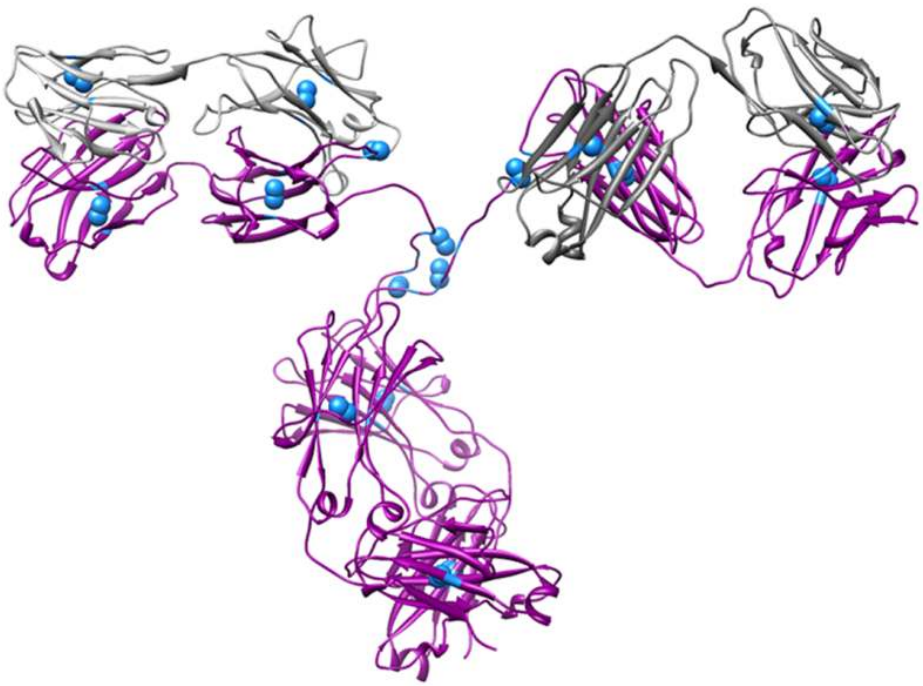
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ & ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ

Διπλωματική Εργασία

Υπολογιστική βελτιστοποίηση της διαλυτότητας των μονοκλωνικών αντισωμάτων που δρουν ενάντια σε καρκινικά κύτταρα



Γριμανέλλη Βασιλική
Πτυχιούχος Τμήματος Πληροφορικής,
Οικονομικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Αθήνα, Ιούλιος 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Καθηγητής Σταύρος Ι. Χαμόδρακας (επιβλέπων)**

   Τμήμα Βιολογίας

   Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

2. **Επίκουρος Καθηγητής Παντελής Γ. Μπάγκος**

   Τμήμα Πληροφορικής με εφαρμογές στη Βιοϊατρική

   Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3. **Λέκτορας Βασιλική Α. Οικονομίδου**

   Τμήμα Βιολογίας

   Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Στους γονείς μου,

Παναγιώτη & Άννα

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ 6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 9
ABSTRACT 10
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ 12
1.1 ΑΝΟΣΙΑ 12
1.1.1 ΕΜΦΥΤΗ ΑΝΟΣΙΑ 12
1.1.2 ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΙΑ 13
1.2 ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ 14
1.3 ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΑΠΑΡΤΙΖΟΥΝ ΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ 14
1.3.1 ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ 15
1.3.1.1 Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ 17
1.3.1.2 Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ 19
1.3.2 ΑΝΤΙΓΟΝΟΠΑΡΟΥΣΙΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ 24
1.4 ΕΠΙΤΟΠΟΙ 26
1.4.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ Β ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ 28
1.4.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ 30
1.5 ΑΝΟΣΟΓΟΝΟ - ΑΝΤΙΓΟΝΟ 30
1.6 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΕΣ 31
1.7 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ 34
1.7.1 ΤΑΞΕΙΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ 36
1.7.1.1 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗ G 36
1.7.1.2 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗ A 37
1.7.1.3 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗ E 39
1.7.1.4 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗ M 40
1.7.1.5 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗ D 41
1.7.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ 42
1.7.2.1 ΟΨΩΝΙΣΜΟΣ 42
1.7.2.2 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ 42
1.7.2.3 ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΣΟΛΑΒΗΤΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ 44

1.8 ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ 46
1.8.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ 46
1.8.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΥΒΡΙΔΩΜΑΤΑ 48
1.8.2.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ. 51
1.8.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ 53
1.8.3.1 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ 53
1.8.3.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΓΚΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ 54
1.8.3.3 ΘΑΝΑΤΩΣΗ ΟΓΚΩΝ 54
1.8.3.4 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ 55
1.8.3.5 ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΙΣ ΟΡΓΑΝΩΝ ΚΑΙ ΙΣΤΩΝ 55
1.8.3.6 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ 56
1.8.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ 56
1.8.5 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ 59
1.8.6 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ 59
1.9 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΥΣΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ... 61
1.10 ΣΚΟΠΟΣ 63
1.11 ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΤΟΧΕΥΟΥΝ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ .. 64
1.11.1 ALEMTUZUMAB 64
1.11.2 BEVACIZUMAB 66
1.11.3 CETUXIMAB 67
1.11.4 OFATUMUMAB 69
1.11.5 PERTUZUMAB 71
1.11.6 RITUXIMAB 73
1.11.7 TRASTUZUMAB 75
1.12 ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ 78
1.12.1 DrugBank 78
1.12.2 RCSB PDB 78
1.12.3 IMGT® 79
1.13 ΕΡΓΑΛΕΙΑ 80
1.13.1 ClustalW 80
1.13.2 AMYLPRED2 80

1.13.3 DSSP 80
1.13.4 Modeller9v11 81
1.13.5 WHAT IF 81
1.13.6 PROCHECK 82
1.13.7 PYMOL 82
1.13.8 UCSF Chimera 1.6.2 82
2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ 84
2.1 ΓΕΝΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΠΟΡΕΙΑΣ ΕΡΕΥΝΑΣ 84
2.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ 85
2.3 ΕΥΡΕΣΗ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΠΟΥ ΤΕΙΝΟΥΝ ΝΑ ΠΡΟΚΑΛΕΣΟΥΝ ΣΥΣΣΩΜΑΤΩΣΗ 88
2.4 ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΜΙΝΟΞΙΚΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ ΠΟΥ ΘΑ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΘΟΥΝ 89
2.5 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΝΕΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΩΝ ΔΟΜΩΝ 92
2.6 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ 93
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ 96
3.1 ALEMTUZUMAB 98
3.2 BEVACIZUMAB 101
3.3 CETUXIMAB 104
3.4 OFATUMUMAB 107
3.5 PERTUZUMAB 110
3.6 RITUXIMAB 113
3.7 TRASTUZUMAB 116
3.8 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ 119
4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 135
4.1 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ 138
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 139
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 139

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με θέμα «Υπολογιστική βελτιστοποίηση της διαλυτότητας των μονοκλωνικών αντισωμάτων που δρουν ενάντια σε καρκινικά κύτταρα», εκπονήθηκε στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην Βιοπληροφορική, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Σταύρου Ι. Χαμόδρακα και των μελών της εξεταστικής επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή Παντελή Γ. Μπάγκο και την Λέκτορα Βασιλική Α. Οικονομίδου.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Σταύρο Χαμόδρακα, καθώς μου εμπιστεύτηκε μία πολύ ξεχωριστή και ιδιαίτερη διπλωματική εργασία σε έναν ραγδαία αναπτυσσόμενο τομέα της επιστήμης, υλοποιώντας έτσι την αρχική μου επιθυμία και δίνοντάς μου την ευκαιρία να εμβαθύνω στο συγκεκριμένο επιστημονικό πεδίο, καθώς και να διευρύνω τους ορίζοντες των γνώσεών μου. Μέσα από την διδασκαλία του, καθ' όλη τη διάρκεια των μαθημάτων του μεταπτυχιακού, ήταν πάντα διαθέσιμος, με τις επιστημονικές του γνώσεις και συμβουλές να λύσει οποιαδήποτε απορία. Αλλά και μέσα από την προσωπική επαφή, η καθοδήγησή του και οι ιδέες του ήταν καθοριστικές και πολύτιμες για την διεξαγωγή της παρούσας έρευνας. Τον ευχαριστώ θερμά, για όλες τις ερευνητικές συζητήσεις που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της εκπόνησης αυτής, αλλά και σε ευρύτερο πλαίσιο, καθώς, μέσα από τις εβδομαδιαίες συναντήσεις ολόκληρου του εργαστηρίου, μου έδωσε την ευκαιρία να ακούσω για τις έρευνες και τις μελέτες των συναδέρφων-συμφοιτητών μου, μέσα από τις οποίες διεξάγονταν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες συζητήσεις που αποτέλεσαν πηγή περαιτέρω γνώσεων σε διάφορους τομείς της επιστήμης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στη Λέκτορα Βασιλική Α. Οικονομίδου για την τιμή που μου κάνει να είναι μέλος της τριμελής εξεταστικής επιτροπής της διπλωματικής μου εργασίας, για όλες τις γνώσεις που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια των μαθημάτων, αλλά και για τη γενικότερη

παρουσία της και την τεράστια συμβολή της για την ομαλή λειτουργία του εργαστηρίου.

Ακόμα, επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Επίκουρο Καθηγητή Παντελή Γ. Μπάγκο, που μου έκανε την τιμή να είναι μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, καθώς επίσης και για όλες τις διαλέξεις και τις γνώσεις που μου μετέφερε κατά τη διάρκεια των μαθημάτων του μεταπτυχιακού.

Στη συνέχεια, ένα πολύ μεγάλο και θερμό ευχαριστώ οφείλω στους Δρ. Μαργαρίτα Θεοδωροπούλου και Δρ. Γεώργιο Τσαούση, αρχικά για τη διδασκαλία τους στα πλαίσια των μαθημάτων της μεταπτυχιακής ειδίκευσης, αλλά και για την πολύτιμη βοήθειά τους σε όλη την πορεία της παρουσίας μου στον Τομέα. Και οι δύο ήταν πάντα δίπλα μου, σαν επιστήμονες και φίλοι, διαθέτοντας απαντήσεις και λύσεις σε όποια απορία ή σε όποιο προβληματισμό ή δυσκολία αντιμετώπισα. Οι συμβουλές τους, αλλά και οι ερευνητικές συζητήσεις μαζί τους αποτέλεσαν πηγή έμπνευσης για την περαιτέρω βελτίωση της συγκεκριμένης εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Δρ. Νικόλαο Παπανδρέου και Δρ. Ζωή Λίτου για την διδασκαλία τους καθ' όλη τη διάρκεια των μαθημάτων της μεταπτυχιακής ειδίκευσης. Η παρουσία τους στο συγκεκριμένο εργαστήριο, αλλά και στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, αποτελεί βασικό πυλώνα για την ομαλή λειτουργία του, και διασφάλιση του ευχάριστου και φιλικού περιβάλλοντος που σχηματίζουν ένα πρόσφορο έδαφος για την εκπόνηση μιας διπλωματικής εργασίας.

Στη συνέχεια, ευχαριστώ ιδιαίτερα τους υποψήφιους Διδάκτορες Παρασκευή Τσιολάκη και Νικόλαο Λούρο για τις εύστοχες συμβουλές τους, την άμεση επίλυση επιστημονικών δυσκολιών που μπορεί να αντιμετώπισα, τις εποικοδομητικές συζητήσεις στα ερευνητικά μας αντικείμενα αλλά και για την ευρύτερη αλληλεπίδραση που είχαμε στην διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής και ιδιαίτερα το εργαστήριο Βιοπληροφορικής, που με

φιλοξένησε και μου παρείχε όλα τα απαραίτητα μέσα και τον εξοπλισμό κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες, θέλω να αποδώσω σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου, για τον κάθε ένα ξεχωριστά αλλά και ως σύνολο, καθώς ολοκληρώνοντας την παραμονή μου στο εργαστήριο γνώρισα καλούς και άξιους συναδέρφους αλλά και φίλους.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς οφείλω στην οικογένειά μου και τους φίλους μου, καθώς η στήριξή τους, η εμπιστοσύνη τους στις δυνατότητές μου και η εμψύχωση που μου παρείχαν, αποτέλεσαν την κινητήριο δύναμη σε όλο το ταξίδι της ερευνητικής μου πορείας από την έναρξη μέχρι και την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι πιθανότατα, η πιο ραγδαία αναπτυσσόμενη και πολλά υποσχόμενη κατηγορία φαρμάκων. Χρησιμοποιούνται θεραπευτικά σε αυτοάνοσα νοσήματα, καρδιαγγειακές και μολυσματικές ασθένειες, στη μεταμόσχευση νεφρών και σε διάφορα είδη καρκίνου. Σημαντικό μειονέκτημα στην αξιοποίηση των αντισωμάτων είναι η τάση που έχουν να σχηματίζουν συσσωματώματα σε υψηλές συγκεντρώσεις, κατά την αποθήκευση και τη χρήση τους. Τα συσσωματώματα αυτά μπορεί να μειώσουν την δραστικότητα των αντισωμάτων, καθώς επίσης να προκαλέσουν ανοσολογικές αποκρίσεις σε ασθενείς. Στην παρούσα έρευνα, μελετήθηκε η τάση ενός συνόλου μονοκλωνικών αντισωμάτων ως προς τον σχηματισμό συσσωματωμάτων. Το σύνολο αυτό αποτελείται από εγκεκριμένα μονοκλωνικά αντισώματα από τον Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA), είναι IgG1 kappa ανοσοσφαιρίνες με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης. Για την πρόγνωση των περιοχών που έχουν την τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος AMYLPRED2. Μελετώντας τις περιοχές αυτές στην τρισδιάστατη δομή των αντισωμάτων, κι έχοντας ως κριτήρια τον βαθμό έκθεσης του κάθε αμινοξικού καταλοίπου στην πρωτεΐνη, έγιναν αντικαταστάσεις αμινοξικών καταλοίπων με εκτεθειμένες τις πλευρικές τους αλυσίδες, ώστε να μην επηρεαστεί η συνολική δομή της πρωτεΐνης. Τα κατάλοιπα αυτά αντικαταστάθηκαν πολλαπλές φορές με άλλα, μέχρι να δοθεί ως αποτέλεσμα η καλύτερη δυνατή ελαχιστοποίηση των επιφανειών με τάση για συσσωμάτωση. Νέα μοντέλα δημιουργήθηκαν, ενεργειακά βελτιστοποιημένα. Η διαδικασία αυτή, μπορεί να γενικευθεί και σε άλλα μονοκλωνικά αντισώματα, οδηγώντας έτσι στην ελάττωση της τάσης για σχηματισμό συσσωματωμάτων, βελτιώνοντας με αυτόν τον τρόπο την διαλυτότητα τους.

ABSTRACT

Monoclonal antibodies (mAbs) represent the most promising and rapidly growing class in therapeutic compounds. They are used in treatment schemes for autoimmune, cardiovascular and infectious diseases, kidney transplantation, and cancer. A major drawback in the exploitation of antibodies is their tendency to form aggregates, when delivered in high concentrations in their storage and usage. Aggregates may result in reduction of antibody therapeutic activity, while severe immunological responses in patients have also been recorded. In this study, we investigated the susceptibility of a set of monoclonal antibodies to form aggregates. We selected antibodies that have all been approved by the U. S. Food and Drug Administration and are indicated for treatment of various types of cancer, such as breast cancers, chronic lymphocytic leukemia, colorectal and gastric cancers. They are IgG1 kappa immunoglobulins and they have several, different mechanisms of action. We collected the amino acid sequences of the antibodies and their 3D-structures that have been deposited in the RCSB Protein Data Bank. AMYLPRED2 consensus method was used to predict 'aggregation-prone' regions on the surface of these proteins. Considering the 3D-structures (Fab fragments) of these antibodies, and the exposed to the solvent amino acid residues of the protein, we tentatively replaced amino acid residues with exposed side chains in the predicted 'aggregation-prone' regions, which, most probably, do not affect their 3D-structure. These residues were substituted by others, resulting apparently, in reduction of antibodies' potential to form aggregates. Subsequently, Modeller9v11 software was used for homology modeling of the proteins' three-dimensional structures and new models were calculated. In order to ensure that the side chains of the new models are still exposed and do not have histeric hindrance, structure minimization was performed. This computational study must be experimentally verified in order to ensure that these substitutions decrease the antibodies' tendency to form aggregates, and that they also improve their solubility.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΑΝΟΣΙΑ

Ανοσία (Immunity), είναι το σύνολο των φυσιολογικών μηχανισμών, που δίνουν στον οργανισμό την ικανότητα να αναγνωρίζει οποιαδήποτε ξένη προς αυτόν ουσία και ν' αντιδρά, παράγοντας εξειδικευμένα κύτταρα και κυτταρικά προϊόντα, ώστε να την εξουδετερώσει και να την αποβάλλει. Στα σπονδυλωτά, υπάρχουν δύο τύποι ανοσίας, η έμφυτη, ή μη ειδική, ή φυσική ανοσία, η οποία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού, και η επίκτητη, ή ειδική, ή προσαρμοστική ανοσία, που αποτελεί τη δεύτερη γραμμή άμυνας του οργανισμού. Οι δύο μηχανισμοί ανοσίας δρουν συνεργατικά για την προστασία του οργανισμού (Medzhitov and Janeway 1997).

1.1.1 ΕΜΦΥΤΗ ΑΝΟΣΙΑ

Η έμφυτη ανοσία (Innate Immunity), περιλαμβάνει τέσσερις τύπους αμυντικών φραγμών, τους ανατομικούς, τους φυσιολογικούς, τους φαγοκυτταρικούς και τους φλεγμονώδεις (Medzhitov and Janeway 2000). Τα περισσότερα συστατικά της έμφυτης ανοσίας υπάρχουν πριν την έναρξη της μόλυνσης, και συνιστούν ένα σύνολο μη ειδικών μηχανισμών (Kimbrell and Beutler 2001). Στους ανατομικούς φραγμούς περιλαμβάνεται το δέρμα και οι βλεννώδεις μεμβράνες. Το δέρμα, εμποδίζει ή καθυστερεί την είσοδο των μικροβίων στον οργανισμό. Οι βλεννώδεις μεμβράνες (φυσιολογική χλωρίδα, βλέννα, βλεφαρίδες) εγκλωβίζουν ξένους μικροοργανισμούς, είτε ωθούν μικροοργανισμούς έξω από το σώμα (Εικόνα 1).

Στους φυσιολογικούς φραγμούς περιλαμβάνεται η θερμοκρασία, όπου ο πυρετός αναστέλλει την αύξηση μερικών παθογόνων. Ακόμα, συμπεριλαμβάνονται το χαμηλό pH στο στομάχι και χημικοί μεσολαβητές, όπως η λυσοζύμη για τη διάσπαση των βακτηριακών τοιχωμάτων, οι ιντερφερόνες, όπου επάγουν αντι-ιική προστασία σε μη μολυσμένα κύτταρα και το συμπλήρωμα για τη λύση μικροοργανισμών (Beutler 2004). Στους φαγοκυτταρικούς φραγμούς υπάρχει η διαδικασία της φαγοκυττάρωσης από μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα και μακροφάγα, όπου φαγοκυτταρώνουν και θανατώνουν ολόκληρους μικροοργανισμούς.

Ακόμα, σημαντικός αμυντικός μηχανισμός της έμφυτης ανοσίας είναι οι φλεγμονώδεις φραγμοί. Οι μηχανισμοί της έμφυτης ανοσίας δεν είναι εξειδικευμένοι για ένα συγκεκριμένο παθογόνο. Η έμφυτη ανοσία είναι μια ιδιαίτερα δραστική γραμμή άμυνας, καθώς παρεμποδίζει τις περισσότερες μολύνσεις πριν την έναρξή τους, ή τις εξαλείφει μέσα σε λίγες ώρες (Kugelberg 2014). Απαντάται σχεδόν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και πιθανή έκθεση στον εισβολέα οδηγεί σε άμεση, μη ειδική, ανοσολογική απάντηση για την εξουδετέρωσή του (Elliott, Siddique et al. 2014).

1.1.2 ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΙΑ

Η έμφυτη ανοσία, μπορεί και διακρίνει με ακρίβεια τα εαυτά συστατικά από τα παθογόνα αλλά δεν είναι εξειδικευμένη στη διάκριση λεπτών διαφορών σε ξένα μόρια. Όταν το παθογόνο εισέλθει στον οργανισμό, αποφεύγοντας την πρώτη γραμμή άμυνας, ενεργοποιείται η επίκτητη ανοσία (Adaptive Immunity), για να αναγνωρίσει, να εξαλείψει και να απομνημονεύσει τον παθογόνο εισβολέα (Pancer and Cooper 2006). Η επίκτητη ανοσία χωρίζεται σε δύο επιμέρους κατηγορίες, την κυτταρομεσολαβητική και τη χυμική ανοσία (Εικόνα 10). Αυτό που την χαρακτηρίζει είναι η μνήμη, η εξειδίκευση στην απάντηση, η αναγνώριση εαυτού και μη εαυτού, καθώς και το ότι υπάρχει μόνο στα σπονδυλωτά σε αντίθεση με τη μη ειδική ανοσία (Burnet 1969; Miller 1993; Medzhitov and Janeway 2000).

Τα συστατικά της έμφυτης και της επίκτητης ανοσίας δεν λειτουργούν ανεξάρτητα, αντιθέτως αλληλεπιδρούν και συνεργάζονται παράγοντας μια συνδυαστική απόκριση (Vivier and Malissen 2005). Η ενεργοποίηση των έμφυτων ανοσολογικών αποκρίσεων παράγει μηνύματα που επάγουν και κατευθύνουν τις επακόλουθες επίκτητες ανοσολογικές αποκρίσεις (Parish and O'Neill 1997). Λόγω της επίκτητης ανοσίας, το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να διακρίνει λεπτές διαφορές μεταξύ των αντιγόνων και να παράγει τεράστια ποικιλομορφία μορίων, επιτρέποντας του να αναγνωρίζει πάρα πολλές διαφορετικές δομές σε ξένα αντιγόνα (Bonilla and Oettgen 2010).

1.2 ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι το σύστημα άμυνας του οργανισμού με ιδιαίτερες ικανότητες προσαρμογής. Εξελίχθηκε ώστε να προστατεύει τα σπονδυλωτά από παθογόνους μικροοργανισμούς και τον καρκίνο (Cooper and Lawton 1974; Boon and van der Bruggen 1996). Έχει μια τεράστια ποικιλία κυττάρων και μορίων, που έχουν την ικανότητα, με μεγάλη εξειδίκευση, να αναγνωρίζουν και να καταστρέφουν μια τεράστια ποικιλία ξένων παραγόντων (Medzhitov 2007). Αποτελείται από τα πρωτογενή λεμφικά όργανα, τα οποία είναι ο μυελός των οστών και ο θύμος αδένας, και τα δευτερογενή λεμφικά όργανα τα οποία είναι οι λεμφαδένες, οι αμυγδαλές, ο σπλήνας και οι λεμφικοί ιστοί των βλεννογόνων και του δέρματος. Στα πρωτογενή λεμφικά όργανα δημιουργούνται και ωριμάζουν τα ειδικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Miller 1993).

Οποιαδήποτε δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να οδηγήσει σε αυτοάνοσα νοσήματα, φλεγμονές καθώς και διάφορα είδη καρκίνου (Guevara-Patino, Turk et al. 2003). Στην περίπτωση της ανοσολογικής ανεπάρκειας, η δραστηριότητα του ανοσοποιητικού συστήματος είναι μειωμένη σε σχέση με το φυσιολογικό, καταλήγοντας σε επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις. Η ανοσολογική ανεπάρκεια μπορεί να είναι αποτέλεσμα γενετικής ασθένειας ή να προκληθεί από χορήγηση ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων.

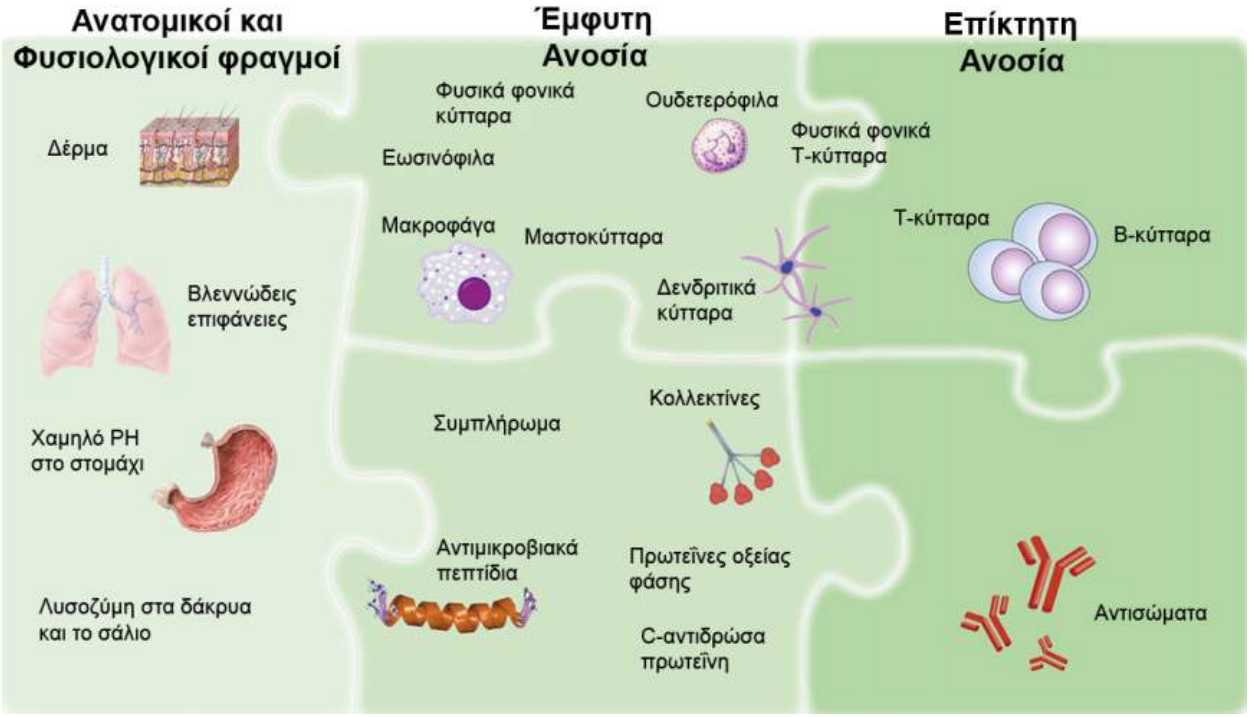
1.3 ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΑΠΑΡΤΙΖΟΥΝ ΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Τα κύτταρα και τα μόρια του ανοσοποιητικού συστήματος δρουν σε ένα μοναδικό λειτουργικά δίκτυο, του οποίου η πολυπλοκότητα μπορεί να συγκριθεί μόνο με εκείνη του νευρικού συστήματος. Υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες κυττάρων που απαρτίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα, τα κύτταρα της λεμφικής σειράς (λεμφοκύτταρα) και τα κύτταρα της μυελικής σειράς. Τα λεμφοκύτταρα περιλαμβάνουν τα Β λεμφοκύτταρα (B cells), τα Τ λεμφοκύτταρα (T cells), καθώς και τα μεγάλα κοκκιώδη κύτταρα (αλλιώς φυσικά φονικά κύτταρα – natural killer cells, NK). Τα κύτταρα της μυελικής σειράς περιλαμβάνουν τα δενδριτικά κύτταρα (dendritic cells), τα ουδετερόφιλα (neutrophils), τα μονοκύτταρα/μακροφάγα

(monocytes/macrophages), τα εωσινόφιλα (eosinophils) και τα βασεόφιλα (baseophils) (Krishnaswamy, Ajitawi et al. 2006). Τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα βασεόφιλα αποτελούν την οικογένεια των κοκκιοκυττάρων (granulocytes). Αξιοσημείωτες είναι οι διαφορές που παρατηρούνται στο σχήμα του πυρήνα, καθώς και στον αριθμό και το σχήμα των κυτταροπλασματικών κοκκίων τους (Goldsby, Kindt et al. 2005).

1.3.1 ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

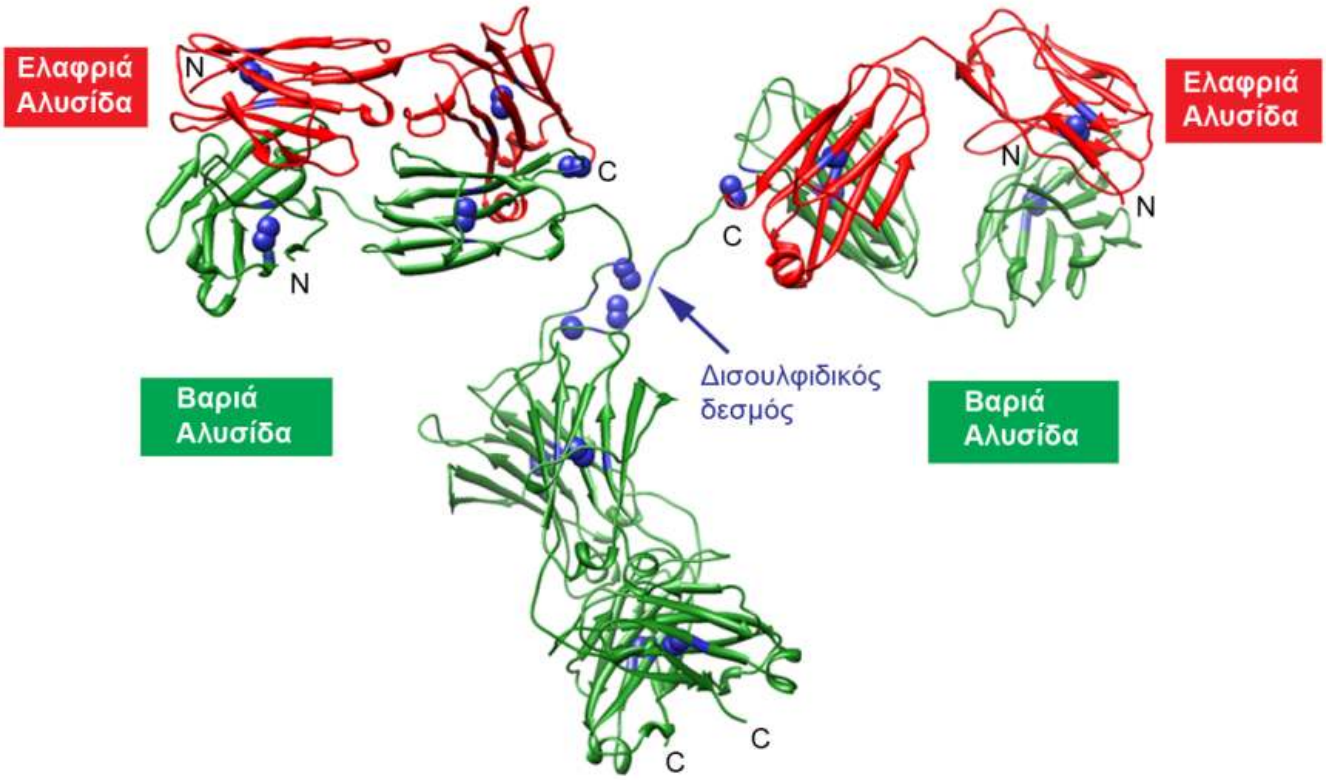
Τα λεμφοκύτταρα έχουν σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς είναι υπεύθυνα για την επαγωγή της επίκτητης ανοσίας και φέρουν τα ανοσολογικά γνωρίσματα της ποικιλομορφίας, της εξειδίκευσης, της μνήμης και της διάκρισης του εαυτού και του μη-εαυτού. Κυκλοφορούν συνεχώς ανάμεσα στο αίμα και τη λέμφο, και μπορούν να μεταναστεύουν σε διάφορους ιστούς και όργανα. Τα λεμφοκύτταρα διαχωρίζονται σε τρεις πληθυσμούς, στα Β λεμφοκύτταρα, τα Τ λεμφοκύτταρα και τα φυσικά φονικά κύτταρα, με βάση τη λειτουργία και τα μόρια που φέρουν στην επιφάνεια της μεμβράνης τους (Middleton, Curran et al. 2002). Τα Β λεμφοκύτταρα και τα Τ λεμφοκύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών. Η ωρίμανση των Β λεμφοκυττάρων γίνεται στο μυελό των οστών (Bone marrow) επίσης, από όπου πήραν και το όνομά τους (B cells). Τα Τ λεμφοκύτταρα ωριμάζουν στο θύμο αδένα (Thymus) (Miller 2002), από όπου ομοίως πήραν το όνομά τους (T cells). Όταν βρίσκονται στην αρχή του κυτταρικού τους κύκλου και δεν έχουν αλληλεπιδράσει με κάποιο αντιγόνο, έχουν μικρό μέγεθος και αναφέρονται ως παρθένα (naive) (Goldsby, Kindt et al. 2005).



Εικόνα 1 : Το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου θεωρείται ότι αποτελείται από τρία επίπεδα : (α) ανατομικοί και φυσιολογικοί φραγμοί του ανοσοποιητικού συστήματος, (β) κυτταρικά και χυμικά προϊόντα έμφυτης ανοσίας, (γ) κυτταρικά και χυμικά προϊόντα επίκτητης ανοσίας. Σε κάποιες περιπτώσεις δεν είναι απόλυτος αυτός ο διαχωρισμός, καθώς για παράδειγμα τα φυσικά φονικά Τ κύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα κατηγοριοποιούνται και στην έμφυτη αλλά και στην επίκτητη ανοσία (Turvey and Broide 2010).

1.3.1.1 Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

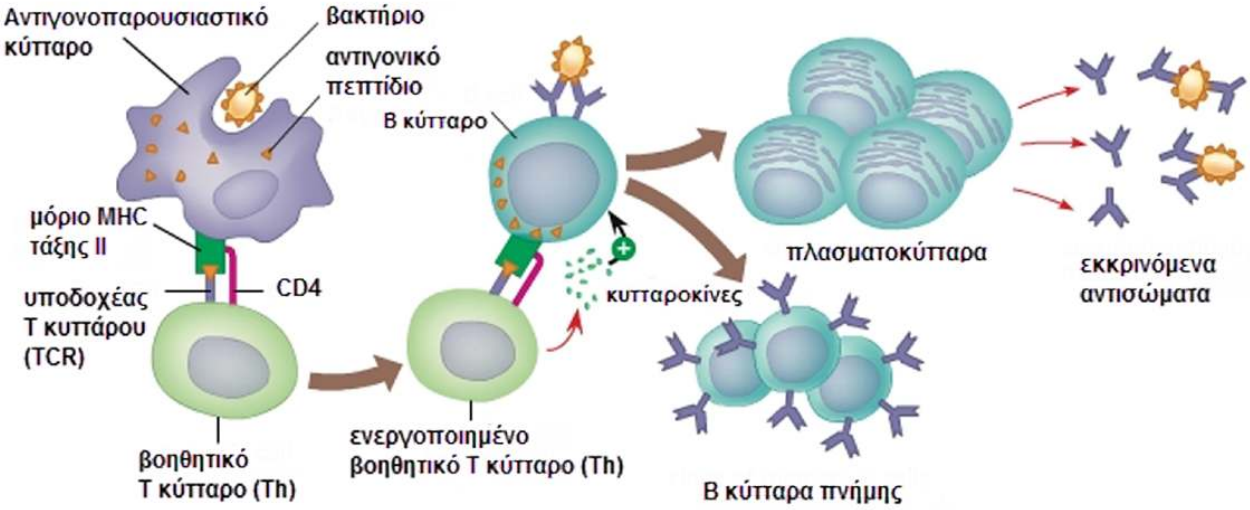
Τα Β λεμφοκύτταρα δημιουργούνται στο μυελό των οστών, όπου και ωριμάζουν (Benschop and Cambier 1999). Κάθε ένα Β λεμφοκύτταρο, εκφράζει στη μεμβράνη του ένα μοναδικό υποδοχέα που ονομάζεται υποδοχέας Β κυττάρου (B cell receptor, BCR). Ο υποδοχέας αυτός είναι ένα μεμβρανικό μόριο ανοσοσφαιρίνης (Εικόνα 2), υπεύθυνο για την αναγνώριση αντιγόνου σε διαλυτή μορφή (Matsuuchi and Gold 2001). Οι ανοσοσφαιρίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούνται από δύο πανομοιότυπες βαριές (heavy chain) και δύο πανομοιότυπες ελαφριές (light chain) πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Κάθε βαριά αλυσίδα συγκρατείται με μία ελαφριά με δισουλφιδικούς δεσμούς και επιπρόσθετοι δισουλφιδικοί δεσμοί συγκρατούν τα δύο ζεύγη, και κατ' επέκταση όλη την πρωτεΐνη.



Εικόνα 2 : Δομή ανοσοσφαιρίνης-υποδοχέα Β κυττάρου με κωδικό 1IGT στην βάση πρωτεϊνικών δομών PDB. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι ελαφριές αλυσίδες και με πράσινο χρώμα οι βαριές αλυσίδες. Με μπλε σφαίρες διακρίνονται οι δισουλφιδικοί δεσμοί. Τα αμινοτελικά άκρα όλων των αλυσίδων καθώς και τα καρβοξυτελικά των ελαφριών αλυσίδων του υποδοχέα βρίσκονται εξωκυττάρια, ενώ τα καρβοξυτελικά άκρα των βαριών αλυσίδων του υποδοχέα βρίσκονται ενδοκυττάρια.

Οι λειτουργίες του υποδοχέα Β κυττάρου διασφαλίζουν την φυσιολογική παραγωγή αντισωμάτων. Σε περίπτωση δυσλειτουργίας του, μπορεί να προκληθούν ασθένειες όπως ανοσοανεπάρκεια, αυτοάνοσα νοσήματα και κακοήθειες (Goodnow 2007; Corcos, Osborn et al. 2011). Όταν ένα παρθένο Β λεμφοκύτταρο αναγνωρίσει, για πρώτη φορά, ένα αντιγόνο που «ταιριάζει» με τον μεμβρανικό του υποδοχέα, η πρόσδεση του αντιγόνου με τον υποδοχέα προκαλεί το κύτταρο να αρχίσει να διαιρείται. Μετά την ενεργοποίησή του διαφοροποιείται σε πλασματοκύτταρα (plasma cells), τα οποία παράγουν και εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες αντισωμάτων (antibodies), σε δραστικά Β κύτταρα (effector B cells) και σε Β κύτταρα μνήμης (memory B cells).

Η διαδικασία αυτή ονομάζεται χυμική απόκριση ή χυμική απάντηση (Εικόνα 3). Τα πλασματοκύτταρα ενώ έχουν χρόνο ζωής μόνο λίγες ημέρες, έχει διαπιστωθεί ότι εκκρίνουν περίπου 2000 μόρια αντισωμάτων το δευτερόλεπτο (Goldsby, Kindt et al. 2005). Τα Β κύτταρα μνήμης έχουν μεγαλύτερο χρόνο ζωής από τα παρθένα Β λεμφοκύτταρα και εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον ίδιο υποδοχέα όπως τα προγονικά τους Β λεμφοκύτταρα. Τα Β λεμφοκύτταρα έχουν και αντιγονοπαρουσιαστικές ιδιότητες (Mauri and Bosma 2012).

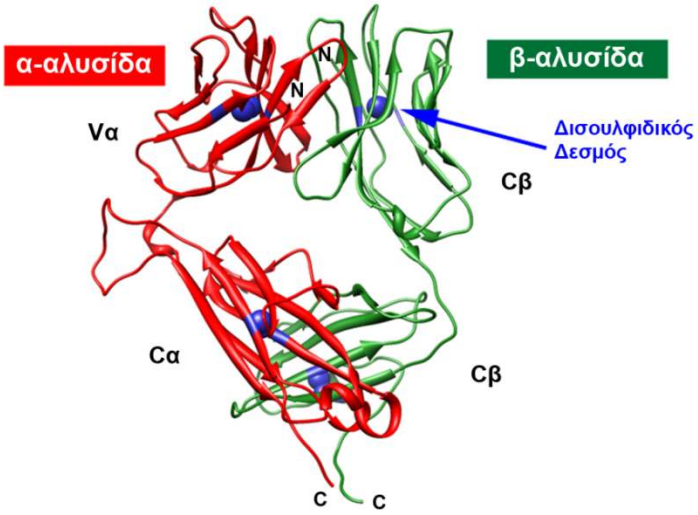


Εικόνα 3 : Το αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο φαγοκυτταρώνει το βακτήριο-αντιγόνο και το παρουσιάζει στην επιφάνειά του με τη βοήθεια του μορίου MHC τάξης II. Το σύμπλοκο αντιγόνο-MHC II μόριο αναγνωρίζεται από τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα (Th) τα οποία εκκρίνουν κυτταροκίνες που προσελκύουν στην μολυσμένη περιοχή τα β λεμφοκύτταρα. Αναγνωρίζουν με τη σειρά τους το αντιγόνο-βακτήριο με τον υποδοχέα Β κυττάρου (BcR) που διαθέτουν στην επιφάνειά τους και διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα (plasma cells) και Β κύτταρα μνήμης (memory B cells). Τα πλασματοκύτταρα εκκρίνουν αντισώματα για τα οποία αναγνωρίζουν το αντιγόνο, το δεσμεύουν κι ενεργοποιούν μηχανισμούς για την εξουδετέρωσή του.

1.3.1.2 Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

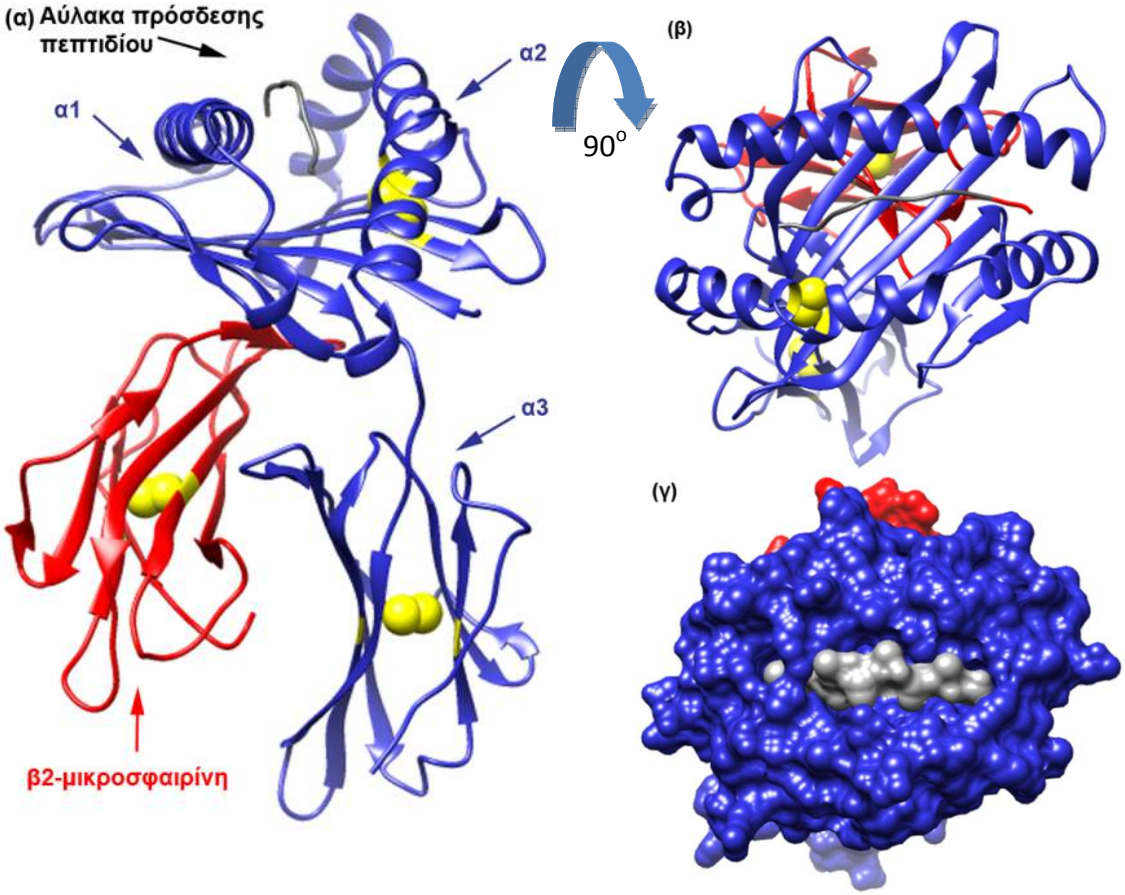
Τα Τ λεμφοκύτταρα δημιουργούνται στο μυελό των οστών αλλά σε αντίθεση με τα Β λεμφοκύτταρα, μεταναστεύουν και ωριμάζουν στο θύμο αδένα (Ashton-Rickardt, Bandeira et al. 1994). Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής του το Τ λεμφοκύτταρο εκφράζει στην επιφάνεια του υποδοχείς που ονομάζονται υποδοχείς Τ κυττάρου (T cell receptor, TCR) (Rudolph, Stanfield et al. 2006). Σε αντίθεση με τα Β λεμφοκύτταρα των οποίων οι υποδοχείς αναγνωρίζουν αντιγόνα σε διαλυτή μορφή, οι υποδοχείς των Τ λεμφοκυττάρων (Εικόνα 4), μπορούν να αναγνωρίζουν κομμάτια - πεπτίδια του αντιγόνου, προσδεδεμένα σε μεμβρανικές πρωτεΐνες που ονομάζονται πρωτεΐνες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC), στην επιφάνεια μολυσμένων ή καρκινικών κυττάρων (Yin, Wang et al. 2012).

Τα μόρια MHC είναι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που λειτουργούν ως αντιγονοπαρουστικά μόρια. Δημιουργούν σταθερά συμπλέγματα με τα αντιγονικά πεπτίδια που παρουσιάζονται στην κυτταρική επιφάνεια, όπου αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς των Τ λεμφοκυττάρων. Υπάρχουν δύο κατηγορίες, τα MHC τάξης I και τα MHC τάξης II μόρια (Garcia and Teyton 1998).



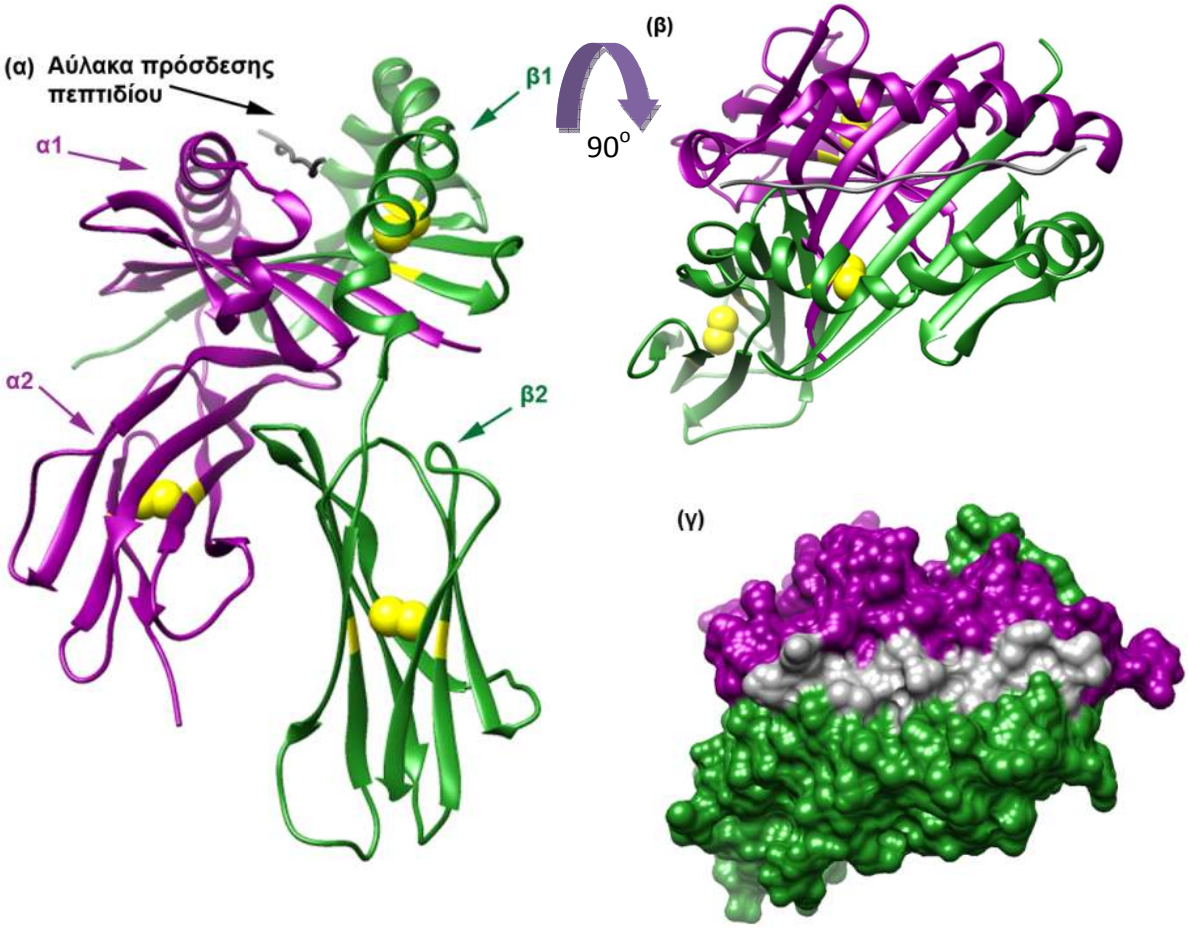
Εικόνα 4 : Η στερεοδιάταξη της δομής του υποδοχέα Τ κυττάρου (T cell receptor, TCR), ακολουθεί το χαρακτηριστικό δίπλωμα ανοσοσφαιρίνης (Ig-like Fold). Με κόκκινο η α-αλυσίδα και με πράσινο χρώμα η β-αλυσίδα. Με μπλε σφαίρες διακρίνονται οι δισουλφιδικοί δεσμοί. Κάθε μία από τις αλυσίδες α και β αποτελούνται από δύο ΄δομικά αυτοτελείς περιοχές με δομή ανοσοσφαιρίνης. Η αμινοξική ακολουθία των μεταβλητών περιοχών (Vα, Vβ) παρουσιάζει ποικιλομορφία, ενώ η αμινοξική ακολουθία των σταθερών περιοχών (Cα, Cβ) δεν ποικίλει. Η δομή του συγκεκριμένου Τ κυτταρικού υποδοχέα υπάρχει στην βάση RCSB PDB με κωδικό 1TCR.

Τα μόρια MHC τάξης I εντοπίζονται στην επιφάνεια σχεδόν όλων των εμπύρηνων κυττάρων και παρουσιάζουν αντιγονικά πεπτίδια στα Τ κυτταροτοξικά κύτταρα (Ferber, Zoete et al. 2012). Αποτελούνται από μία βαριά α αλυσίδα (45KDa), συνδεδεμένη μη ομοιοπολικά με μία μικρή πρωτεΐνη, τη β_2-μικροσφαιρίνη (12KDa). Η ύπαρξη της β_2-μικροσφαιρίνης απαιτείται προκειμένου να εκφραστούν τα MHC I μόρια στην κυτταρική μεμβράνη (Εικόνα 5). Η βαριά αλυσίδα αποτελείται από τρεις δομικά αυτοτελείς περιοχές (domains), τις α1, α2 και α3. Η α1 με την α2 σχηματίζονται από οκτώ αντιπαράλληλους β κλώνους δημιουργώντας μία επίπεδη επιφάνεια κάθετα στην οποία βρίσκονται δύο α έλικες, δημιουργώντας μία αύλακα ή αλλιώς περιοχή σχισμής, στην οποία προσδένεται το αντιγονικό πεπτίδιο που παρουσιάζει το κύτταρο. Η στερεοδιάταξη της α3 ακολουθεί το χαρακτηριστικό δίπλωμα της ανοσοσφαιρίνης IgG (Li and Raghavan 2010). Το πεπτίδιο που παρουσιάζεται αποτελείται από 8-11 αμινοξικά κατάλοιπα.



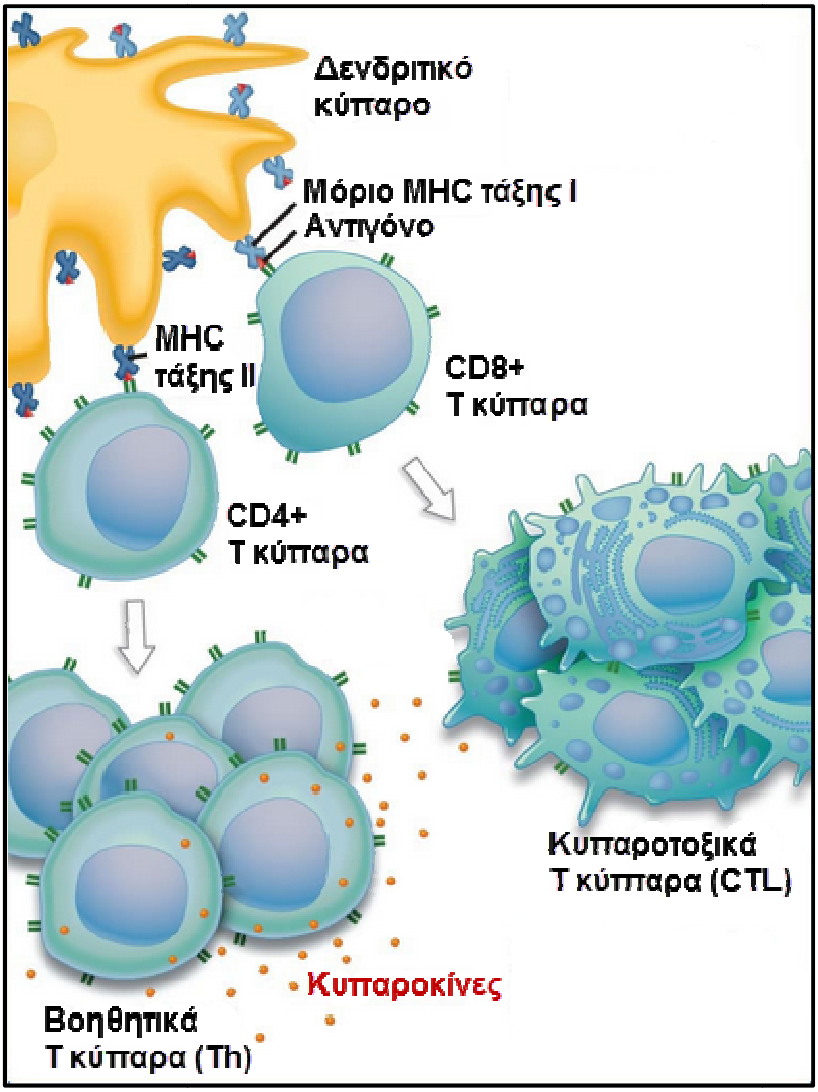
Εικόνα 5 : Απεικόνιση δομής μορίου MHC τάξης I με κωδικό PDB : 1HSA. (α) Με κόκκινο χρώμα η πρωτεΐνη β_2-μικροσφαιρίνη και με κίτρινες σφαίρες οι δισουλφιδικοί δεσμοί. Με γκρι χρώμα το αντιγονικό πεπτίδιο. Το μόριο αναπαριστάται στις 0° μοίρες (β) Το ίδιο μόριο στραμμένο 90° μοίρες και (γ) ομοίως το μόριο που απεικονίζεται στο (β) με χωροπληρωτικό μοντέλο.

Τα μόρια MHC τάξης II εντοπίζονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και αποτελούνται από δύο αλυσίδες, την α αλυσίδα (33KDa) με τις α1 και α2 δομικά αυτοτελείς περιοχές και την β αλυσίδα (28KDa), με τις β1 και β2 δομικά αυτοτελείς περιοχές (Εικόνα 6). Οι α2 και β2 ακολουθούν το χαρακτηριστικό δίπλωμα IgG ανοσοσφαιρίνης, και οι α1 και β1 ομοίως με το μόριο MHC τάξης I, αποτελούνται από οκτώ αντιπαράλληλους β κλώνους, δημιουργώντας μία επίπεδη επιφάνεια κάθετα στην οποία βρίσκονται δύο α έλικες, δημιουργώντας την αύλακα στην οποία προσδένεται το αντιγονικό πεπτίδιο που παρουσιάζει το αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο (Reinherz, Tan et al. 1999). Τα πεπτίδια που παρουσιάζονται στα Τ βοηθητικά κύτταρα αποτελούνται από 12-25 αμινοξικά κατάλοιπα καθώς η αύλακα που έχει σχηματιστεί είναι μεγαλύτερη από αυτήν του MHC I μορίου.



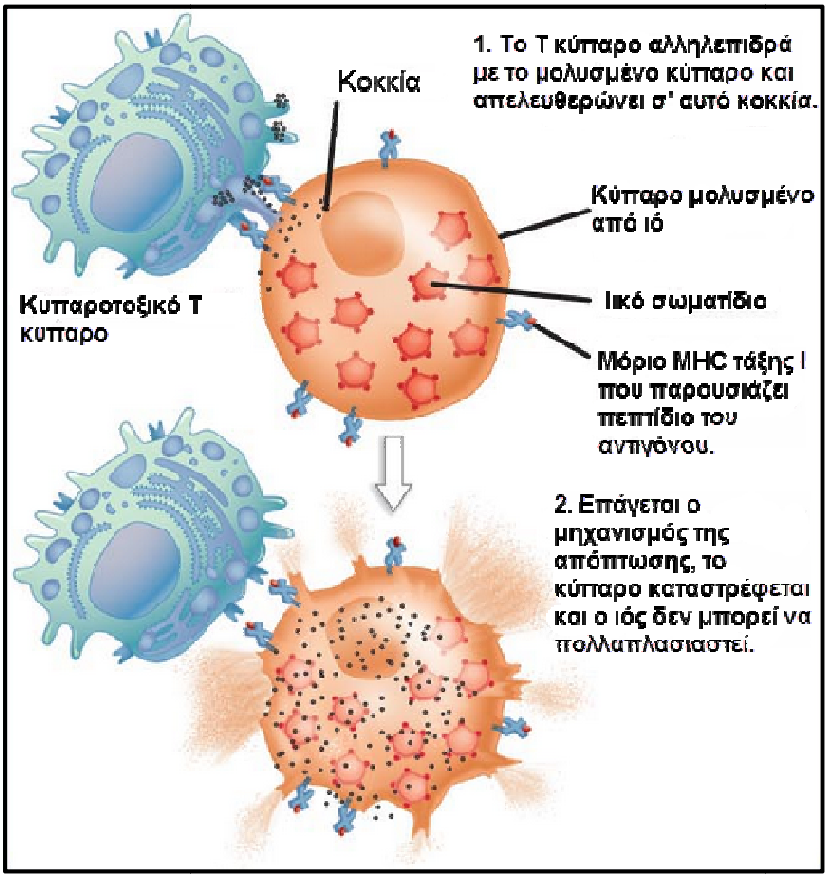
Εικόνα 6 : Τριασδιάστατη δομή μορίου MHC τάξης II, με κωδικό PDB 1DLH. (α) Με κόκκινο η πρωτεΐνη β_2-μικροσφαιρίνη, με κίτρινες σφαίρες οι δισουλφιδικοί δεσμοί. Με γκρι χρώμα το αντιγονικό πεπτίδιο. Το μόριο αναπαριστάται στις 0° μοίρες. (β) Το ίδιο μόριο στραμμένο 90° μοίρες και (γ) ομοίως το μόριο που απεικονίζεται στο (β) με χωροπληρωτικό μοντέλο.

Όταν ένα παρθένο Τ λεμφοκύτταρο αναγνωρίσει το σύμπλοκο πεπτίδιο-MHC μόριο σε ένα κύτταρο (Εικόνα 7), τότε πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται σε Τ κύτταρα μνήμης (memory T cell), σε Τ βοηθητικά (T helper, Th) και Τ κυτταροτοξικά κύτταρα (cytoxic T cell, Tc) (Dutton, Bradley et al. 1998). Σε αντίθεση με τα Β λεμφοκύτταρα, τα Τ λεμφοκύτταρα δεν διαθέτουν αντιγονοπαρουσιαστικές ιδιότητες. Τα Τ βοηθητικά κύτταρα μπορούν να διακριθούν από τα Τ κυτταροτοξικά από την παρουσία των γλυκοπρωτεϊνών CD4+ και CD8+ αντίστοιχα, στην επιφάνειά τους (Ellmeier, Sawada et al. 1999; Li, Yin et al. 2013). Όταν ένα Τ βοηθητικό κύτταρο αναγνωρίζει και αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο πεπτίδιο-MHC μόριο, γίνεται δραστικό και εκκρίνει κυτταροκίνες (Mareeva, Martinez-Hackert et al. 2008).



Εικόνα 7 : Τα Τ κύτταρα αναγνωρίζουν το σύμπλοκο αντιγόνο – MHC μόριο, αλληλεπιδρούν με αυτό και ενεργοποιούνται. Στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε βοηθητικά Τ κύτταρα (Th) και κυτταροτοξικά Τ κύτταρα (CTL) και πολλαπλασιάζονται.

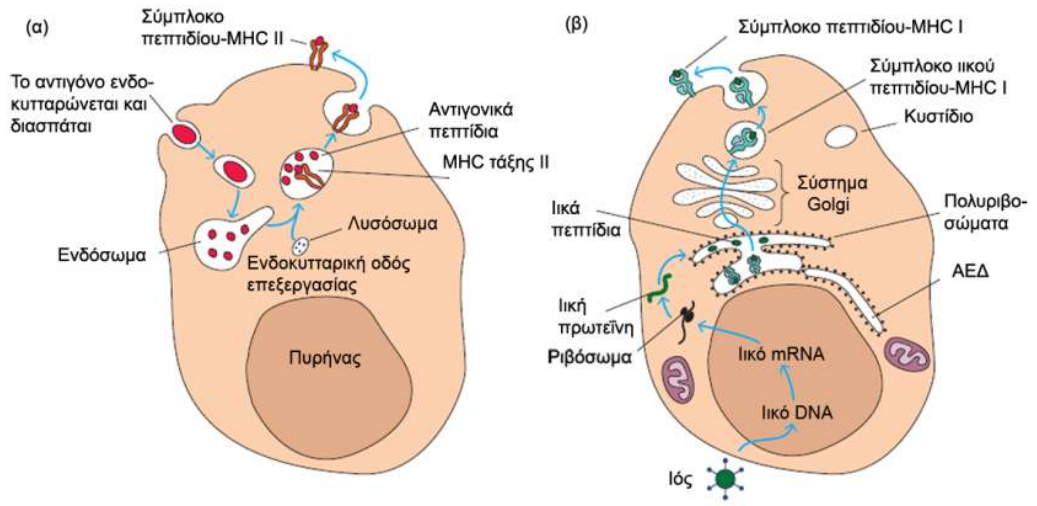
Οι κυτταροκίνες είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες, πεπτίδια ή γλυκοπρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους (<80 KDa), οι οποίες βοηθούν στην επικοινωνία των κυττάρων, αναστέλλοντας ή διεγείροντας ανοσολογικές αποκρίσεις (Abbas, Murphy et al. 1996). Σημαντικό ρόλο έχουν στην ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων, των Τ κυτταροτοξικών κυττάρων, των μακροφάγων και άλλων κυττάρων που συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση. Ανάλογα με το είδος των κυτταροκινών που θα εκκριθούν από τα ενεργοποιημένα Τ βοηθητικά κύτταρα, επάγονται διαφορετικοί τύποι ανοσολογικής απόκρισης (Bach, Aguet et al. 1997). Με την βοήθεια των κυτταροκινών, ένα Τ κυτταροτοξικό κύτταρο έχοντας αναγνωρίσει το σύμπλοκο πεπτίδιο – MHC I στην επιφάνεια ενός μολυσμένου κυττάρου, πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται σε δραστικό κυτταροτοξικό Τ λεμφοκύτταρο (CTL) (Εικόνα 8). Σε αντίθεση με το Τ κυτταροτοξικό κύτταρο (Tc), το CTL δεν εκκρίνει πολλές κυτταροκίνες αλλά έχει κυτταροτοξική δράση ή δρα άμεσα θανατώνοντας το μολυσμένο κύτταρο.



Εικόνα 8 : Διαδικασία θανάτωσης μολυσμένου κυττάρου από τα κυτταροτοξικά Τ κύτταρα (CTL). Το Τ κύτταρο αλληλεπιδρά με το μολυσμένο κύτταρο και απελευθερώνει σ' συτό κοκκία. Επάγεται ο μηχανισμός της απόπτωσης, το κύτταρο καταστρέφεται και ο ιός δεν μπορεί να πολλαπλασιαστεί.

1.3.2 ΑΝΤΙΓΟΝΟΠΑΡΟΥΣΙΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

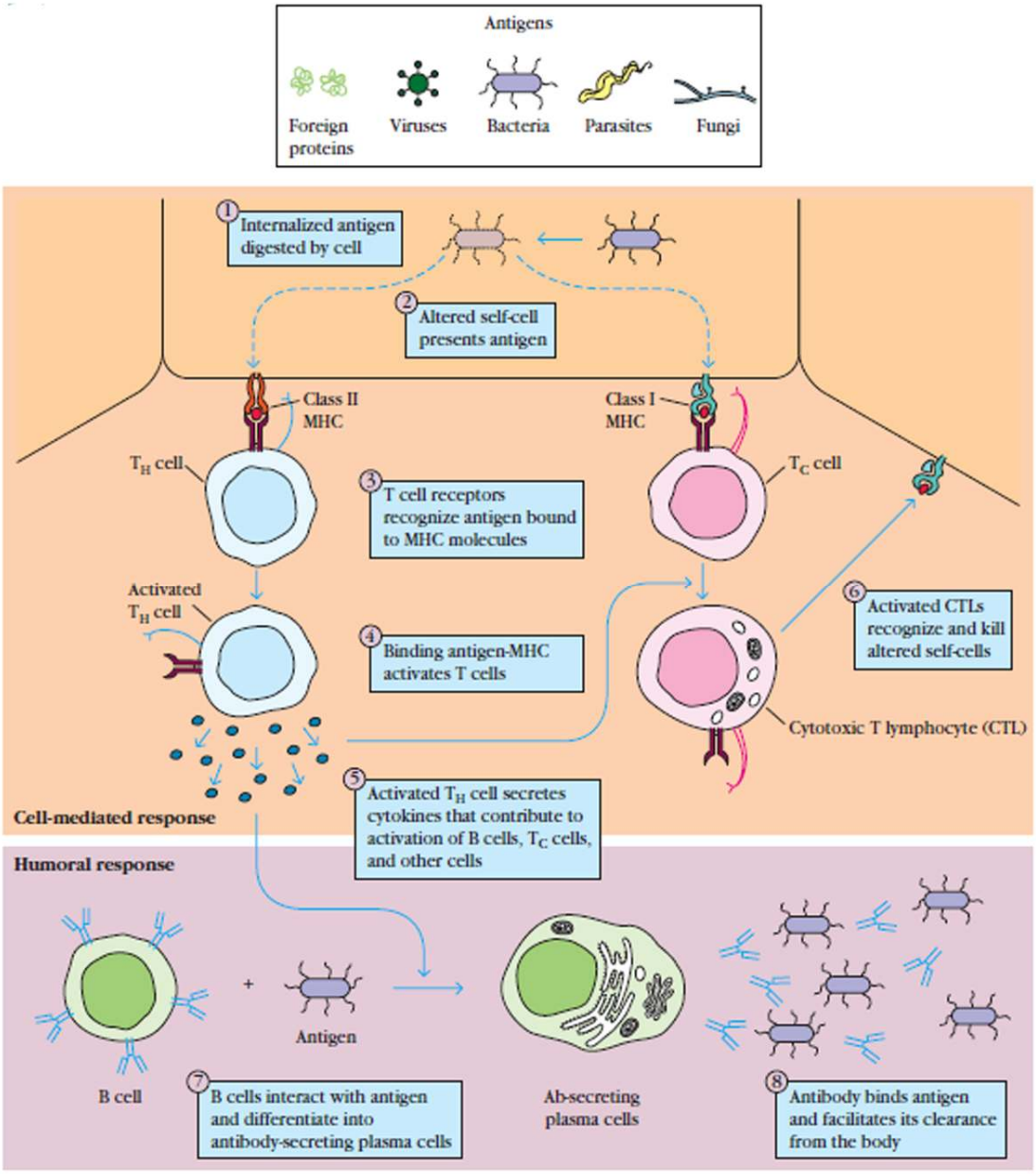
Η επαγωγή και των δύο τύπων της ανοσολογικής απόκρισης πυροδοτούνται από την παραγωγή κυτταροκινών από τα Τ βοηθητικά κύτταρα (T_h) (Εικόνα 10). Είναι αναγκαίο η ενεργοποίηση των Τ βοηθητικών κυττάρων να ρυθμίζεται προσεκτικά, καθώς μία ανεπιθύμητη ενεργοποίηση τους σε εαυτά κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητη ανοσολογική απόκριση, και κατ' επέκταση σε ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων (Abbas, Murphy et al. 1996). Για να διασφαλιστεί η σωστή ενεργοποίηση των Τ βοηθητικών κυττάρων, μπορούν να αναγνωρίσουν μόνο αντιγονικά πεπτίδια που παρουσιάζονται σε σύμπλοκο με το μόριο MHC τάξης ΙΙ στην επιφάνεια αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APCs) (Germain, Sant et al. 1988).



Εικόνα 9 : (α) Το εξωγενές αντιγόνο εισέρχεται με ενδοκυττάρωση ή φαγοκυττάρωση στην ενδοκυτταρική οδό επεξεργασίας. Το αντιγόνο διασπάται σε μικρά πεπτίδια, τα οποία θα παρουσιαστούν με τη βοήθεια των μορίων MHC τάξης ΙΙ πάνω στην μεμβράνη του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου. (β) Το ενδογενές αντιγόνο, που παράγεται μέσα στο κύτταρο (π.χ. κύτταρο μολυσμένο από ιό), διασπάται μέσα στο κυτταρόπλασμα σε πεπτίδια, τα οποία συνδέονται με τα μόρια MHC τάξης Ι στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (ΑΕΔ). Στη συνέχεια, το σύμπλοκο πεπτίδιο-μόριο MHC τάξης Ι μετακινείται στην κυτταρική επιφάνεια μέσω του συστήματος Golgi.

Την κατηγορία των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων αποτελούν τα Β κύτταρα, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά διακρίνονται για δύο ιδιότητες, διαθέτουν MHC τάξης ΙΙ μόρια στη μεμβράνη τους, και εκκρίνουν κυτταροκίνες, οι οποίες προκαλούν την ενεργοποίηση των Τ βοηθητικών κυττάρων. Αναλυτικότερα, τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα αρχικά ενδοκυτταρώνουν το αντιγόνο, είτε με την διαδικασία της ενδοκυττάρωσης, είτε με την διαδικασία της

φαγοκυττάρωσης, και στη συνέχεια εκθέτουν ένα τμήμα του σε σύμπλοκο με ένα μόριο MHC τάξης II στη μεμβράνη τους (Εικόνα 9). Τα Τ βοηθητικά κύτταρα το αναγνωρίζουν, αλληλεπιδρούν με αυτό και γίνονται δραστικά (Germain, Sant et al. 1988).

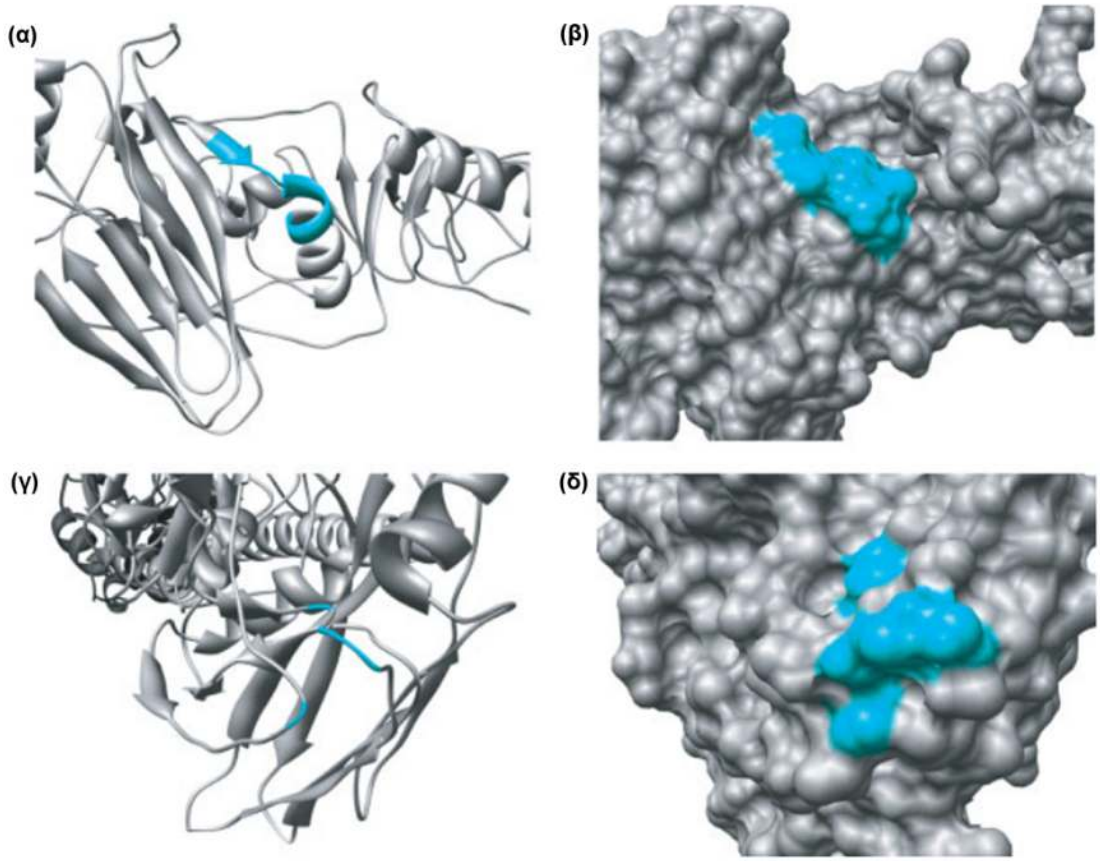


Εικόνα 10 : Στη χυμική απόκριση, Β κύτταρα αλληλεπιδρούν με το αντιγόνο (Ag) και στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε εκκριτικά πλασματοκύτταρα. Το αντίσωμα που εκκρίνεται (Ab) αλληλεπιδρά με το αντιγόνο και υποβοηθά την απομάκρυνση του από το σώμα. Στην κυτταρομεσολαβητική ανοσία, διάφοροι υποπληθυσμοί Τ κυττάρων, αναγνωρίζουν το αντιγόνο που παρουσιάζεται στα εαυτά κύτταρα. Τα Τ βοηθητικά κύτταρα (Th), αποκρίνονται στα αντιγόνα με την παραγωγή κυτταροκινών. Τα Τ κυτταροτοξικά (Tc) αποκρίνονται στα αντιγόνα με διαφοροποίηση τους σε κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (CTL), τα οποία συμμετέχουν στη θανάτωση τροποποιημένων εαυτών κυττάρων, όπως π.χ. μολυσμένων με ιό (Goldsby, Kindt et al. 2005).

1.4 ΕΠΙΤΟΠΟΙ

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος δεν αναγνωρίζουν ούτε αλληλεπιδρούν με ολόκληρα τα αντιγόνα. Τα λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν διακριτές περιοχές ενός μακρομορίου, που ονομάζονται επίτοποι. Αντιγονικός καθοριστής (antigenic determinant), ή επίτοπος (epitope), ονομάζεται η ανοσοδραστική περιοχή του αντιγονικού μορίου, που έχει την ικανότητα να συνδέεται με τα κυκλοφορούντα αντισώματα, τις μεμβρανικές ανοσοσφαιρίνες των Β λεμφοκυττάρων, ή τον υποδοχέα των Τ λεμφοκυττάρων (Hofmann and Hadge 1987).

Υπάρχουν δύο κατηγορίες επιτόπων. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τους επιτόπους που αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς των Τ λεμφοκυττάρων, δηλαδή γραμμικά αντιγονικά πεπτίδια που παρουσιάζονται μετά από επεξεργασία, είτε στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, σε σύμπλοκο με ένα MHC τάξης ΙΙ μόριο, είτε στην επιφάνεια άλλων εμπύρηνων κυττάρων, σε σύμπλοκο με ένα MHC τάξης Ι μόριο. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει επιτόπους που αναγνωρίζονται, είτε από τον υποδοχέα των Β λεμφοκυττάρων, είτε από τα κυκλοφορούντα αντισώματα στο πλάσμα (Εικόνα 11). Στην δεύτερη κατηγορία, υπάρχει ένας επιμέρους διαχωρισμός, στους γραμμικούς ή συνεχείς επιτόπους (linear ή continuous), και στους στερεοδιαταξικούς ή ασυνεχείς επιτόπους (conformational ή discontinuous) (Huang and Honda 2006).



Εικόνα 11 : (α) Γραμμικός επίτοπος με αναπαράσταση cartoon στο λογισμικό γραφικών Pymol, (β) ο ίδιος γραμμικός επίτοπος σε χωροπληρωτικό μοντέλο, (γ) στερεοδιαταξικός επίτοπος με αναπαράσταση cartoon, (δ) στερεοδιαταξικός επίτοπος σε χωροπληρωτικό μοντέλο με κωδικό PDB : 1HA0 (Greenbaum, Andersen et al. 2007).

Ένας στερεοδιαταξικός επίτοπος αποτελείται από αμινοξικά κατάλοιπα ή μικρά πεπτίδια της αμινοξικής ακολουθίας. Τα κατάλοιπα αυτά ή τα μικρά πεπτίδια δεν είναι διαδοχικά στην αμινοξική ακολουθία και μπορεί να απέχουν αρκετά. Όμως, λόγω της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης «πλησιάζουν» στο χώρο και σχηματίζουν τον στερεοδιαταξικό επίτοπο. Αυτού του είδους οι επίτοποι αλληλεπιδρούν με τον παράτοπο με βάση τα χαρακτηριστικά της τριτοταγής δομής ή της τεταρτοταγούς δομής του αντιγόνου (Haste Andersen, Nielsen et al. 2006).

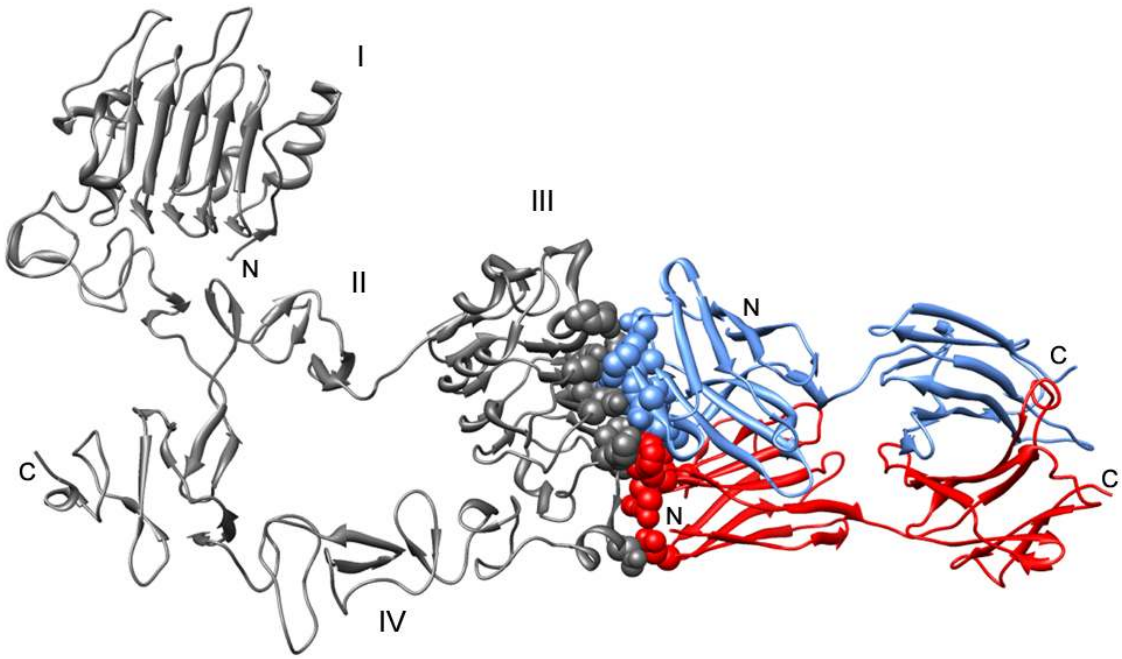
Σε αντίθεση με τους στερεοδιαταξικούς επιτόπους, οι γραμμικοί επίτοποι αλληλεπιδρούν με τον παράτοπο με βάση την πρωτοταγή δομή τους. Αποτελούνται από αμινοξικά κατάλοιπα που βρίσκονται διαδοχικά στην αμινοξική ακολουθία του αντιγόνου (Saha and Raghava 2006). Τα περισσότερα αντισώματα αναγνωρίζουν στερεοδιαταξικούς επιτόπους με συγκεκριμένη τριτοταγή δομή.

Η αναγνώριση των αντιγόνων από τα Β και τα Τ λεμφοκύτταρα είναι διαφορετική. Στα Β λεμφοκύτταρα γίνεται αναγνώριση διαλυτού αντιγόνου, μέσω του διμερούς συμπλόκου μεμβρανικής ανοσοσφαιρίνης (antibody, Ab) και αντιγόνο (antigen, Ag), και δεν απαιτείται η εμπλοκή των MHC μορίων. Επειδή το αντιγόνο βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα όταν προσδένεται από το Β λεμφοκύτταρο, οι επίτοποι τείνουν να βρίσκονται στις πιο προσιτές περιοχές της εκτεθειμένης επιφάνειας του αντιγόνου (Kringelum, Nielsen et al. 2013). Σε αντίθεση με τα Β λεμφοκύτταρα, τα Τ λεμφοκύτταρα δεν αναγνωρίζουν διαλυτά αντιγόνα, αναγνωρίζουν αντιγόνα μέσω του τριμερούς συμπλέγματος υποδοχέα Τ κυττάρου, αντιγόνου και MHC μορίου.

Απαραίτητη είναι η συμμετοχή των MHC μορίων για να γίνει παρουσίαση του επεξεργασμένου αντιγόνου. Οι Τ κυτταρικοί επίτοποι, κατά βάση, δεν μπορούν να αναλυθούν ανεξάρτητα από τα αντίστοιχα, σχετιζόμενα με αυτούς, μόρια MHC. Η χημική φύση των αντιγόνων που επάγουν την κυτταρο-μεσολαβητική απόκριση είναι κυρίως πρωτεΐνες, αλλά και μερικά λιπίδια και γλυκολιπίδια, ενώ η χημική φύση των αντιγόνων στην περίπτωση της χυμικής απόκρισης είναι πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και λιπίδια (Rammensee, Bachmann et al. 1999).

1.4.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ Β ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ

Ένα αντίσωμα συνδέεται με έναν επίτοπο με ασθενείς μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές υπάρχουν σε μικρή απόσταση μεταξύ των ατόμων και για να είναι ισχυρός ο δεσμός θα πρέπει η θέση πρόσδεσης του αντισώματος, δηλαδή ο παράτοπος, και ο επίτοπος να έχουν συμπληρωματικά σχήματα, σχέση κλειδιού – κλειδαριάς (Εικόνα 12) (Ivanciuc, Schein et al. 2009).



Εικόνα 12 : Γραφική αναπαράσταση του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος. Τα άτομα των αμινοξικών καταλοίπων που αλληλεπιδρούν αναπαριστώνται με σφαίρες. Με σκούρο γκρι απεικονίζεται το αντιγόνο, με κόκκινο χρώμα η ελαφριά αλυσίδα του αντισώματος και με γαλάζιο χρώμα η βαριά αλυσίδα του αντισώματος. Οι σφαίρες των καταλοίπων του αντιγόνου αποτελούν τον επίτοπο, και οι σφαίρες των καταλοίπων του αντισώματος αποτελούν τον παράτοπο. Το σύμπλοκο που απεικονίζεται έχει κωδικό PDB : 1YY9.

Επειδή τα αντισώματα αναγνωρίζουν ελεύθερα αντιγόνα σε διάλυμα, οι Β κυτταρικοί επίτοποι στις φυσικές πρωτεΐνες αποτελούνται κυρίως από πολικά αμινοξέα για να είναι προσιτοί, και να μπορούν να προσδεθούν με το αντίσωμα. Περιοχές στην επιφάνεια της πρωτεΐνης του αντιγόνου που προεξέχουν, είναι πιο πιθανό να αναγνωριστούν ως επίτοποι και αποτελούνται σχεδόν εξ' ολοκλήρου από πολικά αμινοξικά κατάλοιπα, ενώ αμινοξικές ακολουθίες που είναι κρυμμένες στο εσωτερικό της πρωτεΐνης αποτελούνται συχνά από υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα και δεν λειτουργούν ως Β κυτταρικοί επίτοποι, εκτός αν η πρωτεΐνη πρώτα αποδιαταχθεί. Μετά από έρευνες, έχει διαπιστωθεί ότι σύνθετες πρωτεΐνες, έχουν πολλαπλούς αλληλοεπικαλυπτόμενους Β κυτταρικούς επιτόπους, δηλαδή το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας της πρωτεΐνης είναι δυνητικά αντιγονικό (Kringelum, Nielsen et al. 2013).

1.4.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ

Τα Τ λεμφοκύτταρα δεν αναγνωρίζουν διαλυτά αντιγόνα, αλλά αντιγόνα που έχουν πρώτα υποστεί επεξεργασία και αλληλεπιδρούν με τα μόρια MHC, όπου στη συνέχεια παρουσιάζονται στην επιφάνεια των κυττάρων με τα μόρια MHC ως σύμπλοκο. Σε αντίθεση με τους Β κυτταρικούς επιτόπους όπου διακρίνονται μέσω της ικανότητας τους να αλληλεπιδρούν με το αντίσωμα, οι Τ κυτταρικοί επίτοποι πρέπει να προσδιοριστούν μέσω της ικανότητας τους να αλληλεπιδρούν τόσο με τον Τ κυτταρικό υποδοχέα, όσο και με ένα μόριο MHC (Tong, Tan et al. 2007). Ένα μόριο MHC δεν είναι εξειδικευμένο για ένα συγκεκριμένο Τ κυτταρικό επίτοπο, αλλά αλληλεπιδρά με μία ποικιλία διαφορετικών πεπτιδίων. Οι επίτοποι που αναγνωρίζονται από τα Τ κύτταρα είναι πεπτίδια, τα οποία τείνουν να βρίσκονται συνήθως στο εσωτερικό των μορίων και εκτίθενται μετά από επεξεργασία στα αντιγονοπαρουσιαστικά ή στα τροποποιημένα εαυτά κύτταρα (Altman, Moss et al. 2011).

1.5 ΑΝΟΣΟΓΟΝΟ - ΑΝΤΙΓΟΝΟ

Ανοσογόνο (Immunogen), είναι μία ουσία που μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή αντισωμάτων ή/και δραστικών Τ λεμφοκυττάρων, δηλαδή μία ουσία που επάγει ανοσολογική απόκριση. Αντιγόνο (antigen), είναι μία ουσία που συνδέεται ειδικά με ένα μόριο αντισώματος ή με τον επιφανειακό υποδοχέα δραστικών Τ λεμφοκυττάρων, και μπορεί να αποτελέσει στόχο της ανοσολογικής απόκρισης. Όλες οι ανοσογόνες ουσίες είναι ταυτόχρονα και αντιγόνα (antigen). Το αντίθετο δεν ισχύει, δεν είναι όλα τα αντιγόνα και ανοσογόνα (Levine and Koh 1999).

Τα απτένια, τα οποία είναι μικρά μόρια χαμηλού μοριακού βάρους (~80 KDa), θεωρούνται αντιγόνα, όχι όμως και ανοσογόνα. Θα γίνουν ανοσογόνα στην περίπτωση που αλληλεπιδράσουν και γίνουν σύμπλοκο με κάποια πρωτεΐνη, όπου στη συνέχεια το σύμπλοκο θα προκαλέσει ανοσολογική απόκριση. Τέτοια μόρια είναι η πενικιλίνη, η ασπιρίνη, η σουλφοναμίδη και η γενταμυκίνη. Αντιγόνα θεωρούνται οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, όπως τα βακτήρια και τα βακτηριακά προϊόντα, οι μύκητες, τα παράσιτα και οι ιοί. Ειδικότερα, ως αντιγόνα θεωρούνται

τα μακρομόρια του παθογόνου, δηλαδή οι πρωτεΐνες, οι πολυσακχαρίτες, τα λιπίδια και τα νουκλεϊκά οξέα.

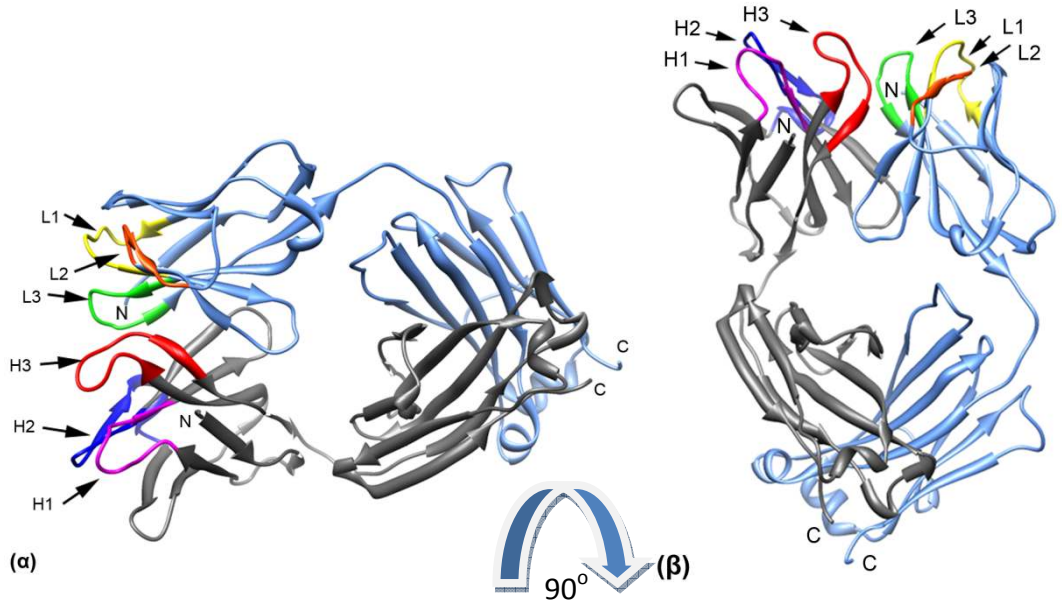
1.6 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΕΣ

Οι ανοσοσφαιρίνες (Immunoglobulins, Ig), είτε είναι μεμβρανοδυνδεόμενα μόρια (membrane Immunoglobulins, mIgs) και λειτουργούν ως υποδοχείς στην επιφάνεια των Β λεμφοκυττάρων, αναγνωρίζοντας διαλυτά αντιγόνα, είτε είναι ετερογενή εκκριτικά μόρια (secretary Immunoglobulins, sIgs) από τα πλασματοκύτταρα, που συμμετέχουν στην χυμική ανοσία.

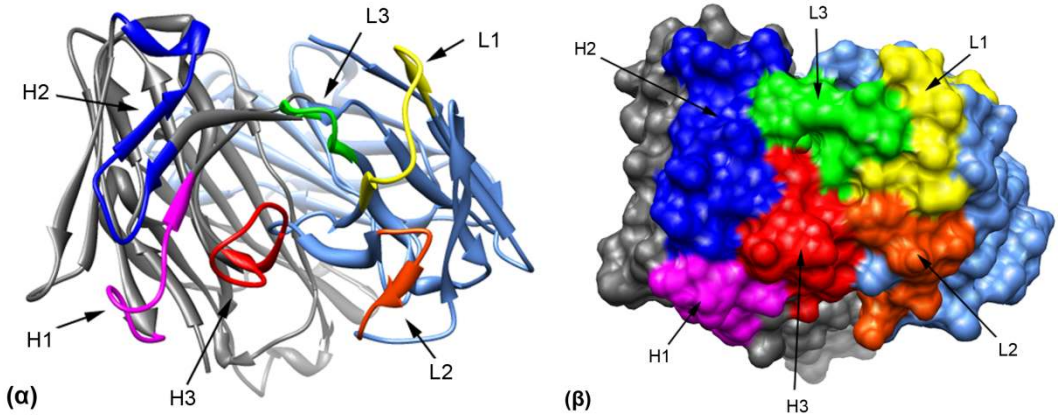
Οι ανοσοσφαιρίνες (Igs) έχουν μία κοινή δομή, η οποία σχηματίζεται από δύο πανομοιότυπες ελαφριές (Light chains, L) πολυπεπτιδικές αλυσίδες μοριακού βάρους περίπου 25KDa η καθεμία, και από δύο πανομοιότυπες βαριές (Heavy chains, H) πολυπεπτιδικές αλυσίδες μοριακού βάρους περίπου 50KDa. Κάθε ελαφριά αλυσίδα συγκρατείται με μία βαριά με ένα δισουλφιδικό δεσμό και με μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, όπως δεσμούς αλάτων και υδρογόνου. Παρόμοιες μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και δισουλφιδικοί δεσμοί συγκρατούν τις δύο πανομοιότυπες βαριές κι ελαφριές αλυσίδες μεταξύ τους, σχηματίζοντας το διμερές ανοσοσφαιρινικό μόριο (Wang, Singh et al. 2007).

Τα πρώτα 110 αμινοξέα από το αμινοτελικό άκρο και από την ελαφριά και από την βαριά αλυσίδα έχουν υψηλή μεταβλητότητα, καθώς ποικίλουν πολύ ανάμεσα στα αντισώματα διαφορετικής ειδικότητας (Schroeder and Cavacini 2010). Ονομάζονται μεταβλητές περιοχές, (Variable, V), V_L για την ελαφριά αλυσίδα και V_H για την βαριά αλυσίδα. Οι διαφορές που προκύπτουν στα διάφορα αντισώματα, οφείλονται στην ποικιλότητα των αμινοξέων στις περιοχές αυτές. Στην πραγματικότητα, η εξειδίκευση των αντισωμάτων οφείλεται στους βρόχους (θηλιές) που σχηματίζονται στη δομή των μεταβλητών περιοχών και των δύο αλυσίδων, που ονομάζονται συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές, (Complementary determining regions, CDR) και σχηματίζουν την περιοχή πρόσδεσης με το αντιγόνο (Εικόνα 13, Εικόνα 14). Μέσα στην ίδια τάξη αντισωμάτων όμως, παρατηρούνται πολύ λιγότερες διαφορές όταν συγκριθούν με τις υπόλοιπες περιοχές του μορίου. Οι περιοχές των αντισωμάτων που παρατηρείται μεγάλη συντηρητικότητα

ονομάζονται σταθερές περιοχές (Constant, C), C_L για την ελαφριά και C_H για την βαριά αλυσίδα (Davies, Padlan et al. 1975).



Εικόνα 13 : (α) Γραφική αναπαράσταση cartoon με το λογισμικό UCSF Chimera 1.6.2 της τρισδιάστασης δομής του μονοκλωνικού αντισώματος Cetuximab με κωδικό PDB : 1YY8. Με γαλάζιο χρώμα η ελαφριά, και με γκρι σκούρο χρώμα η βαριά αλυσίδα του αντισώματος. Με κίτρινο, πορτοκαλί και πράσινο οι υπερμεταβλητές θηλιές της ελαφριάς αλυσίδας που ονομάζονται L1, L2, και L3, σύμφωνα με την σειρά που εντοπίζονται στην πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης. Αντίστοιχα με μαντζέντα, σκούρο μπλε και κόκκινο οι υπερμεταβλητές θηλιές της βαριάς αλυσίδας (H1, H2, H3). (β) Αναπαράσταση της ίδιας δομής, στραμμένη κατά 90° μοίρες.



Εικόνα 14 : (α) Αναπαράσταση της δομής με κωδικό PDB : 1YY8, με τους ίδιους χρωματισμούς για τις υπερμεταβλητές περιοχές και τις αλυσίδες του αντισώματος, όπως στην εικόνα 14. Η δομή είναι στραμμένη κατά τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε κάθετα στην εικόνα να διακρίνεται η κοιλότητα που σχηματίζεται, τα αμινοξικά κατάλοιπα της οποίας θα αλληλεπιδράσουν με το αντιγόνο. (β) Χωροπληρωτικό μοντέλο της ίδιας αναπαράστασης της τρισδιάστατης δομής με κωδικό PDB : 1YY8.

Χημικές και ενζυμικές μέθοδοι αποκάλυψαν τη βασική δομή του αντισώματος. Σε πείραμα διάσπασης της Ανοσοσφαιρίνης Γ (IgG) με παπαΐνη, παρήχθησαν τρία θραύσματα, τα δύο ήταν πανομοιότυπα κι ένα τρίτο αρκετά διαφορετικό. Τα δύο πανομοιότυπα θραύσματα διέθεταν δραστικότητα αντιγονικής δέσμευσης, και ονομάστηκαν θραύσματα Fab (Fragment, antigen binding). Το τρίτο θραύσμα, δεν διέθετε αντιγονική ειδικότητα, βρέθηκε όμως ότι κρυσταλλώνεται κατά την αποθήκευση σε χαμηλή θερμοκρασία, και ονομάστηκε κρυσταλλώσιμο ή Fc θραύσμα (Fragment crystallizable) (Bentley 1994).

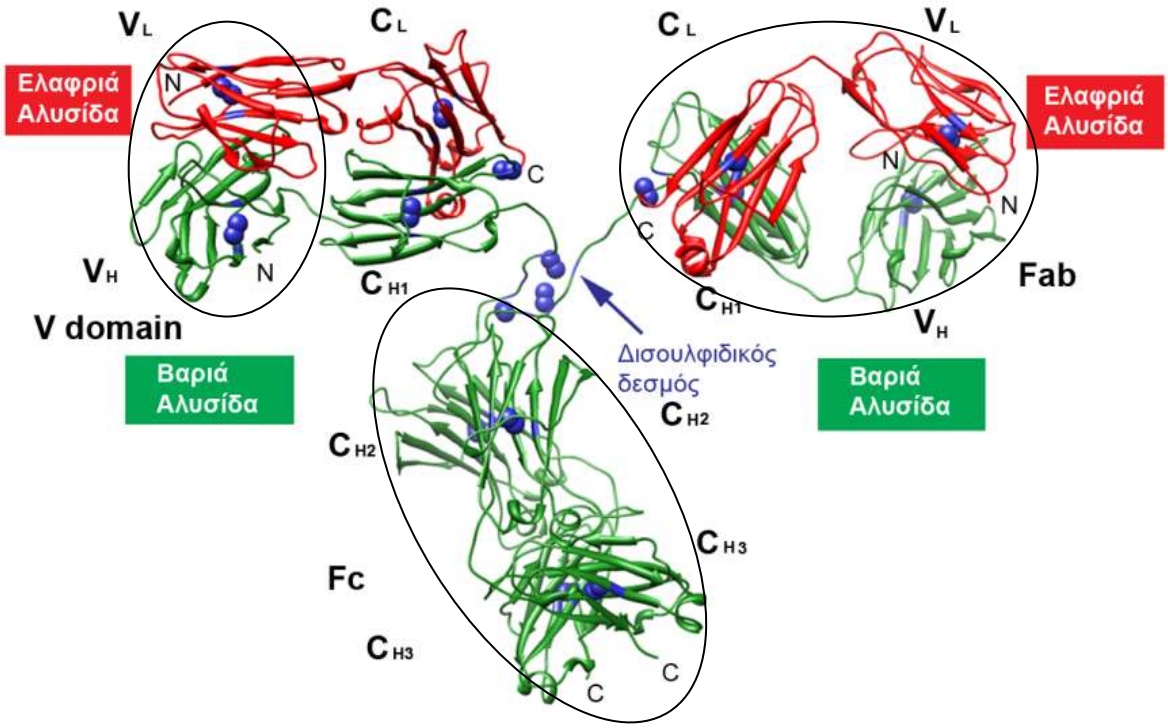
Τάξη	Βαριά αλυσίδα	Υποτάξεις	Ελαφριά αλυσίδα
IgG	γ	γ1, γ2, γ3, γ4	κ ή λ
IgM	μ	Καμία	κ ή λ
IgA	α	α1, α2	κ ή λ
IgE	ε	Καμία	κ ή λ
IgD	δ	Καμία	κ ή λ

Πίνακας 1 : Σύσταση αλυσίδων των πέντε τάξεων ανοσοσφαιρινών στον άνθρωπο.

Η ελαφριά αλυσίδα των αντισωμάτων εκτός από την μεταβλητή (V_L) περιοχή που αποτελεί τη μισή αμινοξική ακολουθία, η άλλη μισή είναι η σταθερή (C_L), η οποία έχει δύο βασικές ακολουθίες αμινοξέων. Έτσι, υπάρχουν δύο τύποι ελαφριάς αλυσίδας, κάπα (κ) και λάμδα (λ). Ομοίως στην βαριά αλυσίδα υπάρχει η μεταβλητή περιοχή VH ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο και η υπόλοιπη αλυσίδα ανήκει σε μία από τις πέντε βασικές ακολουθίες σταθερής περιοχής (C) (μ, δ, γ, ε, και α). Κάθε μία από τις πέντε διαφορετικές βαριές αλυσίδες ονομάζεται ισότυπος (isotype). Το μήκος των σταθερών περιοχών είναι περίπου 330 αμινοξικά κατάλοιπα για το δ, γ, και α, και 440 αμινοξικά κατάλοιπα για το μ και το ε. Η βαριά αλυσίδα καθορίζει και την τάξη του αντισώματος, IgM(μ), IgG(γ), IgA(α), IgD(δ) και IgE(ε) (Spiegelberg 1989). Κάθε τάξη έχει είτε κ είτε λ ελαφριές αλυσίδες (Πίνακας 1). Μικρές διαφορές στην αμινοξική ακολουθία της βαριάς αλυσίδας τύπου α και γ, οδήγησαν σε μια περαιτέρω κατηγοριοποίηση σε υποτάξεις. Στον άνθρωπο υπάρχουν δυο υποτάξεις της α βαριάς αλυσίδας, α1 και α2 (άρα και δυο υποκατηγορίες, IgA1 και IgA2), και τέσσερις για την γ βαριά αλυσίδα, γ1, γ2, γ3 και γ4 (άρα τέσσερις υποτάξεις, IgG1, IgG2, IgG3 και IgG4) (Wingren, Michaelsen et al. 1996).

1.7 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ

Ύστερα από μελέτη των κρυσταλλογραφικών αναλύσεων με ακτίνες Χ, οι ανοσοσφαιρίνες ακολουθούν ένα κοινό χαρακτηριστικό δίπλωμα στο χώρο, το οποίο ονομάστηκε Ανοσοσφαιρινικό Δίπλωμα (Immunoglobulin Fold). Η δομή αυτή ακολουθεί τη χαρακτηριστική δομή β σάντουιτς (β-sandwitch) δύο β-πτυχωτών φύλλων (β-sheets), καθένα από τα οποία αποτελείται από αντιπαράλληλους β-κλώνους (β-strands), όπου σχηματίζονται θηλιές (loops) διαφόρων μεγεθών. Οι β-κλώνοι σταθεροποιούνται με υδρογονικούς δεσμούς που συνδέουν τις αμινομάδες (-NH) με τις καρβοξυλικές ομάδες ενός γειτονικού κλώνου. Οι β-κλώνοι αποτελούνται από πολικά και υδρόφοβα κατάλοιπα με τις πλευρικές τους αλυσίδες να οργανώνονται κάθετα προς το β-πτυχωτό φύλλο. Τα υδρόφοβα αμινοξέα κατευθύνονται κυρίως προς το εσωτερικό του σάντουιτς, ενώ τα πολικά αμινοξέα κατευθύνονται κυρίως προς το εξωτερικό του (Harris, Skaletsky et al. 1998).



Εικόνα 15 : Γραφική απεικόνιση της δομής με κωδικό PDB : 1IGT, με το λογισμικό UCSF Chimera 1.6.2. Με πράσινο χρώμα αναπαριστώνται οι βαριές αλυσίδες του μορίου, με κόκκινο οι ελαφριές αλυσίδες, και με μπλε σφαίρες οι δισουλφιδικοί δεσμοί. Γίνεται διαχωρισμός της Fv περιοχής, της Fab περιοχής και της Fc περιοχής με ελλείψεις. Επίσης κάθε β-σάντουιτς ονομάζεται σύμφωνα με το αν βρίσκεται στην ελαφριά ή τη βαριά αλυσίδα (L, H), και σύμφωνα με το αν βρίσκεται στην σταθερή ή τη μεταβλητή περιοχής (V, C).

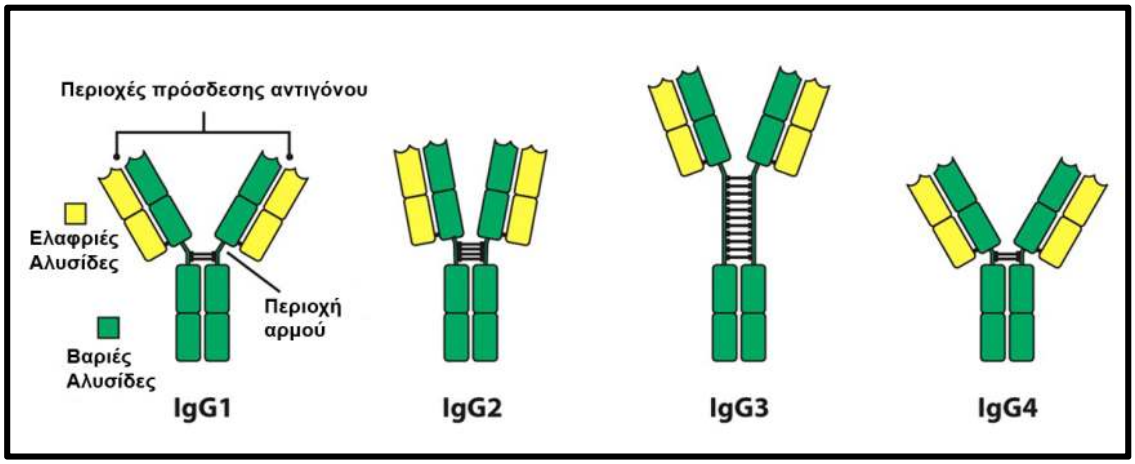
Παρόλο που οι μεταβλητές και οι σταθερές περιοχές έχουν παρόμοια δομή, υπάρχουν και λεπτές διαφορές. Η διαφορά είναι στα β-σάντουιτς του σταθερού και του μεταβλητού τμήματος ο αριθμός των β-κλώνων που σχηματίζουν τα β-πτυχωτά φύλλα. Στο μεταβλητό τμήμα το β-σάντουιτς έχει δύο β-πτυχωτά φύλλα με πέντε αντιπαράλληλους β-κλώνους και τέσσερις αντιπαράλληλους β-κλώνους, συγκρατούμενους από ένα δισουλφιδικό δεσμό σε συντηρημένες θέσεις. Στο σταθερό τμήμα της ελαφριάς αλυσίδας αποτελείται από ένα β σάντουιτς (β-sandwich) με τέσσερις αντιπαράλληλους β κλώνους στο ένα β φύλλο και τρεις αντιπαράλληλους β κλώνους στο δεύτερο φύλλο, με ένα δισουλφιδικό δεσμό ανάμεσά τους (Huber 1980).

Το χαρακτηριστικό αυτό ανοσοσφαιρινικό δίπλωμα, επιτρέπει την ανάπτυξη μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις δομικά αυτοτελείς περιοχές (domains), κατά μήκος της επιφάνειας των β-πτυχωτών φύλλων. Δημιουργούνται μη ομοιοπολικοί δεσμοί ανάμεσα στα β-σάντουιτς της κάθε αλυσίδας καθώς και ανάμεσα στις διαφορετικές αλυσίδες. Επίσης, επιτρέπει την δημιουργία θηλιών ή βρόχων (loops), ποικίλα σε μήκος, τα οποία αποτελούν την περιοχής δέσμευσης του αντιγόνου στο ανοσοσφαιρινικό μόριο (Εικόνα 15) (Wilson and Stanfield 1994).

1.7.1 ΤΑΞΕΙΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

1.7.1.1 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗ G

Η ανοσοσφαιρίνη G (Immunoglobulin G, IgG), είναι η πιο διαδεδομένη τάξη στον ορό, αποτελώντας περίπου το 80% της συνολικής ανοσοσφαιρίνης του ορού. Αποτελείται από δύο βαριές αλυσίδες τύπου γ και δύο ελαφριές αλυσίδες τύπου κ ή λ. Στον άνθρωπο υπάρχουν τέσσερις υποτάξεις της IgG, που διαφέρουν στην ακολουθία της γ αλυσίδας, IgG1, IgG2, IgG3 και IgG4. Η αρίθμηση προκύπτει με βάση τη συγκέντρωσή τους στον ορό. Δομικά, οι υποτάξεις αυτές διαφέρουν στο μέγεθος της περιοχής του αρμού (hinge region), καθώς και στον αριθμό και τη θέση των δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των δύο βαριών αλυσίδων στην περιοχή αυτή (Εικόνα 16). Λειτουργικά, οι αμινοξικές διαφορές στην ακολουθία της κάθε υποτάξης καθορίζουν την βιολογική δράση του μορίου (Butler, Wertz et al. 2009).



Εικόνα 16 : Γενική Δομή των τεσσάρων υποτάξεων της IgG του ανθρώπου. Διαφέρουν ως προς τον αριθμό και τη διευθέτηση των δισουλφιδικών δεσμών που συγκρατούν τα ζεύγη των αλυσίδων.

Οι IgG1, IgG2 και IgG4 μπορούν και διαπερνούν εύκολα τον πλακούντα και είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την προστασία του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Η IgG3 είναι πιο δραστική για την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, ακολουθούν οι IgG1 και IgG2, ενώ η IgG4 δεν έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί το συμπλήρωμα. Σχετικά με τους Fc υποδοχείς, οι IgG1 και IgG3 είναι πιο δραστικές στο να επάγουν τον οψωνισμό, ακολουθεί η IgG4, ενώ η IgG2 είναι λιγότερο δραστική. Αυτή τους η ιδιότητα σχετίζεται με το πως αλληλεπιδρούν με τους Fc υποδοχείς των φαγοκυττάρων (Michaelsen 1988).

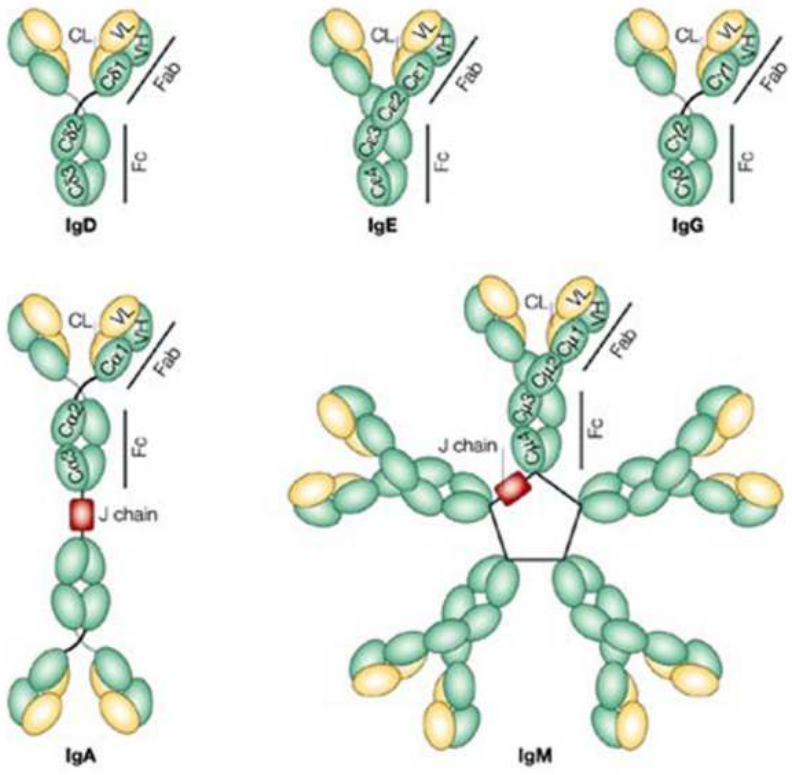
1.7.1.2 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗ Α

Η ανοσοσφαιρίνη Α (Immunoglobulin A, IgA) έχει σημαντικό ρόλο στην τοπική ανοσία βλεννογόνων και για το λόγο αυτό παράγεται πολύ περισσότερη IgA στους ιστούς των βλεννογόνων από το άθροισμα όλων των υπολοίπων ανοσοσφαιρινών (Fagarasan and Honjo 2003). Η IgA έχει δύο υποτάξεις, την IgA1 και την IgA2 και μπορεί να εμφανίζεται σε μία διμερή μορφή, που ονομάζεται εκκριτική IgA (secretory IgA - sIgA). Σε αυτή τη μορφή, η IgA είναι η κύρια ανοσοσφαιρίνη που βρίσκεται στις εκκρίσεις των βλεννογόνων, όπως στα δάκρυα, στο σάλιο, στο πρωτόγαλα, αλλά και σε εκκρίσεις του ουροποιογεννητικού συστήματος, του γαστρεντερικού σωλήνα καθώς και της αναπνευστικής οδού (Woof and Kerr 2006). Ανιχνεύεται επίσης και στο αίμα σε μικρές ποσότητες. Η IgA ενεργοποιεί ελάχιστα το σύστημα του συμπληρώματος αλλά μπορεί να προκαλέσει οψωνισμό (Woof and Russell 2011).

Ενώ η IgA1 κυριαρχεί στον ορό (~80%), τα ποσοστά της IgA2 είναι υψηλότερα σε εκκρίσεις, παρά στον ορό (~35% στις εκκρίσεις) (Delacroix, Dive et al. 1982). Η αναλογία των εκκριτικών κυττάρων που παράγουν IgA1 και IgA2 ποικίλει στους διάφορους λεμφικούς ιστούς του ανθρώπινου σώματος (Simell, Kilpi et al. 2006). Η IgA1 είναι η κύρια IgA υποτάξη που βρίσκεται στον ορό. Η πλειονότητα των λεμφικών ιστών απαρτίζεται από κύτταρα που παράγουν IgA. Στην IgA2, οι βαριές και οι ελαφριές αλυσίδες δεν συγκρατούνται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς, αλλά με μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις. Και η IgA1 και η IgA2 έχουν βρεθεί σε εξωτερικές εκκρίσεις, όπως στο πρωτόγαλα, το μητρικό γάλα, τα δάκρυα και το σάλιο, όπου η IgA2 είναι επικρατέστερη, απ' ότι στο αίμα (Delacroix, Dive et al. 1982). Επειδή το ανοσοποιητικό σύστημα των νεογνών δεν είναι πλήρως λειτουργικό, το μητρικό γάλα παίζει σημαντικό ρόλο στη προστασία του. Η παρουσία της sIgA βοηθάει στην προστασία του νεογνού ενάντια στις μολύνσεις κατά τη διάρκεια του πρώτου μήνα ζωής.

Είναι επίσης δυνατό να γίνει διάκριση των μορφών της IgA ανοσοσφαιρίνης βασιζόμενη στην περιοχή που βρίσκονται, στην IgA του ορού και στην εκκριτική IgA. Στην εκκριτική IgA, πολυμερή των 2-4 μονομερών IgA συνδέονται με δύο επιπλέον αλυσίδες. Μία από αυτές είναι η J αλυσίδα (από το Joining chain), η οποία

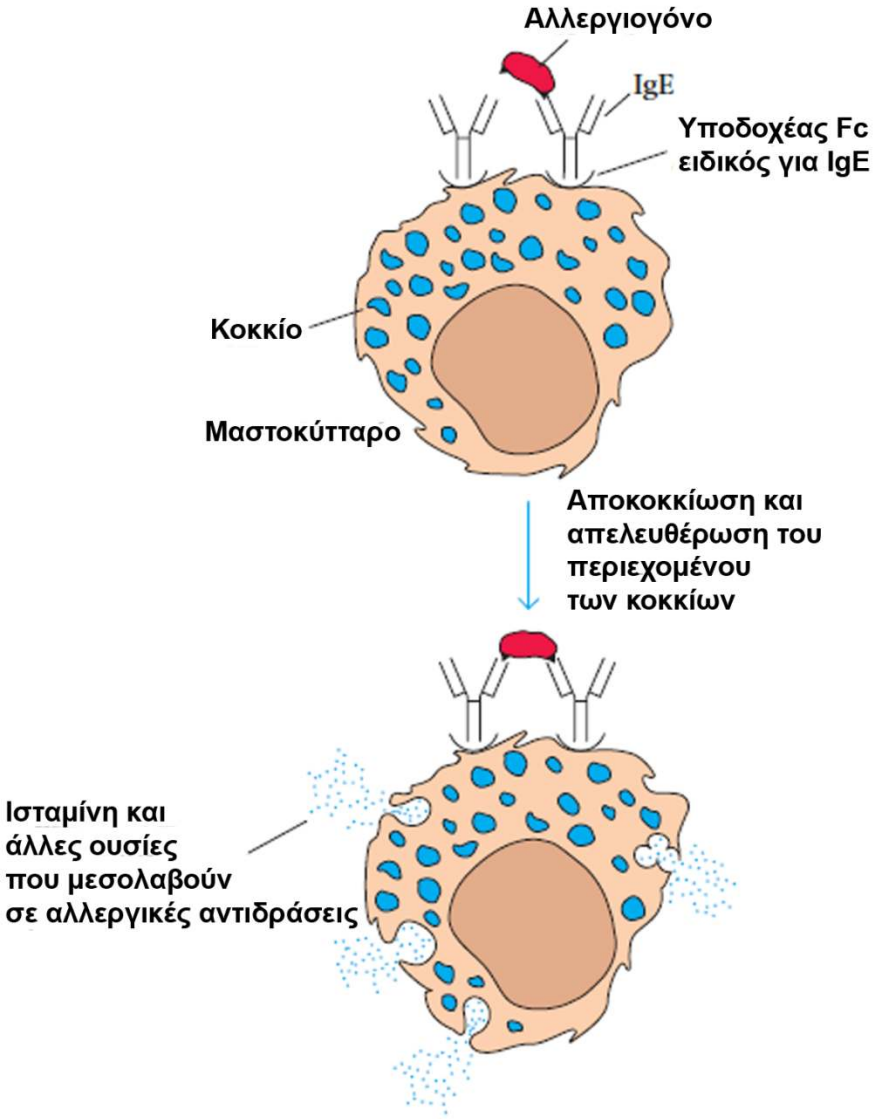
παράγεται στα IgA εκκριτικά κύτταρα, ένα πολυπεπτίδιο μοριακής μάζας 15 kDa, πλούσια σε κυστεΐνη και δομικά τελείως διαφορετική από άλλες ανοσοσφαιρινικές αλυσίδες. Μείωση ή απουσία της IgA, μπορεί να είναι μία κλινικά σημαντική ανοσοανεπάρκεια. Η Neisseria gonorrheae (που προκαλεί την γονόρροια) (Halter, Pohlner et al. 1984), ο Streptococcus pneumoniae (Proctor and Manning 1990), και ο Haemophilus influenzae τύπου B (St Geme, de la Morena et al. 1994), ελευθερώνουν μία πρωτεάση, που καταστρέφει την IgA.



Εικόνα 17 : Γραφική αναπαράσταση των τεσσάρων ανοσοσφαιρινικών τάξεων (Rojas and Apodaca 2002).

1.7.1.3 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗ Ε

Η ανοσοσφαιρίνη (Immunoglobulin E, IgE) έχει πολύ χαμηλή συγκέντρωση στον ορό (0,3 μg/ml), συμμετέχει στις αντιδράσεις υπερευαισθησίας που παρατηρούνται κατά τις αλλεργίες, όπως το άσθμα, η κνίδωση και το αναφυλακτικό σοκ, και υπάρχει στην οικογένεια των θηλαστικών (Gould, Sutton et al. 2003).



Εικόνα 18 : Διαδικασία αποκοκκιωκίωσης. Η πρόσδεση του αντιγόνου (αλλεργιογόνου) την IgE και η αλληλεπίδραση του συμπλόκου με τον υποδοχέα επάγει την διαδικασία της αποκοκκίωσης, δηλαδή την απελευθέρωση ουσιών (μπλε κύκλοι) που μεσολαβούν σε αλλεργικές αντιδράσεις.

Η IgE δεσμεύεται σε μεμβρανικούς υποδοχείς των βασεόφιλων του αίματος και των μαστοκυττάρων των ιστών. Η πρόσδεση του συμπλόκου IgE-αντιγόνο (αλλεργιογόνο) στους υποδοχείς, επάγει τη μεταφορά των κοκκίων των βασεόφιλων και των μαστοκυττάρων προς την πλασματική τους μεμβράνη και την

απελευθέρωση του περιεχομένου τους στο εξωκυττάριο περιβάλλον, μια διαδικασία γνωστή ως αποκοκκιωκυττάρωση (Εικόνα 18). Το αποτέλεσμα είναι η απελευθέρωση μιας ποικιλίας φαρμακολογικά ενεργών μεσολαβητών που πυροδοτεί τις αλλεργικές αντιδράσεις (Chang, Wu et al. 2007).

1.7.1.4 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗ Μ

Η ανοσοσφαιρίνη Μ (Immunoglobulin M, IgM) έχει συγκέντρωση 1,5 μg/ml στον ορό και αποτελεί το 5-10% του συνόλου. Είναι το μεγαλύτερο φυσικό αντίσωμα που εντοπίζεται στο ανθρώπινο κυκλοφορικό σύστημα. Είναι το πρώτο αντίσωμα που εμφανίζεται ως απάντηση στην αρχική έκθεση στο αντιγόνο και παράγεται κατά κύριο λόγο στο σπλήνα.

Η IgM είναι ένα πολυμερές στο οποίο οι ανοσοσφαιρίνες συνδέονται μεταξύ τους ομοιοπολικά με δισουλφιδικούς δεσμούς σχηματίζοντας πενταμερείς ή εξαμερείς δομές. Το μοριακό βάρος ενός πενταμερούς είναι περίπου 970 kDa. Κάθε μονομερές έχει δύο θέσεις πρόσδεσης αντιγόνου, οπότε το πενταμερές έχει δέκα θέσεις πρόσδεσης με αντιγόνα. Στην πράξη, η IgM δεν δεσμεύει δέκα αντιγόνα καθώς λόγο του μεγάλου μεγέθους των αντιγόνων τα εμποδίζει να συνδεθούν σε κοντινές θέσεις. Υπάρχει και σ' αυτήν την ανοσοσφαιρίνη η αλυσίδα J (όχι πάντα), στην πενταμερή μορφή, όχι στην εξαμερή.

Η IgM βρίσκεται κυρίως στον ορό, και λόγο του γεγονότος ότι είναι μεγάλο μόριο, δεν μπορεί να διαχυθεί εύκολα στο διάμεσο ιστό, γι' αυτό και βρίσκεται σε μικρές ποσότητες. Βρίσκεται και ως εκκριτικό μόριο και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος και στην επαγωγή του οψωνισμού (Wellek, Hahn et al. 1976). Ακόμα, είναι η πρώτη ανοσοσφαιρίνη που εκφράζεται από τα ώριμα Β κύτταρα καθώς επίσης είναι η πρώτη ανοσοσφαιρίνη που εκφράζεται στο έμβρυο (περίπου στις 20 πρώτες βδομάδες). Εμφανίζεται στα αρχικά στάδια μιας μόλυνσης και συνήθως επανεμφανίζονται σε μικρότερο βαθμό σε μία νέα έκθεση στον ίδιο παράγοντα. Η IgM δεν διαπερνά τον ανθρώπινο πλακούντα σε αντίθεση με την IgG. Επειδή τα IgM αντισώματα συχνά συνδέονται με συγκεκριμένα αντιγόνα, ακόμα και σε απουσία προηγούμενης ανοσοποίησης, ονομάζονται και «φυσικά αντισώματα».

Παθολογικές καταστάσεις που συνδέονται με την ανοσοσφαιρίνη Μ, είναι η Μακροσφαιριναιμία Waldenström και η μονοκλωνική γαμμαπάθεια απροσδιορίστης σημασίας (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS). Η πρώτη περίπτωση ανήκει στα βραδείας εξέλιξης Non Hodgkin's (NHL) λεμφώματα. Είναι μια κατάσταση κατά την οποία βρίσκεται στο αίμα μη φυσιολογική IgM (μονοκλωνική IgM). Οι ασθενείς συνήθως είναι συμπτωματικοί, σε μερικούς ανθρώπους ωστόσο, το εύρημα είτε συνδέεται με άλλη ασθένεια είτε μπορεί να εξελιχτεί μετά από χρόνια σε άλλες διαταραχές, συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων μορφών καρκίνου του αίματος. Η δεύτερη περίπτωση είναι η παρουσία στον ορό ή/και στα ούρα μιας ομοιογενούς ανοσοσφαιρίνης ή τμήματός της, που εκκρίνεται από ένα κλωνικό πληθυσμό πλασματοκυττάρων ή Β λεμφοκυττάρων.

1.7.1.5 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗ D

Η ανοσοσφαιρίνη IgD αποτελεί ένα «μυστήριο» από το 1964 που ανακαλύφθηκε αρχικά σε ασθενή που έπασχε από πολλαπλό μυέλωμα. Έχει συγκέντρωση 30μg/ml και αποτελεί το 0,2% της ανοσοσφαιρίνης του ορού. Η IgD με την IgM αποτελούν της κυρίαρχες μεμβρανικές ανοσοσφαιρίνες που εκφράζονται στα Β κύτταρα και η βιολογική της λειτουργία παραμένει ακόμα άγνωστη. Πρόσφατα, παρατηρήθηκε η IgD να προσδένεται σε βασεόφιλα και μαστικά κύτταρα επάγοντας την ενεργοποίησή τους για να παράγουν αντιμικροβιακούς παράγοντες, οι οποίοι συμμετείχαν στην γραμμή άμυνας του αναπνευστικού (Chen, Xu et al. 2009).

1.7.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Εκτός από την πρόσδεση του αντιγόνου, τα αντισώματα συμμετέχουν και σε άλλες βιολογικές λειτουργίες. Πρέπει να αναφερθεί ότι τα αντισώματα δεν έχουν τη δυνατότητα να θανατώσουν ή να απενεργοποιήσουν τον παθογόνο οργανισμό μόνο με την πρόσδεσή τους σε αυτό. Για να μπορούν να είναι αποτελεσματικά ενάντια στα παθογόνα, τα αντισώματα πρέπει εκτός από το να τα αναγνωρίζουν και να προσδένονται σε αυτά, να ενεργοποιήσουν τους φυσιολογικούς μηχανισμούς του οργανισμού που θα καταλήξουν στην απομάκρυνση του αντιγόνου και τον θάνατο του παθογόνου. Ενώ το Fab θραύσμα του αντισώματος είναι υπεύθυνο για τη δέσμευση του αντιγόνου, το Fc θραύσμα της βαριάς αλυσίδας είναι υπεύθυνο για μια ποικιλία αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες και κύτταρα του οργανισμού που θα καταλήξουν σε ανοσολογική απόκριση (Casadevall, Dadachova et al. 2004). Τρεις βασικές λειτουργίες είναι ο οψωνισμός, η εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα και η ενεργοποίηση του συμπληρώματος (Εικόνα 19).

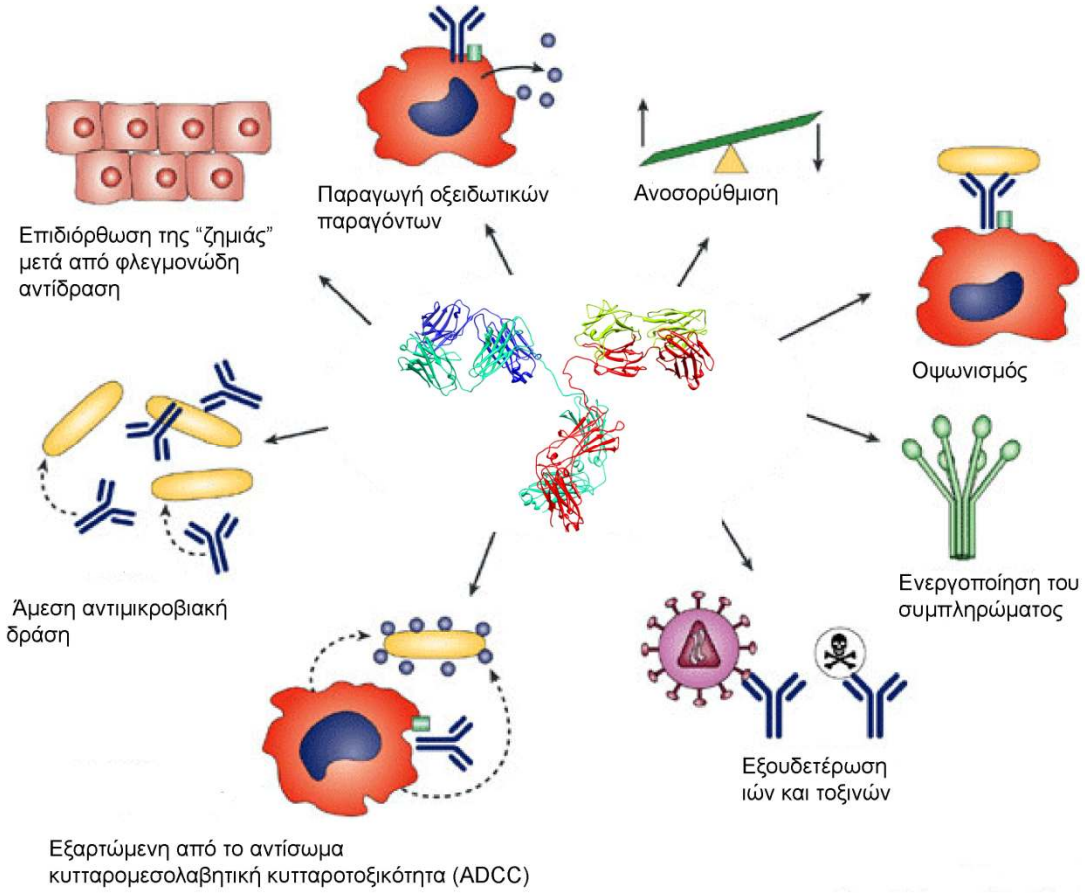
1.7.2.1 ΟΨΩΝΙΣΜΟΣ

Ο οψωνισμός (opsonization) είναι η επαγωγή της φαγοκυττάρωσης του αντιγόνου από τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα, ιδιαίτερα σημαντική διαδικασία στην άμυνα κατά των βακτηρίων. Στην επιφάνεια των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων υπάρχουν πρωτεϊνικά μόρια που ονομάζονται Fc υποδοχείς (FcR), τα οποία αλληλεπιδρούν με το Fc θραύσμα των ανοσοσφαιρινών. Έτσι το παθογόνο γίνεται στόχος διαφόρων διαδικασιών αποδόμησης που περιλαμβάνουν ενζυμική διάσπαση, οξειδωτική καταστροφή και επιδράσεις αντιμικροβιακών πεπτιδίων στη διάσπαση μεμβρανών (Casadevall, Dadachova et al. 2004).

1.7.2.2 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ

Το σύστημα του συμπληρώματος (complement system) είναι ένα σύνολο γλυκοπρωτεϊνών του ορού, που μπορούν να διαπερνούν τις μεμβράνες. Ενεργοποιείται από την ανοσοσφαιρίνη IgM, στον άνθρωπο, και κάποιες υποτάξεις της IgG (IgG1, IgG2 και IgG3, στον άνθρωπο), και λειτουργεί σαν μία γέφυρα σύνδεσης της ειδικής της μη ειδικής ανοσολογικής απόκρισης.

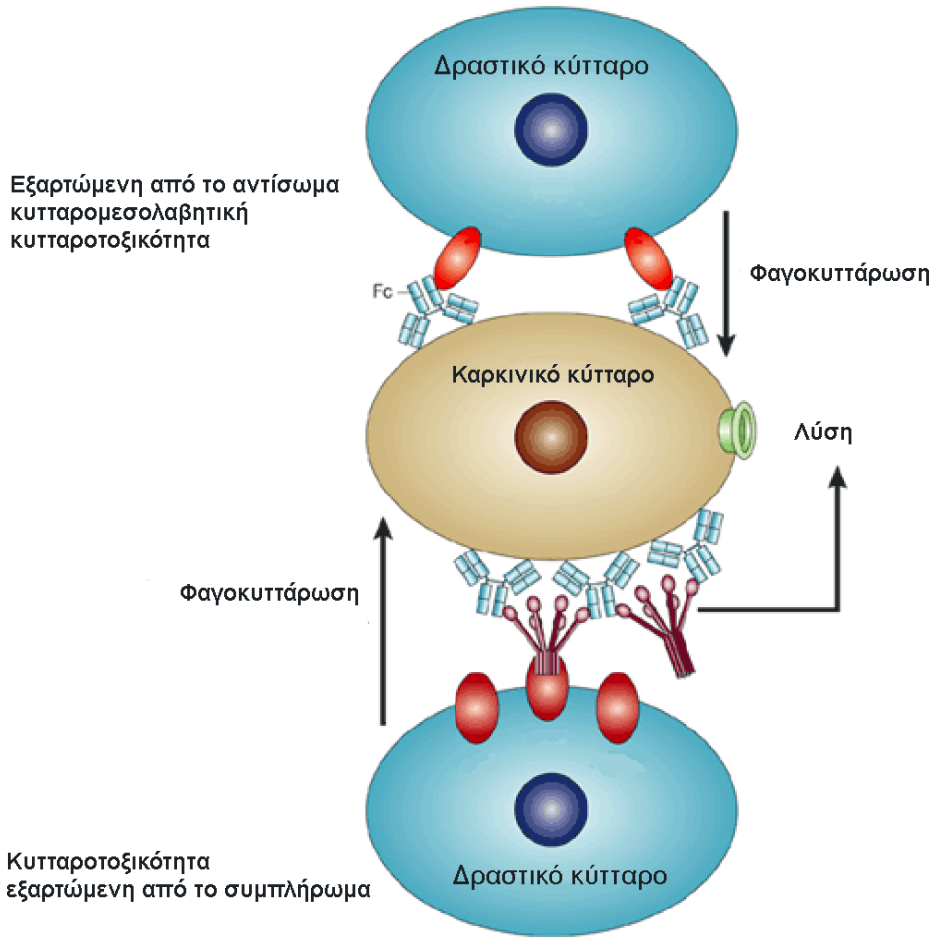
Μετά την αρχική ενεργοποίηση, τα συστατικά του συμπληρώματος αλληλεπιδρούν σε μία ελεγχόμενη ακολουθία για να πραγματοποιήσουν ένα βασικό αριθμό λειτουργιών όπως η λύση κυττάρων, βακτηρίων και ιών, ο οψωνισμός, δέσμευση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος σε ειδικούς υποδοχείς του συμπληρώματος, η οποία επάγει λειτουργίες όπως η φλεγμονή και η έκκριση ανοσορυθμιστικών μορίων, καθώς και ανοσολογική κάθαρση, δηλαδή η απομάκρυνση ανοσολογικών συμπλεγμάτων από την κυκλοφορία και η επανατοποθέτησή τους στο σπλήνα και το ήπαρ (van Lookeren Campagne, Wiesmann et al. 2007). Η διαδικασία ενεργοποίησης του συμπληρώματος από το αντίσωμα ονομάζεται κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα (complement-dependent cytotoxicity, CDC) (Εικόνα 20) (Carter 2001).



Εικόνα 19 : Βασικές λειτουργίες των αντισωμάτων. Επιδιορθώνουν «ζημιές» μετά από φλεγμονώδη αντίδραση. Παράγουν οξειδωτικούς παράγοντες και συμμετέχουν στην ανοσορύθμιση. Επάγουν τον οψωνισμό, και ενεργοποιούν το συμπλήρωμα. Εξουδετερώνουν ιούς και τοξίνες, κι έχουν άμεση αντιμικροβιακή δράση. Επίσης επάγουν την εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταροτοξικότητα (ADCC) (Casadevall, Dadachova et al. 2004).

1.7.2.3 ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΣΟΛΑΒΗΤΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Στην περίπτωση της εξαρτώμενης από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητικής κυτταροτοξικότητας (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), μη ειδικά κυτταροτοξικά κύτταρα εκφράζουν μεμβρανικούς υποδοχείς το Fc θραύσμα του αντισώματος. Τα κύτταρα αυτά, ουδετερόφιλα, εωσινόφιλα, μονοκύτταρα, μακροφάγα, μονοκύτταρα και NK κύτταρα, μέσω των υποδοχέων (FcR) που διαθέτουν, συνδέονται με το Fc θραύσμα των αντισωμάτων, ειδικά δεσμευμένων πάνω σε ένα κύτταρο-στόχο και στη συνέχεια προκαλούν τη λύση του (Casadevall 2003). Παρόλο που τα συγκεκριμένα κυτταροτοξικά κύτταρα δεν είναι αντιγονοειδικά, κατευθύνονται προς συγκεκριμένα κύτταρα στόχους, που καθορίζονται από την ειδικότητα των αντισωμάτων που συμμετέχουν στην όλη διαδικασία. Αυτή η κυτταροτοξικότητα ονομάζεται εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα (Antibody-dependent cell-mediated cytoxicity, ADCC). Το αντίσωμα λειτουργεί ως ένας υποδοχέας, που βοηθάει το δραστικό κύτταρο στην αναγνώριση και τη θανάτωση του κυττάρου στόχου (Εικόνα 20) (Carter 2001).



Εικόνα 20 : Με γαλάζιο απεικονίζονται τα μη ειδικά κυτταροτοξικά κύτταρα, των οποίων οι μεμβρανικοί υποδοχείς της επιφάνειάς τους θα αλληλεπιδράσουν με το σταθερό (Fc) τμήμα του αντισώματος. Στο επάνω τμήμα της εικόνας απεικονίζεται η εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα (Antibody-dependent cell-mediated cytoxicity, ADCC) και στο κάτω τμήμα απεικονίζεται η εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα (complement-dependent cytotoxicity, CDC). Και οι δύο λειτουργίες έχουν ως βασικό στόχο τη λύση του καρκινικού κυττάρου (Carter 2001).

1.8 ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

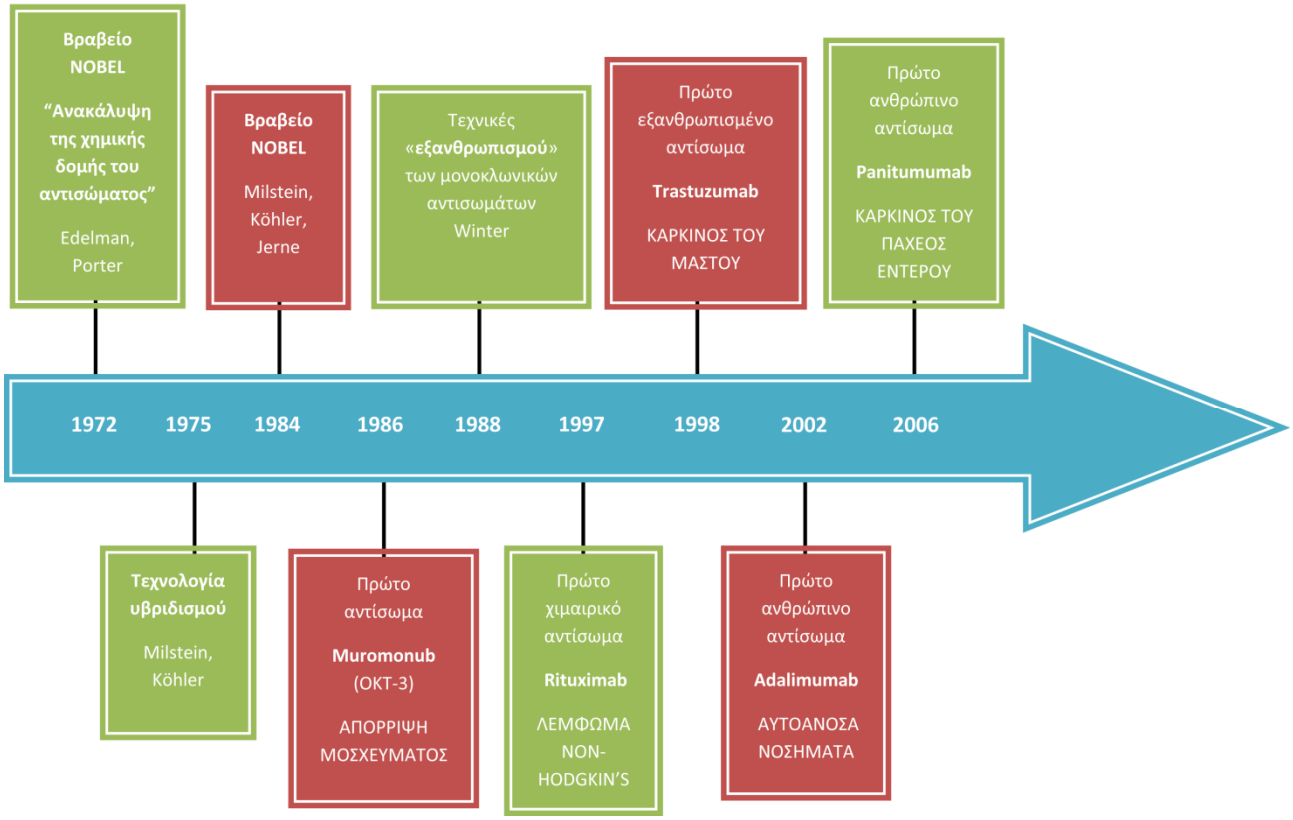
Τα μονοκλωνικά αντισώματα (monoclonal antibodies - mAbs), είναι ομοιογενείς πληθυσμοί ανοσοσφαιρινών, που προέρχονται από ένα μοναδικό πλασματοκύτταρο, με προκαθορισμένη ειδικότητα προς ένα αντιγονικό επίτοπο και δυνατότητα για *in vitro* ατέρμονα αναπαραγωγή. Χρησιμοποιούνται θεραπευτικά σε αυτοάνοσα νοσήματα, καρδιαγγειακές και μολυσματικές ασθένειες, τη μεταμόσχευση νεφρών και σε διάφορα είδη καρκίνου. Είναι πιθανότατα, η πιο ραγδαία αναπτυσσόμενη και πολλά υποσχόμενη κατηγορία φαρμάκων καθώς μεγάλο μέρος του επιστημονικού πληθυσμού διεξάγει έρευνα για τη δημιουργία νέων θεραπευτικών μορίων αλλά και βελτιστοποίηση των ήδη υπαρχόντων.

1.8.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Στις αρχές του 20ού αιώνα, ο Paul Ehrlich πρότεινε την ιδέα του σχεδιασμού ενός μορίου, το οποίο θα μπορεί επιλεκτικά να στοχεύσει σε ένα συγκεκριμένο οργανισμό, ο οποίος προκαλεί κάποια ασθένεια, και στη συνέχεια μία τοξίνη θα μεταφέρεται σε αυτόν. Θα σχεδιαζόταν έτσι ένα εξειδικευμένο θεραπευτικό μόριο, “magic bullet”, το οποίο θα μπορούσε να θανατώσει τον οργανισμό-στόχο. Η ιδέα του “magic bullet”, κατά κάποιο τρόπο πραγματοποιήθηκε με τον σχεδιασμό των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Μαζί με τον Élie Metchnikoff το 1908 πήραν το Νομπέλ Φυσιολογίας και Ιατρικής γι’ αυτήν την έρευνα, η οποία οδήγησε σε μία πετυχημένη θεραπεία ενάντια στη σύφιλη το 1910 (Siberil, Dutertre et al. 2005).

Αρχές της δεκαετίας 1970, ο Gerald Maurice Edelman με τον Rodney Robert Porter πήραν το Νομπέλ (1972) για την έρευνα τους για το ανοσοποιητικό σύστημα, ανακαλύπτοντας τη χημική δομή ενός μορίου ανοσοσφαιρίνης και ανοίγοντας έτσι νέους ορίζοντες στην έρευνα των αντισωμάτων. Αργότερα το 1975, ο César Milstein και ο Georges Jean Franz Köhler ανέπτυξαν την τεχνική του υβριδώματος, όπου το 1984 μοιράστηκαν το Νομπέλ Φυσιολογίας και Ιατρικής μαζί με τον Niels Kaj Jerne για την συνολική τους έρευνα στο ανοσοποιητικό σύστημα και την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων (Kohler and Milstein 1975). Η βασική ιδέα ήταν η σύντηξη μυελωματικών κυττάρων, τα οποία δεν έχουν την ικανότητα έκκρισης αντισωμάτων, με υγιή Β λεμφοκύτταρα, που εκκρίνουν αντισώματα. Το 1988 ο

Greg Winter και η ομάδα του, πρωτοπορούν με τη δημιουργία τεχνικών «εξανθρωπισμού» των μονοκλωνικών αντισωμάτων, εξαλείφοντας τις ανοσολογικές αποκρίσεις που προκαλούσαν σε αρκετούς ασθενείς (Riechmann, Clark et al. 1988).



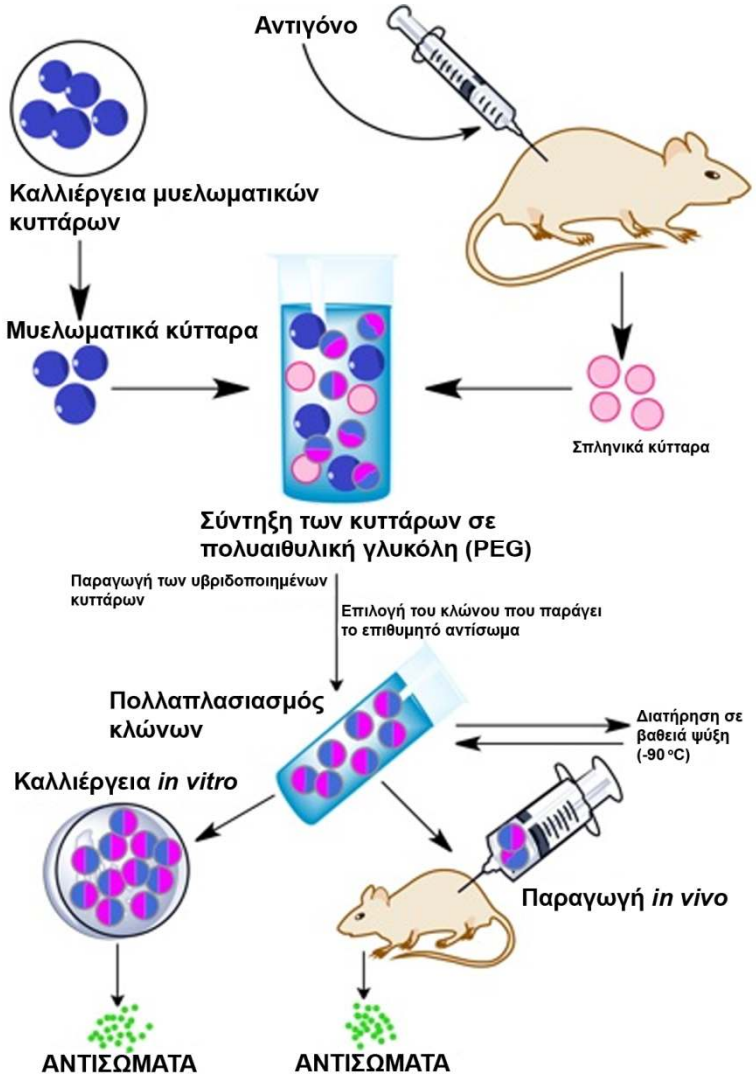
Εικόνα 21 : Χρονικό ιστορικού της έρευνας και των επιτευγμάτων σχετικά με τις ανοσοσφαιρίνες και τα μονοκλωνικά αντισώματα.

Δύο χρόνια νωρίτερα (1986), εγκρίθηκε από τον Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (FDA), το πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα, Muromonub OKT-3, για την απόρριψη μοσχεύματος. Αρκετά χρόνια αργότερα και μετά την εξέλιξη των τεχνικών «εξανθρωπισμού» των μονοκλωνικών αντισωμάτων (1988), εγκρίθηκε το πρώτο χιμαιρικό μονοκλωνικό αντίσωμα, Rituximab, για θεραπευτική χρήση ενάντια στο λέμφωμα Non-Hodgkink's και ένα χρόνο αργότερα (1998), το Trastuzumab, το πρώτο εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα, λαμβάνει έγκριση για θεραπεία κατά του καρκίνου του μαστού. Το 2002 δίνεται έγκριση για το Adalimumab, το πρώτο ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα για αυτοάνοσα νοσήματα και τέσσερα χρόνια μετά (2006), λαμβάνει έγκριση το μονοκλωνικό αντίσωμα Panitumumab, για θεραπευτική χρήση κατά του καρκίνου του παχέος εντέρου (Εικόνα 21).

1.8.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΥΒΡΙΔΩΜΑΤΑ

Η χρήση αντι-ορών (anti-serum) ενώ εξυπηρετεί τον εντοπισμό, τη φαγοκυττάρωση και τη λύση του αντιγόνου in vivo, για in vitro μελέτες παρουσιάζει βασικά μειονεκτήματα, λόγω της ετερογένειας τους, της περιορισμένης διαθεσιμότητας σε ποσότητα, καθώς και στο γεγονός ότι είναι θεωρητικά δύσκολο και πρακτικά αδύνατο να έχουμε παραγωγή του ίδιου ακριβώς αντισώματος σε άλλο ζώο, του ίδιου ή διαφορετικού είδους. Το 1975, οι Kohler και Milstein, χρησιμοποίησαν την τεχνική υβριδισμού κυττάρων, για την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων (Kohler and Milstein 1975). Αυτή τους η επιτυχία τους έδωσε το βραβείο Νόμπελ Ιατρικής το 1984, καθώς επίσης απέδειξε την ισχύ της θεωρίας της επιλογής κλώνου, που ανέπτυξε ο Frank Macfarlane Burnet το 1959 και υποστήριξε τη μονοκλωνικότητα των Β-λεμφοκυττάρων. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, κάθε Β-λεμφοκύτταρο έχει τη γενετική πληροφορία για τη σύνθεση μιας μόνο αντισωμικής ειδικότητας.

Αναλυτικότερα, πρότεινε ότι κάθε Β λεμφοκύτταρο έχει στην επιφάνειά του ανοσοσφαιρίνες οι οποίες καθορίζουν την ειδικότητα των αντισωμάτων που παραχθούν και θα εκκριθούν όταν το κύτταρο ενεργοποιηθεί από το αντιγόνο που θα έρθει σε επαφή (Nossal 1985). Οι Kohler και Milstein εκμεταλλεύτηκαν τις ιδιότητες των πλασματοκυττάρων, τα οποία είναι «αθάνατα» και έτσι μπορούν να διατηρηθούν στις καλλιέργειες για χρόνια. Απέδειξαν ότι με τη σύντηξη σωματικών κυττάρων μπορούσαν να παραχθούν κυτταρικές σειρές (υβριδώματα) που χαρακτηρίζονται από την ατέρμονα παραγωγή αντισώματος με ομοιογενή σύσταση (μονοκλωνικό).



Εικόνα 22 : Διαδικασία παραγωγής μονοκλωνικών μονοκλωνικών αντισωμάτων με την διαδικασία του υβριδισμού.

Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά τα στάδια παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων (Εικόνα 22) (Lerner 1981):

Γίνεται ανοσοποίηση, συνήθως ποντικιού ή αρουραίου, με ένα αντιγόνο, μια ουσία δηλαδή ξένη σε αυτό. Ενεργοποιείται το ανοσοποιητικό σύστημα του ζώου και παράγονται αντισώματα. Αφαιρείται ο σπλήνας για να απομονωθούν και να συλλεχτούν σπληνικά κύτταρα. Παράλληλα γίνεται καλλιέργεια μυελωματικών κυττάρων, τα οποία δεν παράγουν ανοσοσφαιρίνες, αλλά έχουν την ιδιότητα του πολλαπλασιασμού και της ατέρμονα διαίρεσης.

Στη συνέχεια, γίνεται σύντηξη κυττάρων μυελώματος με κύτταρα που παράγουν αντισώματα και έχουν το ένζυμο εποξανθίνη φωσφοριβοσιλική

τρανσφεράση (hypoxanthine phoshoribosyl transferase, HPRT). Τα κύτταρα του μυελώματος δεν παράγουν ανοσοσφαιρίνες και έχουν ανεπάρκεια στο ένζυμο HPRT.

Η σύντηξη των κυττάρων (υβριδώματα), ευνοείται από την προσθήκη χημικών ουσιών, όπως η πολυαιθυλική γλυκόλη (polyethylene glycol, PEG) (Pontecorvo 1976), η οποία προάγει την σύντηξη των κυτταρικών μεμβρανών. Ακόμα, γίνεται σύντηξη των πυρήνων των υβριδωμάτων, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται κύτταρα που έχουν την ικανότητα να παράγουν αντισώματα και να επιζούν σε καλλιεργητικό υλικό που περιέχει υποξανθίνη, αμινοπτερίνη και θυμιδίνη (HAT). Η αμινοπτερίνη είναι μια ισχυρή τοξίνη που μπλοκάρει τη μεταβολική οδό. Το κενό που δημιουργείται καλύπτεται με τους μεταβολίτες υποξανθίνης και θυμιδίνης. Έτσι, τα σπληνικά κύτταρα μπορούν να επιζήσουν στο καλλιεργητικό υλικό HAT, ενώ τα κύτταρα του μυελώματος που έχουν μεταβολική ανεπάρκεια δεν μπορούν.

Το καλλιεργητικό υλικό HAT σ' αυτό το στάδιο περιέχει σπληνικά κύτταρα, μυελωματικά κύτταρα και συντηγμένα κύτταρα. Τα σπληνικά κύτταρα ύστερα από 1-2 εβδομάδες πεθαίνουν φυσιολογικά καθώς ολοκληρώνουν τον κύκλο ζωής τους, ενώ τα κύτταρα του μυελώματος δεν μπορούν καθόλου να επιζήσουν στο υλικό HAT. Μερικά από τα κύτταρα που έχουν συντηχθεί έχουν και την ικανότητα να παράγουν αντισώματα.

Στο στάδιο αυτό, πρέπει να γίνει η επιλογή των κλώνων των υβριδίων που εκκρίνουν την επιθυμητή ανοσοσφαιρίνη. Μερικά από τα συντηγμένα κύτταρα εκκρίνουν αντισώματα ειδικά για το αντιγόνο που χρησιμοποιήθηκε, και άλλα εκκρίνουν μη ειδικά αντισώματα. Οπότε είναι ιδιαίτερα σημαντική η διαδικασία της εξέτασης του υπερκείμενου θρεπτικού μέσου κάθε καλλιέργειας, το οποίο περιέχει το αντίσωμα που έχει εκκριθεί, έτσι ώστε να επιλεγούν μόνο οι επιθυμητοί κλώνοι.

Ο πιο κοινός τρόπος ανίχνευσης είναι με στερεάς φάσεως ανοσοενζυμική μέθοδο (solid phase enzyme-linked immunoassay, ELISA) (Engvall and Perlmann 1971). Από τα πηγαδάκια της καλλιεργητικής πλάκας, στα οποία διαπιστώθηκε η παραγωγή αντισώματος, αφαιρούνται κύτταρα, ώστε να μείνει ένα μόνο κύτταρο σε

κάθε πηγαδάκι. Αυτό το ένα κύτταρο που είναι αθάνατο και παράγει αντίσωμα με μία μόνο ειδικότητα (μονοκλωνικό αντίσωμα), πολλαπλασιάζεται δημιουργείται ένας κλώνος κυττάρων που παράγουν μονοκλωνικό αντίσωμα, ίδιο με εκείνο που παράγει και το προγονικό κύτταρο από το οποίο προέρχονται.

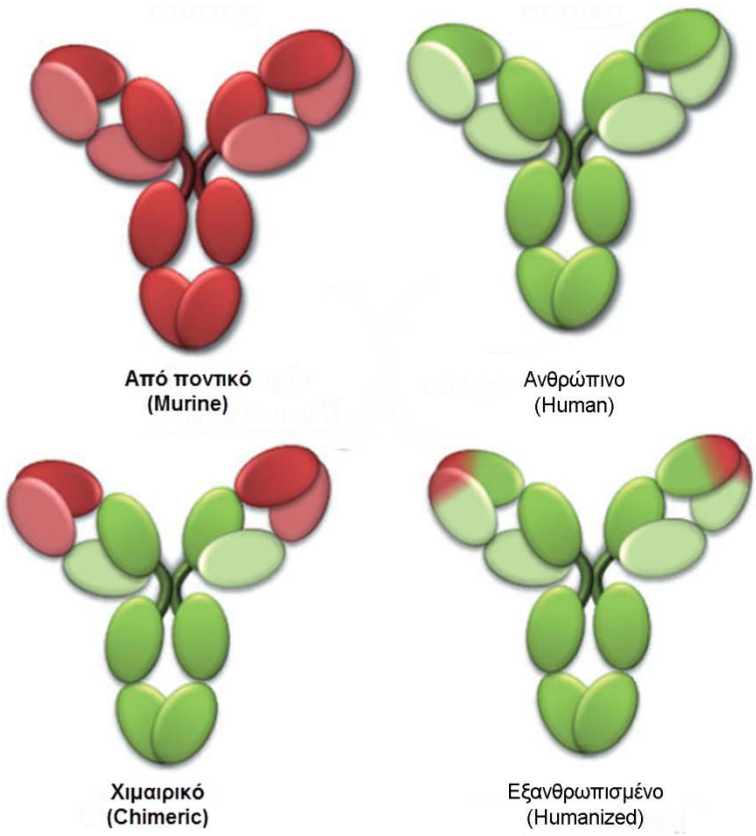
Αφού λοιπόν γίνει η διαδικασία της ταυτοποίησης ως προς την ειδικότητα του εκκρινόμενου αντισώματος, ακολουθεί η διαδικασία της κλωνοποίησης με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Στη συνέχεια ακολουθεί η μαζική παραγωγή *in vivo* και *in vitro*. Το υβρίδιο κύτταρο αναπτύσσεται σε ειδικές φιάλες καλλιέργειας και το αντίσωμα εκκρίνεται στο υπερκείμενο θρεπτικό μέσο σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (10mg/ml). Αν όμως τα κύτταρα της καλλιέργειας αυτής χορηγηθούν στην περιτοναϊκή κοιλότητα ιστοσυμβατού ζώου, αναπτύσσεται ασκιτικό υγρό με πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μονοκλωνικών αντισωμάτων (1-25mg/ml). Τα αντισώματα στη συνέχεια απομονώνονται από το ασκιτικό υγρό με κατάλληλες τεχνικές χρωματογραφίας (Nelson, Reynolds et al. 2000).

1.8.2.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΜΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται ευρέως στον ερευνητικό τομέα, καθώς επίσης και σε κλινικό επίπεδο για διάγνωση ή θεραπεία ασθενειών. Εκτός από την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων με χρήση υβριδωμάτων, κατασκευάζονται και ανασυνδυασμένα ανθρώπινα αντισώματα. Σημαντικό μειονέκτημα στη χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων σε κλινικές εφαρμογές στον άνθρωπο είναι ότι, καθώς τα αντισώματα αυτά προέρχονται κυρίως από ποντίκια, αναγνωρίζονται ως «ξένα» και επάγουν ανοσολογική απόκριση (Chames, Van Regenmortel et al. 2009).

Επιτακτική ήταν η ανάγκη για παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων από ανθρώπινη πρωτεΐνη, κάτι ιδιαίτερα δύσκολο, λόγω τεχνικών προβλημάτων καθώς δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν Β λεμφοκύτταρα από σπλήνα ανθρώπου και διότι τα μυελωματικά κύτταρα του ανθρώπου είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε καλλιέργειες *in vitro* κι έχουν μικρό χρόνο ζωής σε σχέση με του ποντικού. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με μια πιθανή μετατροπή φυσιολογικών

Β λεμφοκυττάρων σε καρκινικά, με καλλιέργειά τους *in vitro*, παρουσία του ιού Epstein-Barr. Έτσι, με αυτήν την τροποποίηση, τα Β λεμφοκύτταρα του ανθρώπου μπορούν να πολλαπλασιάζονται απεριόριστα *in vitro* και ταυτόχρονα να εκκρίνουν τα επιθυμητά αντισώματα.



Εικόνα 23 : Χιμαιρικά και εξανθρωπισμένα αντισώματα. Η πρωτεΐνη που προέρχεται από ποντικό απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα και η ανθρώπινη πρωτεΐνη απεικονίζεται με πράσινο χρώμα. Με ανοιχτές αποχρώσεις ξεχωρίζουν οι ελαφριές αλυσίδες και με σκούρες αποχρώσεις απεικονίζονται οι βαριές αλυσίδες (Chames, Van Regenmortel et al. 2009).

Ιδιαίτερα σημαντικό επίτευγμα της μηχανικής των αντισωμάτων ήταν η δημιουργία χιμαιρικών μονοκλωνικών αντισωμάτων (chimeric antibodies) (Εικόνα 23). Κατέστη δυνατό η δημιουργία μιας χίμαιρας από σύντηξη των μεταβλητών δομικά αυτοτελών περιοχών (variable domains) της πρωτεΐνης του ποντικού, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση και αλληλεπίδραση με το αντιγόνο, με τις σταθερές δομικά αυτοτελείς περιοχές (constant domains) της ανθρώπινης πρωτεΐνης (Neuberger, Williams et al. 1985), οδηγώντας στην ανάπτυξη μιας νέας γενιάς θεραπευτικών μορίων (Reichert, Rosensweig et al. 2005). Τα χιμαιρικά μονοκλωνικά αντισώματα αποτελούνται από περίπου 70% ανθρώπινη πρωτεΐνη και περίπου 30% πρωτεΐνη ποντικού, γεγονός που τα καθιστά περισσότερο ικανά να

μην προκαλέσουν ανοσολογική απάντηση και να μπορέσουν να αλληλεπιδράσουν με το στόχο τους.

Με την πάροδο του χρόνου και την πρόοδο της μηχανικής των αντισωμάτων, κατέστη δυνατή η περαιτέρω μείωση των περιοχών των μονοκλωνικών αντισωμάτων που προέρχονται από πρωτεΐνη ποντικού, μόνο στις υπερμεταβλητές περιοχές των αντισωμάτων (hypervariable loops) (Jones, Dear et al. 1986). Τα αντισώματα αυτά αποτελούνται από περίπου 85-90% ανθρώπινη πρωτεΐνη και περίπου 10-15% από πρωτεΐνη ποντικού. Ονομάζονται εξανθρωπισμένα αντισώματα (humanized antibodies), κι έχουν ακόμα λιγότερες πιθανότητες να προκαλέσουν ανοσολογική απάντηση από τα χιμαιρικά αντισώματα (Εικόνα 23).

Ένα ακόμα σημαντικό επίτευγμα ήταν η παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων εξ' ολοκλήρου από ανθρώπινη πρωτεΐνη (human antibodies). Η πρώτη τεχνική που χρησιμοποιήθηκε και χρησιμοποιείται ακόμα με επιτυχία, είναι η τεχνική του βακτηριοφάγου (phage display). Κυρίως αναπτύχθηκε στο εργαστήριο του Greg Winter (McCafferty, Griffiths et al. 1990), ο οποίος εμπνεύστηκε από από τον George Smith (Smith 1985).

1.8.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

1.8.3.1 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Η μελέτη μιας πρωτεΐνης πρέπει να γίνει στην καθαρή της μορφή, ώστε να προκύψουν σαφή συμπεράσματα. Έτσι, η πρωτεΐνη πρέπει να απομονωθεί από το αρχικό υλικό, με βάση πρωτόκολλα καθαρισμού. Η απομόνωση, ή ο καθαρισμός μιας πρωτεΐνης από ένα μίγμα, είναι μια ιδιαίτερα χρονοβόρα διαδικασία καθώς αποτελείται από πολλά στάδια και τα αποτελέσματα δεν είναι πάντα τόσο ικανοποιητικά. Υπάρχει τεράστιος αριθμός πρωτεϊνών σε μία πηγή, καθώς επίσης οι πρωτεΐνες είναι ευαίσθητες στις χημικές διεργασίες με αποτέλεσμα να μην αποκτάται εύκολα αρκετή ποσότητα λειτουργικής πρωτεΐνης για μελέτη.

Επειδή τα μονοκλωνικά αντισώματα προσδένονται με πολύ μεγάλη εξειδίκευση σε μια χημική ουσία, μπορούν να βοηθήσουν στον καθαρισμό της από πολύπλοκα μίγματα. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να καθαριστούν πολύτιμες ουσίες που

βρίσκονται σε απειροελάχιστη ποσότητα σε ένα μίγμα. Η τεχνική αυτή βοήθησε στο να γίνει η ιντερφερόνη ευρέως διαθέσιμη. Η παραγωγή ενός μονοκλωνικού αντισώματος ειδικό για την πρωτεΐνη αυτή, βοηθά πολύ στην ευκολότερη απομόνωση της. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η απομόνωση ιντερφερόνης λευκοκυττάρων από τους ερευνητές Secher και Burke (Secher and Burke 1980).

1.8.3.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΓΚΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ

Η εξέλιξη μιας ασθένειας ή η πρόοδος της θεραπείας της, μπορεί να ελεγχθεί με τη βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων. Μονοκλωνικά αντισώματα συνδέονται με ραδιενεργά ισότοπα, εισάγονται στη συνέχεια στον οργανισμό και ανιχνεύεται η θέση των ραδιενεργών ισοτόπων στο σώμα. Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί με ακρίβεια σε ποιο σημείο του σώματος υπάρχει ένας θρόμβος ή κάποιος όγκος. Παρόλο ότι η σημασία της χρησιμοποίησης μονοκλωνικών αντισωμάτων στη διάγνωση διαφόρων μορφών καρκίνου είναι δεδομένη, υπάρχουν μειονεκτήματα για την ευρεία χρήση τους. Το κύριο μειονέκτημα είναι ότι πολλοί όγκοι ενός συγκεκριμένου τύπου, όπως π.χ. του μαστού, δεν έχουν κοινούς πρωτεϊνικούς δείκτες.

1.8.3.3 ΘΑΝΑΤΩΣΗ ΟΓΚΩΝ

Μονοκλωνικά αντισώματα μπορούν να θανατώσουν καρκινικά κύτταρα, σε μερικές περιπτώσεις άμεσα, με λύση παρουσία του συστήματος του συμπληρώματος. Παρόλο ότι μεγάλος αριθμός καρκινικών κυττάρων είναι ανθεκτικός στη λύση μέσω του συμπληρώματος, ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα, μπορεί να συζευχθεί με θανατηφόρα τοξίνη ή με ραδιενεργό για να παραχθεί μία ανοσοτοξίνη, ικανή να φονεύει καρκινικά κύτταρα. Διάφορες τοξίνες όπως η *Shigella* και η *diphtheria* αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση και είναι τόσο ισχυρές ώστε ένα μόριο της τοξίνης να φονεύει ένα κύτταρο. Κάθε μία από αυτές τις τοξίνες αποτελείται από δύο τμήματα: το ένα είναι η τοξίνη (μία πολυπεπτιδική αλυσίδα) και το άλλο ένας υποκαταστάτης (ligand) που συνδέεται σε υποδοχείς πάνω στην κυτταρική μεμβράνη. Χωρίς τον υποκαταστάτη, η τοξίνη δεν μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα και έτσι είναι ανενεργή. Θεωρητικά, το δεσμευμένο μονοκλωνικό αντίσωμα, θα οδηγήσει την τοξίνη ειδικά στα καρκινικά κύτταρα, όπου θα προκαλέσει το θάνατο με αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης. Η μεγάλη τοξικότητα

αυτών των τοξινών είναι πολύ σημαντική, αφού πολύ λίγα μόρια μιας ανοσοτοξίνης θα έλθουν σε επαφή με τη μάζα του όγκου. Διάφορες μελέτες *in vitro* έχουν δείξει την ικανότητα της ανοσοτοξίνης να θανατώνει τα καρκινικά κύτταρα, χωρίς να επηρεάζει τα υγιή (Waldmann 2003; Goldenberg and Sharkey 2007).

1.8.3.4 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Τα μονοκλωνικά αντισώματα επειδή αναγνωρίζουν ειδικά έναν αντιγονικό καθοριστή, είναι πολύ χρήσιμα ως ανοσοδιαγνωστικά. Μπορούν να ανιχνεύσουν στα υγρά του σώματος ουσίες που είναι υπεύθυνες για ποικίλες ασθένειες, παθογόνους μικροοργανισμούς, καθώς και τη διακύμανση της συγκέντρωσης διάφορων προϊόντων του μεταβολισμού, η οποία μπορεί να προοιωνίζει την πιθανότητα εμφάνισης κάποιας ασθένειας. Η τεχνική ανίχνευσης είναι γρήγορη, απλή, ευαίσθητη, ακριβής και επιτρέπει τη διάγνωση ασθενειών στα πολύ αρχικά στάδιά τους, δηλαδή πριν εμφανιστούν τα συμπτώματα.

Περισσότερα από 100 μονοκλωνικά αντισώματα κυκλοφορούν σήμερα και χρησιμοποιούνται ως διαγνωστικοί παράγοντες. Ανάμεσα σε αυτά περιλαμβάνονται: έλεγχος εγκυμοσύνης, έλεγχος ανίχνευσης παθογόνων πρωτοζώων, βακτηρίων, ιών, έλεγχος επιπέδων διαφόρων φαρμάκων, καρδιακών ασθενειών, ιστοσυμβατά αντιγόνα, διαβήτης και καρκίνος. Τα αντισώματα θα συνεισφέρουν σημαντικά στην αύξηση της ευαισθησίας κλινικών δοκιμασιών, όπως η τυποποίηση (προσδιορισμός) των ομάδων αίματος και η εξακρίβωση μιας πιθανής κύησης. Στην τελευταία περίπτωση έχουν κατασκευαστεί ειδικά ανοσοδιαγνωστικά τεστ, τα οποία περιέχουν μονοκλωνικά αντισώματα για ειδικές ορμόνες που παράγονται κατά την κύηση (Richter, Ivancevic et al. 2011).

1.8.3.5 ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΙΣ ΟΡΓΑΝΩΝ ΚΑΙ ΙΣΤΩΝ

Πριν από κάθε μεταμόσχευση οργάνου, επιβάλλεται ο έλεγχος ιστοσυμβατότητας του δότη και του δέκτη. Κάθε κύτταρο του οργάνου που πρόκειται να γίνει η μεταμόσχευση, έχει στην επιφάνειά του ειδικά αντιγόνα επιφάνειας, που αναγνωρίζονται από ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα. Με τα μονοκλωνικά αντισώματα μπορεί να γίνει ο έλεγχος των οργάνων από δωρητές, για να διαπιστωθεί αν ταιριάζουν ανοσολογικά με τα αντίστοιχα των ασθενών. Έτσι

είναι δυνατόν να αποφευχθεί η απόρριψη του οργάνου και οι μεταμοσχεύσεις να είναι επιτυχείς (Hooks, Wade et al. 1991).

1.8.3.6 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Αρκετές είναι οι θεραπευτικές εφαρμογές των μονοκλωνικών αντισωμάτων, καθώς από το 1986 που εγκρίθηκε το πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα (Muromomab), μέχρι και σήμερα χρησιμοποιούνται σε πολυάριθμες ασθένειες. Μερικές από αυτές είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Abciximab), το άσθμα (Omalizumab), η οστεοπόρωση (Denosumab), αυτοάνοσα νοσήματα (Infliximab) όπως η νόσος του Alzheimer, η σκλήρυνση κατά πλάκας και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Adalimumab), καθώς και αρκετά είδη καρκίνου (Trastuzumab, Alemtuzumab, Bevacizumab) (Shuptrine, Surana et al. 2012).

1.8.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Οι μηχανισμοί δράσης των μονοκλωνικών αντισωμάτων ποικίλουν κι έχουν ως στόχο κατά κύριο λόγο την ενεργοποίηση των φυσιολογικών μηχανισμών του ανοσοποιητικού συστήματος και κατ' επέκταση την επαγωγή της ανοσολογικής απόκρισης (Modjtahedi, Ali et al. 2012). Συνοψίζονται σε εννέα βασικές κατηγορίες (Εικόνα 24).

Μία κατηγορία είναι τα μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία αναστέλλουν τη λειτουργία υποδοχέων επιδερμικών αυξητικών παραγόντων (Epidermal Grow Factor Receptor, EGFR), όπως το μονοκλωνικό αντίσωμα Cetuximab (αναλυτική περιγραφή στο Κεφάλαιο 1.9.3). Το αντίσωμα αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του κυττάρου και εμποδίζεται ο αντίστοιχος επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Grow Factor, EGF) από το να αλληλεπιδράσει με τον υποδοχέα, καταλήγοντας στην αναστολή της ωρίμανσης του κυττάρου και την επαγωγή της απόπτωσης (Li, Schmitz et al. 2005).

Μία βασική διαδικασία που βοηθάει ιδιαίτερα των πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων είναι η αγγειογένεση. Στόχος ορισμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι η αναστολή, ή η μείωση του πολλαπλασιασμού των αιμοφόρων αγγείων και κατ' επέκταση η ελαχιστοποίηση και η μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Επιτυγχάνεται με την δέσμευση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού

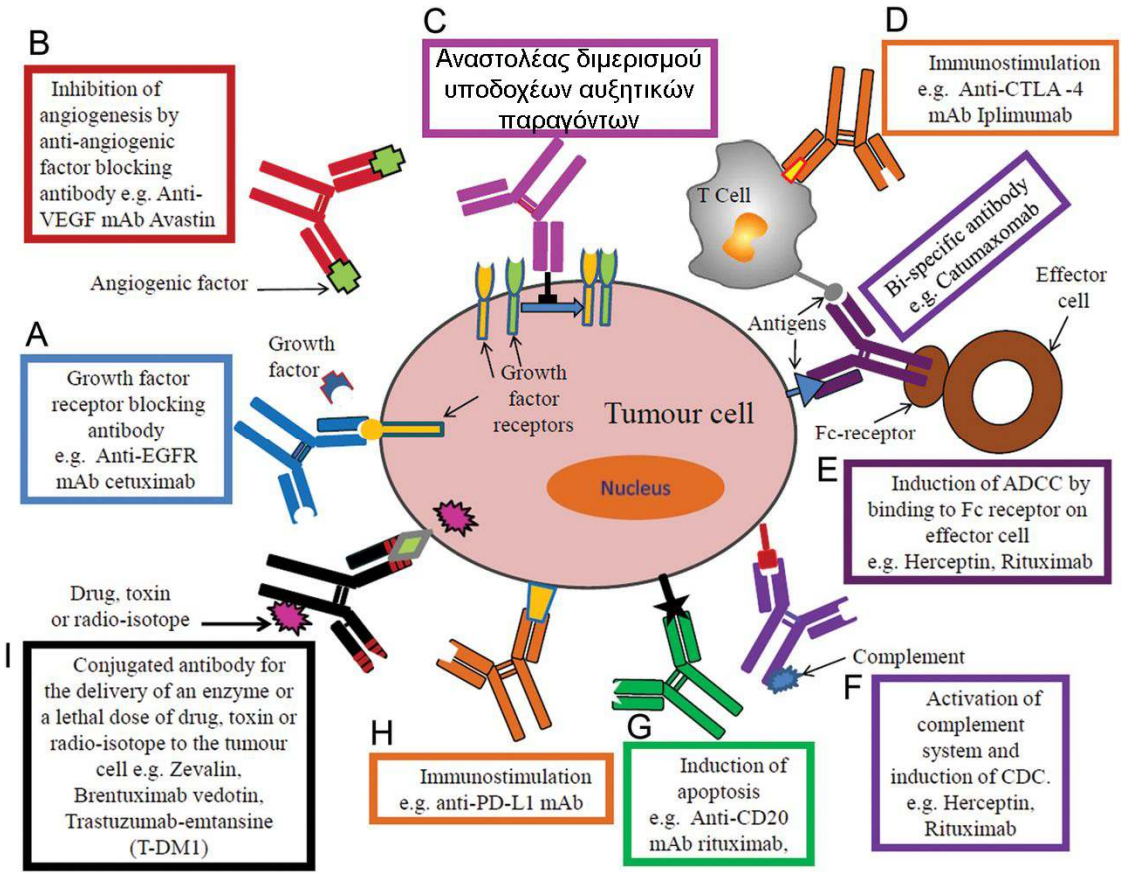
παράγοντα A (Vascular endothelial growth factor A, VEGF-A), έτσι ώστε να παρεμποδιστεί η αλληλεπίδραση του με τον αντίστοιχο υποδοχέα (Vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR), που βρίσκεται στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων. Παράδειγμα μονοκλωνικού αντισώματος που λειτουργεί ως αγγειογενετικός αναστολέας είναι το Bevacizumab (αναλυτική περιγραφή στο κεφάλαιο 1.9.2) (Muller, Chen et al. 1998).

Άλλη κατηγορία αποτελούν τα μονοκλωνικά αντισώματα που λειτουργούν ως αναστολείς διμερισμού των υποδοχέων της οικογένειας των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (HER receptors), καταλήγοντας στην καθυστέρηση ανάπτυξης του όγκου. Παράδειγμα είναι το μονοκλωνικό αντίσωμα Pertuzumab (περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 1.9.5), το οποίο αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα HER2 και αναστέλλει τον διμερισμό με τους άλλους υποδοχείς της οικογένειας των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (HER receptors) (Franklin, Carey et al. 2004).

Σε μια γενικότερη κατηγορία εντάσσονται τα μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν στόχο να ενεργοποιήσουν τους φυσιολογικούς μηχανισμούς άμυνας που θα ενεργοποιούσε και ο ίδιος ο οργανισμός, επιταχύνοντας αυτές τις διαδικασίες. Μέσω της πρόσδεσης του Fc τμήματος του μονοκλωνικού αντισώματος με τον υποδοχέα Fc (Fc receptor) του δραστικού κυττάρου (Φυσικά φονικά κύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα), επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση των μηχανισμών αυτών. Σ' αυτούς τους μηχανισμούς περιλαμβάνεται η επαγωγή της απόπτωσης που επιτυγχάνεται με το αντίσωμα Rituximab (αναλυτική περιγραφή στο Κεφάλαιο 1.9.7), το οποίο αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη CD20 που βρίσκεται στην επιφάνεια των παρθένων B λεμφοκυττάρων κι έχει ως στόχο τη λύση του κυττάρου (Weiner 2010).

Επιπλέον μονοκλωνικά αντισώματα όπως το Ofatumumab και το Trastuzumab (αναλυτική περιγραφή στο Κεφάλαιο 1.9.4 και 1.9.7 αντίστοιχα) λειτουργούν επάγοντας την κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα (complement-dependent cytotoxicity, CDC), καθώς και την εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα (Antibody-dependent cell-mediated cytoxicity, ADCC) (Nahta and Esteva 2006).

Επιπλέον, μονοκλωνικά αντισώματα μπορούν να λειτουργούν ως «φορείς», είτε μιας τοξίνης, ενός ενζύμου είτε ενός ραδιο-ισοτόπου, με τα οποία είναι συζευγμένα κι έχουν ως ρόλο τη μεταφορά των ουσιών αυτών στο κύτταρο-στόχο, με σκοπό τη λύση του καρκινικού κυττάρου. Παραδείγματα τέτοιων αντισωμάτων είναι το Ibritumomab tiuxetan, το Brentuximab vedotin και το Trastuzumab-emtansine (T-DM1) (Barok, Joensuu et al. 2014).



Εικόνα 24 : Μηχανισμοί δράσης μονοκλωνικών αντισωμάτων. Επάγουν τη θεραπευτική τους δράση (α) αναστέλλοντας την πρόσδεση των αυξητικών παραγόντων, με τους αντίστοιχους υποδοχείς, (β) αναστέλλοντας και «παγιδεύοντας» αγγειογενετικούς παράγοντες, (γ) αναστέλλοντας το διμερισμό μεταξύ υποδοχέων αυξητικών παραγόντων, (δ) διεγείροντας την ανοσοαπόκριση, (ε) με την πρόσδεση του σταθερού τμήματος (Fc) με τον Fc υποδοχέα (Fc receptor) στα δραστικά κύτταρα (effector cells), επάγοντας την εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα (ADCC), (στ) ενεργοποιώντας το σύστημα του συμπληρώματος και επάγοντας την κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα (CDC), (η) διεγείροντας την ανοσοαπόκριση, (ζ) επάγοντας την απόπτωση, (θ) λειτουργώντας ως «μεταφορείς» τοξικών ουσιών που χορηγούν στο καρκινικό κύτταρο (Modjtahedi, Ali et al. 2012).

1.8.5 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι πιθανότατα, η πιο ραγδαία αναπτυσσόμενη και πολλά υποσχόμενη κατηγορία φαρμάκων. Χρησιμοποιούνται θεραπευτικά σε αυτοάνοσα νοσήματα, καρδιαγγειακές και μολυσματικές ασθένειες, μεταμόσχευση νεφρών και σε διάφορα είδη καρκίνου. Λόγω της ιδιότητας τους να συνδέονται ειδικά με συγκεκριμένο στόχο, τα μονοκλωνικά αντισώματα καθίστανται περισσότερο ακριβή και αποτελεσματικά από τα συμβατικά μικρομοριακά φάρμακα. Μπορούν να «μπλοκάρουν» αντιδράσεις μεταξύ των κυττάρων προλαμβάνοντας δυσλειτουργίες του ανοσοποιητικού, και με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής μπορούν να στοχεύσουν οποιοδήποτε πρωτεϊνικό μόριο ή κυτταρικό τύπο απαιτείται κάθε φορά.

Η ακρίβεια στο στόχο-αντιγόνο η ευελιξία τους, ο συνεχής πολλαπλασιασμός τους (νέα αντισώματα) και το γεγονός ότι δεν αναγνωρίζουν ως ξένα τα κύτταρα του οργανισμού, τον οποίο καλούνται να θεραπεύσουν, μειώνουν σημαντικά την τοξικότητά τους, τις πιθανές παρενέργειες και επομένως την αποτυχία της μεθόδου αλλά και τον χρόνο και το κόστος παραγωγής τους (Modjtahedi, Ali et al. 2012).

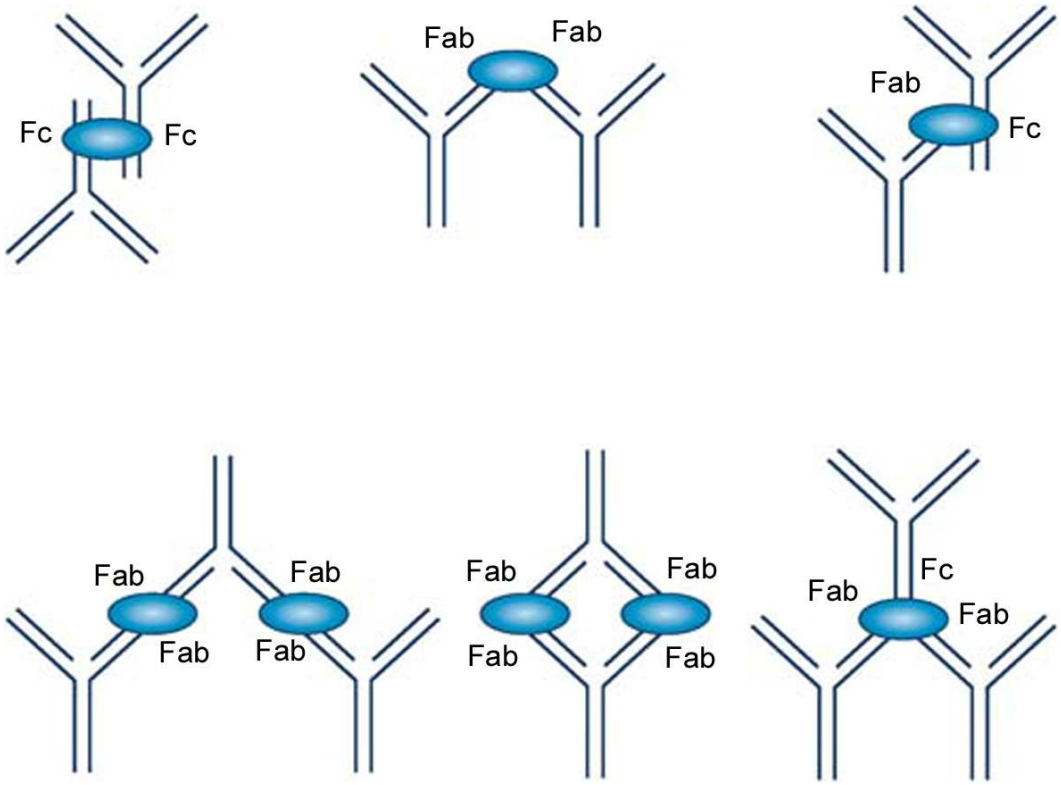
1.8.6 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ

Λόγω ότι τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι μεγάλα πρωτεϊνικά μόρια, παρασκευάζονται σε ενέσιμη μορφή. Κοινή επιθυμία και στόχος αποτελεί η μετατροπή τους σε δισκία, ώστε να λαμβάνονται εύκολα από τους ασθενείς, να είναι ανεκτά από το πεπτικό τους σύστημα και, καθώς παραμένουν για αρκετό χρονικό διάστημα μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό, η χορήγησή τους να μην είναι τόσο συχνή.

Σημαντικό μειονέκτημα των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι τα κόστη παραγωγής σε συνδυασμό με τα προβλήματα μαζικής παραγωγής. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι μεγάλα πρωτεϊνικά μόρια με αρκετούς δισουλφιδικούς δεσμούς. Για να είναι αποτελεσματικά πρέπει να χορηγηθούν σε μεγάλες ποσότητες καθώς επίσης για την παραγωγή τους απαιτούνται τεράστιες ποσότητες καλλιεργειών από κύτταρα θηλαστικών

ακολουθούμενα από ακριβές τεχνικές, και εξειδικευμένες εγκαταστάσεις (Chames, Van Regenmortel et al. 2009).

Ακόμα, σημαντικό μειονέκτημα στην αξιοποίηση των αντισωμάτων είναι η τάση που έχουν να σχηματίσουν συσσωματώματα σε υψηλές συγκεντρώσεις, κατά την αποθήκευση και τη χρήση τους (Wang 2005). Τα συσσωματώματα αυτά μπορεί να μειώσουν την δραστικότητα των αντισωμάτων, καθώς επίσης να προκαλέσουν ανοσολογικές αποκρίσεις σε ασθενείς. Ύπαρξη συσσωματωμάτων, ακόμα και σε μικρό ποσοστό μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική (Chennamsetty, Voynov et al. 2010). Τα μονοκλωνικά αντισώματα υπόκεινται σε μία σειρά πολύπλοκων διαδικασιών από την παραγωγή τους μέχρι το τελικό προϊόν, αλλά και κατά την αποθήκευσή τους μέχρι την τελική κατανάλωση υποβάλλονται αρκετά πιέσεις, όπως υψηλές συγκεντρώσεις, μεταβλητές θερμοκρασίες και ακραίες τιμές pH (Cromwell, Hilario et al. 2006).



Εικόνα 25 : Αναπαράσταση τρόπων δημιουργίας συσσωματωμάτων μεταξύ των μονοκλωνικών αντισωμάτων (Agrawal, Kumar et al. 2011).

Ιδιαίτερη πρόκληση για την ανάπτυξη ασφαλών και λειτουργικών μονοκλωνικών αντισωμάτων, αποτελεί ο λογικός σχεδιασμός διαδικασιών κατασκευής, και αναπροσαρμογή της κατάλληλης δοσολογίας κατά την χορήγηση των μονοκλωνικών αντισωμάτων, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η ποιότητα και η λειτουργικότητά τους (Zhang, Singh et al. 2012). Ιδιαίτερα ισχυρή είναι η άποψη ότι η δημιουργία συσσωματωμάτων έχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο σχετικά με τις παρενέργειες των μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά την χορήγησή τους, καθώς επίσης και στην πρόκληση ανοσολογικών αποκρίσεων στους ασθενείς (Rosenberg 2006).

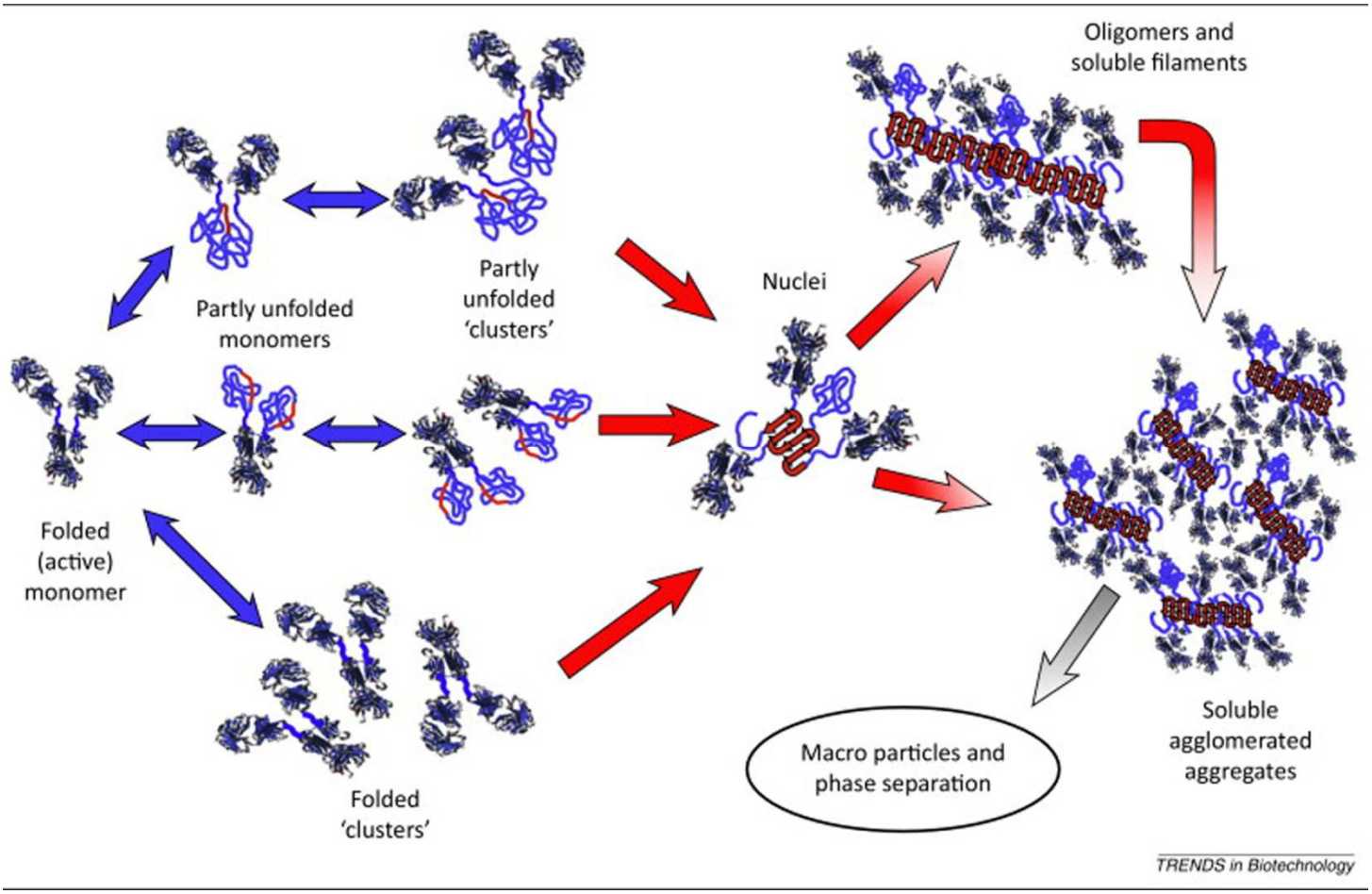
Τα πρωτεϊνικά μόρια αλληλεπιδρούν με διάφορους τρόπους σχηματίζοντας ολιγομερή ή πολυμερή, τα οποία καταλήγουν σε σφαιρικά συσσωματώματα. Τα συσσωματώματα αυτά είναι, είτε ορατά είτε μη ή μερικώς ορατά με ηλεκτρονική μικροσκοπία, και δημιουργούν ινίδια ή ιζήματα (Agrawal, Kumar et al. 2011). Αρκετές μελέτες και έρευνες έχουν γίνει για τους πιθανούς τρόπους αλληλεπίδρασης των μονοκλωνικών αντισωμάτων (Εικόνα 25).

1.9 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΥΣΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ

Αν και είναι ήδη γνωστό ότι οι πρωτεΐνες είναι οριακά σταθερές έχοντας πάρει την τρισδιάστατη δομή τους, συχνά δεν λαμβάνεται υπόψιν ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς στο σχηματισμό συσσωματωμάτων όταν βρίσκονται σε στάδια όπου δεν έχουν ακόμα διπλωθεί ή έχουν μερικώς διπλωθεί. Έτσι είναι πολύ πιθανό σε αυτά τα στάδια να δημιουργηθούν σταθερά συσσωματώματα, τα οποία αποτελούν σημαντικό ρίσκο κατά την παραγωγή θεραπευτικών μορίων, καθώς είναι υπεύθυνα για την επαγωγή ανοσολογικών αποκρίσεων στους ασθενείς (Εικόνα 26) (Roberts 2014).

Διάφοροι τρόποι συσσωμάτωσης των θεραπευτικών μορίων έχουν ήδη προταθεί, οι οποίοι συνοψίζονται σε πέντε βασικούς μηχανισμούς. Την συσσωμάτωση των μονομερών στη φυσική τους μορφή, την συσσωμάτωση των μονομερών λόγω στερεοδιαταξικών αλλαγών καθώς και τη συσσωμάτωση λόγω χημικών μετατροπών. Ακόμα, περιοχές (patches) στην επιφάνεια των μορίων

μπορούν να οδηγήσουν σε δημιουργία σταθερών συσσωματωμάτων, καθώς επίσης υπάρχει και η δημιουργία συσσωματωμάτων μέσω πυρήνωσης, όπου μία περιοχή στην επιφάνεια του μονομερούς μπορεί να αποτελέσει πυρήνα για την έναρξη συσσωμάτωσης με άλλα μονομερή (Agrawal, Kumar et al. 2011).



Εικόνα 26 : Σχηματική απεικόνιση μηχανισμού συσσωμάτωσης μονομερών λόγω στερεοδιαταξικών αλλαγών για πρωτεΐνες με παραπάνω του ενός δομικά αυτοτελών περιοχών (domains), όπως ένα μονοκλωνικό αντίσωμα (mAb), το οποίο αποτελείται από ένα Fc θραύσμα και δύο Fab θραύσματα. Οι κόκκινοι χρωματισμοί στα μονομερή δείχνουν τις αμινοξικές ακολουθίες που αποτελούν «hot spots» για αλληλεπιδράσεις που καταλήγουν στην δημιουργία σταθερών συσσωματωμάτων. Τα αμφίδρομα βέλη απεικονίζουν τα αναστρέψιμα στάδια ενώ τα βέλη μιας κατεύθυνσης τα μη αναστρέψιμα στάδια. Ο πυρήνας (Nuclei) ορίζεται ως το μικρότερο μη αναστρέψιμο συσσωμάτωμα μονομερών, το οποίο δημιουργήθηκε με τη διαδικασία της πυρήνωσης και θα οδηγήσει σε σφαιρικό συσσωμάτωμα (Roberts 2014).

1.10 ΣΚΟΠΟΣ

Στόχος της παρούσας έρευνας είναι η υπολογιστική βελτιστοποίηση της διαλυτότητας των μονοκλωνικών αντισωμάτων, τα οποία δρουν ενάντια σε καρκινικά κύτταρα. Συλλέγοντας τις αμινοξικές ακολουθίες των αντισωμάτων του συνόλου δεδομένων, έγινε εύρεση των περιοχών – πεπτιδίων που προβλέπεται να έχουν μεγαλύτερη τάση να προκαλέσουν συσσωμάτωση, κυρίως σε υψηλές συγκεντρώσεις. Στη συνέχεια, για όλα τα αντισώματα, βρέθηκαν τα αμινοξικά κατάλοιπα που ήταν επιφανειακά στην τρισδιάστατη δομή τους. Διασταυρώνοντας τα αποτελέσματα, επιλέχθηκαν αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία υπήρξαν στα προβλεπόμενα πεπτίδια για πρόκληση συσσωμάτωσης και ήταν και επιφανειακά. Πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές αντικαταστάσεις αυτών των καταλοίπων με άλλα κατάλοιπα, έχοντας γνώμονα μαζί με τα παραπάνω κριτήρια, και την κλίμακα τάσης των αμινοξέων για συσσωμάτωση του Salvador Ventura. Διεξάγοντας συνεχή επανέλεγχο για κάθε αντικατάσταση αμινοξικού καταλοίπου, προτιμήθηκαν εκείνες οι αντικαταστάσεις που κατέληγαν σε μείωση των αρχικά προβλεπόμενων πεπτιδίων με μεγαλύτερη τάση για συσσωμάτωση. Σχεδιάστηκαν νέα μοντέλα τρισδιάστατων δομών με τις νέες αμινοξικές ακολουθίες, καθώς επίσης βελτιστοποιήθηκαν ενεργειακά. Τέλος, έγιναν αυστηροί έλεγχοι στα νέα μοντέλα για να προταθούν ως πρότυπα.

1.11 ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΠΟΥ ΣΤΟΧΕΥΟΥΝ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

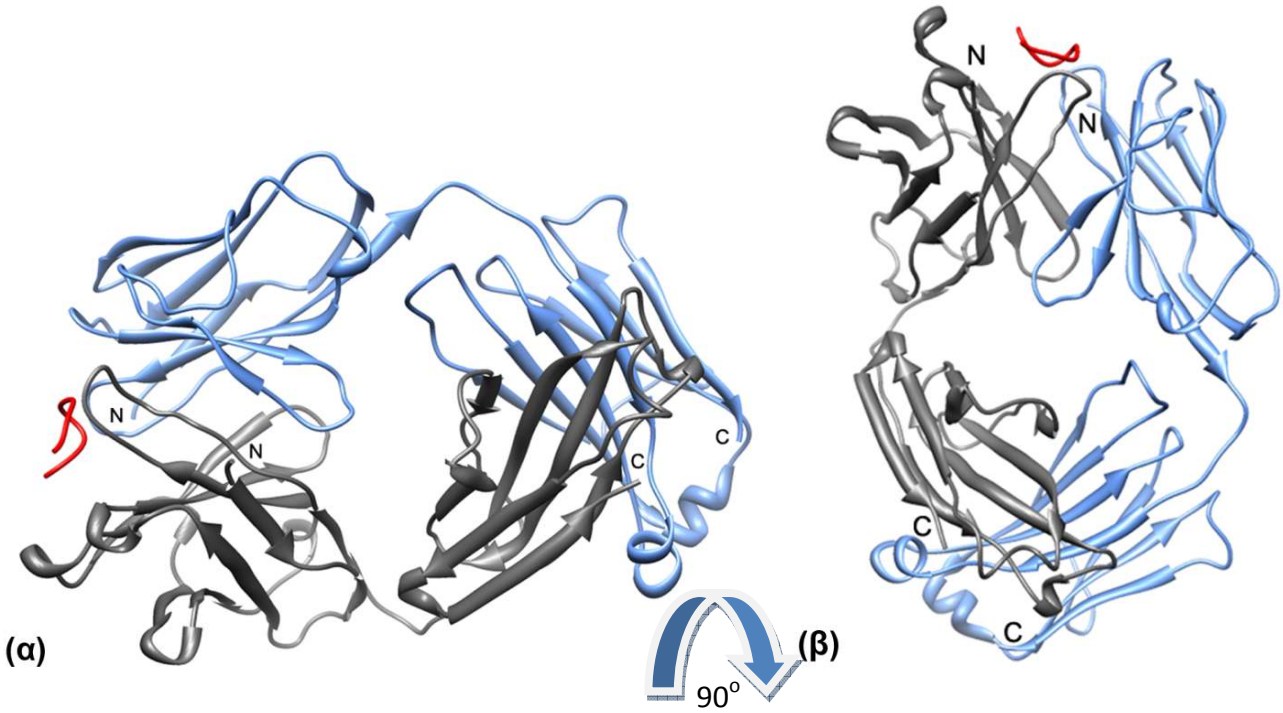
Ακολουθεί αναλυτική περιγραφή ενός συνόλου εμπορικά διαθέσιμων μονοκλωνικών αντισωμάτων, τα οποία στοχεύουν σε καρκινικά κύτταρα, και θα αποτελέσουν στη συνέχεια και το τελικό σύνολο δεδομένων (data set) της παρούσας έρευνας.

1.11.1 ALEMTUZUMAB

Το αντίσωμα Alemtuzumab (CAMPATH®) (James, Hale et al. 1999), είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο χρησιμοποιείται θεραπευτικά για τη χρόνια λεμφοκυτταρική αναιμία (Chronic lymphocytic leukemia - CLL) (Dumont 2002; Quintas-Cardama and O'Brien 2009). Είναι ένα εξανθρωπισμένο (humanized) μονοκλωνικό αντίσωμα (Campath-1H), προερχόμενο από ανασυνδυασμένο DNA, το οποίο στοχεύει στην γλυκοπρωτεΐνη CD52 (21-28 kD), η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων (Keating and Hallek 2002).

Η CD52 κωδικοποιείται από το CD52 γονίδιο (*CD52* gene), και παρουσιάζεται στην επιφάνεια των ώριμων λεμφοκυττάρων, αλλά όχι και των βλαστοκυττάρων από τα οποία προέρχονται τα λεμφοκύτταρα. Επίσης, παρουσιάζεται και στην επιφάνεια των μονοκύτταρων (Buggins, Mufti et al. 2002) και των δενδριτικών κυττάρων (Ratzinger, Reagan et al. 2003). Είναι ένα πεπτίδιο δώδεκα αμινοξικών καταλοίπων και λόγω του ότι είναι αρνητικά φορτισμένο συμπεραίνεται ότι η λειτουργία του είναι η παρεμπόδιση της κυτταρικής προσκόλλησης (anti-adhesion), δίνοντας έτσι τη δυνατότητα στα κύτταρα να κινούνται ελεύθερα.

Στη λευχαιμία, υπάρχει έξαρση στην παρουσία των Β και Τ λεμφοκυττάρων. Το CAMPATH®, επιτρέπει μία επιλεκτική μείωση αυτών των πληθυσμών λεμφοκυττάρων, καθώς προσδένεται στο αντιγόνο CD52 και προάγει την λύση του καρκινικού κυττάρου, ενεργοποιώντας την εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα (Antibody-dependent cell-mediated cytoxicity, ADCC).



Εικόνα 27 : (α) Γραφική αναπαράσταση του πειραματικά προσδιορισμένου με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ συμπλόκου Alemtuzumab – CD52 με κωδικό PDB : 1CE1. Με κόκκινο χρώμα η πρωτεΐνη CD52 (αντιγόνο), με γαλάζιο χρώμα η ελαφριά αλυσίδα και με σκούρο γκρι χρώμα η βαριά αλυσίδα του αντισώματος Alemtuzumab. (β) Ομοίως το ίδιο σύμπλοκο στραμμένο κατά 90 μοίρες.

Το Alemtuzumab διατίθεται υπό την εμπορική ονομασία CAMPATH® στην Αμερική (US) και υπό την ονομασία MABCAMPATH® στην Ευρώπη (EU). Έλαβε την έγκριση από τον Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (FDA) στις 7 Μαΐου 2001 για τη χρόνια λεμφοκυτταρική αναιμία (Chronic lymphocytic leukemia - CLL), για ασθενείς που έχουν λάβει ως θεραπεία αλκυλιωτικούς παράγοντες κι έχουν αποτύχει στη θεραπεία με φλουδαραβίνη. Επίσης βρίσκεται σε διάφορες κλινικές δοκιμές για την Πολλαπλή Σκλήρυνση (Multiple Sclerosis - MS) (Fox 2010) και την απόρριψη μοσχεύματος νεφρού (Kidney Transplant Rejection) (Weissenbacher, Boesmueller et al. 2010). Για τις ανάγκες τις παρούσας έρευνας, θα χρησιμοποιηθεί η πειραματικά προσδιορισμένη με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ δομή του Alemtuzumab από την βάση πρωτεϊνικών δομών PDB, με κωδικό 1CE1 (Εικόνα 27) (James, Hale et al. 1999).

1.11.2 BEVACIZUMAB

Το Bevacizumab (AVASTIN®) (Muller, Chen et al. 1998), είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο λειτουργεί ως αγγειογενετικός αναστολέας (angiogenesis inhibitor). Χρησιμοποιείται θεραπευτικά για διάφορους τύπους καρκίνου, όπως τον καρκίνο του παχέος εντέρου, τον καρκίνο του πνεύμονα, τον καρκίνο του μαστού (εκτός Αμερικής), το γλοιοβλάστωμα (μόνο εντός Αμερικής), καθώς επίσης τον καρκίνο του νεφρού και του στομάχου. Είναι ένα εξανθρωπισμένο (humanized) μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο στοχεύει στη δέσμευση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα Α (Vascular endothelial growth factor A, VEGF-A), έτσι ώστε να παρεμποδιστεί η αλληλεπίδραση του με τον αντίστοιχο υποδοχέα (Vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR), που βρίσκεται στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων (Los, Roodhart et al. 2007). Έτσι, εμποδίζεται ή μειώνεται ο πολλαπλασιασμός των αιμοφόρων αγγείων και ελαχιστοποιείται η μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Semenza 2008).

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας Α (Vascular endothelial growth factor A, VEGF-A), είναι μία πρωτεΐνη, η οποία στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το VEGFA γονίδιο (*VEGFA* gene) (Semenza 2008). Κυρίως δραστηριοποιείται στα επιθηλιακά κύτταρα, επάγει την αγγειογένεση καθώς επίσης τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, προωθεί την κυτταρική μετανάστευση και αναστέλλει την απόπτωση του κυττάρου.

Το Bevacizumab διατίθεται εμπορικά υπό την ονομασία AVASTIN® από την εταιρία Genentech Inc. Η πρώτη έγκριση που έλαβε από τον Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA), ήταν στις 26 Φεβρουαρίου 2004 για τον μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου. Λίγα χρόνια μετά, στις 11 Οκτωβρίου 2006 έλαβε έγκριση για τον μεταστατικό καρκίνο του πνεύμονα (Velcheti, Viswanathan et al. 2006) και στις 22 Φεβρουαρίου 2008 για τον μεταστατικό καρκίνο του μαστού (αρνητικό για ERB2 – ERB2 negative). Τον Δεκέμβρη του 2010 ο FDA αποσύρει το Bevacizumab από τη χρήση του ενάντια στον καρκίνο του μαστού εντός Αμερικής, καθώς μετά από έρευνες διαπιστώνεται ότι δεν είναι απόλυτα ασφαλές και αποτελεσματικό σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Στις 31 Ιουλίου 2009 λαμβάνει έγκριση για τον μεταστατικό νεφρικό καρκίνο και στις 8 Φεβρουαρίου

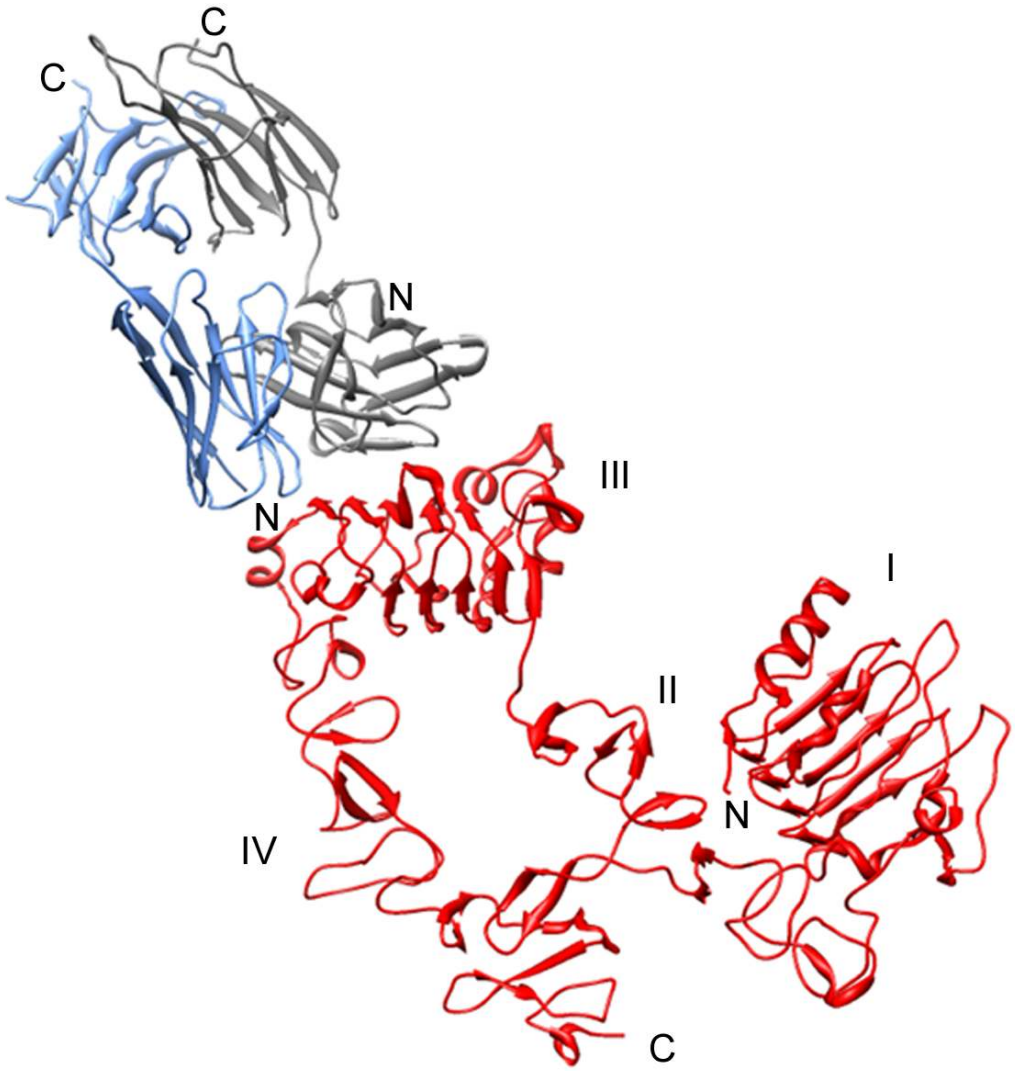
2011 για το γλοιοβλάστωμα (μόνο εντός Αμερικής) (Burkhardt, Riina et al. 2012; Gilbert, Dignam et al. 2014). Για τις ανάγκες τις παρούσας έρευνας, θα χρησιμοποιηθεί η πειραματικά προσδιορισμένη με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ δομή του Bevacizumab από την βάση πρωτεϊνικών δομών PDB, με κωδικό 1BJ1 (Muller, Chen et al. 1998).

1.11.3 CETUXIMAB

Το Cetuximab (ERBITUX®) (Li, Schmitz et al. 2005), είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο λειτουργεί ως αναστολέας του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor - EGFR). Χρησιμοποιείται θεραπευτικά για τον καρκίνο του παχέος εντέρου (Messersmith and Ahnen 2008), τον μεταστατικό καρκίνο του πνεύμονα καθώς και σε διάφορα είδη καρκίνων στο κεφάλι και στο λαιμό (Vermorken, Mesia et al. 2008). Είναι ένα χιμαιρικό (chimeric) μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο προσδένεται ειδικά στον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor - EGFR) και σε καρκινικά καθώς και σε υγιή κύτταρα. Αναστέλλει την πρόσδεση με τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (epidermal growth factor - EGF), καθώς και άλλων μορίων προσδετών όπως τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού α (transforming growth factor alpha, TGFα), εμποδίζοντας την ωρίμανση του κυττάρου και την μετανάστευσή του σε άλλα όργανα και ιστούς (Dreux, Lamb et al. 2006).

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal growth factor receptor - EGFR), είναι μέλος της υπό-οικογένειας των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) and Her 4 (ErbB-4)) και μέλος της ευρύτερης οικογένειας των υποδοχέων επιδερμικών αυξητικών παραγόντων (Herbst 2004). Μεταλλαγές που μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση των υποδοχέων αυτών, ή την λειτουργία τους, μπορούν να οδηγήσουν σε διάφορα είδη καρκίνου (Zhang, Berezov et al. 2007). Οι υποδοχείς HER βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη και μεταδίδουν σήματα επικοινωνίας (ονομάζονται EGFs), από το εξωτερικό του κυττάρου προς το εσωτερικό του κυττάρου, καθώς επίσης παίζουν καθοριστικό τόλο στον πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Σε κάποια είδη καρκίνων, κυρίως σε καρκίνους του μαστού, ο υποδοχέας HER2 υπερεκφράζεται και προκαλεί τα καρκινικά κύτταρα να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα.

Η πρόσδεση του Cetuximab με τον EGFR εμποδίζει τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση άλλων υποδοχέων, καταλήγοντας στην αναστολή της ωρίμανσης του κυττάρου, την επαγωγή της απόπτωσης καθώς και στην μείωση της παραγωγής αγγειακών επιθηλιακών παραγόντων (Vascular endothelial growth factor) (Downward, Parker et al. 1984; Oda, Matsuoka et al. 2005).



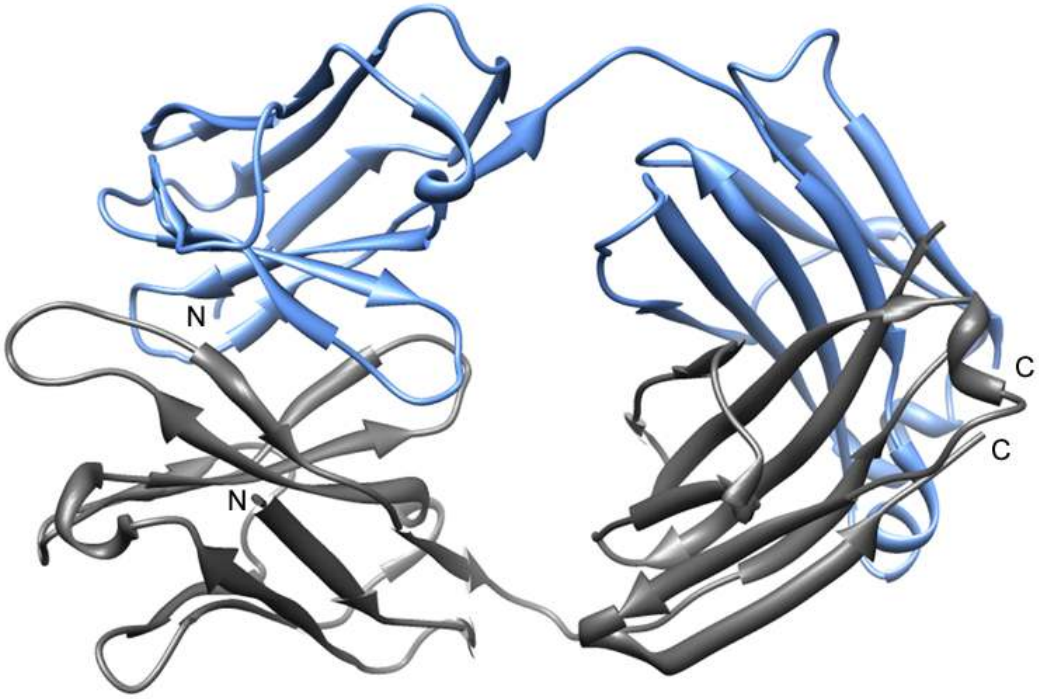
Εικόνα 28 : Γραφική αναπαράσταση του πειραματικά προσδιορισμένου με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ συμπλόκου του Cetuximab με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) με κωδικό PDB : 1YY9. Με κόκκινο χρώμα ο υποδοχέας (αντιγόνο), με γαλάζιο χρώμα η ελαφριά αλυσίδα και με σκούρο γκρι χρώμα η βαριά αλυσίδα του αντισώματος Cetuximab. Η αλληλεπίδραση συμβαίνει στην δομικά αυτοτελή περιοχή III (domain III) του υποδοχέα.

Το Cetuximab διατίθεται εμπορικά υπό την ονομασία ERBITUX® από τις εταιρίες Bristol-Myers Squibb και Eli Lilly and Company United States στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, και από την εταιρία Merck KGaA στην Ευρώπη. Έλαβε έγκριση από τον Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (FDA) στις 12

Φεβρουαρίου 2004 για τον μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου, καθώς και για τον μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου θετικό στον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal growth factor receptor - EGFR). Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε η πειραματικά προσδιορισμένη με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, δομή του Cetuximab από την βάση πρωτεϊνικών δομών PDB με κωδικό 1YY8 (Εικόνα 28) (Li, Schmitz et al. 2005).

1.11.4 OFATUMUMAB

Το Ofatumumab (ARZERRA™) (Du, Yang et al. 2009), είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο χρησιμοποιείται θεραπευτικά για τη χρόνια λεμφοκυτταρική αναιμία (Chronic lymphocytic leukemia - CLL), καθώς επίσης μελετάται ως πιθανή θεραπεία και άλλων τύπων καρκίνου (Zhang 2009). Είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα εξ ολοκλήρου από ανθρώπινη πρωτεΐνη, το οποίο στοχεύει στην γλυκοζυλιωμένη φωσφοπρωτεΐνη CD20, η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια των παρθένων Β λεμφοκυττάρων.



Εικόνα 29 : Γραφική αναπαράσταση της πειραματικά προσδιορισμένης με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ δομής του Ofatumumab με κωδικό PDB : 3GIZ. Με γαλάζιο χρώμα η ελαφριά αλυσίδα, και με σκούρο γκρι χρώμα η βαριά αλυσίδα του αντισώματος Ofatumumab.

Η πρωτεΐνη CD20 κωδικοποιείται από το MS4A1 γονίδιο (*MS4A1* gene) (Tedder, Streuli et al. 1988). Στην επιφάνεια των παρθένων Β κυττάρων, η πρωτεΐνη CD20 παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην διαφοροποίηση των Β κυττάρων σε πλασματοκύτταρα. Υπάρχει σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του Β λεμφοκυττάρου εκτός από το αρχικό και το τελευταίο (Macardle and Nicholson 2002). Λόγω της παρουσίας της CD20 σε νεοπλασίες Β και Τ κυττάρων, μπορεί να διαπιστωθούν Β κυτταρικά λεμφώματα και λευχαιμίες. Το αντίσωμα Ofatumumab στοχεύει στην πρωτεΐνη CD20 των καρκινικών κυττάρων, επάγωντας την κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα (complement-dependent cytotoxicity, CDC), καθώς και την εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα (Antibody-dependent cell-mediated cytoxicity, ADCC) (Lin 2010).

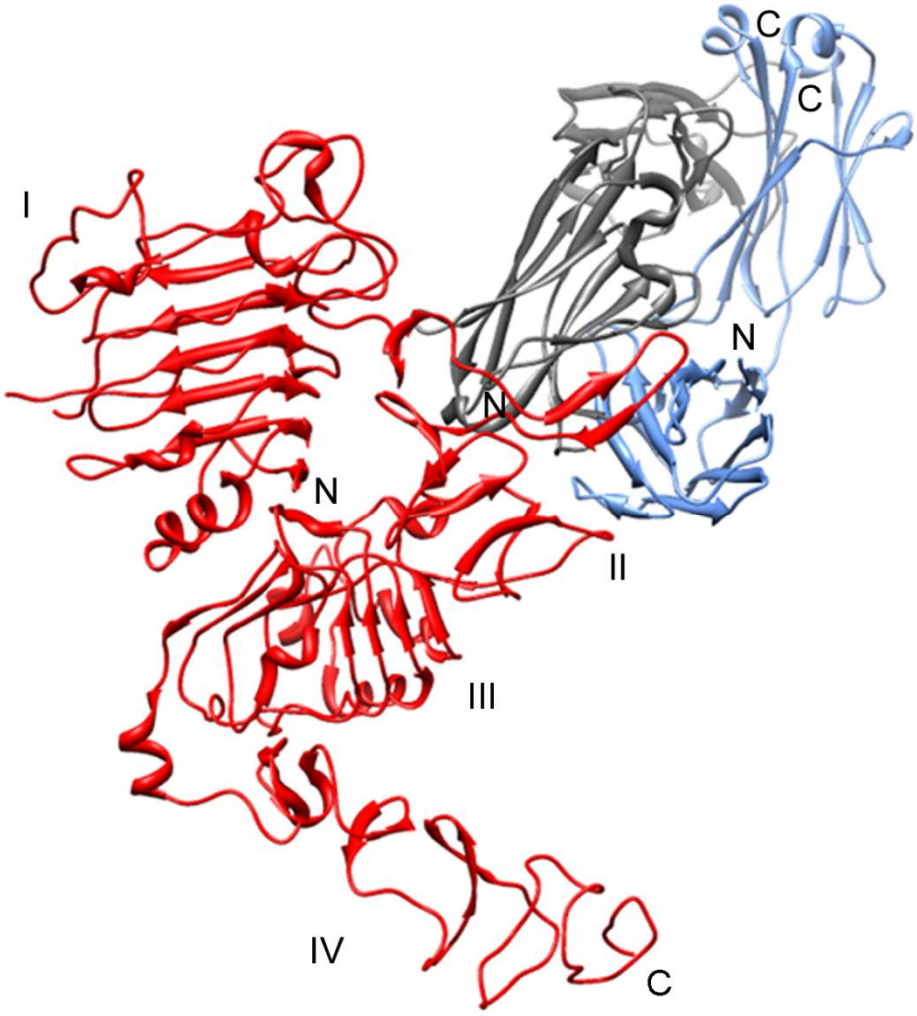
Το Ofatumumab διατίθεται εμπορικά από την εταιρία GenMab A/S. Έλαβε έγκριση από τον Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων (FDA) με την εμπορική ονομασία ARZERRA™ στις 26 Οκτωβρίου 2009, για θεραπευτική χρήση ενάντια στην χρόνια λεμφοκυτταρική αναιμία (Chronic lymphocytic leukemia - CLL). Επίσης, βρίσκεται σε φάση κλινικών δοκιμών για την Ρευματοειδή Αρθρίτιδα (Rheumatoid arthritis, RA), καθώς και για το λέμφωμα Non-Hodgkin’s (Non-Hodgkin's lymphoma, NHL).

Σε σύγκριση με το μονοκλωνικό αντίσωμα Rituximab (RITUXAN®), το οποίο ομοίως στοχεύει στην πρωτεΐνη CD20 και θα περιγραφεί λεπτομερώς στην ενότητα 1.11.6, το μονοκλωνικό αντίσωμα Ofatumumab διαπιστώνεται να έχει καλύτερη πρόσδεση με το αντιγόνο (Lin 2010). Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε η πειραματικά προσδιορισμένη με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ δομή με κωδικό PDB : 3GI (Εικόνα 29) (Du, Yang et al. 2009).

1.11.5 PERTUZUMAB

Το Pertuzumab (PERJETA™) (Vajdos, Adams et al. 2002), είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο χρησιμοποιείται θεραπευτικά για τον θετικό στον υποδοχέα HER2 καρκίνο του μαστού. Είναι ένα εξανθρωπισμένο (humanized) μονοκλωνικό αντίσωμα. Λειτουργεί ως αναστολέας διμερισμού του υποδοχέα HER2 με τους άλλους υποδοχείς της οικογένειας των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (HER receptors), καταλήγοντας στην καθυστέρηση ανάπτυξης του όγκου (de Bono, Bellmunt et al. 2007).

Ο υποδοχέας της κινάσης τυροσίνης 2 (ERBB2, HER2), είναι μία πρωτεΐνη, η οποία στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το ERBB2 γονίδιο (*ERBB2* gene). Το ERBB2 γονίδιο αναφέρεται συχνά και ως *HER2* από το υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (Human epidermal growth factor receptor 2) ή αλλιώς *Her2/neu*. Η πρωτεΐνη HER2 ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων επιδερμικών αυξητικών παραγόντων (Epidermal growth factor receptor EGFR/ERBB), η οποία περιγράφηκε στην ενότητα 1.9.3. Υπερέκφραση του γονιδίου ERBB2 έχει αποδειχθεί να έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη συγκεκριμένων ιδιαίτερα επιθετικών τύπων καρκίνου του μαστού. Με την πάροδο των χρόνων η πρωτεΐνη HER2 αποτέλεσε σημαντικό βιοδείκτη (biomarker), καθώς και στόχο του περίπου 30% των θεραπευτικών φαρμάκων για τον καρκίνο του μαστού (Olayioye 2001).



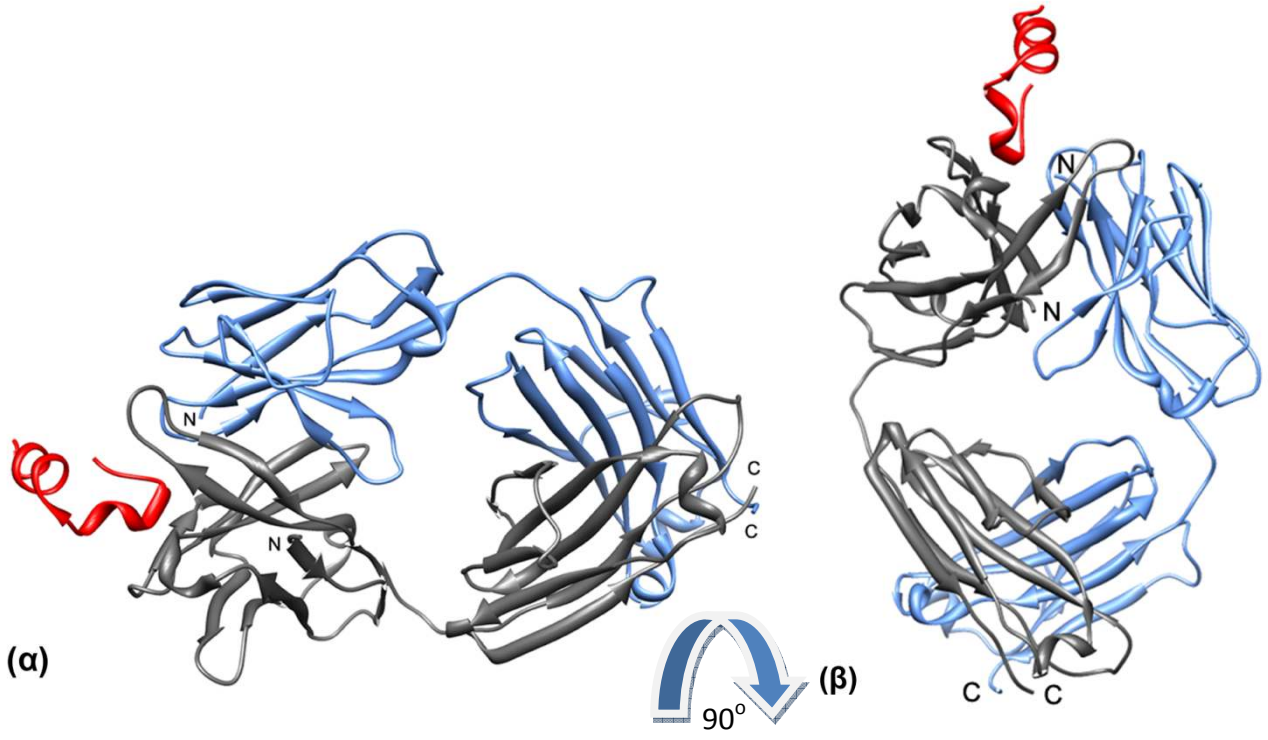
Εικόνα 30 : Γραφική αναπαράσταση του πειραματικά προσδιορισμένου με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ συμπλόκου του αντισώματος Pertuzumab με τον υποδοχέα της κινάσης τυροσίνης 2 (ERBB2, HER2), με κωδικό PDB : 1S78. Με κόκκινο χρώμα ο υποδοχέας (αντιγόνο), με γαλάζιο χρώμα η ελαφριά αλυσίδα και με σκούρο γκρι χρώμα η βαριά αλυσίδα του αντισώματος Pertuzumab. Η αλληλεπίδραση συμβαίνει στην δομικά αυτοτελή περιοχή II (domain II) του υποδοχέα.

Το Pertuzumab διατίθεται εμπορικά με την ονομασία PERJETA™ από την εταιρία Genentech Inc, η οποία από το 2009 ανήκει στην εταιρία Roche. Έλαβε έγκριση από τον Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (FDA) στις 8 Ιουνίου 2012 για θεραπεία στον θετικό στον υποδοχέα HER2 καρκίνο του μαστού. Επίσης βρίσκεται σε στάδια κλινικών δοκιμών για διάφορα είδη καρκίνου του προστάτη (Mitri, Constantine et al. 2012). Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε η πειραματικά προσδιορισμένη με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ δομή με κωδικό PDB : 1L7I (Εικόνα 30) (Vajdos, Adams et al. 2002).

1.11.6 RITUXIMAB

Το Rituximab (RITUXAN®) (Du, Wang et al. 2007), είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο χρησιμοποιείται θεραπευτικά για το λέμφωμα Non-Hodgkin's (Non-Hodgkin's lymphoma, NHL) (Scott 1998; Grillo-Lopez, White et al. 1999), για τη χρόνια λεμφοκυτταρική αναιμία (Chronic lymphocytic leukemia - CLL) (Jaglowski and Byrd 2010), καθώς και για την Ρευματοειδή Αρθρίτιδα (Rheumatoid arthritis, RA) (Edwards, Szczepanski et al. 2004). Είναι ένα χιμαιρικό μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο στοχεύει στην πρωτεΐνη CD20 (περιγράφηκε αναλυτικά στην ενότητα 1.9.4), η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια των φυσιολογικών και των καρκινικών Β λεμφοκυττάρων.

Το Rituximab προσδένεται στην πρωτεΐνη CD20 στο καρκινικό Β λεμφοκύτταρο με το Fab θραύσμα του αντισώματος, ενώ με το Fc θραύσμα του αντισώματος «στρατολογεί» άλλα αντισώματα στην περιοχή του καρκινικού κυττάρου, καθώς επίσης ενεργοποιεί το συμπλήρωμα για να προκληθεί λύση του κυττάρου (Di Gaetano, Cittera et al. 2003). Καταστρέφει τα καρκινικά και τα φυσιολογικά κύτταρα που έχουν την πρωτεΐνη CD20 στην επιφάνειά τους, επάγοντας την κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα (complement-dependent cytotoxicity, CDC), καθώς επίσης και την εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα (Antibody-dependent cell-mediated cytoxicity, ADCC). Χρησιμοποιείται θεραπευτικά σε ασθένειες που χαρακτηρίζονται είτε από μεγάλο πληθυσμό Β λεμφοκυττάρων, είτε από υπερδραστήρια Β κύτταρα, είτε από Β κύτταρα που δυσλειτουργούν.



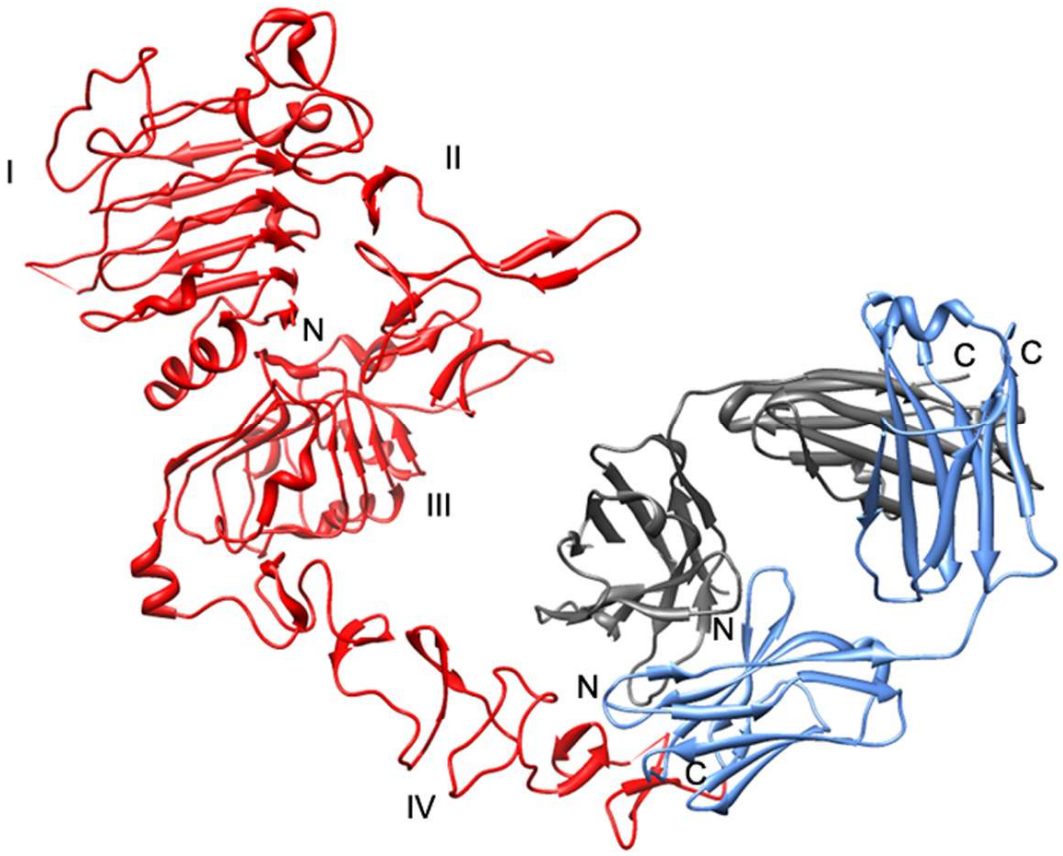
Εικόνα 31 : (α) Γραφική αναπαράσταση του πειραματικά προσδιορισμένου με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ συμπλόκου του αντισώματος Rituximab – αντιγόνο CD20 με κωδικό PDB : 2OSL. Με κόκκινο χρώμα η πρωτεΐνη CD20 (αντιγόνο), με γαλάζιο χρώμα η ελαφριά αλυσίδα και με σκούρο γκρι χρώμα η βαριά αλυσίδα του αντισώματος Rituximab. (β) Ομοίως το ίδιο σύμπλοκο στραμμένο κατά 90 μοίρες.

Το Rituximab διατίθεται εμπορικά με την ονομασία MABTHERA® από τις εταιρίες Biogen Idec και Genentech στην Αμερική, και με την ονομασία RITUXAN® από την Roche στον Καναδά και την Ευρωπαϊκή Ένωση. Έλαβε έγκριση από τον ΟργανισμόΕλέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (FDA) στις 1 Νοεμβρίου 1997 για θεραπεία ενάντια στο λέμφωμα Non-Hodgkin’s (Non-Hodgkin's lymphoma, NHL) (Grillo-Lopez, White et al. 1999). Μερικά χρόνια αργότερα έλαβε έγκριση στις 28 Φεβρουαρίου 2006 για την Ρευματοειδή Αρθρίτιδα (Rheumatoid arthritis, RA), και στις 18 Φεβρουαρίου 2010 για τη χρόνια λεμφοκυτταρική αναιμία (Chronic lymphocytic leukemia - CLL). Ακόμα, στις 19 Απριλίου 2011 λαμβάνει έγκριση για την Κοκκιωμάτωση Wegener (Wegener's Granulomatosis, WG). Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε η πειραματικά προσδιορισμένη με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ δομή με κωδικό PDB : 2OSL (Εικόνα 31) (Du, Wang et al. 2007).

1.11.7 TRASTUZUMAB

Το Trastuzumab (HERCEPTIN®) (Cho, Mason et al. 2003), είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο χρησιμοποιείται θεραπευτικά για τον καρκίνο του μαστού, θετικό στον υποδοχέα HER2 σε πρώιμο στάδιο (Moja, Tagliabue et al. 2012), καθώς επίσης και για τον μεταστατικό καρκίνο του μαστού, ομοίως θετικό στον υποδοχέα HER2. Είναι ένα εξανθρωπισμένο (humanized) μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο στοχεύει στον υποδοχέα HER2 (περιγράφηκε αναλυτικά στην ενότητα 1.9.5) (Yu and Hung 2000).

Ενίσχυση ή υπέρ – έκφραση του *ERBB2* γονιδίου συμβαίνει σε περίπου 15-30% των καρκίνων του μαστού (Burstein 2005; Mitri, Constantine et al. 2012), καθώς επίσης είναι γνωστό ότι απαντάται και σε καρκίνους των ωοθηκών και του στομάχου, όπως και σε επιθετικές μορφές καρκίνου της μήτρας (Santin, Bellone et al. 2008). Μία σημαντική επίδραση από την πρόσδεση του Trastuzumab με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, HER2) είναι η αύξηση της πρωτεΐνης p27, η οποία είναι υπεύθυνη για την αναστολή του πολλαπλασιασμού του κυττάρου (Le, Pruefer et al. 2005). Ακόμα, το αντίσωμα Trastuzumab, μετά την πρόσδεσή του με το αντιγόνο (HER2/neu) επάγει την εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα (Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) (Clynes, Towers et al. 2000).



Εικόνα 32 : Γραφική αναπαράσταση του πειραματικά προσδιορισμένου με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ συμπλόκου του αντισώματος Trastuzumab με τον υποδοχέα της κινάσης τυροσίνης 2 (ERBB2, HER2), με κωδικό PDB 1N8Z. Με κόκκινο ο υποδοχέας (αντιγόνο), με γαλάζιο η ελαφριά αλυσίδα και με σκούρο γκρι η βαριά αλυσίδα του αντισώματος Trastuzumab. Η αλληλεπίδραση συμβαίνει στην δομικά αυτοτελή περιοχή IV (domain IV) του υποδοχέα.

Το Trastuzumab διατίθεται εμπορικά από την εταιρία Roche με το όνομα HERCEPTIN® για την θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του μαστού με υπερ-έκφραση του υποδοχέα ERBB2. Έλαβε την πρώτη έγκριση από τον Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (FDA) στις 1 Σεπτεμβρίου 1998, καθώς επίσης έλαβε έγκριση αρκετά χρόνια αργότερα για την θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου του πεπτικού συστήματος στις 20 Οκτωβρίου 2010.

Ακόμα, αρκετά πρόσφατα, στις 22 Φεβρουαρίου 2013 έλαβε επίσης έγκριση από τον FDA για θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του μαστού με υπερ-έκφραση του υποδοχέα ERBB2 με την ονομασία KADCYLA®. Το KADCYLA® (Trastuzumab emtansine) (Niculescu-Duvaz 2010), αποτελείται από το μονοκλωνικό αντίσωμα Trastuzumab συζευγμένο (συνδεδεμένο) με τον κυτταροτοξικό παράγοντα mertansine (DM1), ο οποίος χορηγείται στο εσωτερικό του καρκινικού κυττάρου όπου και αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, οδηγώντας το κύτταρο στην

απόπτωση (LoRusso, Weiss et al. 2011). Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε η πειραματικά προσδιορισμένη με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ δομή με κωδικό PDB : 1N8Z (Εικόνα 32) (Cho, Mason et al. 2003).

1.12 ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

1.12.1 DrugBank

Η βάση DrugBank 3.0 (Open Data Drug & Drug Target Database) (Knox, Law et al. 2011), περιέχει πληροφορίες με λεπτομερή σχολιασμό για 7689 εγγραφές, περιλαμβάνοντας 1552 φάρμακα – μικρά μόρια, εγκεκριμένα από τον Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (FDA), 155 βιοτεχνολογικά φάρμακα (πρωτεΐνες-πεπτίδια), εγκεκριμένα από τον FDA, 87 φαρμακευτικά προϊόντα διατροφής και πάνω από 6000 φάρμακα σε πειραματικό επίπεδο. Επιπλέον, περιέχει πληροφορίες για ένα μη ομόλογο σύνολο των 4270 πρωτεϊνικών ακολουθιών (πρωτεΐνες στόχους φαρμάκων/ ένζυμα/ μεταφορείς) που συνδέονται με τις εγγραφές. Η βάση συνδέεται με διαδικτυακούς υπερσυνδέσμους με τις βάσεις KEGG (Kanehisa, Goto et al. 2012), PubChem (NCBI_Resource 2013), ChEBI (Hastings, de Matos et al. 2013), PDB (Rose, Bi et al. 2013), Swiss-Prot (UniProt_Consortium 2013), GenBank, PharmGKB (Thorn, Klein et al. 2013) και GeneCards (Stelzer, Dalah et al. 2011), (Wishart, Knox et al. 2008; Law, Knox et al. 2014) και διατίθεται στην διαδικτυακή διεύθυνση http://www.drugbank.ca/.

1.12.2 RCSB PDB

Η βάση RCSB PDB (Protein Data Bank) (Berman, Westbrook et al. 2000), είναι η μοναδική βάση παγκοσμίως, όπου είναι κατατεθειμένες οι τρισδιάστατες δομές βιολογικών μακρομορίων. Περιλαμβάνει δομές που έχουν προκύψει είτε από κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, είτε με φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Σήμερα (Ιούλιος 2014) η βάση PDB περιλαμβάνει 101.207 δομές βιομορίων. Η κάθε εγγραφή της βάσης PDB εκτός από τις συντεταγμένες των ατόμων, περιέχει βιβλιογραφικές αναφορές, λεπτομέρειες για τον προσδιορισμό της δομής, καθώς και άλλα σχετικά στοιχεία. Ο χρήστης έχει πρόσβαση στη βάση μέσω της διαδικτυακής διεύθυνσης http://pdb.org/pdb/home/home.do.

1.12.3 IMGT®

Η βάση IMGT® (The international ImMunoGeneTics information system®) (Lefranc, Giudicelli et al. 2009), δημιουργήθηκε το 1989 από τη Marie-Paule Lefranc, στο Πανεπιστήμιο του Montpellier 2 και διατίθεται διαδικτυακά στην διεύθυνση http://www.imgt.org/. Εξειδικεύεται σε ανοσοσφαιρίνες (Immunoglobulins, IG) και στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών ή αντισώματα, σε υποδοχείς Τ κυττάρων (T cell Receptor, TR), σε πρωτεΐνες του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (MHC) και στην υπεροικογένεια τους, του ανθρώπου και άλλων σπονδυλωτών, καθώς και σε άλλες πρωτεΐνες που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα των σπονδυλωτών και των ασπόνδυλων. Η IMGT® συνεργάζεται στενά με το EBI (Europe), DDBJ (Japan) και το NCBI (USA) και αποτελείται από μία βάση ακολουθιών, μία βάση γονιδιωμάτων, μία βάση τρισδιάστατων δομών, μία βάση μονοκλωνικών αντισωμάτων καθώς και από διάφορα online εργαλεία. Στην παρούσα έρευνα έγινε άντληση πληροφοριών από την βάση μονοκλωνικών αντισωμάτων (POSTER Poiron, C. et al., JOBIM 2010, Paper 13 (2010)), η οποία διατίθεται διαδικτυακά στην διεύθυνση http://www.imgt.org/mAb-DB/query.

1.13 ΕΡΓΑΛΕΙΑ

1.13.1 ClustalW

Το ClustalW (Thompson, Higgins et al. 1994) είναι ένα εργαλείο που πραγματοποιεί πολλαπλές στοιχίσεις και δέχεται ως είσοδο ακολουθίες DNA, και ακολουθίες πρωτεϊνών. Υπολογίζει διάφορα σκορ μεταξύ των ακολουθιών, έτσι ώστε να επιτευχθεί το καλύτερο «ταίριασμα» μεταξύ τους. Χρησιμοποιεί διάφορα σύμβολα στο αποτέλεσμα της στοίχισης, έτσι ώστε να φαίνονται οι ταυτότητες, οι ομοιότητες και οι διαφορές μεταξύ των ακολουθιών. Ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να το χρησιμοποιήσει διαδικτυακά, μέσω της διεύθυνσης https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/

1.13.2 AMYLPRED2

Το εργαλείο AMYLPRED2 (Tsolis, Papandreou et al. 2013), είναι ένας συναινετικός αλγόριθμος πρόγνωσης πεπτιδίων που έχουν τάση για συσσωμάτωση, σε σφαιρικές πρωτεΐνες. Συνδυάζει έντεκα υπάρχουσες μεθόδους, οι οποίες συνδυάζονται κατάλληλα έτσι ώστε να παραχθεί το συναινετικό αποτέλεσμα. Είναι ένα διαδικτυακό εργαλείο για ακαδημαϊκή χρήση, για την συναινετική πρόβλεψη επιρρεπών προς συσσωμάτωση περιοχών, παίρνοντας ως είσοδο μία ακολουθία. Ιδιαίτερα χρήσιμο για πρωτεΐνες που σχετίζονται με στερεοδιαταξικές ασθένειες, τις αμυλοειδώσεις, όπως η νόσος του Alzheimer, και η νόσος του Parkinson και διαβήτης τύπου ΙΙ. Διατίθεται για χρήση στην διαδικτυακή διεύθυνση http://aias.biol.uoa.gr/AMYLPRED2/.

1.13.3 DSSP

Το πρόγραμμα DSSP (Define Secondary Structure of Proteins) (Kabsch and Sander 1983), είναι ένας αλγόριθμος ανάθεσης δευτεροταγούς δομής με βάση τις ατομικές συντεταγμένες συντεταγμένες του αρχείου PDB που θα δοθεί ως είσοδος. Η ανάθεση γίνεται με βάση κανόνων που έχουν οριστεί εκ των προτέρων, χωρίς όμως να γίνεται πρόγνωση δευτεροταγούς δομής. Επίσης το DSSP είναι μία βάση, που περιέχει έτοιμα αρχεία με αναθέσεις δευτεροταγούς δομής για όλες τις πρωτεϊνικές εγγραφές της βάσης PDB. Ο χρήστης μπορεί, είτε να το χρησιμοποιήσει

διαδικτυακά, από την διεύθυνση http://www.biogem.org/cgi-bin/edssp.pl, είτε τοπικά, από τον προσωπικό του υπολογιστή.

1.13.4 Modeller9v11

Το εργαλείο Modeller9v11 (Sali and Blundell 1993), χρησιμοποιείται για προτυποποίηση με βάση την ομολογία (homology modeling). Μοντελοποιεί τρισδιάστατες δομές πρωτεϊνών ικανοποιώντας τους περιορισμούς στο χώρο. Ο χρήστης παρέχει μία στοίχιση της ακολουθίας που θέλει να μοντελοποιήσει, με την ακολουθία κάποιας γνωστής δομής που καλείται δομή-οδηγός (σε μορφή .pir), καθώς επίσης και τις συντεταγμένες των ατόμων της δομής-οδηγού. Το λογισμικό υπολογίζει το νέο μοντέλο με όλα τα άτομα εκτός των υδρογόνων. Είναι διαθέσιμο για τα περισσότερα Unix/Linux λειτουργικά συστήματα, Windows καθώς και Mac. Υπάρχει στην διαδικτυακή διεύθυνση http://salilab.org/modeller/ , όπου μπορεί ο χρήστης να το εγκαταστήσει τοπικά.

1.13.5 WHAT IF

Το λογισμικό WHAT IF (Vriend 1990), αποτελείται από ένα ποικίλο σύνολο προγραμμάτων κι εργαλείων που είναι απαραίτητα σε διάφορα πεδία της *in silico* δομικής έρευνας των μακρομορίων. Ειδικό για προτυποποίηση πρωτεϊνικών δομών με βάση την ομολογία (homology modeling), για «διόρθωση» πρωτεϊνικών δομών, για επικύρωση των πρωτεϊνικών τρισδιάστατων δομών, κυρίων όσων πρόκειται να κατατεθούν στην βάση πρωτεϊνικών δομών Protein Data Bank (PDB), καθώς και για οπτικοποίηση μακρομορίων και μορίων που αλληλεπιδρούν (λιπίδια, ιόντα, μόρια νερού). Στην παρούσα έρευνα, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο WHAT_CHECK (Hooft, Vriend et al. 1996) του λογισμικού WHAT IF, για τον έλεγχο της ποιότητας των μοντέλων που δημιουργήθηκαν. Ο χρήστης μπορεί να έχει πλήρη διαδικτυακή πρόσβαση στο πακέτο λογισμικών του WHAT IF μέσω της διαδικτυακής σελίδας http://swift.cmbi.ru.nl/whatif/.

1.13.6 PROCHECK

Το λογισμικό PROCHECK (Laskowski, Moss et al. 1993) είναι ένα εργαλείο, το οποίο ελέγχει τη στερεοχημική δομή μιας πρωτεϊνικής δομής, αναλύοντας τη συνολική γεωμετρία της δομής, αλλά και του κάθε ζεύγους αμινοξικών καταλοίπων. Περιλαμβάνει το πρόγραμμα PROCHECK-NMR, το οποίο χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ποιότητας των δομών που έχουν βρεθεί με φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Ο χρήστης μπορεί να το χρησιμοποιήσει μέσω της διαδικτυακής σελίδας του EMBL-EBI, https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/, είτε μέσω του λογισμικού SAVES (Structural Analysis and Verification Server), http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/, με ένα σύνολο άλλων εργαλείων για τον έλεγχο πρωτεϊνικών δομών.

1.13.7 PYMOL

Το λογισμικό PyMOL (W.L. Delano The PyMOL Molecular Graphics System. 2005), είναι ένα ανοιχτού κώδικα πρόγραμμα οπτικοποίησης μοριακών γραφικών, το οποίο αναπτύχθηκε από τον Warren Lyford DeLano. Μπορεί να παράγει υψηλής ποιότητας τρισδιάστατες εικόνες μικρών μορίων ή βιολογικών μακρομορίων, όπως πρωτεΐνες. Ο χρήστης μπορεί να κατεβάσει τοπικά το εργαλείο από την ιστοσελίδα http://www.pymol.org.

1.13.8 UCSF Chimera 1.6.2

Το εργαλείο UCSF Chimera 1.6.2 (an Extensible Molecular Modeling System) (Pettersen, Goddard et al. 2004), είναι ένα διαδραστικό πρόγραμμα οπτικοποίησης και ανάλυσης μοριακών δομών και άλλων δεδομένων, όπως χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας και στοιχίσεις ακολουθιών. Δημιουργεί εικόνες υψηλής ποιότητας και ανάλυσης, καθώς και κινούμενες εικόνες. Έχει την ιδιότητα της επεκτασιμότητας, καθώς δίνεται η δυνατότητα στο χρήστη να μπορεί να ενσωματώσει καινούρια χαρακτηριστικά. Παρέχεται μέσω της διαδικτυακής διεύθυνσης http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/, για λειτουργικά συστήματα Microsoft Windows, Linux, Apple Mac OS X, SGI IRIX, και HP Tru64 Unix.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 ΓΕΝΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΠΟΡΕΙΑΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

2.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Με έναυσμα την εξερεύνηση και μελέτη της πιο ραγδαία αναπτυσσόμενης κατηγορίας φαρμάκων, των μονοκλωνικών αντισωμάτων, έγινε μια αρχική επισκόπηση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας και των διαδικτυακών βάσεων δεδομένων. Συγκεντρώθηκαν πληροφορίες που αφορούν όλα τα μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία, είτε έχουν λάβει έγκριση από τον Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (Food and Drug Administrator, FDA), είτε βρίσκονται σε στάδιο κλινικών μελετών, καθώς επίσης και όσα έχουν αποσυρθεί.

Στην παρούσα έρευνα δεν επιλέχθηκαν ως πιθανά μέλη του συνόλου δεδομένων, μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία, είτε βρίσκονται σε στάδιο κλινικών μελετών, είτε δεν έχουν λάβει ακόμα έγκριση για εμπορική διάθεση. Επιλέχθηκαν μόνο όσα έχουν λάβει έγκριση από τον FDA και χρησιμοποιούνται θεραπευτικά μέχρι και σήμερα σε διάφορες ασθένειες. Αναλυτικά στοιχεία για το κάθε μονοκλωνικό αντίσωμα υπάρχουν στο Παράρτημα στην ενότητα 1.

Κοινός παρονομαστής στο σύνολο δεδομένων προς μελέτη, ήταν να επιλεγούν τα μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν σε καρκινικά κύτταρα για διάφορα είδη καρκίνου. Σε τελευταίο στάδιο, επιλέχθηκαν από αυτά μόνο όσα διαθέτουν τρισδιάστατη δομή που έχει προσδιοριστεί πειραματικά είτε με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, είτε με φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Στον πίνακα παρουσιάζεται συνοπτικά το τελικό σύνολο δεδομένων των μονοκλωνικών αντισωμάτων που μελετήθηκαν στην παρούσα έρευνα, τα οποία έχουν ήδη παρουσιαστεί λεπτομερώς στο Κεφάλαιο 1 στις ενότητες 1.11.1 έως 1.11.7 (

ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΕΓΚΡΙΣΗ FDA	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΤΥΠΟΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ PDB	ΣΤΟΧΟΣ	ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ
RITUXAN®	**1997**	Χιμαιρικό	IgG1 - kappa	2OSL	CD20	Μη-Hodgkin λέμφωμα
	2010					Χρόνια λεμφοκυτταρική λευ
HERCEPTIN®	**1998**	Εξανθρωπισμένο	IgG1 - kappa	1N8Z	ERBB2	Μεταστατικός καρκίνος του
	2010					Καρκίνος του στομάχου
CAMPATH®	**2001**	Εξανθρωπισμένο	IgG1 - kappa	1CE1 , 1BEY	CD52	Χρόνια λεμφοκυτταρική λευ
						Πολλαπλή σκλήρυνση

						Απόρριψη μοσχεύματος νεφ
AVASTIN®	**2004**	Εξανθρωπισμένο	IgG1 - kappa	1BJ1	VEGF-A	Καρκίνος του εντέρου
	2006					Καρκίνος του πνεύμονα
	2009					Νεφροκυτταρικό καρκίνωμα
	2011					Γλοιοβλάστωμα
ERBITUX®	**2004**	Χιμαιρικό	IgG1 - kappa	1YY8, 1YY9	EGFR	Καρκίνος εντέρου, θετικός σ
ARZERRA™	**2009**	Ανθρώπινο	IgG1 - kappa	3GIZ	CD20	Χρόνια λεμφοκυτταρική λευ
						Μη-Hodgkin λέμφωμα
						Ρευματοειδής αρθρίτιτδα
PERJETA™	**2012**	Εξανθρωπισμένο	IgG1 - kappa	1L7I, 1S78	ERBB2	Καρκίνος του μαστού
						Καρκίνος του προστάτη

Πίνακας 2).

	ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ	ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΕΓΚΡΙΣΗ FDA	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΤΥΠΟΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ PDB	ΣΤΟΧΟΣ	ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ	ΣΤΑΔΙΟ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ
1	**Rituximab**	RITUXAN®	**1997**	Χιμαιρικό	IgG1 - kappa	2OSL	CD20	Μη-Hodgkin λέμφωμα	
			2010					Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία	
2	**Trastuzumab**	HERCEPTIN®	**1998**	Εξανθρωπισμένο	IgG1 - kappa	1N8Z	ERBB2	Μεταστατικός καρκίνος του μαστού	
			2010					Καρκίνος του στομάχου	
3	**Alemtuzumab**	CAMPATH®	**2001**	Εξανθρωπισμένο	IgG1 - kappa	1CE1 , 1BEY	CD52	Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία	
								Πολλαπλή σκλήρυνση	Στάδιο I/II
								Απόρριψη μοσχεύματος νεφρού	Στάδιο I/II
4	**Bevacizumab**	AVASTIN®	**2004**	Εξανθρωπισμένο	IgG1 - kappa	1BJ1	VEGF-A	Καρκίνος του εντέρου	
			2006					Καρκίνος του πνεύμονα	
			2009					Νεφροκυτταρικό καρκίνωμα	
			2011					Γλοιοβλάστωμα	
5	**Cetuximab**	ERBITUX®	**2004**	Χιμαιρικό	IgG1 - kappa	1YY8, 1YY9	EGFR	Καρκίνος εντέρου, θετικός σε EGFR	
6	**Ofatumumab**	ARZERRA™	**2009**	Ανθρώπινο	IgG1 - kappa	3GIZ	CD20	Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία	
								Μη-Hodgkin λέμφωμα	Στάδιο III
								Ρευματοειδής αρθρίτιτδα	Στάδιο III
7	**Pertuzumab**	PERJETA™	**2012**	Εξανθρωπισμένο	IgG1 - kappa	1L7I, 1S78	ERBB2	Καρκίνος του μαστού	
								Καρκίνος του προστάτη	Στάδιο II

Πίνακας 2 : Σύνολο δεδομένων των μονοκλωνικών αντισωμάτων που μελετήθηκαν στην παρούσα έρευνα (Berman, Westbrook et al. 2000; Chames, Van Regenmortel et al. 2009; Lefranc, Giudicelli et al. 2009; Firer and Gellerman 2012).

Για τα επτά μονοκλωνικά αντισώματα του τελικού συνόλου δεδομένων, συλλέχθηκαν οι τρισδιάστατες δομές τους καθώς και οι αμινοξικές τους ακολουθίες σε μορφή fasta, από την βάση πρωτεϊνικών δομών RCSB PDB (Protein Data Bank) (Berman, Westbrook et al. 2000), καθώς επίσης πληροφορίες συλλέχθηκαν και από τις βάσεις IMGT/mAb-DB (Lefranc, Giudicelli et al. 2009), και DrugBank (Knox, Law et al. 2011). Από τις δομές αυτές, οι τρεις (Πίνακας 3), αφορούν την δομικά αυτοτελή περιοχή του αντισώματος που αναγνωρίζει το αντιγόνο (Fab) και οι υπόλοιπες έξι (Πίνακας 4), περιέχουν το σύμπλοκο του Fab θραύσματος μαζί με τμήμα-πεπτίδιο του αντιγόνου ή κάποιας δομικά αυτοτελούς περιοχής του αντιγόνου. Για τα αντισώματα Cetuximab και Pertuzumab και Trastuzumab υπάρχει δομή και με το Fab θραύσμα αλλά και ως σύμπλοκο με τον υποδοχέα που στοχεύουν.

	ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΚΩΔΙΚΟΣ PDB	ΜΕΘΟΔΟΣ	ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΟΤΗΤΑ	ΑΝΑΦΟΡΑ
1	Cetuximab	1YY8	X-RAY DIFFRACTION	2.00 Å	(Li, Schmitz et al. 2005)
2	Ofatumumab	3GIZ	X-RAY DIFFRACTION	2.20 Å	(Du, Yang et al. 2009)
3	Pertuzumab	1L7I	X-RAY DIFFRACTION	1.80 Å	(Vajdos, Adams et al. 2002)

Πίνακας 3 : Δομές μονοκλωνικών αντισωμάτων του συνόλου δεδομένων με την δομικά αυτοτελή περιοχή Fab. Καταγράφονται στοιχεία όπως ο κωδικός στην βάση πρωτεϊνικών δομών PDB και η διακριτικότητα που λύθηκε η δομή.

	ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΚΩΔΙΚΟΣ PDB	ΜΕΘΟΔΟΣ	ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΟΤΗΤΑ	ΑΝΑΦΟΡΑ
1	Alemtuzumab	1CE1	X-RAY DIFFRACTION	1.90 Å	(James, Hale et al. 1999)
2	Bevacizumab	1BJ1	X-RAY DIFFRACTION	2.00 Å	(Muller, Chen et al. 1998)
3	Cetuximab	1YY9	X-RAY DIFFRACTION	2.00 Å	(Li, Schmitz et al. 2005)
4	Pertuzumab	1S78	X-RAY DIFFRACTION	1.80 Å	(Vajdos, Adams et al. 2002)
5	Rituximab	2OSL	X-RAY DIFFRACTION	2.60 Å	(Du, Wang et al. 2007)
6	Trastuzumab	1N8Z	X-RAY DIFFRACTION	2.52 Å	(Cho, Mason et al. 2003)

Πίνακας 4 : Δομές μονοκλωνικών αντισωμάτων του συνόλου δεδομένων με την δομικά αυτοτελή περιοχή Fab σε σύμπλοκο με το αντιγόνο ή μέρος του αντιγόνου που αλληλεπιδρούν. Καταγράφονται στοιχεία όπως ο κωδικός στην βάση πρωτεϊνικών δομών PDB και η διακριτικότητα που λύθηκε η δομή.

2.3 ΕΥΡΕΣΗ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΠΟΥ ΤΕΙΝΟΥΝ ΝΑ ΠΡΟΚΑΛΕΣΟΥΝ ΣΥΣΣΩΜΑΤΩΣΗ

Για τον εντοπισμό των περιοχών στην αμινοξική ακολουθία των αντισωμάτων με μεγαλύτερη τάση για συσσωμάτωση, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό AMYLPRED2 (Tsolis, Papandreou et al. 2013). Για κάθε ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, έγινε εισαγωγή στο AMYLPRED2 της αμινοξικής ακολουθίας σε μορφή FASTA, της κάθε αλυσίδας ξεχωριστά.

Στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 3 στις ενότητες 3.1 έως 3.7, τα αμινοξικά κατάλοιπα που προβλέπονται περισσότερο επιρρεπή στη συσσωμάτωση επισημάνθηκαν με κόκκινο χρώμα, στην τρισδιάστατη δομή του κάθε αντισώματος. Με αυτήν την αναπαράσταση δόθηκε η δυνατότητα της παρατήρησης του κάθε καταλοίπου σε τρεις διαστάσεις στο χώρο.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές στοιχίσεις των αμινοξικών ακολουθιών των αντισωμάτων. Μία πολλαπλή στοίχιση για τις ελαφριές αλυσίδες των αντισωμάτων, και μία πολλαπλή στοίχιση για τις βαριές αλυσίδες των αντισωμάτων. Οι στοιχίσεις πραγματοποιήθηκαν με το εργαλείο ClustalW (Thompson, Higgins et al. 1994). Για καλύτερη εποπτεία των αποτελεσμάτων, στα αποτελέσματα των στοιχίσεων, ενσωματώθηκαν τα αποτελέσματα του εργαλείου AMYLPRED2.

2.4 ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΜΙΝΟΞΙΚΩΝ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ ΠΟΥ ΘΑ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΘΟΥΝ

Πρώτο κριτήριο για την επιλογή των αμινοξικών καταλοίπων που θα αντικατασταθούν με άλλα κατάλοιπα, ήταν η προσβασιμότητά τους από τον διαλύτη στην τρισδιάστατη δομή. Είναι αναγκαίο, οι πλευρικές τους αλυσίδες να είναι επιφανειακές στην τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης, έτσι ώστε να μην επηρεάσουν την στερεοδιάταξη της πρωτεΐνης. Δεν είναι επιθυμητή η αντικατάσταση αμινοξικών καταλοίπων που δεν είναι επιφανειακά, διότι είναι πολύ πιθανό να επηρεάσουν την τρισδιάστατη δομή λόγω των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ατόμων των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξικών καταλοίπων, και κατά συνέπεια τη σταθερότητα του μορίου.

Για την ικανοποίηση του κριτηρίου αυτού, έγινε εύρεση των επιφανειακών καταλοίπων στην τριασδιάστατη δομή του κάθε μονοκλωνικού αντισώματος με το εργαλείο DSSP (Kabsch and Sander 1983). Στο αρχείο με τα αποτελέσματα του προγράμματος (output file), απομονώθηκε η στήλη με όνομα ACC, η οποία περιέχει έναν αριθμό για το κάθε κατάλοιπο σε Å², ο οποίος αντιπροσωπεύει τα μόρια νερού σε επαφή με το κατάλοιπο πολλαπλασιασμένο με τον αριθμό δέκα (Εικόνα 33). Επομένως, η προσβάσιμη επιφάνεια της πρωτεΐνης στο διαλύτη είναι πλέον γνωστή.

#	RESIDUE	AA	STRUCTURE	BP1	BP2	ACC	N-H-->O	O-->H-N	N-H-->O	O-->H-N	TCO
1	1 A	D		0	0	133	0, 0.0	2,-0.4	0, 0.0	93,-0.1	0.000
2	2 A	I	-	0	0	7	93,-0.4	2,-0.5	91,-0.3	88,-0.1	-0.700
3	3 A	L	-	0	0	116	-2,-0.4	23,-1.9	94,-0.1	2,-0.5	-0.840
4	4 A	L E	-A	25	0A	9	-2,-0.5	2,-0.6	94,-0.4	96,-0.4	-0.924
5	5 A	T E	-A	24	0A	57	19,-3.0	19,-2.8	-2,-0.5	2,-0.4	-0.942
6	6 A	Q E	-A	23	0A	16	-2,-0.6	17,-0.2	17,-0.2	94,-0.1	-0.822
7	7 A	S E	S+A	22	0A	37	15,-2.1	15,-2.5	-2,-0.4	2,-0.1	-0.985
8	8 A	P	-	0	0	52	0, 0.0	3,-0.2	0, 0.0	14,-0.1	0.706
9	9 A	V S	S+	0	0	114	1,-0.3	94,-2.3	93,-0.2	2,-0.4	0.901
10	10 A	I E	S-d	103	0B	89	92,-0.2	2,-0.6	2,-0.0	-1,-0.3	-0.992
11	11 A	L E	-d	104	0B	31	92,-3.0	94,-3.2	-2,-0.4	2,-0.5	-0.930
12	12 A	S E	+d	105	0B	44	-2,-0.6	2,-0.3	92,-0.2	94,-0.2	-0.883
13	13 A	V E	-d	106	0B	11	92,-2.6	94,-3.4	-2,-0.5	6,-0.1	-0.936
14	14 A	S >	-	0	0	38	-2,-0.3	3,-1.9	92,-0.2	64,-0.3	-0.802
15	15 A	P T 3	S+	0	0	83	0, 0.0	64,-0.2	0, 0.0	3,-0.1	-0.167
16	16 A	G T 3	S+	0	0	46	62,-2.6	61,-0.4	1,-0.3	63,-0.1	0.017
17	17 A	E <	-	0	0	93	-3,-1.9	61,-2.6	60,-0.2	2,-0.4	-0.233
18	18 A	R	-	0	0	83	59,-0.2	2,-0.3	58,-0.2	58,-0.2	-0.802
19	19 A	V E	- B	0	75A	8	56,-2.8	56,-2.5	-2,-0.4	2,-0.4	-0.930
20	20 A	S E	- B	0	74A	65	-2,-0.3	2,-0.4	54,-0.2	54,-0.2	-0.990

Εικόνα 33 : Παρουσίαση τμήματος του αρχείου αποτελεσμάτων του λογισμικού DSSP. Ο αριθμός της στήλης ACC (με κόκκινη έλλειψη), παρουσιάζει για το κάθε κατάλοιπο τα μόρια νερού που έρχεται σε επαφή, πολλαπλασιασμένος με τον αριθμό δέκα (10).

Στη συνέχεια διασταυρώνοντας τα αποτελέσματα των δύο εργαλείων (AMYLPRED2 και DSSP), επιλέγονται να αντικατασταθούν αμινοξικά κατάλοιπα που ανήκουν σε περιοχές - πεπτίδια που έχουν προβλεφθεί από το AMYLPRED2 ότι έχουν την τάση να προκαλέσουν συσσωματώματα, και ταυτόχρονα, μέσω του DSSP διαπιστώνεται ότι είναι και επιφανειακά στην τρισδιάστατη δομή του μορίου. Κατάλοιπα τα οποία είναι «θαμμένα» δεν επιλέγονται να αντικατασταθούν γιατί είναι πολύ πιθανό το γεγονός ότι θα επιφέρουν αλλαγές στη στερεοδιάταξη της πρωτεΐνης.

Δεύτερο κριτήριο επιλογής των αμινοξικών καταλοίπων που θα αντικατασταθούν με άλλα κατάλοιπα ήταν να μην βρίσκονται στις υπερμεταβλητές περιοχές των αντισωμάτων (CDRs). Τα κατάλοιπα των CDRs είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση και την αλληλεπίδραση με το αντιγόνο-στοχο, συνεπώς, οποιαδήποτε αλλαγή σ' αυτά τα κατάλοιπα μπορεί να έχει δραματικές ή ακόμα και καταστροφικές συνέπειες στη λειτουργικότητα του αντισώματος.

Ένα ακόμα κριτήριο επιλογής αμινοξικών καταλοίπων που θα αντικατασταθούν από άλλα, ήταν η κλίμακα τάσης των αμινοξέων για πρόκληση συσσωμάτωσης, του Salvador Ventura (Sanchez de Groot, Pallares et al. 2005). Σύμφωνα με την κλίμακα αυτή (Πίνακας 5), τα αμινοξέα που παρουσιάζουν μεγαλύτερη τάση για συσσωμάτωση έχουν θετικές τιμές, ενώ αυτά που δεν ευνοούν τη συσσωμάτωση έχουν αρνητικές τιμές. Όσο πιο μεγάλες είναι οι θετικές τιμές τόσο μεγαλύτερη η τάση, και αντίστοιχα για τις αρνητικές τιμές. Η κλίμακα αυτή, έχει προκύψει από μελέτη πεπτιδίων, που πειραματικά έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν συσσωματώματα. Παρατηρείται από την κλίμακα, ότι υδρόφοβα κατάλοιπα ευνοούν τη συσσωμάτωση, ενώ τα πολικά κατάλοιπα ενισχύουν τη διαλυτότητα του μορίου, καταλήγοντας έτσι στο συμπέρασμα ότι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ίσως να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη δημιουργία συσσωματωμάτων.

Επομένως επιλέχθηκε, αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία μαζί με τα προηγούμενα κριτήρια ήταν σχετικά ψηλά στην κλίμακα του Salvador Ventura, να αντικατασταθούν από αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία ήταν σχετικά χαμηλά στην κλίμακα αυτή.

ΑΜΙΝΟΞΕΑ	ΚΛΙΜΑΚΑ ΤΑΣΗΣ ΣΥΣΣΩΜΑΤΩΣΗΣ
I	1.822
F	1.754
V	1.594
L	1.380
Y	1.159
W	1.037
M	0.910
C	0.604
A	-0.036
T	-0.159
S	-0.294
P	-0.334
G	-0.535
K	-0.931
H	-1.033
Q	-1.231
R	-1.240
N	-1.302
E	-1.412
D	-1.836

Πίνακας 5 : Κλίμακα τάσης των είκοσι (20) αμινοξέων για πρόκληση συσσωμάτωσης, του Salvador Ventura. τα αμινοξέα που παρουσιάζουν μεγαλύτερη τάση για συσσωμάτωση έχουν θετικές τιμές, ενώ αυτά που δεν ευνοούν τη συσσωμάτωση έχουν αρνητικές τιμές. Όσο πιο μεγάλες είναι οι θετικές τιμές τόσο μεγαλύτερη η τάση, και αντίστοιχα για τις αρνητικές τιμές (Du, Wang et al. 2007).

2.5 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΝΕΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΩΝ ΔΟΜΩΝ

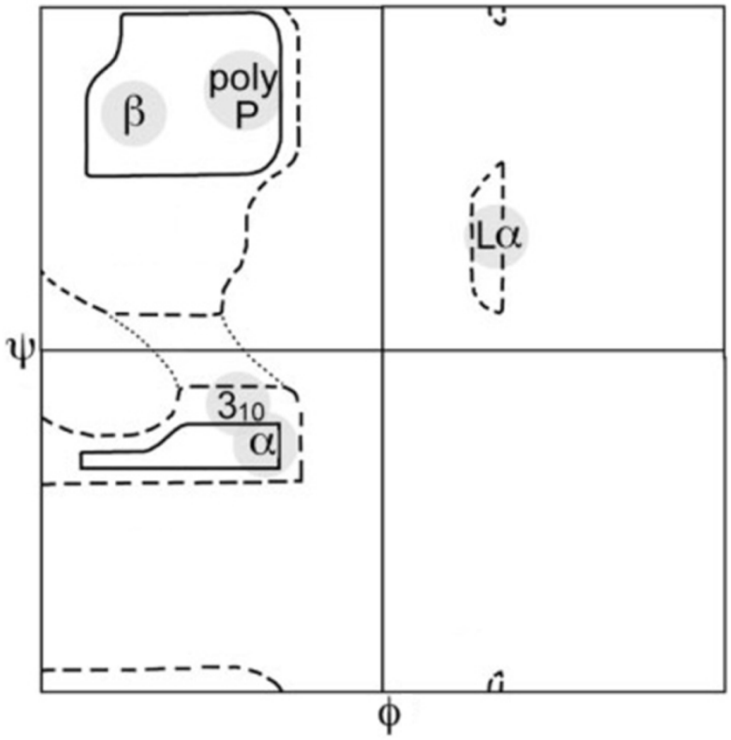
Η διαδικασία της επιλογής των αμινοξικών καταλοίπων που θα αντικαταστήσουν τα αρχικά κατάλοιπα, που είχαν επιλεγεί με τα κριτήρια που περιγράφηκαν στην Ενότητα 2.4, ήταν ιδιαίτερα επίπονη και χρονοβόρα, καθώς για κάθε ένα κατάλοιπο του συνόλου, σε κάθε μονοκλωνικό αντίσωμα, δοκιμάστηκαν όλες οι δυνατές αντικαταστάσεις. Μετά από κάθε αντικατάσταση ακολουθούσε έλεγχος με το εργαλείο AMYLPRED2 (Tsolis, Papandreou et al. 2013). Για ένα κατάλοιπο που δύο διαφορετικές αντικαταστάσεις με άλλο κατάλοιπο έδιναν το ίδιο αποτέλεσμα, επιλέχθηκε εκείνο που είχε παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με το αρχικό. Δημιουργήθηκαν στη συνέχεια νέα αρχεία μορφής fasta που περιέχουν την αμινοξική ακολουθία των μονοκλωνικών αντισωμάτων, έχοντας ενσωματώσει τις αντικαταστάσεις με τα νέα αμινοξικά κατάλοιπα.

Το επόμενο βήμα πλέον, και έχοντας τις νέες αμινοξικές ακολουθίες, είναι η δημιουργία των τρισδιάστατων δομών τους. Οι τρισδιάστατες δομές των μονοκλωνικών αντισωμάτων με τη νέα αμινοξική ακολουθία, έγιναν με ομόλογη προτυποποίηση με το εργαλείο Modeller9v11 (Sali and Blundell 1993). Η απαιτούμενη είσοδος του εργαλείου, είναι μία δομή από την βάση PDB που θα χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο ή αλλιώς δομή-οδηγός, πάνω στην οποία θα «χτιστεί» το νέο μοντέλο, και μία στοίχιση. Η στοίχιση πρέπει να έχει το φορμάτ PIR και να αποτελείται από την αμινοξική ακολουθία της υπάρχουσας δομής που θα χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο, και την νέα αμινοξική ακολουθία με τις αντικαταστάσεις των καταλοίπων που πραγματοποιήθηκαν. Για τις στοιχίσεις χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο ClustalW (Thompson, Higgins et al. 1994).

Τέλος, έγιναν επιπλέον παραμετροποιήσεις στα αρχεία εισόδου του εργαλείου Modeller9v11, έτσι ώστε να συμπεριλαμβάνονται στα νέα μοντέλα και οι δύο αλυσίδες (βαριά και ελαφριά αλυσίδα), διότι το εργαλείο Modeller9v11 με τις αρχικές παραμέτρους δημιουργεί μοντέλα με μία αλυσίδα.

2.6 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ

Για τα νέα μοντέλα που δημιουργήθηκαν, έγιναν αυστηροί έλεγχοι σχετικά με την ορθότητα και την αξιοπιστία της τρισδιάστατης δομής τους. Με τη βοήθεια του προγράμματος PROCHECK (Laskowski, Moss et al. 1993), έγινε έλεγχος για πιθανές μη επιτρεπτές θέσεις (γωνιές φ και ψ), στο Ramachandran Plot (Ramachandran, Ramakrishnan et al. 1963), των αμινοξικών καταλοίπων για κάθε μοντέλο (Εικόνα 34).



Εικόνα 34 : Ramachandran Plot.

Ως είσοδος στο λογισμικό PROCKECK δίνεται η τρισδιάστατη δομή του νέου μοντέλου της πρωτεΐνης σε αρχείο τύπου .pdb. Μετά από μία σειρά υπολογισμών, δίνονται ως αποτέλεσμα, αναλυτικά αρχεία για το κάθε κατάλοιπο της πρωτεΐνης αλλά και για την πρωτεΐνη συνολικά. Οι θέσεις χωρίζονται στις κατηγορίες των επιθυμητών θέσεων, των θέσεων που επιτρέπονται, των λιγότερο επιτρεπτών θέσεων και των θέσεων που είναι απαγορευμένες.

Για τον έλεγχο της ποιότητας των μοντέλων που δημιουργήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο WHAT_CHECK του λογισμικού WHAT IF (Vriend 1990). Ένα από τα στοιχεία των αποτελεσμάτων του εργαλείου που κρίνουν την ποιότητα

του μοντέλου που δόθηκε ως είσοδος, είναι ο έλεγχος για πιθανές συγκρούσεις μεταξύ των ατόμων των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξικών καταλοίπων.

Επειδή παρατηρήθηκαν αρκετές συγκρούσεις μεταξύ των ατόμων στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξικών καταλοίπων, ακολούθησε βελτιστοποίηση των νέων μοντέλων με το εργαλείο Minimize Structure, ακολουθώντας την πορεία Structure -> Minimize Structure, του προγράμματος USCF Chimera 1.6.2 (Pettersen, Goddard et al. 2004). Η λειτουργία Minimize Structure ελαχιστοποιεί την ενέργεια των μοριακών μοντέλων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε όλα τα μονοκλωνικά αντισώματα του συνόλου δεδομένων, ακολουθήθηκε η πορεία που παρουσιάστηκε στο Κεφάλαιο 2, όπου περιγράφηκε αναλυτικά η μεθοδολογία της παρούσας έρευνας. Παρακάτω αναπαριστώνται συγκεντρωμένα όλα τα αποτελέσματα για κάθε βήμα της μεθοδολογίας.

Για κάθε μονοκλωνικό αντίσωμα, δίνεται η ακολουθία της ελαφριάς και της βαριάς αλυσίδας με τον κώδικα του ενός γράμματος με κενό ανά δέκα κατάλοιπα και κάθε σειρά χωρίζεται ανά εξηντάδες. Ακριβώς από κάτω από την κάθε σειρά της αμινοξικής ακολουθίας υπάρχουν τα αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2 και ακολουθούν τα αποτελέσματα του εργαλείου DSSP.

Τα αμινοξικά κατάλοιπα στη σειρά με όνομα AMYLRPED2 που έχουν το σύμβολο της δίεσης (#) είναι αυτά που προβλέπει ο αλγόριθμος ότι έχουν μεγαλύτερη τάση να προκαλέσουν συσσωμάτωση. Τα πεπτίδια που προβλέπονται ως περισσότερο επιρρεπή στη συσσωμάτωση επισημάνθηκαν με κόκκινο χρώμα, στην τρισδιάστατη δομή του κάθε αντισώματος. Με αυτήν την αναπαράσταση δόθηκε η δυνατότητα της παρατήρησης του κάθε πεπτιδίου σε τρεις διαστάσεις στο χώρο.

Κάτω από τα αποτελέσματα του AMYLPRED2 (Tsolis, Papandreou et al. 2013), ενσωματώθηκαν τα αποτελέσματα του προγράμματος DSSP με έναν αστερίσκο (*), μόνο για τα κατάλοιπα που προέβλεψε το AMYLPRED2 ότι συμμετέχουν σε πεπτίδια με τάση για συσσωμάτωση. Ως κάτω όριο για να θεωρηθεί ένα κατάλοιπο εκτεθειμένο επιλέχθηκε να έρχεται σε επαφή με δύο μόρια νερού.

Με την ονομασία ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ, κάτω από τα αποτελέσματα του λογισμικού DSSP, καταγράφηκαν όλες οι αντικαταστάσεις που τελικά επικράτησαν. Το αμινοξικό κατάλοιπο που επιλέχθηκε να αντικαταστήσει κάποιο άλλο, βρίσκεται ακριβώς από κάτω από αυτό που πήρε τη θέση του στην αμινοξική ακολουθία.

Σχετικά με τον κώδικα των χρωμάτων, σε όλες τις τρισδιάστατες δομές των αντισωμάτων, παρουσιάζονται με γκρι χρώμα τα κατάλοιπα της ελαφριάς αλυσίδας του αντισώματος και με μπλε σκούρο τα κατάλοιπα της βαριάς αλυσίδας του

αντισώματος. Με κίτρινο επισημαίνονται οι υπερμεταβλητές περιοχές (CDRs), οι οποίες ονομάστηκαν L1, L2 και L3 για την ελαφριά αλυσίδα και H1, H2 και H3 για τη βαριά αλυσίδα του αντισώματος από την αγγλική ονομασία light για την ελαφριά αλυσίδα και heavy για την βαριά αλυσίδα αντίστοιχα. Με κόκκινο χρώμα αναπαριστώνται τα κατάλοιπα που προέβλεψε το εργαλείο AMYLPRED2 ότι έχουν μεγαλύτερη τάση να προκαλέσουν συσσωματώματα. Τέλος, με γαλάζιο χρώμα αναπαριστώνται οι περιοχές των CDRs που συμπίπτουν με τα αποτελέσματα του AMYLPRED2.

Όλα τα αποτελέσματα κάθε βήματος, καθώς και οι τελικές αντικαταστάσεις των αμινοξικών καταλοίπων με τις συνέπειες που επιφέρουν στα αντισώματα αναπαραστάθηκαν στις τρισδιάστατες δομές τους με την βοήθεια του εργαλείου USCF Chimera 1.6.2. με χωροπληρωτικά μοντέλα και μοντέλα cartoon. Με 'N' απεικονίζεται το αμινοτελικό άκρο της κάθε αλυσίδας και με 'C' το καρβοξυτελικό άκρο της αλυσίδας. Ακολουθείται ο ίδιος κώδικας χρωμάτων όπως περιγράφηκε παραπάνω. Στην παράθεση των αποτελεσμάτων στις παρακάτω ενότητες (3.1 – 3.7) ακολουθείται αλφαβητική σειρά στο σύνολο των μονοκλωνικών αντισωμάτων.

3.1 ALEMTUZUMAB

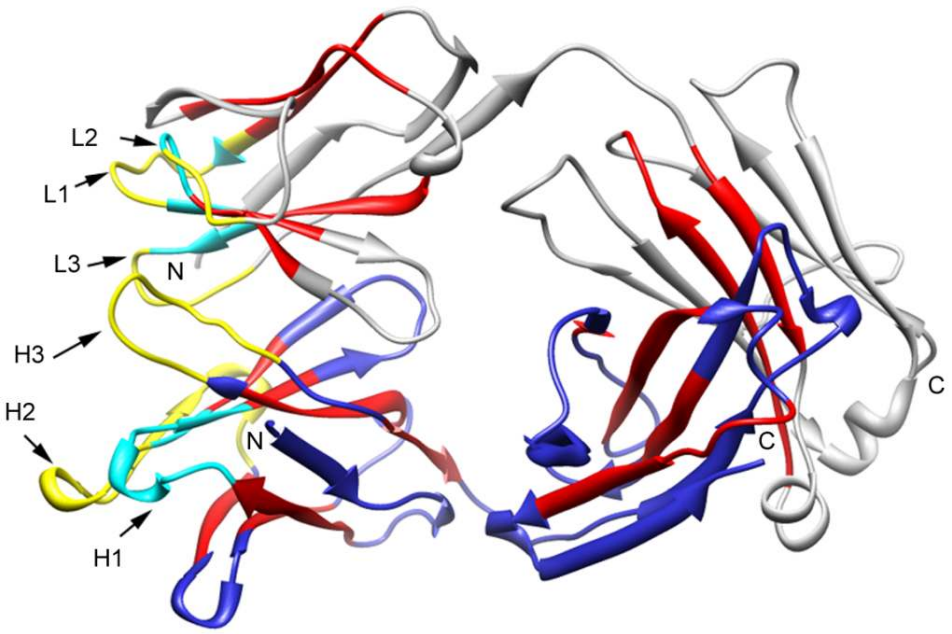
Ελαφριά αλυσίδα

```
                                10         20         30         40         50         60
Alemtuzumab      DIQMTQSPSS  LSASVGDRVT  ITCKASQNID  KYLNWYQQKP  GKAPKLLIYN  TNNLQTGVPS
Amylpred2                           ###  ### #         ####          #####  ##
DSSP                                * *   *                            *    *
ANTIKATASTASEIS                       D                                K

                                70         80         90        100        110        120
Alemtuzumab      RFSGSGSGTD  FTFTISSLQP  EDIATYYCLQ  HISRPRTFGQ  GTKVEIKRTV  AAPSVFIFPP
Amylpred2                #  ########    ########  #                        ######
DSSP                     *   *   **        *                                *
ANTIKATASTASEIS                   D                                          D

                               130        140        150        160        170        180
Alemtuzumab      SDEQLKSGTA  SVVCLLNNFY  PREAKVQWKV  DNALQSGNSQ  ESVTEQDSKD  STYSLSSTLT
Amylpred2                ##  ##########
DSSP                     *          * *
ANTIKATASTASEIS          D

                               190        200        210
Alemtuzumab      LSKADYEKHK  VYACEVTHQG  LSSPVTKSFN  R
Amylpred2
DSSP
ANTIKATASTASEIS
```

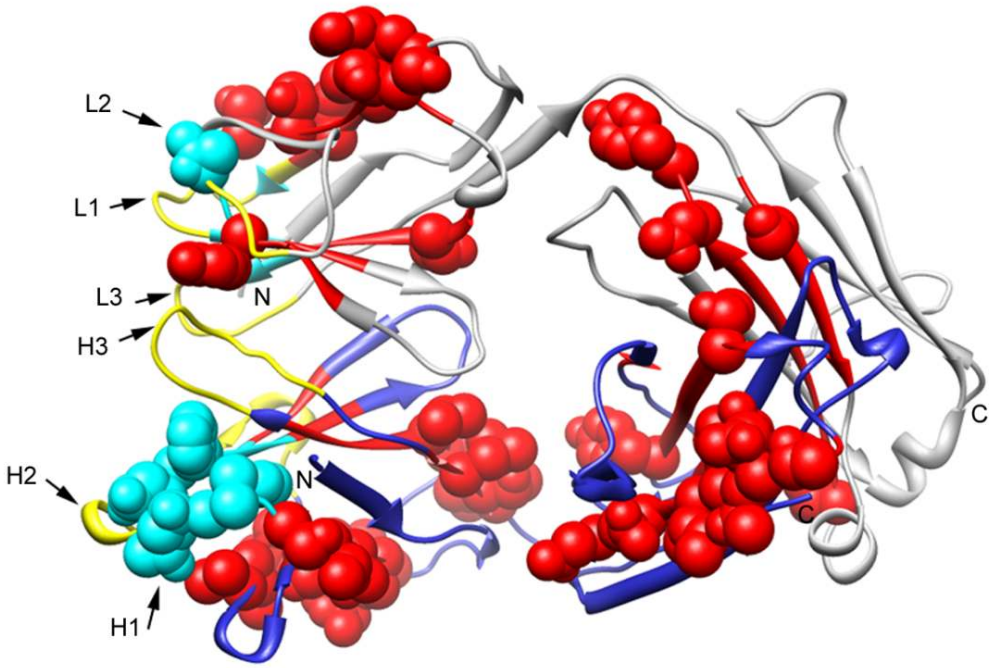
Βαριά αλυσίδα

```
                                10         20         30         40         50         60
Alemtuzumab      QVQLQESGPG  LVRPSQTLSL  TCTVSGFTFT  DFYMNWVRQP  PGRGLEWIGF  IRDKAKGYTT
Amylpred2                          ####  ##########  #######          ####  #
DSSP                               * *   * * **** *  **
ANTIKATASTASEIS

                                70         80         90        100        110        120
Alemtuzumab      EYNPSVKGRV  TMLVDTSKNQ  FSLRLSSVTA  ADTAVYYCAR  EGHTAAPFDY  WGQGSLVTVS
Amylpred2                #  ####        ######        #######                 ######
DSSP                        * **         * * *        * *                       * **
ANTIKATASTASEIS             N              D          S D                        S

                               130        140        150        160        170        180
Alemtuzumab      SASTKGPSVF  PLAPSSKSTS  GGTAALGCLV  KDYFPEPVTV  SWNSGALTSG  VHTFPAVLQS
Amylpred2                                      ####  #                          ##
DSSP
ANTIKATASTASEIS

                               190        200        210        220
Alemtuzumab      SGLYSLSSVV  TVPSSSLGTQ  TYICNVNHKP  SNTKVDKKVE
Amylpred2           #######  ##      ###  #######
DSSP                *        *      ***  *** * *
ANTIKATASTASEIS     K        S           S T
```

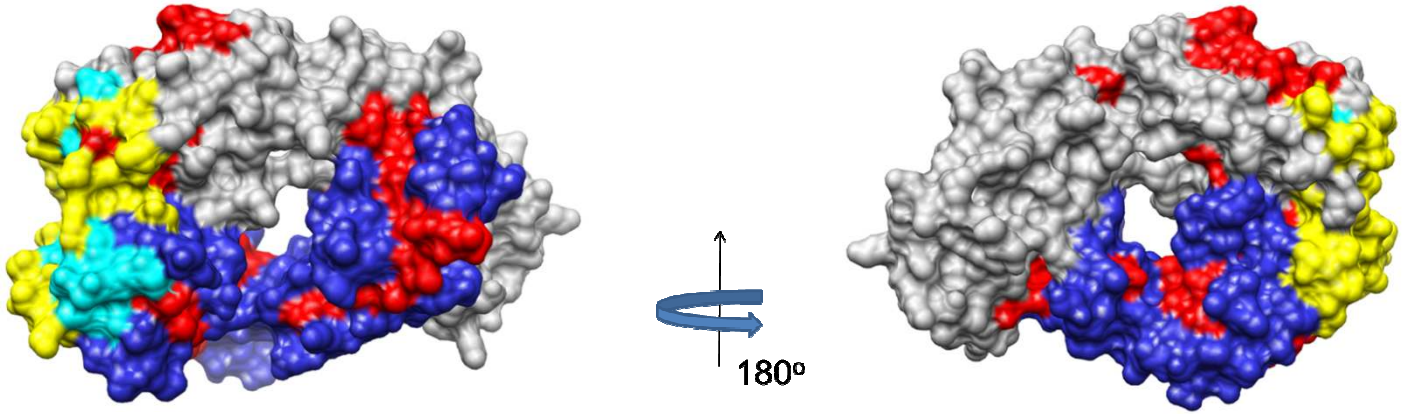
Τα παραπάνω αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2, απεικονίζονται, με τον ίδιο χρωματικό κώδικα, στην τρισδιάστατη δομή του αντισώματος Alemtuzumab, με κωδικό PDB : 1CE1 (Εικόνα 35). Στην Εικόνα 35 προστίθενται τα αποτελέσματα του λογισμικού DSSP, τα οποία αναπαριστώνται στη δομή με σφαίρες (Εικόνα 36). Στην Εικόνα 37 απεικονίζεται η δομή, με χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις, και στην Εικόνα 38, η ίδια δομή με τις αντικαταστάσεις των αμινοξικών καταλοίπων και τα νέα αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2.



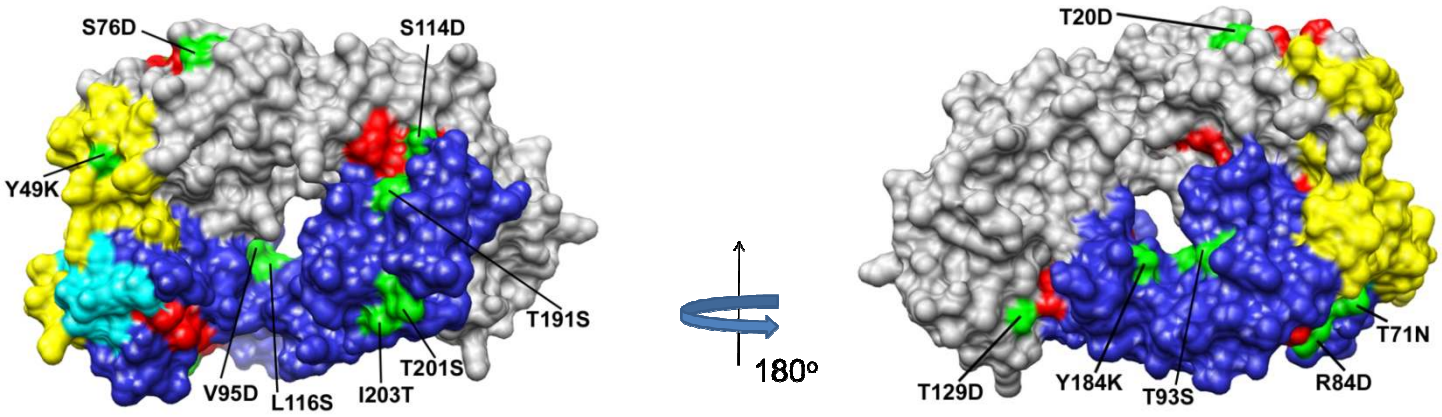
Εικόνα 35 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Alemtuzumab. Με κόκκινο χρώμα στην ελαφριά και βαριά αλυσίδα τα αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2. Απεικόνιση των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs) με κίτρινο χρώμα, καθώς επίσης αναφέρονται και οι ονομασίες της κάθε θηλιάς (loop) ξεχωριστά σύμφωνα με την αλυσίδα που βρίσκονται και τη σειρά που απαντώνται στην πρωτοταγή δομή. Ακόμα, με γαλάζιο χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα που δώθηκαν ως αποτέλεσμα του AMYLPRED2 και είναι και κατάλοιπα των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs).



Εικόνα 36 : Στην Εικόνα 35, ενσωματώθηκαν τα αποτελέσματα του λογισμικού DSSP. Με κόκκινες σφαίρες απεικονίζονται τα επιφανειακά κατάλοιπα των περιοχών που έχουν μεγαλύτερη τάση για συσσωμάτωση, σύμφωνα με το λογισμικό AMYLPRED2, ομοίως με γαλάζιες σφαίρες τα κατάλοιπα που έχουν τις ιδιότητες που αναφέρθηκαν και επιπλέον είναι κατάλοιπα των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs). Τα επιφανειακά κατάλοιπα που απεικονίζονται ως σφαίρες (εκτός από τα κατάλοιπα (γαλάζιες σφαίρες) που είναι στα CDRs), αποτελούν το σύνολο των καταλοίπων που είναι εφικτό στη συνέχεια να αντικαταστασθούν από άλλα κατάλοιπα.



Εικόνα 37 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Alemtuzumab σε χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις. Ισχύει ο κώδικας χρωμάτων που έχει ήδη περιγραφεί.



Εικόνα 38 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Alemtuzumab σε χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις. Με ανοιχτό πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα που αντικαταστάθηκαν, καθώς επίσης αναφέρεται και σε ποια θέση στην αμινοξική ακολουθία βρίσκονται και με ποια κατάλοιπα αντικαταστάθηκαν. Ακόμα, αιφαιρέθηκε το κόκκινο χρώμα από τα κατάλοιπα που πλέον δεν προβλέπονται από το εργαλείο AMYLPRED2 να έχουν τάση για συσσωμάτωση μετά τις αντικαταστάσεις που έγιναν.

3.2 BEVACIZUMAB

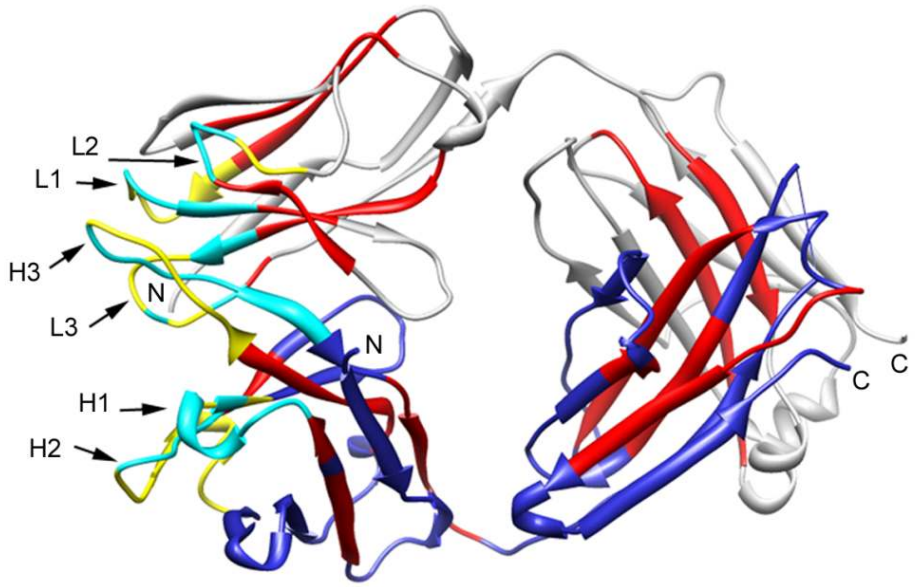
Ελαφριά αλυσίδα

```
                                10        20        30        40        50        60
Bevacizumab      DIQMTQSPSS  LSASVGDRVT  ITCSASQDIS  NYLNWYQQKP  GKAPKVLIYF  TSSLHSGVPS
Amylpred2                           ###  ###         ######          ######  ###
DSSP                                * *   *          **              *   **   **
ANTIKATASTASEIS                       D                                  S

                                70        80        90       100       110       120
Bevacizumab      RFSGSGSGTD  FTLTISSLQP  EDFATYYCQQ  YSTVPWTFGQ  GTKVEIKRTV  AAPSVFIFPP
Amylpred2                   #######       ########     #   ##                 ######
DSSP                         * * **         *                                 * **
ANTIKATASTASEIS              D   K          D                                   N

                               130       140       150       160       170       180
Bevacizumab      SDEQLKSGTA  SVVCLLNNFY  PREAKVQWKV  DNALQSGNSQ  ESVTEQDSKD  STYSLSSTLT
Amylpred2                ##  ##########
DSSP                     *          * *
ANTIKATASTASEIS          D

                      190       200       210   214
Bevacizumab      LSKADYEKHK  VYACEVTHQG  LSSPVTKSFN  RGEC
Amylpred2
DSSP
ANTIKATASTASEIS
```

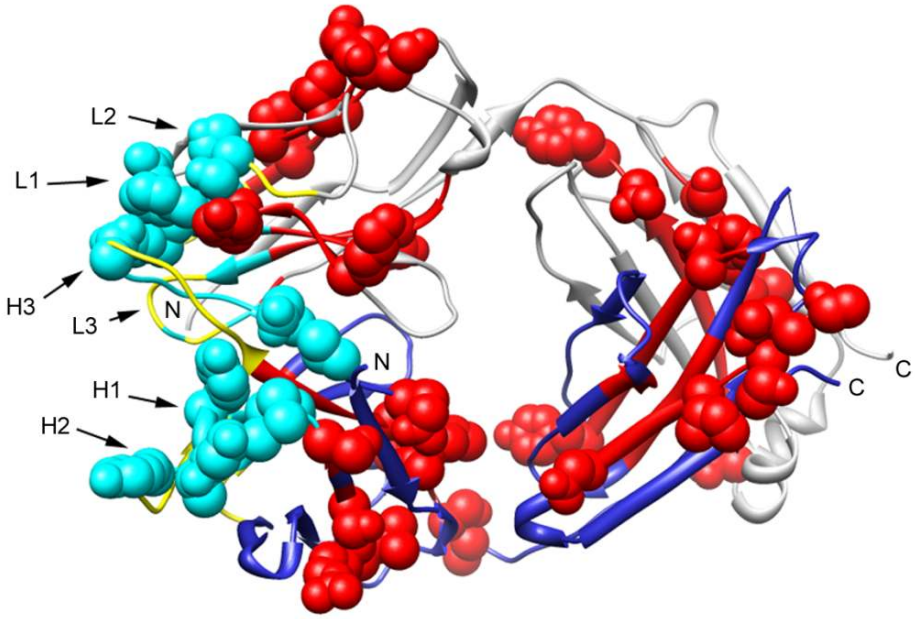
Βαριά αλυσίδα

```
                                10        20        30        40        50        60
Bevacizumab      EVQLVESGGG  LVQPGGSLRL  SCAASGYTFT  NYGMNWVRQA  PGKGLEWVGW  INTYTGEPTY
Amylpred2                           ###  ##  #######  ##  #           ####  ####
DSSP                                **   *   **** *   *                    *
ANTIKATASTASEIS                       D       D

                                70        80        90       100       110       120
Bevacizumab      AADFKRRFTF  SLDTSKSTAY  LQMNSLRAED  TAVYYCAKYP  HYYGSSHWYF  DVWGQGTLVT
Amylpred2                                            ########     ######  ##  ######
DSSP                                                 * *          *       **  * **
ANTIKATASTASEIS                                        A                       N  S

                               130       140       150       160       170       180
Bevacizumab      VSSASTKGPS  VFPLAPSSKS  TSGGTAALGC  LVKDYFPEPV  TVSWNSGALT  SGVHTFPAVL
Amylpred2        ###                              ##  ###           ###
DSSP              **
ANTIKATASTASEIS

                               190       200       210       220       230  231
Bevacizumab      QSSGLYSLSS  VVTVPSSSLG  TQTYICNVNH  KPSNTKVDKK  VEPKSCDKTH  T
Amylpred2            #####  ####      #  #########
DSSP                 *        *       *  *** *   *
ANTIKATASTASEIS      K        S          S T
```

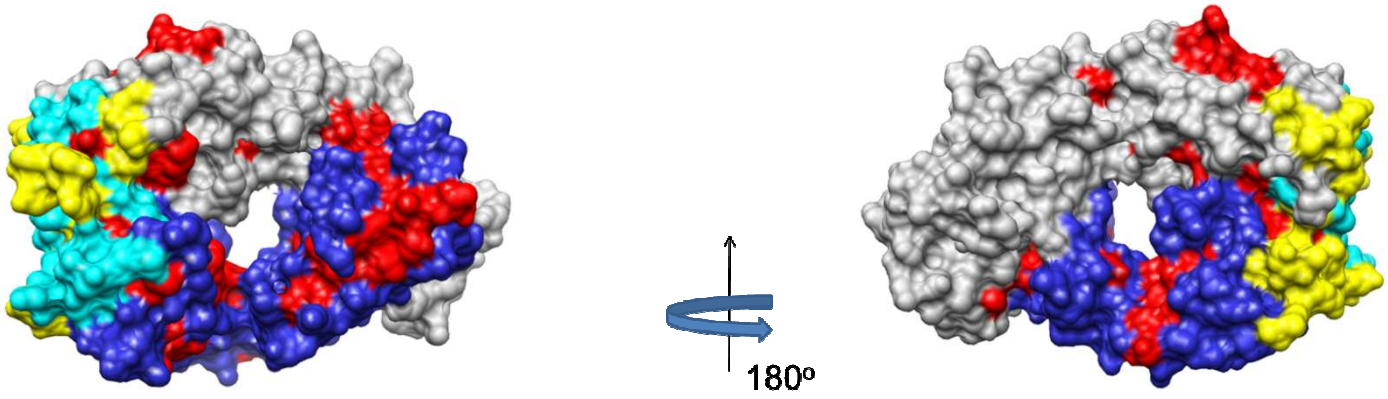
Τα παραπάνω αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2, απεικονίζονται, με τον ίδιο χρωματικό κώδικα, στην τρισδιάστατη δομή του αντισώματος Bevacizumab, με κωδικό PDB : 1BJ1 (Εικόνα 39). Στην Εικόνα 39 προστίθενται τα αποτελέσματα του λογισμικού DSSP, τα οποία αναπαριστώνται στη δομή με σφαίρες (Εικόνα 40). Στην Εικόνα 41 απεικονίζεται η δομή, με χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις, και στην Εικόνα 42, η ίδια δομή με τις αντικαταστάσεις των αμινοξικών καταλοίπων και τα νέα αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2.



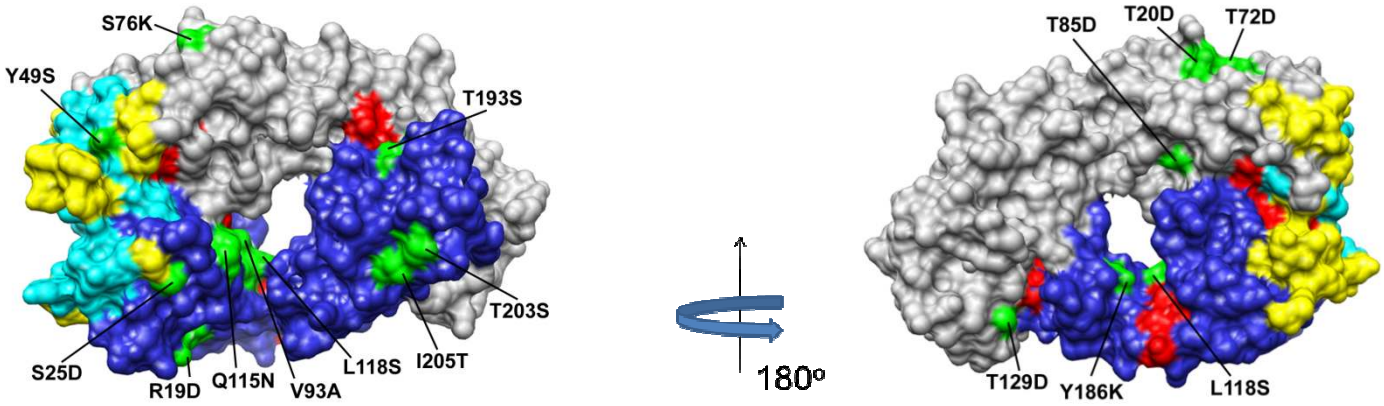
Εικόνα 39 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Bevacizumab. Με κόκκινο χρώμα στην ελαφριά και βαριά αλυσίδα τα αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2. Απεικόνιση των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs) με κίτρινο χρώμα, καθώς επίσης αναφέρονται και οι ονομασίες της κάθε θηλιάς (loop) ξεχωριστά σύμφωνα με την αλυσίδα που βρίσκονται και τη σειρά που απαντώνται στην πρωτοταγή δομή. Ακόμα, με γαλάζιο χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα που δώθηκαν ως αποτέλεσμα του AMYLPRED2 και είναι και κατάλοιπα των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs).



Εικόνα 40 : Στην Εικόνα 39, ενσωματώθηκαν τα αποτελέσματα του λογισμικού DSSP. Με κόκκινες σφαίρες απεικονίζονται τα επιφανειακά κατάλοιπα των περιοχών που έχουν μεγαλύτερη τάση για συσσωμάτωση, σύμφωνα με το λογισμικό AMYLPRED2, ομοίως με γαλάζιες σφαίρες τα κατάλοιπα που έχουν τις ιδιότητες που αναφέρθηκαν και επιπλέον είναι κατάλοιπα των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs). Τα επιφανειακά κατάλοιπα που απεικονίζονται ως σφαίρες (εκτός από τα κατάλοιπα (γαλάζιες σφαίρες) που είναι στα CDRs), αποτελούν το σύνολο των καταλοίπων που είναι εφικτό στη συνέχεια να αντικαταστασθούν από άλλα κατάλοιπα.



Εικόνα 41 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Bevacizumab σε χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις. Ισχύει ο κώδικας χρωμάτων που έχει ήδη περιγραφεί.



Εικόνα 42 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Bevacizumab σε χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις. Με ανοιχτό πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα που αντικαταστάθηκαν, καθώς επίσης αναφέρεται και σε ποια θέση στην αμινοξική ακολουθία βρίσκονται και σε με ποια κατάλοιπα αντικαταστάθηκαν. Ακόμα, αιφαιρέθηκε το κόκκινο χρώμα από τα κατάλοιπα που πλέον δεν προβλέπονται από το εργαλείο Amylpred2 να έχουν τάση για συσσωμάτωση μετά τις αντικαταστάσεις που έγιναν.

3.3 CETUXIMAB

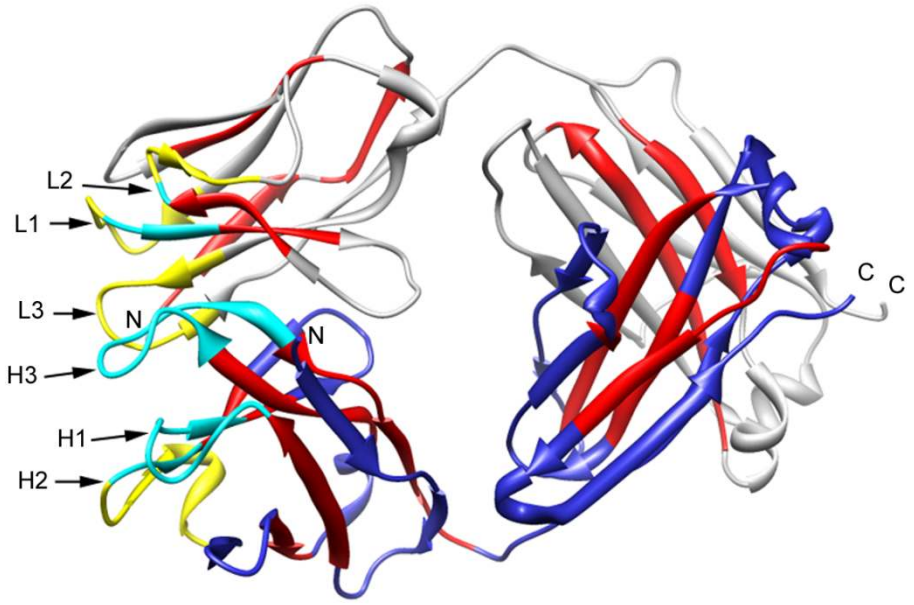
Ελαφριά αλυσίδα

```
                          10         20         30         40         50         60
Cetuximab        DILLTQSPVI  LSVSPGERVS  FSCRASQSIG  TNIHWYQQRT  NGSPRLLIKY  ASESISGIPS
Amylpred2         ###### ##  ###                     ######          #####
DSSP               * * * **  **                      *                  **
ANTIKATASTASEIS      S    S

                          70         80         90        100        110        120
Cetuximab        RFSGSGSGTD  FTLSINSVES  EDIADYYCQQ  NNNWPTTFGA  GTKLELKRTV  AAPSVFIFPP
Amylpred2                    ######                                          ######
DSSP                          * * *                                           *
ANTIKATASTASEIS               D                                               D

                         130        140        150        160        170        180
Cetuximab        SDEQLKSGTA  SVVCLLNNFY  PREAKVQWKV  DNALQSGNSQ  ESVTEQDSKD  STYSLSSTLT
Amylpred2                ##  ##########
DSSP                     *          * *
ANTIKATASTASEIS          D            K

                         190        200        210  213
Cetuximab        LSKADYEKHK  VYACEVTHQG  LSSPVTKSFN  RGA
Amylpred2
DSSP
ANTIKATASTASEIS
```

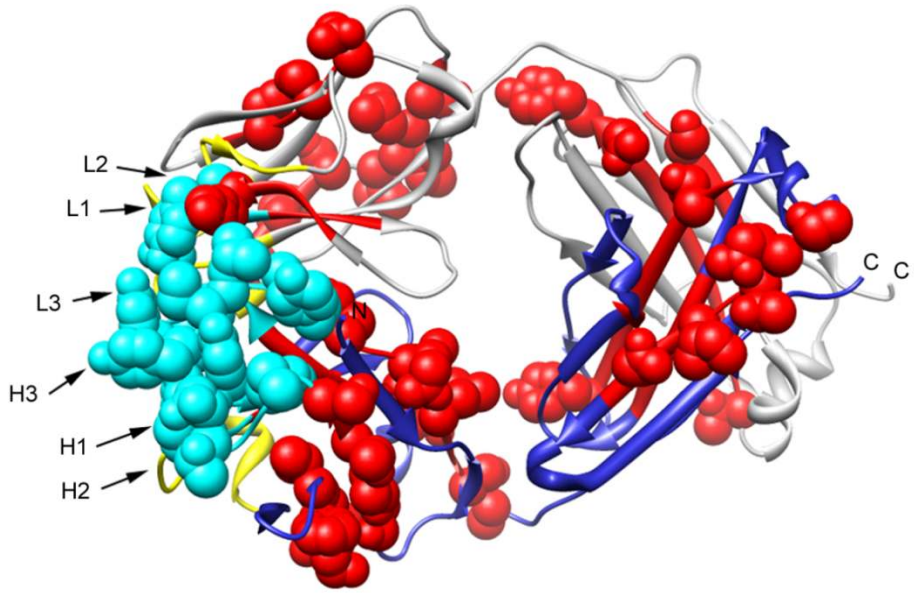
Βαριά αλυσίδα

```
                          10         20         30         40         50         60
Cetuximab        QVQLKQSGPG  LVQPSQSLSI  TCTVSGFSLT  NYGVHWVRQS  PGKGLEWLGV  IWSGGNTDYN
Amylpred2                       ###  ##########  #######          ####  ###
DSSP                             *   * * ***  *  **                      **
ANTIKATASTASEIS                  D   S S

                          70         80         90        100        110        120
Cetuximab        TPFTSRLSIN  KDNSKSQVFF  KMNSLQSNDT  AIYYCARALT  YYDYEFAYWG  QGTLVTVSAA
Amylpred2                       ###  ###       #  ##########  ##########  #########
DSSP                            **   * *       *   *      **  ** *  ***   *  *   **
ANTIKATASTASEIS                 S                   D                          D

                         130        140        150        160        170        180
Cetuximab        STKGPSVFPL  APSSKSTSGG  TAALGCLVKD  YFPEPVTVSW  NSGALTSGVH  TFPAVLQSSG
Amylpred2                                     #####            #  #
DSSP
ANTIKATASTASEIS

                         190        200        210        220  221
Cetuximab        LYSLSSVVTV  PSSSLGTQTY  ICNVNHKPSN  TKVDKRVEPK  S
Amylpred2         #########       #####  ####
DSSP              *      *       ****   * *
ANTIKATASTASEIS   K      S          S   T
```

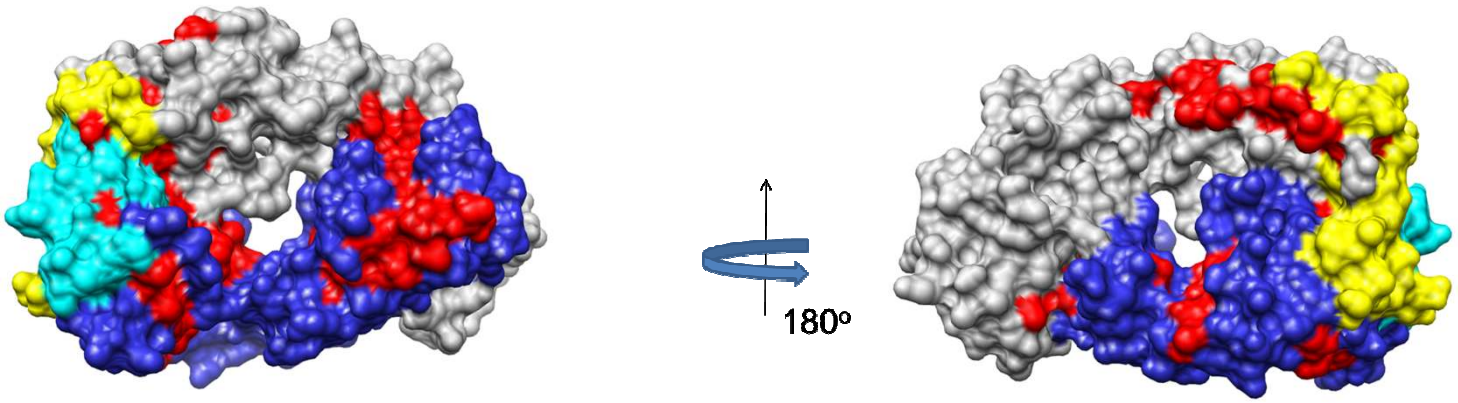
Τα παραπάνω αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2, απεικονίζονται, με τον ίδιο χρωματικό κώδικα, στην τρισδιάστατη δομή του αντισώματος Cetuximab, με κωδικό PDB : 1YY8 (Εικόνα 43). Στην Εικόνα 43 προστίθενται τα αποτελέσματα του λογισμικού DSSP, τα οποία αναπαριστώνται στη δομή με σφαίρες (Εικόνα 44). Στη συνέχεια, στην Εικόνα 45 απεικονίζεται η δομή, με χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις, και στην Εικόνα 46, η ίδια δομή με τις αντικαταστάσεις των αμινοξικών καταλοίπων και τα νέα αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2.



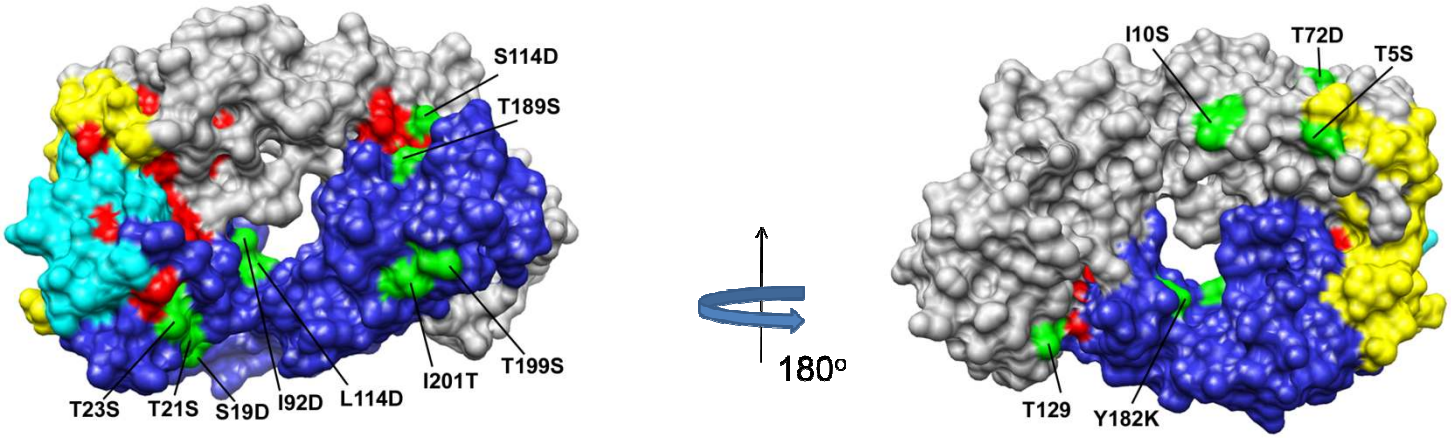
Εικόνα 43 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Cetuximab. Με κόκκινο χρώμα στην ελαφριά και βαριά αλυσίδα τα αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2. Απεικόνιση των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs) με κίτρινο χρώμα, καθώς επίσης αναφέρονται και οι ονομασίες της κάθε θηλιάς (loop) ξεχωριστά σύμφωνα με την αλυσίδα που βρίσκονται και τη σειρά που απαντώνται στην πρωτοταγή δομή. Ακόμα, με γαλάζιο χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα που δώθηκαν ως αποτέλεσμα του AMYLPRED2 και είναι και κατάλοιπα των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs).



Εικόνα 44 : Στην Εικόνα 43, ενσωματώθηκαν τα αποτελέσματα του λογισμικού DSSP. Με κόκκινες σφαίρες απεικονίζονται τα επιφανειακά κατάλοιπα των περιοχών που έχουν μεγαλύτερη τάση για συσσωμάτωση, σύμφωνα με το λογισμικό AMYLPRED2, ομοίως με γαλάζιες σφαίρες τα κατάλοιπα που έχουν τις ιδιότητες που αναφέρθηκαν και επιπλέον είναι κατάλοιπα των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs). Τα επιφανειακά κατάλοιπα που απεικονίζονται ως σφαίρες (εκτός από τα κατάλοιπα (γαλάζιες σφαίρες) που είναι στα CDRs), αποτελούν το σύνολο των καταλοίπων που είναι εφικτό στη συνέχεια να αντικαταστασθούν από άλλα κατάλοιπα.



Εικόνα 45 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Cetuximab σε χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις. Ισχύει ο κώδικας χρωμάτων που έχει ήδη περιγραφεί.



Εικόνα 46 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Cetuximab σε χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις. Με ανοιχτό πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα που αντικαταστάθηκαν, καθώς επίσης αναφέρεται και σε ποια θέση στην αμινοξική ακολουθία βρίσκονται και σε με ποια κατάλοιπα αντικαταστάθηκαν. Ακόμα, αιφαιρέθηκε το κόκκινο χρώμα από τα κατάλοιπα που πλέον δεν προβλέπονται από το εργαλείο Amylpred2 να έχουν τάση για συσσωμάτωση μετά τις αντικαταστάσεις που έγιναν.

3.4 OFATUMUMAB

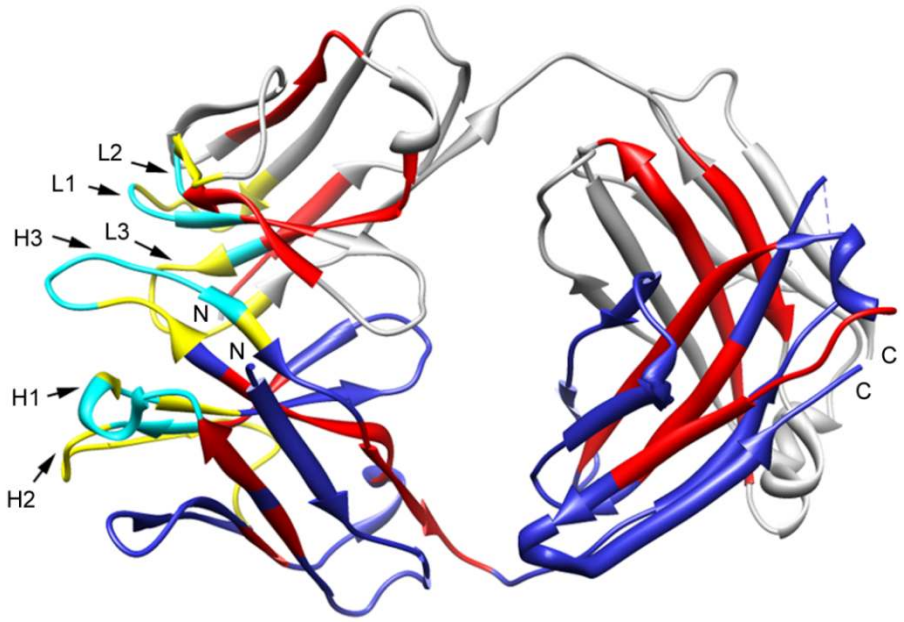
Ελαφριά αλυσίδα

```
                         10         20         30         40         50         60
Ofatumumab       EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA
Amylpred2         #####                            ######         ######  #
DSSP               * *                             **            *   **
ANTIKATASTASEIS     S                                              S

                         70         80         90        100        110        120
Ofatumumab       RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPITFGQ GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP
Amylpred2                   #######     #######                            ######
DSSP                         *   **     * *                                * **
ANTIKATASTASEIS              D   K        A                                  N

                        130        140        150        160        170        180
Ofatumumab       SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT
Amylpred2                ##  ##########
DSSP                     *          *
ANTIKATASTASEIS          D

                        190        200        210 211
Ofatumumab       LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN R
Amylpred2
DSSP
ANTIKATASTASEIS
```

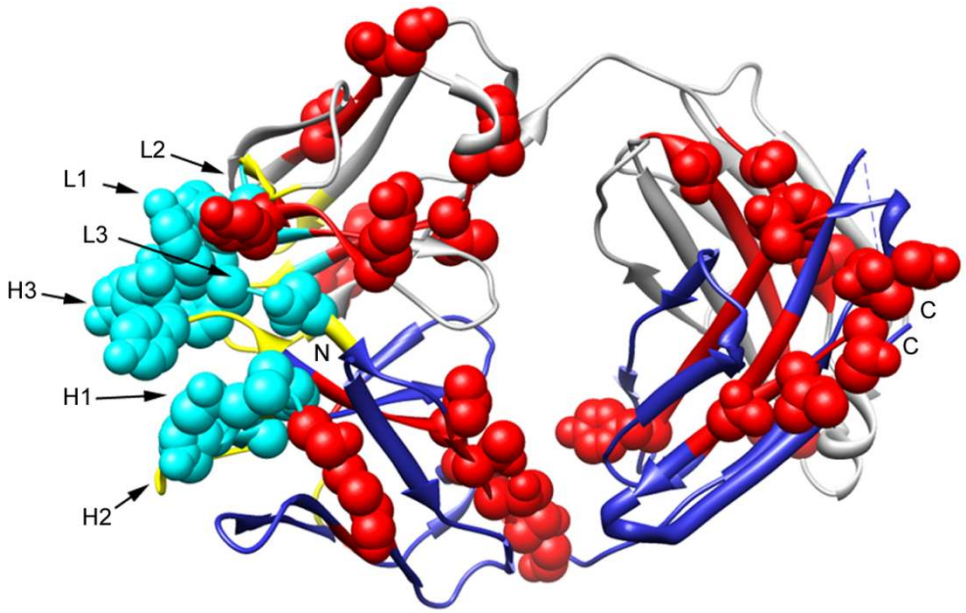
Βαριά αλυσίδα

```
                         10         20         30         40         50         60
Ofatumumab       EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFN DYAMHWVRQA PGKGLEWVST ISWNSGSIGY
Amylpred2                            #  # ########  # #                ####  ##
DSSP                                 * * **** *   *                    *   *
ANTIKATASTASEIS

                         70         80         90        100        110        120
Ofatumumab       ADSVKGRFTI SRDNAKKSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDI QYGNYYYGMD VWGQGTTVTV
Amylpred2                               ###        #######     #########     ######
DSSP                                               * *         ******  *       * *
ANTIKATASTASEIS                                    S A                         D

                        130        140        150        160        170        180
Ofatumumab       SSASTKGPSV FPLAPGSSKS TSGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
Amylpred2        ##                            ### ##            ##
DSSP             **
ANTIKATASTASEIS

                        190        200        210        220 222
Ofatumumab       SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EP
Amylpred2            ###### ###     ## #######
DSSP                 *      *      ** ** * *
ANTIKATASTASEIS      K      S          S T
```

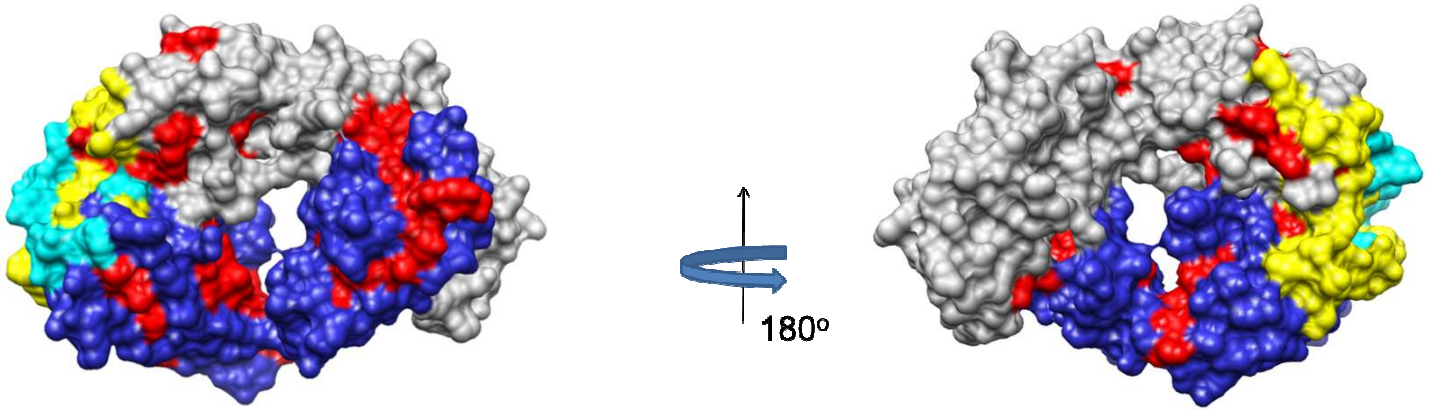
Τα παραπάνω αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2, απεικονίζονται, με τον ίδιο χρωματικό κώδικα, στην τρισδιάστατη δομή του αντισώματος Ofatumumab, με κωδικό PDB : 3GIZ (Εικόνα 47). Στην Εικόνα 47 προστίθενται τα αποτελέσματα του λογισμικού DSSP, τα οποία αναπαριστώνται στη δομή με σφαίρες (Εικόνα 48). Στην Εικόνα 49 απεικονίζεται η δομή, με χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις, και στην Εικόνα 50, η ίδια δομή με τις αντικαταστάσεις των αμινοξικών καταλοίπων και τα νέα αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2.



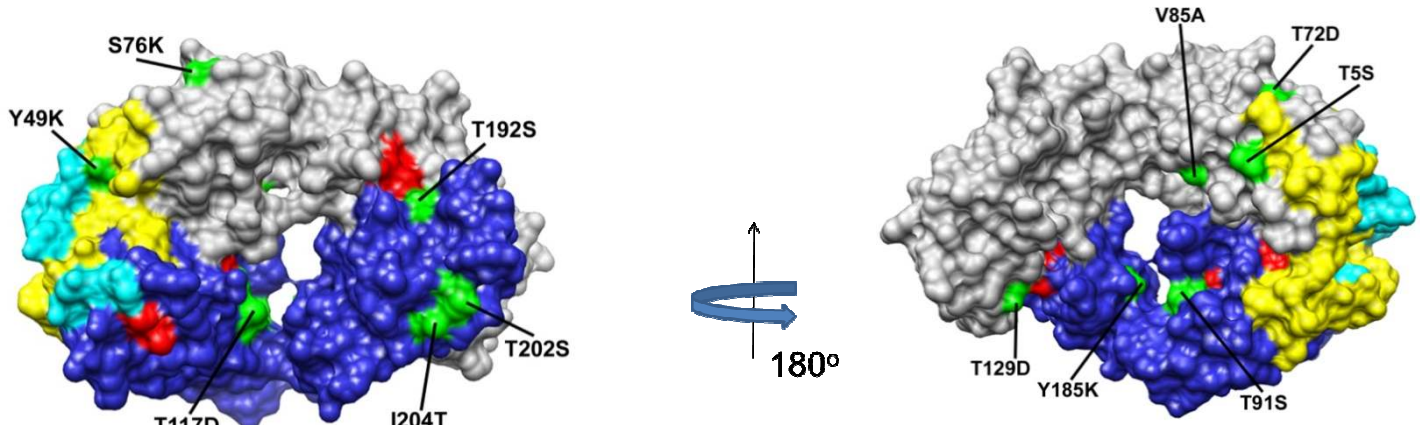
Εικόνα 47 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Ofatumumab. Με κόκκινο χρώμα στην ελαφριά και βαριά αλυσίδα τα αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2. Απεικόνιση των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs) με κίτρινο χρώμα, καθώς επίσης αναφέρονται και οι ονομασίες της κάθε θηλιάς (loop) ξεχωριστά σύμφωνα με την αλυσίδα που βρίσκονται και τη σειρά που απαντώνται στην πρωτοταγή δομή. Ακόμα, με γαλάζιο χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα που δώθηκαν ως αποτέλεσμα του AMYLPRED2 και είναι και κατάλοιπα των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs).



Εικόνα 48 : Στην Εικόνα 47, ενσωματώθηκαν τα αποτελέσματα του λογισμικού DSSP. Με κόκκινες σφαίρες απεικονίζονται τα επιφανειακά κατάλοιπα των περιοχών που έχουν μεγαλύτερη τάση για συσσωμάτωση, σύμφωνα με το λογισμικό AMYLPRED2, ομοίως με γαλάζιες σφαίρες τα κατάλοιπα που έχουν τις ιδιότητες που αναφέρθηκαν και επιπλέον είναι κατάλοιπα των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs). Τα επιφανειακά κατάλοιπα που απεικονίζονται ως σφαίρες (εκτός από τα κατάλοιπα (γαλάζιες σφαίρες) που είναι στα CDRs), αποτελούν το σύνολο των καταλοίπων που είναι εφικτό στη συνέχεια να αντικαταστασθούν από άλλα κατάλοιπα.



Εικόνα 49 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Ofatumumab σε χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις. Ισχύει ο κώδικας χρωμάτων που έχει ήδη περιγραφεί.



Εικόνα 50 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Ofatumumab σε χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις. Με ανοιχτό πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα που αντικαταστάθηκαν, καθώς επίσης αναφέρεται και σε ποια θέση στην αμινοξική ακολουθία βρίσκονται και σε με ποια κατάλοιπα αντικαταστάθηκαν. Ακόμα, αιφαιρέθηκε το κόκκινο χρώμα από τα κατάλοιπα που πλέον δεν προβλέπονται από το εργαλείο AmyIpred2 να έχουν τάση για συσσωμάτωση μετά τις αντικαταστάσεις που έγιναν.

3.5 PERTUZUMAB

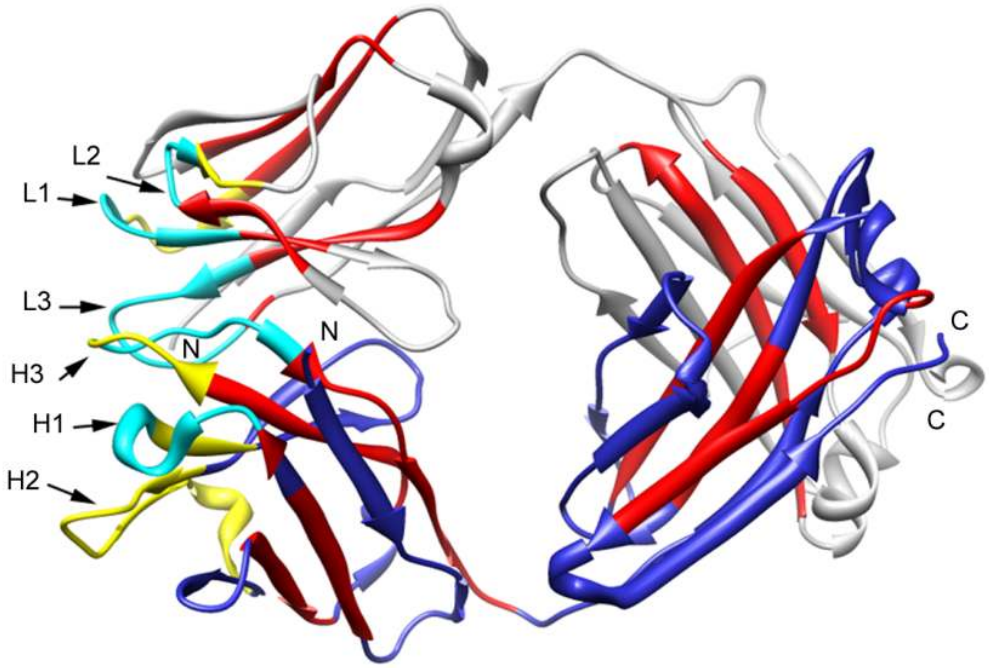
Ελαφριά αλυσίδα

```
                                10        20        30        40        50        60
Pertuzumab      DIQMTQSPSS  LSASVGDRVT  ITCKASQDVS  IGVAWYQQKP  GKAPKLLIYS  ASYRYTGVPS
Amylpred2                          ###  ###      ##  ######        #####  ###
DSSP                               * *   *       *  *                **   **
ANTIKATASTASEIS                      D                                K

                                70        80        90       100       110       120
Pertuzumab      RFSGSGSGTD  FTLTISSLQP  EDFATYYCQQ  YYIYPYTFGQ  GTKVEIKRTV  AAPSVFIFPP
Amylpred2                   #######        #######  ########                 ######
DSSP                         *   **         *       *** **                    *
ANTIKATASTASEIS              D   R          D                                 D

                               130       140       150       160       170       180
Pertuzumab      SDEQLKSGTA  SVVCLLNNFY  PREAKVQWKV  DNALQSGNSQ  ESVTEQDSKD  STYSLSSTLT
Amylpred2               ##  ##########
DSSP                    *          *
ANTIKATASTASEIS         D

                               190       200       210   214
Pertuzumab      LSKADYEKHK  VYACEVTHQG  LSSPVTKSFN  RGEC
Amylpred2
DSSP
ANTIKATASTASEIS
```

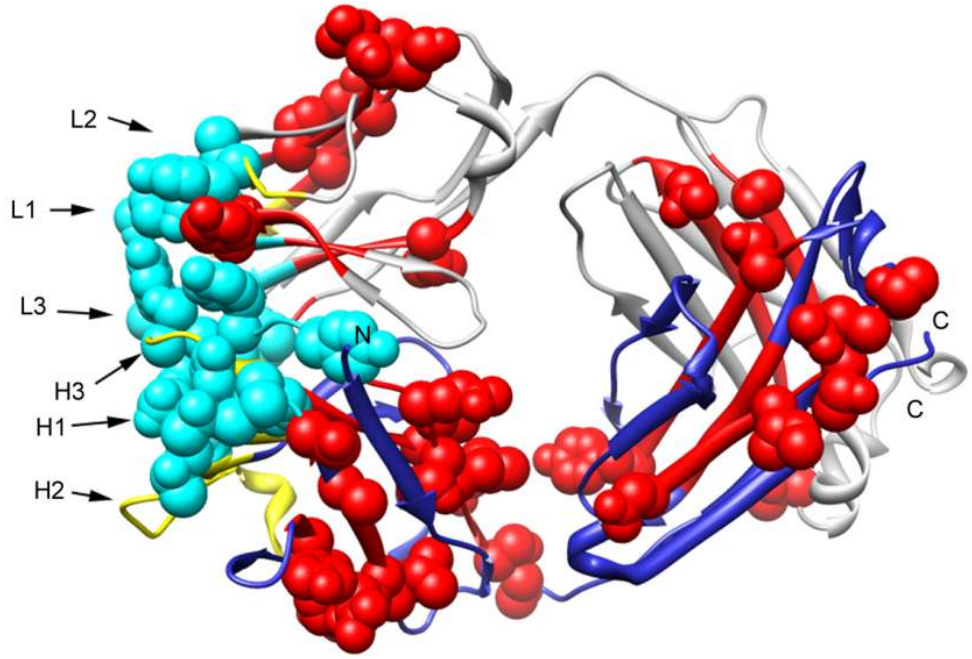
Βαριά αλυσίδα

```
                                10        20        30        40        50        60
Pertuzumab      EVQLVESGGG  LVQPGGSLRL  SCAASGFTFT  DYTMDWVRQA  PGKGLEWVAD  VNPNSGGSIY
Amylpred2                          ###  ###  ######  ##
DSSP                               **     * **** *  **
ANTIKATASTASEIS                      D

                                70        80        90       100       110       120
Pertuzumab      NQRFKGRFTL  SVDRSKNTLY  LQMNSLRAED  TAVYYCARNL  GPSFYFDYWG  QGTLVTVSSA
Amylpred2                          ###  ####        ########     ########  #########
DSSP                                 *   * *        * *          ***  *    * **   **
ANTIKATASTASEIS                      K                A                        D

                               130       140       150       160       170       180
Pertuzumab      STKGPSVFPL  APSSKSTSGG  TAALGCLVKD  YFPEPVTVSW  NSGALTSGVH  TFPAVLQSSG
Amylpred2                                   #####                            ##
DSSP
ANTIKATASTASEIS

                               190       200       210       220  222
Pertuzumab      LYSLSSVVTV  PSSSLGTQTY  ICNVNHKPSN  TKVDKKVEPK  SC
Amylpred2        #########        #####  #####
DSSP             *      *        ****   *   *
ANTIKATASTASEIS  K      S           S   T
```

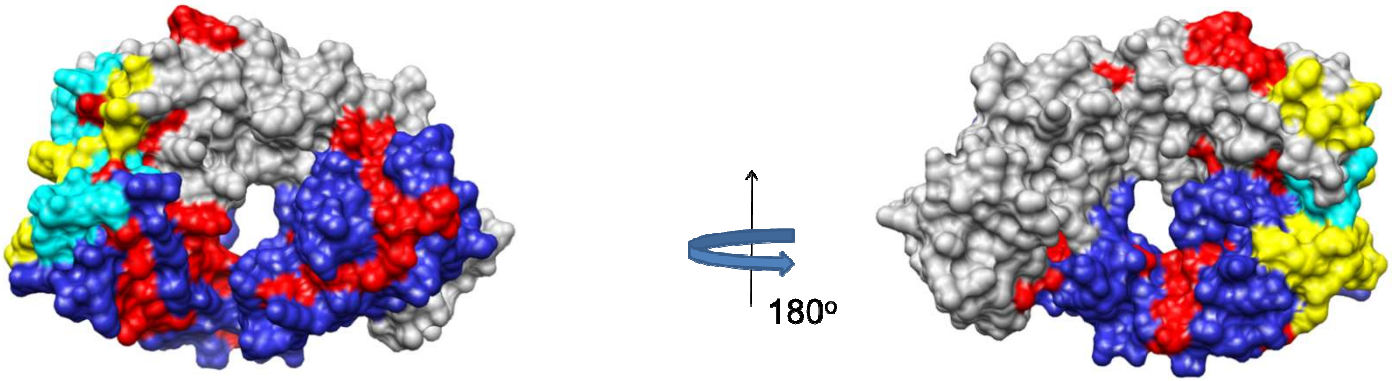
Τα παραπάνω αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2, απεικονίζονται, με τον ίδιο χρωματικό κώδικα, στην τρισδιάστατη δομή του αντισώματος Pertuzumab, με κωδικό PDB : 1L1I (Εικόνα 51). Στην Εικόνα 51 προστίθενται τα αποτελέσματα του λογισμικού DSSP, τα οποία αναπαριστώνται στη δομή με σφαίρες (Εικόνα 52). Στη συνέχεια, στην Εικόνα 53 απεικονίζεται η δομή, με χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις, και στην Εικόνα 54, η ίδια δομή με τις αντικαταστάσεις των αμινοξικών καταλοίπων και τα νέα αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2.



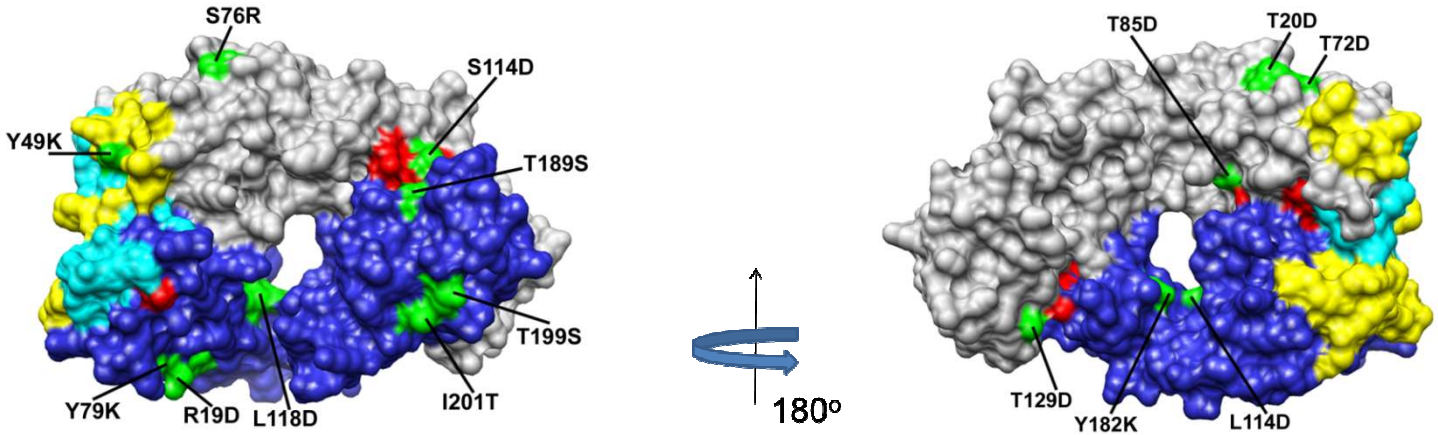
Εικόνα 51 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Pertuzumab. Με κόκκινο χρώμα στην ελαφριά και βαριά αλυσίδα τα αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2. Απεικόνιση των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs) με κίτρινο χρώμα, καθώς επίσης αναφέρονται και οι ονομασίες της κάθε θηλιάς (loop) ξεχωριστά σύμφωνα με την αλυσίδα που βρίσκονται και τη σειρά που απαντώνται στην πρωτοταγή δομή. Ακόμα, με γαλάζιο χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα που δώθηκαν ως αποτέλεσμα του AMYLPRED2 και είναι και κατάλοιπα των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs).



Εικόνα 52 : Στην Εικόνα 51, ενσωματώθηκαν τα αποτελέσματα του λογισμικού DSSP. Με κόκκινες σφαίρες απεικονίζονται τα επιφανειακά κατάλοιπα των περιοχών που έχουν μεγαλύτερη τάση για συσσωμάτωση, σύμφωνα με το λογισμικό AMYLPRED2, ομοίως με γαλάζιες σφαίρες τα κατάλοιπα που έχουν τις ιδιότητες που αναφέρθηκαν και επιπλέον είναι κατάλοιπα των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs). Τα επιφανειακά κατάλοιπα που απεικονίζονται ως σφαίρες (εκτός από τα κατάλοιπα (γαλάζιες σφαίρες) που είναι στα CDRs), αποτελούν το σύνολο των καταλοίπων που είναι εφικτό στη συνέχεια να αντικαταστασθούν από άλλα κατάλοιπα.



Εικόνα 53 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Pertuzumab σε χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις. Ισχύει ο κώδικας χρωμάτων που έχει ήδη περιγραφεί.



Εικόνα 54 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Pertuzumab σε χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις. Με ανοιχτό πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα που αντικαταστάθηκαν, καθώς επίσης αναφέρεται και σε ποια θέση στην αμινοξική ακολουθία βρίσκονται και σε με ποια κατάλοιπα αντικαταστάθηκαν. Ακόμα, αιφαιρέθηκε το κόκκινο χρώμα από τα κατάλοιπα που πλέον δεν προβλέπονται από το εργαλείο Amylpred2 να έχουν τάση για συσσωμάτωση μετά τις αντικαταστάσεις που έγιναν.

3.6 RITUXIMAB

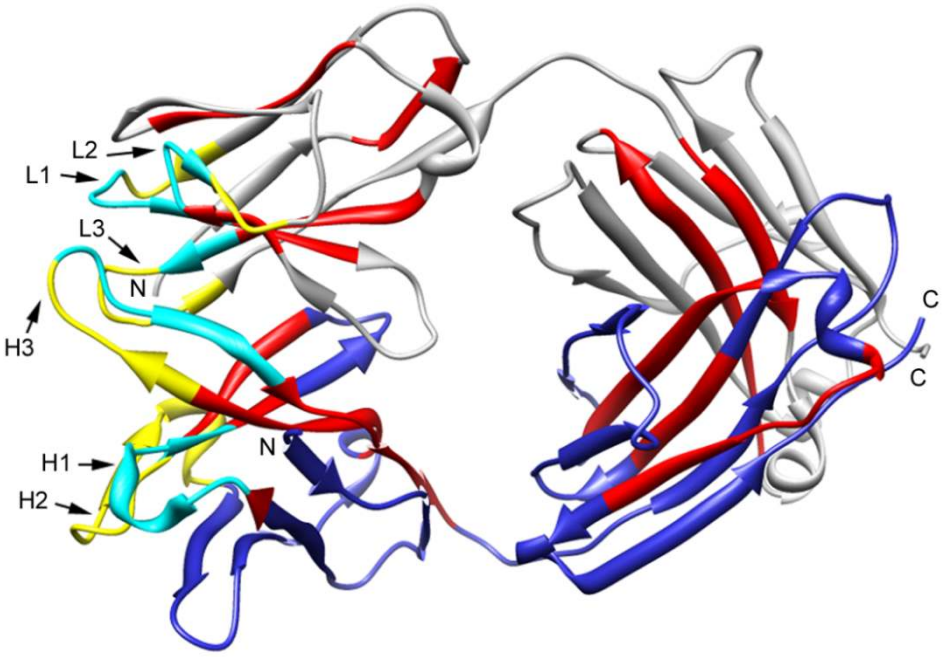
Ελαφριά αλυσίδα

```
                          10         20         30         40         50         60
Rituximab        QIVLSQSPAI  LSASPGEKVT  MTCRASSSVS  YIHWFQQKPG  SSPKPWIYAT  SNLASGVPVR
Amylpred2                ##  ###                ###  ######          #####  ##
DSSP                     **  **                 * *  *                * * *  **
ANTIKATASTASEIS           D                                             K

                          70         80         90        100        110        120
Rituximab        FSGSGSGTSY  SLTISRVEAE  DAATYYCQQW  TSNPPTFGGG  TKLEIKRTVA  APSVFIFPPS
Amylpred2                ##  #####        #######                            ######
DSSP                     *   * * *         * *                                *  *
ANTIKATASTASEIS          D       K         D                                     D

                         130        140        150        160        170        180
Rituximab        SDEQLKSGTA  VVCLLNNFYP  REAKVQWKVD  NALQSGNSQE  SVTEQDSKDS  TYSLSSTLTL
Amylpred2                ##  #########
DSSP                     *         *
ANTIKATASTASEIS          D

                         190        200        210  213
Rituximab        SKADYEKHKV  YACEVTHQGL  SSPVTKSFNR  GEC
Amylpred2
DSSP
ANTIKATASTASEIS
```

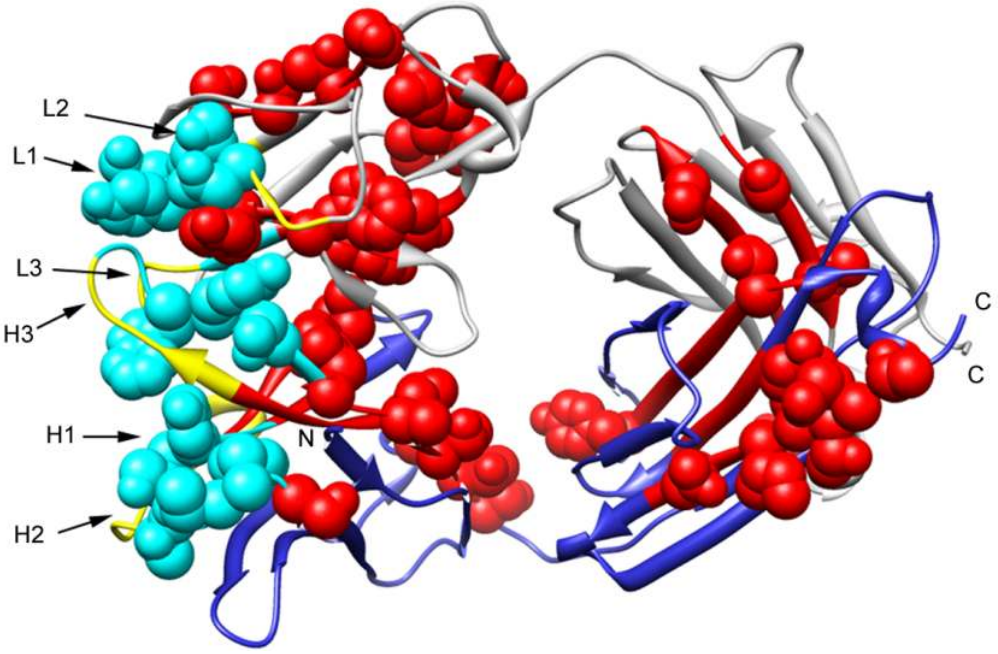
Βαριά αλυσίδα

```
                          10         20         30         40         50         60
Rituximab        QVQLQQPGAE  LVKPGASVKM  SCKASGYTFT  SYNMHWVKQT  PGRGLEWIGA  IYPGNGDTSY
Amylpred2                                   ######  #######         ######
DSSP                                        **** *  **              **
ANTIKATASTASEIS                                                     S

                          70         80         90        100        110        120
Rituximab        NQKFKGKATL  TADKSSSTAY  MQLSSLTSED  SAVYYCARST  YYGGDWYFNV  WGAGTTVTVS
Amylpred2                                           ########        #######  ##########
DSSP                                                * *             * ** *   * *  * * *
ANTIKATASTASEIS                                       D                        S  S

                         130        140        150        160        170        180
Rituximab        AASTKGPSVF  PLAPSSKSTS  GGTAALGCLV  KDYFPEPVTV  SWNSGALTSG  VHTFPAVLQS
Amylpred2                                     ####  #                            ##
DSSP
ANTIKATASTASEIS

                         190        200        210        220   224
Rituximab        SGLYSLSSVV  TVPSSSLGTQ  TYICNVNHKP  SNTKVDKKVE  PKSC
Amylpred2           #######  ##      ###  ######
DSSP                *        *      ***  *** *
ANTIKATASTASEIS     K        S           S T
```

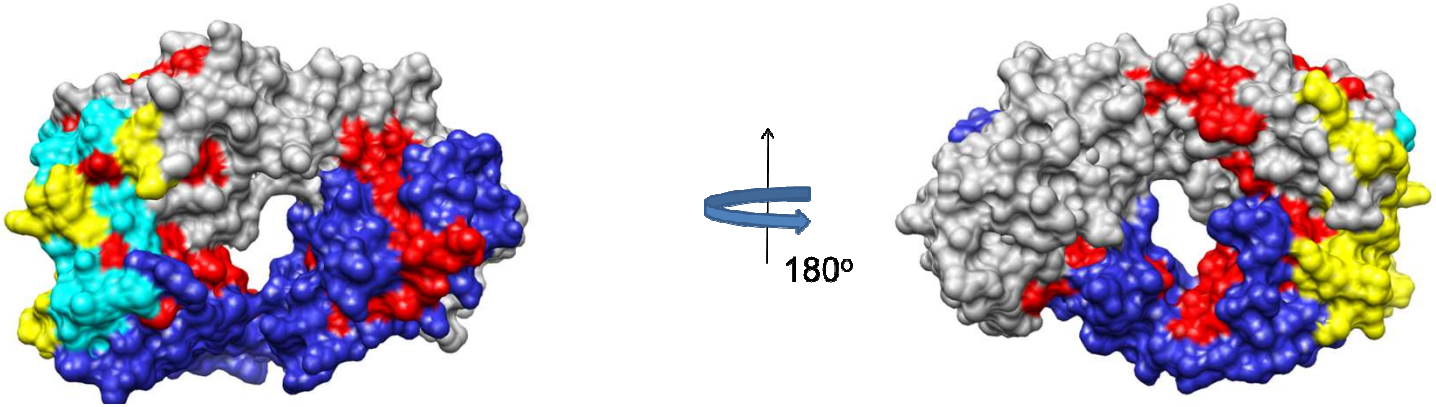
Τα παραπάνω αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2, απεικονίζονται, με τον ίδιο χρωματικό κώδικα, στην τρισδιάστατη δομή του αντισώματος Rituximab, με κωδικό PDB : 2OSL (Εικόνα 55). Στην Εικόνα 55 προστίθενται τα αποτελέσματα του λογισμικού DSSP, τα οποία αναπαριστώνται στη δομή με σφαίρες (Εικόνα 56). Στη συνέχεια, στην Εικόνα 57 απεικονίζεται η δομή, με χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις, και στην Εικόνα 58, η ίδια δομή με τις αντικαταστάσεις των αμινοξικών καταλοίπων και τα νέα αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2.



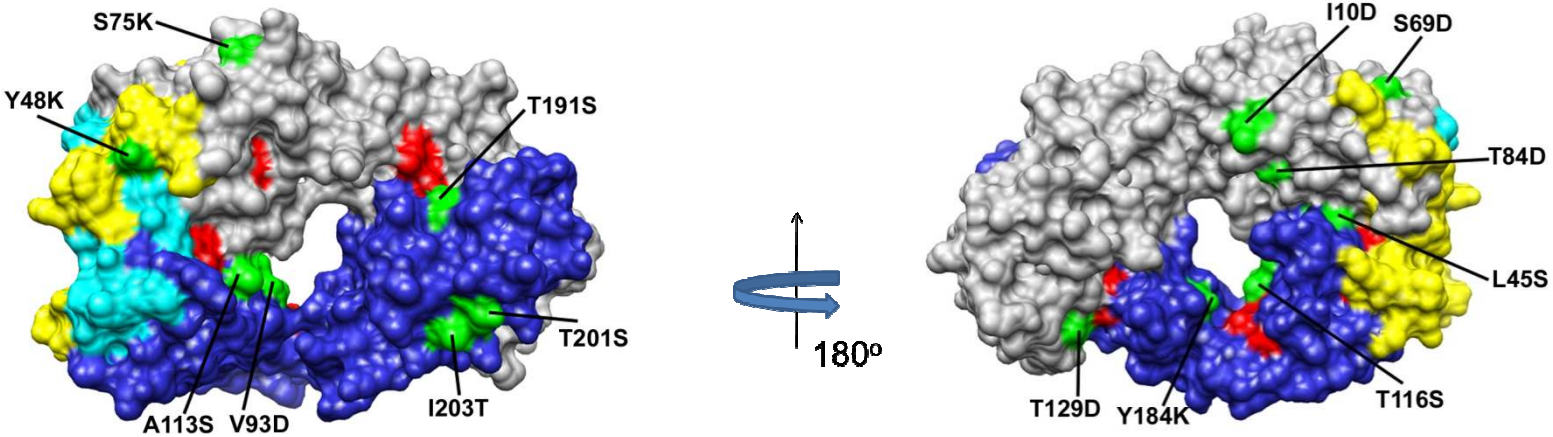
Εικόνα 55 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Rituximab. Με κόκκινο χρώμα στην ελαφριά και βαριά αλυσίδα τα αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2. Απεικόνιση των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs) με κίτρινο χρώμα, καθώς επίσης αναφέρονται και οι ονομασίες της κάθε θηλιάς (loop) ξεχωριστά σύμφωνα με την αλυσίδα που βρίσκονται και τη σειρά που απαντώνται στην πρωτοταγή δομή. Ακόμα, με γαλάζιο χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα που δώθηκαν ως αποτέλεσμα του AMYLPRED2 και είναι και κατάλοιπα των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs).



Εικόνα 56 : Στην Εικόνα 55, ενσωματώθηκαν τα αποτελέσματα του λογισμικού DSSP. Με κόκκινες σφαίρες απεικονίζονται τα επιφανειακά κατάλοιπα των περιοχών που έχουν μεγαλύτερη τάση για συσσωμάτωση, σύμφωνα με το λογισμικό AMYLPRED2, ομοίως με γαλάζιες σφαίρες τα κατάλοιπα που έχουν τις ιδιότητες που αναφέρθηκαν και επιπλέον είναι κατάλοιπα των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs). Τα επιφανειακά κατάλοιπα που απεικονίζονται ως σφαίρες (εκτός από τα κατάλοιπα (γαλάζιες σφαίρες) που είναι στα CDRs), αποτελούν το σύνολο των καταλοίπων που είναι εφικτό στη συνέχεια να αντικαταστασθούν από άλλα κατάλοιπα.



Εικόνα 57 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Rituximab σε χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις. Ισχύει ο κώδικας χρωμάτων που έχει ήδη περιγραφεί.



Εικόνα 58 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Rituximab σε χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις. Με ανοιχτό πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα που αντικαταστάθηκαν, καθώς επίσης αναφέρεται και σε ποια θέση στην αμινοξική ακολουθία βρίσκονται και σε με ποια κατάλοιπα αντικαταστάθηκαν. Ακόμα, αιφαιρέθηκε το κόκκινο χρώμα από τα κατάλοιπα που πλέον δεν προβλέπονται από το εργαλείο Amylpred2 να έχουν τάση για συσσωμάτωση μετά τις αντικαταστάσεις που έγιναν.

3.7 TRASTUZUMAB

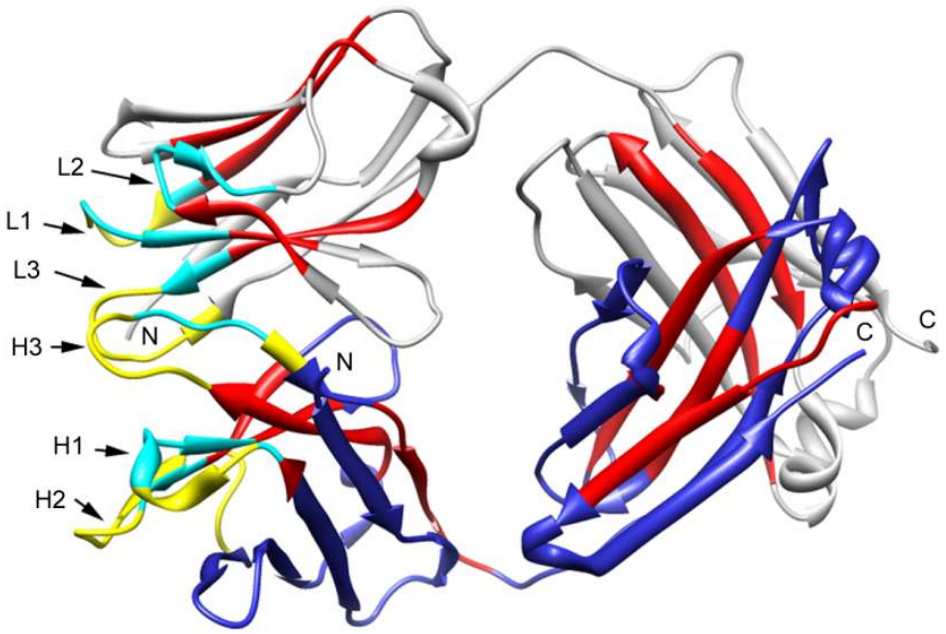
Ελαφριά αλυσίδα

```
                          10         20         30         40         50         60
Trastuzumab      DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS
Amylpred2                      ###   ####       ######           #####  ######
DSSP                           * *    * *       *                  *    *****
ANTIKATASTASEIS                  D                                 K

                          70         80         90        100        110        120
Trastuzumab      RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
Amylpred2                  #######       #######                         ######
DSSP                        *   **        *                               *
ANTIKATASTASEIS             D   D         D                               D

                         130        140        150        160        170        180
Trastuzumab      SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT
Amylpred2                ##  #########
DSSP                     *          *
ANTIKATASTASEIS          D

                         190        200        210   214
Trastuzumab      LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
Amylpred2
DSSP
ANTIKATASTASEIS
```

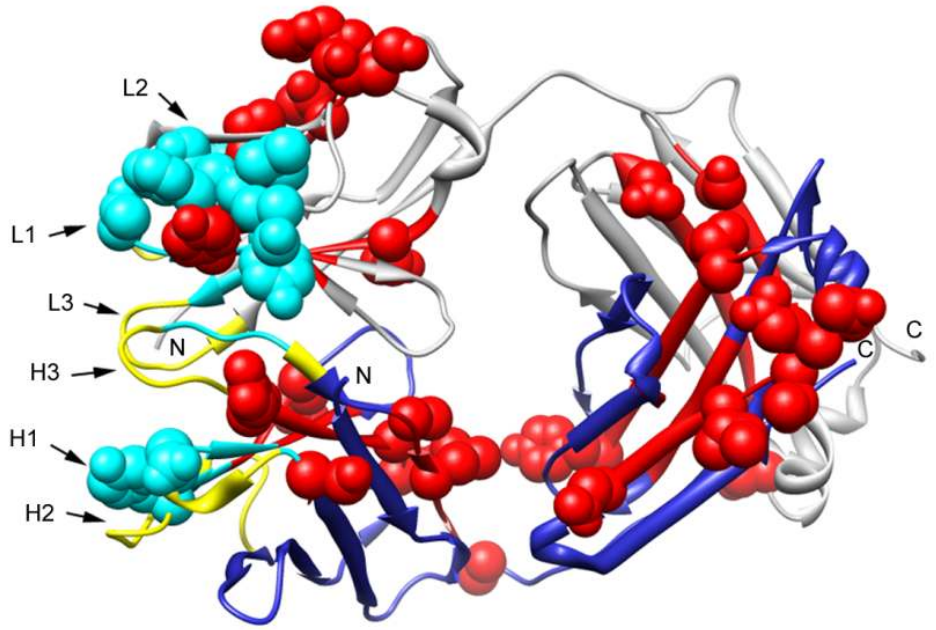
Βαριά αλυσίδα

```
                          10         20         30         40         50         60
Trastuzumab      EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
Amylpred2                                  ##     ########        #####  ##
DSSP                                       **     *               *      *
ANTIKATASTASEIS                                                   S

                          70         80         90        100        110        120
Trastuzumab      ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
Amylpred2                                         ########      ####     #########
DSSP                                              * *    *               * **   **
ANTIKATASTASEIS                                   S D                       N    D

                         130        140        150        160        170        180
Trastuzumab      ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
Amylpred2                                 #####               ##
DSSP
ANTIKATASTASEIS

                         190        200        210        220
Trastuzumab      GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
Amylpred2          ########  #     ####  ######
DSSP               *      *        ****  *    *
ANTIKATASTASEIS    K      S           S   T
```

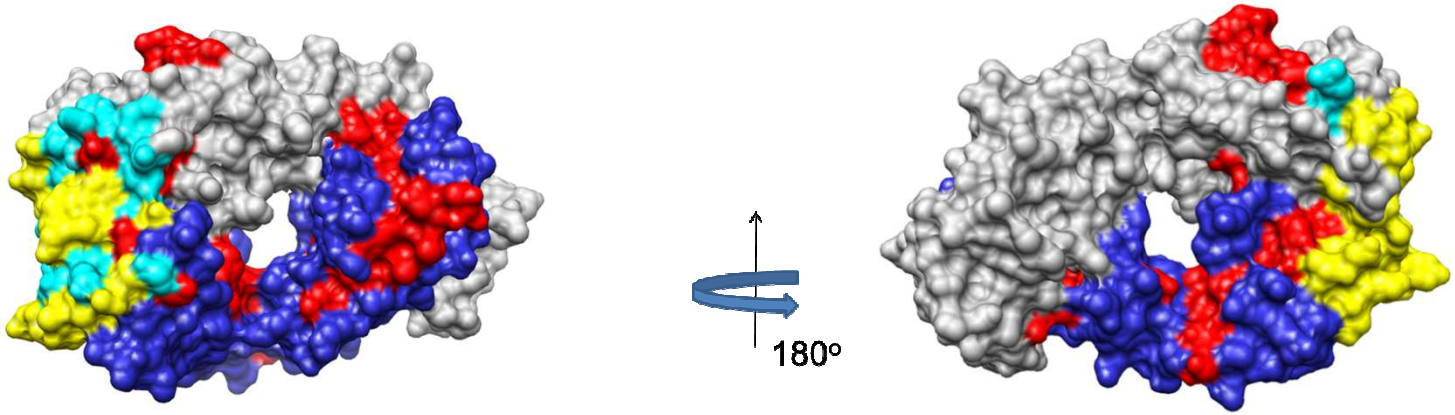
Τα παραπάνω αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2, απεικονίζονται, με τον ίδιο χρωματικό κώδικα, στην τρισδιάστατη δομή του αντισώματος Trastuzumab, με κωδικό PDB : 1N8Z (Εικόνα 59). Στην Εικόνα 59 προστίθενται τα αποτελέσματα του λογισμικού DSSP, τα οποία αναπαριστώνται στη δομή με σφαίρες (Εικόνα 60). Στη συνέχεια, στην Εικόνα 61 απεικονίζεται η δομή, με χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις, και στην Εικόνα 62, η ίδια δομή με τις αντικαταστάσεις των αμινοξικών καταλοίπων και τα νέα αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2.



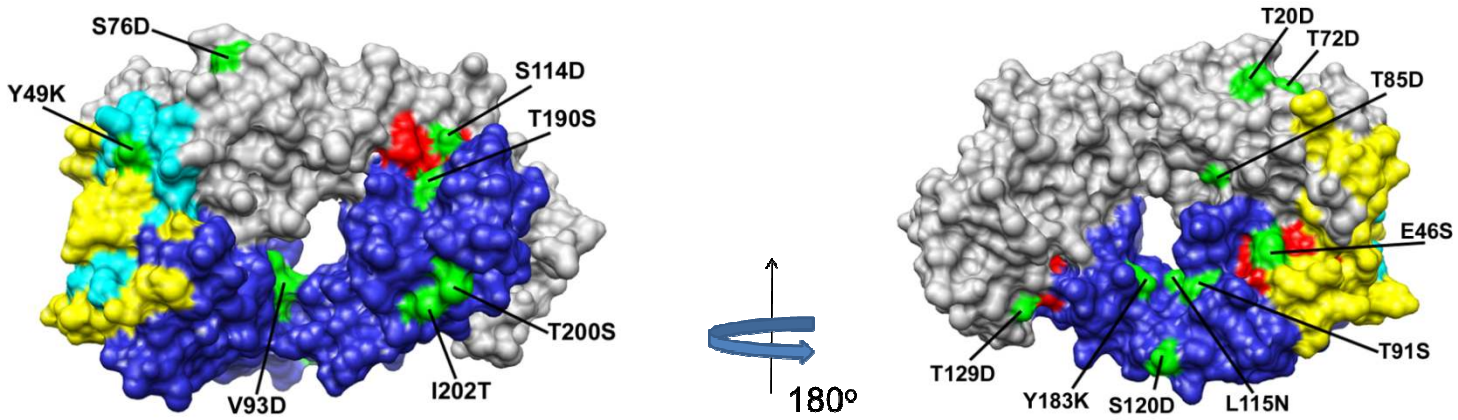
Εικόνα 59 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Trastuzumab. Με κόκκινο χρώμα στην ελαφριά και βαριά αλυσίδα τα αποτελέσματα του λογισμικού AMYLPRED2. Απεικόνιση των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs) με κίτρινο χρώμα, καθώς επίσης αναφέρονται και οι ονομασίες της κάθε θηλιάς (loop) ξεχωριστά σύμφωνα με την αλυσίδα που βρίσκονται και τη σειρά που απαντώνται στην πρωτοταγή δομή. Ακόμα, με γαλάζιο χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα που δώθηκαν ως αποτέλεσμα του AMYLPRED2 και είναι και κατάλοιπα των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs).



Εικόνα 60 : Στην Εικόνα 59, ενσωματώθηκαν τα αποτελέσματα του λογισμικού DSSP. Με κόκκινες σφαίρες απεικονίζονται τα επιφανειακά κατάλοιπα των περιοχών που έχουν μεγαλύτερη τάση για συσσωμάτωση, σύμφωνα με το λογισμικό AMYLPRED2, ομοίως με γαλάζιες σφαίρες τα κατάλοιπα που έχουν τις ιδιότητες που αναφέρθηκαν και επιπλέον είναι κατάλοιπα των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs). Τα επιφανειακά κατάλοιπα που απεικονίζονται ως σφαίρες (εκτός από τα κατάλοιπα (γαλάζιες σφαίρες) που είναι στα CDRs), αποτελούν το σύνολο των καταλοίπων που είναι εφικτό στη συνέχεια να αντικαταστασθούν από άλλα κατάλοιπα.



Εικόνα 61 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Trastuzumab σε χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις. Ισχύει ο κώδικας χρωμάτων που έχει ήδη περιγραφεί.



Εικόνα 62 : Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Trastuzumab σε χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις. Με ανοιχτό πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα που αντικαταστάθηκαν, καθώς επίσης αναφέρεται και σε ποια θέση στην αμινοξική ακολουθία βρίσκονται και σε με ποια κατάλοιπα αντικαταστάθηκαν. Ακόμα, αιφαιρέθηκε το κόκκινο χρώμα από τα κατάλοιπα που πλέον δεν προβλέπονται από το εργαλείο Amylpred2 να έχουν τάση για συσσωμάτωση μετά τις αντικαταστάσεις που έγιναν.

3.8 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ

Το τελικό στάδιο της παρούσας έρευνας, ήταν ο έλεγχος των μοντέλων που δημιουργήθηκαν με το εργαλείο Modeller9v11, καθώς επίσης και η βελτιστοποίηση τους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό PROCHECK, και το εργαλείο WHAT_CHECK του λογισμικού WHAT IF.

Με το εργαλείο PROCHECK έγινε έλεγχος της στερεοχημικής δομής του κάθε μονοκλωνικού αντισώματος. Θα ήταν ανασταλτικός παράγοντας να βρεθούν αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία προβλέπονται να βρίσκονται σε απαγορευμένες περιοχές του Ramachandran Plot, όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 2.6. Δίνοντας ως είσοδο στο λογισμικό PROCHECK και τις δομές-οδηγούς, ήταν δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων (Πίνακας 6). Είναι εμφανές ότι τα περισσότερα αμινοξικά κατάλοιπα που βρίσκονται σε απαγορευμένες θέσεις στο Ramachandran Plot στα νέα μοντέλα, προϋπάρχουν στις ίδιες θέσεις και στις πειραματικά προσδιορισμένες με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ δομές, γεγονός ιδιαίτερα ενθαρρυντικό για την ποιότητα των νέων μοντέλων.

Μονοκλωνικό Αντίσωμα	Δομή από την RCSB PDB	Νέα Δομή (Modeller9v11)
Alemtuzumab	THR 51 (E)	THR 51 (E)
Bevacizumab	SER 30 (E)	SER 30 (E)
	THR 51 (E)	THR 51 (E)
Cetuximab	ALA 51 (E)	
Ofatumumab	ALA 51 (E)	ALA 51 (E)
		SER 137 (B)
Pertuzumab	ALA 51 (E)	ALA 51 (E)
	SER 30 (E)	TYR 55 (E)
Rituximab	THR 50 (E)	LYS 137 (B)
Trastuzumab	ALA 51 (E)	ALA 51 (E)
	ASN 30 (E)	

Πίνακας 6 : Αμινοξικά κατάλοιπα, με τον κώδικα των τριών γραμμάτων, που βρέθηκαν σε απαγορευμένες θέσεις στο Ramachandran Plot. Στην μεσαία στήλη τα αποτελέσματα για τις πειραματικά προσδιορισμένες με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ δομές που χρησιμοποιήθηκαν ως δομές – οδηγοί. Στην τρίτη στήλη τα αποτελέσματα για τις νέες δομές που δημιουργήθηκαν με το εργαλείο Modeller9v11. Το γράμμα Ε στην παρένθεση αντιπροσωπεύει την ελαφριά αλυσίδα και το Β τη βαριά αλυσίδα.

Στη συνέχεια, ένα ακόμα σημαντικό κριτήριο για να θεωρηθεί ότι τα νέα μοντέλα που δημιουργήθηκαν με τα νέα αμινοξικά κατάλοιπα είναι αξιόπιστες ποιοτικά, έγινε έλεγχος με το εργαλείο WHAT_CHECK του λογισμικού WHAT IF. Μέσω του εργαλείου WHAT_CHECK, δίνεται η δυνατότητα ενός αυστηρού ελέγχου πιθανών συγκρούσεων (bumps) μεταξύ των ατόμων των αμινοξικών καταλοίπων. Ομοίως με το εργαλείο PROCHECK, ως είσοδος στο λογισμικό WHAT_CHECK δόθηκαν και οι αρχικές δομές-οδηγοί, για να είναι δυνατή η σύγκριση.

Το εργαλείο WHAT_CHECK χωρίζει τα αποτελέσματα των συγκρούσεων που εντοπίζει, σε πέντε κατηγορίες, ξεκινώντας από αυτές που θα έπρεπε να αντιμετωπιστούν μέχρι εκείνες που πρέπει να αντιμετωπιστούν. Στον έλεγχο των δομών-οδηγών, αλλά και στον έλεγχο των νέων δομών, οι συγκρούσεις που βρέθηκαν ήταν στις δύο πρώτες κατηγορίες από τις πέντε, όπου θα έπρεπε ενδεχομένως να αντιμετωπιστούν, χωρίς όμως η ανάγκη αυτή να είναι επιτακτική (Πίνακας 7, Πίνακας 8).

Δομές από την RCSB PDB	Μεσαία Κατηγορία (Middle Bin)	Δεύτερη Κατηγορία (Second Bin)	Πρώτη Κατηγορία (Mildest Bin)
Alemtuzumab	0	0	28
Bevacizumab	0	0	20
Cetuximab	0	**1**	31
Ofatumumab	0	0	25
Pertuzumab	0	**1**	30
Rituximab	0	**2**	35
Trastuzumab	**1**	**5**	59

Πίνακας 7: Αποτελέσματα συγκρούσεων που εντόπισε το εργαλείο WHAT_CHECK. Οι δομές που δόθηκαν ως είσοδος είναι οι πειραματικά προσδιορισμένες με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ δομές που έχουν κατατεθεί στην βάση RCSB PDB και χρησιμοποιήθηκαν ως δομές-οδηγοί.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το αποτέλεσμα στη πειραματικά προσδιορισμένη με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ δομή του μονοκλωνικού αντισώματος Trastuzumab (κωδικός PDB : 1N8Z), όπου εντοπίζεται μία σύγκρουση ατόμων στην μεσαία κατηγορία (Middle Bin). Αυτό το αποτέλεσμα, μαζί με τις συγκρούσεις (bumps) που παρατηρούνται στην δεύτερη αλλά και στην πρώτη κατηγορία, διαπιστώνεται πως το λογισμικό WHAT_CHECK έχει ιδιαίτερα αυστηρά κριτήρια για να θεωρηθεί μία δομή βέλτιστη.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα στον Πίνακας 8, διαπιστώνεται ότι υπάρχει αισθητή αύξηση στον αριθμό των συγκρούσεων στην πρώτη (mildest bin) και στην δεύτερη κατηγορία (second bin). Παρόλο που το λογισμικό WHAT_CHECK έχει ιδιαίτερα αυστηρά κριτήρια για την αξιολόγηση μιας δομής και οι δύο αυτές κατηγορίες δεν είναι στις κρίσιμες κατηγορίες (οι οποίες χρήζουν άμεση αντιμετώπιση), θεωρήθηκε ότι οι νέες δομές πρέπει να βελτιστοποιηθούν.

Νέες Δομές (Modeller9v11)	Μεσαία Κατηγορία (Middle Bin)	Δεύτερη Κατηγορία (Second Bin)	Πρώτη Κατηγορία (Mildest Bin)
Alemtuzumab	0	11	136
Bevacizumab	0	7	107
Cetuximab	0	13	127
Ofatumumab	0	6	105
Pertuzumab	0	11	129
Rituximab	0	7	139
Trastuzumab	0	12	144

Πίνακας 8 : Αποτελέσματα συγκρούσεων μεταξύ των ατόμων των αμινοξικών καταλοίπων που εντόπισε το εργαλείο WHAT_CHECK του λογισμικού WHAT IF. Οι δομές που δόθηκαν ως είσοδος είναι οι νέες δομές που δημιουργήθηκαν με το εργαλείο Modeller9v11.

Η βελτιστοποίηση των μοντέλων έγινε με το λογισμικό UCSF Chimera 1.6.2. Χρησιμοποιήθηκε η λειτουργία “Minimize Structure”, η οποία ελαχιστοποιεί την ενέργεια των μοριακών μοντέλων. Η εγκυρότητα των βελτιστοποιημένων μοντέλων ελέγχθηκε εκ νέου με το λογισμικό PROCHECK και WHAT_CHECK του WHAT IF web server (Πίνακας 9, Πίνακας 10).

Μονοκλωνικό Αντίσωμα	Δομή από την RCSB PDB	Νέα Δομή (Modeller9v11)	Βελτιστοποιημένη δομή (UCSF Chimera 1.6.2)
Alemtuzumab	THR 51 (E)	THR 51 (E)	THR 51 (E)
			ASP 30 (E)
Bevacizumab	SER 30 (E)	SER 30 (E)	SER 30 (E)
	THR 51 (E)	THR 51 (E)	THR 51 (E)
Cetuximab	ALA 51 (E)		ALA 51 (E)
Ofatumumab	ALA 51 (E)	ALA 51 (E)	
		SER 137 (B)	
Pertuzumab	ALA 51 (E)	ALA 51 (E)	ALA 51 (E)
	SER 30 (E)	TYR 55 (E)	LEU 100 (B)
Rituximab	THR 50 (E)	LYS 137 (B)	THR 50 (E)
			LYS 137 (B)
Trastuzumab	ALA 51 (E)	ALA 51 (E)	ALA 51 (E)
	ASN 30 (E)		

Πίνακας 9 : Συγκεντρωτικός πίνακας καταλοίπων που βρέθηκαν σε απαγορευμένες θέσεις στο Ramachandran Plot. Στην δεύτερη στήλη τα αποτελέσματα για τις πειραματικά προσδιορισμένες με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ δομές που χρησιμοποιήθηκαν ως δομές – οδηγοί. Στην τρίτη στήλη τα αποτελέσματα για τις νέες δομές που δημιουργήθηκαν με το εργαλείο Modeller9v11. Στην τέταρτη στήλη τα αποτελέσματα για τις βελτιστοποιημένες δομές με το λογισμικό του UCSF Chimera 1.6.2. Το γράμμα Ε στην παρένθεση αντιπροσωπεύει την ελαφριά αλυσίδα και το Β τη βαριά αλυσίδα.

Βελτιστοποιημένες Δομές (Chimera 1.6.2)	Μεσαία Κατηγορία (Middle Bin)	Δεύτερη Κατηγορία (Second Bin)	Πρώτη Κατηγορία (Mildest Bin)
Alemtuzumab	0	0	12
Bevacizumab	0	0	15
Cetuximab	0	0	14
Ofatumumab	0	0	19
Pertuzumab	0	0	18
Rituximab	0	0	13
Trastuzumab	0	0	17

Πίνακας 10 : Αποτελέσματα συγκρούσεων (bumps) μεταξύ των ατόμων των αμινοξικών καταλοίπων που εντόπισε το εργαλείο WHAT_CHECK του λογισμικού WHAT IF. Οι δομές που δόθηκαν ως είσοδος είναι οι νέες δομές που βελτιστοποιήθηκαν με το λογισμικό UCSF Chimera 1.6.2.

Όλες οι δομές των μονοκλωνικών αντισωμάτων, καθώς και τα νέα μοντέλα που δημιουργήθηκαν με το λογισμικό Modeller9v11 (Sali and Blundell 1993) παρουσιάζονται σε μορφή χωροπληρωτικών μοντέλων, κατάλληλα χρωματισμένων

για την εύκολη κατανόηση και εξαγωγή συμπερασμάτων. Είναι σχηματικά εμφανές ότι οι αντικαταστάσεις των αμινοξικών καταλοίπων που έγιναν, οδήγησαν σε δραματικές αλλαγές στις επιφάνειες που είχαν αρχικά προβλεφθεί ως επιρρεπείς για τον σχηματισμό συσσωματωμάτων (aggregation-prone regions). Είναι ευδιάκριτη, σε όλες τις δομές, οι οποίες μορφοποιήθηκαν με το σύνολο εργαλείων UCSF Chimera 1.6.2 (Pettersen, Goddard et al. 2004), η μείωση, ή ακόμα και η ολική έλλειψη των περιοχών αυτών.

ΚΛΙΜΑΚΑ VENTURA	ΠΡΙΝ	ΜΕΤΑ	ΚΛΙΜΑΚΑ VENTURA	ΠΛΗΘΟΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ
1.822	**I**	**T**	**-0.159**	**7**
1.822	I	S	-0.294	1
1.822	I	D	-1.836	3
1.754	F	N	-1.302	2
1.594	V	S	-0.294	1
1.594	V	A	-0.036	3
1.594	V	D	-1.836	3
1.380	L	S	-0.294	3
1.380	L	A	-0.036	1
1.380	L	N	-1.302	1
1.380	L	D	-1.836	2
1.159	Y	S	-0.294	2
1.159	**Y**	**K**	**-0.931**	**13**
-0.036	A	S	-0.294	1
-0.159	**T**	**D**	**-1.836**	**21**
-0.159	**T**	**S**	**-0.294**	**22**
-0.159	T	N	-1.302	1
-0.294	**S**	**D**	**-1.836**	**10**
-0.294	S	K	-0.931	3
-0.294	S	R	-1.240	1
-1.231	Q	N	-1.302	2
-1.240	R	D	-1.836	3
-1.302	N	S	-0.294	2
-1.412	E	S	-0.294	1

Πίνακας 11: Πλήθος αντικαταστάσεων αμινοξικών καταλοίπων, με γκρι σκίαση οι αντικαταστάσεις με τη μεγαλύτερη συχνότητα σε όλο το σύνολο των μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Στο πλήθος των αμινοξικών αντικαταστάσεων στο σύνολο των αντισωμάτων (Πίνακας 11), αρχικά παρατηρείται ότι οι περισσότερες ή σχεδόν όλες οι αμινοξικές αντικαταστάσεις, αφορούν πολικά κατάλοιπα, τα οποία αντικαθίστανται από

πολικά ή φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα, όπως το πολικό κατάλοιπο Θρεονίνη (THR, T) το οποίο αντικαθίσταται από το επίσης πολικό κατάλοιπο Σερίνη (SER, S) ή το κατάλοιπο Θρεονίνη το οποίο αντικαθίσταται από το αρνητικά φορτισμένο κατάλοιπο Ασπαρτικό Οξύ (ASP, D).

Αρκετές είναι και οι αντικαταστάσεις υδρόφοβων αμινοξικών καταλοίπων από άλλα, επίσης υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα, όπως η αντικατάσταση του καταλοίπου Βαλίνη (VAL, V) από το υδρόφοβο κατάλοιπο Αλανίνη (ALA, A). Και σ' αυτήν την περίπτωση, αν και η αντικατάσταση του υδρόφοβου καταλοίπου δεν έγινε από κάποιο πολικό, τα αποτελέσματα στην μείωση ή την ολική έλλειψη της περιοχής με τάση για συσσωμάτωση ήταν εξίσου σημαντικά.

Παρατηρώντας τον Πίνακας 11 με το συνολικό πλήθος των αμινοξικών αντικαταστάσεων για όλα τα μονοκλωνικά αντισώματα, διεξάγεται το συμπέρασμα ότι οι επικρατέστερες αντικαταστάσεις από τα υδρόφοβα κατάλοιπα, ήταν το κατάλοιπο Ισολευκίνη (ILE, I), το οποίο αντικαταστάθηκε από το πολικό κατάλοιπο Θρεονίνη (THR, T), το κατάλοιπο Βαλίνη (VAL, V), το οποίο αντικαταστάθηκε από το επίσης υδρόφοβο κατάλοιπο Αλανίνη (ALA, A) ή το κατάλοιπο Σερίνη (SER, S), και το κατάλοιπο Τυροσίνη (TYR, Y), το οποίο αντικαταστάθηκε από το θετικά φορτισμένο κατάλοιπο Λυσίνη (LYS, K).

Στα πολικά κατάλοιπα, οι επικρατέστερες αμινοξικές αντικαταστάσεις ήταν, η αντικατάσταση του καταλοίπου Θρεονίνης (THR, T) με το πολικό κατάλοιπο Σερίνη (SER, S), καθώς και η αντικατάσταση του ίδιου καταλοίπου (Θρεονίνη) από το αρνητικά φορτισμένο κατάλοιπο Ασπαρτικό Οξύ (ASP, D). Ακόμα, μεγάλο ήταν και το πλήθος των αντικαταστάσεων του πολικού καταλοίπου Σερίνη (SER, S) με το αρνητικά φορτισμένο κατάλοιπο Ασπαρτικό Οξύ (ASP, D).

Στη συνέχεια, έγινε μία προσπάθεια ομαδοποίησης των πεπτιδίων με τάση για συσσωμάτωση που προβλέπονταν από το λογισμικό AMYLPRED2 (Tsolis, Papandreou et al. 2013), καταλήγοντας στην δημιουργία μοτίβων για την ελαφριά και την βαριά αλυσίδα των αντισωμάτων. Για την παρατήρηση και την δημιουργία των μοτίβων, έγιναν πολλαπλές στοιχίσεις με όλα τα αντισώματα του συνόλου

δεδομένων, μία πολλαπλή στοίχιση για τις ελαφριές αλυσίδες και μία για τις βαριές αλυσίδες, με το εργαλείο ClustalW (Santin, Bellone et al. 2008).

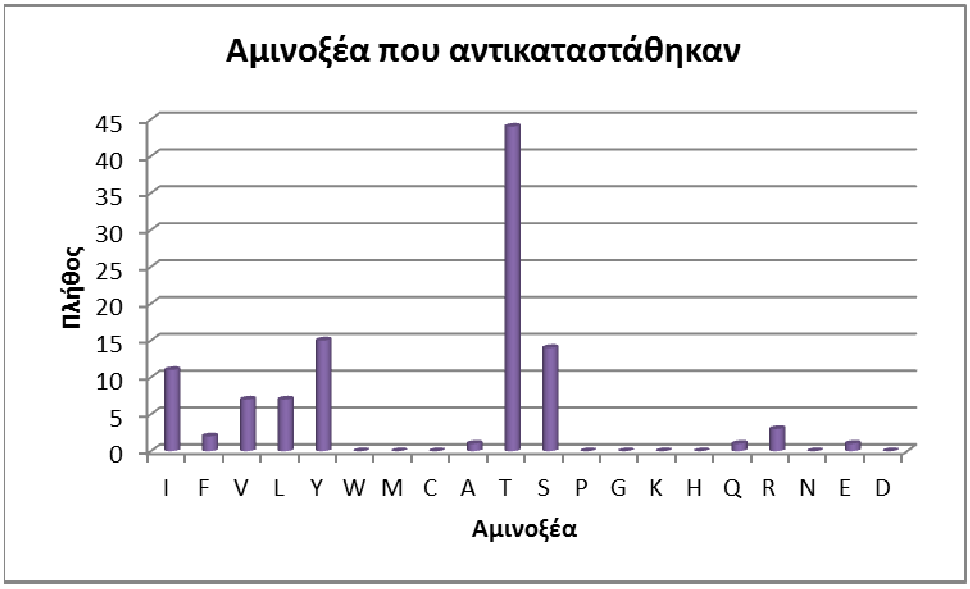
Στους πίνακες που ακολουθούν, συγκεντρώθηκε το πλήθος των αμινοξικών καταλοίπων που αντικαταστάθηκαν από άλλα αμινοξικά κατάλοιπα σε όλο το σύνολο των επτά (7) μονοκλωνικών αντισωμάτων που παρουσιάστηκαν στον Πίνακας 11. Στον Πίνακας 12 και στο διάγραμμα της Εικόνα 63 παρουσιάζεται το πλήθος των αμινοξικών καταλοίπων που αντικαταστάθηκαν και στον Πίνακας 13 και στο διάγραμμα της Εικόνα 64 το πλήθος των αμινοξικών καταλοίπων που τα αντικατέστησαν.

Αμινοξικά κατάλοιπα που αντικαταστάθηκαν	Πλήθος
I	**11**
F	2
V	7
L	7
Y	**15**
W	0
M	0
C	0
A	1
T	**44**
S	**14**
P	0
G	0
K	0
H	0
Q	1
R	3
N	0
E	1
D	0
ΣΥΝΟΛΟ	106

Πίνακας 12 : Πλήθος αμινοξέων που επιλέχθηκε να αντικατασταθούν από άλλα αμινοξέα, σε όλο το σύλονο των επτά (7) μονοκλωνικών αντισωμάτων. Με έντονη γραφή παρουσίαζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα με το μεγαλύτερο πλήθος.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του Πίνακας 12, το αμινοξικό κατάλοιπο που υπερτερεί στις αντικαταστάσεις είναι το πολικό κατάλοιπο Θρεονίνη (THR, T) με μεγάλη διαφορά σε σχέση με τα υπόλοιπα κατάλοιπα. Στη συνέχεια ακολουθούν τα

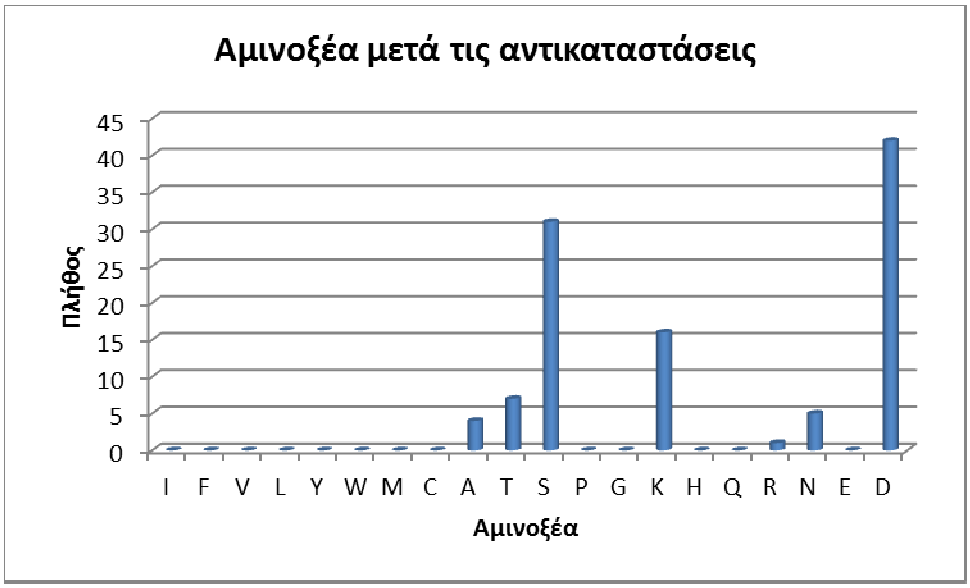
αμινοξικά κατάλοιπα Ισολευκίνη (ILE, I), Τυροσίνη (TYR, Y) και Σερίνη (SER, S), στο σύνολο των 106 αμινοξικών αντικαταστάσεων σε όλο το σύνολο δεδομένων.



Εικόνα 63 : Διάγραμμα παρουσίασης του πλήθους του κάθε αμινοξέως που επιλέχθηκαν να αντικατασταθούν από άλλα αμινοξικά κατάλοιπα στο σύνολο των επτά (7) μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Αμινοξέα μετά τις αντικαταστάσεις	Πλήθος
I	0
F	0
V	0
L	0
Y	0
W	0
M	0
C	0
A	4
T	**7**
S	**31**
P	0
G	0
K	**16**
H	0
Q	0
R	1
N	5
E	0
D	**42**
ΣΥΝΟΛΟ	106

Πίνακας 13 : Πλήθος αμινοξέων τα οποία επιλέχθηκαν να αντικαταστήσουν τα αρχικά αμινοξικά κατάλοιπα, σε όλο το σύλονο των επτά (7) μονοκλωνικών αντισωμάτων. Με έντονη γραφή παρουσίαζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα με το μεγαλύτερο πλήθος.



Εικόνα 64 : Διάγραμμα παρουσίασης του πλήθους του κάθε αμινοξέως που επιλέχθηκαν να αντικατασταθούν από άλλα αμινοξικά κατάλοιπα στο σύνολο των επτά (7) μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του Πίνακας 13, το αμινοξικό κατάλοιπο που υπερτερεί στις αντικαταστάσεις είναι το αρνητικά φορτισμένο κατάλοιπο Ασπαρτικό Οξύ (ASP, D). Στη συνέχεια βρίσκεται το πολικό κατάλοιπο Σερίνη (SER, S) με σχετικά μικρή διαφορά από το Ασπαρτικό Οξύ και ακολουθούν τα αμινοξικά κατάλοιπα Λυσίνη (LYS, K) και Θρεονίνη (THR, T), στο σύνολο των 106 αμινοξικών αντικαταστάσεων σε όλο το σύνολο δεδομένων.

Ελαφριά Αλυσίδα

```
                                                L1                                L2
1CE1_Alemtuzumab     DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNIDKYLNWYQQKPGKAPKLLIYNTNNLQTGVPS 60
1BJ1_Bevacizumab     DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPS 60
1YY8_Cetuximab       DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPS 60
3GIZ_Ofatumumab      EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA 60
1L7I_Pertuzumab      DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS 60
2OSL_Rituximab       QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVS-YIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPV 59
1N8Z_Trastuzumab     DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS 60

                     :* ::***  ** * *::.:::* **..:.  : *:**:.. :*:  *  :.   :*:*

                                                L3
1CE1_Alemtuzumab     RFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCLQHISRPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP 120
1BJ1_Bevacizumab     RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP 120
1YY8_Cetuximab       RFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP 120
3GIZ_Ofatumumab      RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPP 120
1L7I_Pertuzumab      RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP 120
2OSL_Rituximab       RFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP 119
1N8Z_Trastuzumab     RFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP 120

                     ***** ***.:::::*. ::.** * *** *    * *** **::*:**************

1CE1_Alemtuzumab     SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT 180
1BJ1_Bevacizumab     SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT 180
1YY8_Cetuximab       SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT 180
3GIZ_Ofatumumab      SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT 180
1L7I_Pertuzumab      SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT 180
2OSL_Rituximab       SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT 179
1N8Z_Trastuzumab     SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT 180
                     ************************************************************

1CE1_Alemtuzumab     LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR--- 211
1BJ1_Bevacizumab     LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 214
1YY8_Cetuximab       LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGA- 213
3GIZ_Ofatumumab      LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR--- 211
1L7I_Pertuzumab      LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 214
2OSL_Rituximab       LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 213
1N8Z_Trastuzumab     LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 214
                     ******************************
```

Εικόνα 65 : Στοίχιση αμινοξικών ακολουθιών των ελαφριών αλυσίδων των μονοκλωνικών αντισωμάτων του συνόλου δεδομένων. Με κίτρινη υπογράμμιση, οι υπερμεταβλητές περιοχές (CDRs) L1, L2 και L3. Με κόκκινο χρώμα τα κατάλοιπα που προβλέπει το λογισμικό AMYLPRED2 με μεγαλύτερη τάση για δημιουργία συσσωματωμάτων.

Αναλύοντας την στοίχιση των αμινοξικών ακολουθιών των ελαφριών αλυσίδων των μονοκλωνικών αντισωμάτων (Εικόνα 65), διαπιστώνεται ότι υπάρχουν αρκετές ομοιότητες και στις θέσεις και στο είδος των αμινοξικών καταλοίπων που προβλέπονται από το εργαλείο AMYLPRED2 με μεγαλύτερη τάση για πρόκληση συσσωματωμάτων. Οπότε έγινε μια προσπάθεια ομαδοποίησης τους και δημιουργία μοτίβων για τα πεπτίδια αυτά. Ομοίως και από την ανάλυση και παρατήρηση της στοίχισης των αμινοξικών ακολουθιών των βαριών αλυσίδων (Εικόνα 66) προκύπτουν ομοιότητες οι οποίες οδήγησαν επίσης στην δημιουργία μοτίβων.

Βαριά Αλυσίδα

```
                                                   H1                                H2
1CE1_Alemtuzumab     QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVSGFTFTDFYMNWVRQPPGRGLEWIGFIRDKAKGYTT 60
1BJ1_Bevacizumab     EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTY--TGEP 58
1YY8_Cetuximab       QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWS---GGNT 57
3GIZ_Ofatumumab      EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWN--SGSI 58
1L7I_Pertuzumab      EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPN--SGGS 58
2OSL_Rituximab       QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPG--NGDT 58
1N8Z_Trastuzumab     EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPT--NGYT 58

                     :*** :.*  **:*. :: ::* .**:.:..  :.**:*.**:****:. :
```

```
                                H2                                      H3
1CE1_Alemtuzumab     EYNPSVKGRVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAREG-HTAAPFD---YWGQGSL 116
1BJ1_Bevacizumab     TYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTL 118
1YY8_Cetuximab       DYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFA---YWGQGTL 114
3GIZ_Ofatumumab      GYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKD-IQYGNYYYGMDVWGQGTT 117
1L7I_Pertuzumab      IYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR---NLGPSFY-FDYWGQGTL 115
2OSL_Rituximab       SYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARS-TYYGGDWY-FNVWGAGTT 116
1N8Z_Trastuzumab     RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR---WGGDGFYAMDYWGQGTL 115

                      *   .. : ::  * :..   :::.*: : *:*:***::             ** *:
```

```
1CE1_Alemtuzumab     VTVSSASTKGPSVFPLAP-SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP 175
1BJ1_Bevacizumab     VTVSSASTKGPSVFPLAP-SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP 177
1YY8_Cetuximab       VTVSAASTKGPSVFPLAP-SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP 173
3GIZ_Ofatumumab      VTVSSASTKGPSVFPLAPGSSKSTSG-TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP 176
1L7I_Pertuzumab      VTVSSASTKGPSVFPLAP-SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP 174
2OSL_Rituximab       VTVSAASTKGPSVFPLAP-SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP 175
1N8Z_Trastuzumab     VTVSSASTKGPSVFPLAP-SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP 174

                     ****:************* ******* ********************************
```

```
1CE1_Alemtuzumab     AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE--------- 220
1BJ1_Bevacizumab     AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT 231
1YY8_Cetuximab       AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS------ 221
3GIZ_Ofatumumab      AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP-------- 222
1L7I_Pertuzumab      AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC----- 222
2OSL_Rituximab       AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC----- 224
1N8Z_Trastuzumab     AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP-------- 220
                     ****************************************:**
```

Εικόνα 66 : Στοίχιση αμινοξικών ακολουθιών των βαριών αλυσίδων των μονοκλωνικών αντισωμάτων του συνόλου δεδομένων. Με κίτρινη υπογράμμιση, οι υπερμεταβλητές περιοχές (CDRs) L1, L2 και L3. Με κόκκινο χρώμα τα κατάλοιπα που προβλέπει το λογισμικό AMYLPRED2 με μεγαλύτερη τάση για δημιουργία συσσωματωμάτων.

Στους πίνακες (Πίνακας 14, Πίνακας 15) που ακολουθούν, συγκεντρώνονται και παρουσιάζονται τα μοτίβα που δημιουργήθηκαν για την ελαφριά και την βαριά αλυσίδα, με βάση την παρατήρηση της σύστασης των πεπτιδίων που προβλέπονται από το εργαλείο AMYLPRED2 στις στοιχίσεις που δημιουργήθηκαν με το εργαλείο ClustalW (Thompson, Higgins et al. 1994).

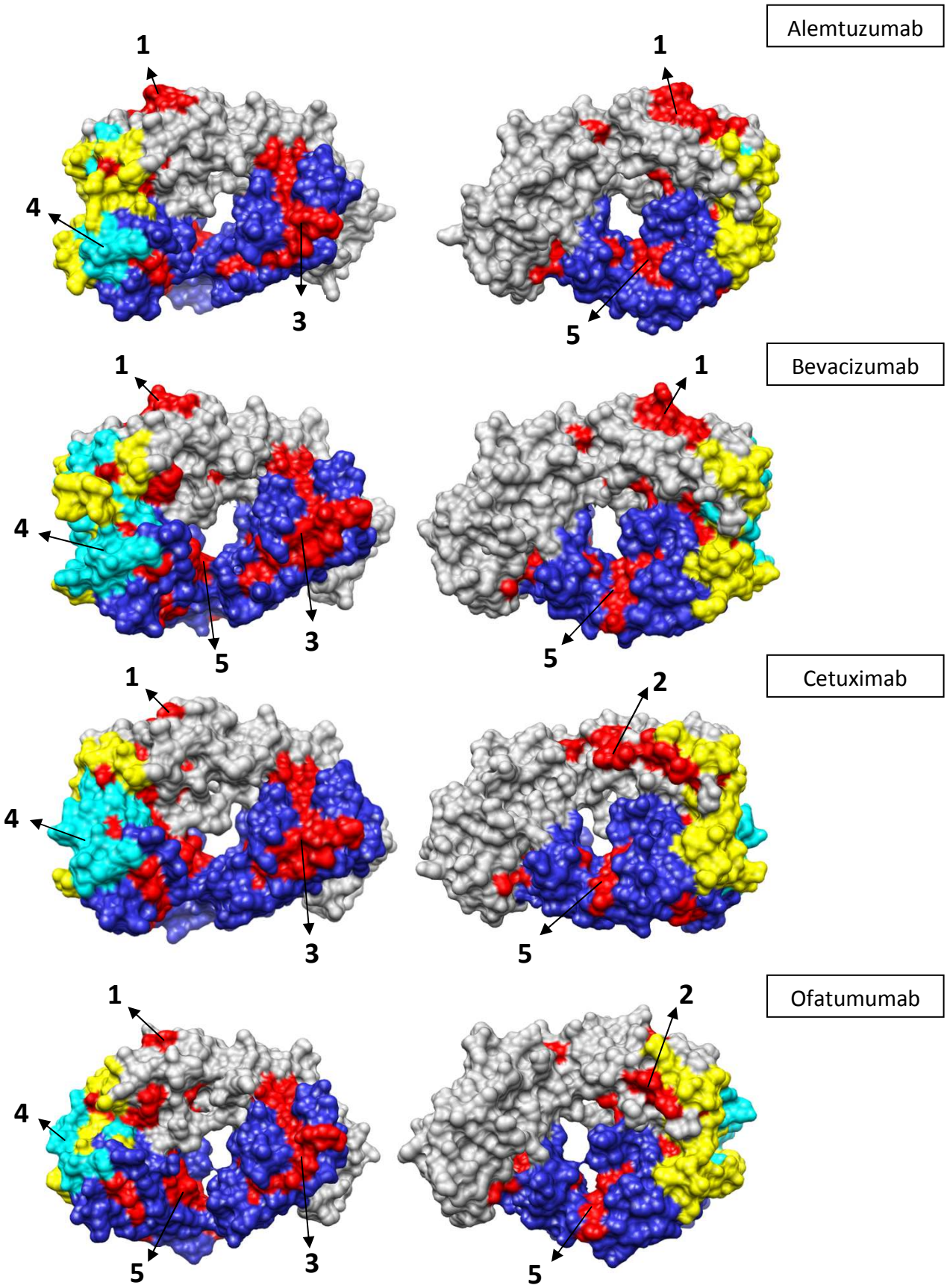
Ελαφριά Αλυσίδα	Μοτίβο	Αρχή	Τέλος
1	I[VL]LTQ	2	6
2	RVTITC	18	23
3	FT[FL]TISS	70-71	76-77
4	A[TV]YYC[QL]Q	83-84	89-90
5	PSVFIF	112-113	117-118
6	TASVVCLLNNFY	128-129	139-140

Πίνακας 14 : Σύνολο μοτίβων από τις ελαφριές αλυσίδες των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Στις στήλες «Αρχή» και «Τέλος» παρουσιάζονται οι θέσεις τις αρχής και του τέλους των μοτίβων στις αμινοξικές ακολουθίες των μονοκλωνικών αντισωμάτων.

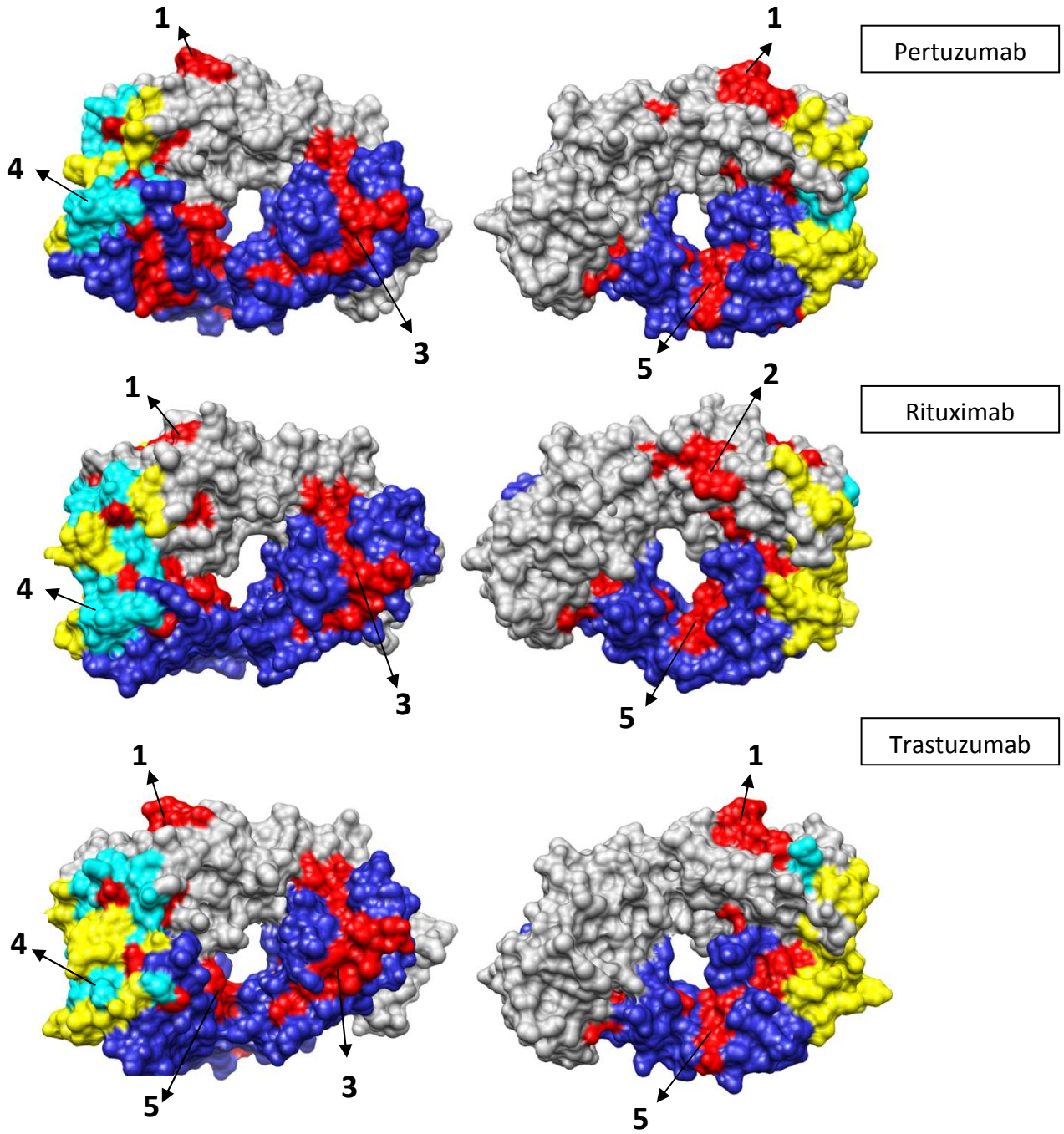
Βαριά Αλυσίδα	Μοτίβο	Αρχή	Τέλος
1	[TS]A[VIL]YYC[AS]	90-93	96-99
2	G[TS][TL]VTVS	112-116	118-122
3	YSLSSVVTV	182-186	190-195
4	GTQTYICNVN	196-201	205-210
5	W[VIL][GA]	47	49
6	GCLVK	145-149	149-153

Πίνακας 15 : Σύνολο μοτίβων από τις βαριές αλυσίδες των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Τα μοτίβα 5 και 6 αναπαριστούν «θαμμένα» πεπτίδια στην τρισδιάστατη δομή των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Στις στήλες «Αρχή» και «Τέλος» παρουσιάζονται οι θέσεις τις αρχής και του τέλους των μοτίβων στις αμινοξικές ακολουθίες των μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Στη συνέχεια, παρατηρώντας στις τρισδιάστατες δομές των αντισωμάτων, που παρουσιάστηκαν στις ενότητες 3.1-3.7, τις περιοχές πρόκλησης συσσωματωμάτων (κόκκινες και γαλάζιες), δημιουργήθηκαν ομάδες (clusters) των επιφανειακών αμινοξικών καταλοίπων που δόθηκαν ως αποτέλεσμα από το AMYLPRED2, στις οποίες έγινε αντιστοίχιση των μοτίβων που παρουσιάζονται στον Πίνακας 14, και Πίνακας 15. Στις Εικόνα 67 και Εικόνα 68 που ακολουθούν, αριθμούνται οι ομάδες που δημιουργούνται, καθώς επίσης αναγράφεται και σε ποιο μοτίβο αντιστοιχούν.



Εικόνα 67 : Γραφική αναπαράσταση των δομών των μονοκλωνικών αντισωμάτων σε χωροπληρωτικά μοντέλα με τον κώδικα χρωμάτων της ενότητας 3. Με τους αριθμούς 1-5 ονομάζονται οι ομάδες των επιφανειακών καταλοίπων που παρατηρήθηκαν.



Εικόνα 68 : Σε συνέχεια της Εικόνας 65 των δομών των υπόλοιπων τριών μονοκλωνικών αντισωμάτων σε χωροπληρωτικά μοντέλα με τον κώδικα χρωμάτων της ενότητας 3. Με τους αριθμούς 1-5 ονομάζονται οι ομάδες των επιφανειακών αμινοξικών καταλοίπων που παρατηρήθηκαν.

Στον Πίνακας 16, συγκεντρώθηκαν όλα τα αποτελέσματα των ομάδων (clusters) και των μοτίβων που δημιουργήθηκαν. Για κάθε μία ομάδα (cluster), παρουσιάζεται από ποια μοτίβα αποτελείται, καθώς επίσης σε κάθε ένα μοτίβο ποιες αντικαταστάσεις αμινοξικών καταλοίπων πραγματοποιούνται, και ποιες είναι οι επιπτώσεις των αντικαταστάσεων αυτών σε σχέση με την τάση να προκαλέσουν συσσωματώματα.

ΟΜΑΔΕΣ	ΜΟΤΙΒΟ	ΑΛΥΣΙΔΑ	ΠΕΠΤΙΔΙΑ	ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	ΕΠΙΠΤΩΣΗ
1	RVTITC	E	RV**T**ITC	T->D	√
1	FT[FL]TISS	E	FTFTI**S**S	S->D	FTFTID
			F**T**LTI**S**S	T->D & S->K	√
			F**T**LTI**S**S	T->D & S->R	√
			F**T**LTI**S**S	T->D & S->D	√
2	I[VL]LTQ	E	ILL**T**Q	T->S	√
			IVL**T**Q	T->S	√
3	PSVFIF	E	P**S**VFIF	S->D	FI
			PSV**F**IF	F->N	√
			PSVF**I**F	I->D	√
3	TASVVCLLNNFY	E	**T**ASVVCLLNNFY	T->D	SVVCLLNNF
			TASVVCLLNNF**Y**	T->D & Y->K	VVCLLNN
3	YSLSSVVTV	B	**Y**SLSSVV**T**V	Y->K & T->S	√
3	GTQTYICNVN	B	GTQ**T**Y**I**CNVN	T->S & I->T	√
4	A[TV]YYC[QL]Q	E	A**V**YYCQQ	V->A	AAY
			A**T**YYCQQ	T->D	YCQQ
			A**T**YYCQQ	T->D	√
5	[TS]A[VIL]YYC[AS]	B	**T**A**V**YYCA	T->S & V->D	√
			TA**V**YYCA	V->A	AYY
			TA**I**YYCA	I->D	√
			TA**L**YYCA	T->S & L->A	AAYY
			TA**V**YYCA	V->A	AYY
			SA**V**YYCA	V->D	√
			TA**V**YYCS	T->S & V->D	√
5	G[TS][TL]VTVS	B	GS**L**VTVS	L->S	√
			GT**L**VTVS	L->D	√
			GT**T**VTVS	T->D	√
			GT**T**VTVS	T->S	VTV
			GT**L**VTVS(**S**)	L->N & S->D	√
	W[VIL][GA]	B	«ΘΑΜΜΕΝΑ» ΠΕΠΤΙΔΙΑ		
	GCLVK	B			

Πίνακας 16 : Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για όλα τα πεπτίδια-μοτίβα που παρατηρήθηκαν στις επιφανειακές ομάδες (clusters) των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Για κάθε πετίδιο-μοτίβο δίνονται όλες οι μορφές που παρατηρήθηκε στις αμινοξικές ακολουθίες, ποιες αντικαταστάσεις έγιναν και ποια είναι τα αποτελέσματα του AMYLPRES2 μετά τις αντικαταστάσεις. Στην ομάδα πέντε (5) στο πεπτίδιο GTLVTVS(S), το κατάλοιπο Σερίνη βρίσκεται σε παρένθεση διότι ενώ δεν συμπεριλαμβάνεται στο μοτίβο, αντικαταστάθηκε από το κατάλοιπο Ασπαρτικό Οξύ για να επιτευχθεί η απαλοιφή του πεπτιδίου αυτού από τα αποτελέσματα του AMYLPRED2. Στην στήλη «Αλυσίδα» με Ε αναφέρεται η ελαφριά αλυσίδα και με Β η βαριά αλυσίδα. Επίσης, παρατηρήθηκαν τα πεπτίδια-μοτίβα W[VIL][GA] και GCLVK αλλά δεν συμπεριλήφθηκαν στις επιφανειακές ομάδες καθώς επίσης δεν έγιναν αμινοξικές αντικαταστάσεις αμινοξικών καταλοίπων σε αυτά διότι τα κατάλοιπα που τα αποτελούν είναι επιφανειακά.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα μονοκλωνικά αντισώματα αποτελούν μία από τις ραγδαία αναπτυσσόμενες και πολλά υποσχόμενες κατηγορίες θεραπευτικών μορίων. Χρησιμοποιούνται ήδη θεραπευτικά σε αυτοάνοσα νοσήματα, καρδιαγγειακές και μολυσματικές ασθένειες, μεταμόσχευση νεφρών και σε διάφορα είδη καρκίνου. Συνδέονται ειδικά με το αντιγόνο-στόχο και ενεργοποιούν τους φυσιολογικούς μηχανισμούς του οργανισμού για να τον καταπολεμήσουν (Modjtahedi, Ali et al. 2012).

Από το 1986 που έλαβε έγκριση το πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα Muromomab, μέχρι και σήμερα έχουν λάβει έγκριση από τον FDA πάνω από τριάντα (30) μονοκλωνικά αντισώματα, από τα οποία τα δεκατέσσερα (14) στοχεύουν σε καρκινικά κύτταρα διαφόρων ειδών καρκίνων (Firer and Gellerman 2012). Τα μονοκλωνικά αντισώματα απασχολούν μεγάλη μερίδα επιστημόνων και φαρμακευτικών εταιριών, καθώς τα τελευταία χρόνια διεξάγονται πολυάριθμες έρευνες για τον σχεδιασμό νέων αντισωμάτων αλλά και την βελτιστοποίηση των υπαρχόντων (Modjtahedi, Ali et al. 2012).

Επίσης, εκτός από τον σχεδιασμό νέων μονοκλωνικών αντισωμάτων, μεγάλη έρευνα διεξάγεται για την αξιοποίηση των υπαρχόντων και σε άλλες ασθένειες από αυτές που ήδη χρησιμοποιούνται θεραπευτικά (Willis and Robertson 2014). Κάποιες από αυτές τις μελέτες έχουν δώσει θετικά αποτελέσματα, καθώς μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται ήδη για συγκεκριμένες ασθένειες, την τελευταία πενταετία έχουν λάβει έγκριση για την εφαρμογή τους και σε άλλες κλινικές ενδείξεις (Bauer, Rancea et al. 2012).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ιδιαίτερη σημασία στην επιστημονική κοινότητα δίνεται στην βελτιστοποίηση των ήδη υπαρχόντων μονοκλωνικών αντισωμάτων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το μονοκλωνικό αντίσωμα Trastuzumab, το οποίο από το 1998 χρησιμοποιείται θεραπευτικά ενάντια του καρκίνου του μαστού. Μόλις πέρσι (2013), ολοκληρώθηκαν οι κλινικές μελέτες και το αντίσωμα αυτό έλαβε νέα έγκριση από τον FDA για θεραπευτική χρήση,

συζευγμένο με την ουσία mertansine, πάλι ενάντια στον καρκίνο του μαστού (Ballantyne and Dhillon 2013).

Ένα από τα μεγαλύτερα μειονεκτήματα των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι η τάση που έχουν να σχηματίζουν συσσωματώματα σε μεγάλες συγκεντρώσεις, και κατά την παρασκευή τους, και κατά την χορήγηση τους στον ασθενή. Ως συνέπεια από τον σχηματισμό συσσωματωμάτων είναι η επαγωγή ανοσολογικής απάντησης από τον οργανισμό καθώς και η αναστολή της λειτουργίας τους εφόσον ο οργανισμός τα αναγνωρίζει ως «ξένα» και προσπαθεί να τα καταπολεμήσει (Chames, Van Regenmortel et al. 2009).

Αξιοσημείωτες προσπάθειες έχουν γίνει στη δημιουργία λογισμικών, τα οποία αναγνωρίζουν μέσω διαφόρων αλγορίθμων πρόγνωσης, δεχόμενα ως είσοδο την πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης, κατάλοιπα τα οποία χαρακτηρίζονται ως περισσότερο επιρρεπή στη δημιουργία συσσωματωμάτων (Agrawal, Kumar et al. 2011). Αξιοσημείωτες είναι οι προσπάθειες του εργαστηρίου μας, που κατέληξαν στη δημιουργία δύο συναινετικών αλγορίθμων πρόγνωσης, το λογισμικό AMYLPRED (Frousios, Iconomidou et al. 2009), και το λογισμικό AMYLPRED2 (Tsolis, Papandreou et al. 2013).

Στην παρούσα μελέτη, στόχος ήταν η υπολογιστική βελτιστοποίηση των μονοκλωνικών αντισωμάτων του συνόλου δεδομένων σε δομικό επίπεδο. Επιχειρήθηκαν αντικαταστάσεις αμινοξικών καταλοίπων, με συγκεκριμένα κριτήρια, οι οποίες έδωσαν εξαιρετικά θετικά αποτελέσματα στην ελαχιστοποίηση ή και την ολική έλλειψη των περιοχών στην επιφάνεια των αντισωμάτων που είχαν προβλεφθεί από τον συναινετικό αλγόριθμο AMYLPRED2.

Από το πλήθος των αντικαταστάσεων που παρουσιάστηκαν στον Πίνακας 11, συμπεραίνεται ότι υπάρχουν πέντε ιδιαίτερα ευνοϊκές αντικαταστάσεις αμινοξικών καταλοίπων στην ελαχιστοποίηση και «εξαφάνιση» ολόκληρων περιοχών που προβλέπονται με τάση για συσσωμάτωση. Αυτές είναι, η αντικατάσταση του υδρόφοβου καταλοίπου Ισολευκίνη (ILE, I) από το πολικό κατάλοιπο Θρεονίνη (THR, T), του πολικού καταλοίπου Θρεονίνη (THR, T) από το επίσης πολικό κατάλοιπο Σερίνη (SER, S), καθώς και από το αρνητικά φορτισμένο κατάλοιπο Ασπαρτικό Οξύ

(ASP, D). Ακόμα η αντικατάσταση του πολικού καταλοίπου Σερίνη (SER, S) από το Ασπαρτικό Οξύ (ASP, D), και η αντικατάσταση του υδρόφοβου καταλοίπου Τυροσίνη (TYR, Y) από το φορτισμένο κατάλοιπο Λυσίνη (LYS, K).

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του Πίνακας 12, το αμινοξικό κατάλοιπο που υπερτερεί στις αντικαταστάσεις είναι το πολικό κατάλοιπο Θρεονίνη (THR, T) με μεγάλη διαφορά σε σχέση με τα υπόλοιπα κατάλοιπα. Στη συνέχεια ακολουθούν τα αμινοξικά κατάλοιπα Ισολευκίνη (ILE, I), Τυροσίνη (TYR, Y) και Σερίνη (SER, S), στο σύνολο των 106 αμινοξικών αντικαταστάσεων σε όλο το σύνολο δεδομένων.

Επίσης, παρατηρώντας τα αποτελέσματα του Πίνακας 13, το αμινοξικό κατάλοιπο που υπερτερεί στις αντικαταστάσεις είναι το αρνητικά φορτισμένο κατάλοιπο Ασπαρτικό Οξύ (ASP, D). Στη συνέχεια βρίσκεται το πολικό κατάλοιπο Σερίνη (SER, S) με σχετικά μικρή διαφορά από το Ασπαρτικό Οξύ και ακολουθούν τα αμινοξικά κατάλοιπα Λυσίνη (LYS, K) και Θρεονίνη (THR, T), στο σύνολο των 106 αμινοξικών αντικαταστάσεων σε όλο το σύνολο δεδομένων.

Ιδιαίτερα εντυπωσιακά είναι τα αποτελέσματα της ομαδοποίησης των αποτελεσμάτων του λογισμικού AMYLPRED2, στην πρωτοταγή δομή (μοτίβα) καθώς και στην τριτοταγή δομή (clusters) των πρωτεϊνών του συνόλου δεδομένων. Στις εικόνες 67 και 68 είναι εμφανές πως τα επιφανειακά clusters από τα κατάλοιπα που έχουν μεγαλύτερη τάση για σχηματισμό συσσωματωμάτων, είναι αρκετά συντηρημένα σε όλες τις δομές των μονοκλωνικών αντισωμάτων του συνόλου δεδομένων, κυρίως το cluster με τον αριθμό 1 και το cluster με τον αριθμό 3.

Αλλά και στην πρωτοταγή δομή των αντισωμάτων φαίνεται ξεκάθαρα η συντήρηση των πεπτιδίων με τάση για συσσωμάτωση στις εικόνες 65 και 66, και διαπιστώνεται και από την ύπαρξη των μοτίβων που παρουσιάστηκαν στους πίνακες 14 και 15. Μετά από την συσχέτιση των μοτίβων και των επιφανειακών clusters στον Πίνακας 16, εξάγονται σημαντικά συμπεράσματα. Ένα από αυτά, είναι ότι ένα πεπτίδιο μπορεί να μεταβεί από τον χαρακτηρισμό aggregation-prone στον χαρακτηρισμό μη aggregation-prone πεπτίδιο, από μία και μόνο αντικατάσταση, είτε από το πολύ δύο αντικαταστάσεις αμινοξικών καταλοίπων. Ακόμα,

παρατηρείται ότι υπάρχουν παραπάνω από ένας συνδυασμός αντικαταστάσεων αμινοξικών καταλοίπων για να καταλήξουμε στο επιθυμητό αποτέλεσμα.

Είναι πολύ ελπιδοφόρο το γεγονός ότι ολοκληρώνοντας την παρούσα μελέτη, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι με συγκεκριμένες αντικαταστάσεις αμινοξικών καταλοίπων και ενεργειακές βελτιστοποιήσεις των νέων μοντέλων δομών, στο σύνολο των επτά (7) μονοκλωνικών αντισωμάτων, μπορούν να προταθούν νέα υπολογιστικά μοντέλα φαρμάκων. Τα μοντέλα αυτά θα είναι κατά μεγάλο ποσοστό λιγότερο επιρρεπή στον σχηματισμό συσσωματωμάτων, οπότε κατά συνέπεια και στην επαγωγή ανοσολογικής απάντησης στους ασθενείς που θα χορηγηθούν.

4.1 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά, καθώς δημιουργήθηκαν επτά νέα μοντέλα δομών μονοκλωνικών αντισωμάτων, τα οποία είναι υπολογιστικά βελτιστοποιημένα, ως προς την τάση που έχουν συγκεκριμένες περιοχές της επιφάνειάς τους να σχηματίζουν συσσωματώματα. Η μελέτη αυτή διεξήχθη σε ένα σύνολο μονοκλωνικών αντισωμάτων που στοχεύουν σε καρκινικά κύτταρα. Αυτή η διαδικασία μπορεί να γενικευτεί και σε άλλα μονοκλωνικά αντισώματα, οδηγώντας στην ελάττωση της τάσης για σχηματισμό συσσωματωμάτων, βελτιώνοντας με αυτό τον τρόπο την διαλυτότητά τους. Ήδη, στο εργαστήριό μας, η διαδικασία αυτή διεξάγεται σε ένα σύνολο μονοκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται εμπορικά σε αυτοάνοσες ασθένειες. Τα πρώτα αποτελέσματα είναι επίσης ενθαρρυντικά, πράγμα που ενισχύει την πρόταση δημιουργίας μιας γενικευμένης μεθόδου βελτιστοποίησης της διαλυτότητας των μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Καθώς η συγκεκριμένη μελέτη είναι εξολοκλήρου υπολογιστική, προτείνεται, τα αποτελέσματά της να υπολογιστούν και να πιστοποιηθούν πειραματικά, για να διασφαλιστεί και πειραματικά ότι οι αντικαταστάσεις των αμινοξικών καταλοίπων που προτείνονται, θα μειώσουν την τάση των μονοκλωνικών αντισωμάτων να σχηματίζουν συσσωματώματα και θα βελτιστοποιήσουν τη διαλυτότητα των μονοκλωνικών αντισωμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abbas, A. K., K. M. Murphy, et al. (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." Nature 383(6603): 787-793.

Agrawal, N. J., S. Kumar, et al. (2011). "Aggregation in protein-based biotherapeutics: computational studies and tools to identify aggregation-prone regions." J Pharm Sci 100(12): 5081-5095.

Altman, J. D., P. A. Moss, et al. (2011). "Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. Science. 1996. 274: 94-96." J Immunol 187(1): 7-9.

Ashton-Rickardt, P. G., A. Bandeira, et al. (1994). "Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus." Cell 76(4): 651-663.

Bach, E. A., M. Aguet, et al. (1997). "The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling." Annu Rev Immunol 15: 563-591.

Ballantyne, A. and S. Dhillon (2013). "Trastuzumab emtansine: first global approval." Drugs 73(7): 755-765.

Barok, M., H. Joensuu, et al. (2014). "Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance." Breast Cancer Res 16(2): R22.

Bauer, K., M. Rancea, et al. (2012). "Rituximab, ofatumumab and other monoclonal anti-CD20 antibodies for chronic lymphocytic leukaemia." Cochrane Database Syst Rev 11: CD008079.

Benschop, R. J. and J. C. Cambier (1999). "B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates." Curr Opin Immunol 11(2): 143-151.

Bentley, G. A. (1994). "Twenty years of antibody structure." Res Immunol 145(1): 31-33.

Berman, H. M., J. Westbrook, et al. (2000). "The Protein Data Bank." Nucleic Acids Res 28(1): 235-242.

Beutler, B. (2004). "Innate immunity: an overview." Mol Immunol 40(12): 845-859.

Bonilla, F. A. and H. C. Oettgen (2010). "Adaptive immunity." J Allergy Clin Immunol 125(2 Suppl 2): S33-40.

Boon, T. and P. van der Bruggen (1996). "Human tumor antigens recognized by T lymphocytes." J Exp Med 183(3): 725-729.

Buggins, A. G., G. J. Mufti, et al. (2002). "Peripheral blood but not tissue dendritic cells express CD52 and are depleted by treatment with alemtuzumab." Blood 100(5): 1715-1720.

Burkhardt, J. K., H. Riina, et al. (2012). "Intra-arterial delivery of bevacizumab after blood-brain barrier disruption for the treatment of recurrent glioblastoma: progression-free survival and overall survival." World Neurosurg 77(1): 130-134.

Burnet, F. M. (1969). "The evolution of adaptive immunity in vertebrates." Acta Pathol Microbiol Scand 76(1): 1-11.

Burstein, H. J. (2005). "The distinctive nature of HER2-positive breast cancers." N Engl J Med 353(16): 1652-1654.

Butler, J. E., N. Wertz, et al. (2009). "Porcine IgG: structure, genetics, and evolution." Immunogenetics 61(3): 209-230.

Carter, P. (2001). "Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies." Nat Rev Cancer 1(2): 118-129.

Casadevall, A. (2003). "Antibody-mediated immunity against intracellular pathogens: two-dimensional thinking comes full circle." Infect Immun 71(8): 4225-4228.

Casadevall, A., E. Dadachova, et al. (2004). "Passive antibody therapy for infectious diseases." Nat Rev Microbiol 2(9): 695-703.

Chames, P., M. Van Regenmortel, et al. (2009). "Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future." Br J Pharmacol 157(2): 220-233.

Chang, T. W., P. C. Wu, et al. (2007). "Anti-IgE antibodies for the treatment of IgE-mediated allergic diseases." Adv Immunol 93: 63-119.
Chen, K., W. Xu, et al. (2009). "Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils." Nat Immunol 10(8): 889-898.
Chennamsetty, N., V. Voynov, et al. (2010). "Prediction of aggregation prone regions of therapeutic proteins." J Phys Chem B 114(19): 6614-6624.
Cho, H. S., K. Mason, et al. (2003). "Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab." Nature 421(6924): 756-760.
Clynes, R. A., T. L. Towers, et al. (2000). "Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets." Nat Med 6(4): 443-446.
Cooper, M. D. and A. R. Lawton, 3rd (1974). "The development of the immune system." Sci Am 231(5): 58-72.
Corcos, D., M. J. Osborn, et al. (2011). "B-cell receptors and heavy chain diseases: guilty by association?" Blood 117(26): 6991-6998.
Cromwell, M. E., E. Hilario, et al. (2006). "Protein aggregation and bioprocessing." AAPS J 8(3): E572-579.
Davies, D. R., E. A. Padlan, et al. (1975). "Three-dimensional structure of immunoglobulins." Annu Rev Biochem 44: 639-667.
de Bono, J. S., J. Bellmunt, et al. (2007). "Open-label phase II study evaluating the efficacy and safety of two doses of pertuzumab in castrate chemotherapy-naive patients with hormone-refractory prostate cancer." J Clin Oncol 25(3): 257-262.
Delacroix, D. L., C. Dive, et al. (1982). "IgA subclasses in various secretions and in serum." Immunology 47(2): 383-385.
Di Gaetano, N., E. Cittera, et al. (2003). "Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo." J Immunol 171(3): 1581-1587.
Downward, J., P. Parker, et al. (1984). "Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor." Nature 311(5985): 483-485.
Dreux, A. C., D. J. Lamb, et al. (2006). "The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis." Atherosclerosis 186(1): 38-53.
Du, J., H. Wang, et al. (2007). "Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody Rituximab." J Biol Chem 282(20): 15073-15080.
Du, J., H. Yang, et al. (2009). "Structure of the Fab fragment of therapeutic antibody Ofatumumab provides insights into the recognition mechanism with CD20." Mol Immunol 46(11-12): 2419-2423.
Dumont, F. J. (2002). "CAMPATH (alemtuzumab) for the treatment of chronic lymphocytic leukemia and beyond." Expert Rev Anticancer Ther 2(1): 23-35.
Dutton, R. W., L. M. Bradley, et al. (1998). "T cell memory." Annu Rev Immunol 16: 201-223.
Edwards, J. C., L. Szczepanski, et al. (2004). "Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis." N Engl J Med 350(25): 2572-2581.
Elliott, D. E., S. S. Siddique, et al. (2014). "Innate immunity in disease." Clin Gastroenterol Hepatol 12(5): 749-755.
Ellmeier, W., S. Sawada, et al. (1999). "The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development." Annu Rev Immunol 17: 523-554.
Engvall, E. and P. Perlmann (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G." Immunochemistry 8(9): 871-874.
Fagarasan, S. and T. Honjo (2003). "Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences." Nat Rev Immunol 3(1): 63-72.

Ferber, M., V. Zoete, et al. (2012). "T-cell receptors binding orientation over peptide/MHC class I is driven by long-range interactions." PLoS One 7(12): e51943.
Firer, M. A. and G. Gellerman (2012). "Targeted drug delivery for cancer therapy: the other side of antibodies." J Hematol Oncol 5: 70.
Fox, E. J. (2010). "Alemtuzumab in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis." Expert Rev Neurother 10(12): 1789-1797.
Franklin, M. C., K. D. Carey, et al. (2004). "Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex." Cancer Cell 5(4): 317-328.
Frousios, K. K., V. A. Iconomidou, et al. (2009). "Amyloidogenic determinants are usually not buried." BMC Struct Biol 9: 44.
Garcia, K. C. and L. Teyton (1998). "T-cell receptor peptide-MHC interactions: biological lessons from structural studies." Curr Opin Biotechnol 9(4): 338-343.
Germain, R. N., A. J. Sant, et al. (1988). "The molecular basis of antigen presentation." Princess Takamatsu Symp 19: 179-191.
Gilbert, M. R., J. J. Dignam, et al. (2014). "A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma." N Engl J Med 370(8): 699-708.
Goldenberg, D. M. and R. M. Sharkey (2007). "Novel radiolabeled antibody conjugates." Oncogene 26(25): 3734-3744.
Goldsby, A. R., J. T. Kindt, et al. (2005). "Immunology." 5th edition Macmillan Higher Education.
Goodnow, C. C. (2007). "Multistep pathogenesis of autoimmune disease." Cell 130(1): 25-35.
Gould, H. J., B. J. Sutton, et al. (2003). "The biology of IGE and the basis of allergic disease." Annu Rev Immunol 21: 579-628.
Greenbaum, J. A., P. H. Andersen, et al. (2007). "Towards a consensus on datasets and evaluation metrics for developing B-cell epitope prediction tools." J Mol Recognit 20(2): 75-82.
Grillo-Lopez, A. J., C. A. White, et al. (1999). "Overview of the clinical development of rituximab: first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma." Semin Oncol 26(5 Suppl 14): 66-73.
Guevara-Patino, J. A., M. J. Turk, et al. (2003). "Immunity to cancer through immune recognition of altered self: studies with melanoma." Adv Cancer Res 90: 157-177.
Halter, R., J. Pohlner, et al. (1984). "IgA protease of Neisseria gonorrhoeae: isolation and characterization of the gene and its extracellular product." EMBO J 3(7): 1595-1601.
Harris, L. J., E. Skaletsky, et al. (1998). "Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody." J Mol Biol 275(5): 861-872.
Haste Andersen, P., M. Nielsen, et al. (2006). "Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures." Protein Sci 15(11): 2558-2567.
Hastings, J., P. de Matos, et al. (2013). "The ChEBI reference database and ontology for biologically relevant chemistry: enhancements for 2013." Nucleic Acids Res 41(Database issue): D456-463.
Herbst, R. S. (2004). "Review of epidermal growth factor receptor biology." Int J Radiat Oncol Biol Phys 59(2 Suppl): 21-26.
Hofmann, H. J. and D. Hadge (1987). "On the theoretical prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences." Biomed Biochim Acta 46(11): 855-866.
Hooft, R. W., G. Vriend, et al. (1996). "Errors in protein structures." Nature 381(6580): 272.
Hooks, M. A., C. S. Wade, et al. (1991). "Muromonab CD-3: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use in transplantation." Pharmacotherapy 11(1): 26-37.

Huang, J. and W. Honda (2006). "CED: a conformational epitope database." BMC Immunol 7: 7.
Huber, R. (1980). "Spatial structure of immunoglobulin molecules." Klin Wochenschr 58(22): 1217-1231.
Ivanciuc, O., C. H. Schein, et al. (2009). "Structural analysis of linear and conformational epitopes of allergens." Regul Toxicol Pharmacol 54(3 Suppl): S11-19.
Jaglowski, S. M. and J. C. Byrd (2010). "Rituximab in chronic lymphocytic leukemia." Semin Hematol 47(2): 156-169.
James, L. C., G. Hale, et al. (1999). "1.9 A structure of the therapeutic antibody CAMPATH-1H fab in complex with a synthetic peptide antigen." J Mol Biol 289(2): 293-301.
Jones, P. T., P. H. Dear, et al. (1986). "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse." Nature 321(6069): 522-525.
Kabsch, W. and C. Sander (1983). "Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features." Biopolymers 22(12): 2577-2637.
Kanehisa, M., S. Goto, et al. (2012). "KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets." Nucleic Acids Res 40(Database issue): D109-114.
Keating, M. and M. Hallek (2002). "Alemtuzumab, the first monoclonal antibody (MAb) directed against CD52." Med Oncol 19 Suppl: S1-2.
Kimbrell, D. A. and B. Beutler (2001). "The evolution and genetics of innate immunity." Nat Rev Genet 2(4): 256-267.
Knox, C., V. Law, et al. (2011). "DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs." Nucleic Acids Res 39(Database issue): D1035-1041.
Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature 256(5517): 495-497.
Kringelum, J. V., M. Nielsen, et al. (2013). "Structural analysis of B-cell epitopes in antibody:protein complexes." Mol Immunol 53(1-2): 24-34.
Krishnaswamy, G., O. Ajitawi, et al. (2006). "The human mast cell: an overview." Methods Mol Biol 315: 13-34.
Kugelberg, E. (2014). "Innate immunity: A wee protection." Nat Rev Immunol 14(6): 359.
Laskowski, R. A., D. S. Moss, et al. (1993). "Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures." J Mol Biol 231(4): 1049-1067.
Law, V., C. Knox, et al. (2014). "DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism." Nucleic Acids Res 42(Database issue): D1091-1097.
Le, X. F., F. Pruefer, et al. (2005). "HER2-targeting antibodies modulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 via multiple signaling pathways." Cell Cycle 4(1): 87-95.
Lefranc, M. P., V. Giudicelli, et al. (2009). "IMGT, the international ImMunoGeneTics information system." Nucleic Acids Res 37(Database issue): D1006-1012.
Lerner, E. A. (1981). "How to make a hybridoma." Yale J Biol Med 54(5): 387-402.
Levine, J. S. and J. S. Koh (1999). "The role of apoptosis in autoimmunity: immunogen, antigen, and accelerant." Semin Nephrol 19(1): 34-47.
Li, S., K. R. Schmitz, et al. (2005). "Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab." Cancer Cell 7(4): 301-311.
Li, X. C. and M. Raghavan (2010). "Structure and function of major histocompatibility complex class I antigens." Curr Opin Organ Transplant 15(4): 499-504.
Li, Y., Y. Yin, et al. (2013). "Structural and biophysical insights into the role of CD4 and CD8 in T cell activation." Front Immunol 4: 206.
Lin, T. S. (2010). "Ofatumumab: a novel monoclonal anti-CD20 antibody." Pharmgenomics Pers Med 3: 51-59.

LoRusso, P. M., D. Weiss, et al. (2011). "Trastuzumab emtansine: a unique antibody-drug conjugate in development for human epidermal growth factor receptor 2-positive cancer." Clin Cancer Res 17(20): 6437-6447.
Los, M., J. M. Roodhart, et al. (2007). "Target practice: lessons from phase III trials with bevacizumab and vatalanib in the treatment of advanced colorectal cancer." Oncologist 12(4): 443-450.
Macardle, P. J. and I. C. Nicholson (2002). "Cd20." J Biol Regul Homeost Agents 16(2): 136-138.
Mareeva, T., E. Martinez-Hackert, et al. (2008). "How a T cell receptor-like antibody recognizes major histocompatibility complex-bound peptide." J Biol Chem 283(43): 29053-29059.
Matsuuchi, L. and M. R. Gold (2001). "New views of BCR structure and organization." Curr Opin Immunol 13(3): 270-277.
Mauri, C. and A. Bosma (2012). "Immune regulatory function of B cells." Annu Rev Immunol 30: 221-241.
McCafferty, J., A. D. Griffiths, et al. (1990). "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains." Nature 348(6301): 552-554.
Medzhitov, R. (2007). "Recognition of microorganisms and activation of the immune response." Nature 449(7164): 819-826.
Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immune recognition: mechanisms and pathways." Immunol Rev 173: 89-97.
Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "Innate immunity: impact on the adaptive immune response." Curr Opin Immunol 9(1): 4-9.
Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (2000). "How does the immune system distinguish self from nonself?" Semin Immunol 12(3): 185-188; discussion 257-344.
Messersmith, W. A. and D. J. Ahnen (2008). "Targeting EGFR in colorectal cancer." N Engl J Med 359(17): 1834-1836.
Michaelsen, T. E. (1988). "Alteration of the conformation of human IgG subclasses by reduction of the hinge S-S bonds." Mol Immunol 25(7): 639-646.
Middleton, D., M. Curran, et al. (2002). "Natural killer cells and their receptors." Transpl Immunol 10(2-3): 147-164.
Miller, J. F. (1993). "Self-nonself discrimination and tolerance in T and B lymphocytes." Immunol Res 12(2): 115-130.
Miller, J. F. (2002). "The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes." Immunol Rev 185: 7-14.
Mitri, Z., T. Constantine, et al. (2012). "The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy." Chemother Res Pract 2012: 743193.
Modjtahedi, H., S. Ali, et al. (2012). "Therapeutic application of monoclonal antibodies in cancer: advances and challenges." Br Med Bull 104: 41-59.
Moja, L., L. Tagliabue, et al. (2012). "Trastuzumab containing regimens for early breast cancer." Cochrane Database Syst Rev 4: CD006243.
Muller, Y. A., Y. Chen, et al. (1998). "VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 A resolution and mutational analysis of the interface." Structure 6(9): 1153-1167.
Nahta, R. and F. J. Esteva (2006). "Herceptin: mechanisms of action and resistance." Cancer Lett 232(2): 123-138.
NCBI_Resource, C. (2013). "Database resources of the National Center for Biotechnology Information." Nucleic Acids Res 41(Database issue): D8-D20.
Nelson, P. N., G. M. Reynolds, et al. (2000). "Monoclonal antibodies." Mol Pathol 53(3): 111-117.

Neuberger, M. S., G. T. Williams, et al. (1985). "A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function." Nature 314(6008): 268-270.
Niculescu-Duvaz, I. (2010). "Trastuzumab emtansine, an antibody-drug conjugate for the treatment of HER2+ metastatic breast cancer." Curr Opin Mol Ther 12(3): 350-360.
Nossal, G. J. (1985). "Sir Frank MacFarlane Burnet (1899-1985)." Nature 317(6033): 108.
Oda, K., Y. Matsuoka, et al. (2005). "A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling." Mol Syst Biol 1: 2005 0010.
Olayioye, M. A. (2001). "Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members." Breast Cancer Res 3(6): 385-389.
Pancer, Z. and M. D. Cooper (2006). "The evolution of adaptive immunity." Annu Rev Immunol 24: 497-518.
Parish, C. R. and E. R. O'Neill (1997). "Dependence of the adaptive immune response on innate immunity: some questions answered but new paradoxes emerge." Immunol Cell Biol 75(6): 523-527.
Pettersen, E. F., T. D. Goddard, et al. (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." J Comput Chem 25(13): 1605-1612.
Pontecorvo, G. (1976). "Polyethylene glycol (PEG) in the production of mammalian somatic cell hybrids." Birth Defects Orig Artic Ser 12(7): 399-400.
Proctor, M. and P. J. Manning (1990). "Production of immunoglobulin A protease by Streptococcus pneumoniae from animals." Infect Immun 58(9): 2733-2737.
Quintas-Cardama, A. and S. O'Brien (2009). "Targeted therapy for chronic lymphocytic leukemia." Target Oncol 4(1): 11-21.
Ramachandran, G. N., C. Ramakrishnan, et al. (1963). "Stereochemistry of polypeptide chain configurations." J Mol Biol 7: 95-99.
Rammensee, H., J. Bachmann, et al. (1999). "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." Immunogenetics 50(3-4): 213-219.
Ratzinger, G., J. L. Reagan, et al. (2003). "Differential CD52 expression by distinct myeloid dendritic cell subsets: implications for alemtuzumab activity at the level of antigen presentation in allogeneic graft-host interactions in transplantation." Blood 101(4): 1422-1429.
Reichert, J. M., C. J. Rosensweig, et al. (2005). "Monoclonal antibody successes in the clinic." Nat Biotechnol 23(9): 1073-1078.
Reinherz, E. L., K. Tan, et al. (1999). "The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II." Science 286(5446): 1913-1921.
Richter, W. S., V. Ivancevic, et al. (2011). "99mTc-besilesomab (Scintimun) in peripheral osteomyelitis: comparison with 99mTc-labelled white blood cells." Eur J Nucl Med Mol Imaging 38(5): 899-910.
Riechmann, L., M. Clark, et al. (1988). "Reshaping human antibodies for therapy." Nature 332(6162): 323-327.
Roberts, C. J. (2014). "Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control." Trends Biotechnol.
Rojas, R. and G. Apodaca (2002). "Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells." Nat Rev Mol Cell Biol 3(12): 944-955.
Rose, P. W., C. Bi, et al. (2013). "The RCSB Protein Data Bank: new resources for research and education." Nucleic Acids Res 41(Database issue): D475-482.
Rosenberg, A. S. (2006). "Effects of protein aggregates: an immunologic perspective." AAPS J 8(3): E501-507.
Rudolph, M. G., R. L. Stanfield, et al. (2006). "How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors." Annu Rev Immunol 24: 419-466.

Saha, S. and G. P. Raghava (2006). "Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network." Proteins 65(1): 40-48.
Sali, A. and T. L. Blundell (1993). "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints." J Mol Biol 234(3): 779-815.
Sanchez de Groot, N., I. Pallares, et al. (2005). "Prediction of "hot spots" of aggregation in disease-linked polypeptides." BMC Struct Biol 5: 18.
Santin, A. D., S. Bellone, et al. (2008). "Trastuzumab treatment in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma overexpressing HER2/neu." Int J Gynaecol Obstet 102(2): 128-131.
Schroeder, H. W., Jr. and L. Cavacini (2010). "Structure and function of immunoglobulins." J Allergy Clin Immunol 125(2 Suppl 2): S41-52.
Scott, S. D. (1998). "Rituximab: a new therapeutic monoclonal antibody for non-Hodgkin's lymphoma." Cancer Pract 6(3): 195-197.
Secher, D. S. and D. C. Burke (1980). "A monoclonal antibody for large-scale purification of human leukocyte interferon." Nature 285(5765): 446-450.
Semenza, G. L. (2008). "A new weapon for attacking tumor blood vessels." N Engl J Med 358(19): 2066-2067.
Shuptrine, C. W., R. Surana, et al. (2012). "Monoclonal antibodies for the treatment of cancer." Semin Cancer Biol 22(1): 3-13.
Siberil, S., C. A. Dutertre, et al. (2005). "Therapeutic monoclonal antibodies: a little history, a lot of engineering, and... some clinical successes." Transfus Clin Biol 12(2): 114-122.
Simell, B., T. Kilpi, et al. (2006). "Subclass distribution of natural salivary IgA antibodies against pneumococcal capsular polysaccharide of type 14 and pneumococcal surface adhesin A (PsaA) in children." Clin Exp Immunol 143(3): 543-549.
Smith, G. P. (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." Science 228(4705): 1315-1317.
Spiegelberg, H. L. (1989). "Biological role of different antibody classes." Int Arch Allergy Appl Immunol 90 Suppl 1: 22-27.
St Geme, J. W., 3rd, M. L. de la Morena, et al. (1994). "A Haemophilus influenzae IgA protease-like protein promotes intimate interaction with human epithelial cells." Mol Microbiol 14(2): 217-233.
Stelzer, G., I. Dalah, et al. (2011). "In-silico human genomics with GeneCards." Hum Genomics 5(6): 709-717.
Tedder, T. F., M. Streuli, et al. (1988). "Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A 85(1): 208-212.
Thompson, J. D., D. G. Higgins, et al. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res 22(22): 4673-4680.
Thorn, C. F., T. E. Klein, et al. (2013). "PharmGKB: the Pharmacogenomics Knowledge Base." Methods Mol Biol 1015: 311-320.
Tong, J. C., T. W. Tan, et al. (2007). "Methods and protocols for prediction of immunogenic epitopes." Brief Bioinform 8(2): 96-108.
Tsolis, A. C., N. C. Papandreou, et al. (2013). "A consensus method for the prediction of 'aggregation-prone' peptides in globular proteins." PLoS One 8(1): e54175.
Turvey, S. E. and D. H. Broide (2010). "Innate immunity." J Allergy Clin Immunol 125(2 Suppl 2): S24-32.
UniProt_Consortium (2013). "Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013." Nucleic Acids Res 41(Database issue): D43-47.

Vajdos, F. F., C. W. Adams, et al. (2002). "Comprehensive functional maps of the antigen-binding site of an anti-ErbB2 antibody obtained with shotgun scanning mutagenesis." J Mol Biol 320(2): 415-428.
van Lookeren Campagne, M., C. Wiesmann, et al. (2007). "Macrophage complement receptors and pathogen clearance." Cell Microbiol 9(9): 2095-2102.
Velcheti, V., A. Viswanathan, et al. (2006). "The proportion of patients with metastatic non-small cell lung cancer potentially eligible for treatment with bevacizumab: a single institutional survey." J Thorac Oncol 1(5): 501.
Vermorken, J. B., R. Mesia, et al. (2008). "Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer." N Engl J Med 359(11): 1116-1127.
Vivier, E. and B. Malissen (2005). "Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited." Nat Immunol 6(1): 17-21.
Vriend, G. (1990). "WHAT IF: a molecular modeling and drug design program." J Mol Graph 8(1): 52-56, 29.
Waldmann, T. A. (2003). "Immunotherapy: past, present and future." Nat Med 9(3): 269-277.
Wang, W. (2005). "Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics." Int J Pharm 289(1-2): 1-30.
Wang, W., S. Singh, et al. (2007). "Antibody structure, instability, and formulation." J Pharm Sci 96(1): 1-26.
Weiner, G. J. (2010). "Rituximab: mechanism of action." Semin Hematol 47(2): 115-123.
Weissenbacher, A., C. Boesmueller, et al. (2010). "Alemtuzumab in solid organ transplantation and in composite tissue allotransplantation." Immunotherapy 2(6): 783-790.
Wellek, B., H. Hahn, et al. (1976). "Opsonizing activities of IgG, IgM antibodies and the C3b inactivator-cleaved third component of complement in macrophage phagocytosis." Agents Actions 6(1-3): 260-262.
Willis, M. and N. P. Robertson (2014). "Drug safety evaluation of alemtuzumab for multiple sclerosis." Expert Opin Drug Saf: 1-10.
Wilson, I. A. and R. L. Stanfield (1994). "Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes." Curr Opin Struct Biol 4(6): 857-867.
Wingren, C., T. E. Michaelsen, et al. (1996). "Comparison of surface properties of human IgA, IgE, IgG and IgM antibodies with identical and different specificities." Scand J Immunol 44(5): 430-436.
Wishart, D. S., C. Knox, et al. (2008). "DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets." Nucleic Acids Res 36(Database issue): D901-906.
Woof, J. M. and M. A. Kerr (2006). "The function of immunoglobulin A in immunity." J Pathol 208(2): 270-282.
Woof, J. M. and M. W. Russell (2011). "Structure and function relationships in IgA." Mucosal Immunol 4(6): 590-597.
Yin, Y., X. X. Wang, et al. (2012). "Crystal structure of a complete ternary complex of T-cell receptor, peptide-MHC, and CD4." Proc Natl Acad Sci U S A 109(14): 5405-5410.
Yu, D. and M. C. Hung (2000). "Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies." Oncogene 19(53): 6115-6121.
Zhang, A., S. K. Singh, et al. (2012). "Distinct aggregation mechanisms of monoclonal antibody under thermal and freeze-thaw stresses revealed by hydrogen exchange." Pharm Res 29(1): 236-250.
Zhang, B. (2009). "Ofatumumab." MAbs 1(4): 326-331.
Zhang, H., A. Berezov, et al. (2007). "ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies." J Clin Invest 117(8): 2051-2058.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs), τα οποία έχουν εγκριθεί από τον FDA για θεραπευτική χρήση.

2. Περιγραφή των ομάδων (clusters), από ποια πεπτίδια με τάση προς συσσωμάτωση αποτελούνται.

3. Abstract και Poster στο 35ο επιστημονικό συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών (ΕΕΒΕ), 23-25 Μαΐου 2013

4. Abstract και Poster στο 5ο επιστημονικό συνέδριο του Cambridge Healthtech Institute, 4-8 Νοεμβρίου 2013

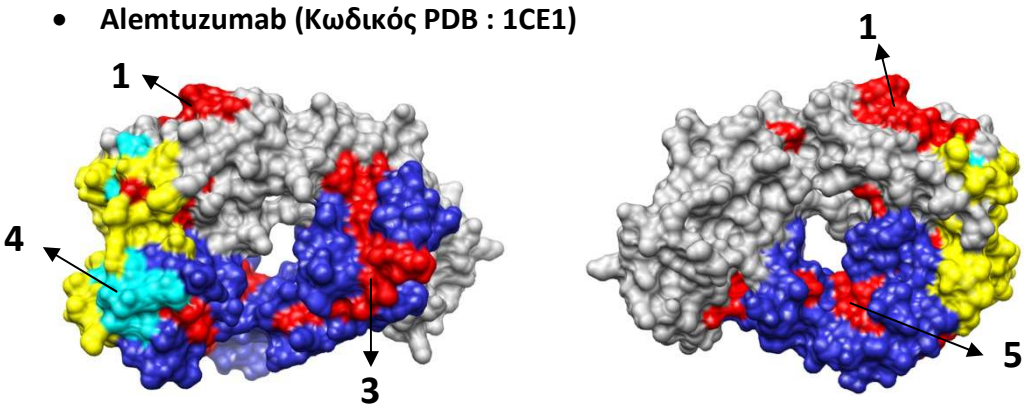
5. Abstract και Poster στο 8ο επιστημονικό συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Υπολογιστικής Βιολογίας και Βιοπληροφορικής, 22-24 Νοεμβρίου 2013

1. Μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs), τα οποία έχουν εγκριθεί από τον Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (FDA) για θεραπευτική χρήση.

ΕΓΚΡΙΣΗ FDA	ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΣΤΟΧΟΣ	ΤΥΠΟΣ	ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΝΔΕΙΞΗ
1986	Muromomab	Orthoclone OKT3	CD3	Murine IgG2a	Transplant rejection
1994	Abciximab	ReoPro	GP IIb/IIIa	Chimeric Fab	Prevention of re-stenosis after PTCA
1997	Daclizumab	Zenapax	CD25	Humanized IgG1	Transplant rejection
1997	Rituximab	Rituxan	CD20	Chimeric IgG1	B-cell lymphoma
1998	Basiliximab	Simulect	CD25	Chimeric IgG1	Transplant rejection
1998	Palivizumab	Synaagis	RSV/ProteinF	Humanized IgG1	RSV bronchiolitis
1998	Infliximab	Remicade	TNFα	Chimeric IgG1	Crohn's disease, rheumatoid arthritis
1998	Trastuzumab	Herceptin	HER2/neu	Humanized IgG1	Breast cancer
2000	Gemtuzumab	Mylotarg	CD33	Humanized	Acute myeloid leukaemia
2001	Alemtuzumab	MabCampath	CD52	Humanized IgG1	Chronic lymphatic leukaemia
2002	^{90}Y-ibritumomab	Zevalin	CD20	Murine IgG1	B-cell lymphoma
2002	Adalimumab	Humira	TNFα	Human IgG1	Rheumatoid arthritis
2003	Omalizumab	Xolair	IgE	Humanized IgG1	Asthma
2003	^{131}I-tositumomab	Bexxar	CD20	Murine IgG1	B-cell lymphoma
2003	Efalizumab	Raptiva	CD11a	Humanized IgG1	Psoriasis
2004	Bevacizumab	Avastin	VEGF-A	Humanized IgG1	Colorectal cancer
2004	Cetuximab	Erbitux	EGFR	Chimeric IgG1	Colorectal cancer
2004	Natalizumab	Tysabri	Integrin-α4	Humanized IgG4	Multiple sclerosis
2006	Ranibizumab	Lucectis	VEGF-A	Humanized IgG1	Wet-type age-related macular degeneration
2006	Panitumomab	Vectibis	EGFR	Human IgG2	Metastatic colorectal carcinoma
2007	Eculizumab	Soliris	C5	Humanized IgG2/4	Paroxysmal noctumal haemoglobinuria
2008	Certolizumab	Cimzia	TNFα	Humanized IgG1	Crohn's disease
2009	Ofatumumab	Arzerra	CD20	Human IgG1	Chronic lymphatic leukaemia
2011	Ipilimumab	Yervoy	CTLA-4	Human IgG1	Metastatic melanoma
2011	Brentuximab	Adcertis	CD30	Chimeric IgG1	ALCL & Hodgkin lymphoma
2012	Pertuzumab	Perjeta	HER2/neu	Humanized IgG1	Breast Cancer

2. Περιγραφή των ομάδων (clusters), από ποια πεπτίδια με τάση προς συσσωμάτωση αποτελούνται.

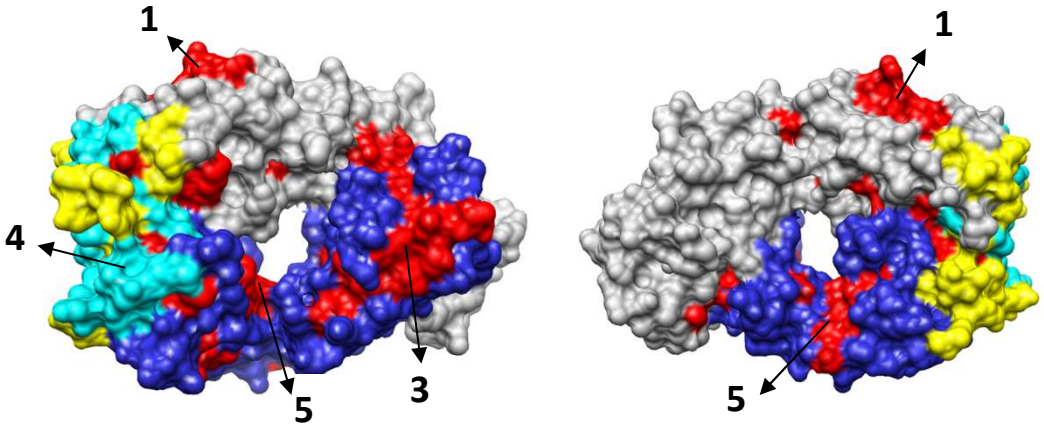
- **Alemtuzumab (Κωδικός PDB : 1CE1)**




```
                        10         20         30         40         50         60
Alemtuzumab_E   DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNID KYLNWYQQKP GKAPKLLIYN TNNLQTGVPS
Amylpred2                      ###  ### #        ####          #####  ##
                        70         80         90        100        110        120
Alemtuzumab_E   RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCLQ HISRPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
Amylpred2               #  #######     #######  #                        ######
                       130        140        150        160        170        180
Alemtuzumab_E   SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT
Amylpred2               ## ##########
                       190        200        210 211
Alemtuzumab_E   LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN R
Amylpred2
                        10         20         30         40         50         60
Alemtuzumab_B   QVQLQESGPG LVRPSQTLSL TCTVSGFTFT DFYMNWVRQP PGRGLEWIGF IRDKAKGYTT
Amylpred2                     ####  ##########  #######          ####  #
                        70         80         90        100        110        120
Alemtuzumab_B   EYNPSVKGRV TMLVDTSKNQ FSLRLSSVTA ADTAVYYCAR EGHTAAPFDY WGQGSLVTVS
Amylpred2               #  ####      ######      #######                 ######
                       130        140        150        160        170        180
Alemtuzumab_B   SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS
Amylpred2                                  ####  #                        ##
                       190        200        210        220
Alemtuzumab_B   SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE
Amylpred2          #######  ##     ### #######
```

ΟΜΑΔΑ	ΠΕΠΤΙΔΙΑ	ΑΛΥΣΙΔΑ	ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ
1	^{18}RVTITC-A^{25}	E	T20D	√
	^{70}DFTFTISSL^{78}	E	S76D	^{71}FTFTID^{76}
3	^{113}PSVFIF^{118}	E	S114D	^{115}VFI^{117}
	^{129}TASVVCLLNNFY^{140}	E	T129D	^{131}SVVCLLNNF^{139}
	^{184}YSLSSVVTV^{192}	B	Y184K & T191S	√
	^{198}GTQTYICNVN^{207}	B	T201S & I203T	√
4	^{46}LLIYNTN^{52}	E	Y49K	√
	^{17}TLSLTCTVSGFTFTDFYMNWV^{37}	B		^{17}TLSLTCTVSGFTFTDFYMNWV^{37}
	^{70}VTMLV^{74}	B	T71N	√
	^{81}FSLRLS^{86}	B	R82D	√
	^{83}IATYYCLQH^{91}	E		^{83}IATYYCLQH^{91}
	^{47}WIGFI^{51} (F50)	B	Όχι επιφ	^{47}WIGFI^{51}
5	^{114}GSLVTV^{119}	B	L116S	√
	^{93}TAVYYCA^{99}	B	T93S & V95D	√

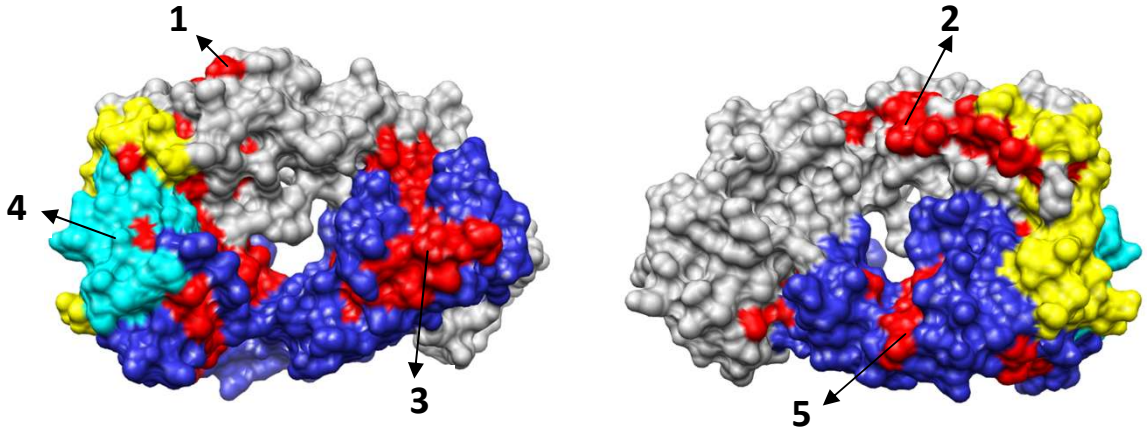
- **Bevacizumab (Κωδικός PDB : 1BJ1)**




```
                        10         20         30         40         50         60
Bevacizumab_E   DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIYF TSSLHSGVPS
Amylpred2                     ###  ###        ######       ######  ###
                        70         80         90        100        110        120
Bevacizumab_E   RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
Amylpred2                  #######    ########    #  ##                  ######
                       130        140        150        160        170        180
Bevacizumab_E   SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT
Amylpred2             ##  ##########
                       190        200        210   214
Bevacizumab_E   LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
Amylpred2
                        10         20         30         40         50         60
Bevacizumab_B   EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGEPTY
Amylpred2                     ###  ## #######  ## #            ####  ####
                        70         80         90        100        110        120
Bevacizumab_B   AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP HYYGSSHWYF DVWGQGTLVT
Amylpred2                                        ########       ######  ##  ######
                       130        140        150        160        170        180
Bevacizumab_B   VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
Amylpred2       ###                          ##  ###          ###
                       190        200        210        220        230  231
Bevacizumab_B   QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH T
Amylpred2            #####  ####     #  #########
```

ΟΜΑΔΑ	ΠΕΠΤΙΔΙΑ	ΑΛΥΣΙΔΑ	ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ
1	18 RVTITC 23	E	T20D	√
	71 FTLTISS 77	E	T72D & S76K	√
3	113 PSVFIF 118	E	F116N	√
	129 TASVVCLLNNFY 140	E	T129D	127 SVVCLLNNF 139
	186 YSLSSVVTV 194	B	Y186K & T193S	√
	200 GTQTYICNVN 209	B	T203S & I205T	√
4	24 ASGYTFTNY 32	B	S25D	27 YTFTNY 32
	47 WVGWINTY 54	B		47 WVGWINTY 54
	105 SSHWYFDV 112	B		105 SSHWYFDV 112
	31 NYLNWY 36	E		31 NYLNWY 36
	45 KVLIYFTSS 53	E	Y49S	46 VLISFTSS 53
	18 LRLSC 22	B	R19D	√
	83 FATYYCQQ 90	E	T85D	√
5	91 TAVYYCAK 98	B	V93A	93 AYY 95
	115 QGTLVTVSS 123	B	Q115N & L118S	119 VTVSS 123

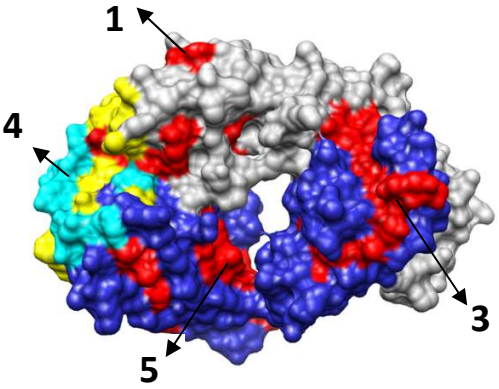
- **Cetuximab (Κωδικός PDB : 1YY8)**

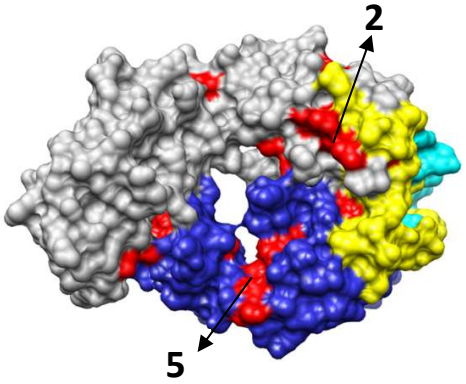



```
                        10         20         30         40         50         60
Cetuximab_E     DILLTQSPVI LSVSPGERVS FSCRASQSIG TNIHWYQQRT NGSPRLLIKY ASESISGIPS
Amylpred2        ###### ## ###        ######       #####
                        70         80         90        100        110        120
Cetuximab_E     RFSGSGSGTD FTLSINSVES EDIADYYCQQ NNNWPTTFGA GTKLELKRTV AAPSVFIFPP
Amylpred2                  ######                                      ######
                       130        140        150        160        170        180
Cetuximab_E     SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT
Amylpred2                ## ##########
                       190        200        210  213
Cetuximab_E     LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGA
Amylpred2
                        10         20         30         40         50         60
Cetuximab_B     QVQLKQSGPG LVQPSQSLSI TCTVSGFSLT NYGVHWVRQS PGKGLEWLGV IWSGGNTDYN
Amylpred2                     ###   ##########  #######        ####   ###
                        70         80         90        100        110        120
Cetuximab_B     TPFTSRLSIN KDNSKSQVFF KMNSLQSNDT AIYYCARALT YYDYEFAYWG QGTLVTVSAA
Amylpred2                     ###   ###      #  ##########  ##########  #########
                       130        140        150        160        170        180
Cetuximab_B     STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG
Amylpred2                              #####              #  #
                       190        200        210        220 221
Cetuximab_B     LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK S
Amylpred2        #########       #####  ####
```

ΟΜΑΔΑ	ΠΕΠΤΙΔΙΑ	ΑΛΥΣΙΔΑ	ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ
1	^{71}FTLSIN^{76}	E	T72D	√
2	^{2}ILLTQS^{7}	E	T5S	√
	^{9}VILSV^{13}	E	I10S	√
3	^{113}PSVFIF^{118}	E	S114D	^{116}FI^{117}
	^{129}TASVVCLLNNFY^{140}	E	T129D & Y140K	^{132}VVCLLNN^{138}
	^{182}YSLSSVVTV^{190}	B	Y182K & T189S	√
	^{196}GTQTYICNV^{204}	B	T199S & I201T	√
4	^{32}NIHWYQ^{37}	E		^{32}IHWYQ^{37}
	^{46}LLIKY^{50}	E		^{46}LLIKY^{50}
	^{47}WLGVIWS^{53}	B		^{47}WLGVIWS^{53}
	^{18}LSITCTVSGFSLTNYGVHWV^{37}	B	S19D & T21S & T23S	^{24}VSGFSLTNYGVHWV^{37}
	^{78}VFFKMN^{83}	B	V78S	√
5	^{90}TAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA^{119}	B	I92D & L114D	^{97}RALTYYDYEFAYWG^{110}

- **Ofatumumab (Κωδικός PDB : 3GIZ)**

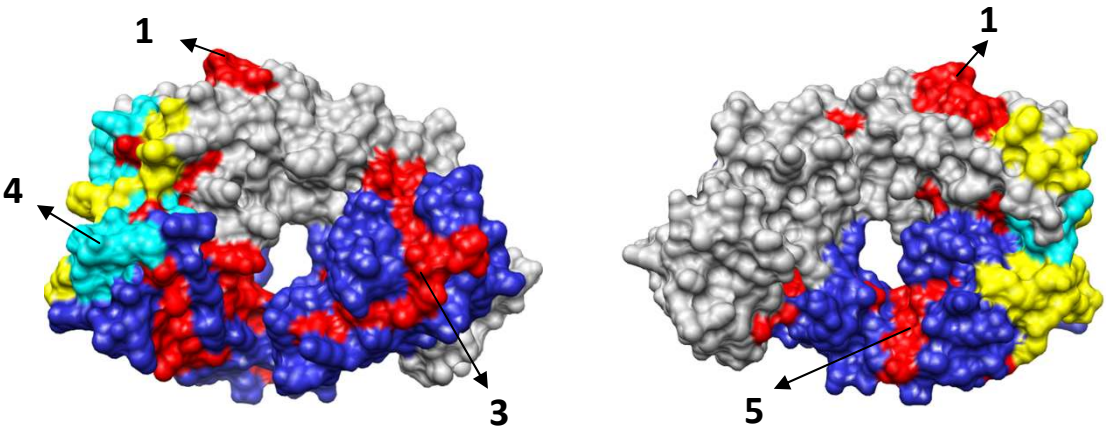





```
                        10         20         30         40         50         60
Ofatumumab_E    EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA
Amylpred2        #####                 ######        ######  #
                        70         80         90        100        110        120
Ofatumumab_E    RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPITFGQ GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP
Amylpred2                  #######     #######                          ######
                       130        140        150        160        170        180
Ofatumumab_E    SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT
Amylpred2              ##  ##########
                       190        200        210 211
Ofatumumab_E    LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN R
Amylpred2
                        10         20         30         40         50         60
Ofatumumab_B    EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFN DYAMHWVRQA PGKGLEWVST ISWNSGSIGY
Amylpred2                           #  # ########  # #            ####  ##
                        70         80         90        100        110        120
Ofatumumab_B    ADSVKGRFTI SRDNAKKSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDI QYGNYYYGMD VWGQGTTVTV
Amylpred2                              ###       #######     #########     ######
                       130        140        150        160        170        180
Ofatumumab_B    SSASTKGPSV FPLAPGSSKS TSGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
Amylpred2       ##                          ###  ##          ##
                       190        200        210        220 222
Ofatumumab_B    SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EP
Amylpred2           ######  ###     ##  #######
```

ΟΜΑΔΑ	ΠΕΠΤΙΔΙΑ	ΑΛΥΣΙΔΑ	ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ
1	^{71}FTLTISS^{77}	E	T72D & S76K	√
2	^{2}IVLTQ^{6}	E	T5S	√
3	^{113}PSVFIF^{118}	E	F116N	√
	^{129}TASVVCLLNNFY^{140}	E	T129D	^{89}SVVCLLNNF^{89}
	^{185}YSLSSVVTV^{193}	B	Y185K & T192S	√
	^{199}GTQTYICNV^{207}	B	T202S & I204T	√
4	^{20}LS-AASGFTFND^{31}	B		^{20}LS-AASGFTFND^{31}
	^{102}YGNYYYGMD^{110}	B	Χωρίς αλλαγή	^{102}YGNYYY^{107}
	^{45}RLLIYDA^{51}	E	Y49S	√
	^{31}SYLAWY^{36}	E		^{31}SYLAWY^{36}
	^{83}FAVYYCQ^{89}	E	V85A	^{89}AAY^{89}
5	^{91}TALYYCA^{97}	B	T91S & L93A	^{92}AAYY^{95}
	^{115}GTTVTVSS^{122}	B	T117D	√

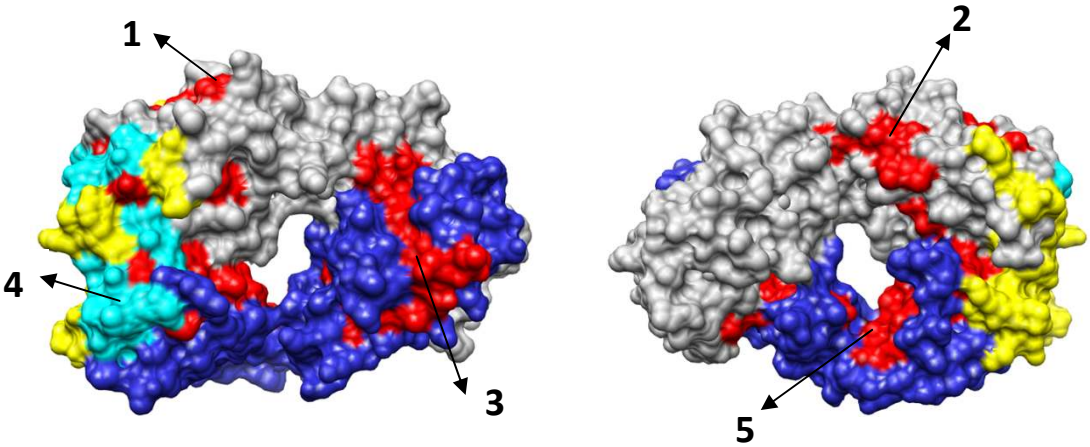
- **Pertuzumab (Κωδικός PDB : 1L7I)**




```
                        10         20         30         40         50         60
Pertuzumab_E   DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS IGVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS
Amylpred2                    ###  ###     ##  ######         #####  ###
                        70         80         90        100        110        120
Pertuzumab_E   RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYIYPYTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
Amylpred2                 #######       #######  ########                 ######
                       130        140        150        160        170        180
Pertuzumab_E   SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT
Amylpred2            ##  ##########
                       190        200        210   214
Pertuzumab_E   LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
Amylpred2
                        10         20         30         40         50         60
Pertuzumab_B   EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFT DYTMDWVRQA PGKGLEWVAD VNPNSGGSIY
Amylpred2                    ###  ### ######  ##
                        70         80         90        100        110        120
Pertuzumab_B   NQRFKGRFTL SVDRSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARNL GPSFYFDYWG QGTLVTVSSA
Amylpred2                    ###  ####        ########     ########  #########
                       130        140        150        160        170        180
Pertuzumab_B   STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG
Amylpred2                              #####                            ##
                       190        200        210        220 222
Pertuzumab_B   LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SC
Amylpred2       #########      #####  #####
```

ΟΜΑΔΑ	ΠΕΠΤΙΔΙΑ	ΑΛΥΣΙΔΑ	ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ
1	^{18}RVTITC^{23}	E	T20D	√
	^{71}FTLTISS^{77}	E	T72D & S76R	√
3	^{113}PSVFIF^{118}	E	S114D	^{115}VFI^{117}
	^{129}TASVVCLLNNFY^{140}	E	T129D	^{40}SVVCLLNNF^{40}
	^{196}GTQTYICNV^{204}	B	T199S & I201T	√
	^{182}YSLSSVVTV^{190}	B	Y182K & T189S	√
4	^{46}LLIYSASY^{56}	E	Y49K	√
	^{29}VSIGVAWY^{36}	E		^{29}VSIGVAWY^{36}
	^{18}LRLSCA-SGFTFTDY^{32}	B	R19D	^{25}SGFTFTDY^{32}
	^{78}TLYLQM^{83}	B	Y80K	√
	^{84}ATYYCQQYYIYPYTF^{98}	E	T85D	^{86}YCQQYYIYPYTF^{98}
5	^{91}TAVYYCAR^{98}	B	V93A	^{93}AYY^{95}
	^{103}SFYFDYWGQGTLVTVSS^{119}	B	L114D	^{103}SFYFDY^{108}

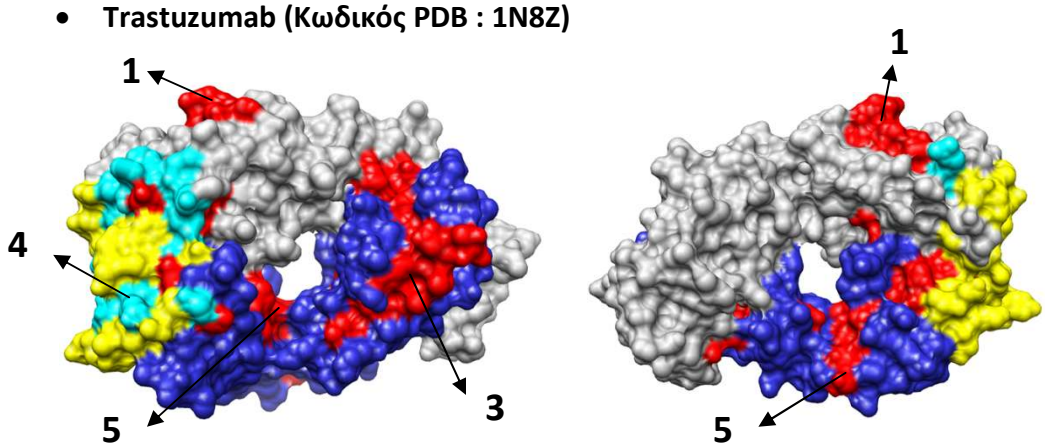
- **Rituximab (Κωδικός PDB : 2OSL)**




```
                        10         20         30         40         50         60
Rituximab_E     QIVLSQSPAI LSASPGEKVT MTCRASSSVS YIHWFQQKPG SSPKPWIYAT SNLASGVPVR
Amylpred2               ## ###          ###  ######       #####  ##
                        70         80         90        100        110        120
Rituximab_E     FSGSGSGTSY SLTISRVEAE DAATYYCQQW TSNPPTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS
Amylpred2               ## #####     #######                          ######
                       130        140        150        160        170        180
Rituximab_E     SDEQLKSGTA VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL
Amylpred2               ## #########
                       190        200        210  213
Rituximab_E     SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC
Amylpred2

                        10         20         30         40         50         60
Rituximab_B     QVQLQQPGAE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYNMHWVKQT PGRGLEWIGA IYPGNGDTSY
Amylpred2                             ######   #######       ######
                        70         80         90        100        110        120
Rituximab_B     NQKFKGKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARST YYGGDWYFNV WGAGTTVTVS
Amylpred2                                        ########     #######  ##########
                       130        140        150        160        170        180
Rituximab_B     AASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS
Amylpred2                                  ####  #                        ##
                       190        200        210        220   224
Rituximab_B     SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSC
Amylpred2          #######  ##     ###  ######
```

ΟΜΑΔΑ	ΠΕΤΙΔΙΑ	ΑΛΥΣΙΔΑ	ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ
1	69 SYSLTIS 75	E	S69D & S75K	√
2	9 AILSA 13	E	I10D	√
3	112 PSVFIF 117	E	I116D	√
	128 TASVVCLLNNFY 139	E	T128D	130 SVVCLLNNF 138
	184 YSLSSVVTV 192	B	Y184K & T191S	√
	198 GTQTYICNV 206	B	T201S & I203T	√
4	28 SVSYIHWFQ 36	E		28 SVSYIHWFQ 36
	46 WIYATSN 52	E	Y48K	√
	25 SGYTFTSYNMHWV 37	B		25 SGYTFTSYNMHWV 37
	45 LEWIGA 50	B	L45S	47 WIG 49
	83 ATYYCQQ 89	E	T84D	√
5	91 SAVYYCAR 98	B	V93D	√
	104 GDWYFNVWGAGTTVTVS 120	B	A113S & T116S	104 GDWYFNV...VTV 119

- **Trastuzumab (Κωδικός PDB : 1N8Z)**




```
                        10         20         30         40         50         60
Trastuzumab_E   DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS
Amylpred2                  ###  ####       ######       #####  ######
                        70         80         90        100        110        120
Trastuzumab_E   RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
Amylpred2                 #######    #######                            ######
                       130        140        150        160        170        180
Trastuzumab_E   SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT
Amylpred2                ##  #########
                       190        200        210   214
Trastuzumab_E   LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
Amylpred2
                        10         20         30         40         50         60
Trastuzumab_B   EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
Amylpred2                                ##      ########       #####  ##
                        70         80         90        100        110        120
Trastuzumab_B   ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
Amylpred2                                        ########       ####    #########
                       130        140        150        160        170        180
Trastuzumab_B   ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
Amylpred2                                  #####                ##
                       190        200        210        220
Trastuzumab_B   GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
Amylpred2         ########  #     ####  ######
```

ΟΜΑΔΑ	ΠΕΠΤΙΔΙΑ	ΑΛΥΣΙΔΑ	ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ
1	18 RVTITCR 24	E	T20D	√
	71 FTLTISS 77	E	T72D & S76D	√
3	113 PSVFIF 118	E	S114D	115 VFI 117
	129 TASVVCLLNNF 139	E	T129D	131 SVVCLLNSSF 138
	183 YSLSSVVTV 191	B	Y183K & T190S	√
	197 GTQTYICNVN 206	B	T200S & I202T	√
4	46 LLIYSASFLYS 56	E	Y49K	50 SASFLYS 56
	31 DTYIHWVR 38	B		31 DTYIHWVR 38
	46 EWVARIY 52	B	E46S	√
	105 YAMD 108	B		105 YAMD 108
	31 TAVAWY 36	E		31 AVAWY 36
	84 ATYYCQQ 90	E	T85D	√
5	91 TAVYYCSR 98	B	T91S & V93D	√
	112 QGTLVTVSS 120	B	L115N & S120D	√

3. Abstract και Poster στο 35ο επιστημονικό συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών (ΕΕΒΕ), 23-25 Μαΐου 2013

Πρακτικά 35ου Επιστημονικού Συνεδρίου της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών
Ναύπλιο, 23-25 Μαΐου 2013

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Γριμανέλλη Βασιλική, Τσώλης Αντώνης, Χαμόδρακας Σταύρος
Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολις, Αθήνα 157 01

Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι πιθανότατα, η πιο ραγδαία αναπτυσσόμενη και πολλά υποσχόμενη κατηγορία φαρμάκων. Χρησιμοποιούνται θεραπευτικά σε αυτοάνοσα νοσήματα, καρδιαγγειακές και μολυσματικές ασθένειες, μεταμόσχευση νεφρών και σε διάφορα είδη καρκίνου. Σημαντικό μειονέκτημα στην αξιοποίηση των αντισωμάτων είναι η τάση που έχουν να σχηματίσουν συσσωματώματα σε υψηλές συγκεντρώσεις, κατά την αποθήκευση και τη χρήση τους. Τα συσσωματώματα αυτά μπορεί να μειώσουν την δραστικότητα των αντισωμάτων, καθώς επίσης να προκαλέσουν ανοσολογικές αποκρίσεις σε ασθενείς. Σ' αυτή την εργασία, μελετήθηκε η τάση του Pertuzumab (Omnitarg, PerjetaTM, 2C4) ως προς τον σχηματισμό συσσωματωμάτων. Το Pertuzumab είναι ένα ανασυνδυασμένο, μονοκλωνικό αντίσωμα με έναν μοναδικό μηχανισμό δράσης εναντίον καρκινικών κυττάρων στο μαστό. Αλληλεπιδρά με την εξωκυττάρια περιοχή II του υποδοχέα HER-2 αναστέλλοντας την ικανότητα του να διμεριστεί με άλλους υποδοχείς της οικογένειας υποδοχέων HER. Για την πρόγνωση των περιοχών που έχουν την τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι AMYLPRED και AMYLPRED2, που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριό μας. Μελετώντας τις περιοχές αυτές στην τρισδιάστατη δομή του αντισώματος, έγιναν αντικαταστάσεις αμινοξικών καταλοίπων με εκτεθειμένες τις πλευρικές τους αλυσίδες, ώστε να μην επηρεαστεί η δομή της πρωτεΐνης. Τα κατάλοιπα αυτά αντικαταστάθηκαν με άλλα που έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες, έχοντας ως αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση των επιφανειών με τάση για συσσωμάτωση. Αυτή η διαδικασία μπορεί να γενικευθεί και σε άλλα μονοκλωνικά αντισώματα, οδηγώντας στην ελάττωση της τάσης για σχηματισμό συσσωματωμάτων, βελτιώνοντας με αυτόν τον τρόπο την διαλυτότητα και τη σταθερότητά τους.

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Γριμανέλλη, Β.Π., Τσώλης, Α.Χ. και Χαμόδρακας, Σ.Ι.

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας,Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 157 01

Εισαγωγή

Μονοκλωνικά αντισώματα

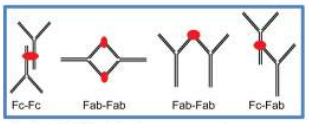
Τα **μονοκλωνικά αντισώματα** είναι ομοιογενείς πληθυσμοί **ανοσοσφαιρινών** που προέρχονται από ένα μοναδικό πλασματοκύτταρο. Έχουν προκαθορισμένη ειδικότητα προς ένα αντιγονικό επίτοπο και δυνατότητα για **in vitro** ατέρμονη αναπαραγωγή. Η στερεοδιάταξη τους ακολουθεί το χαρακτηριστικό δίπλωμα της ανοσοσφαιρίνης IgG (Εικόνα 1).

Θεραπευτικές εφαρμογές

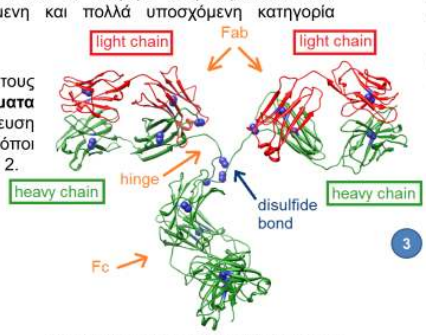
Χρησιμοποιούνται **θεραπευτικά** σε αυτοάνοσα νοσήματα, όπως στη Σκλήρυνση κατά πλάκας, στην ασθένεια Alzheimer's, σε καρδιαγγειακές παθήσεις, μολυσματικές ασθένειες, κατά τη μεταμόσχευση νεφρών, και, σε διάφορα είδη καρκίνου. Είναι πιθανότατα, η πιο ραγδαία αναπτυσσόμενη και πολλά υποσχόμενη κατηγορία φαρμάκων.

Μειονέκτημα

Σημαντικό μειονέκτημα της αξιοποίησής τους είναι η τάση να σχηματίζουν **συσσωματώματα** σε υψηλές συγκεντρώσεις, κατά την αποθήκευση και την χρήση τους. Οι πιθανοί τρόποι συσσωμάτωσης παρουσιάζονται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2: Πιθανοί τρόποι συσσωμάτωσης.



Εικόνα 1: Δομή ανοσοσφαιρίνης IgG, PDB 1IGT.

Συνέπειες

Οι συνέπειες που προκύπτουν από τον πιθανό σχηματισμό των συσσωματωμάτων είναι να **μειωθεί η δραστικότητα** των αντισωμάτων, καθώς επίσης να προκληθούν **ανοσολογικές αποκρίσεις** σε ασθενείς.

Στόχος της παρούσας εργασίας: Η βελτιστοποίηση της διαλυτότητας του μονοκλωνικού αντισώματος Pertuzumab, προτείνοντας αλλαγές επιφανειακών αμινοξικών καταλοίπων, χωρίς να επηρεαστεί η τρισδιάστατη δομή του.

Μεθοδολογία

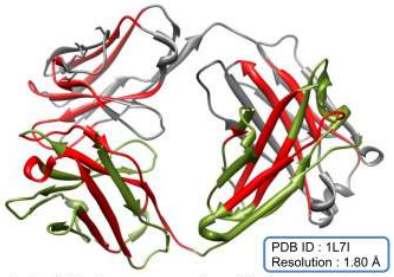
1. Επιλέχθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα **Pertuzumab** (Omnitarg, 2C4, Perjeta™), το οποίο έχει σχεδιαστεί να δρα έναντι του υποδοχέα HER-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2), σημαντικού στην εξέλιξη επιθετικών τύπων καρκίνου του μαστού. Το Pertuzumab έχει μοναδικό μηχανισμό δράσης: αλληλεπιδρά με την εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα HER-2, αναστέλλοντας την ικανότητα του να διμερίζεται με άλλους υποδοχείς της οικογένειας HER.

2. Για την πρόβλεψη των περιοχών που έχουν την τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα χρησιμοποιήθηκαν οι συναινετικοί μέθοδοι AMYLPRED [1] και AMYLPRED2 [2], οι οποίες αναπτύχθηκαν στο εργαστήριό μας (Εικόνα 3).

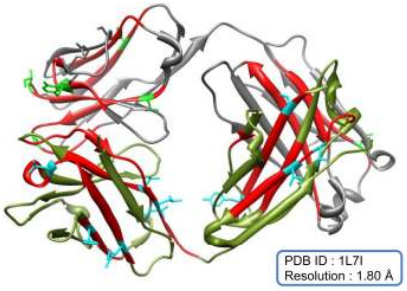
3. Μελετώντας τις περιοχές αυτές στην τρισδιάστατη δομή του αντισώματος, επιλέχθηκαν να αντικατασταθούν αμινοξικά κατάλοιπα, των οποίων οι πλευρικές τους αλυσίδες είναι εκτεθειμένες, έτσι ώστε να μην επηρεαστεί η δομή της πρωτεΐνης (Εικόνα 4).

4. Τα κατάλοιπα αυτά στη συνέχεια αντικαταστάθηκαν με άλλα, τα οποία έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες.

5. Τέλος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 3: Με κόκκινο οι περιοχές της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας στη μεταβλητή περιοχή (Fab) του αντισώματος, που προβλέπεται ότι τείνουν να σχηματίζουν συσσωματώματα.

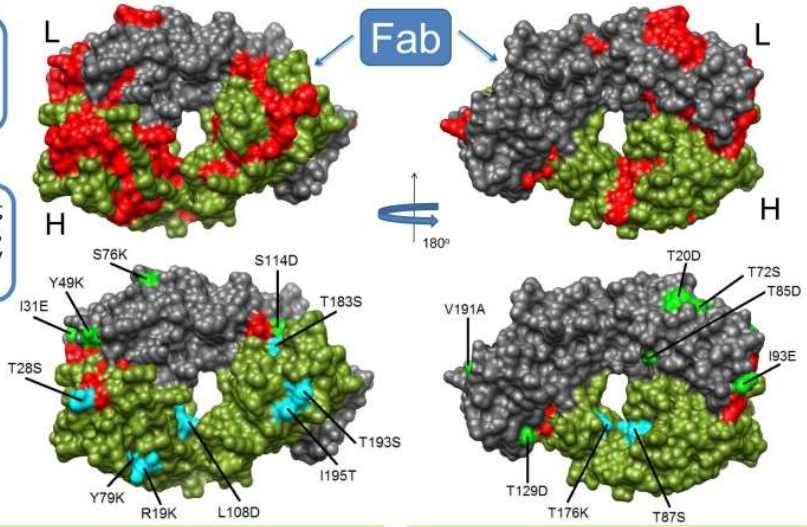


Εικόνα 4: Με πράσινο και γαλάζιο τα αμινοξικά κατάλοιπα της ελαφριάς και της βαριάς αλυσίδας αντίστοιχα, που πρόκειται να αντικατασταθούν.

Αποτελέσματα

Απεικόνιση της επιφάνειας της δομής 1L7I με τις περιοχές που προβλέπονται από τις μεθόδους AMYLPRED [1] και AMYLPRED2 [2].

Απεικόνιση της επιφάνειας της δομής 1L7I με τις περιοχές που προβλέπονται, μετά τις αντικαταστάσεις των αμινοξικών καταλοίπων.



Επιφάνειες με τάση για σχηματισμό συσσωματωμάτων

Αντικαταστάσεις αμινοξικών καταλοίπων :

- Ελαφριά αλυσίδα
- Βαριά αλυσίδα

Συμπεράσματα - Συζήτηση

Αντικαταστάσεις αμινοξικών καταλοίπων (με εκτεθειμένες πλευρικές αλυσίδες) από άλλα με παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες μπορούν να οδηγήσουν σε :

- ✓ Ελαχιστοποίηση των επιφανειών με τάση για συσσωμάτωση.
- ✓ Και κατ' επέκταση, βελτίωση της διαλυτότητας και της σταθερότητας του αντισώματος. (πράγμα που πρέπει να ελεγχθεί πειραματικά)

Στοιχίζοντας τις αμινοξικές ακολουθίες ενός συνόλου μονοκλωνικών αντισωμάτων, παρατηρήθηκε μεγάλη ομολογία στη βαριά και στην ελαφριά αλυσίδα καθώς επίσης παρατηρήθηκαν παρόμοιες ή ακόμα και ίδιες προβλέψεις περιοχών με τάση για σχηματισμό συσσωματωμάτων.

- ✓ **Η διαδικασία αυτή μπορεί να γενικευθεί και σε άλλα μονοκλωνικά αντισώματα.** (πράγμα που προτείνεται να ελεγχθεί πειραματικά από κάποια φαρμακευτική εταιρεία)

Βιβλιογραφία

[1] Frousios, K.K., Iconomidou, V.A., Karletidi, C.M., Hamodrakas, S.J. (2009) Amyloidogenic determinants are usually not buried. BMC Struct Biol., 9(1), 44.

[2] Tsolis, A.C., Papandreou, N.C., Iconomidou, V.A., Hamodrakas, S.J. (2013) A Consensus Method for the Prediction of "Aggregation-Prone" Peptides in Globular Proteins. PLoS ONE, 8(1): e54175.

4. Abstract και Poster στο 5ο επιστημονικό συνέδριο του Cambridge Healthtech Institute, 4-8 Νοεμβρίου 2013

IMPROVING THE SOLUBILITY OF THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CANCER

Grimanelli, V.P., Tsolis, A.C. and Hamodrakas, S.J.

Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 157 01

Monoclonal antibodies represent the most promising and rapidly growing class in therapeutic compounds. They are used in treatment schemes for autoimmune, cardiovascular and infectious diseases, kidney transplantation, and cancer. A major drawback in the exploitation of antibodies is their tendency to form aggregates, when delivered in high concentrations in their storage and usage. Aggregates may result in reduction of antibody therapeutic activity, while severe immunological responses in patients have also been recorded. In this study, we investigated the susceptibility of a set of monoclonal antibodies to form aggregates. We selected antibodies that have all been approved by the U. S. Food and Drug Administration and are indicated for treatment of various types of cancer, such as breast cancers, chronic lymphocytic leukemia colorectal and gastric cancers. They are IgG1 kappa immunoglobulins and they have several, different mechanisms of action. We collected the amino acid sequences of the antibodies and their 3D-structures that have been deposited in the RCSB Protein Data Bank. AMYLPRED and AMYLPRED2 consensus methods (developed in our lab) were used to predict 'aggregation-prone' regions on the surface of these proteins. Considering the 3D-structures (Fab fragments) of these antibodies, we tentatively replaced amino acid residues with exposed side chains in the predicted 'aggregation-prone' regions, which, most probably, do not affect their 3D-structure. These residues were substituted by others with similar properties, resulting apparently, in reduction of antibodies' potential to form aggregates. This computational study must be experimentally verified in order to ensure that these substitutions decrease the antibodies' tendency to form aggregates, and that they also improve their solubility and stabilization.

IMPROVING THE SOLUBILITY OF THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CANCER

Grimanelli, V.P., Tsolis, A.C. and Hamodrakas, S.J.

Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 157 01

Introduction

Monoclonal Antibodies

Monoclonal antibodies (mAbs) are homogeneous populations of **immunoglobulins** derived from a single plasma cell. They have predetermined specificity for an antigenic epitope and potential for *in vitro* endless reproduction. Their conformation follows the Ig-like fold of immunoglobulin IgG (Figure 1).

Therapeutic Applications

They are used in **treatment schemes** for autoimmune diseases, like Multiple Sclerosis (MS), for Alzheimer's disease, for cardiovascular and infectious diseases, kidney transplantation, and different types of cancer. Monoclonal antibodies represent the most **promising** and **rapidly growing** class in therapeutic compounds.

Drawbacks

A major drawback in the exploitation of antibodies is their tendency to **form aggregates**, when delivered in high concentrations in their storage and usage. Figure 2 depicts some of the potential self-association pathways for therapeutic mAbs.

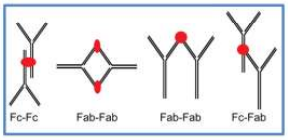


Figure 2: Potential modes by which mAbs may form aggregates.

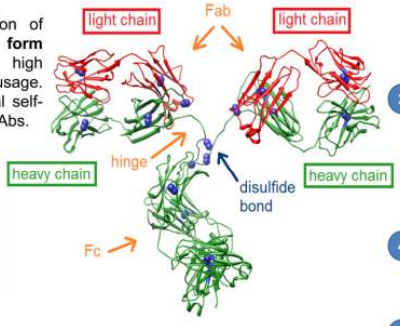


Figure 1: Immunoglobulin fold IgG, PDB 1IGT.

Consequences

Aggregates may result in **reduction** of antibody **therapeutic activity**, while severe **immunological responses** in patients have also been recorded.

Purpose of this current study :

Improving the solubility of a set of monoclonal antibodies proposing amino acid substitutions not affecting their 3D-structure.

Methods

1. In the current study we present the humanized monoclonal antibody **Trastuzumab** (HERCEPTIN®), which is specifically designed to target HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2). Trastuzumab binds to the HER2 proto-oncogene, an EGF receptor-like protein found on 20-30% of breast cancer cells. This binding flags the tumor cell for destruction by the body's immune system, known as antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC).
2. **AMYLPRED** [1] and **AMYLPRED2** [2] consensus methods (developed in our lab) were used to predict 'aggregation-prone' regions on the surface of these proteins (Figure 3).
3. Considering the 3D-structures (Fab fragments) of these antibodies, we tentatively replaced amino acid residues with exposed side chains in the predicted 'aggregation-prone' regions, which, most probably, do not affect their 3D-structure (Figure 4).
4. These residues were substituted by others with similar/different properties. resulting apparently, in reduction of antibodies' potential to form aggregates.
5. The same process was followed for the other six mAbs of our data set (not shown).

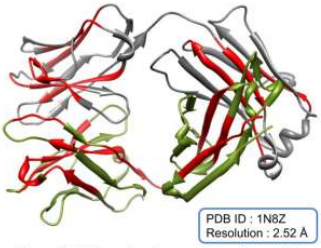


Figure 3: With red color are the regions of the heavy and light chains in the Variable fragment of the antibody that tend to be 'aggregation-prone'.

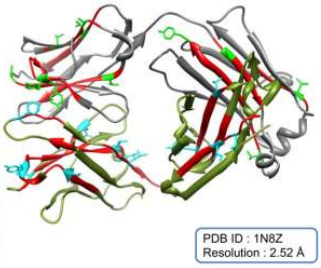


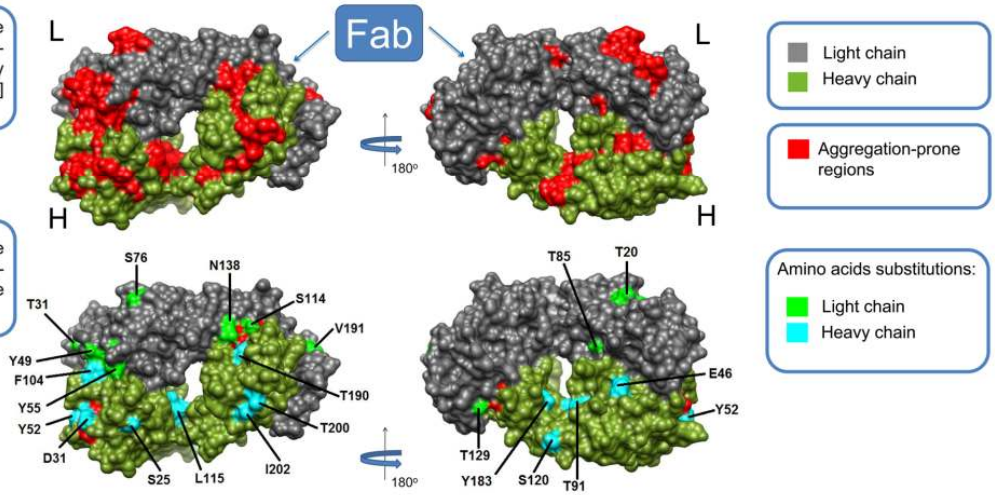
Figure 4: With green and light blue colors are the amino acids of the light and heavy chain respectively that were substituted by others.

INN	PROPRIETARY NAME	PDB IDs
Alemtuzumab	CAMPATH®	1CE1, 1BEY
Bevacizumab	AVASTIN®	1BJ1
Cetuximab	ERBITUX®	1YY8, 1YY9
Ofatumumab	ARZERRA™	3GIZ
Pertuzumab	PERJETA™	1L7I, 1S78
Rituximab	MABTHERA®, RITUXAN®	2OSL, 1L6X
Trastuzumab	HERCEPTIN®	1N8Z

Results

Presentation of the 1N8Z pdb structure surface, including the aggregation-prone regions, predicted by AMYLPRED [1] and AMYLPRED2 [2] consensus methods.

Presentation of the 1N8Z pdb structure surface, including the aggregation-prone regions predicted, after the amino acids substitutions.



Conclusions and Discussion

In a set of seven monoclonal antibodies, amino acid residues (with exposed side chains) were substituted by others, with similar properties, resulting apparently in:

- ✓ Reduction of antibodies' potential to form aggregates.
- ✓ Improvement of antibodies' solubility and stabilization.

Aligning the amino acid sequences of a set of monoclonal antibodies, it was observed high homology to the heavy and light chain, and also, yielded similar or even the same predictions for 'aggregation-prone' regions. Concluding :

- ✓ **This computational study can be generalized in other monoclonal antibodies.**
- ✓ **Also, it should be experimentally verified.**

References

[1] Frousios, K.K., Iconomidou, V.A., Karletidi, C.M., Hamodrakas, S.J. (2009) Amyloidogenic determinants are usually not buried. BMC Struct Biol., 9(1), 44.

[2] Tsolis, A.C., Papandreou, N.C., Iconomidou, V.A., Hamodrakas, S.J. (2013) A Consensus Method for the Prediction of "Aggregation-Prone" Peptides in Globular Proteins. PLoS ONE, 8(1): e54175.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the THALES 2012 PROGRAMME, co-funded by the European Social Fund and National Resources (Project Code: 2012ΣΕ24580211 MIS 380234)

5. Abstract και Poster στο 8ο επιστημονικό συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Υπολογιστικής Βιολογίας και Βιοπληροφορικής, 22-24 Νοεμβρίου 2013

Proceedings of the 8th conference of the Hellenic Society for Computational Biology & Bioinformatics
HSCBB13 – Department of computer Science and Biomedical Informatics
University of Thessaly, Lamia, Greece, 22-11-2013

IMPROVING THE SOLUBILITY OF THE THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODY Rituximab

Vasiliki Grimanelli, Stavros Hamodrakas*
Department of Cell Biology and Biophysics, University of Athens, Athens, 15701, Greece
*Correspondence to: shamodr@biol.uoa.gr

I. Introduction

Monoclonal antibodies (mAbs) represent the most promising and rapidly growing class of therapeutic compounds. They are homogeneous populations of immunoglobulins derived from a single plasma cell. They have a pre-determined specificity for an antigenic epitope and potential for *in vitro* endless reproduction. They are used in treatment schemes for autoimmune, cardiovascular and infectious diseases, kidney transplantation, and cancer [1].

A major drawback in the exploitation of antibodies is their tendency to form aggregates, when delivered in high concentrations in their storage and usage. Aggregates may result in reduction of antibody therapeutic activity, while severe immunological responses in patients have also been recorded [2].

In this study, we investigated the susceptibility of Rituximab (MABTHERA®, RITUXAN®, developed by Biogen Idec under the name IDEC-C2B8), to form aggregates. Rituximab is a chimeric monoclonal IgG1-kappa antibody, which is directed against the CD20 antigen. The Fab region of Rituximab binds to the CD20 antigen on B-lymphocytes, while the Fc domain recruits antibodies and complements to mediate cell lysis. Rituximab is a widely used antibody drug for the treatment of CD20-positive non-Hodgkin's lymphoma [3], chronic lymphocytic leukemia [4], and rheumatoid arthritis [5].

II. Materials And Methods

We collected the amino acid sequence of Rituximab in order to perform a sequence analysis. Our sources were the Drug Bank Database [6], the Protein Data Bank [7] and the Monoclonal Antibodies database, part of the IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® [8]. We also obtained the three-dimensional structure of the antibody from the Protein Data Bank (PDB ID: 2OSL).

AMYLPRED [9] and AMYLPRED2 [10] consensus methods, developed in our lab, were used to predict 'aggregation-prone' regions on the surface of this protein. Using the DSSP algorithm [11] we found the exposed to the solvent amino acid residues of the protein .

Considering the 3D-structure (Fab fragment) of the antibody, we tentatively replaced amino acid residues with exposed side chains in the predicted 'aggregation-prone' regions, which, most probably, do not affect its 3D-structure. These residues were substituted by others with similar properties, resulting apparently, in reduction of Rituximab's potential to form aggregates.

Subsequently, the Modeller9.11 [12] software was used for homology modeling of the proteins' three-dimensional structures and new models were calculated. Having the native structures and new models (after amino acid substitutions), three-dimensional structural alignments were performed with Pymol [13]. Side chains of the new amino-acid residues were examined in order to ensure that the side chains are still exposed and do not have steric hindrance.

AMYLPRED and AMYLPRED2 consensus methods were used over to predict 'aggregation-prone' regions on the surface of the new 3D-structures and to evaluate the results.

III. Results - Discussion

In Rituximab, amino acid residues, with exposed side chains, were substituted by others, with similar properties, resulting apparently in reduction of the antibody's potential to form aggregates and improvement of the antibody' solubility and stabilization.

This computational study can be generalized in other monoclonal antibodies too (and, actually, has already been generalized!), and, also, it should be experimentally verified.

References

[1] J.M. Reichert, C.J. Rosensweig, L.B. Faden and M.C. Dewitz, "Monoclonal antibody successes in the clinic," Nature biotechnology 2005, 23 (9), 1073-1078.
[2] W. Wang, "Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics," International journal of pharmaceutics 2005, 289 (1-2), 1-30.
[3] D.G. Maloney, A.J. Grillo-Lopez, C.A. White, D. Bodkin, R.J. Schilder, J.A. Neidhart, "IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma," Blood 1997, 90 (6), 2188-2195.
[4] G.L. Plosker and D.P. Figgitt, "Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia," Drugs 2003, 63 (8), 803-843.
[5] J.C. Edwards, L. Szczepanski, J. Szechinski, A. Filipowicz-Sosnowska, P. Emery, D.R. Close, "Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis," The New England journal of medicine 2004, 350 (25), 2572-2581.
[6] C. Knox, V. Law, T. Jewison, P. Liu, S. Ly, A. Frolkis, "DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs," Nucleic acids research 2011, 39 (Database issue), D1035-1041.

[7] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, "The Protein Data Bank," Nucleic acids research 2000, 28 (1), 235-242.
[8] M.P. Lefranc, V. Giudicelli, C. Ginestoux, J. Jabado-Michaloud, G. Folch, F. Bellahcene, "IMGT, the international ImMunoGeneTics information system," Nucleic acids research 2009, 37 (Database issue), D1006-1012.
[9] K.K. Frousios, V.A. Iconomidou, C.M. Karletidi and S.J. Hamodrakas, "Amyloidogenic determinants are usually not buried," BMC structural biology 2009, 9, 44.
[10] A.C. Tsolis, N.C. Papandreou, V.A. Iconomidou and S.J. Hamodrakas, "A consensus method for the prediction of 'aggregation-prone' peptides in globular proteins," PloS one 2013, 8 (1), e54175.
[11] W. Kabsch and C. Sander, "Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features," Biopolymers 1983, 22 (12), 2577-2637.
[12] A. Sali and T.L. Blundell, "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints," Journal of molecular biology 1993, 234 (3), 779-815.
[13] W.L. Delano The PyMOL Molecular Graphics System. 2005.

IMPROVING THE SOLUBILITY OF THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CANCER - Rituximab

Vasiliki P. Grimanelli and Stavros J. Hamodrakas

Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 157 01

Introduction

Monoclonal Antibodies

Monoclonal antibodies (mAbs) are homogeneous populations of **immunoglobulins** derived from a single plasma cell. They have predetermined specificity for an antigenic epitope and potential for *in vitro* endless reproduction. Their conformation follows the Ig-like fold of immunoglobulin IgG (Figure 1).

Therapeutic Applications

They are used in **treatment schemes** for autoimmune diseases, like Multiple Sclerosis (MS), for Alzheimer's disease, for cardiovascular and infectious diseases, kidney transplantation, and different types of cancer. Monoclonal antibodies represent the most **promising** and **rapidly growing** class in therapeutic compounds [1].

Drawbacks

A major drawback in the exploitation of antibodies is their tendency to **form aggregates**, when delivered in high concentrations in their storage and usage [2]. Figure 2 depicts some of the potential self-association pathways for therapeutic mAbs.

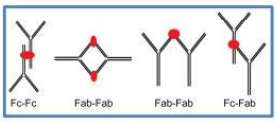


Figure 2: Potential modes by which mAbs may form aggregates.

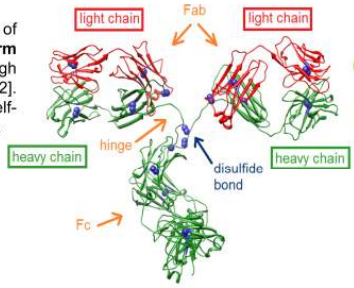


Figure 1: Immunoglobulin fold IgG, PDB ID: 1IGT.

Consequences

Aggregates may result in **reduction** of antibody **therapeutic activity**, while severe **immunological responses** in patients have also been recorded.

Purpose of this current study :

Improving the solubility of Rituximab proposing amino acid substitutions not affecting its 3D-structure.

Rituximab

Rituximab (MABTHERA®, RITUXAN®) is a chimeric monoclonal IgG1-kappa antibody, which is directed against CD20 antigen. The Fab region of rituximab binds to the CD20 antigen on B lymphocytes, while the Fc domain recruits antibodies and complements to mediate cell lysis. Rituximab is a widely used antibody drug for treatment of CD20-positive non-Hodgkins lymphoma [3], chronic lymphocytic leukemia [4], and rheumatoid arthritis [5].

Methods

1. We collected the amino acid sequence of **Rituximab** in order to perform a sequence analysis. Our sources were the Drug Bank Database [6], the Protein Data Bank [7] and the Monoclonal Antibodies database, part of the IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® [8]. We also obtained the three-dimensional structure of the antibody from the Protein Data Bank (PDB ID: 2OSL).
2. **AMYLPRED** [9] and **AMYLPRED2** [10] consensus methods (developed in our lab) were used to predict 'aggregation-prone' regions on the surface of this protein (Figure 3). Using the **DSSP** algorithm [11] we found the exposed to the solvent amino acid residues of the protein.
3. Considering the 3D-structures (Fab fragments) of the antibodies, we tentatively replaced amino acid residues with exposed side chains in the predicted 'aggregation-prone' regions, which, most probably, do not affect their 3D-structure (Figure 4).
4. These residues were substituted by others with similar properties, resulting apparently, in reduction of Rituximab's potential to form aggregates.
5. Subsequently, the **Modeller9.11** [12] software was used for homology modeling of the proteins' three-dimensional structures and new models were calculated. Having the native structures and new models (after amino acid substitutions), three-dimensional structural alignments were performed with **Pymol** [13]. Side chains of the new amino-acid residues were examined in order to ensure that the side chains are still exposed and do not have steric hindrance.
6. AMYLPRED and AMYLPRED2 consensus methods were used over to predict 'aggregation-prone' regions on the surface of the new 3D-structures and to evaluate the results.

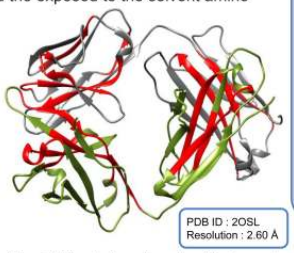


Figure 3: With red color are the regions of the heavy and light chains in the Variable fragment of the antibody that tend to be 'aggregation-prone'.

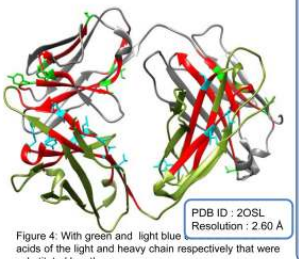
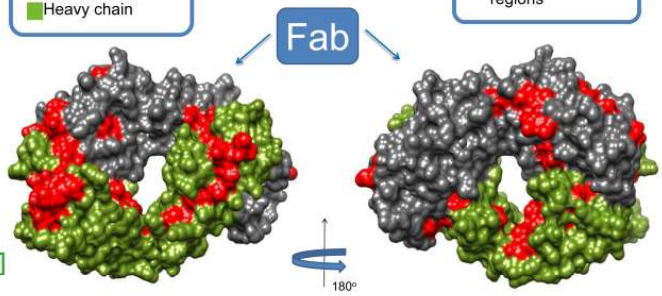


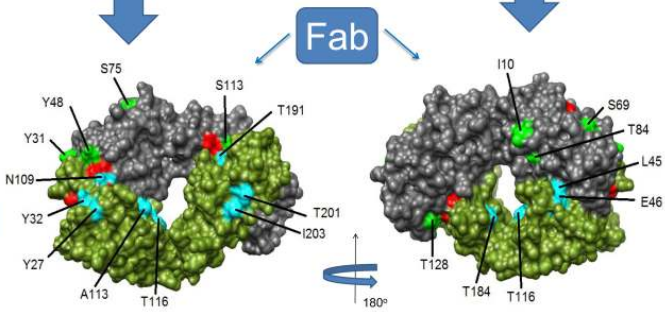
Figure 4: With green and light blue acids of the light and heavy chain respectively that were substituted by others.

Results

Presentation of the 2OSL pdb structure surface, including the aggregation-prone regions, predicted by **AMYLPRED** [1] and **AMYLPRED2** [2] consensus methods.



Presentation of the 2OSL pdb structure surface, including the aggregation-prone regions predicted, after the amino acids substitutions.



Conclusions and Discussion

In Rituximab, amino acid residues, with exposed side chains, were substituted by others, with similar properties, resulting apparently in:

- ✓ Reduction of antibody's potential to form aggregates.
- ✓ Improvement of antibody's solubility and stabilization.

Aligning the amino acid sequences of a set of monoclonal antibodies, it was observed high homology to the heavy and light chain, and also, yielded similar or even the same predictions for 'aggregation-prone' regions. Concluding :

✓**This computational study can be generalized in other monoclonal antibodies too** (and, actually, has already been generalized!).

✓**Also, it should be experimentally verified.**

References

[1] J.M. Reichert, et al., Nature biotechnology 2005.
[2] W. Wang, International journal of pharmaceutics 2005.
[3] D.G. Maloney, et al., Blood 1997.
[4] G.L. Plosker and D.P. Figgitt, Drugs 2003.
[5] J.C. Edwards, et al., The New England journal of medicine 2004.
[6] C. Knox, et al., Nucleic acids research 2011.
[7] H.M. Berman, et al., Nucleic acids research 2000.
[8] M.P. Lefranc, et al., Nucleic acids research 2009.
[9] K.K. Frousios, et al., BMC structural biology 2009.
[10] A.C. Tsolis, et al., PloS one 2013.
[11] W. Kabsch and C. Sander, Biopolymers 1983.
[12] A. Sali and T.L. Blundell, Journal of molecular biology 1993.
[13] W.L. Delano The PyMOL Molecular Graphics System. 2005.