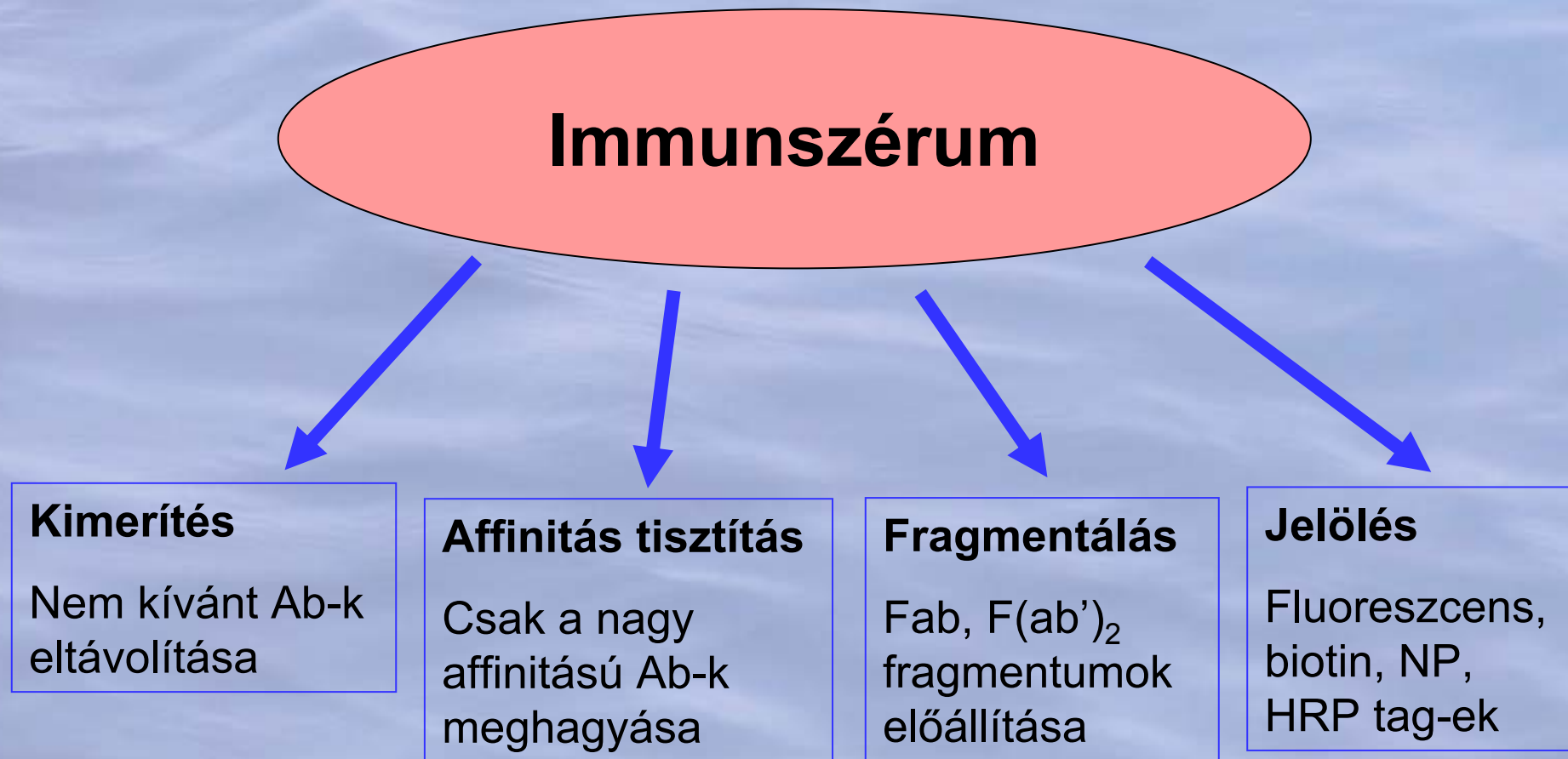


# Ellenanyag előállítás - poliklonális



# Ellenanyag előállítás - poliklonális

---





# Ellenanyag előállítás - poliklonális

## Speciális lehetőségek

Humán IgH, Ig $\lambda$  géneket tartalmazó mesterséges kromoszóma bevitele blgH<sup>-/-</sup>, blg $\lambda$ <sup>-/-</sup> szarvasmarhába



Immunizálás



Humán poliklonális ellenanyagok kinyerése nagy mennyiségben

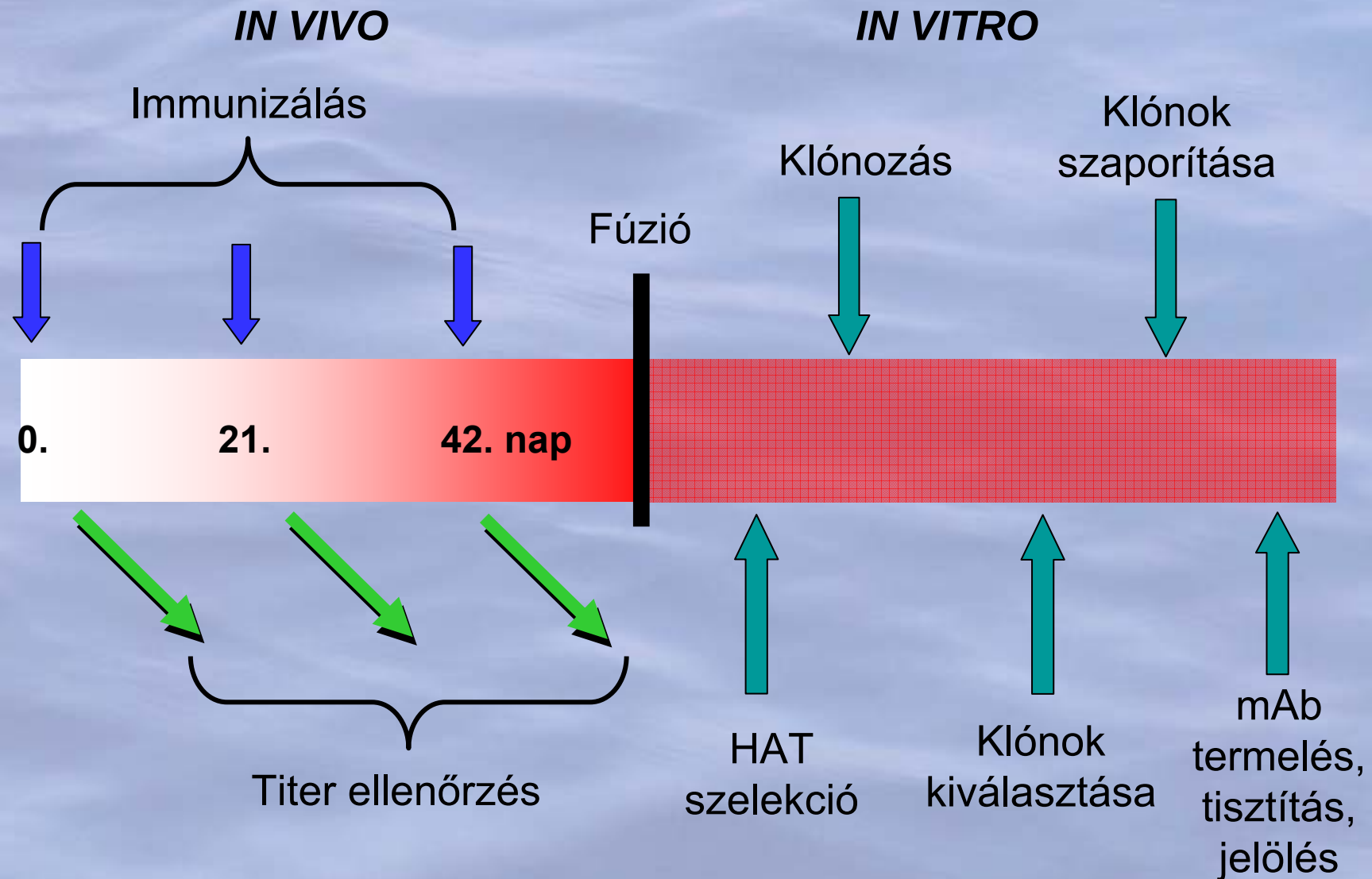
Tyúk immunizálása



Tojásból IgY tisztítás

Előnyök: nem invazív, sok IgY, nagy filogenetikai távolság az emlősöktől, nem kötődik Fc $\gamma$ R-okhoz

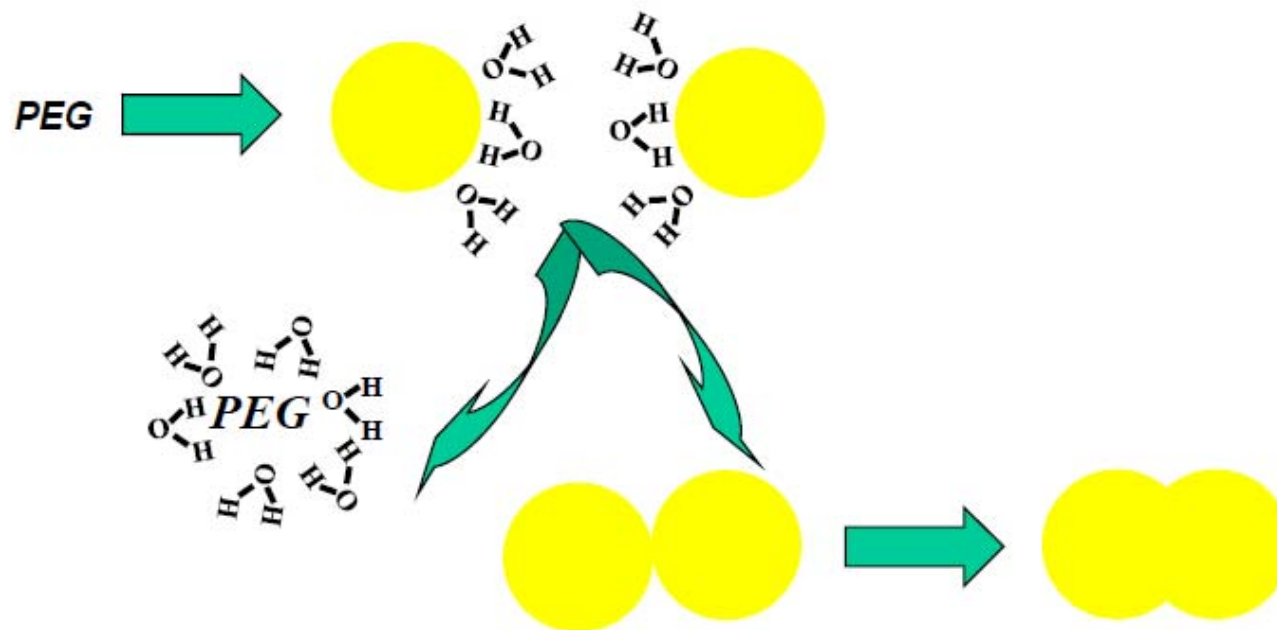
# Ellenanyag előállítás - monoklonális



# Ellenanyag előállítás - monoklonális

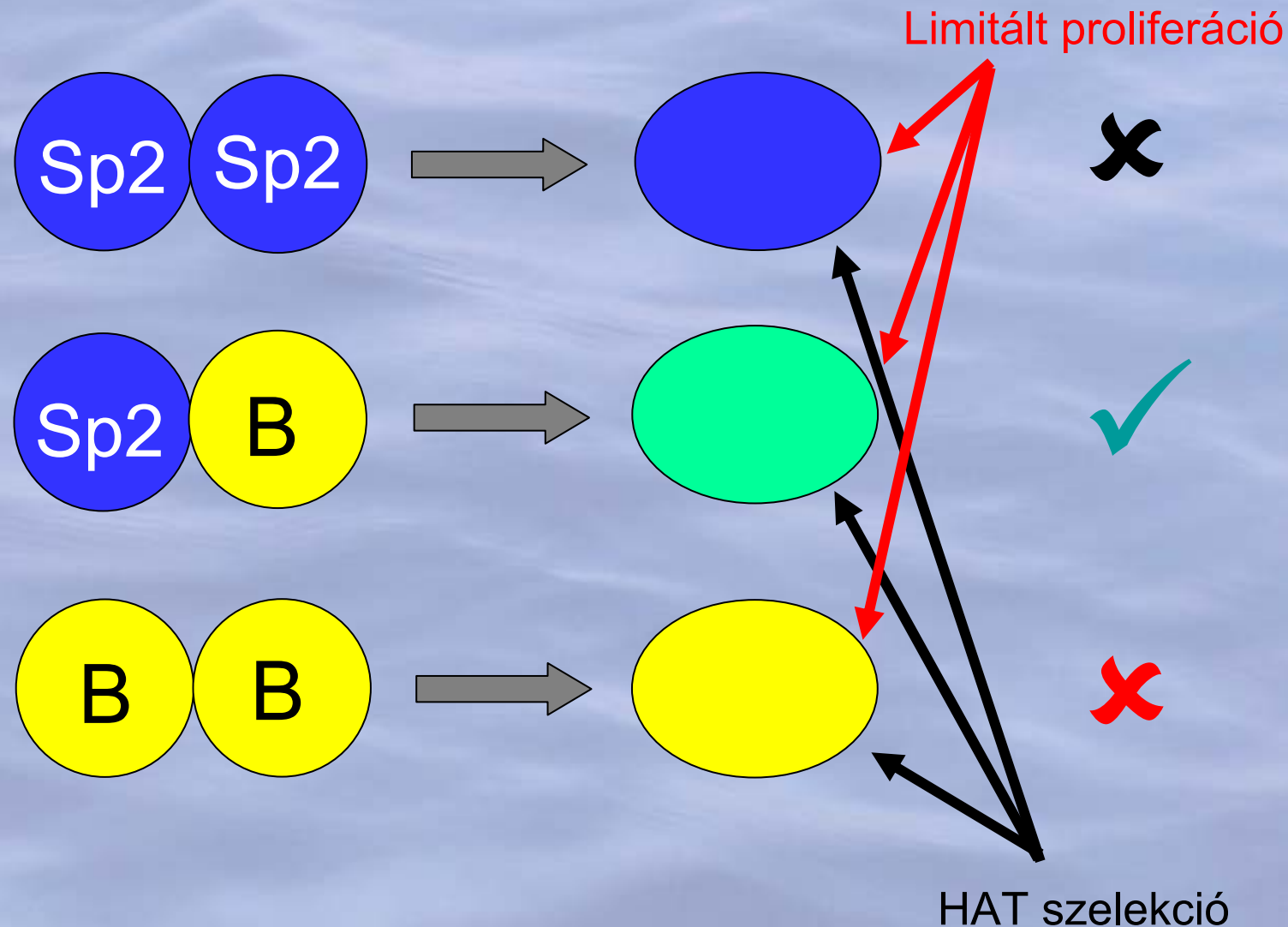
Fúziós partnerek

Ellenanyag termelő B sejt + Sp2/0 egér mielóma (HGPRT<sup>-/-</sup>)



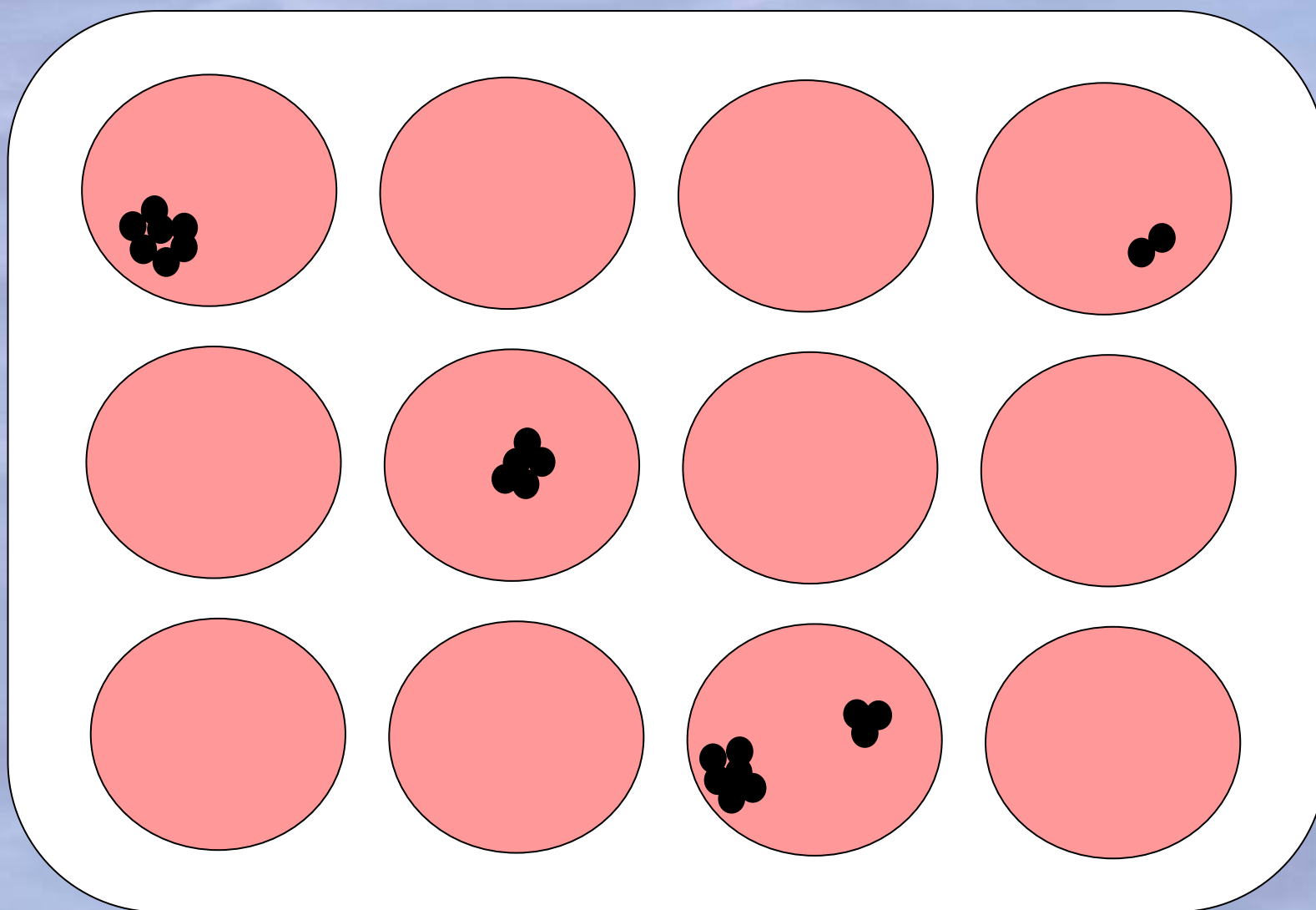
Kacskovics I. után

# Ellenanyag előállítás - monoklonális

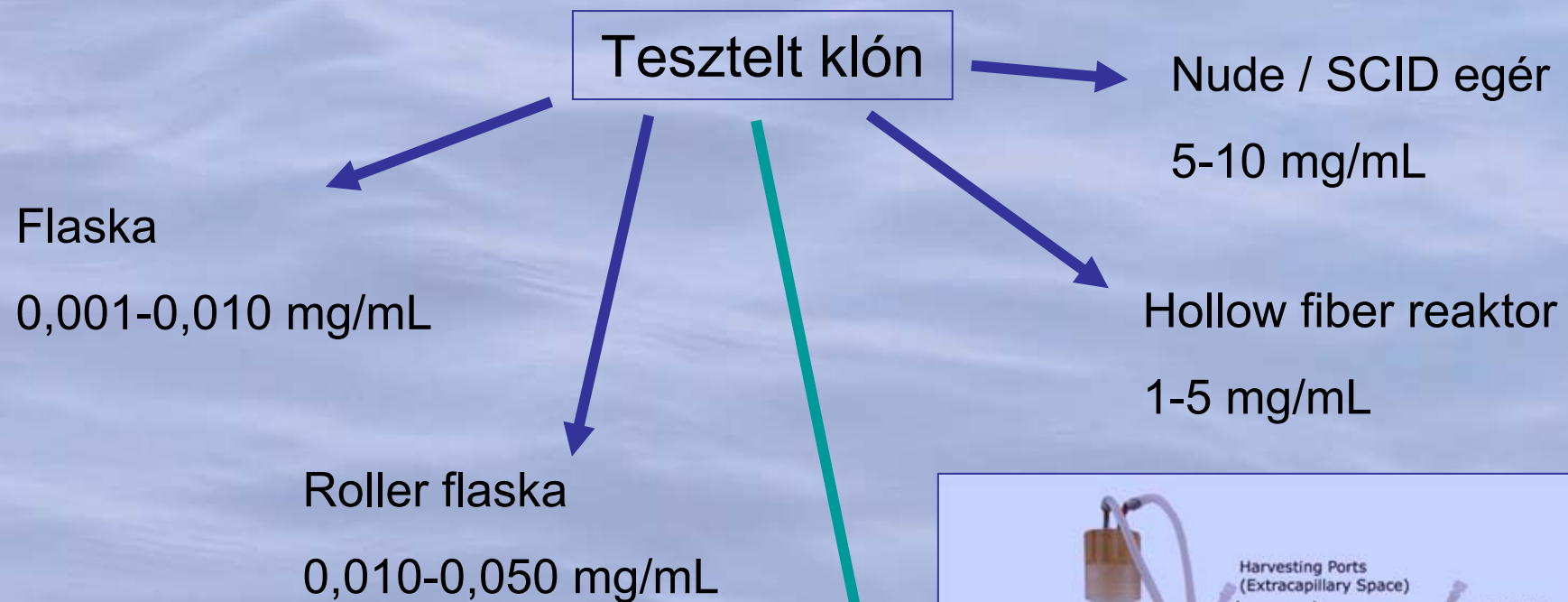


# Ellenanyag előállítás - monoklonális

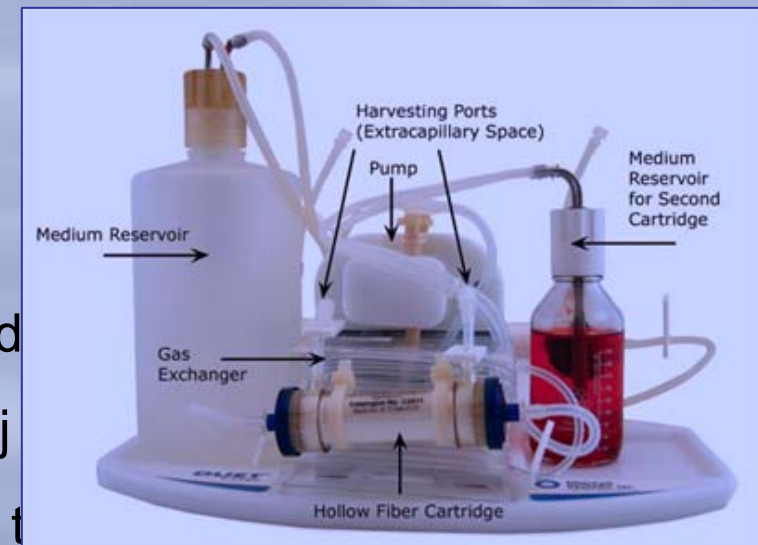
---



# Ellenanyag előállítás - monoklonális

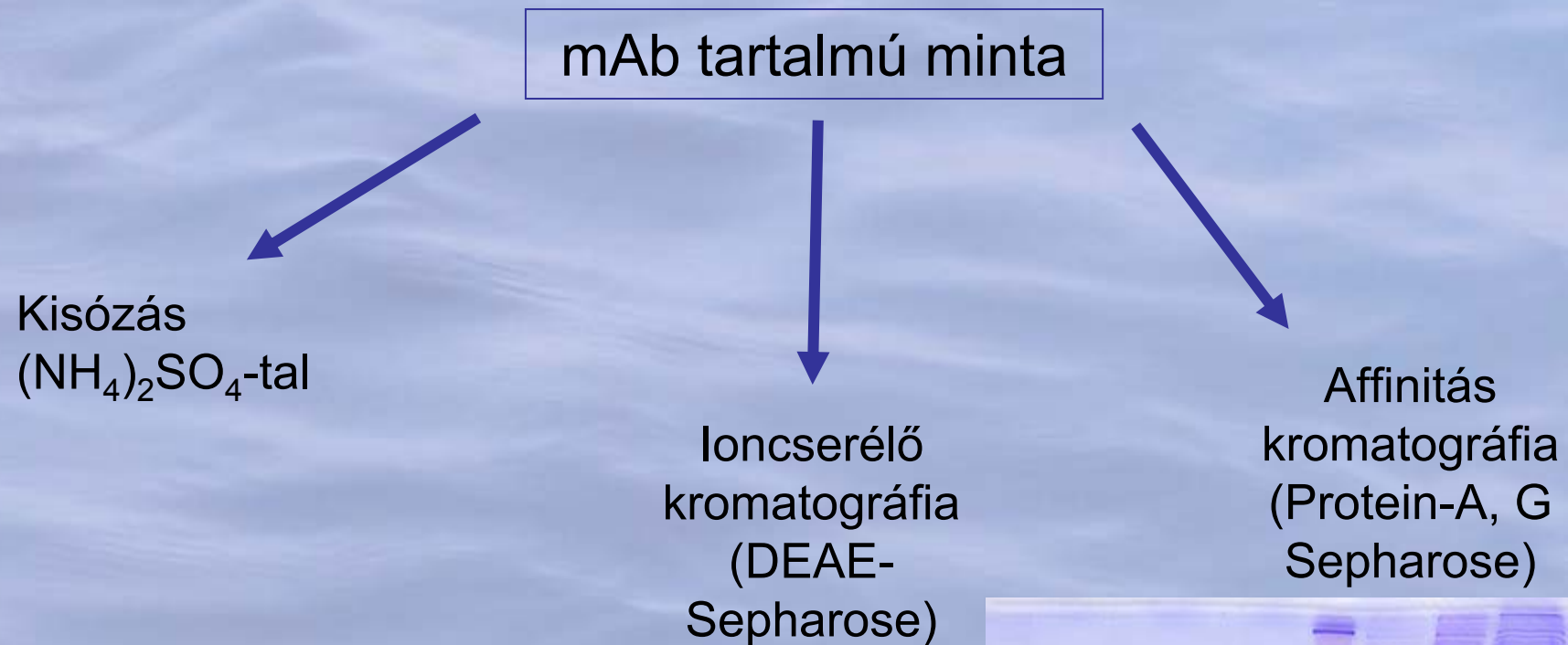


Transzgén mód  
Tg kecske – tej  
(olcsó, könnyű t

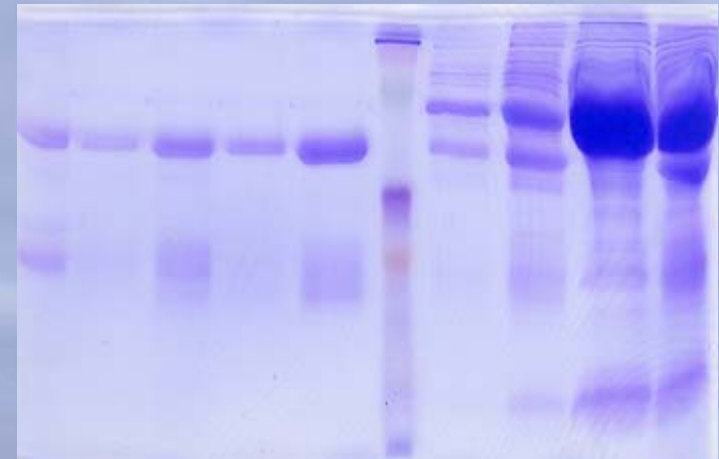




# Ellenanyag előállítás - monoklonális



Ellenőrzés PAGE-val!!!



# Ellenanyagok módosítása

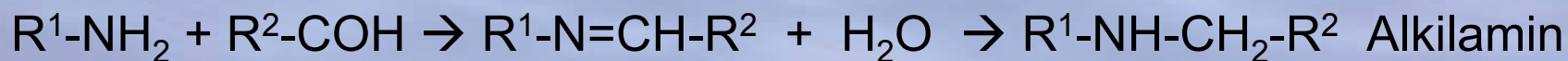
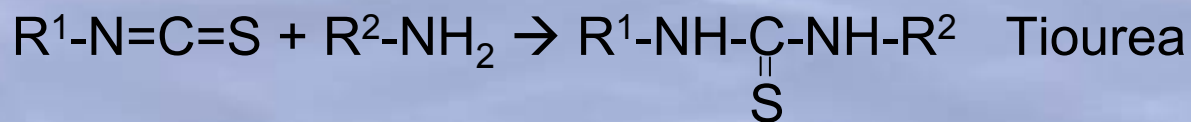
---

- ◆ Kémiai módosítás, jelölés
- ◆ Biológiai hasítás
- ◆ Géntechnológiai módosítások

# Ellenanyagok módosítása

Leggyakrabban

- Lizil oldallánc támadása izotiocianát, szukcinilimid, szulfonil-klorid csoportokkal, vagy glutáraldehid kapcsolómolekula segítségével más fehérjékkel
- Cukoroldallánc oxidálása után aldehid reakció aminnal (Schiff-bázis)

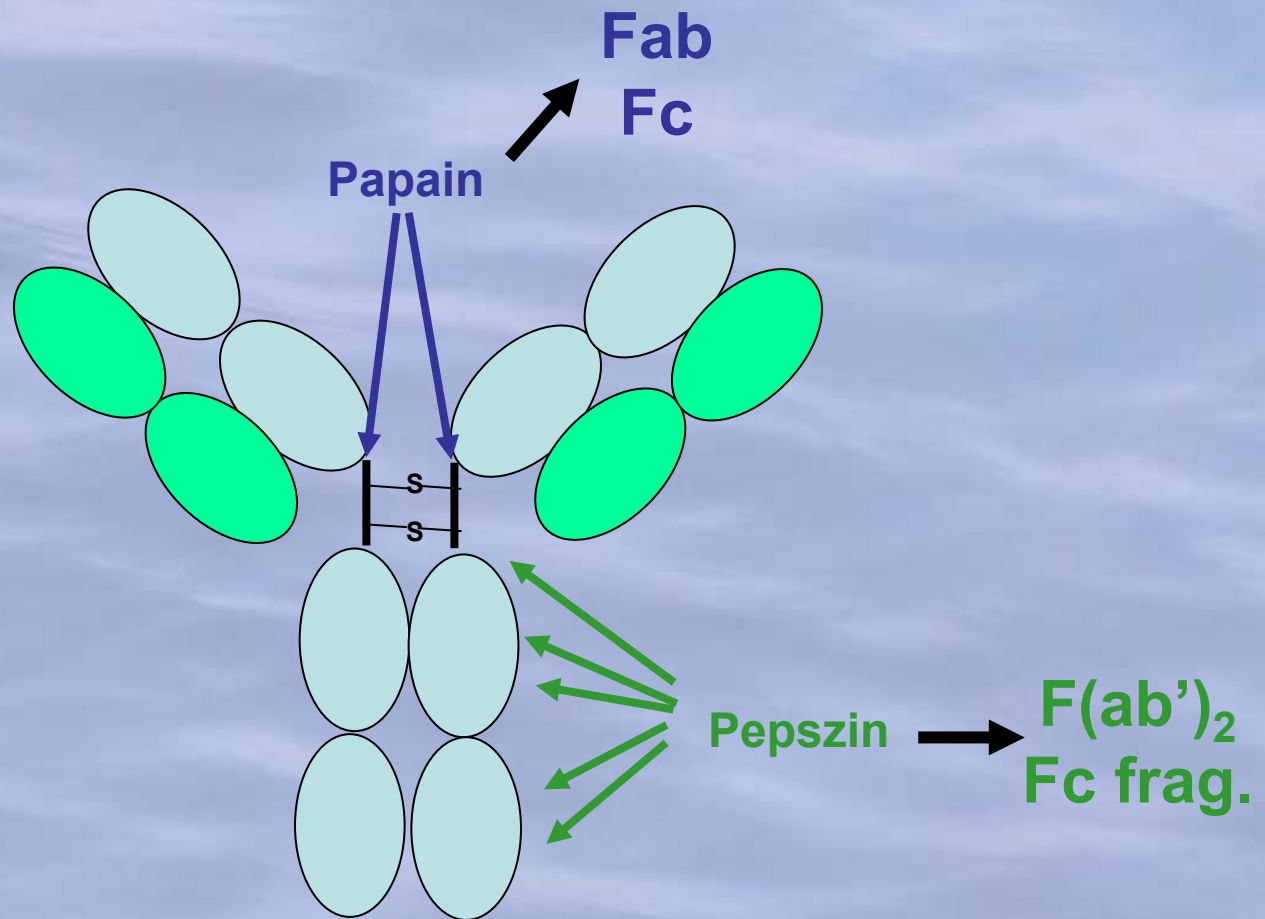


Hasznos infó: Molecular Probes - Handbook of  
Fluorescent Probes and Research Chemicals

# Ellenanyagok módosítása

## Emésztés

- Papain
- Pepszin
- Tripszin
- Ficin

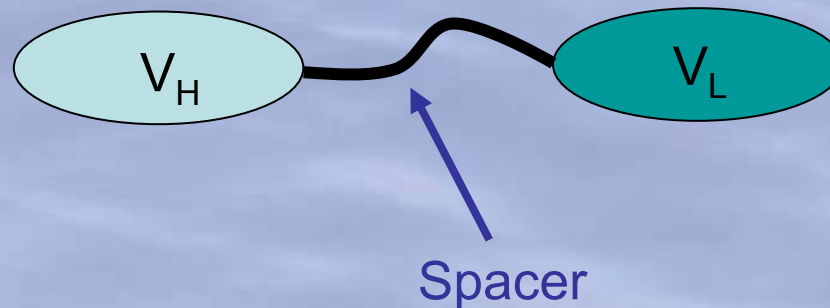


# Ellenanyagok módosítása

---

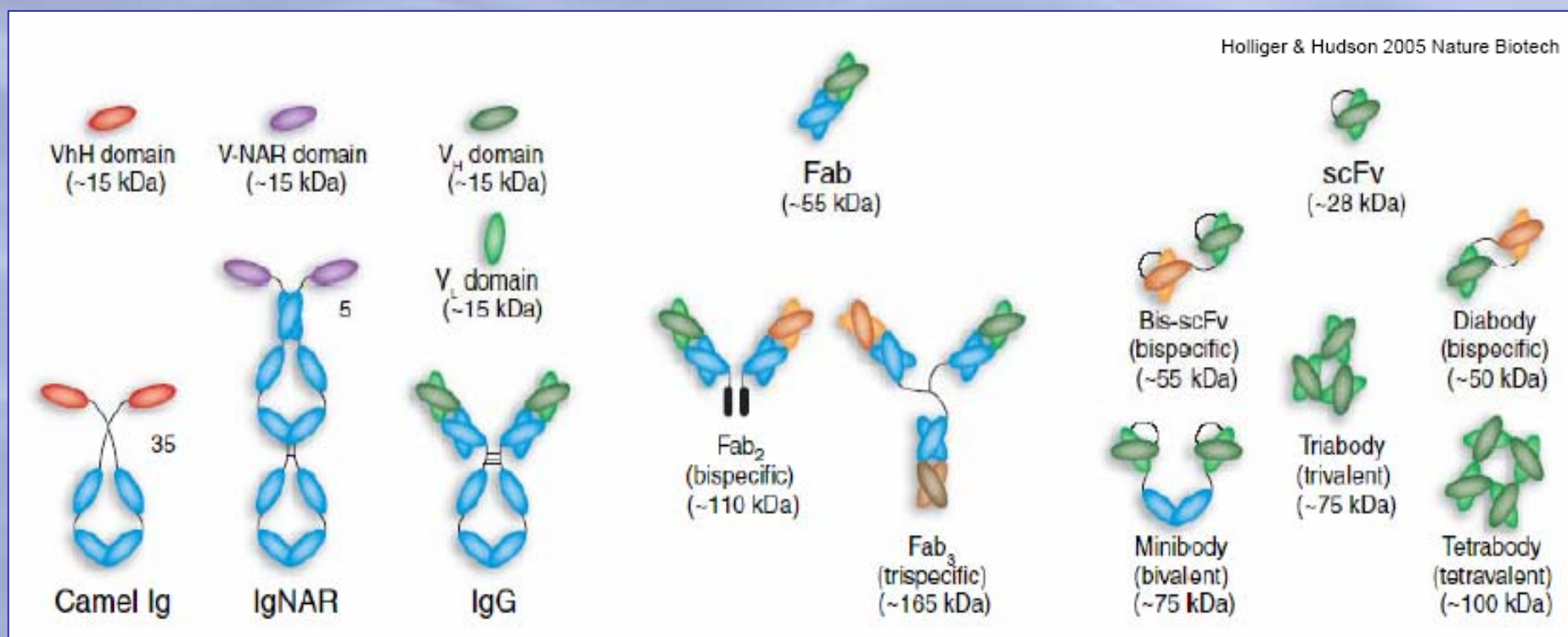
## Speciális ellenanyagformák (génteknológia)

**scFv** – egyláncú,  $V_H$ - $V_L$  egy peptidként történő szintézise, fág könyvtárból szelektálva, vagy ismert monoklonális szekvenciájából



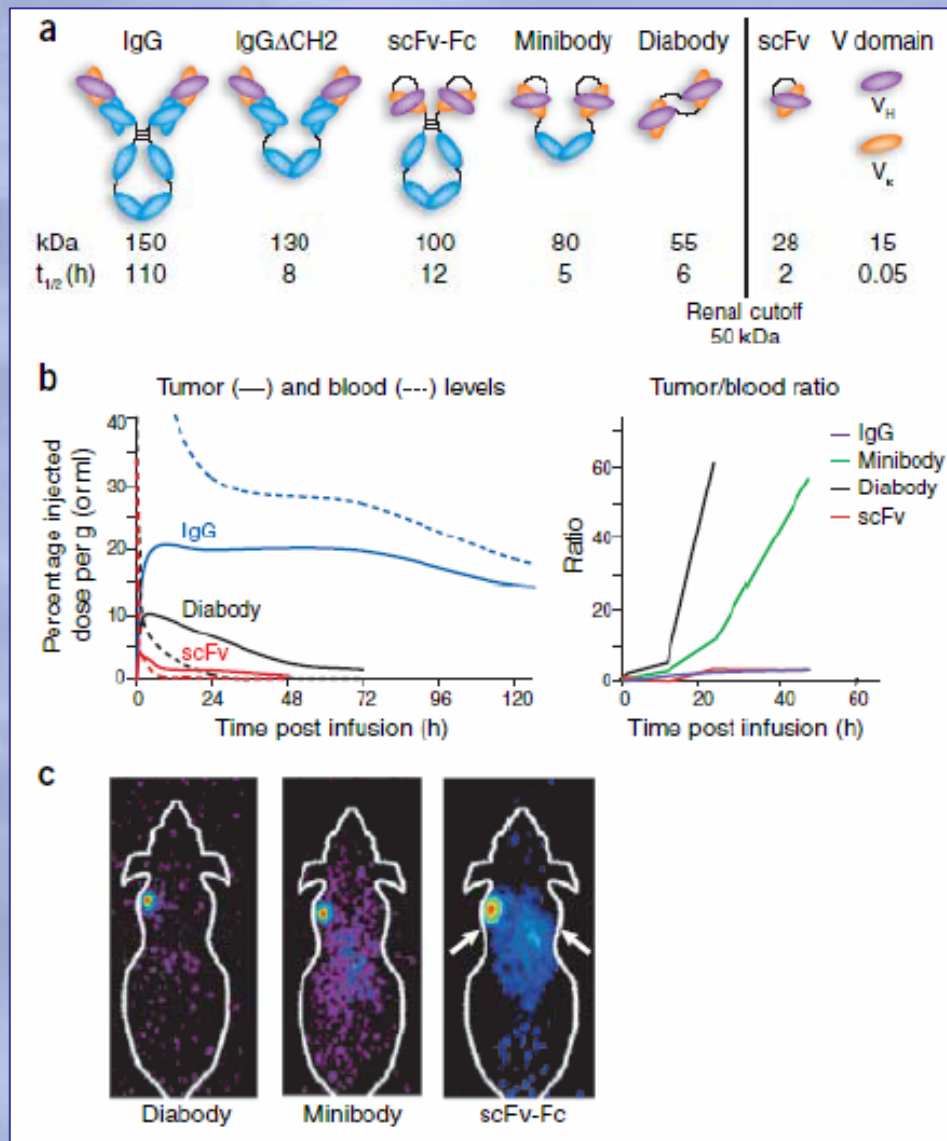
# Ellenanyagok módosítása

## Speciális ellenanyagformák (géntechnológia)





# Ellenanyagok módosítása



## Szempontok

- Valencia – aviditás
- Méret – diffúzió
- Fc – effektor funkció
- Teljes térszerkezet – Ag/Ab kapcsolat
- Szekvencia - féléletidő

# Ellenanyagok módosítása

---

**Humán terápiás ellenanyagok (cél a neutralizáló Ab válasz elkerülése)**

Egér monoklonális



Kiméra ellenanyag (C régiók humán, V régiók egér eredetűek)



CDR graft ellenanyagok (csak a CDR egér eredetű)



Fág display szintetikus ellenanyagok



Transzgenikus humán ellenanyagok

The background of the slide is a close-up photograph of water with gentle ripples, creating a textured, blue-grey surface.

# Poliklonális vs. monoklonális

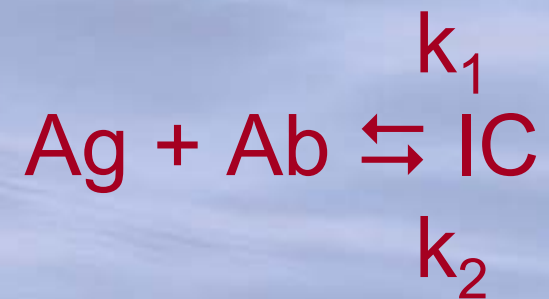
# Gyakran használt fogalmak

---

- ◆ Affinitás / aviditás
- ◆ Specificitás / szenzitivitás
- ◆ Keresztreakció / polireaktivitás
- ◆ Háttérreakció / aspecifikus reakció

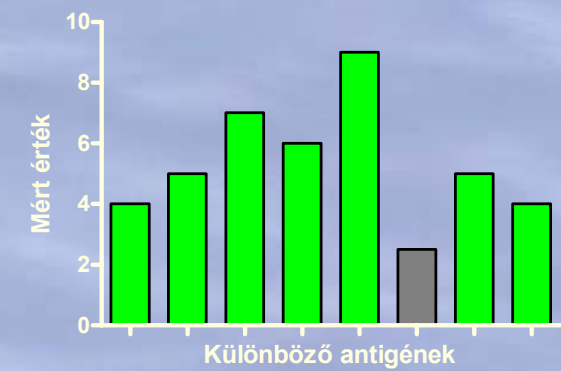
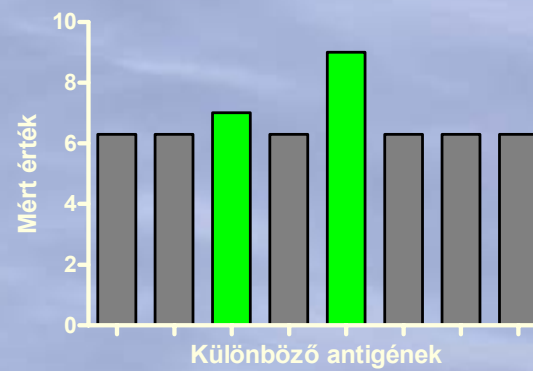
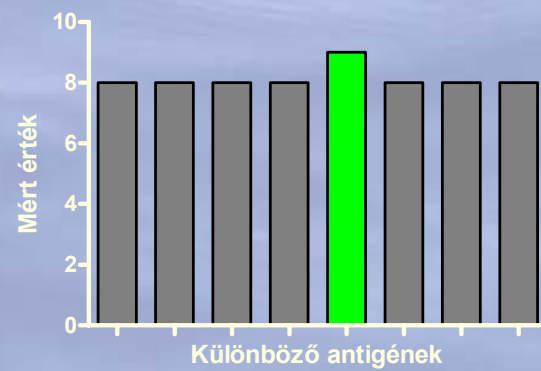
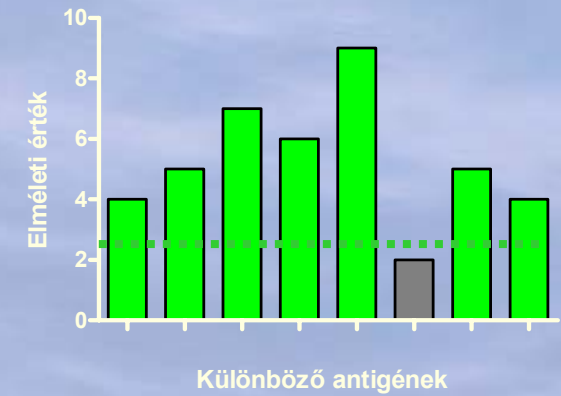
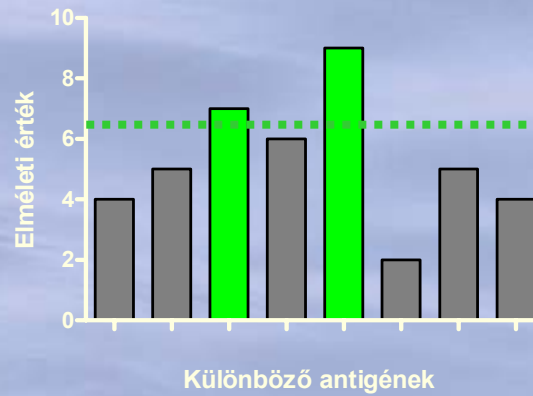
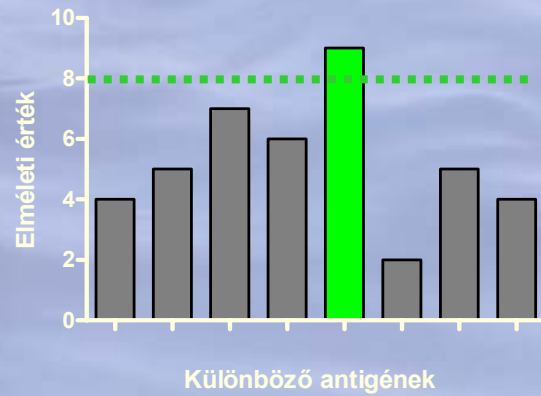
# Affinitás / aviditás

---



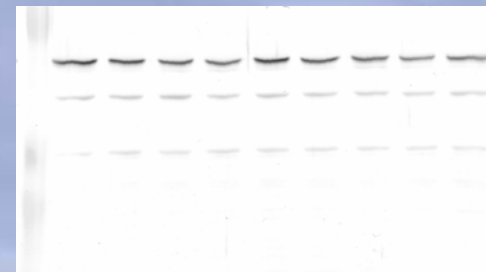
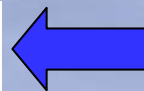
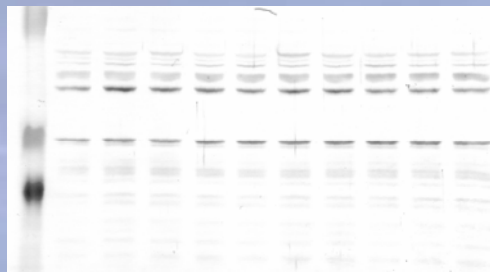
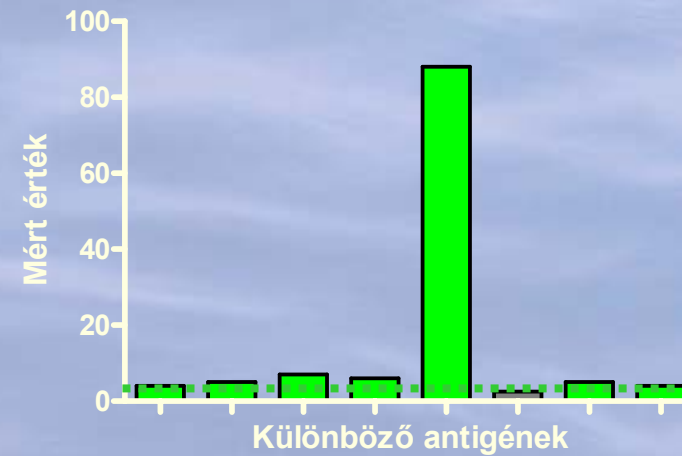
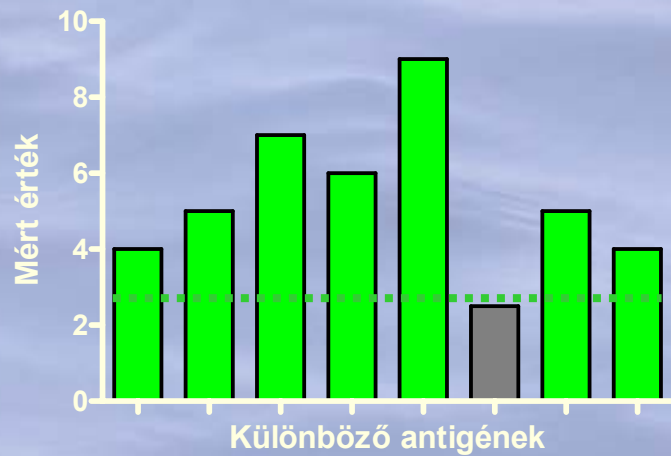
$$K_d = [\text{Ag}][\text{Ab}] / [\text{IC}] = k_2 / k_1$$

# Specifitás / szenzitivitás





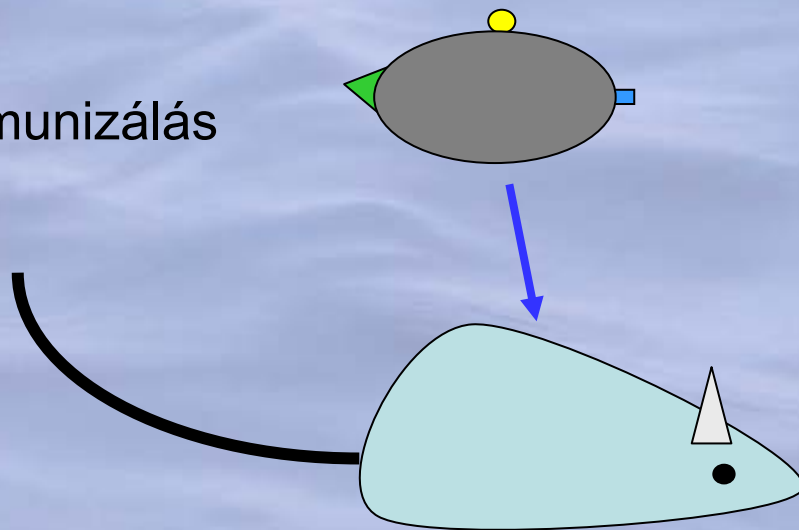
# Specifitás / szenzitivitás



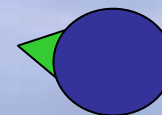
# Keresztreakció / polireaktivitás

---

Immunizálás

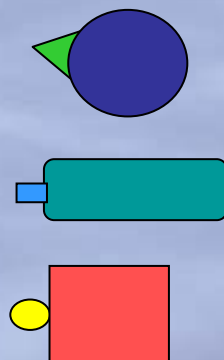


Célantigén

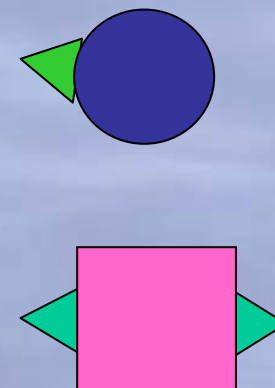


---

Poliklonális

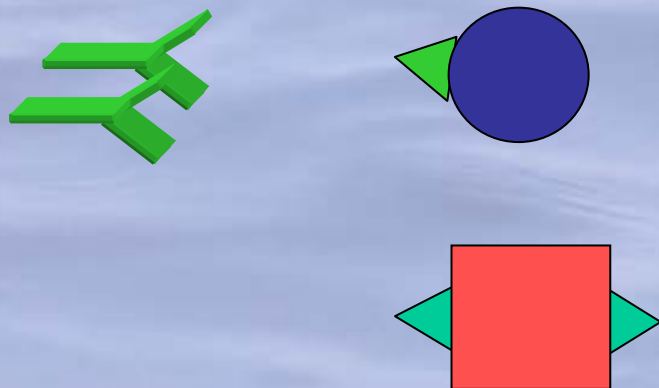


Monoklonális



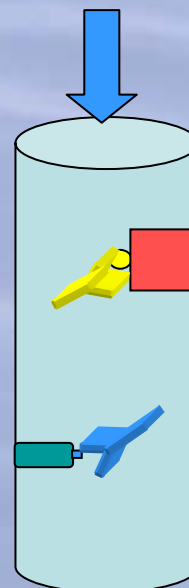
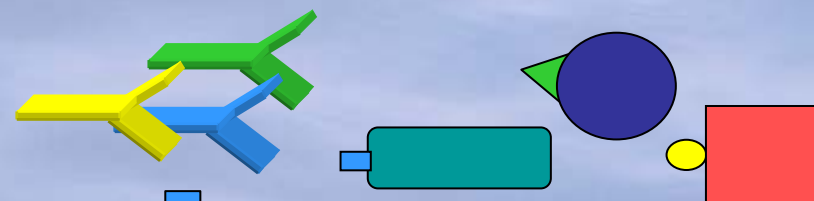
# Keresztreakció / polireaktivitás

Monoklonális



Új monoklonális keresése, előállítása (irányított mutagenézis?) ☹

Poliklonális

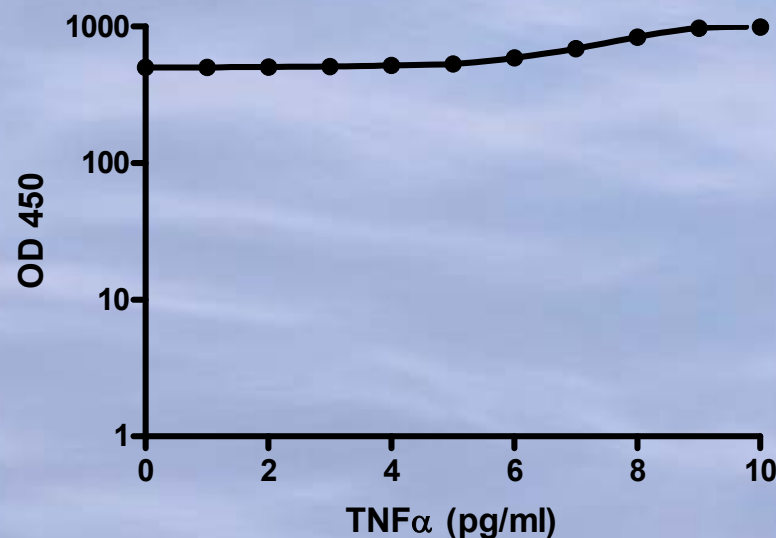
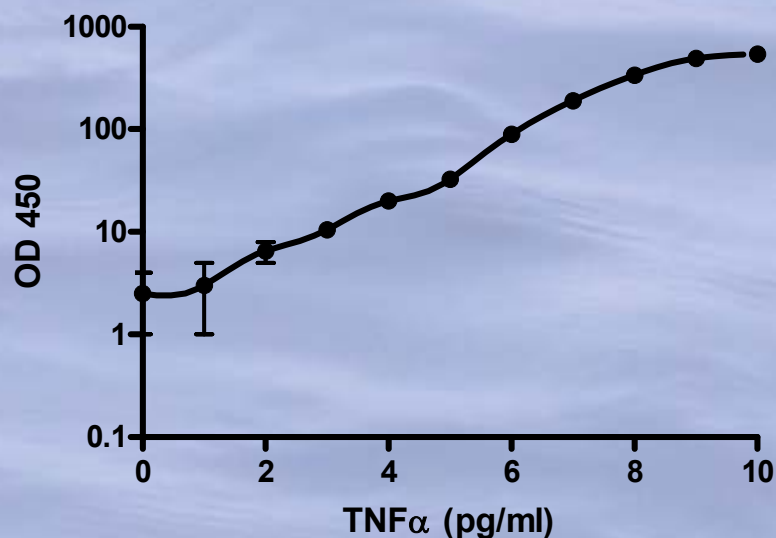


Kimerítés

(affinitás kromatográfia)

☺ / ☹

# Háttérreakció / aspecifikus reakció



Ok: a minta valamely hordozókomponenséhez történő kötődés, nem feltétlenül a CDR-régióon keresztül

(általános fehérje/fehérje, ill. fehérje/polimer reakció, ellenanyag Fc-receptorhoz való kötődése)

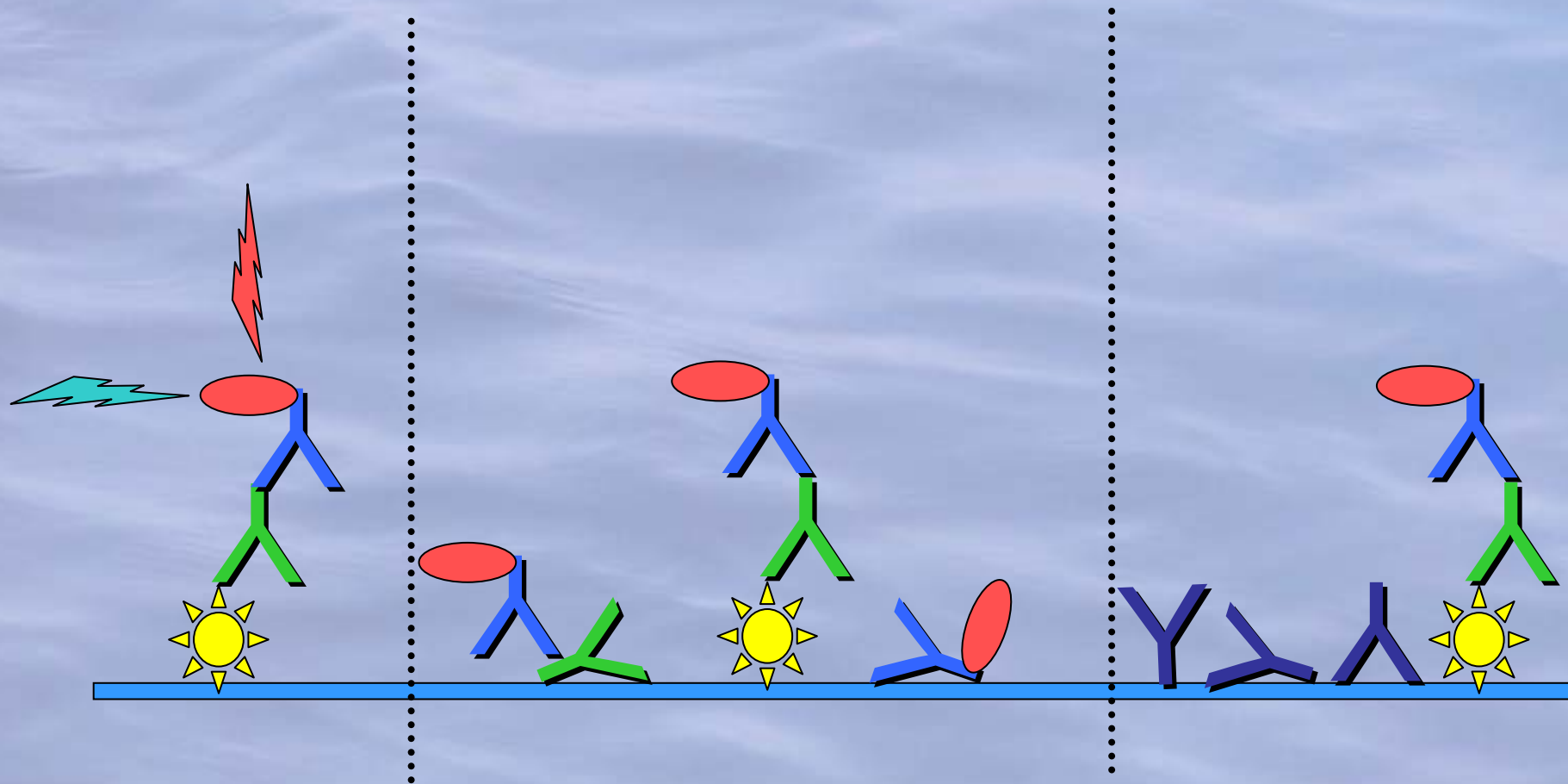
# Háttérreakció / aspecifikus reakció

---

Megoldások:

1. Blokkolás – a potenciális ellenanyag kötő felszínek lefedése olyan anyaggal, amivel nem keresztreagál az ellenanyag (BSA, kazein, zselatin, tejpor, szérum)
2. Detergens használata (1-féle detergens terjedt el az ilyen típusú reakcióknál – Tween 20 – a kb. 100-féle másra általánosan használt reagensből!!!)
3. Ionerő megváltoztatása (van reakció, ami 1 M NaCl-ben optimális!)
4. Inkubációs idők optimalizálása ( $k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$ )
5. Megfelelő módszer megválasztása
6. Új ellenanyag keresése/ előállítása

# Háttérreakció / aspecifikus reakció





# Poliklonális vs. monoklonális

| Jellemzők            | Poliklonális         | Monoklonális             |
|----------------------|----------------------|--------------------------|
| Specifititás         | Heterogén            | Homogén ?                |
| Affinitás            | Heterogén            | Homogén                  |
| Izotípus             | Heterogén            | Homogén                  |
| Keresztreakció       | Gyakori              | Nincs ?                  |
| Előállítási idő      | 2 hónap              | 4-12 hónap               |
| Előállítási költség  | Ag + 10-100 eFt      | Ag + 500-2000 eFt        |
| Infrastruktúra igény | Olcsó, egyszerű      | Drága, speciális         |
| Szakértelem igény    | Közepes              | Magas                    |
| Immunizálás          | Tiszta antigénnel    | Akár nyers keverékkel is |
| Mennyiség            | Nagy, de korlátozott | Korlátlan, de drága      |
| Gazdaszervezet       | Nyúl, kecske, birka  | Egér, patkány, (nyúl)    |

# Poliklonális vs. monoklonális

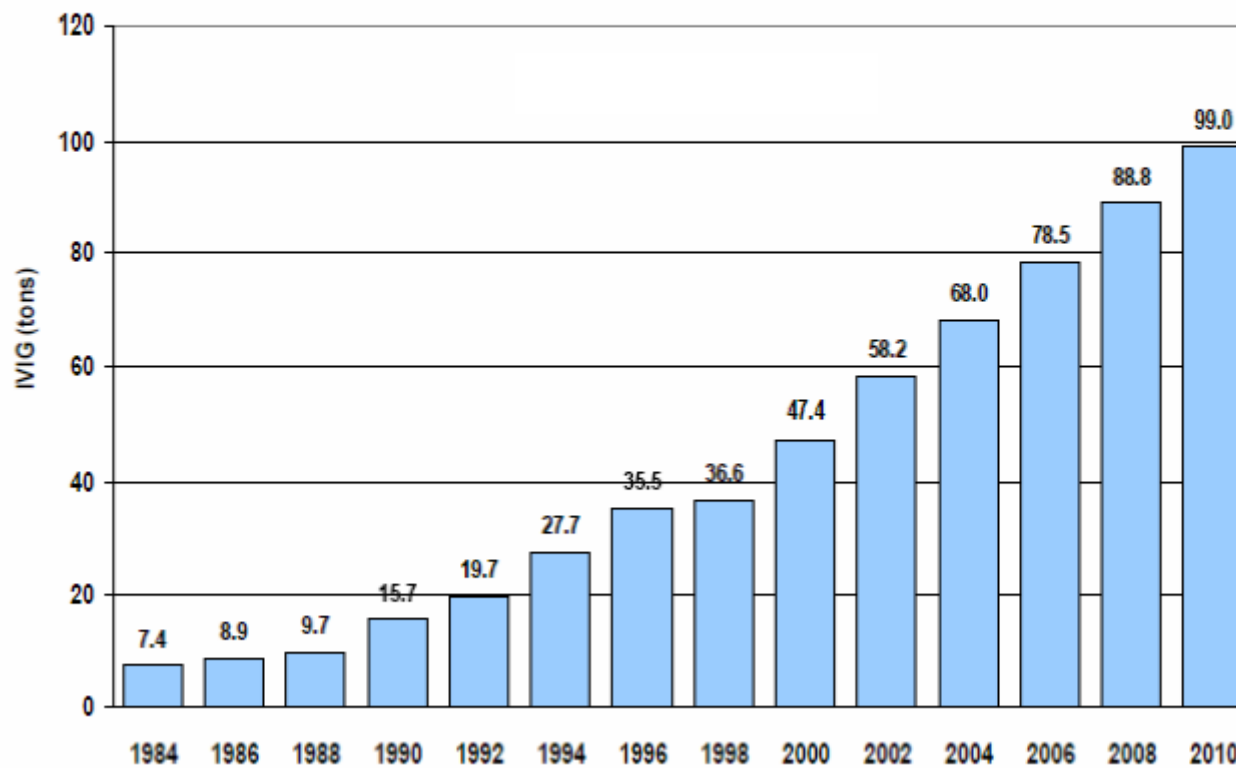
---

| Poliklonális                    | Monoklonális        |
|---------------------------------|---------------------|
| Immunprecipitáció               | ELISA               |
| Agaróz immundiffúzió            | Western-blot        |
| Immunogold (elektronmikroszkóp) | FACS                |
| ELISA                           | Primer ellenanyagok |
| Western-blot                    | FRET                |
| Szekunder ellenanyagok          | Bead-array          |
| Komplement aktivációs tesztek   | Nano-Pro            |
| Vírusneutralizáció              | Immunszcintigráfia  |
| Affinitás kromatográfia         | MAb terápia         |
| IVIG                            |                     |

# Poliklonális vs. monoklonális



## Worldwide need of immunoglobulins



# Jövő heti program...

---

Analitikai módszerek - részletesebben