



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

«Βελτιστοποίηση διαλυτότητας θεραπευτικών
μονοκλωνικών αντισωμάτων με υπολογιστικές
μεθόδους»

Anti
soma



Ελευθερία Καρταράκη

Πτυχιούχος Μαθηματικών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2017



HELLENIC REPUBLIC
National and Kapodistrian
University of Athens

SCHOOL OF SCIENCE
FACULTY OF BIOLOGY

MASTER IN “BIOINFORMATICS”

Master Diploma Thesis

**«Optimizing the aggregation propensity of
therapeutic monoclonal antibodies»**



Eleftheria Karataraki

Mathematician, National and Kapodistrian University of Athens

ATHENS 2017



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

«Βελτιστοποίηση διαλυτότητας θεραπευτικών
μονοκλωνικών αντισωμάτων με υπολογιστικές μεθόδους»

Anti
soma



Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Επίκουρη Καθηγήτρια Βασιλική Οικονομίδου
*Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής,
Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών*

Καθηγητής Κωνσταντίνος Βοργιάς
*Τομέας Βιοχημείας,
Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών*

Αναπληρωτής Καθηγητής Παντελεήμων Μπάγκος
*Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

*Η επιστήμη, φίλε μου, συνίσταται από λάθη, αλλά είναι λάθη
χρήσιμα γιατί λίγο-λίγο οδηγούν στην αλήθεια*

Jules Gabriel Verne (1828-1905) Γάλλος μυθιστοριογράφος

Περιεχόμενα

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	ΑΝΟΣΙΑ	1
1.1.1	ΕΜΦΥΤΗ ΑΝΟΣΙΑ.....	1
1.1.2	ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΙΑ	2
1.2	ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	3
1.3	ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	3
1.4	ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	5
1.4.1	Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	6
1.4.1.1	ΧΥΜΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ.....	7
1.4.2	Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	8
1.4.2.1	ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΣΟΛΑΒΗΤΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ	11
1.4.3	ΑΝΤΙΓΟΝΟΠΑΡΟΥΣΙΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	12
1.5	ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΣ ΚΑΘΟΡΙΣΤΗΣ - ΕΠΙΤΟΠΟΣ.....	13
1.5.1	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΗΚΑ Β ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ	15
1.5.2	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ.....	16
1.6	ΑΝΟΣΟΓΟΝΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ	16
1.7	ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΕΣ	17
1.8	ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ	20
1.9	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ	22
1.9.1	ΟΨΩΝΙΣΜΟΣ	23
1.9.2	ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ	24
1.9.3	ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΣΟΛΑΒΗΤΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ	24
1.9.4	ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ	25
1.10	ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	26
1.10.1	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΥΒΡΙΔΩΜΑΤΑ	27
1.10.2	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ	29

1.10.3	ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ	31
1.10.3.1	ΘΕΩΡΗΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ	32
1.10.3.2	ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ	32
1.10.3.3	ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ	33
1.10.4	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ.....	33
1.10.5	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	35
1.10.6	ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ	36
1.10.7	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΥΣΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ.....	38
2	ΣΤΟΧΟΣ	39
3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	40
3.1	ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	40
3.1.1	RCSB PDB	40
3.1.2	DrugBank	40
3.2	ΕΡΓΑΛΕΙΑ	41
3.2.1	AMYPRED2.....	41
3.2.2	DSSP.....	41
3.2.3	MODELLER 9V16.....	41
3.2.4	JSMOL	42
3.2.5	PROCHECK	42
3.2.6	WHAT IF.....	42
3.2.7	Pymol	43
3.3	Ο ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΟΣ ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ ANTISOMA	43
3.4	ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	44
3.4.1	ΣΥΝΟΛΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	45
3.4.1.1	OMALIZUMAB.....	45
3.4.1.2	EFALIZUMAB	47
3.4.1.3	DACLIZUMAB	49
3.4.1.4	CANACINUMAB.....	51
3.4.1.5	BASILIXIMAB	53
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	55
4.1	Η ΜΕΘΟΔΟΣ ANTISOMA	55

4.1.1	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	55
4.1.2	ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΗ ΕΠΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	57
4.1.3	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΓΝΩΣΤΕΣ	63
4.1.3.1	Ο αλγόριθμος CamSol.....	63
4.1.3.2	Ο αλγόριθμος AGGRESCAN3D	65
4.1.3.3	Ο αλγόριθμος SolubiS	66
4.2	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΟ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΟ ΕΡΓΑΛΕΙΟ ANTISOMA ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ	68
4.2.1	Omalizumab.....	72
4.2.2	Efalizumab	74
4.2.3	Daclizumab	76
4.2.4	Canacinumab	78
4.2.5	Basiliximab.....	80
5	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	83
6	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	92
6.1	ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ.....	92
6.1.1	CamSol.....	92
6.1.2	AGGRESCAN3D	96
6.1.3	SOLUBIS	99
6.2	Περιγραφή των βασικών αρχείων του αλγορίθμου ANTISOMA	101
6.3	Abstract εργασίας στο επιστημονικό συνέδριο HSCBB16	102
6.4	Poster στο επιστημονικό συνέδριο HSCBB16	104
6.5	Ramachandran Plots Νέων Μοντέλων.....	105
6.5.1	Omalizumab.....	105
6.5.2	Efalizumab	106
6.5.3	Daclizumab	107
6.5.4	Canacinumab	108
6.5.5	Basiliximab.....	109

*Στους γονείς μου Γιώργο και Πόπη για την
αγάπη τους, την εμπιστοσύνη τους και την
υποστήριξή τους...*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με θέμα «Βελτιστοποίηση διαλυτότητας θεραπευτικών μονοκλωνικών αντισωμάτων με υπολογιστικές μεθόδους» πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοπληροφορικής και Βιοφυσικής, στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιοπληροφορική», υπό την επίβλεψη του Ομότιμου Καθηγητή Σταύρου Ι. Χαμόδρακα. Μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής είναι η Επίκουρη Καθηγήτρια Βασιλική Οικονομίδου, ο Καθηγητής Κωνσταντίνος Βοργιάς και ο Αναπληρωτής Καθηγητής Παντελής Μπάγκος.

Κατ' αρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ομότιμο καθηγητή Σταύρο Χαμόδρακα, ο οποίος υπήρξε πάντα δίπλα μου κατά την διάρκεια της διπλωματικής και κατά τη διάρκεια των μαθημάτων, όπου ήταν διαθέσιμος για κάθε απορία μου, πάντα έδινε λύσεις σε τυχόν προβλήματα και δυσκολίες και πάντα με συμβούλευε για το πως θα προχωρήσω. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και με επέλεξε στο μεταπτυχιακό και σαν μέλος της ερευνητικής του ομάδας. Μέσω της διπλωματικής που μου ανέθεσε ειδικεύθηκα στον προγραμματισμό και μπόρεσα να αποκτήσω σημαντικές γνώσεις για τη μετέπειτα πορεία μου. Με έμαθε πως να κάνω έρευνα και πως να αγαπήσω την έρευνα. Τέλος, στις εβδομαδιαίες συναντήσεις του εργαστηρίου, μου έδωσε την ευκαιρία να μάθω και να ακούσω πολλά από τις εργασίες των συναδέλφων μου. Διεύρυνα τους ορίζοντες μου πέρα από τη δική μου εργασία, μέσα από τις ενδιαφέρουσες συζητήσεις που διεξάγονταν και τα θέματα που παρουσιάζονταν.

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω τα τρία μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τόσο για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν σε αυτή, όσο και για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν στα πλαίσια των μαθημάτων του μεταπτυχιακού.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Βασιλική Οικονομίδου για την τιμή που μου κάνει να είναι μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής της διπλωματικής μου. Με τη διδασκαλία της στα πλαίσια του μεταπτυχιακού, μου πρόσφερε πολλές γνώσεις, συμβουλές, εφόδια και βοήθεια όποτε τη χρειάστηκα.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Βοργιά για την τιμή που μου κάνει να είναι μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής της διπλωματικής μου εργασίας. Με τη διδασκαλία του στα πλαίσια του μεταπτυχιακού μου πρόσφερε πολλές γνώσεις, εφόδια καθώς επίσης η παρουσία και οι συμβουλές του ήταν καθοριστικές.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Παντελή Μπάγκο για την τιμή που μου κάνει να είναι μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής της διπλωματικής μου εργασίας. Με τη διδασκαλία του στα πλαίσια του μεταπτυχιακού, μου πρόσφερε πολλές γνώσεις, εφόδια και συμβουλές για τη μετέπειτα πορεία μου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Κατερίνα Νάστου για την καθημερινή μας αλληλεπίδραση και τη πολύτιμη βοήθεια της σε κάθε απορία που προέκυπτε και για την οργάνωση και επίβλεψη της παρούσας διπλωματικής. Οι συμβουλές της ήταν απαραίτητες για την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου. Επίσης ευχαριστώ ιδιαίτερως την υποψήφια διδάκτορα Εβίτα Τσιολάκη που με βοήθησε πολύ στο θεωρητικό κομμάτι της διπλωματικής μου. Ακόμη, ευχαριστώ πολύ τους υποψήφιο διδάκτορα Φώτη Μπαλτούμα, Δρ. Νικόλαο Λούρο, Δρ. Νικόλαο Παπανδρέου και Δρ. Ζωή Λίτου για το φιλικό κλίμα στο εργαστήριο την άμεση βοήθειά τους και τις επικοινωνητικές συζητήσεις μας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Δρ. Γεώργιο Τσαούση και Δρ. Μαργαρίτα Θεοδωροπούλου για τη διδασκαλία τους στα πλαίσια του μεταπτυχιακού και επειδή μου έδωσαν μια πρώτη γεύση του προγραμματισμού στη Βιολογία.

Ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου τη Γεωργία, την Κατερίνα, την Έφη, τον Αρσένη, την Κωνσταντίνα και ιδιαίτερα την Φωτεινή και τη Χαρά που με την καλή τους διάθεση συνέβαλαν σε ένα πολύ καλό κλίμα στο εργαστήριο.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου που με στήριξαν στις δύσκολες στιγμές. Τέλος αυτή η διπλωματική δεν θα ήταν ποτέ δυνατή χωρίς τη στήριξη των γονιών μου, Γιώργου και Πόπη, σε κάθε δυνατό επίπεδο. Τους ευχαριστώ πολύ και τους αφιερώνω αυτή τη διπλωματική εργασία.

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 οργάνων, στη μείωση φλεγμονών και σε διάφορα είδη καρκίνου. Παρά τα αδιαμφισβήτητα πλεονεκτήματα τους, τα εξανθρωπισμένα αντισώματα έχουν και σημαντικά **μειονεκτήματα** όπως **μικρή διάρκεια ζωής** και **μικρή πρωτεϊνική σταθερότητα**. Το πιο σημαντικό όμως μειονέκτημα είναι η τάση τους να δημιουργούν **σταθερές και συχνά αδιάλυτες πρωτεϊνικές δομές**. Τα συσσωματώματα αυτά μπορούν να **μειώσουν την δραστικότητα** των αντισωμάτων, καθώς επίσης να προκαλέσουν **ανοσολογικές αποκρίσεις** σε ασθενείς όταν βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες. Στην παρούσα έρευνα, ο στόχος μας ήταν να σχεδιάσουμε και να αναπτύξουμε μια **αυτοματοποιημένη υπολογιστική μέθοδο που να μειώνει τις περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση στα θεραπευτικά μονοκλωνικά αντισώματα**. Για την πρόγνωση των περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος AMYLPRED2. Έχοντας ως κριτήριο τον βαθμό έκθεσης του κάθε αμινοξικού καταλοίπου στην πρωτεΐνη και την θέση τους στην τρισδιάστατη δομή των αντισωμάτων, έγιναν **αντικαταστάσεις αμινοξικών καταλοίπων** με εκτεθειμένες πλευρικές αλυσίδες, ώστε να μην επηρεαστεί η συνολική δομή της πρωτεΐνης. Μετά από αυτές τις αντικαταστάσεις δίνεται ως αποτέλεσμα η καλύτερη δυνατή **ελαχιστοποίηση των επιφανειών με τάση για συσσωμάτωση**. Στη συνέχεια υπολογίζεται το εμβαδόν αυτών των περιοχών πριν και μετά τις αντικαταστάσεις. Κατά την αξιολόγηση του υπολογιστικού εργαλείου που σχεδιάστηκε και αναπτύχθηκε, σε 5 μονοκλωνικά αντισώματα, βρέθηκε ότι οι περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση μετά τις αντικαταστάσεις μειώθηκαν και σε μερικές περιπτώσεις εξαφανίστηκαν. Τα θετικά αποτελέσματα της μελέτης αυτής θα πρέπει να ελεγχθούν πειραματικά προκειμένου να εξακριβωθεί η εγκυρότητα τους έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή νέων φαρμάκων και στη βελτιστοποίηση των ήδη υπαρχόντων.

ABSTRACT

Monoclonal antibodies (mAbs) represent the most promising and rapidly growing class of therapeutic compounds, as efficient implements for treating a wide variety of human chronic and acute diseases. Despite their benefits, human-derived mAbs or murine-derived mAbs do have **deficiencies**, such as **short *in vivo* life span** and **low stability**. A major drawback in the exploitation of antibodies is their tendency to **form aggregates**, a process by which protein molecules assemble into **stable and often insoluble complexes**. In this study our purpose was to **design and develop an automatic computational method**, called **ANTISOMA**, for the **detection of these small peptides, the substitution of certain residues of these peptides and finally the optimization of the aggregation propensity of these regions**. In order to detect the ‘aggregation-prone’ regions we used AMYLPRED2, a consensus method, developed in our lab, for the prediction of these ‘aggregation-prone’ peptides on amino acid sequence. Taking into account the position of each residue in the protein and their accessibility to the solvent, “hotspot” **residues are substituted**, utilizing additional experimental aggregation propensities of amino acids. **New optimized models** as well as comparison between the “aggregation-prone” surface before and after substitutions are provided. For the evaluation of our method we used five (5) therapeutic monoclonal antibodies, derived from the Protein Data Bank. Our method performed efficiently during optimization. In particular, a decrease in the “aggregation-prone” surface was observed for all mAbs, which indicates that **targeted substitutions may modify the aggregation profile on exposed surfaces of mAbs**. Rational design of mAbs, in combination with additional experimental approaches, will enable improvements in the efficacy and safety of protein therapeutics.

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 να αντιδρά, παράγοντας εξειδικευμένα κύτταρα και κυτταρικά παράγωγα, ώστε να την εξουδετερώσει και να την αποβάλλει. Στα σπονδυλωτά, υπάρχουν δύο τύποι ανοσίας, η έμφυτη, ή αλλιώς μη ειδική ανοσία, η οποία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού, και η επίκτητη, ή αλλιώς ειδική 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) αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας εναντίον των μολύνσεων. Τα περισσότερα συστατικά της έμφυτης ανοσίας υπάρχουν πριν την έναρξη της μόλυνσης και προσφέρουν στον οργανισμό αντοχή στις διάφορες ασθένειες. Οι μηχανισμοί αυτοί δεν είναι ειδικοί για κάποιο συγκεκριμένο παθογόνο μικροοργανισμό, αλλά περιλαμβάνουν κυτταρικά και μοριακά παράγωγα τα οποία αναγνωρίζουν μόρια που μοιάζουν με τα συνήθη παθογόνα. Σημαντικό ρόλο στην έμφυτη ανοσία παίζουν φαγοκύτταρα, όπως μακροφάγα και ουδετερόφιλα και διάφοροι φραγμοί, όπως το δέρμα.

Η έμφυτη ανοσία (Innate Immunity), περιλαμβάνει τέσσερις τύπους αμυντικών φραγμών, τους ανατομικούς, τους φυσιολογικούς, τους φαγοκυτταρικούς και τους φλεγμονώδεις (Medzhitov and Janeway 2000).

Οι ανατομικοί φραγμοί συμμετέχουν στην παρεμπόδιση της εισόδου παθογόνων αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού ενάντια στη μόλυνση. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνεται το δέρμα και οι βλεννώδεις επιφάνειες επειδή αποτελούν προστατευτικούς φραγμούς και παρεμποδίζουν την είσοδο των μικροοργανισμών. Ο επιπεφυκότας του ματιού και η πεπτική, η αναπνευστική και η ουρογεννητική οδός θεωρούνται βλεννώδεις επιφάνειες, αφού καλύπτονται από βλεννώδεις μεμβράνες και όχι από ξηρό προστατευτικό δέρμα όπως η εξωτερική επιφάνεια του σώματος. Επίσης, το

σάλιο, τα δάκρυα και οι βλεννώδεις εκκρίσεις δρουν για να εκδιώξουν τους εισβολείς και περιέχουν και αντιβακτηριακές ή αντιικές ουσίες.

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-ική προστασία σε μη μολυσμένα κύτταρα και το συμπλήρωμα για τη λύση μικροοργανισμών (Beutler 2004).

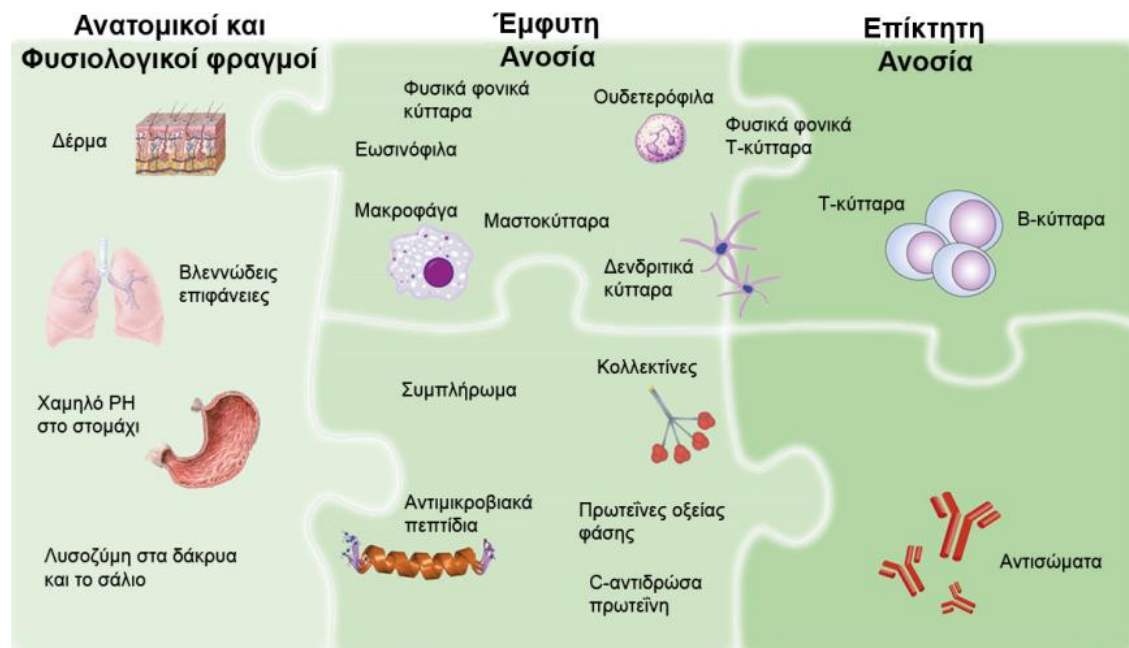
Στους φαγοκυτταρικούς φραγμούς περιλαμβάνεται η πρόσληψη εξωκυτταρικού υλικού με φαγοκυττάρωση (phagocytosis). Η φαγοκυττάρωση είναι ένας τύπος ενδοκυττάρωσης (endocytosis), δηλαδή πρόσληψης από το κύτταρο κάποιου υλικού από το περιβάλλον. Σε αυτή την περίπτωση η κυτταρική μεμβράνη σχηματίζει προεκβολές γύρω από το υλικό, που μπορεί να περιλαμβάνει ολόκληρους παθογόνους μικροοργανισμούς, δημιουργώντας μεγάλα κυστίδια γνωστά ως φαγοσώματα (phagosomes). Η φαγοκυττάρωση επιτυγχάνεται από εξειδικευμένα κύτταρα, όπως μονοκύτταρα του αίματος, ουδετερόφιλα και μακροφάγα των ιστών.

Τέλος, στους φλεγμονώδεις φραγμούς ανήκει και η επαγωγή της φλεγμονώδους αντίδρασης που είναι μια πολύπλοκη ακολουθία γεγονότων που επάγει η καταστροφή ενός ιστού από τραυματισμό ή εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών. Το τελικό αποτέλεσμα της φλεγμονής μπορεί να είναι μια ειδική ανοσολογική απόκριση ή κάθαρση του εισβολέα από συστατικά του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος.

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 **χημική** ανοσία που θα αναλύσουμε στη συνέχεια της εργασίας (Εικόνα 1). 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).



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 T-κύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα κατηγοριοποιούνται και στην έμφυτη αλλά και στην επίκτητη ανοσία (Turvey and Broide, 2010).

1.2 ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι το σύστημα άμυνας του οργανισμού. Παράγει τεράστια ποικιλία κυττάρων και μορίων τα οποία αναγνωρίζουν τους ξένους εισβολείς. Είναι ένα σύστημα το οποίο χαρακτηρίζεται από την ικανότητα προσαρμογής και μεγάλης εξειδίκευσης και εξελίχθηκε ώστε να προστατεύει τα σπονδυλωτά από παθογόνους μικροοργανισμούς και τον καρκίνο (Boon and van der Bruggen 1996). Αποτελείται από δυο ειδών όργανα. 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.

1.3 ΚΥΤΤΑΡΑ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Ένα πολύπλοκο λειτουργικό δίκτυο συνιστούν τα κύτταρα και τα μόρια του ανοσοποιητικού συστήματος, τόσο πολύπλοκο που μπορεί να συγκριθεί μονό με αυτό 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 ηωσινόφιλα (eosinophils) και τα βασεόφιλα (basophils) (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).

Τα **φυσικά φονικά κύτταρα**(NK) περιγράφηκαν πρώτη φορά το 1976, όταν παρατηρήθηκε ότι στον οργανισμό περιέχεται ένας μικρός πληθυσμός κοκκιδών λεμφοκυττάρων, μεγάλου μεγέθους, ο οποίος εκδηλώνει κυτταροτοξική δραστηριότητα εναντίον ενός μεγάλου φάσματος καρκινικών κυττάρων, απουσία οποιαδήποτε προηγούμενης ανοσοποίησης με αυτά. Αργότερα, αποδείχτηκε ότι τα NK παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού εναντίον καρκινικών κυττάρων και κυττάρων που έχουν προσβληθεί από ιούς.

Τα **δενδριτικά κύτταρα** (dendritic cells, DC) ονομάστηκαν έτσι λόγω της χαρακτηριστικής μορφολογίας τους, που συνιστάται στην ανάπτυξη επιμηκών κυτταροπλασματικών προεκβολών, που θυμίζουν τους δενδρίτες των νευρικών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά είναι δύσκολο να απομονωθούν, γιατί οι συμβατικές τεχνικές κυτταρικής απομόνωσης τείνουν να καταστρέφουν τις επιμήκεις προεκβολές τους.

Τα **ουδετερόφιλα** παράγονται μέσω της διαδικασίας της αιμοποίησης στο μυελό των οστών. Εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και κυκλοφορούν για 7-10 ώρες πριν μεταναστεύσουν στους ιστούς, όπου και παραμένουν για μερικές ημέρες. Σε διάφορες μολύνσεις, ο μυελός των οστών απομακρύνεται, παράγοντας περισσότερα από τα συνηθισμένα ουδετερόφιλα, τα οποία είναι τα πρώτα που καταφτάνουν στο σημείο της φλεγμονής. Η επακόλουθη αύξηση του αριθμού των ουδετερόφιλων της κυκλοφορίας καλείται λευκοκυττάρωση (leukocytosis) που αποτελεί ένδειξη λοίμωξης.

Το σύστημα των **μονοπύρηνων φαγοκυττάρων** περιλαμβάνει τα μονοκύτταρα που κυκλοφορούν στο αίμα και τα μακροφάγα που εγκαθίστανται στους ιστούς. Κατά τη διάρκεια της αιμοποίησης στο μυελό των οστών, τα προγονικά κύτταρα των κοκκιοκυττάρων-μονοκυττάρων διαφοροποιούνται προς προ-μονοκύτταρα, τα οποία εξέρχονται από το μυελό των οστών και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος, όπου διαφοροποιούνται περαιτέρω σε ώριμα μονοκύτταρα. Τα μονοκύτταρα κυκλοφορούν στο αίμα για περίπου 8 ώρες, κατά τη διάρκεια των οποίων αυξάνουν σε μέγεθος. Στη συνέχεια, μεταναστεύουν στους ιστούς και διαφοροποιούνται σε ειδικά για κάθε τύπο ιστού μακροφάγα ή σε δενδριτικά κύτταρα.

Τα **ηωσινόφιλα**, όπως και τα ουδετερόφιλα, είναι μετακινούμενα φαγοκύτταρα που μεταναστεύουν από το αίμα στους ιστούς. Ο φαγοκυτταρικός ρόλος τους είναι μικρότερης σημασίας από τον αντίστοιχο των ουδετερόφιλων και θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα εναντίον παρασιτικών οργανισμών. Τα εκκρινόμενα συστατικά των ηωσινοφιλικών κοκκίων προκαλούν βλάβες στη δομή της μεμβράνης των παρασίτων. Τα ηωσινόφιλα (eosinophils) διαθέτουν πυρήνα με δύο λοβούς και κοκκιώδες κυτταρόπλασμα.

Τέλος, τα **βασεόφιλα** είναι μη φαγοκυτταρικά κοκκιοκύτταρα που λειτουργούν απελευθερώνοντας από τα κυτταροπλασματικά κοκκία διάφορους παράγοντες με φαρμακολογική δράση. Αυτοί οι παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ορισμένων αλλεργικών αντιδράσεων. Τα βασεόφιλα (basophils) διαθέτουν λοβωτό πυρήνα και έντονα κοκκιώδες κυτταρόπλασμα.

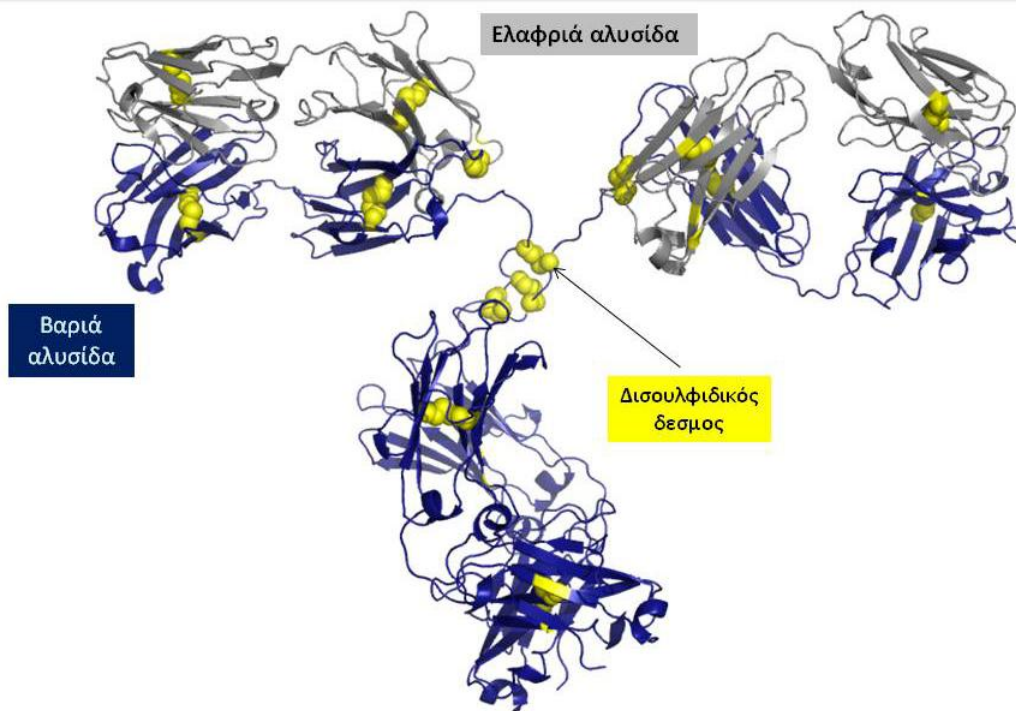
1.4 ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα λεμφοκύτταρα είναι από τα σημαντικότερα κύτταρα του ανοσοποιητικού μας συστήματος, αφού είναι κυρία συστατικά της επίκτητης ανοσίας και αρά φέρουν τα χαρακτηριστικά της, δηλαδή ποικιλομορφία, εξειδίκευση, μνήμη και διάκριση εαυτού και μη-εαυτού. Τα λεμφοκύτταρα κυκλοφορούν συνεχώς στο αίμα και τη λέμφο και μπορούν να μεταναστεύουν σε όργανα και ιστούς. Διακρίνονται σε 3 κατηγορίες τα 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 2002). Τα Β λεμφοκύτταρα όπως και τα Τ λεμφοκύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών με τη

διαφορά όμως ότι η ωρίμανση των Β λεμφοκυττάρων γίνεται στο μυελό των οστών ενώ η ωρίμανση των Τ λεμφοκυττάρων γίνεται στο θυμό αδένα. Το όργανο όπου ωριμάζουν τα λεμφοκύτταρα δικαιολογεί και την ονομασία τους, Τ από τον θυμό (Thymus) αδένα και Β από το μυελό των οστών (Bone marrow) (Cioffi, Pollenz et al. 2002). Όταν βρίσκονται στην αρχή του κυτταρικού τους κύκλου και δεν έχουν αλληλεπιδράσεις με κάποιο αντιγόνο, έχουν μικρό μέγεθος και αναφέρονται ως παρθένα (naive) (Goldsby 2005). Μερικά από τα προγονικά Β και Τ λεμφοβλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε κύτταρα μνήμης. Αυτά τα κύτταρα ευθύνονται για τη μακράς διάρκειας ανοσία ενάντια πολλών παθογόνων. Τα κύτταρα μνήμης είναι μικρά λεμφοκύτταρα και διακρίνονται από τα παρθένα κύτταρα με βάση την παρουσία ή απουσία συγκεκριμένων μεμβρανικών μορίων.

1.4.1 Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα Β λεμφοκύτταρα δημιουργούνται στο μυελό των οστών, όπου και ωριμάζουν (Benschop, Melamed et al. 1999). Όταν τα Β λεμφοκύτταρα εγκαταλείπουν το μυελό των οστών, καθένα εκφράζει πάνω στη μεμβράνη του ένα μοναδικό υποδοχέα δέσμευσης αντιγόνου που ονομάζεται υποδοχέας Β κυττάρου (B cell receptor, BCR). Ο υποδοχέας αυτός είναι ένα μεμβρανικό μόριο ανοσοσφαιρίνης (μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη) (Εικόνα 2), υπεύθυνο για την αναγνώριση αντιγόνου σε διαλυτή μορφή (Foy and Matsuuchi 2001). Οι ανοσοσφαιρίνες 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. Τα αμινοτελικά άκρα των ζευγών των βαριών και των ελαφριών αλυσίδων σχηματίζουν μια αύλακα σχήματος Υ, μέσα στην οποία δεσμεύεται το αντιγόνο.

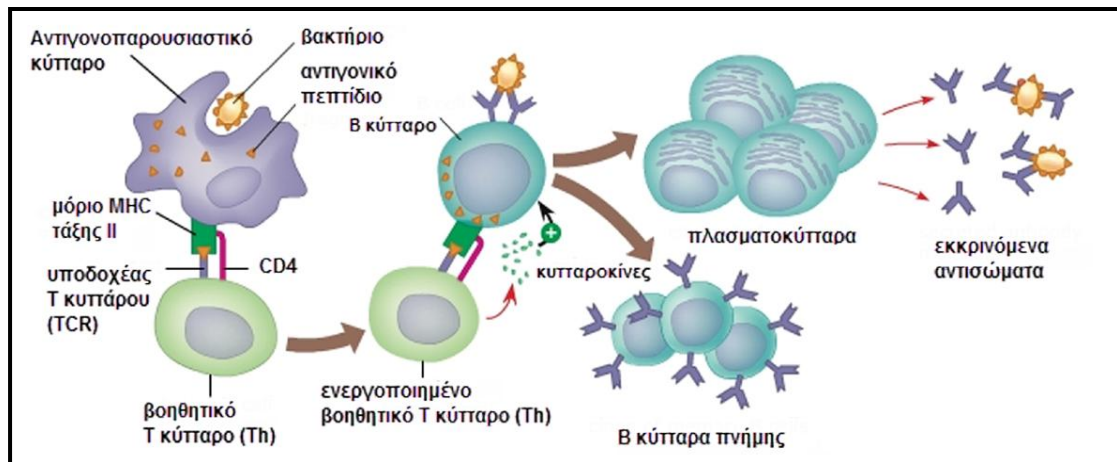


Εικόνα 2 : Δομή ανοσοσφαιρίνης-υποδοχέα Β κυττάρου με κωδικό 1IGT στην βάση πρωτεϊνικών δομών PDB. Με γκρι χρώμα απεικονίζονται οι ελαφριές αλυσίδες και με μπλε χρώμα οι βαριές αλυσίδες. Με κίτρινες σφαίρες διακρίνονται οι δισουλφιδικοί δεσμοί. Τα αμινοτελικά άκρα όλων των αλυσίδων καθώς και τα καρβοξυτελικά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

1.4.1.1 ΧΥΜΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ

Τα Β λεμφοκύτταρα είναι σημαντικά γιατί διασφαλίζουν την φυσιολογική παραγωγή αντισωμάτων. Όταν ένα παρθένο Β κύτταρο έρχεται για πρώτη φορά σε επαφή με το αντιγόνο που το ενεργοποιεί, δηλαδή ταιριάζει στον μεμβρανικό υποδοχέα του (αντίσωμα), τότε αυτό δεσμεύει το αντιγόνο και αρχίζει να πολλαπλασιάζεται. Το προγονικό κύτταρο αρχίζει να διαφοροποιείται σε Β-κύτταρα μνήμης (memory B cells) και δραστικά Β-κύτταρα (effector B cells), τα πλασματοκύτταρα (plasma cells). Τα πλασματοκύτταρα παράγουν και εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες αντισωμάτων. Τα Β-κύτταρα μνήμης έχουν μεγαλύτερο χρόνο ζωής από τα παρθένα Β κύτταρα και συνεχίζουν να εκφράζουν το ίδιο μεμβρανοσυνδεδεμένο αντίσωμα. Τα πλασματοκύτταρα δεν εκφράζουν μεμβρανοσυνδεδεμένο αντίσωμα, αλλά παράγουν το αντίσωμα ως εκκριτικό συστατικό. Τα πλασματοκύτταρα ζουν λίγες μέρες, όμως εκκρίνουν τεράστιες ποσότητες αντισώματος. Τα εκκρινόμενα αντισώματα είναι τα κύρια δραστικά μόρια της χυμικής ανοσίας. Τα Β λεμφοκύτταρα έχουν και αντιγονοπαρουσιαστικές ιδιότητες (παρουσιάζουν

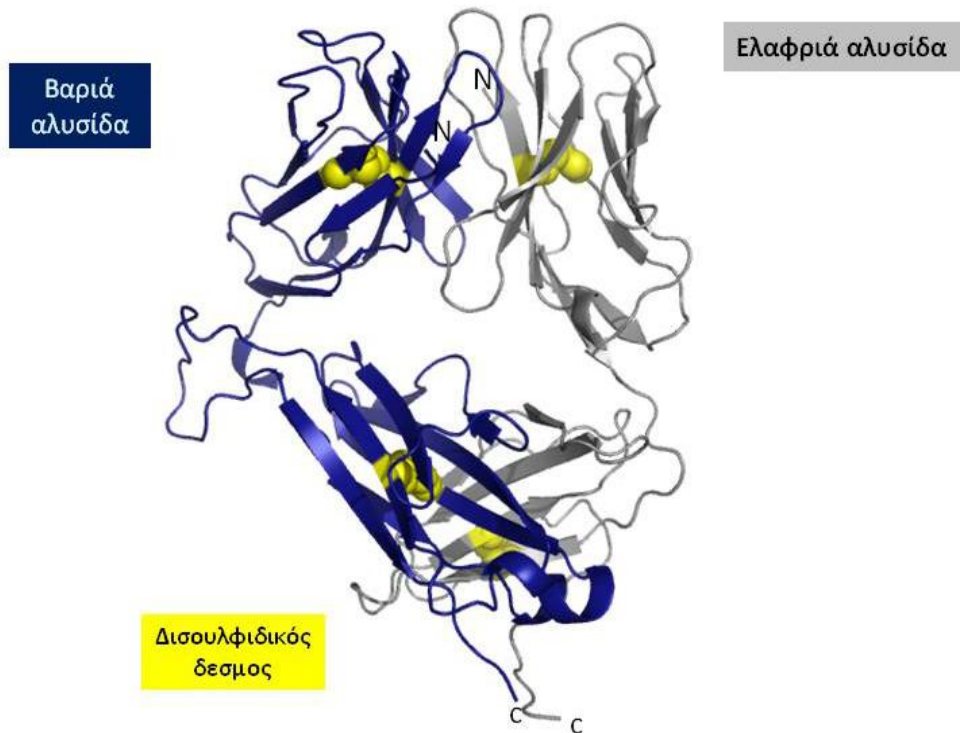
στην επιφάνεια τους μικρά μόρια που αναγνωρίζονται από αντισώματα) (Mauri and Bosma 2012) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3 : Το αντιγόνοπαρουσιαστικό 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 T λεμφοκύτταρα (Th) τα οποία εκκρίνουν κυτταροκίνες που προσελκύουν στην μολυσμένη περιοχή τα B λεμφοκύτταρα. Αναγνωρίζουν με τη σειρά τους το αντιγόνο-βακτήριο με τον υποδοχέα B κυττάρου (BCR) που διαθέτουν στην επιφάνειά τους και διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα (plasma cells) και B κύτταρα μνήμης (memory B cells). Τα πλασματοκύτταρα εκκρίνουν αντισώματα για τα οποία αναγνωρίζουν το αντιγόνο, το δεσμεύουν κι ενεργοποιούν μηχανισμούς για την εξουδετέρωσή του.

1.4.2 Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Τα T λεμφοκύτταρα δημιουργούνται στο μυελό των οστών αλλά σε αντίθεση με τα B λεμφοκύτταρα, μεταναστεύουν και ωριμάζουν στο θύμο αδέν (Ashton-Rickardt and Tonegawa 1994). Καθώς ωριμάζει το T λεμφοκύτταρο εκφράζει στην επιφάνεια του υποδοχείς που ονομάζονται υποδοχείς T κυττάρου (T cell receptor, TCR) (Εικόνα 4) (Rudolph, Stanfield et al. 2006). Ο υποδοχέας αυτός διαφέρει δομικά από τις ανοσοσφαιρίνες και διαθέτει κάποια κοινά χαρακτηριστικά με αυτές, που εντοπίζονται κυρίως στη δομή της θέσης δέσμευσης του αντιγόνου. Μια σημαντική διαφορά των T από τα B λεμφοκύτταρα είναι ότι οι υποδοχείς των B λεμφοκυττάρων αναγνωρίζουν αντιγόνα σε διαλυτή μορφή ενώ οι υποδοχείς των T λεμφοκυττάρων αναγνωρίζουν κομμάτια - πεπτίδια του αντιγόνου, προσδεμένα σε μεμβρανικές πρωτεΐνες που ονομάζονται πρωτεΐνες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC), στην επιφάνεια μολυσμένων ή καρκινικών κυττάρων (Yin, Lan et al. 2012).



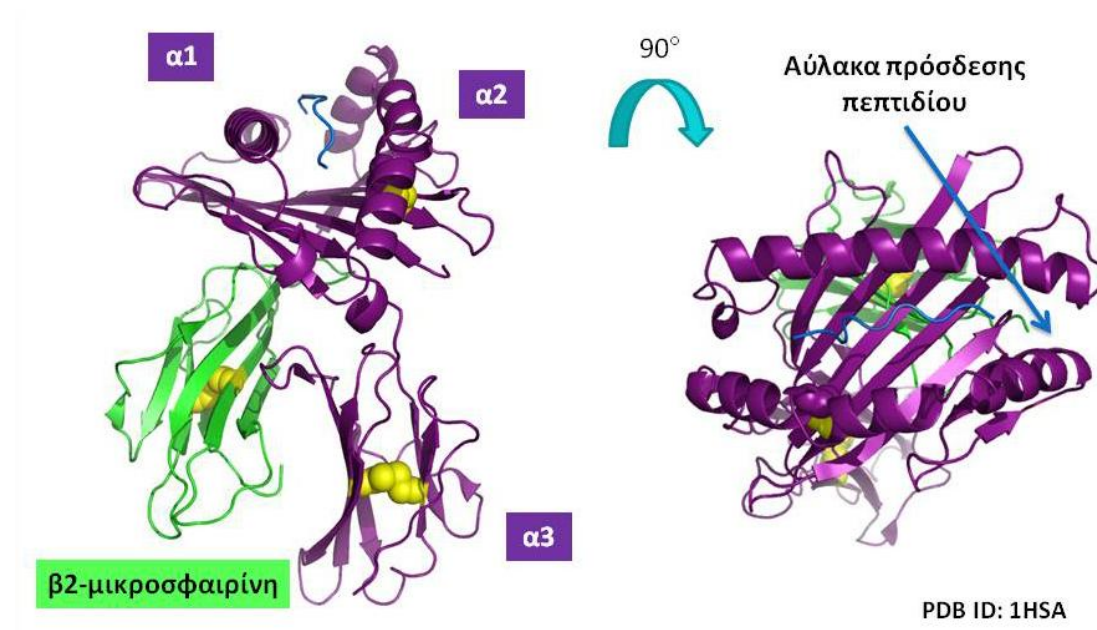
Εικόνα 4 : Η στερεοδιάταξη της δομής του υποδοχέα T κυττάρου (T cell receptor, TCR), ακολουθεί το χαρακτηριστικό δίπλωμα ανοσοσφαιρίνης (Ig-like Fold). Με γκρι χρώμα η α-αλυσίδα και με μπλε χρώμα η β-αλυσίδα. Με κίτρινες σφαίρες διακρίνονται οι δισουλφιδικοί δεσμοί. Κάθε μία από τις αλυσίδες α και β 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 T κυτταρικού υποδοχέα υπάρχει στην βάση RCSB PDB με κωδικό 1TCR.

Το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC) είναι ένα μεγάλο γενετικό σύμπλεγμα με πολλαπλούς τύπους. Οι τύποι του MHC κωδικοποιούν δύο βασικές τάξεις μεμβρανοσυνδεόμενων γλυκοπρωτεϊνών:

- Τάξης I
- Τάξης II

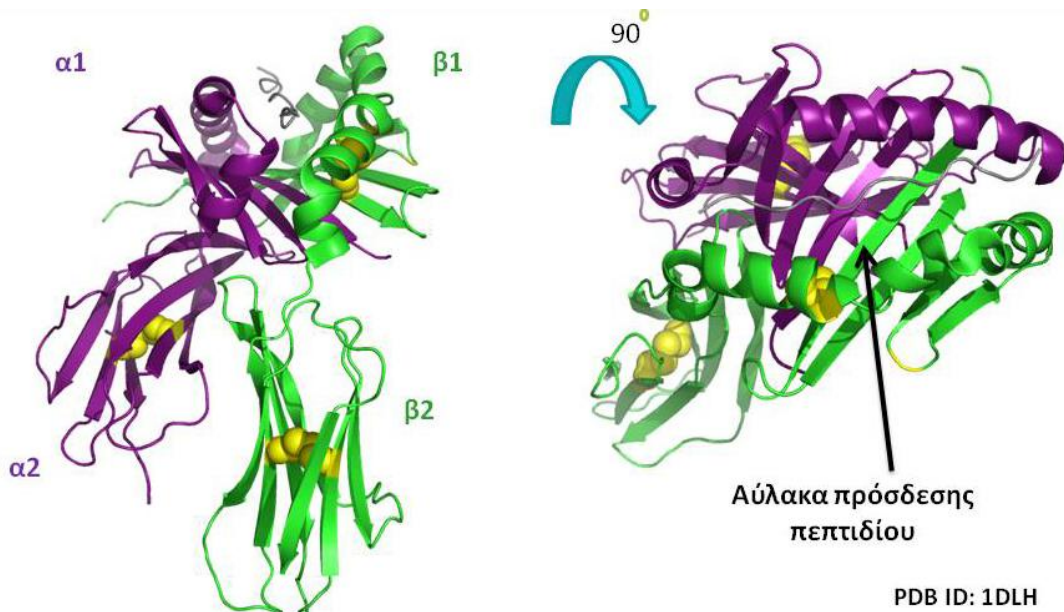
Τα μόρια MHC τάξης I εντοπίζονται στην επιφάνεια σχεδόν όλων των εμπύρηνων κυττάρων και παρουσιάζουν αντιγονικά πεπτίδια έτσι ώστε να αναγνωριστούν από τα T κυτταροτοξικά κύτταρα (Ferber, Zoete et al. 2012). Αποτελούνται από μία βαριά α αλυσίδα (45KDa), συνδεδεμένη μη ομοιοπολικά με μία μικρή πρωτεΐνη, τη β2-μικροσφαιρίνη (12KDa). Η ύπαρξη της β2-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 $\alpha 1$, $\alpha 2$ και $\alpha 3$. Η $\alpha 1$ με την $\alpha 2$ 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 προσδέεται το αντιγονικό πεπτίδιο που παρουσιάζει το κύτταρο. Η στερεοδιάταξη της $\alpha 3$ ακολουθεί το χαρακτηριστικό δίπλωμα της ανοσοσφαιρίνης IgG (Li 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 πράσινο χρώμα η πρωτεΐνη $\beta 2$ -μικροσφαιρίνη και με κίτρινες σφαίρες οι δισουλφιδικοί δεσμοί. Με μωβ χρώμα το αντιγονικό πεπτίδιο. Το μόριο αναπαρίσταται στις 0° μοίρες και στις 90°

Τα μόρια MHC τάξης II εντοπίζονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και αποτελούνται από δύο αλυσίδες, την α αλυσίδα (33KDa) με τις $\alpha 1$ και $\alpha 2$ δομικά αυτοτελείς περιοχές και την β αλυσίδα (28KDa), με τις $\beta 1$ και $\beta 2$ δομικά αυτοτελείς περιοχές (Εικόνα 6). Οι $\alpha 2$ και $\beta 2$ ακολουθούν το χαρακτηριστικό δίπλωμα IgG ανοσοσφαιρίνης, και οι $\alpha 1$ και $\beta 1$ 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 προσδέεται το αντιγονικό πεπτίδιο που παρουσιάζει το αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο (Reinherz and Acuto 2011). Τα πεπτίδια που παρουσιάζονται στα T βοηθητικά κύτταρα αποτελούνται από 12-25 αμινοξικά κατάλοιπα καθώς η αύλακα που έχει σχηματιστεί είναι μεγαλύτερη από αυτήν του MHC I μορίου (Εικόνα 6).



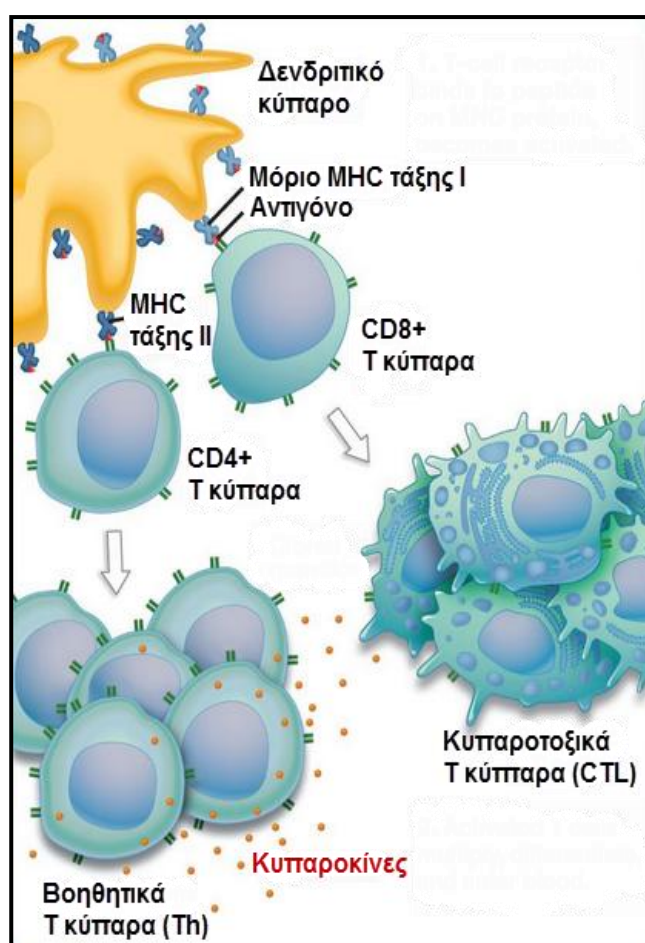
Εικόνα 6 : Τριασδιάστατη δομή μορίου MHC τάξης II, με κωδικό PDB 1DLH. Με κίτρινες σφαίρες αναπαρίστανται οι δισουλφιδικοί. Το μόριο αναπαρίσταται στις 0° μοίρες και στις 90° .

1.4.2.1 ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΣΟΛΑΒΗΤΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ

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, 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.

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 (cytotoxic T cell,

Tc) (Engvall and Perlmann 1971). Τα T λεμφοκύτταρα δεν διαθέτουν αντιγονοπαρουσιαστικές ιδιότητες σε αντίθεση με τα B λεμφοκύτταρα. Τα T βοηθητικά κύτταρα διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα γιατί φέρουν στην επιφάνεια τους τις γλυκοπρωτεΐνες CD4⁺ και CD8⁺ αντίστοιχα (Li 2010). Στην κυτταρομεσολαβητική ανοσία όταν ένα T βοηθητικό κύτταρο αναγνωρίζει και αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο πεπτιδίου-MHC μόριο, γίνεται δραστικό και εκκρίνει κυτταροκίνες (Mauri and Bosma 2012)((Mareeva, Martinez-Hackert et al. 2008).



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

1.4.3 ΑΝΤΙΓΟΝΟΠΑΡΟΥΣΙΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Η χυμική και η κυτταρομεσολαβητική απόκριση ελάγονται και ενεργοποιούνται από τη στιγμή που θα παραχθούν κυτταροκίνες από τα T βοηθητικά κύτταρα. Ένας λάθος "συναγερμός" μπορεί να ενεργοποιήσει τα T κύτταρα έτσι ώστε να αρχίσουν να παράγουν

κυτταροκίνες και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες ανοσολογικές αποκρίσεις και ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων (Abbas, Murphy et al. 1996). Για την προστασία του οργανισμού από αυτή την περίπτωση τα Th κύτταρα αναγνωρίζουν μόνο τα αντιγόνα που εκτίθενται μαζί με μόρια MHC II πάνω στη μεμβράνη αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APC). (Germain 1988). Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα διακρίνονται για δύο ιδιότητες.

- εκφράζουν μόρια MHC II στη μεμβράνη τους
- μπορούν να παράγουν ένα συνδιεγερτικό σήμα που απαιτείται για την ενεργοποίηση των Th κυττάρων

Αρχικά, τα APC ενδοκυτταρώνουν το αντιγόνο, είτε με φαγοκυττάρωση είτε με ενδοκυττάρωση και έπειτα εκθέτουν τμήμα του, δεσμευμένο με ένα μόριο MHC II, στη μεμβράνη τους. Το Th κύτταρο αναγνωρίζει και αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο αντιγόνου-MHC II πάνω στη μεμβράνη του APC. Τότε παράγεται ένα πρόσθετο συνδιεγερτικό σήμα από το APC που οδηγεί στην ενεργοποίηση του Th κυττάρου.

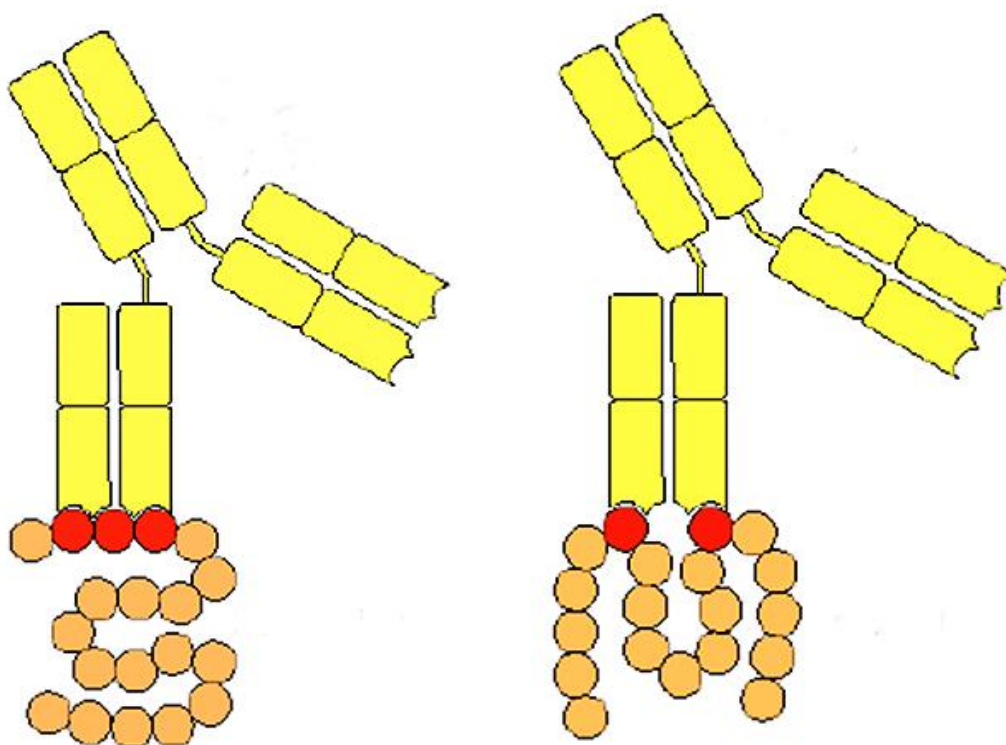
1.5 ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΣ ΚΑΘΟΡΙΣΤΗΣ - ΕΠΙΤΟΠΟΣ

Όπως προαναφέρθηκε τα T και τα B λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν διαφορετικά τα αντιγόνα. Τα αντιγόνα είναι συνήθως μεγάλα και πολύπλοκα μόρια και έτσι τα λεμφοκύτταρα αδυνατώντας να αναγνωρίσουν τόσο πολύπλοκα συστήματα, αναγνωρίζουν διακριτές περιοχές του μακρομορίου που ονομάζονται αντιγονικοί καθοριστές (antigenic determinant) ή επίτοποι (epitope). Αντιγονικός καθοριστής ονομάζεται η ανοσοδραστική περιοχή του αντιγονικού μορίου, που έχει την ικανότητα να συνδέεται με τα κυκλοφορούντα αντισώματα, τις μεμβρανικές ανοσοσφαιρίνες των B λεμφοκυττάρων, ή τον υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων (Hofmann and Hodge 1987).

Οι δύο διαφορετικοί κλάδοι του ανοσοποιητικού συστήματος αναγνωρίζουν διαφορετικά τους επίτοπους. Ο χυμικός κλάδος (B λεμφοκύτταρα) αναγνωρίζει επίτοπους που εκφράζονται πάνω σε επιφάνειες βακτηρίων ή ιών όπως και αυτούς που εκφράζονται σε διαλυτές πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες ή λιποσακχαρίτες που έχουν απελευθερωθεί από παθογόνους εισβολείς. Εφόσον οι υποδοχείς των B λεμφοκυττάρων προσδένουν αντιγόνα σε διαλυτή μορφή, οι επίτοποι που αναγνωρίζουν βρίσκονται

συνήθως στην επιφάνεια του αντιγόνου. Αντίθετα στον κυτταρομεσολαβητικό κλάδο (T λεμφοκύτταρα) αναγνωρίζει πρωτεϊνικούς επίτοπους που εκφράζονται με μόρια MCH σε εαυτά κύτταρα του οργανισμού όπως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα η τροποποιημένα εαυτά κύτταρα π.χ. καρκινικά κύτταρα η κύτταρα μολυσμένα από ιό.

Οι επίτοποι χωρίζονται σε δύο κατηγορίες τους γραμμικούς ή συνεχείς επίτοπους (linear ή continuous) και τους στερεοδιαταξικούς ή ασυνεχείς επίτοπους (conformational ή discontinuous) (Hwang and Park 2008) (Εικόνα 8).



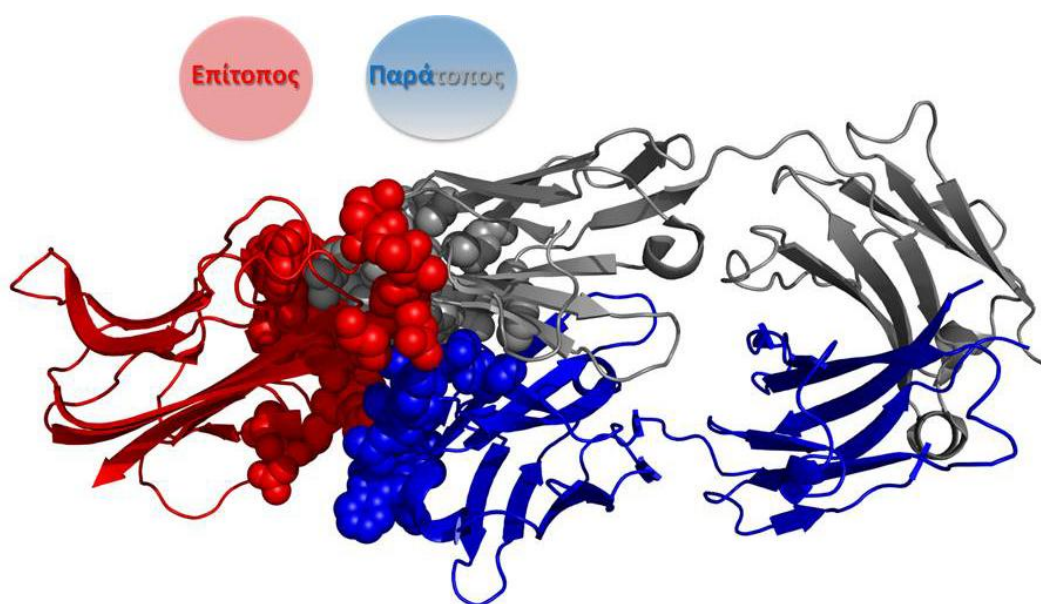
Εικόνα 8 : Αριστερά αναπαρίσται ο γραμμικός επίτοπος με κόκκινο χρώμα ενώ δεξιά αναπαρίσται ένας στερεοδιαταξικός επίτοπος πάλι με κόκκινο χρωματισμό

Οι γραμμικοί επίτοποι αλληλεπιδρούν με τον παράτοπο (περιοχή του αντισώματος) με βάση την πρωτοταγή δομή τους, αφού αποτελούνται από αμινοξικά κατάλοιπα που βρίσκονται διαδοχικά στην αμινοξική ακολουθία του αντιγόνου (Saha and Raghava 2006). Αντίθετα ο στερεοδιαταξικός επίτοπος αποτελείται από αμινοξικά κατάλοιπα ή πεπτίδια της αμινοξικής ακολουθίας. Τα κατάλοιπα αυτά μπορεί να μην είναι διαδοχικά στην ακολουθία και να απέχουν αρκετά μεταξύ τους. Λόγω όμως του διπλώματος της πρωτεΐνης πλησιάζουν αρκετά στο χώρο σχηματίζοντας τον στερεοδιαταξικό επίτοπο. Οι

στεροδιαταξικοί επίτοποι αλληλεπιδρούν με τον παράτοπο με βάση την τριτοταγή δομή του αντιγόνου (Haste Andersen, Nielsen et al. 2006).

1.5.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΗΚΑ Β ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ

Ο επίτοπος (ανοσογόνο) συνδέεται με ένα αντίσωμα με ασθενείς μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις για να δημιουργηθούν θα πρέπει τα άτομα των μορίων που πρόκειται να αλληλεπιδράσουν να είναι σε μικρή απόσταση μεταξύ τους. Για να ισχυροποιηθεί ο δεσμός θα πρέπει η θέση πρόσδεσης του αντισώματος, δηλαδή ο παράτοπος, και ο επίτοπος να έχουν συμπληρωματικά σχήματα, σχέση κλειδιού – κλειδαριάς (Εικόνα 9) (Ivančius, Schein et al. 2009). Όπως προαναφέρθηκε τα αντισώματα αναγνωρίζουν ελεύθερα αντιγόνα μέσα σε διάλυμα. Περιοχές λοιπόν στην επιφάνεια της πρωτεΐνης του αντιγόνου που προεξέχουν, πιθανώς να λειτουργούν ως επίτοποι λόγω της προσβασιμότητας των ατόμων τους στο διάλυμα. Συμπερασματικά, θα αποτελούνται κατά το μεγαλύτερο ποσοστό τους από πολικά αμινοξικά κατάλοιπα. Αντίθετα περιοχές του αντιγόνου που είναι καλά κρυμμένες στο εσωτερικό της πρωτεΐνης αποτελούνται από υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα και άρα δεν θα λειτουργούν ως κυτταρικοί επίτοποι, έκτος αν η πρωτεΐνη αποδιαταχθεί. Σύνθετες πρωτεΐνες αποτελούνται από πολλούς αλληλεπικαλυπτόμενους Β κυτταρικούς επίτοπους. Αυτό σημαίνει ότι μεγαλύτερο επιφανειακό μέρος της πρωτεΐνης μπορεί να λειτουργήσει ως αντιγόνο.



PDB ID: 3WD5

Εικόνα 9 : Γραφική αναπαράσταση του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος. Τα άτομα των αμινοξικών καταλοίπων που αλληλεπιδρούν αναπαριστώνται με σφαίρες. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται το αντιγόνο, με γκρι η ελαφριά

αλυσίδα του αντισώματος και με μπε 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 : 3WD5.

1.5.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ

Αντίθετα με τα Β, τα Τ λεμφοκύτταρα δεν αναγνωρίζουν αντιγόνα σε διαλυτή μορφή, άλλα μικρά πεπτίδια του αντιγόνου που έχουν υποστεί πρώτα επεξεργασία και αλληλεπιδρούν με μόρια ΜΗC. Στη συνέχεια παρουσιάζονται στην επιφάνεια των κυττάρων ως σύμπλοκο με τα μόρια ΜΗC. Οι Β κυτταρικοί επίτοποι προσδιορίζονται ,μέσω της ικανότητας τους να αλληλεπιδρούν με το αντίσωμα. Δομικές μελέτες κρυσταλλωμένων μορίων ΜΗC τάξης I ή II με γνωστά Τ-κυτταρικά αντιγονικά πεπτίδια, έδειξαν ότι το πεπτίδιο προσδένεται σε μια αύλακα πάνω στο μόριο ΜΗC. Αντίθετα οι Τ κυτταρικοί επίτοποι προσδιορίζονται από την ικανότητα τους να αλληλεπιδρούν τόσο με τον υποδοχέα Τ λεμφοκυττάρου όσο και με ένα μόριο ΜΗC (Tong, Bogen et al. 2008). Ένα μόριο ΜΗC δεν είναι εξειδικευμένο απέναντι σε έναν Τ κυτταρικό υποδοχέα άλλα αλληλεπιδρά με μια ποικιλία διαφορετικών πεπτιδίων. Τα Τ λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν επίτοπους που συνήθως βρίσκονται στο εσωτερικό των μορίων στόχων και έπειτα από επεξεργασία εκτίθενται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών ή τροποποιημένων εαυτών κυττάρων (Agrawal, Kumar et al. 2011).

1.6 ΑΝΟΣΟΓΟΝΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ

Υπάρχει μία διάκριση μεταξύ των εννοιών ανοσογόνου και αντιγόνου. Ανοσογόνο (Immunogen), είναι μία ουσία που μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή αντισωμάτων ή/και δραστικών Τ λεμφοκυττάρων, δηλαδή μία ουσία που αποτελεί στόχο της ανοσολογικής απόκρισης. Αντιγόνα ονομάζονται τα συστατικά που αναγνωρίζονται είτε από τον υποδοχέα των Β κυττάρων είτε σε συνδυασμό με μόρια ΜΗC από τον υποδοχέα των Τ κυττάρων και επάγουν ανοσολογική απόκριση. Όλες οι ανοσογόνες ουσίες είναι ταυτόχρονα και αντιγόνα (antigen). Το αντίθετο δεν ισχύει, δεν είναι όλα τα αντιγόνα και ανοσογόνα (Levine and Koh 1999).

Αν πάρουμε ως παράδειγμα 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.

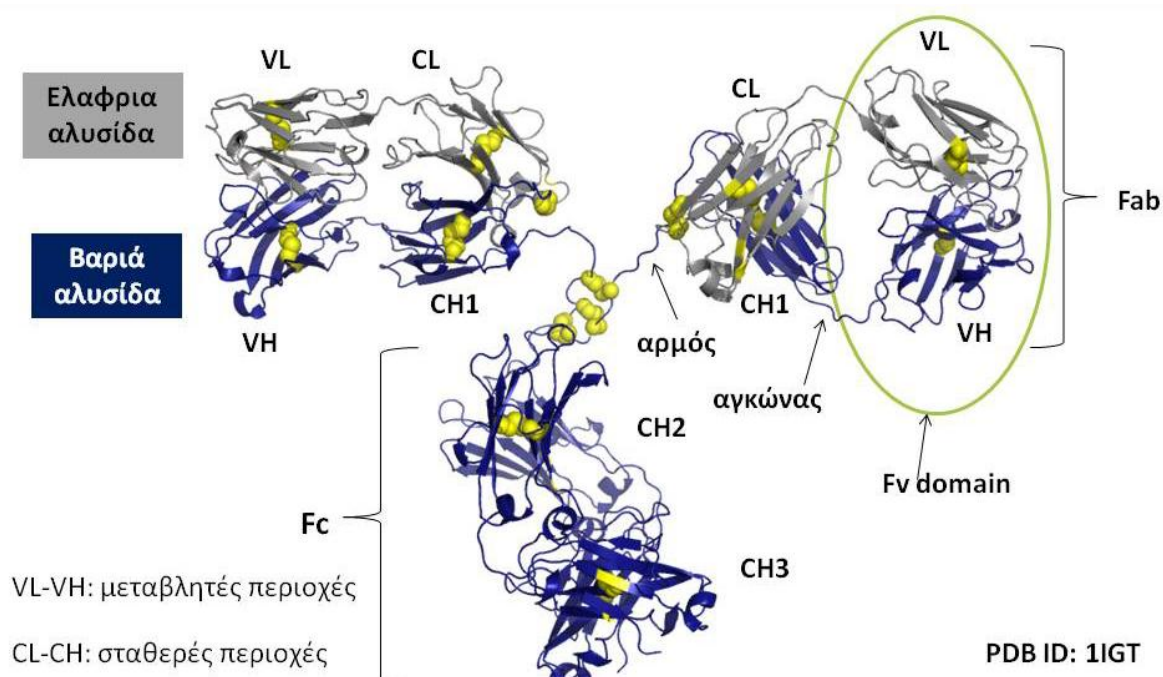
Ο ρόλος του αντιγόνου είναι ιδιαίτερα κρίσιμος αφού όταν αυτό αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί ώριμα, αντιγονικά δραστικά Τ και Β-λεμφοκύτταρα, αυτό έχει ως αποτέλεσμα επαγωγή και την επέκταση ενός πληθυσμού των κυττάρων με δεδομένη αντιγονική ειδικότητα. Μέσω αυτής της διαδικασίας, κατά τη δέσμευση του αντιγόνου από τους υποδοχείς των λεμφοκυττάρων, προκαλεί επαναλαμβανόμενους πολλαπλασιασμούς και δημιουργεί κλώνους κύτταρα με αντιγονική ιδιότητα παρόμοια με του πατρικού.

Υπάρχουν δύο κατηγορίες αντιγόνων, το εξωγενές και το ενδογενές αντιγόνο. Το εξωγενές αντιγόνο παράγεται έξω από το κύτταρο του ξενιστή και εισέρχεται με ενδοκυττάρωση ή φαγοκυττάρωση. Στη συνέχεια τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα διασπούν το εξωγενές αντιγόνο σε μικρά πεπτίδια τα οποία δεσμεύονται μέσα στην αύλακα των μορίων ΜHC II. Τα μόρια ΜHC που φέρουν το πεπτίδιο, μεταβαίνουν στη συνέχεια στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Το ενδογενές αντιγόνο παράγεται μέσα στο κύτταρο του ξενιστή. Δύο παραδείγματα είναι οι ιικές πρωτεΐνες που συντίθενται μέσα στα μολυσμένα κύτταρα του ξενιστή και οι μοναδικές πρωτεΐνες που συντίθενται από τα καρκινικά κύτταρα. Τα ενδογενή αντιγόνα διασπώνται σε πεπτιδικά θραύσματα τα οποία δεσμεύονται σε μόρια ΜHC I μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και συνέχεια μεταφέρονται στη κυτταρική μεμβράνη.

1.7 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΕΣ

Οι ανοσοσφαιρίνες ή αντισώματα είναι πρωτεΐνες που δεσμεύουν τα αντιγόνα και είτε αποτελούν υποδοχείς στην επιφάνεια των Β λεμφοκυττάρων, είτε είναι ετερογενή μόρια που εκκρίνονται από τα πλασματοκύτταρα κατά τη διάρκεια της χυμικής ανοσίας. 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, Das et al. 2009) (Εικόνα 10).

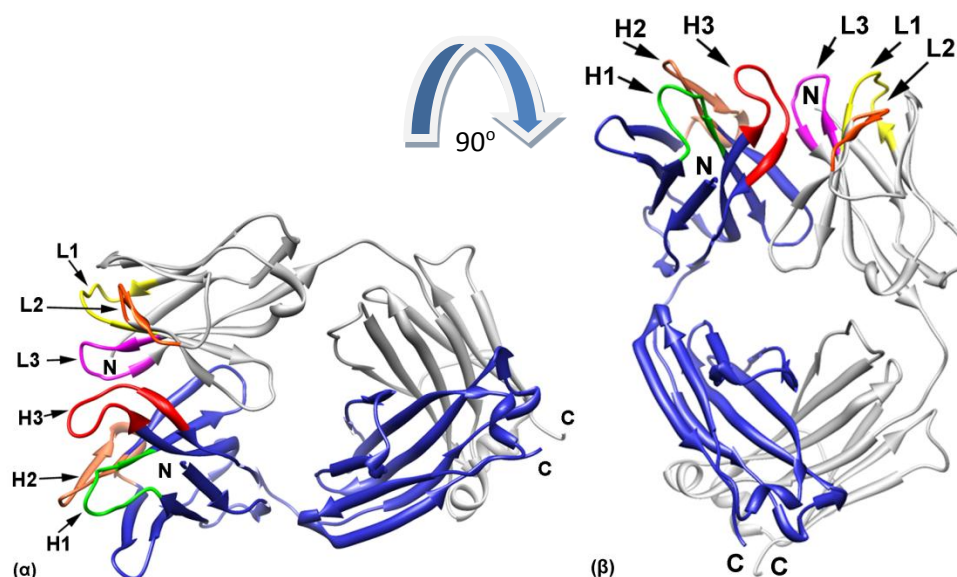


Εικόνα 10 : Γραφική απεικόνιση της δομής με κωδικό PDB : 1IGT, με το λογισμικό PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.). Με μπλε χρώμα αναπαριστώνται οι βαριές αλυσίδες του μορίου, με γκρι οι ελαφριές αλυσίδες, και με κίτρινες σφαίρες οι δισουλφιδικοί δεσμοί. Γίνεται διαχωρισμός του V domain (μεταβλητή δομικά αυτοτελής περιοχή), του Fab και του Fc θραύσματος 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 περιοχή (V, C).

Συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές, (Complementary determining regions, CDR)

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, Haas et al. 2010). Ονομάζονται μεταβλητές περιοχές, (Variable, V), VL για την ελαφριά αλυσίδα και VH για την βαριά αλυσίδα. Οι διαφορές που προκύπτουν στα διάφορα αντισώματα, οφείλονται στην ποικιλότητα των αμινοξέων στις περιοχές αυτές. 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 10). 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), CL για την ελαφριά και CH για την βαριά αλυσίδα (Davies, Burrows et al. 1975) (Εικόνα 11).



Εικόνα 11 : (α) Γραφική αναπαράσταση cartoon με το λογισμικό PyMOL της τρισδιάστασης δομής του μονοκλωνικού αντισώματος Cetuximab με κωδικό PDB: 1Y78. Με γκρι χρώμα η ελαφριά, και με μπλε χρώμα η βαριά αλυσίδα του αντισώματος. Με κίτρινο, πορτοκαλί και magenta 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 πράσινο, ανοιχτό ροζ και κόκκινο οι υπερμεταβλητές θηλιές της βαριάς αλυσίδας (H1, H2, H3). (β) Αναπαράσταση της ίδιας δομής, στραμμένη κατά 90° μοίρες.

Fab θραύσμα αντισώματος

Σε ένα πολύ σημαντικό πείραμα οι επιστήμονες προσπάθησαν να θραύσουν ένα αντίσωμα με την ουσία παπαΐνη. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να δημιουργηθούν τρία θραύσματα. Τα δύο από αυτά ήταν παρόμοια (μεγέθους 45 KD) αλλά το τρίτο ήταν πολύ διαφορετικό (μεγέθους 50KD). Τα δύο πανομοιότυπα θραύσματα διέθεταν την ικανότητα να δεσμεύουν αντιγόνα για αυτό ονομάστηκαν Fab θραύσματα (Fragment antigen binding), ενώ το τρίτο θραύσμα δεν διέθετε την ικανότητα να δεσμεύει αντιγόνα. Βρέθηκε ότι κρυσταλλώνεται κατά την αποθήκευση του σε χαμηλή θερμοκρασία και έτσι ονομάστηκε Fc θραύσμα (Fragment crystallizable). (Bentley, Boulot et al. 1994).

Μετά από ανάλυση μεγάλου αριθμού ελαφριών αλυσίδων βγήκαν κάποια συμπεράσματα. Η μεταβλητή περιοχή της ελαφριάς αλυσίδας διαφέρει πολύ από αντίσωμα σε αντίσωμα αντίθετα η σταθερή περιοχή είναι πολύ συντηρημένη με αποτέλεσμα να έχει 2 βασικές

ακολουθίες αμινικών καταλοίπων. Έτσι λοιπόν υπάρχουν δύο τύποι ελαφριών αλυσίδων ο κάπα (κ) και ο λάμδα (λ). Στον άνθρωπο, το 60% των ελαφριών αλυσίδων είναι τύπου κ και το 40% τύπου λ, ενώ στο ποντίκι το 95% είναι τύπου κ και το 5% τύπου λ. Κάθε απλό αντίσωμα περιέχει μόνο ένα τύπο ελαφριάς αλυσίδας. Οι αμινοξικές ακολουθίες των λ ελαφριών αλυσίδων δείχνουν μικρές διαφορές με βάση τις οποίες κατατάσσονται σε υποτύπους.

Αντίστοιχα, η μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας δεν είναι συντηρημένη ενώ η σταθερή περιοχή της είναι αρκετά συντηρημένη με αποτέλεσμα αυτή η περιοχή να 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. Έτσι λοιπόν με βάση αυτόν τον διαχωρισμό τα αντισώματα διαχωρίζονται σε 5 υποτάξεις τις : IgM (μ), IgG (γ), IgA (α), IgD (δ), IgE (ε.) (Wingren, Michaelsen et al. 1996)

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

1.8 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ

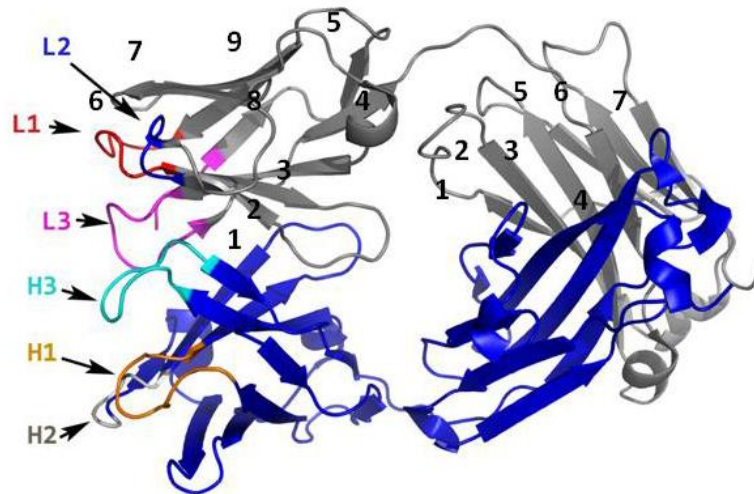
Οι ανοσοσφαιρίνες μελετήθηκαν πολύ και ήταν αντικείμενο κρυσταλλογραφικών αναλύσεων με ακτίνες Χ όπου φάνηκε ότι ακολουθούν ένα κοινό χαρακτηριστικό δίπλωμα στο χώρο που ονομάστηκε Ανοσοσφαιρινικό Δίπλωμα (Immunoglobulin Fold).

Η δομή αυτή ακολουθεί τη χαρακτηριστική δομή β-σάντουιτς (β-sandwich) δυο πτυχωτών β-επιφανειών (β-sheets) κάθε μία από τις οποίες αποτελείται από αντιπαράλληλους β-κλώνους που ενώνονται με θηλιές διαφόρων μεγεθών. Οι β-κλώνοι σταθεροποιούνται μεταξύ τους με υδρογονικούς δεσμούς που συνδέουν τις αμινομάδες του ενός κλώνου με τις καρβοξυτελικές ομάδες του επόμενου (γειτονικού) κλώνου. Οι β-κλώνοι αποτελούνται

από πολικά αλλά και από υδρόφοβα κατάλοιπα με τις πλευρικές τους αλυσίδες να τοποθετούνται κάθετα στην β-πτυχωτή επιφάνεια. Τα πολικά κατάλοιπα βρίσκονται συνήθως στο εξωτερικό του σάντουιτς ενώ τα υδρόφοβα προς το εσωτερικό (Harris and Thorgeirsson 1998).

Παρόλο που και οι μεταβλητές και οι σταθερές περιοχές του αντισώματος ακολουθούν τη δομή και ίδιο χαρακτηριστικό δίπλωμα στο χώρο, υπάρχουν λεπτές διαφορές μεταξύ τους. Η μεταβλητή αυτοτελής περιοχή είναι λίγο πιο μεγάλη αφού περιέχει ένα επιπλέον ζευγάρι β-κλώνων στην β-πτυχωτή επιφάνεια. Έτσι λοιπόν το μεταβλητό τμήμα περιέχει ένα σάντουιτς δυο β-πτυχωτών επιφανειών, όπου η πρώτη περιέχει 5 αντιπαράλληλους β-κλώνους ενώ η δεύτερη 4 αντιπαράλληλους β-κλώνους. Οι επιφάνειες συγκρατούνται μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό σε συντηρημένες θέσεις. Από την άλλη το σταθερό τμήμα της ελαφριάς αλυσίδας αποτελείται από ένα β-σάντουιτς με τέσσερις αντιπαράλληλους β-κλώνους στη μία β-επιφάνεια και τρεις αντιπαράλληλους β-κλώνους στη δεύτερη, με ένα δισουλφιδικό δεσμό ανάμεσά τους (Huber, Bigi et al. 1980).

Το χαρακτηριστικό αυτό δίπλωμα, επιτρέπει την ανάπτυξη μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις δομικά αυτοτελείς περιοχές, 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 περιοχή δέσμευσης του αντιγόνου στο ανοσοσφαιρινικό μόριο (Εικόνα 12) (Waldmann 2003).



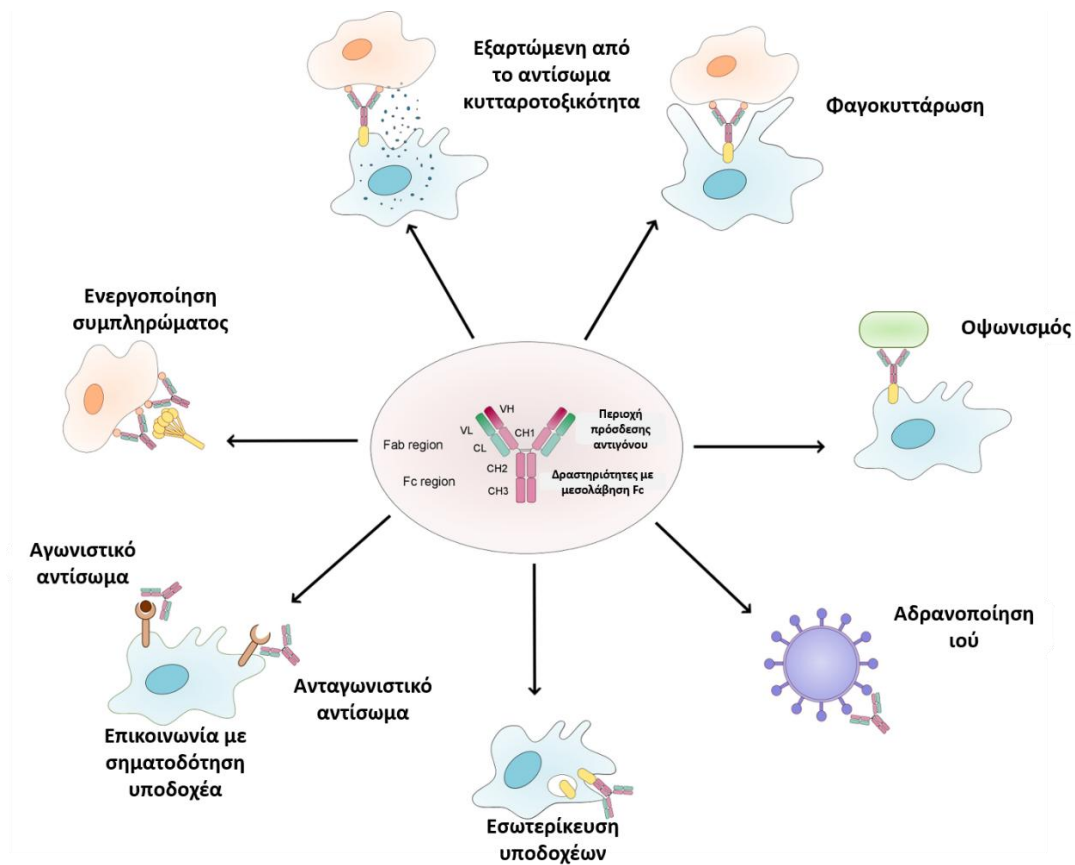
PDB ID:1YY8

Εικόνα 12 : Αναπαράσταση της δομής με κωδικό PDB : 1YY8. Με νούμερα αναπαρίστανται οι αντιπαράλληλοι β-κλώνοι στις β-πτυχωτές επιφάνειες.

1.9 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Κύρια λειτουργία των αντισωμάτων είναι να δεσμεύουν και να αναγνωρίζουν το αντιγόνο. Εκτός από αυτό όμως, συμμετέχουν σε μια ευρεία κλίμακα βιολογικών δράσεων. Τα αντισώματα δεν έχουν την ικανότητα να απενεργοποιήσουν η να θανατώσουν ένα κύτταρο στόχο απλά και μόνο με την πρόσδεση τους σε αυτόν. Για να είναι αποτελεσματικά πρέπει να επάγουν μια σειρά από βιολογικές αποκρίσεις και δραστικές λειτουργίες που θα προκαλέσουν την αφαίρεση του παθογόνου. Παρότι στο Fab θραύσμα του αντισώματος βρίσκονται οι καθοριστικές συμπληρωματικές περιοχές που είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση του αντιγόνου, το Fc θραύσμα ευθύνεται για μια ποικιλία αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες, κύτταρα και ιστούς, που οδηγούν στις δραστικές λειτουργίες της ανοσολογικής απόκρισης. Τέσσερις βασικές λειτουργίες είναι ο οψωνισμός, η εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα, η

ενεργοποίηση του συμπληρώματος και η φαγοκυττάρωση (Εικόνα 13).



Εικόνα 13 : 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).

1.9.1 ΟΨΩΝΙΣΜΟΣ

Οψωνισμός είναι η διαδικασία με την οποία ένα παθογόνο "μαρκάρεται" για πέψη και εξαλείφεται από ένα φαγόσωμα. Όταν στον οργανισμό εντοπίζεται κάποια φλεγμονή τότε τα φαγοκύτταρα αναγνωρίζουν μοτίβα μικροβιακών παθογόνων και επάγουν την φαγοκυττάρωση του αντιγόνου από τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα. Ο οψωνισμός περιλαμβάνει την πρόσδεση ενός μορίου π.χ. αντισώματος με ένα αντιγόνο. Μετά τον οψωνισμό καλούνται τα φαγοκύτταρα που έλκονται από το παθογόνο. Το τμήμα Fab του αντισώματος συνδέεται με το αντιγόνο, ενώ το τμήμα Fc του αντισώματος προσδένεται σε ένα υποδοχέα Fc στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων, διευκολύνοντας την φαγοκυττάρωση. Το σύμπλοκο μπορεί επίσης να δημιουργήσει υποπροϊόντα, τα οποία είναι σημαντικά συστατικά του συστήματος συμπληρώματος. Αυτά τα συστατικά

εναποτίθενται στην κυτταρική επιφάνεια του παθογόνου και ενισχύουν στην καταστροφή του.

1.9.2 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ

Διαφορετικές τάξεις αντισωμάτων ενεργοποιούν ένα σύνολο γλυκοπρωτεϊνών του ορού που συνολικά ονομάζονται σύστημα του συμπληρώματος (complement system). Ο Paul Elrich, στο Βερολίνο, πραγματοποίησε ανεξάρτητα πειράματα και πρότεινε τον όρο αυτό, ορίζοντάς το ως «τη δραστικότητα του ορού του αίματος που συμπληρώνει τη δράση των αντισωμάτων». Σήμερα γνωρίζουμε ότι το συμπλήρωμα περιλαμβάνει ένα σύνολο πρωτεϊνών (περισσότερες από 30 διαλυτές και συνδεδεμένες σε κύτταρα) που μπορούν να διαπερνούν κυτταρικές μεμβράνες.

Το σύστημα του συμπληρώματος Περιλαμβάνει πάνω από 30 πρωτεΐνες (πεπτίδια) και αποτελεί το 5% των σφαιρινών του αίματος. Συμβολίζονται με το γράμμα C και αριθμούνται από το 1 έως το 9. Κατά την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, παράγονται «πεπτιδικά θραύσματα» από τη διαίρεση των πεπτιδίων. Τα πεπτιδικά θραύσματα που παράγονται κατά την ενεργοποίηση, συμβολίζονται με μικρά γράμματα, δίπλα στο πεπτίδιο από το οποίο προέκυψαν π.χ. C3a, C3b. Τα θραύσματα αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν συμπλέγματα με ενζυμική δραστηριότητα. Τα συστατικά του συμπληρώματος κυκλοφορούν στον ορό ως ανενεργά προένζυμα, μέχρι την ενεργοποίησή τους. Τα ξένα κύτταρα (βακτήρια) έχουν στην επιφάνειά τους μόρια που ενεργοποιούν το σύστημα συμπληρώματος. Η ενεργοποίηση γίνεται με πρωτεόλυση. Η ενεργοποίηση οδηγεί σε ένα «καταρράκτη» αντιδράσεων και αλληλεπιδράσεων, που τα καθιστά ενεργά και ικανά να πραγματοποιήσουν μια σειρά λειτουργιών.

1.9.3 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 για το Fc θραύσμα του αντισώματος. Τα κύτταρα αυτά, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, 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 (Chames, Van Regenmortel et al. 2009). 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 cytotoxicity, ADCC). Το αντίσωμα λειτουργεί ως ένας υποδοχέας, που βοηθάει το δραστικό κύτταρο στην αναγνώριση και τη θανάτωση του κυττάρου στόχου (Carter and Vasey 2001).

1.9.4 ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ

Τα μακροφάγα διαθέτουν την ικανότητα ενδοκυττάρωσης και πέψης εξωγενών αντιγόνων, όπως ολόκληρων μικροοργανισμών και αδιάλυτων σωματιδίων, καθώς και ενδογενούς προέλευσης στοιχείων, όπως τραυματισμένων ή νεκρών κυττάρων του ίδιου οργανισμού, κυτταρικών υπολειμμάτων και ενεργοποιημένων παραγόντων πήξης. Κατά την έναρξη της φαγοκυττάρωσης, τα μακροφάγα προσελκύονται και κινούνται προς ποικιλία υποστρωμάτων που παράγονται σε μια ανοσοαπόκριση, στα πλαίσια της διαδικασίας του χημειοτακτισμού ή χημειοταξίας.

Το επόμενο βήμα της φαγοκυτταρικής διαδικασίας συνίσταται στην προσκόλληση του αντιγόνου στη μεμβράνη του μακροφάγου. Πολύπλοκα αντιγόνα, όπως ολόκληρα βακτηριακά κύτταρα ή ιικά σωματίδια, τείνουν να προσκολλώνται ικανοποιητικά και να φαγοκυτταρώνονται άμεσα. Αντίθετα, απομονωμένες πρωτεΐνες και βακτήρια που περικλείονται από κάψα, δεν προσκολλώνται ικανοποιητικά και για αυτό το λόγο δεν φαγοκυτταρώνονται εύκολα. Η προσκόλληση αυτή επάγει τη δημιουργία μεμβρανικών προεκβολών, που καλούνται ψευδοπόδια και εκτείνονται γύρω από το υλικό που έχει προσκολληθεί.

Η σύντηξη των ψευδοποδίων εσωκλείει το υλικό σε μια μεμβρανώδη δομή που ονομάζεται φαγόσωμα το οποίο εισέρχεται στη διαδικασία της ενδοκυτταρικής επεξεργασίας. Κατά τη διαδικασία αυτή, το φαγόσωμα κινείται προς το εσωτερικό του κυττάρου, όπου συντήκεται με ένα λυσόσωμα σχηματίζοντας ένα φαγολυσόσωμα. Τα λυσοσώματα περιέχουν λυσοζύμη και ποικιλία άλλων υδρολυτικών ενζύμων, που αναλαμβάνουν την

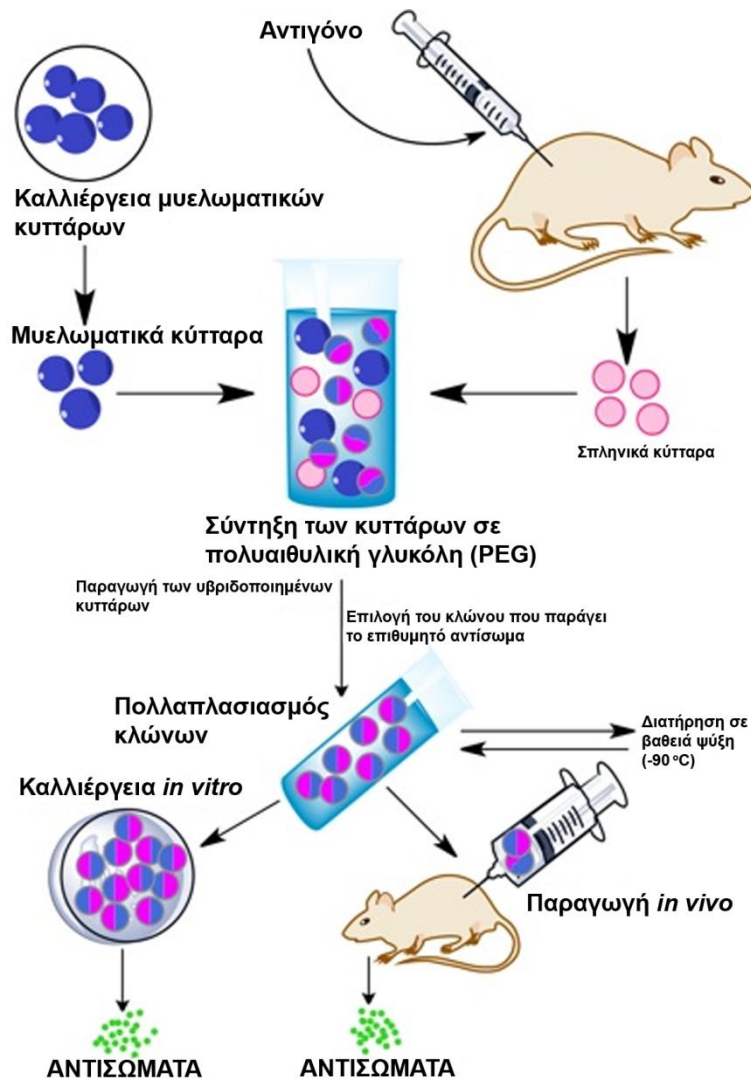
πέψη του υλικού που έχει ενδοκυτταρωθεί. Τα προϊόντα της πέψης που συγκεντρώνονται στο φαγολυσόσωμα, αποβάλλονται μέσω της διαδικασίας της εξωκυττάρωσης.

1.10 ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα μονοκλωνικά αντισώματα (monoclonal antibodies–mAbs), είναι ομοιογενείς πληθυσμοί ανοσοσφαιρινών, προέρχονται από ένα μοναδικό Β κλώνο, έχουν προκαθορισμένη ειδικότητα σε ένα αντιγονικό επίτοπο και έχουν τη δυνατότητα για *in vitro* ατέρμονη παραγωγή. Χρησιμοποιούνται θεραπευτικά σε αυτοάνοσα νοσήματα, καρδιαγγειακές και μολυσματικές ασθένειες, σε διάφορα είδη καρκίνου. Είναι μια ραγδαία αναπτυσσόμενη κατηγορία φαρμάκων και πολλοί επιστήμονες ασχολούνται με τη δημιουργία νέων θεραπευτικών μορίων και με τη βελτίωση ήδη υπαρχόντων.

Η άμεση βιοχημική απομόνωση ενός μονοκλωνικού αντισώματος από ένα παρασκεύασμα πολυκλωνικού αντιορού είναι πολύ δύσκολη. Το 1975, ο George Kohler και ο Cesar Milstein (Kohler and Milstein 1975) ανέπτυξαν μια μέθοδο για την παραγωγή μονοκλωνικού αντισώματος, που έγινε γρήγορα τεχνολογία αιχμής στην ανοσολογία. Με τη συγχώνευση ενός φυσιολογικού Β-κυττάρου που παράγει αντίσωμα με ένα μυελωματικό κύτταρο (δηλαδή ένα καρκινικό κύτταρο), μπόρεσαν να παράγουν ένα υβριδικό κύτταρο, που ονομάστηκε **υβρίδωμα** (hybridoma) και διέθετε τις ιδιότητες της αθανασίας μυελωματικού κυττάρου και της έκκρισης αντισώματος του Β-κυττάρου. Οι κλώνοι των υβριδίων-κυττάρων που εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες μονοκλωνικού αντισώματος, μπορούν να καλλιεργηθούν απεριόριστα. Η σημασία της δουλειάς των Kohler και Milstein αναγνωρίστηκε και τιμήθηκαν με βραβείο Nobel το 1984.

1.10.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΥΒΡΙΔΩΜΑΤΑ



Εικόνα 14 : Διαδικασία παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων με την τεχνική του υβριδισμού.

Τα αντισώματα που περιέχονται σε έναν αντιορό, σε απόκριση χορήγησης ενός αντιγόνου, είναι πολύ ετερογενή, εξαιτίας των πολλαπλών αντιγονικών καθοριστών, που επάγουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση διαφόρων κλώνων Β-λεμφοκυττάρων. Μια τέτοια ανοσοαπόκριση εξυπηρετεί τον εντοπισμό, τη φαγοκυττάρωση και τη λύση του αντιγόνου και παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα στον οργανισμό *in vivo*.

Για τις *in vitro* όμως μελέτες, η χρησιμοποίηση των κλασικών αντιορών, παρουσιάζει βασικά μειονεκτήματα, που οφείλονται: 1) στη μεγάλη ετερογένειά τους, 2) στην περιορισμένη διαθέσιμη ποσότητα, 3) στο γεγονός ότι, ενώ ο τίτλος των αντισωμάτων είναι υψηλός, ο τίτλος μιας συγκεκριμένης ανοσοσφαιρίνης είναι συνήθως χαμηλός και 4) στο ότι είναι θεωρητικά δύσκολο και πρακτικά αδύνατο να επιτευχθεί η παραγωγή του

ίδιου ακριβώς συνδυασμού αντισωματικών ειδικοτήτων σε άλλο ζώο, του ίδιου ή διαφορετικού είδους.

Οι Kohler και Milstein χρησιμοποίησαν τη γνωστή τεχνική υβριδισμού σωματικών κυττάρων, για να δώσουν νέες κατευθύνσεις στη Βιολογική έρευνα (Εικόνα 14). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η παρακάτω:

Γίνεται ανοσοποίηση, συνήθως ποντικίου 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 συλλεχθούν σπληνικά κύτταρα. Παράλληλα γίνεται καλλιέργεια μυελωματικών κυττάρων, τα οποία δεν παράγουν ανοσοσφαιρίνες, αλλά έχουν την ιδιότητα του πολλαπλασιασμού και της ατέρμονος διαίρεσης.

Στη συνέχεια, γίνεται συγχώνευση κυττάρων μυελώματος με κύτταρα που παράγουν αντισώματα και έχουν το ένζυμο εποξανθίνη φωσφοριβοσλική τρανσφεράση (hypoxanthine phosphoribosyl transferase, HPRT). Τα κύτταρα του μυελώματος δεν παράγουν ανοσοσφαιρίνες και έχουν ανεπάρκεια στο ένζυμο HPRT.

Η συγχώνευση των κυττάρων (υβριδώματα), ευνοείται από την προσθήκη χημικών ουσιών, όπως η πολυαιθυλική γλυκόλη (polyethylene glycol, PEG), η οποία προάγει τη συγχώνευση των κυτταρικών μεμβρανών. Ακόμα, γίνεται συγχώνευση 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.

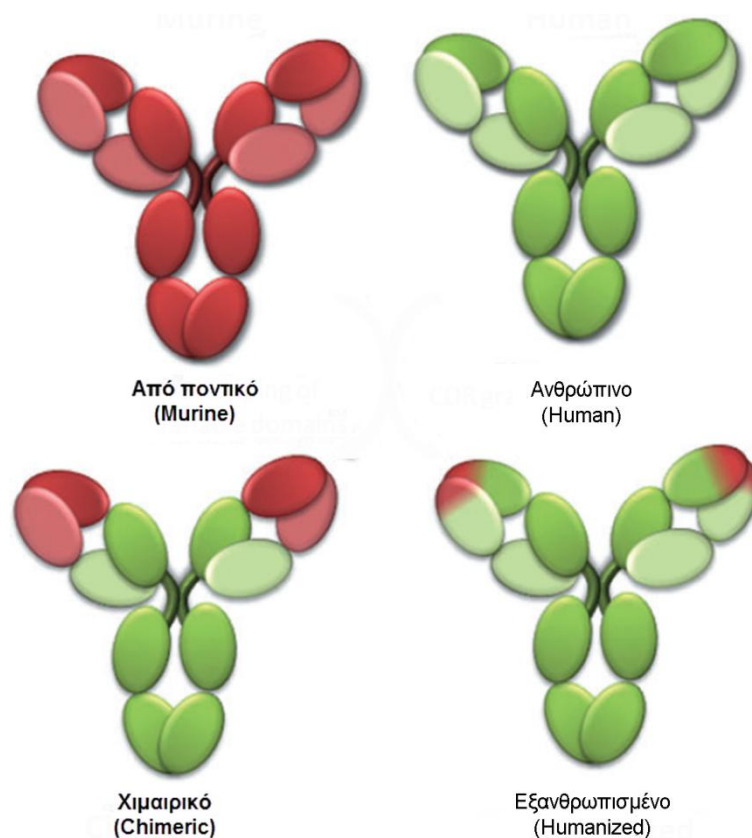
Αφού λοιπόν γίνει η διαδικασία της ταυτοποίησης ως προς την ειδικότητα του εκκρινόμενου αντισώματος, ακολουθεί η διαδικασία της κλωνοποίησης με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Στη συνέχεια ακολουθεί η μαζική παραγωγή *in vivo* και *in vitro*. Το υβρίδιο κύτταρο αναπτύσσεται σε ειδικές φιάλες καλλιέργειας 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 ασκικό υγρό με πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μονοκλωνικών αντισωμάτων (1-25mg/ml). Τα αντισώματα στη συνέχεια απομονώνονται από το ασκικό υγρό με κατάλληλες τεχνικές χρωματογραφίας (Nelson, Reynolds et al. 2000).

1.10.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ

Η ομοιογένεια και η μονο-ειδικότητα των μονοκλωνικών αντισωμάτων τα καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμα για *in vivo* χρήσεις στον άνθρωπο, τόσο για διαγνωστικούς, όσο και για θεραπευτικούς σκοπούς. Το κύριο όμως εμπόδιο για κλινικές εφαρμογές των

μονοκλωνικών αντισωμάτων στον άνθρωπο οφείλεται στο γεγονός ότι τα αντισώματα αυτά προέρχονται συνήθως από ποντίκια και επομένως αναγνωρίζονται ως "ξένα", προκαλώντας αντι-ισοτυπική απόκριση (Chames, Van Regenmortel et al. 2009).

Υπάρχουν πολλές δυσκολίες στην παραγωγή ανθρώπινων μονοκλωνικών αντισωμάτων. Η μεγαλύτερη δυσκολία είναι ότι δεν μπορούν να παραχθούν και να χρησιμοποιηθούν Β-λεμφοκύτταρα από σπλήνα ανθρώπου. Τα υβριδώματα μπορούν να παρασκευαστούν από Β-λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος, από τα οποία λίγα είναι διαφοροποιημένα και συνήθως εκκρίνουν αντισώματα της τάξης Μ. Τα μυελωματικά κύτταρα του ανθρώπου είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε καλλιέργειες *in vitro* κι έχουν μικρό χρόνο ζωής σε σχέση με του ποντικού. Ένας τρόπος για να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα, είναι η μετατροπή των φυσιολογικών Β-λεμφοκυττάρων ανθρώπου 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. Κλωνοποίηση των κυττάρων αυτών, έχει επιτρέψει τη μαζική παραγωγή διαφόρων μονοκλωνικών αντισωμάτων ανθρώπου.



Εικόνα 15 : Χιμαιρικά και εξανθρωπισμένα αντισώματα. Η πρωτεΐνη από ποντικό απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα και η ανθρώπινη πρωτεΐνη απεικονίζεται με πράσινο χρώμα. Με ανοιχτό πράσινο απεικονίζονται οι ελαφριές αλυσίδες ανω με κλειστό πράσινο οι βαριές (Chames, Van Regenmortel et al. 2009).

Ιδιαίτερα σημαντικό επίτευγμα της μηχανικής των αντισωμάτων ήταν η δημιουργία χιμαιρικών μονοκλωνικών αντισωμάτων (chimeric antibodies) (Εικόνα 15). Χιμαιρικά αντισώματα είναι τα αντισώματα που παράγονται 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 (Kohler and Milstein 1975), οδηγώντας στην ανάπτυξη μιας νέας γενιάς θεραπευτικών μορίων (Reinherz and Acuto 2011). 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, Brand 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.

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 (McDermott, Murphy et al. 2013), ο οποίος εμπνεύστηκε από τον George Smith (Smith, Smith et al. 1985).

1.10.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Οι εφαρμογές των mAbs διακρίνονται σε: θεωρητικές, διαγνωστικές και θεραπευτικές.

1.10.3.1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

- Οι **θεωρητικές** εφαρμογές των mAbs αναφέρονται στον:
 - Καθαρισμό πρωτεΐνης. 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. Επειδή τα μονοκλωνικά αντισώματα προσδέονται με πολύ μεγάλη εξειδίκευση σε μια χημική ουσία, μπορούν να βοηθήσουν στον καθαρισμό της από πολύπλοκα μίγματα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η απομόνωση ιντερφερόνης λευκοκυττάρων από τους ερευνητές (Secher and Burke 1980)
 - Μελέτη της περιοχής του αντισώματος που συνδέεται με το αντιγόνο, της βιολογικής λειτουργίας του Fc τμήματος των ανοσοσφαιρινών, των HLA-αντιγόνων κ.τ.λ.
 - Παραγωγή υβριδωμάτων από σύντηξη ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων με κυτταρικές σειρές T-λεμφωμάτων κ.λ.π.

1.10.3.2 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

- Οι **διαγνωστικές** εφαρμογές των mAbs περιλαμβάνουν:
 - Αναζήτηση και τυποποίηση ιών (π.χ. δεικτών του ιού της ηπατίτιδας Β, αντιγονικών ποικιλιών του ιού της γρίπης κ.λ.π.), σχιζομηκύτων και παρασίτων.
 - Ραδιοανοσολογικές και ανοσοενζυμικές μέθοδοι (προσδιορισμός ορμονών).
 - Προσδιορισμός αντιγόνων μεμβράνης, όπως είναι για παράδειγμα ο προσδιορισμός των HLA-αντιγόνων, καθώς και ο προσδιορισμός των υποπληθυσμών των T-λεμφοκυττάρων.
 - Διάγνωση και ταξινόμηση κακοήθων νεοπλασιών (π.χ. λευχαιμίες, μη-Hodgkin λεμφώματα). Μονοκλωνικά αντισώματα συνδέονται με ραδιενεργά ισότοπα, εισάγονται στη συνέχεια στον οργανισμό και ανιχνεύεται η θέση των ραδιενεργών ισωτόπων στο σώμα. Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί με ακρίβεια σε ποιο σημείο του σώματος υπάρχει ένας θρόμβος ή κάποιος όγκος.
 - Απομόνωση αντιγόνου που βρίσκεται σε μικρή ποσότητα σε ένα δείγμα.

1.10.3.3 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

- Οι **θεραπευτικές** εφαρμογές των mAbs περιλαμβάνουν:
 - Παθητική ανοσοποίηση κατά τοξινών και διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών, ιδιαίτερα σε άτομα που εμφανίζουν ανοσοκαταστολή.
 - Ανοσοκατασταλτική θεραπεία στις μεταμοσχεύσεις οργάνων και μυελού των οστών (π.χ. mAb έναντι του CD3 υποδοχέα των T-λεμφοκυττάρων).
 - Θεραπεία αυτοάνοσων νοσημάτων (π.χ. μυασθένεια Gravis, ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης) με την παρασκευή αντιδιοτυπικών αντισωμάτων.
 - Θεραπεία νεοπλασμάτων, κυρίως πειραματικά. Ειδικότερα, το mAb συνδέεται με κυτταροτοξικό φάρμακο και έτσι αποτελεί φορέα του φαρμάκου προς ένα ειδικό αντιγονικό σημείο.
 - Μεταμοσχεύσεις οργάνων και ιστών. Με τα μονοκλωνικά αντισώματα μπορεί να γίνει ο έλεγχος των οργάνων από δωρητές, για να διαπιστωθεί αν ταιριάζουν ανοσολογικά με τα αντίστοιχα των ασθενών.

1.10.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ.

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 16).

Αναστολή λειτουργίας υποδοχέων επιδερμικών αυξητικών παραγόντων (Epidermal Grow Factor Receptor, EGFR)

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. Αυτό καταστέλλει την ωρίμανση του κυττάρου και επάγει την απόπτωση του (Li 2010).

Αναστολή αγγειογένεσης λόγω δέσμησης σε αγγειογενετικούς παράγοντες

Τα καρκινικά κύτταρα παλλαπλασιάζονται κυρίως λόγω της αγγειογένεσης. 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. (Minna, Bunn et al. 1982).

Αναστολείς διμερισμού των υποδοχέων της οικογένειας των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (HER receptors)

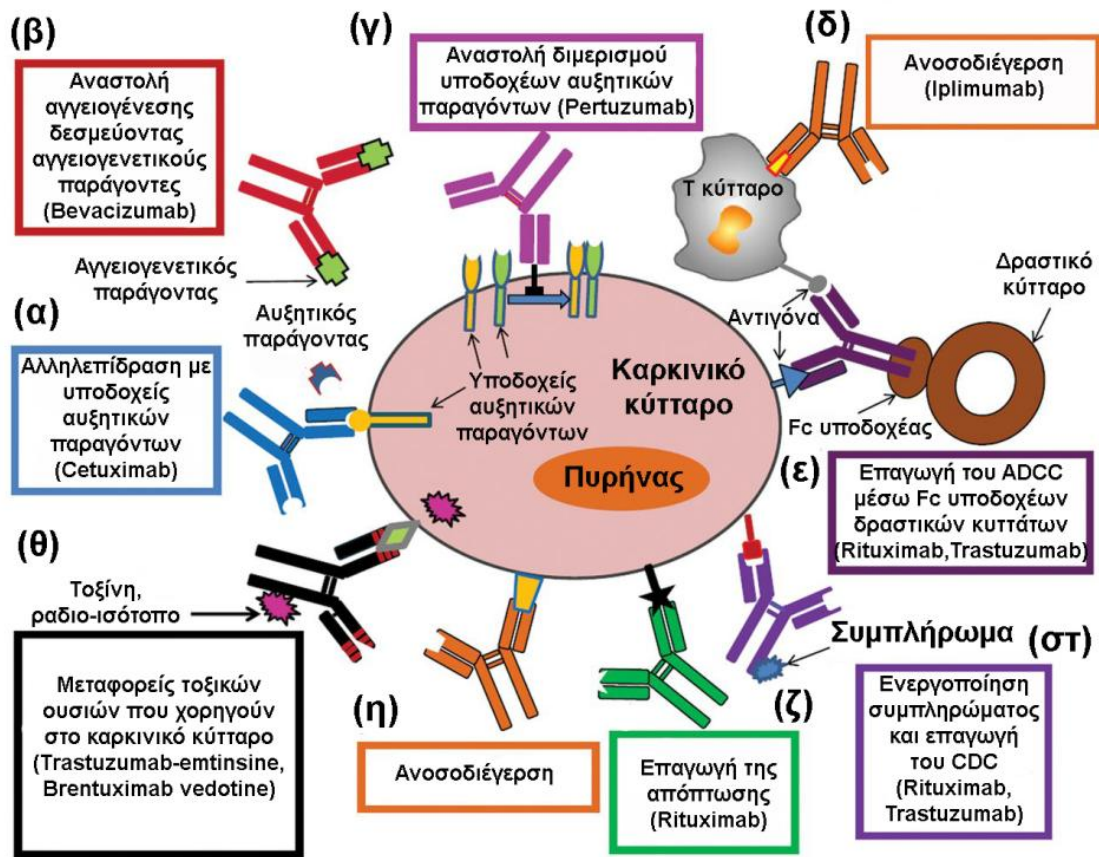
Τα αντισώματα αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα της οικογενείας κινάσης τυροσίνης εμποδίζοντας και πάλι τον αντίστοιχο παράγοντα να προσδεθεί σε αυτόν, καταλήγοντας στην καθυστέρηση ανάπτυξης του όγκου (Foy and Matsuuchi 2001).

Ενεργοποίηση φυσιολογικών μηχανισμών άμυνας

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 θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος με τον υποδοχέα Fc (Fc receptor) του δραστικού κυττάρου (Φυσικά φονικά κύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα), επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση των μηχανισμών αυτών. Επιπλέον μονοκλωνικά αντισώματα 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 cytotoxicity, ADCC).

Φορείς τοξίνης ή ενζύμου

Τέλος, τα 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.



Εικόνα 16 : Μηχανισμοί δράσης μονοκλωνικών αντισωμάτων. (Modjtahedi, Ali et al. 2012).

1.10.5 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 ιδιότητάς 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.

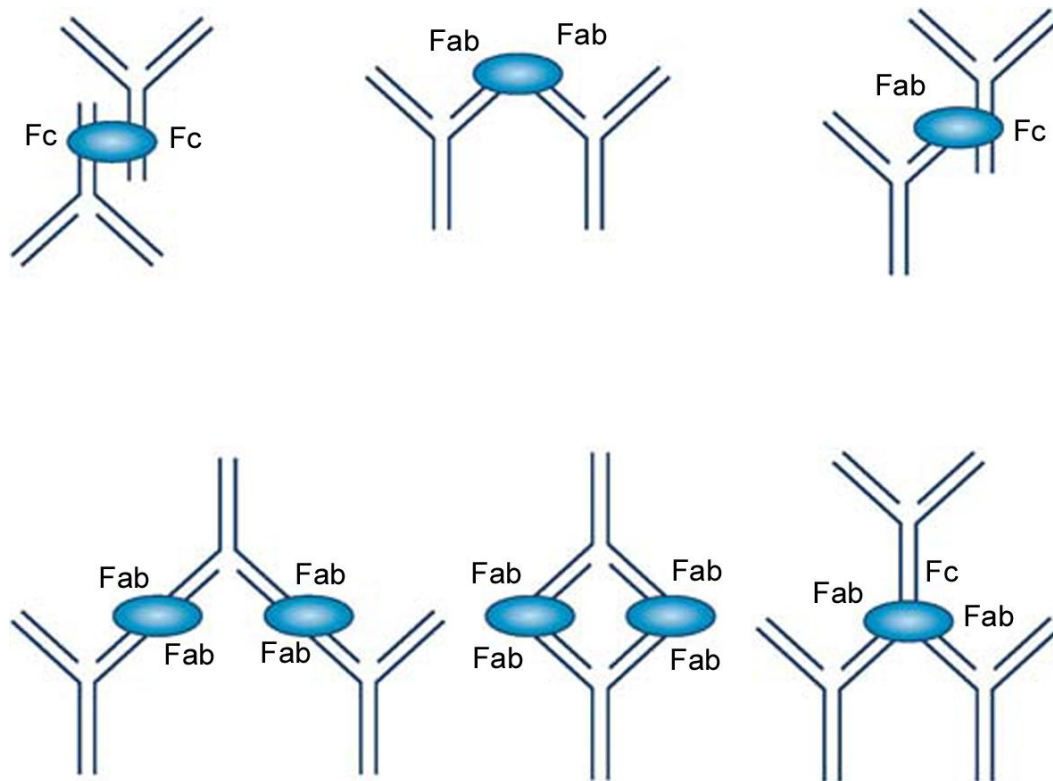
Η ακρίβεια στο στόχο-αντιγόνο η ευελιξία τους, ο συνεχής πολλαπλασιασμός τους (νέα αντισώματα) και το γεγονός ότι δεν αναγνωρίζουν ως ξένα τα κύτταρα του οργανισμού, τον οποίο καλούνται να θεραπεύσουν, μειώνουν σημαντικά την τοξικότητά

τους, τις πιθανές παρενέργειες και επομένως την αποτυχία της μεθόδου αλλά και τον χρόνο και το κόστος παραγωγής τους (Modjtahedi, Ali et al. 2012).

1.10.6 ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Τα μονοκλωνικά αντισώματα όπως προαναφέρθηκε είναι μεγάλα πρωτεϊνικά μόρια και άρα παρασκευάζονται σε ενέσιμη μορφή κάτι που ίσως αν είναι δυσάρεστο για κάποιους ασθενείς. Στόχος των ερευνών αποτελεί η μετατροπή τους σε δισκία, ώστε να λαμβάνεται εύκολα και χωρίς πόνο από τους ασθενείς. Ως αποτέλεσμα αυτού θα είναι ανεκτά από το πεπτικό σύστημα των ασθενών και θα παραμένουν για περισσότερο χρόνο στον οργανισμό τους θα μεγιστοποιούνται τα οφέλη τους και η χορήγηση τους δεν θα είναι τόσο συχνή.

Άλλο σημαντικό μειονέκτημα των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι το γεγονός ότι για την παραγωγή τους απαιτούνται τεράστια κόστη παραγωγής και υπάρχει αδυναμία για την μαζική παραγωγή τους. Επειδή τα μονοκλωνικά είναι πρωτεϊνικά μόρια που συγκρατούνται με δισουλφιδικούς δεσμούς είναι αρκετά ευαίσθητα. 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 σχηματίζουν συσσωματώματα σε υψηλές συγκεντρώσεις, κατά την αποθήκευση και τη χρήση τους (Wang, Das et al. 2009). Τα συσσωματώματα αυτά μπορεί να μειώσουν την δραστηριότητα 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 αρκετές πιέσεις, όπως υψηλές συγκεντρώσεις, μεταβλητές θερμοκρασίες και ακραίες τιμές pH (Cromwell, Hilario et al. 2006).



Εικόνα 17 : Αναπαράσταση του τρόπου δημιουργίας συσσωματωμάτων στα μονοκλωνικά αντισώματα. (Modjtahedi, Ali et al. 2012)

Έτσι λοιπόν απαιτείται λογικός σχεδιασμός διαδικασιών κατασκευής αλλά και αναπροσαρμογή της δοσολογίας κατά την χορήγηση των φαρμάκων έτσι ώστε να είναι ασφαλέστερη η χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων (Zhang, Berezon et al. 2007). Ισχυρή είναι η άποψη που συνδέει τη δημιουργία συσσωματωμάτων με τις παρενέργειές από τη χρήση των μονοκλωνικών όπως και την πρόκληση ανοσολογικών αποκρίσεων στους ασθενείς (Rosenberg 2006).

Ανεξαρτήτως από τα αντισώματα, τα πρωτεϊνικά μόρια εκ φύσεως αλληλεπιδρούν με διάφορους τρόπους σχηματίζοντας ολιγομερή ή πολυμερή τα οποία σχηματίζουν είτε οργανωμένα συσσωματώματα (αμυλοειδή ινίδια), είτε σφαιρικά άμορφα συσσωματώματα. Τα συσσωματώματα αυτά είναι, είτε ορατά 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 17).

1.10.7 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΥΣΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Όταν μελετάται το δίπλωμα των πρωτεϊνών είναι γενικά γνωστό ότι οι πρωτεΐνες είναι σταθερές οριακά όταν έχουν πάρει τη τρισδιάστατη δομή τους στο χώρο. Παρόλα αυτά συχνά δεν λαμβάνεται υπόψη 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 οδηγώντας σε ανεπιθύμητες παρενέργειες (Roberts 2014).

Οι διάφοροι τρόποι συσσωμάτωσης των θεραπευτικών μορίων έχουν ήδη προταθεί και συνοψίζονται σε πέντε βασικούς μηχανισμούς (Roberts 2014)

- (1) Συσσωμάτωση των μονομερών στη φυσική τους μορφή
- (2) Συσσωμάτωση των μονομερών λόγω στερεοδιαταξικών αλλαγών
- (3) Συσσωμάτωση λόγω χημικών μετατροπών
- (4) Περιοχές (patches) στην επιφάνεια των μορίων οδηγούν στη δημιουργία σταθερών συσσωματωμάτων
- (5) Συσσωμάτωση μέσω πυρήνωσης, μια περιοχή στην επιφάνεια του μονομερούς αποτελεί τον πυρήνα έναρξης συσσωμάτωσης σε άλλα μονομερή

2 ΣΤΟΧΟΣ

Στόχος της παρούσας έρευνας είναι η κατασκευή ενός υπολογιστικού εργαλείου που υπολογίζει τις περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση σε θεραπευτικά μονοκλωνικά αντισώματα και μετά από διάφορους υπολογισμούς επιχειρεί να τις μειώσει και σε διάφορες περιπτώσεις να τις εξαλείψει.

Αρχικά για κάθε μονοκλωνικό αντίσωμα υπολογίσθηκαν, για την ελαφριά και την βαριά αλυσίδα αντίστοιχα, οι συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές. Στη συνέχεια υπολογίσθηκαν τα εκτεθειμένα κατάλοιπα που είναι σε περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση κυρίως σε υψηλές συγκεντρώσεις. Διασταυρώνοντας τα αποτελέσματα, επιλέχθηκαν αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία υπήρξαν στα προβλεπόμενα πεπτίδια για πρόκληση συσσωμάτωσης, ήταν επιφανειακά αλλά δεν ανήκαν στις συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν αντικαταστάσεις αυτών των καταλοίπων με άλλα κατάλοιπα, έχοντας γνώμονα μαζί με τα παραπάνω κριτήρια, έναν πίνακα αντικαταστάσεων βασισμένο στην κλίμακα τάσης των αμινοξέων για συσσωμάτωση του Salvador Ventura (Rerra et al., 2016).

Μετά από τις αντικαταστάσεις επαναυπολογίζονται οι περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση, όπου στις περισσότερες περιπτώσεις έχουν εξαλειφθεί.

Το εργαλείο στη συνέχεια πραγματοποιεί ομόλογη προτυποποίηση για το σχεδιασμό ενός καινούργιου μοντέλου. Το νέο μοντέλο δίνεται στον χρήστη, όπως επίσης και η τρισδιάστατη γραφική του αναπαράσταση, πριν και μετά τις αντικαταστάσεις. Τέλος, υπολογίζεται το εμβαδόν των περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση πριν και μετά τις αντικαταστάσεις που πραγματοποιήθηκαν.

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

3.1.1 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 (Φεβρουάριος 2017) η βάση PDB περιλαμβάνει 126,606 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>

3.1.2 DrugBank

Η βάση DrugBank 3.0 (Open Data Drug & Drug Target Database) (Knox, Law et al. 2011), περιέχει πληροφορίες με λεπτομερή σχολιασμό για 8250 εγγραφές, περιλαμβάνοντας 2016 φάρμακα – μικρά μόρια, εγκεκριμένα από τον Οργανισμό Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (FDA), 229 βιοτεχνολογικά φάρμακα (πρωτεΐνες-πεπτίδια), εγκεκριμένα από τον FDA, 94 φαρμακευτικά προϊόντα διατροφής και πάνω από 6000 φάρμακα σε πειραματικό επίπεδο. Επιπλέον, περιέχει πληροφορίες για ένα μη ομόλογο σύνολο των 4344 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, Owen et al. 2016), PDB (Rose, Bi et al. 2013), Swiss-Prot (UniProt_Consortium, 2013), GenBank, PharmGKB (Thorn, Klein et al. 2013) και GeneCards (Stelzer, et al., 2011), (Law, et al., 2014; Wishart, et al., 2008) και διατίθεται στην διαδικτυακή διεύθυνση <http://www.drugbank.ca/>.

3.2 ΕΡΓΑΛΕΙΑ

3.2.1 AMYLPRED2

Το εργαλείο AMYLPRED2 (Tsolis, 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 ο διαβήτης τύπου II. Διατίθεται για χρήση στην διαδικτυακή διεύθυνση <http://aias.biol.uoa.gr/AMYLPRED2/>.

3.2.2 DSSP

Το πρόγραμμα DSSP (Define Secondary Structure of Proteins) (Kabsch and Sander, 1983), είναι ένας αλγόριθμος ανάθεσης δευτεροταγούς δομής με βάση τις ατομικές συντεταγμένες του αρχείου PDB που θα δοθεί ως είσοδος. Η ανάθεση γίνεται με βάση κανόνες 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.

3.2.3 MODELLER 9V16

Το εργαλείο Modeller9v16 (Sali and Blundell, 1993), χρησιμοποιείται για ομόλογη προτυποποίηση (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 πρόγραμμα υπολογίζει το νέο μοντέλο με όλα τα άτομα εκτός των υδρογόνων. Είναι διαθέσιμο για τα περισσότερα Unix/Linux λειτουργικά συστήματα,

Windows και Mac. Υπάρχει στην διαδικτυακή διεύθυνση <http://salilab.org/modeller/> , όπου μπορεί ο χρήστης να το κατεβάσει και να το εγκαταστήσει τοπικά.

3.2.4 JSMOL

Το JSmol (Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D. <http://www.jmol.org/>) είναι μια αναπαράσταση ανοιχτού λογισμικού Java για χημικές δομές σε τρισδιάστατη απεικόνιση (3D),[2] που δεν απαιτεί πρόσθετα τρισδιάστατης επιτάχυνσης.[3] Το JSmol επιστρέφει μια τρισδιάστατη αναπαράσταση ενός μορίου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διδακτικό εργαλείο[4] ή για έρευνα π.χ. στη χημεία και τη βιοχημεία. Είναι λογισμικό ελεύθερου και ανοικτού κώδικα, γραμμένο σε Java και έτσι εκτελείται σε Windows, Mac OS X, και συστήματα Unix. Υπάρχει μια αυτόνομη εφαρμογή και ένα πακέτο ανάπτυξης που μπορεί να ενσωματωθεί σε άλλες εφαρμογές Java, όπως Bioclipse και Taverna workbench.

3.2.5 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.

3.2.6 WHAT IF

Το λογισμικό WHAT IF (Vriend 1990), αποτελείται από ένα ποικίλο σύνολο προγραμμάτων και 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 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/>.

3.2.7 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>.

3.3 Ο ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΟΣ ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ ANTISOMA

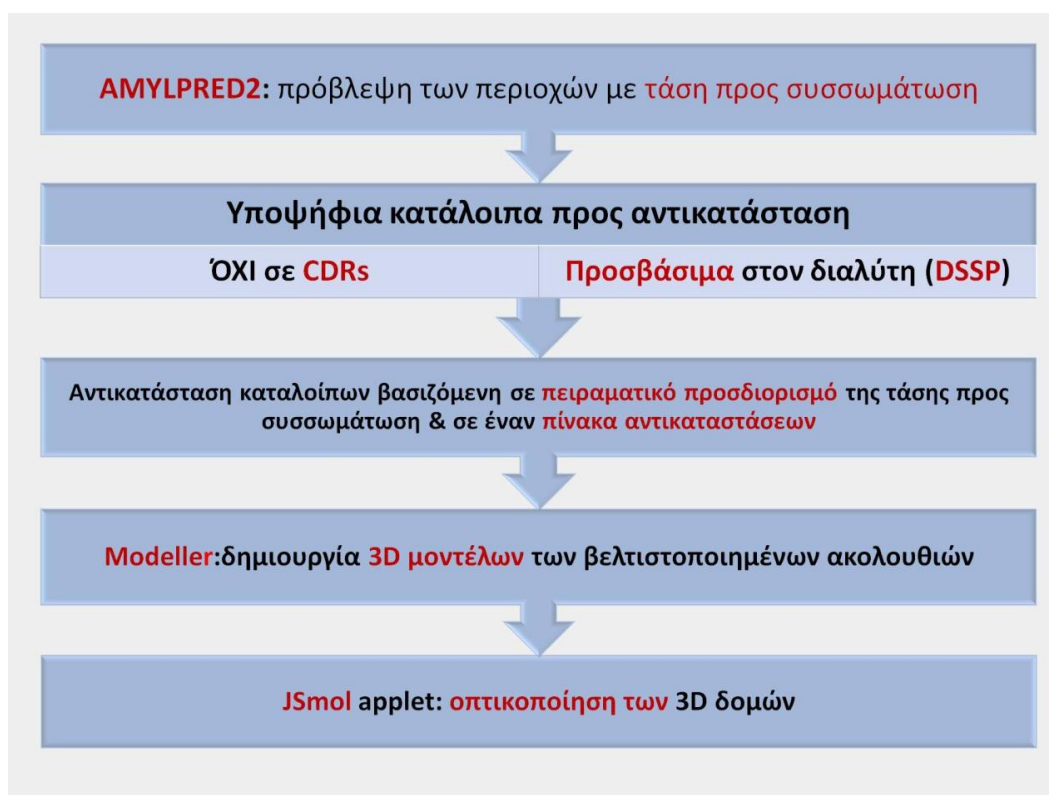
Για την κατασκευή του υπολογιστικού αλγορίθμου ANTISOMA έγινε αρχικά εύρεση των περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο AMYLPRED2. Ο αλγόριθμος εφαρμόζεται αντίστοιχα στην βαριά και στην ελαφριά αλυσίδα πριν και μετά τις αντικαταστάσεις των καταλοίπων που στοχεύουν σε μείωση των περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση.

Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση των καταλοίπων που ήταν υποψήφια προς αντικατάσταση ήταν τρία. Το πρώτο κριτήριο είναι ότι το κατάλοιπο θα πρέπει να βρίσκονται σε περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση, όπως αυτές προβλέφθηκαν από τον αλγόριθμο AMYLPRED2. Το δεύτερο κριτήριο είναι η προσβασιμότητα αυτού του καταλοίπου από τον διαλύτη στην τρισδιάστατη δομή του αντισώματος. Λαμβάνοντας υπόψη μας ότι εάν οι αντικαταστάσεις γίνονταν σε θαμμένα κατάλοιπα αυτό θα επηρέαζε την σταθερότητα και τη δομή της πρωτεΐνης. Έτσι με τη βοήθεια του αλγορίθμου DSSP επιλέχθηκαν κατάλοιπα προσβάσιμα στο διαλύτη. Το τελευταίο κριτήριο βασίστηκε στο γεγονός ότι τα κατάλοιπα που ανήκουν στις συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές (CDRs) είναι ακατάλληλα για αντικατάσταση, αφού θα επηρεάσουν την αλληλεπίδραση και την αναγνώριση του αντιγόνου από το αντίσωμα. Τελικά, ένα κατάλοιπο είναι

υποψήφιο για αντικατάσταση εάν ανήκει σε περιοχή με τάση προς συσσωμάτωση, είναι εκτεθειμένο στον διαλύτη και δεν ανήκει στις συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές.

Για τα κατάλοιπα που ικανοποιούν αυτές τις συνθήκες χρησιμοποιείται ένας πίνακας αντικατάστασης βασισμένος σε υπολογιστικές μελέτες όπως και στην κλίμακα τάσης συσσωμάτωσης των 20 αμινοξέων

Στην συνέχεια πραγματοποιείται ομόλογη προτυποποίηση με την βοήθεια του προγράμματος Modeller και τέλος το νέο μοντέλο οπτικοποιείται με τη βοήθεια του λογισμικού JSmol. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε μπορεί να συνοψιστεί στο παρακάτω γράφημα (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Διάγραμμα σχεδιασμού του υπολογιστικού εργαλείου ANTISOMA.

3.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Για την αξιολόγηση του αλγορίθμου ANTISOMA χρησιμοποιήθηκε η μέτρηση του εμβαδού των περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση πριν και μετά τις αντικαταστάσεις (σε τετραγωνικά Å).

Με τη βοήθεια του λογισμικού DSSP ο ANTISOMA υπολογίζει σε κάθε περιοχή-πεπτίδιο τα τετραγωνικά Å κάθε επιφανειακού αμινοξικού καταλοίπου. Αθροίζοντας αντίστοιχα τις βαθμολογίες της ελαφριάς και της βαριάς αλυσίδας του μονοκλωνικού αντισώματος επιτυγχάνεται μία καλύτερη παρατήρηση του ποσοστού μείωσης των περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση. Η μέθοδος λοιπόν θα είναι αξιόπιστη αν καταφέρνει μετά τις αντικαταστάσεις να ελαχιστοποιεί το εμβαδόν των περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση των δοθέντων μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Επιπλέον η εγκυρότητα των καινούργιων μοντέλων μετά τις αντικαταστάσεις ελέγχθηκε εκ νέου με το λογισμικό **PROCHECK** και **WHAT_CHECK** του WHAT IF web server.

3.4.1 ΣΥΝΟΛΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

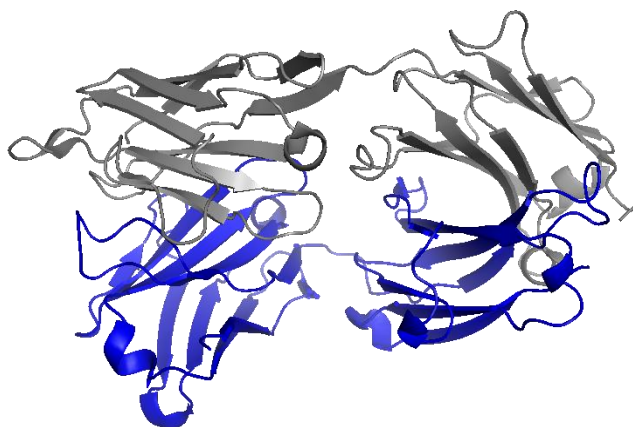
3.4.1.1 OMALIZUMAB

Το Omalizumab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που έχει σχεδιαστεί για να μειώνει την ευαισθησία σε αλλεργιογόνα που είτε εισπνέονται είτε καταπίνονται. Κυρίως χρησιμοποιείται στον έλεγχο κατά του αλλεργικού άσθματος σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται σε υψηλές δόσεις κορτικοειδών. Είναι ένα ανασυνδυασμένο εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που δεσμεύεται ειδικά στην ελεύθερη ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη E (IgE) στο αίμα και σε διάφορα υγρά όπως και σε αυτή που βρίσκεται σαν υποδοχέας στα Β λεμφοκύτταρα (Schulman 2001). Αντίθετα με οποιοδήποτε συνηθισμένο αντίσωμα το Omalizumab δεν προσδένει σε IgE που είναι ήδη δεσμευμένα στην επιφάνεια αντιγονοπαρουσιαστικών και δενδριτικών κυττάρων (Chang, Wu et al. 2007). Η ανοσοσφαιρίνη E εμπλέκεται στην Υπερευαισθησία τύπου 1, που παίζει ρόλο στις περισσότερες αλλεργικές παθήσεις. Έχει υπολογιστεί ότι περίπου 20-40% του πληθυσμού που ζουν ένα δυτικό τρόπο ζωής στις οικονομικά ανεπτυγμένες χώρες επηρεάζονται από την αλλεργίες και ζητούν ιατρική βοήθεια. Στις ΗΠΑ, το 8% των ενηλίκων και 10% των παιδιών έχουν άσθμα. Αλλεργίες εμφανίζονται συχνότερα σε άτομα με υψηλά επίπεδα IgE στον ορό αίματος, αν και μερικά αλλεργικά άτομα έχουν πολύ χαμηλή IgE ενώ αντιθέτως μερικοί άνθρωποι με πολύ υψηλή IgE δεν έχουν αλλεργικά προβλήματα.

Τα άτομα με αλλεργίες είναι ευαισθητοποιημένα να επάγουν ανοσολογικές αποκρίσεις σε διάφορες πρωτεΐνες που περιέχονται σε πολλές από τις εκατοντάδες αβλαβείς

περιβαλλοντικές ουσίες. Αυτές οι ουσίες εισάγονται στον οργανισμό μέσω της εισπνοής όπως η σκόνη, μέσω της τροφής, όπως η γλουτένη, είτε μέσω του δέρματος, όπως το τσίμπημα της μέλισσας. Σε αυτά τα άτομα τα μόρια ανοσοσφαιρίνη E στο σώμα τους, είτε είναι ειδικά σε αλλεργιογόνα είτε όχι, συνδέονται με υψηλή συγγένεια με τον υποδοχέα IgE στην επιφάνεια των μαστοκυττάρων και βασεόφιλων. Υπό ορισμένες συνθήκες οι πρωτεΐνες που προκαλούν αλλεργίες προσδέονται με την ειδική για αυτό το αλλεργιογόνο, IgE στην επιφάνεια των μαστοκυττάρων και βασεόφιλων και πυροδοτούν την ενεργοποίηση των κυττάρων που επάγουν φλεγμονή. Αυτά με τη σειρά τους απελευθερώνουν μια σειρά φαρμακολογικών μεσολαβητών, όπως η ισταμίνη, λευκοτριένια, τρυπτάση, κ.α., προκαλώντας διάφορα αλλεργικά συμπτώματα/νόσους.

Η λογική για το σχεδιασμό των θεραπευτικών αντισωμάτων αντι-IgE και τους φαρμακολογικούς μηχανισμούς της θεραπείας έχουν συνοψιστεί σε άρθρα ανασκόπησης από τον εφευρέτη αυτής της θεραπείας, Tse Wen Chang (Chang, Chen et al. 2015) και των συνεργατών του (Chen, Eisner et al. 2013). Το Omalizumab αναστέλλει την πρόσδεση του IgE σε ιστιοκύτταρα και βασεόφιλα δεσμεύοντας έναν αντιγονικό επίτοπο στον IgE που αλληλεπικαλύπτεται με τη θέση στην οποία το IgE αλληλεπιδρά με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα κτλ.



Εικόνα 19 : Γραφική αναπαράσταση της πειραματικά προσδιορισμένης με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ δομής του Fab θραύσματος του Omalizumab με κωδικό PDB : 4X7S. Με γκρι χρώμα η ελαφριά αλυσίδα, και με μπλε χρώμα η βαριά αλυσίδα του αντισώματος Omalizumab.

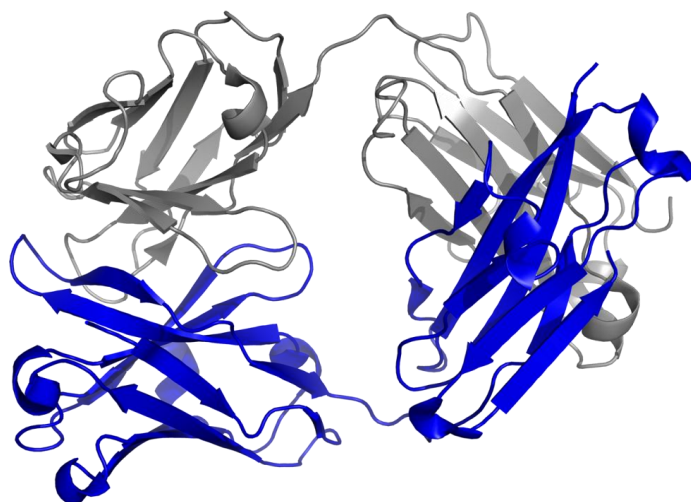
Το Omalizumab διατίθεται εμπορικά υπό την ονομασία XOLAIR® από την Novartis Europharm Ltd. Το Omalizumab έλαβε την έγκριση από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) το 2003. Χρησιμοποιείται για θεραπευτικούς σκοπούς σε

ανθρώπους ηλικίας 12 χρόνων και άνω, με σοβαρό ή μέτριο άσθμα, σε 90 χώρες. Η πρώτη χώρα που έλαβε έγκριση για την χρήση το φαρμάκου είναι η Αυστραλία το 2002. Το Omalizumab έλαβε έγκριση τον Μάρτιο του 2009 για την Ευρωπαϊκή ένωση για τη θεραπεία του άσθματος. Το 2014 λαμβάνει έγκρισή και για μία άλλη ασθένεια την χρόνια κνίδωση (chronic spontaneous urticaria (CSU) αντί των αντισταμινικών) για την ευρωπαϊκή ένωση, τις Ηνωμένες πολιτείες και άλλες 10 χώρες παγκοσμίως.. Να σημειωθεί εδώ οότι η χρόνια κνίδωση δεν εμπεριέχεται στον κατάλογο των ασθενειών συνδεδεμένων με αλλεργίες. Στην παρούσα αξιολόγηση του εργαλείου χρησιμοποιήθηκε η πειραματικά προσδιορισμένη με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ δομή του Omalizumab από την βάση πρωτεϊνικών δομών PDB με κωδικό 4X7S (Εικόνα 19) (Jensen, Plum et al. 2015).

3.4.1.2 EFALIZUMAB

Η εφализουμάμπη (efalizumab) είναι ένα ανασυνδυασμένο μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο συνδέεται ειδικά με την υπομονάδα CD11a του αντιγόνου LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1), μια λεμφοκυτταρική επιφανειακή πρωτεΐνη. Η εφализουμάμπη μπορεί να αμβλύνει τα σημεία και συμπτώματα της ψωρίασης αναστέλλοντας αρκετά στάδια του ανοσολογικού καταρράκτη(Talamonti, Spallone et al. 2011) .

Το Efalizumab προσδέεται στην πρωτεΐνη CD11 στο Β λεμφοκύτταρο με το Fab θραύσμα του αντισώματος, ενώ με το Fc θραύσμα του αντισώματος «στρατολογεί» άλλα αντισώματα στην περιοχή του κυττάρου, καθώς επίσης ενεργοποιεί το συμπλήρωμα για να προκληθεί λύση του κυττάρου (Leonardi 2003). Καταστρέφει τα κύτταρα που έχουν την πρωτεΐνη CD11 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 cytotoxicity, ADCC). Χρησιμοποιείται θεραπευτικά σε ασθένειες που χαρακτηρίζονται είτε από μεγάλο πληθυσμό Β λεμφοκυττάρων, είτε από υπερδραστήρια Β κύτταρα, είτε από Β κύτταρα που δυσλειτουργούν(Koszik, Stary et al. 2010).



Εικόνα 20 : Γραφική αναπαράσταση της πειραματικά προσδιορισμένης με κρυσταλλογραφία ακτινών-Χ δομής του Fab θραύσματος του Efalizumab με κωδικό PDB : 3EO9. Με γκρι χρώμα η ελαφριά αλυσίδα, και με μπλε χρώμα η βαριά αλυσίδα του αντισώματος Efalizumab.

Το Raptiva (Descamps 2007) είχε εγκριθεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) από το Σεπτέμβριο του 2004 για τη θεραπεία ενηλίκων ασθενών με μέτρια έως σοβαρή χρόνια ψωρίαση κατά πλάκας (μία ασθένεια που προκαλεί ερυθρές, λεπιδώδεις πλάκες στο δέρμα), οι οποίοι δεν ανταποκρίθηκαν ή έχουν κάποια αντένδειξη ή δεν ανέχονται άλλες συστηματικές θεραπείες συμπεριλαμβανομένων της κυκλοσπορίνης, της μεθοτρεξάτης και του PUVA (ψωραλένιο υπεριώδες-Α).

Η CHMP (Committee for Medicinal Products for Human Use) επανεξέτασε το φάρμακο κατόπιν αίτησης της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, μετά από αναφορές σοβαρών παρενεργειών, συμπεριλαμβανομένων τριών επιβεβαιωμένων περιστατικών ΠΠΛ (Προϊούσα Πολυεστιακή Λευκοεγκεφαλοπάθεια) σε ασθενείς που είχαν λάβει Raptiva για περισσότερο από τρία χρόνια. Η ΠΠΛ είναι μία σπάνια λοίμωξη του εγκεφάλου που συνήθως οδηγεί σε σοβαρή ανικανότητα ή θάνατο. Δύο από τα τρία επιβεβαιωμένα περιστατικά που αναφέρθηκαν στη CHMP είχαν θανατηφόρο κατάληξη. Η CHMP έλαβε επίσης μία πρόσθετη αναφορά ενός ύποπτου για ΠΠΛ περιστατικού, το οποίο δεν ήταν δυνατό να επιβεβαιωθεί.

Μετά από ανασκόπηση όλων των διαθέσιμων δεδομένων για την ασφάλεια και αποτελεσματικότητα του φαρμάκου, η CHMP συμπέρανε ότι:

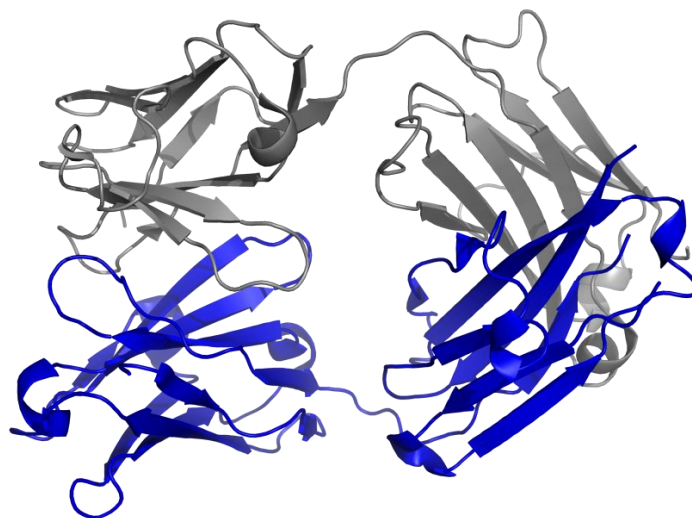
Το Raptiva σχετίζεται και με άλλες σοβαρές παρενέργειες (Gupta and Cherman 2006), οι οποίες περιλαμβάνουν σύνδρομο Guillain-Barre και Miller-Fisher, εγκεφαλίτιδα, εγκεφαλοπάθεια, μηνιγγίτιδα, σήψη και περιστασιακές λοιμώξεις (λοιμώξεις που συμβαίνουν σε άτομα με διακυβευμένο ανοσοποιητικό σύστημα). Δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για την ταυτοποίηση ομάδας ασθενών στους οποίους τα οφέλη του Raptiva υπερέρχουν έναντι των κινδύνων, ειδικότερα υπάρχει έλλειψη δεδομένων αποτελεσματικότητας και ασφάλειας σε ασθενείς που δεν έχουν τη δυνατότητα εναλλακτικής θεραπείας και οι οποίοι ίσως έχουν ήδη ένα εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα ως αποτέλεσμα προηγούμενων θεραπειών. Η CHMP είχε, συνεπώς, τη γνώμη ότι οι κίνδυνοι από το Raptiva υπερτερούν του οφέλους του και ότι η άδεια κυκλοφορίας του στην ΕΕ θα πρέπει να ανασταλεί. Παρόλα αυτά χρησιμοποιήθηκε στην αξιολόγηση του ANTISOMA αφού είχε γνωστή δομή και μπορούσαμε να ταυτοποιήσουμε την μείωσή των περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση. Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε η πειραματικά προσδιορισμένη με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ δομή με κωδικό PDB : 3EO9 (Εικόνα 20)(Du, Wang et al. 2007)

3.4.1.3 DACLIZUMAB

Η δακλιζουμάμπη (daclizumab) (Kim and Baker 2016)είναι ένα ανασυνδυασμένο, εξανθρωποποιημένο IgG1 αντι-Tac αντίσωμα, που λειτουργεί ως ανταγωνιστής του υποδοχέα της Ιντερλευκίνης-2 (IL-2). Η δακλιζουμάμπη συνδέεται με μεγάλη εξειδίκευση με την άλφα ή Tac υπομονάδα του συμπλέγματος του υψηλής συγγένειας υποδοχέα της Ιντερλευκίνης-2 (που εκφράζεται σε ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα) και αναστέλλει τη σύνδεση και τη βιολογική δραστηριότητα της Ιντερλευκίνης-2.(Zhang, McClellan et al. 2014) Η χορήγηση της δακλιζουμάμπης αναστέλλει την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων από την Ιντερλευκίνη-2, μια σημαντική οδό στην κυτταρική ανοσολογική απάντηση που ενέχεται στην απόρριψη αλλογενούς μοσχεύματος.

Το daclizumab συνδέεται με μεγάλη εξειδίκευση με την άλφα ή Tac υπομονάδα του συμπλέγματος του υψηλής συγγένειας υποδοχέα της Ιντερλευκίνης-2(Barkhof and Ciccarelli 2014). Το daclizumab προκαλεί τον κορεσμό των ενεργών θέσεων του υποδοχέα Tac για περίπου 90 μέρες σύμφωνα με το συνιστώμενο δοσολογικό σχήμα στην πλειοψηφία των ασθενών. Σε ποσοστό περίπου 9% των ασθενών που έλαβαν αγωγή με το συγκεκριμένο φάρμακο σε κλινικές μελέτες αναπτύχθηκαν αντισώματα στο daclizumab,

αλλά δεν φάνηκε να επηρεάζει αυτό την αποτελεσματικότητα, ασφάλεια και οποιαδήποτε άλλη κλινικά σημαντική εξεταζόμενη παράμετρο. Δεν παρατηρήθηκαν επίσης σημαντικές μεταβολές στον αριθμό των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων εκτός της αναμενόμενης μείωσης των Τ κυττάρων.



Εικόνα 21 : Γραφική αναπαράσταση της πειραματικά προσδιορισμένης με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ δομής του Fab θραύσματος του Daclizumab με κωδικό PDB : 3NFS. Με γκρι χρώμα η ελαφριά αλυσίδα, και με μπλε χρώμα η βαριά αλυσίδα του αντισώματος Daclizumab.

Το Daclizumab διατίθεται εμπορικά από την εταιρία Roche με το όνομα Zybri[®] για την θεραπεία της πολλαπλής σκλήρυνσης και Zenarax[®] για πρόληψη στην οξεία απόρριψη μοσχεύματος (Sheridan, Robinson et al. 2014). Τον Δεκέμβριο του 1997 εγκρίθηκε από το FDA για χρήση σε συνδυασμό με κυκλοσπορίνη και κορτικοστεροειδή και ήταν το πρώτο εξανθρωπισμένο αντίσωμα που έχει εγκριθεί οπουδήποτε στον κόσμο. (Tsurushita, Hinton et al. 2005) Κατά την έναρξη, η μέση τιμή χονδρικής για το φάρμακο εκτιμήθηκε ότι θα είναι 6.800\$ για πέντε δόσεις και εκτιμήθηκε ότι οι ετήσιες πωλήσεις θα είναι μεταξύ 100 εκατομμύρια \$ και 250 εκατομμύρια \$ μέσα σε πέντε χρόνια από την έναρξη και θεωρήθηκε ότι η χρήση του φαρμάκου θα πρέπει να επεκταθεί για χρήση σε άλλες μεταμοσχεύσεις οργάνων (Marwick 2001) Εγκρίθηκε στην Ευρώπη το 1999.

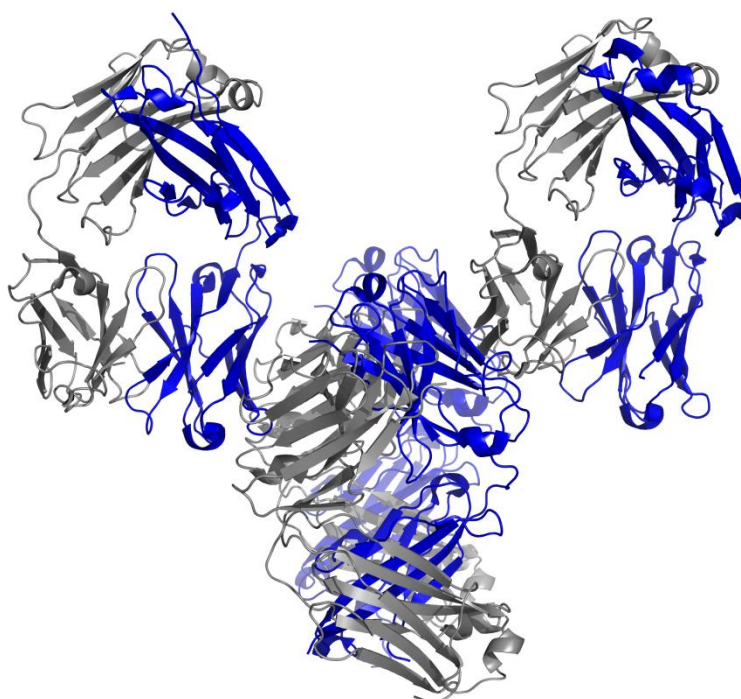
Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε η πειραματικά προσδιορισμένη με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ δομή με κωδικό PDB: 3NFS (Εικόνα 21) (Du, Wang et al. 2007).

3.4.1.4 CANACINUMAB

Το Canacinumab είναι ένα ανθρώπινο θεραπευτικό μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει την Ιντερλευκίνη-1-β. Δεν έχει επίδραση σε άλλους παράγοντες της οικογένειας των ιντερλευκινών -1 ακόμα και αν αναφερόμαστε στην ιντερλευκίνη-1-α. Η κανακινουμάμπη δεσμεύεται με μεγάλη συγγένεια ειδικά στην ανθρώπινη IL-1β και εξουδετερώνει τη βιολογική δραστηριότητα της ανθρώπινης IL-1β, αποκλείοντας την αλληλεπίδραση της με τους υποδοχείς IL-1 και αποτρέποντας έτσι την οφειλόμενη στην IL-1β γονιδιακή ενεργοποίηση και την παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών. Το Canacinumab χρησιμοποιείται για την θεραπεία των περιοδικών συνδρόμων σχετιζόμενων με την κρουοπυρίνη (CAPS)(Yagudina, Kulikov et al. 2015).

Τα σχετιζόμενα με την κρουοπυρίνη περιοδικά σύνδρομα (Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes, CAPS) αποτελούν μια ομάδα σπάνιων αυτοφλεγμονωδών νοσημάτων, στην οποία περιλαμβάνονται το οικογενές αυτοφλεγμονώδες σύνδρομο εκ ψύχους (Familial Cold Autoinflammatory Syndrome, FCAS), το σύνδρομο Muckle-Wells (Muckle-Wells Syndrome, MWS) και το χρόνια βρεφικό νευρολογικό-δερματικό-αρθρικό σύνδρομο (Chronic Infantile Neurologic Cutaneous Articular syndrome, CINCA), που είναι γνωστό και ως πολυσυστηματική φλεγμονώδης νόσος νεογνικής εμφάνισης (Neonatal Onset Multi-systemic Inflammatory Disease, NOMID). Αυτά τα σύνδρομα είχαν αρχικά περιγραφεί ως ξεχωριστές κλινικές καταστάσεις, παρά τις κάποιες κλινικές ομοιότητές τους. Οι ασθενείς, δηλαδή, παρουσιάζουν συχνά αλληλεπικαλυπτόμενα συμπτώματα που σχετίζονται με συστηματική φλεγμονή και στα οποία περιλαμβάνονται ο πυρετός, το δερματικό εξάνθημα που εμφανίζεται ως κνίδωση (ψευδο-κνίδωση) και η ποικίλης βαρύτητας συμμετοχή των αρθρώσεων. Ο χαρακτηρισμός αυτών των καταστάσεων σε μοριακό επίπεδο έχει δείξει μεταλλάξεις του ίδιου γονιδίου και στις τρεις αυτές διαταραχές. Τα CAPS είναι γενετικά νοσήματα. Το υπεύθυνο γονίδιο για τις 3 κλινικές οντότητες (FCAS, MWS, CINCA/NOMID) ονομάζεται CIAS1 (ή NLRP3) και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που ονομάζεται κρουοπυρίνη. Αυτή η πρωτεΐνη παίζει σημαντικό ρόλο στη φλεγμονώδη απάντηση του οργανισμού. Η βλάβη του γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της λειτουργίας της πρωτεΐνης και την ενίσχυση των φλεγμονωδών αποκρίσεων. Αυτές οι ενισχυμένες φλεγμονώδεις αντιδράσεις είναι υπεύθυνες για τα κλινικά συμπτώματα που παρατηρούνται στα CAPS.

Πρόσφατες μελέτες για τη γενετική και την παθοφυσιολογία των CAPS υποδεικνύουν ότι η IL-1β υπερπαράγεται σε αυτές τις καταστάσεις και παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της νόσου. Επί του παρόντος, ένας αριθμός φαρμάκων που αναστέλλουν την IL-1β (αναστολείς της IL-1) βρίσκονται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης. Το canakinumab είναι ένα αντι-IL-1 φάρμακο που εγκρίθηκε πρόσφατα από το FDA και το European Medicines Agency (EMA) για ασθενείς με CAPS ηλικίας άνω των 4 ετών. Σε ασθενείς με MWS, αυτό το φάρμακο έχει δειχθεί πρόσφατα ότι ελέγχει αποτελεσματικά τις φλεγμονώδεις εκδηλώσεις με μία υποδόρια ένεση κάθε 4 έως 8 εβδομάδες. (Yagudina, Kulikov et al. 2015)



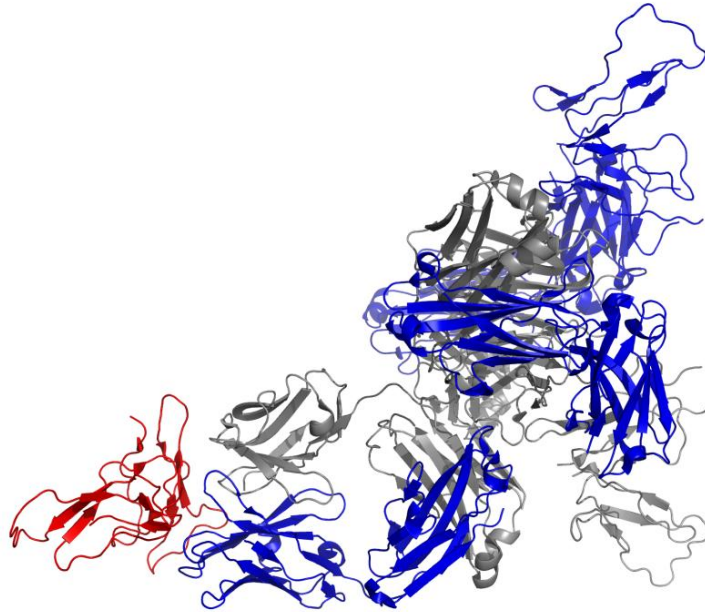
Εικόνα 22 : Γραφική αναπαράσταση της πειραματικά προσδιορισμένης με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ δομής του Canakinumab με κωδικό PDB : 5BVJ. Με γκρι χρώμα η ελαφριά αλυσίδα, και με μπλε χρώμα η βαριά αλυσίδα του αντισώματος Canakinumab.

Το Canakinumab διατίθεται εμπορικά από την εταιρία Novartis με την εμπορική ονομασία ILLARIS®. Εγκρίθηκε για τη θεραπεία των CAPS από τον FDA τον Ιούνιο του 2009 ενώ στην Ευρώπη εγκρίθηκε τον Οκτώβρη 2009. Αρχικά, προτάθηκε προς χρήση και για την θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, αλλά οι κλινικές δοκιμές δεν ολοκληρώθηκαν. Επίσης είχε προταθεί και για τη θεραπεία της ουρικής αρθρίτιδας αλλά ο FDA τελικά συμφώνησε με την άποψη της συμβουλευτικής του επιτροπής από ειδικούς για το canakinumab, η οποία είχε απορρίψει τον περασμένο Ιούνιο την χρήση του για την αντιμετώπιση των κρίσεων της ουρικής αρθρίτιδας. Η αιτιολογία είναι ότι το φάρμακο

παρόλο που έχει κάποια θετική δράση στις κρίσεις της ουρικής αρθρίτιδας, προκαλεί αύξηση των λοιμώξεων κατά 1,7% και σημαντική αύξηση των επιπέδων τριγλυκεριδίων σε αντίθεση με τα υπάρχοντα φάρμακα που δεν προκαλούν τις ανάλογες ανεπιθύμητες ενέργειες. Στην παρούσα αξιολόγηση χρησιμοποιήθηκε η πειραματικά προσδιορισμένη με κρυσταλλογραφία ακτινών-Χ δομή με κωδικό PDB: 5BVJ (Εικόνα 22) (Rondeau, et al., 2015).

3.4.1.5 BASILIXIMAB

Το Basiliximab είναι ένα χμαιοκλικό μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού/ανθρώπου το οποίο στρέφεται εναντίων της α -αλυσίδας του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-2 (αντιγόνο CD25), που εκφράζεται στην επιφάνεια των Τ-λεμφοκυττάρων σε ανταπόκριση προς το αντιγονικό ερέθισμα (Atlani, Sharma et al. 2013). Το Basiliximab δεσμεύεται εκλεκτικά με υψηλή συγγένεια από το αντιγόνο CD25 πάνω στα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα τα οποία εκφράζουν τον υψηλής συγγένειας υποδοχέα της ιντερλευκίνης-2 (IL-2R) εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη δέσμευση της ιντερλευκίνης -2, που αποτελεί ένα κρίσιμο σήμα για το πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων κατά την κυτταρική ανοσολογική απόκριση που εμπλέκεται στην απόρριψη ενός μοσχεύματος. (Martin-Mateos, Graus et al. 2012) Ο πλήρης και ο συνεχής αποκλεισμός του υποδοχέα διατηρείται για όσο διάστημα οι στάθμες του φαρμάκου στον ορό υπερβαίνουν τα 0.2 mg/ml (συνήθως 4-6 εβδομάδες μετά τη χορήγηση). (Mouzaki, Yap et al. 2013) Καθώς οι συγκεντρώσεις πέφτουν κάτω από αυτό το επίπεδο, η έκφραση του αντιγόνου CD25 επανέρχεται στις προ θεραπείας τιμές εντός 1-2 εβδομάδων. Το basilixab δεν προκαλεί καταστροφή του μυελού (Lin, Zhu et al. 2017).



Εικόνα 23 : Γραφική αναπαράσταση του πειραματικά προσδιορισμένου με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ συμπλόκου του Basiliximab με την αυτοτελή δομική περιοχή IL-2Ra (CD25) ectodomain με κωδικό PDB : 3IU3. Με κόκκινο χρώμα ο υποδοχέας (αντιγόνο), με γκρι χρώμα η ελαφριά αλυσίδα και με μπλε χρώμα η βαριά αλυσίδα του αντισώματος Basiliximab

Το Basiliximab διατίθεται εμπορικά από την εταιρία Novartis με το όνομα Simulect® για την πρόληψη οξείας απόρριψης οργάνου, ειδικά νεφρών, σε *de novo* αλλογενή μεταμόσχευση νεφρού σε ενήλικες και παιδιά (1-17 ετών).(Sun, Du et al. 2015) Πρέπει να χορηγείται ταυτόχρονα με ανοσοκατασταλτική θεραπεία που βασίζεται στην κυκλοσπορίνη. Εγκρίθηκε από τον FDA το 1998. Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε η πειραματικά προσδιορισμένη με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ δομή με κωδικό PDB: 3IU3 (Εικόνα 23).(Cho, Lee et al. 2008)

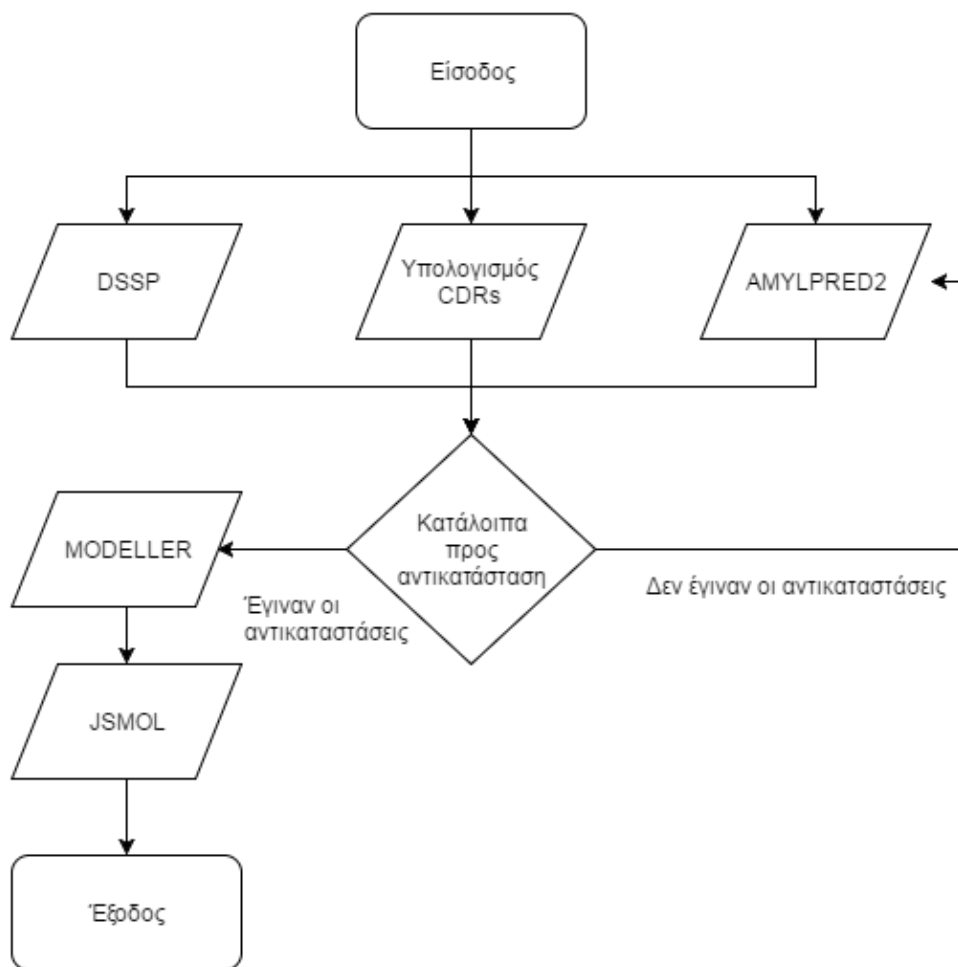
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Η ΜΕΘΟΔΟΣ ANTISOMA

4.1.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

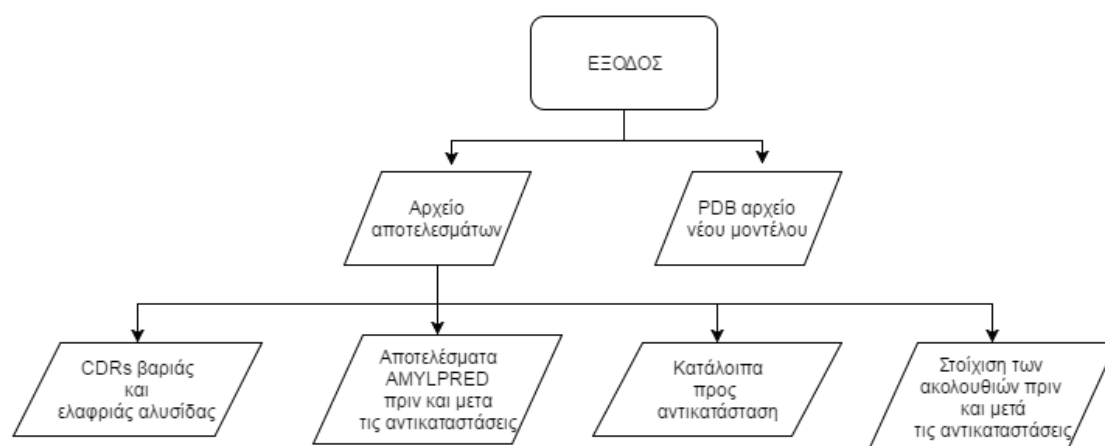
Ο αλγόριθμος ANTISOMA χρησιμοποιεί ως είσοδο ένα αρχείο pdb ενός μονοκλωνικού αντισώματος. Ειδικότερα χρησιμοποιεί μόνο μια από τις ελαφριές ή μια από τις βαριές αλυσίδες του αντισώματος. Έπειτα υπολογίζοντας τις περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση (μέσω του αλγορίθμου AMYLPRED2) όπως επίσης και τα κατάλοιπα που βρίσκονται στην επιφάνεια του αντισώματος (με τη βοήθεια του αλγορίθμου DSSP) και αποκλείοντας εκείνα που βρίσκονται σε CDRs, υπολογίζει τα κατάλοιπα που θα αντικατασταθούν. Αφού γίνουν οι αντικαταστάσεις ο ANTISOMA ξανατρέχει σαν επανέλεγχο το AMYLPRED2 και επαναυπολογίζει τις περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση μετά τις αντικαταστάσεις που πραγματοποιεί. Στη συνέχεια, πραγματοποιεί ομολογή προτυποποίηση (με το λογισμικό MODELLER) με σκοπό να δημιουργήσει ένα καινούργιο μοντέλο του μονοκλωνικού αντισώματος με μειωμένες περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση σε σύγκριση με το αρχικό. Για να μπορέσει ο χρήστης να συγκρίνει τη δομή του αντισώματος πριν και μετά τις αντικαταστάσεις και σε τι ποσοστό αυτές ήταν ωφέλιμες δίνεται η τρισδιάστατη δομή του μονοκλωνικού αντισώματος πριν και μετά τις αντικαταστάσεις (με το λογισμικό JSmol), όπως επίσης ο υπολογισμός του εμβαδού (σε τετραγωνικά Å) των περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση του αρχικού αντισώματος έναντι του βελτιστοποιημένου.

Παρακάτω φαίνεται το διάγραμμα ροής που περιγράφει τον τρόπο λειτουργίας του αλγορίθμου ANTISOMA (Εικόνα 24).



Εικόνα 24: Διάγραμμα ροής όπου φαίνεται ο τρόπος λειτουργίας του αλγορίθμου ANTISOMA

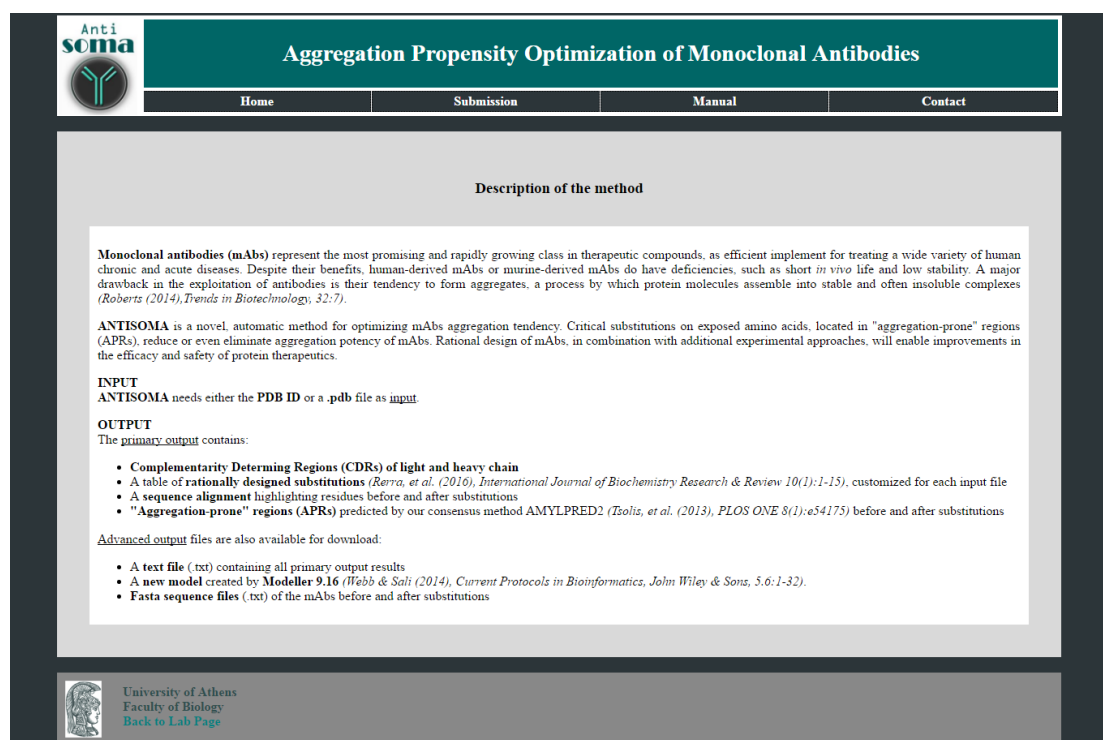
Η έξοδος της μεθόδου αποτελείται από αρχεία κειμένου στα οποία έχει πρόσβαση ο χρήστης και τα οποία παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 25).



Εικόνα 25: Περιγραφή των αρχείων αποτελεσμάτων που προκύπτουν μετά από ένα τρέξιμο του ANTISOMA

4.1.2 ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΗ ΕΠΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Για τη μέθοδο ANTISOMA έχει κατασκευαστεί μία διαδικτυακή διεπαφή η οποία φιλοξενείται στον ιστοχώρο του Εργαστηρίου Βιοπληροφορικής και Βιοφυσικής του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ (<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/ANTISOMA>). Στην κεντρική σελίδα του υπολογιστικού εργαλείου ANTISOMA, ο χρήστης μπορεί να βρει υπερσυνδέσμους για τη σελίδα υποβολής επερώτησης (Submission), για το εγχειρίδιο χρήσης του εργαλείου (Manual) και για τις πληροφορίες επικοινωνίας (Contact) καθώς και πληροφορίες για το εργαλείο και τον τρόπο κατασκευής του.



Εικόνα 26: Η κεντρική σελίδα του υπολογιστικού εργαλείου ANTISOMA

Στη σελίδα submission ο χρήστης μπορεί να εισάγει το μονοκλωνικό αντίσωμα που θέλει να βελτιστοποιήσει είτε εισάγοντας έναν κωδικό pdb στην ειδική φόρμα είτε ανεβάζοντας ένα pdb αρχείο που βρίσκεται αποθηκευμένο τοπικά στον υπολογιστή του (Εικόνα 27). Και στις δύο περιπτώσεις ο χρήστης πρέπει να εισάγει το όνομα της ελαφριάς και της βαριάς αλυσίδας αντίστοιχα, όπως αυτές εμφανίζονται στο pdb αρχείο. Ένα αρχείο pdb περιέχει συντεταγμένες όλων των ατόμων του μορίου για κρυσταλλογραφικά λυμένες δομές. Στο αρχείο pdb θα πρέπει η βαριά και η ελαφριά αλυσίδα να έχουν διαφορετικά γράμματα ως ονομασία. Αν το αρχείο που δοθεί έχει λανθασμένη μορφοποίηση, ή δεν εισαχθεί κάποιο αρχείο, τότε θα εμφανιστεί μήνυμα στο χρήστη που θα τον προτρέπει να γυρίσει στη σελίδα υποβολής και να υποβάλει το αρχείο pdb ξανά.

The screenshot shows the 'Aggregation Propensity Optimization of Monoclonal Antibodies' web application. At the top left is the 'Anti soma' logo. A navigation bar contains links for 'Home', 'Submission', 'Manual', and 'Contact'. The main content area is divided into two sections by a dashed border. The top section has three input fields labeled 'Insert a pdb id', 'Light chain name', and 'Heavy chain name', followed by a 'Submit PDB' button. Below this is the text 'OR upload your own pdb file'. The bottom section has a file selection area labeled 'Select your .pdb file' with a file browser icon and the text 'Επιλογή αρχείου Δεν επιλέχθηκε κανένα αρχείο.', followed by 'Light chain name' and 'Heavy chain name' input fields, and an 'Upload PDB file' button. At the bottom, a note states: '*Please insert a chain identifier as defined in the pdb file. [Example](#)'.

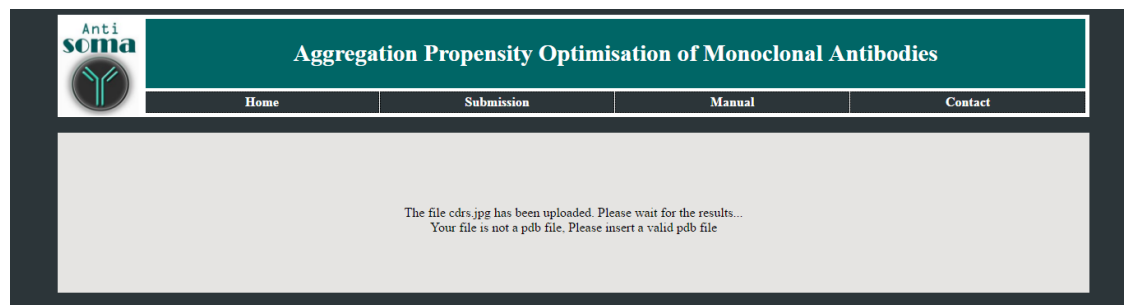
Εικόνα 27: Η σελίδα υποβολής αναζήτησης για το εργαλείο ANTISOMA

Στη σελίδα υποβολής υπάρχει επίσης ένα παράδειγμα που μπορεί να τον βοηθήσει να εντοπίσει στον αρχείο του τα ονόματα των αλυσίδων που τον ενδιαφέρουν (Εικόνα 28). Παρακάτω δίνεται ένα παράδειγμα ενός μέρους ενός αρχείου pdb για την ελαφριά και τη βαριά αλυσίδα του μονοκλωνικού αντισώματος Omalizumab με κωδικό pdb:3EO9, όπως αυτό πρέπει να κατατεθεί, ώστε η μέθοδος να λειτουργήσει σωστά. Ειδικά στην περίπτωση που ο χρήστης ανεβάζει ένα αρχείο pdb εάν η διαδικασία ήταν επιτυχής εμφανίζεται το μήνυμα «The file ****.pdb has been uploaded. Please wait for the results...». Στην αντίθετη περίπτωση εμφανίζεται το αντίστοιχο μήνυμα που ενημερώνει το χρήστη κάτι δεν εισήγαγε σωστά (Εικόνα 29).

Light chain identifier												
7	ATOM	2283	CD2	LEU	L	82	-22.438	9.115	-33.832	1.00	44.20	C
8	ATOM	2284	N	GLN	L	83	-26.883	8.381	-35.899	1.00	40.34	N
9	ATOM	2285	CA	GLN	L	83	-28.061	9.152	-35.515	1.00	39.29	C
10	ATOM	2286	C	GLN	L	83	-28.033	9.463	-34.012	1.00	43.02	C
11	ATOM	2287	O	GLN	L	83	-27.440	8.711	-33.240	1.00	43.73	O
12	ATOM	2288	CB	GLN	L	83	-29.333	8.387	-35.892	1.00	37.45	C
13	ATOM	2289	CG	GLN	L	83	-29.402	8.013	-37.363	1.00	36.86	C
14	ATOM	2290	CD	GLN	L	83	-29.366	9.233	-38.264	1.00	46.38	C
15	ATOM	2291	OE1	GLN	L	83	-30.096	10.202	-38.047	1.00	45.91	O
16	ATOM	2292	NE2	GLN	L	83	-28.500	9.201	-39.271	1.00	45.06	N
17	ATOM	2293	N	PRO	L	84	-28.670	10.575	-33.592	1.00	40.06	N

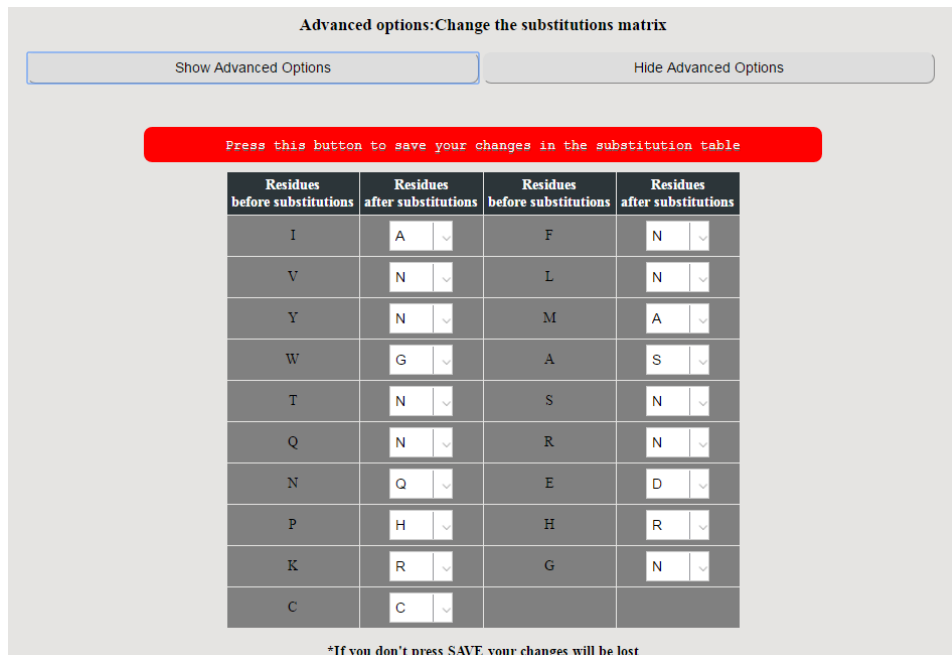
Heavy chain identifier												
12426	ATOM	11584	CB	GLN	H	3	30.001	104.622	-44.653	1.00	30.43	C
12427	ATOM	11585	CG	GLN	H	3	31.391	105.107	-44.329	1.00	38.49	C
12428	ATOM	11586	CD	GLN	H	3	32.159	105.488	-45.577	1.00	42.71	C
12429	ATOM	11587	OE1	GLN	H	3	32.531	104.629	-46.381	1.00	45.98	O
12430	ATOM	11588	NE2	GLN	H	3	32.386	106.785	-45.757	1.00	45.76	N
12431	ATOM	11589	N	LEU	H	4	27.010	105.758	-43.937	1.00	19.26	N
12432	ATOM	11590	CA	LEU	H	4	25.650	105.950	-44.420	1.00	17.74	C
12433	ATOM	11591	C	LEU	H	4	25.692	107.226	-45.238	1.00	17.66	C
12434	ATOM	11592	O	LEU	H	4	26.084	108.281	-44.735	1.00	14.77	O
12435	ATOM	11593	CB	LEU	H	4	24.689	106.123	-43.250	1.00	18.96	C

Εικόνα 28: Αρχείο pdb μονοκλωνικού αντισώματος.



Εικόνα 29: Το αποτέλεσμα μετά από εισαγωγή ακολουθίας με λανθασμένη μορφοποίηση

Εάν ο χρήστης πατήσει το κουμπί Advanced options εμφανίζεται ο πίνακας αντικατάστασης που χρησιμοποιείται για τις αντικαταστάσεις των καταλοίπων που έχουν ως αποτέλεσμα την μείωση της τάσης προς συσσωμάτωση (Εικόνα 30). Μέσω αυτής της επιλογής ο χρήστης μπορεί να αλλάξει τις προεπιλεγμένες αντικαταστάσεις με βάση τις δικές του προτιμήσεις. Σημαντικό είναι να πατήσει το κουμπί που αποθηκεύει τις επιλογές του πριν προχωρήσει στο submission γιατί αλλιώς οι αλλαγές στον πίνακα αντικαταστάσεων θα χαθούν και η υποβολή θα συνεχίσει με τον αρχικά προεπιλεγμένο πίνακα του εργαλείου.



Εικόνα 30: Advanced options του εργαλείου ANTISOMA

Στην σελίδα των αποτελεσμάτων του ANTISOMA ο χρήστης μπορεί να συγκεντρώσει πληροφορίες σχετικά με το μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο υπέβαλλε, ενώ παράλληλα μπορεί να κάνει λήψη των αποτελεσμάτων σε μορφή αρχείων κειμένου (txt).

Στο πρώτο τμήμα των αποτελεσμάτων δίνεται στο χρήστη το αναγνωριστικό του επερωτήματος (Job ID) μέσω του οποίου μπορεί να έχει πρόσβαση στα αποτελέσματα για τον επόμενο μήνα από την ημερομηνία υποβολής.

Στο επόμενο τμήμα προβλέπονται οι συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές του αντισώματος (CDRs) (Εικόνα 31) σύμφωνα με τον ορισμό του Kabat, ένα ευρέως υιοθετημένο πρότυπο αρίθμησης καταλοίπων που ανήκουν σε αυτές τις περιοχές. Για την ελαφριά και τη βαριά αλυσίδα του αντισώματος δίνεται το όνομα των CDRs, την αρχή και το τέλος κάθε πεπτιδίου που ανήκει στα CDRs και, τέλος, τα κατάλοιπα που ανήκουν σε αυτές.

CDRs					
Light chain	Start-End	Residues	Heavy chain	Start-End	Residues
L1	23-32	SASSRSYMQ	H1	23-32	GYSFTRYWMH
L2	48-54	DTSKLAS	H2	47-65	AIYPGNSDTSYNQKFEGKA
L3	87-93	HQRSSYT	H3	96-103	DYGYFFDF

Εικόνα 31: Συμπληρωματικές Καθοριστικές περιοχές όπως προβλέφθηκαν από το εργαλείο ANTISOMA για το μονοκλωνικό Omalizumab με κωδικό pdb 3EO9

Στη συνέχεια δίνονται στο χρήστη τα κατάλοιπα που πληρούν τις προϋποθέσεις και άρα επιλέχθηκαν ως κατάλληλα για αντικατάσταση (Εικόνα 32) όπως επίσης και τις στοιχίσεις των ακολουθιών πριν και μετά τις αντικαταστάσεις που έγιναν όπου με μικρά γράμματα απεικονίζονται τα κατάλοιπα που αντιστάθηκαν. (Εικόνα 33)

Residues for replacement

[See default replacements](#)

Light chain

71:S 73:T 75:S 84:T 111:S 126:T 135:N

Heavy chain

44:E 69:T 70:A 71:V 72:T 91:V 110:T 185:T 192:G 193:T 194:Q 195:T 197:I 199:N

**These residues are NON CDRs, accessible to the solvent and present in "aggregation-prone" regions*

Εικόνα 32: Τα κατάλοιπα προς αντικατάσταση όπως προβλέφθηκαν από το εργαλείο ANTISOMA για το μονοκλωνικό Omalizumab με κωδικό pdb 3E09

Sequences alignment

Alignment for LIGHT chain before and after substitutions

	10	20	30	40	50	60
seq_before	DIQMTIQSPSS	LSASVGDRTV	ITCRASKTIS	KYLAWYQQKP	GKAPKLLIYS	GSTLQSGVPS
seq_after	DIQMTIQSPSS	LSASVGDRTV	IdCRASKTIS	KYLAWYQQKP	GKAPKLLIYS	GSTLQSGVPS
seq_before	70	80	90	100	110	120
seq_before	RFSGSGSGTD	FTLTISSLQP	EDFATYYCQQ	HNEYPLTFGQ	GTHVEIKRTV	AAPSVFIAPP
seq_after	RFSGSGSGTD	FdLTIddLQP	EDFAdYYCQQ	HNEYPLTFGQ	GTHVEIKRTV	AAPdVdIFPP
seq_before	130	140	150	160	170	180
seq_before	SDEQLKSGTA	SVVCLLNIFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLSTLT
seq_after	SDEQLKSGdA	SVVCLLNfY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLSTLT
seq_before	190	200	210			
seq_before	LSKADYKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSPN	RGEC		
seq_after	LSKADYKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSPN	RGEC		

Alignment for HEAVY chain before and after substitutions

	10	20	30	40	50	60
seq_before	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GHWNWRVQA	PGKLEWVGM	IHPDSETRY
seq_after	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GHWNWRVQA	PGKLEWVGM	IHPDSETRY
seq_before	70	80	90	100	110	120
seq_before	NQKFKDRFTI	SVDKSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYVCARGI	YFYGTTFDY	WGQGLVTVS
seq_after	NQKFKDRFdI	sdDKSKNTLd	LmNSLRAED	dAdYYCARGI	YFYGTTFDY	WgNgTdVdVS
seq_before	130	140	150	160	170	180
seq_before	SASTKGPSVF	PLAPSSKSTS	GGTAALGCLV	KDYFPEPVIV	SWNSGALTSG	VHTFFAVLQS
seq_after	SASTKGPSVF	PLAPSSKSTS	GGTAALGCLV	KDYFPEPVIV	SWNSGALTSG	VHTFFAVLQS
seq_before	190	200	210			
seq_before	SGLYSLSSV	TVPSSSLGTQ	TYICNVNHPK	SNTKVDKVKV		
seq_after	SGLYSLSSV	dVPSSSLedn	dYaCNVNHKP	SNTKVDKVKV		

Εικόνα 33: Οι στοιχίσεις της ελαφριάς και της βαριάς αλυσίδας του αντισώματος όπως υπολογίσθηκαν από το εργαλείο ANTISOMA για το μονοκλωνικό Omalizumab με κωδικό pdb 3E09

Στο τελευταίο τμήμα του εργαλείου παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του αλγορίθμου AMYLPRED2 που προβλέπει τις περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση για την βαριά και την ελαφριά αλυσίδα του μονοκλωνικού αντισώματος πριν και μετά τις αντικαταστάσεις που πραγματοποιήθηκαν.(Εικόνα 34)

AMYPRED2 results for LIGHT chain before and after substitutions

Before substitutions			After substitutions		
Region	Start-End	Residues	Region	Start-End	Residues
1	70-75	YSLTIS	1	111-115	NVFIF
2	84-86	TYY	2	128-136	SVVCLLNQF
3	111-115	SVFIF			
4	126-136	TASVVCLLNNF			

AMYPRED2 results for HEAVY chain before and after substitutions

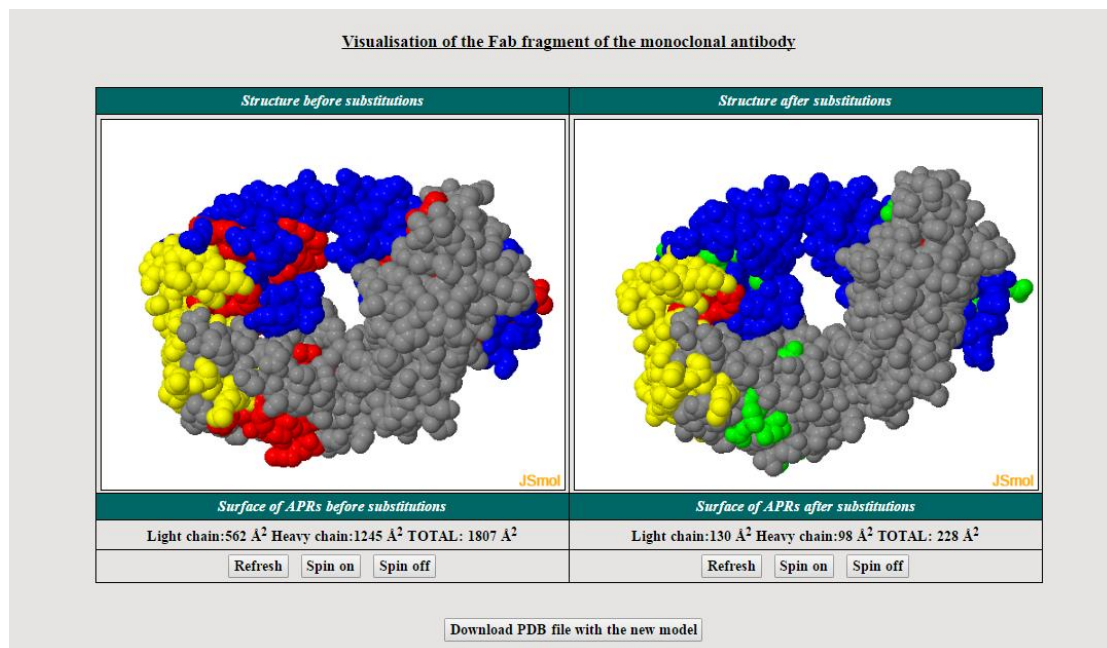
Before substitutions			After substitutions		
Region	Start-End	Residues	Region	Start-End	Residues
1	27-35	FTRYWMHWI	1	27-35	FTRYWMHWI
2	44-48	EWIGA	2	100-105	YYDFW
3	69-72	TAVT	3	143-145	LVK
4	90-94	AVYYC			
5	98-98	Y			
6	100-105	YYDFW			
7	109-113	TTLTV			
8	143-145	LVK			
9	180-186	LSSVTV			
10	192-200	GTQTYICNV			

**Remaining "aggregation-prone" regions are often located in CDRs*

Εικόνα 34: Τα αποτελέσματα του αλγορίθμου AMYPRED2 για την ελαφριά και την βαριά αλυσίδα του μονοκλωνικού Omalizumab με κωδικό pdb 3EO9, πριν και μετά τις αντικαταστάσεις

Ο χρήστης μπορεί στη συνέχεια είτε να υπολογίζει ένα νέο μοντέλο του μονοκλωνικού αντισώματος με τη βοήθεια του λογισμικού Modeler είτε να δει τις ακολουθίες σε μορφοποίηση FASTA πριν και μετά τις αντικαταστάσεις.

Στην επιλογή του «υπολογισμού του νέου μοντέλου» παρουσιάζονται, μέσω του λογισμικού JSmol (Εικόνα 35), το αρχικό μοντέλο και το τελικό μοντέλο με την τρισδιάστατη τους δομή έτσι ώστε ο χρήστης να μπορεί να συγκρίνει τα αποτελέσματα. Επίσης, υπολογίζεται το εμβαδόν των περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση πριν και μετά τις αντικαταστάσεις των καταλοίπων. Τέλος, δίνεται για περαιτέρω χρήση το pdb αρχείο του νέου μοντέλου όπως υπολογίσθηκε από το Modeler.



Εικόνα 35: Τα αποτελέσματα του Modeller μετά τις αντικαταστάσεις για το μονοκλωνικό Opalizumab με κωδικό pdb 3EO9. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η βαριά αλυσίδα, με γκρι χρώμα η ελαφριά αλυσίδα, με κόκκινο οι περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση όπως προβλέφθηκαν από το AMYLPRED2, με κίτρινο τα κατάλοιπα που ανήκουν σε CDRs και με πράσινο τα κατάλοιπα που αντικαταστάθηκαν.

4.1.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΓΝΩΣΤΕΣ

Παρακάτω γίνεται μια προσπάθεια σύγκρισης του αλγορίθμου ANTISOMA με άλλους αλγορίθμους βελτιστοποίησης διαλυτότητας πρωτεϊνών. Οι αλγόριθμοι που θα αναλυθούν είναι ο CamSol (Sormanni, Aprile et al. 2015), ο Aggrescan3D (Zambrano, Jamroz et al. 2015) και ο Solubis (Van Durme, De Baets et al. 2016). Στο παράρτημα παρουσιάζονται λεπτομερείς πληροφορίες για κάθε έναν από τους παρακάτω αλγορίθμους.

4.1.3.1 Ο αλγόριθμος CamSol

Ο αλγόριθμος CamSol προβλέπει την διαλυτότητα μιας πρωτεΐνης και συνδυάζει τρεις αλγορίθμους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ξεχωριστά για συγκεκριμένους υπολογισμούς, είτε όλοι μαζί για το λογικό σχεδιασμό πρωτεϊνών με βελτιστοποιημένη διαλυτότητα.

Ο αλγόριθμος CamSol περιλαμβάνει:

- Λογικό σχεδιασμό των παραλλαγών μιας πρωτεΐνης με ενισχυμένη διαλυτότητα
- Γρήγορο έλεγχο διαλυτότητας (solubility screening) πρωτεϊνικών βιβλιοθηκών

Η διαδικτυακή επαφή της μεθόδου βρίσκεται στην διεύθυνση:

<http://www.vendruscolo.ch.cam.ac.uk/camsolmethod.html>

Αυτοί οι αλγόριθμοι περιλαμβάνουν:

1. (CamSol Intrinsic) Προβλέπει για κάθε αμινοξικό κατάλοιπο τη βαθμολογία διαλυτότητας του και το αντίκτυπο στη συνολική διαλυτότητα του μορίου
2. (CamSol Structurally Corrected) Ο αλγόριθμος διορθώνει τη δομή της πρωτεΐνης με σκοπό να αυξήσει τη διαλυτότητα της. Λαμβάνει υπόψιν του τη θέση των καταλοίπων και την έκθεση τους στο διαλύτη. Οι περιοχές του μορίου που διαφέρουν ως προς τη διαλυτότητα τους χρωματίζονται διαφορετικά.
3. (CamSol design) Ο αλγόριθμος παίρνει ως είσοδο τη δομικά διορθωμένη πρωτεΐνη από τον προηγούμενο αλγόριθμο και προτείνει αντικαταστάσεις ή εισαγωγές καταλοίπων που προβλέπεται να βελτιστοποιούν τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης, ενώ παράλληλα διατηρείται η φυσική της δομή.

Βαθμολογία διαλυτότητας

Η βαθμολογία διαλυτότητας υπολογίζεται από την αλληλουχία των αμινοξέων χρησιμοποιώντας τον πρώτο αλγόριθμο του εργαλείου και χρησιμοποιείται για να ταξινομήσει πρωτεΐνες σύμφωνα με τη διαλυτότητα τους.

Λογικός σχεδιασμός πρωτεϊνών με βελτιστοποιημένη διαλυτότητα

Οι τρεις αλγόριθμοι που προσφέρει το CamSol μπορούν να χρησιμοποιηθούν μαζί για τον δομικό σχεδιασμό νέων πρωτεϊνικών παραλλαγών της αρχικής πρωτεΐνης που έχουν βελτιστοποιημένη διαλυτότητα. Σε αυτή την υλοποίηση η μέθοδος εκτελεί *in silico* δεκάδες χιλιάδες πιθανές αντικαταστάσεις ή εισαγωγές καταλοίπων για να προσδιορίσει συγκεκριμένες μεταλλάξεις που προβλέπεται ότι θα αυξήσουν σε μεγάλο βαθμό τη διαλυτότητα μιας πρωτεΐνης. Παρά τις αλλαγές που πραγματοποιούνται η πρωτεΐνη διατηρεί τις βασικές της ιδιότητες όπως τη βασική της δομή και την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τον στόχο. Η μέθοδος απαιτεί γνώση της δομής της πρωτεΐνης που είναι διαθέσιμη από πειραματικές μεθόδους (pdb) ή από υπολογιστικές μεθόδους (ομόλογη προτυποποίηση), ενώ δεν απαιτείται ιδιαίτερα υψηλή ανάλυση. Η μέθοδος ξεχωρίζει τα κατάλοιπα που πρόκειται να σχηματίσουν συσσωματώματα και πρέπει να

αντικατασταθούν από εκείνα που ναι μεν σχηματίζουν συσσωματώματα αλλά είναι απαραίτητα για την φυσική δομή της πρωτεΐνης όπως εκείνα που αποτελούν τον υδρόφοβο πυρήνα της. Ο χρήστης μπορεί να καθορίσει εξ αρχής μια λίστα με τα κατάλοιπα που είναι απαραίτητα για τη λειτουργία της πρωτεΐνης και έτσι δεν μπορούν να μεταλλαχθούν, όπως και τον μέγιστο αριθμό μεταλλάξεων που θα πραγματοποιηθούν ούτως ώστε η ακολουθία της πρωτεΐνης να παραμείνει συντηρημένη. (Εικόνα 36)

Variant ID	scenario	Nchanges	CamSol overall score	ch:H CamSol score	ch:L CamSol score
WT	WT	0	-0.575317	-0.773655	-0.376048
H.F102E;L116E;T194E	0	3	-0.517186	-0.657664	-0.376048
H.F102E;L116E;T194R	0	3	-0.517236	-0.657764	-0.376048
H.F102R;L116E;T194E	0	3	-0.517496	-0.658283	-0.376048
H.F102R;L116E;T194R	0	3	-0.517546	-0.658382	-0.376048

Εικόνα 36: Αρχείο αποτελεσμάτων του CamSol design για το μονοκλωνικό αντίσωμα Efalizumab με PDB ID 3E09. Η πιο αποτελεσματική μετάλλαξη είναι η "H.F102E; L116E; T194E" αφού έχει τη πιο υψηλή βαθμολογία διαλυτότητας.

4.1.3.2 Ο αλγόριθμος AGGRESCAN3D

Ο αλγόριθμος AGGRESCAN3D αποτελεί μια εξέλιξη του αλγορίθμου AGGRESCAN και ξεπερνά τους περιορισμούς των αλγορίθμων που βασίζονται απλά και μόνο στην αλληλουχία μιας πρωτεΐνης. Ο AGGRESCAN3D έχει μια πιο δομική προσέγγιση που επιτρέπει την ειδική ανίχνευση των καταλοίπων εκείνων που είναι επιρρεπή στη δημιουργία των περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση. Ο αλγόριθμος παρουσιάζει σημαντικά μεγαλύτερη ακρίβεια από ότι τα προγράμματα που βασίζονται στην πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης. Ο AGGRESCAN3D ενσωματώνει ένα πρότυπο μεταλλάξεων που επιτρέπει την εύκολη μοντελοποίηση των παθογόνων μεταλλάξεων ή τον σχεδιασμό πρωτεϊνών με αυξημένη διαλυτότητα. Αυτό επιτυγχάνεται από τον χρήστη αλλάζοντας το ανιχνευμένο κατάλοιπο που πιθανώς αν προκαλέσει συσσωμάτωση ή τα γειτονικά του. Επιπλέον, ο αλγόριθμος διαθέτει "Dynamic Mode" που λαμβάνει υπόψη του και την ευελιξία των καταλοίπων των πρωτεϊνών. Ο αλγόριθμος βρίσκεται στην παρακάτω διεύθυνση:

<http://biocomp.chem.uw.edu.pl/A3D/>

Μετά την κατάθεση των δεδομένων τα αποτελέσματα εμφανίζονται σε 4 καρτέλες

Aggrescan3D score

Βαθμολογία κάθε καταλοίπου της πρωτεΐνης όπως και συνολική βαθμολογία για ολόκληρη την πρωτεΐνη. Αρνητικές τιμές υποδηλώνουν μικρή τάση καταλοίπου για πρόκληση

συσσωμάτωσης ενώ θετικές τιμές το αντίθετο. Δίνεται η ευκαιρία στον χρήστη να αλλάξει κάθε κατάλοιπο συγκεκριμένα κατά όπως αυτός επιθυμεί και στη συνέχεια να ξανατρέξει τον αλγόριθμο για να δει αν μειώθηκε η βαθμολογία διαλυτότητας

Καρτέλα Aggrescan3D Line Plot

Τα αποτελέσματα του αλγορίθμου παρουσιάζονται σαν ένα line plot. Στον άξονα Y παρουσιάζονται οι βαθμολογίες των καταλοίπων ενώ στον άξονα X τα κατάλοιπα. Έχουμε την δυνατότητα να δούμε line plots για όλες τις αλυσίδες μιας πρωτεΐνης. Θετικές βαθμολογίες αποτελούν ένδειξη ότι τα κατάλοιπα εμφανίζουν τάση προς συσσωμάτωση ενώ αρνητικές το αντίθετο

Καρτέλα Structure

Εικόνες της πρωτεΐνης με διαφορετικές λήψης περιστροφής ενσωματώνονται σε ένα βίντεο για την τρισδιάστατη παρουσίαση της πρωτεΐνης. Οι κόκκινες περιοχές είναι αυτές με τάση προς συσσωμάτωση, ενώ οι μπλε οι περιοχές με αυξημένη διαλυτότητα. Η πρωτεΐνη μπορεί να παρουσιαστεί και με το λογισμικό JSmol.

Εάν έχουμε επιλέξει dynamic mode τότε εμφανίζεται και άλλη μια καρτέλα η **Dynamic mode details**. Στο Dynamic mode η πρωτεΐνη μελετάται στο χώρο και πόσο η στερεοδιάταξη της επιτρέπεται να αλλάξει. Για κάθε μία από τις επιτρεπτές στερεοδιατάξεις της ο αλγόριθμος υπολογίζει τις γενικές βαθμολογίες και επιλέγει εκείνη τη δομή με την υψηλότερη. Στη συνέχεια στοιχίζει τις δυο δομές και παρουσιάζει τον δείκτη υπέρθεσης δομών rmsd.

4.1.3.3 Ο αλγόριθμος SolubiS

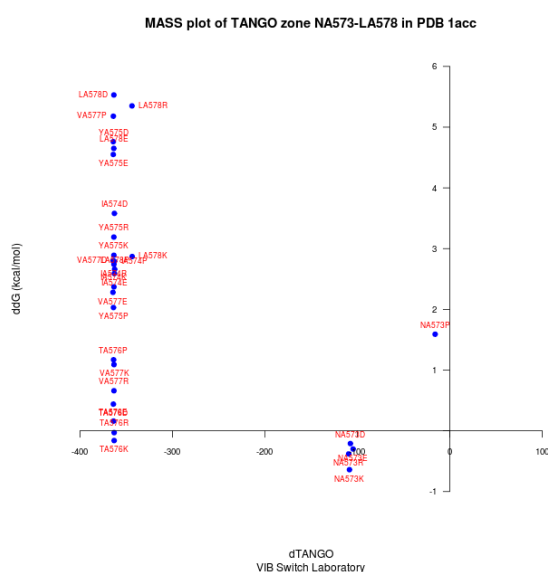
Ο αλγόριθμος SolubiS αναγνωρίζει μεταλλάξεις που μειώνουν την τάση προς συσσωμάτωση των καταλοίπων μιας πρωτεΐνης. Χρησιμοποιεί δύο εργαλεία τον αλγόριθμο TANGO και το FoldX. Ο TANGO είναι ένας στατιστικός αλγόριθμος που αναγνωρίζει τις περιοχές εκείνες της πρωτεΐνης που έχουν τάση να δημιουργήσουν συσσωμάτωση β-πτυχωτών επιφανειών. Αυτό επιτυγχάνεται με τη μετάλλαξη συγκεκριμένων καταλοίπων σε αυτές τις περιοχές σε άλλα που ονομάζονται “gatekeepers” και είναι τα εξής: P (προλίνη), R (αργινίνη), K (λυσίνη), D (ασπαρτικό) και E (γλουταμικό).

Μετά την αναγνώριση των περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση ο εμπειρικός αλγόριθμος FoldX χρησιμοποιείται για να υπολογίσει το αντίκτυπο που είχαν οι παραπάνω μεταλλαγές στην σταθερότητα του μορίου. Ο αλγόριθμος δίνει ως έξοδο την ελεύθερη ενέργεια της πρωτεΐνης για κάθε μετάλλαξη. Αν η μετάλλαξη αποδιατάσσει την πρωτεΐνη τότε η ελεύθερη ενέργεια αυξάνεται ενώ στην αντίθετη περίπτωση μειώνεται. Η μέθοδος βρίσκεται στη διεύθυνση:

<http://solubis.switchlab.org>

Αποτελέσματα SolubiS

Αρχικά παρουσιάζεται μια γραφική αναπαράσταση του μορίου που δόθηκε με χρωματισμένες διαφορετικά τις περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση. Δίνεται επιπλέον και ένα stretch plot που η κάθε τελεία απεικονίζει κάθε μια από τις περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση και τη συνεισφορά της περιοχής στη σταθερότητα του μορίου. Όσες περιοχές βρίσκονται στην πάνω δεξιά γωνία του γραφήματος είναι οι περιοχές που εμφανίζουν την μεγαλύτερη τάση προς συσσωμάτωση και δεν επηρεάζουν πολύ τη σταθερότητα του μορίου. Στη συνέχεια δίνεται μια ανάλυση μεταλλάξεων για κάθε μια από τις περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση. Οι πληροφορίες για όλες τις μεταλλάξεις είναι διαθέσιμες σ έναν πίνακα αλλά επίσης παρουσιάζονται και σαν γράφημα MASS-plot (Mutant Aggregation & Stability Spectrum). (Εικόνα 37)



Εικόνα 37: Τα αποτελέσματα του αλγορίθμου Solubis για το αντίσωμα με κωδικό pdb 1ACC. Αντικαταστάσεις όπως οι NA573K and TA576K μειώνουν την τάση προς συσσωμάτωση και δεν αποδιατάσσουν την πρωτεΐνη αφού βρίσκονται χαμηλά στο Mass Plot.

4.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΟ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΟ ΕΡΓΑΛΕΙΟ ANTISOMA ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

Εργαλεία	Αυτοματοποιημένες μεταλλάξεις	Μη αυτόματες μεταλλάξεις	Πολλαπλές αλυσίδες	Ομόλογη προτυποποίηση	Οπτικοποίηση	Στοίχιση ακολουθιών	Νέα δομή
CamSol	✓		✓		✓		
AGGRESCAN 3D		✓	✓		✓		✓
Solubis	✓				✓		
ANTISOMA	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Ο υπολογιστικός αλγόριθμος ANTISOMA είναι το μοναδικό εργαλείο στο διαδίκτυο που εξειδικεύεται στα μονοκλωνικά αντισώματα και παρέχει δυνατότητα για αντικαταστάσεις καταλοίπων είτε από τον χρήστη είτε αυτοματοποιημένα από τον πίνακα αντικαταστάσεων όπως ορίσθηκε παραπάνω. Λόγω της εξειδίκευσης στα αντισώματα το εργαλείο λαμβάνει υπόψιν του τις συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές (CDRs) στις οποίες δεν επιτρέπεται να γίνει καμία μετάλλαξη ενώ στα εργαλεία AGGRESCAN3D και SolubiS αυτό είναι αδύνατον, άρα αυτό καθιστά αυτά τα εργαλεία ακατάλληλα για μελέτη αντισωμάτων. Το εργαλείο CamSol δίνει τη δυνατότητα να μην μεταλλάξει ο χρήστης κάποια συγκεκριμένα κατάλοιπα αλλά αυτό προϋποθέτει ότι θα πρέπει μόνος του ο χρήστης να υπολογίσει τα CDRs. Το εργαλείο ANTISOMA δεν επηρεάζεται από κενά στις αλυσίδες των αρχείων PDB αφού αυτοματοποιημένα τα γεμίζει ενώ τα υπόλοιπα εργαλεία εμφανίζουν προβλήματα. Να σημειωθεί ότι είναι ο μόνος αλγόριθμος ο οποίος εφαρμόζει ομόλογη προτυποποίηση στις πρωτεΐνες με τα κατάλοιπα να έχουν αντικατασταθεί, δίνοντας έτσι στον χρήστη την ευκαιρία να μην αναλωθεί σε τέτοιους είδους εργασίες και κατευθείαν να χρησιμοποιήσει το νέο pdb αρχείο. Τέλος, το εργαλείο ANTISOMA είναι ιδιαίτερος φιλικό σε έναν νέο χρήστη αφού όλα τα αποτελέσματα δίνονται απευθείας σε πίνακες όπως και σε txt αρχείο για εύκολη σύγκριση και εξαγωγή συμπερασμάτων. Σύμφωνα με τις παραπάνω παρατηρήσεις το υπολογιστικό εργαλείο ANTISOMA αποτελεί μονόδρομο στην έρευνα για μείωση των περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση στα θεραπευτικά μονοκλωνικά αντισώματα.

Λόγω της ακαταλληλότητας των παραπάνω εργαλείων για έρευνα σε μονοκλωνικά αντισώματα και λόγω μη συγκρίσιμων τελικών αποτελεσμάτων δεν μπορεί να γίνει κάποια περαιτέρω σύγκριση μεταξύ τους.

Αξιολόγηση της μεθόδου

Για την αξιολόγηση της μεθόδου 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 (δομές από την βάση PDB), ήταν δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων (1). 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. Αναλυτικά:

- Στο νέο μοντέλο του Efalizumab βρέθηκε ένα κατάλοιπο σε απαγορευμένη θέση σε αντίθεση με τη δομή από την pdb που δεν έχει κανένα
- Στο νέο μοντέλο του Omalizumab δε βρέθηκε κανένα κατάλοιπο σε απαγορευμένη θέση σε αντίθεση με τη δομή από την pdb που έχει τρία
- Στο νέο μοντέλο του Canacinumab βρέθηκαν τρία κατάλοιπα σε απαγορευμένη θέση σε αντίθεση με τη δομή από την pdb που έχει ένα
- Στα νέα μοντέλα του Basiliximab και του Daclizumab βρέθηκε ένα κατάλοιπο σε απαγορευμένη θέση παρομοίως και στη δομή από την pdb.

Πίνακας 1. Αμινοξικά κατάλοιπα, με τον κώδικα του ενός γράμματος, που βρέθηκαν σε απαγορευμένες θέσεις στο Ramachandran Plot. Στην μεσαία στήλη τα αποτελέσματα για τις πειραματικά προσδιορισμένες με κρυσταλλογραφία ακτινών-Χ δομές που χρησιμοποιήθηκαν ως δομές – οδηγοί. Στην τρίτη στήλη τα αποτελέσματα για τις νέες δομές που δημιουργήθηκαν με το εργαλείο Modeller9v16. Το γράμμα L στην παρένθεση αντιπροσωπεύει την ελαφριά αλυσίδα και το H τη βαριά αλυσίδα. Αναλυτικά στο νέο μοντέλο του Efalizumab βρέθηκε ένα κατάλοιπο σε απαγορευμένη θέση σε αντίθεση με τη παλιά

Μονοκλωνικό Αντίσωμα	Δομή από την RCSB PDB	Νέα Δομή (Modeller9v16)
Efalizumab	No disallowed residues	S 135 (H)
	A 55 (L)	
Omalizumab	S 135 (H) S 136 (H)	No disallowed residues
		A 51 (L)
Canacinumab	A 51 (L)	D 61 (H) T 111 (H)
Basiliximab	T 50 (L)	T 50 (L)
Daclizumab	T 50 (L)	T 50 (L)

Στη συνέχεια, ένα ακόμα σημαντικό κριτήριο για να θεωρηθεί ότι τα νέα μοντέλα που δημιουργήθηκαν με τα νέα αμινοξικά κατάλοιπα είναι αξιόπιστα ποιοτικά, είναι ο 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. Όμοια 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 ενδείκνυνται, αλλά δεν είναι απαραίτητο να αντιμετωπιστούν, μέχρι εκείνες που πρέπει οπωσδήποτε 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. Το πρόγραμμα θεωρεί ότι δύο άτομα συγκρούονται όταν η απόστασή τους είναι μικρότερη του αθροίσματος των ακτινών Van der Waals τους μειωμένο κατά 0.40Å. Για τα ζεύγη των ατόμων που συμμετέχουν σε υδρογονικό δεσμό, ο αλγόριθμος είναι πιο ανεκτικός και αντικαθιστά το 0.40 Å με το 0.55Å για να θεωρηθεί ότι υπάρχει πιθανή σύγκρουση μεταξύ των ατόμων.

Πίνακας 2. Αποτελέσματα συγκρούσεων που εντόπισε το εργαλείο WHAT_CHECK. Οι δομές που δόθηκαν ως είσοδος είναι πειραματικά προσδιορισμένες με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ που έχουν κατατεθεί στην βάση RCSB PDB και χρησιμοποιήθηκαν ως δομές-οδηγοί.

Δομές από την RCSB PDB	Μεσαία Κατηγορία (Middle Bin)	Δεύτερη Κατηγορία (Second Bin)	Πρώτη Κατηγορία (Mildest Bin)
Efalizumab	0	1	17
Omalizumab	0	0	19
Canacinumab	0	1	31
Basiliximab	0	0	25
Daclizumab	0	1	30

Πίνακας 3. Αποτελέσματα συγκρούσεων που εντόπισε το εργαλείο WHAT_CHECK. Οι δομές που δόθηκαν ως είσοδος είναι οι νέες δομές όπως υπολογίστηκαν από το λογισμικό Modeller μετά τις αντικαταστάσεις που πραγματοποίησε ο αλγόριθμος ANTISOMA.

Δομές από ANTISOMA	Μεσαία Κατηγορία (Middle Bin)	Δεύτερη Κατηγορία (Second Bin)	Πρώτη Κατηγορία (Mildest Bin)
Efalizumab	0	6	122
Omalizumab	0	8	116
Canacinumab	0	42	196
Basiliximab	0	5	93
Daclizumab	0	1	30

Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα του αλγορίθμου ANTISOMA για κάθε ένα από τα θεραπευτικά μονοκλωνικά αντισώματα του συνόλου δεδομένου ελέγχου της μεθόδου. Θα ακολουθείται ο παρακάτω χρωματικός κώδικας:

- **Μπλε:** Βαριά αλυσίδα
- **Γκρι:** Ελαφριά αλυσίδα
- **Κίτρινο:** CDRs
- **Κοκκίνο:** Περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση
- **Γαλάζιο:** Περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση που βρίσκονται σε CDRs
- **Πράσινο:** Κατάλοιπα που αντικαταστάθηκαν

Οι αντικαταστάσεις στους πίνακες αντικατάστασης θα έχουν κωδικοποίηση της μορφής I32A, που θα σημαίνει ότι η ισολευκίνη στη θέση 32 αντικαταστάθηκε με την αλανίνη.

4.2.1 Omalizumab

Παρουσίαση ακολουθίας ελαφριάς και βαριάς αλυσίδας του Omalizumab σύμφωνα με τον χρωματικό κώδικα που αναφέρθηκε παραπάνω. Με (*) συμβολίζονται τα κατάλοιπα που είναι επιφανειακά σύμφωνα με τον αλγόριθμο DSSP.

	10	20	30	40	50	60
Omalizumab	DIQLTQSPSS	LSASVGDVRT	ITCRASQSV	YDGDSYMNWY	QQKPGKAPK	LIYAASYLES
Amylpred 2		## ###			# #####	
DSSP		* *			* **	
Αντικαταστάσεις		N N			N	

	70	80	90	100	110	120
Omalizumab	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS	SLQPEDFATY	YCQQSHEDPY	TFGQGTKVEI	KRTVAAPSVF
Amylpred 2		##### #	### #			###
DSSP		* * *	*			* *
Αντικαταστάσεις		N N N	N			N

	130	140	150	160	170	180
Omalizumab	IFPPSDEQLK	SGTASVCLL	NNFYPREAKV	QWKVDNALQS	GNSQESVTEQ	DSKdstysLS
Amylpred 2	##	#####	###			
DSSP	*	*	*			
Αντικαταστάσεις	A	N	N			

	190	200	210	220
Omalizumab	STLTLSKADY	EKHKVYACEV	THQGLSSPVT	KSFNRGEC
Amylpred 2				
DSSP				
Αντικαταστάσεις				

	10	20	30	40	50	60
Omalizumab	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	SGYSWNWIRO	APGKGLEWVA	SIT YDGSTNY
Amylpred 2					### ##	
DSSP						
Αντικαταστάσεις						

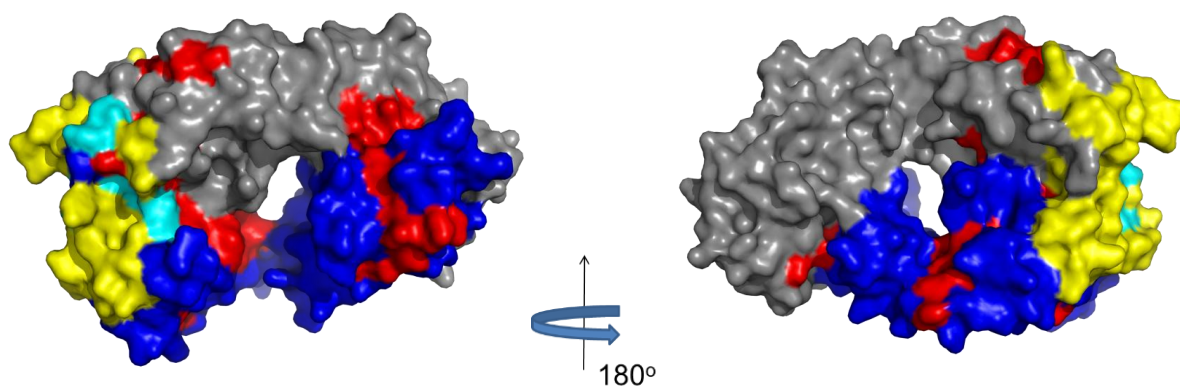
	70	80	90	100	110	120
Omalizumab	NPSVKGRTI	SRDDSKNIFY	LOMNSLRAED	TAVYYCARGS	HYFGHWFAV	WGQGTIVTVS
Amylpred 2		### #	#####	#####	#####	#####
DSSP		*	* *	** **	* * *	* * *
Αντικαταστάσεις		Q	N N		G Q NN	N

	130	140	150	160	170	180
Omalizumab	SASTKGPSVF	PLAPSSKSTS	GGTAALGCLV	KDYFPEPVTV	SWNSGALTSG	VHTFPAVLQS
Amylpred 2	#		###			
DSSP	*					
Αντικαταστάσεις	N					

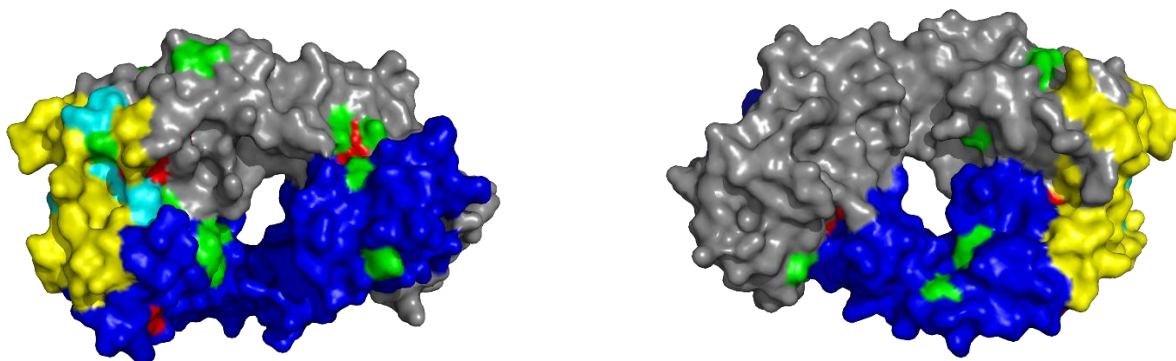
	190	200	210	220
Omalizumab	SGLYSLSSV	TVPSSSLGTQ	TYICNVNHKP	SNTKVDKKVE PK
Amylpred 2	#####	##	### #####	
DSSP	*	***	* * *	
Αντικαταστάσεις	N	N A		

Χωροπληρωτικά μοντέλα πριν και μετά τις αντικαταστάσεις

ΠΡΙΝ ΤΙΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ



ΜΕΤΑ ΤΙΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ



Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Omalizumab σε χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις πριν (μοντέλα πάνω σειρά) και μετά (μοντέλα κάτω σειρά) τις αντικαταστάσεις. Με ανοιχτό πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα που αντικαταστάθηκαν. Ακόμα, αφαιρέθηκε το κόκκινο χρώμα από τα κατάλοιπα που πλέον δεν προβλέπονται από το εργαλείο AMYLPRED2 να έχουν τάση για συσσωμάτωση μετά τις αντικαταστάσεις που έγιναν.

Πίνακας Αντικαταστάσεων

Ελαφριά αλυσίδα

T20N, T22N, T76N, S80N, S81N, T89N, S118N, F120N, I121A, T133N

Βαριά Αλυσίδα

T91N, V93N, T115N, I116N, S120N, S121N, T191N, T199N, T201N, I203A

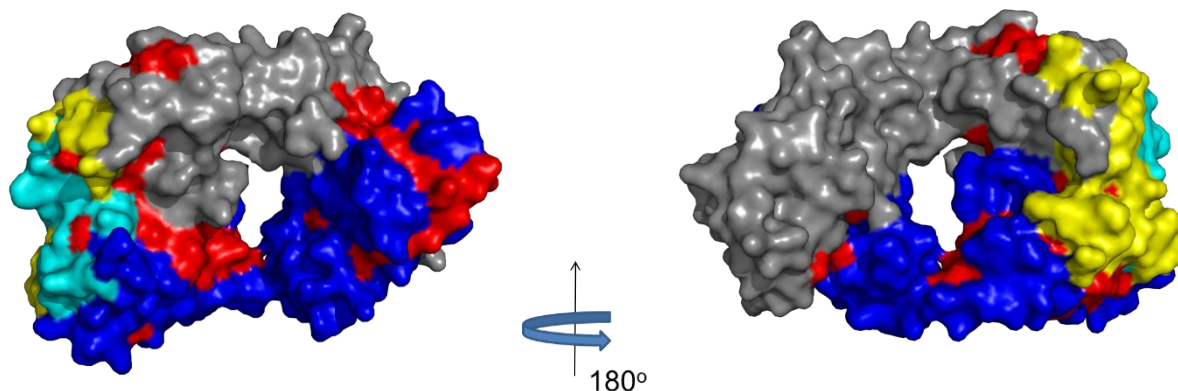
4.2.2 Efalizumab

Παρουσίαση ακολουθίας ελαφριάς και βαριάς αλυσίδας του Efalizumab σύμφωνα με τον χρωματικό κώδικα που αναφέρθηκε παραπάνω. Με (*) συμβολίζονται τα κατάλοιπα που είναι επιφανειακά σύμφωνα με τον αλγόριθμο DSSP.

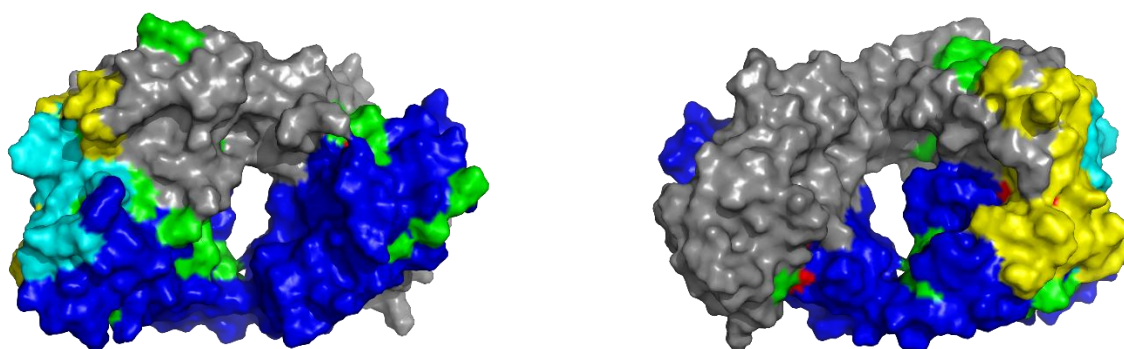
	10	20	30	40	50	60
Efalizumab	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASKTIS	KYLAWYQQK	GKAPKLLIYS	GSTLQSGVPS
Amylpred 2		## ###	#####		#### #	
DSSP		* *			*	
Αντικαταστάσεις		N N			N	
	70	80	90	100	110	120
Efalizumab	RFSGSGSGTD	FITLTISSLQP	EDFATYYCQQ	HNEYPLTFGQ	GTKVEIKRTV	AAPSVFIFPP
Amylpred 2		#####	####			####
DSSP		* **	*			* **
Αντικαταστάσεις		N NN	N			N NA
	130	140	150	160	170	180
Efalizumab	SDEQLKSGTA	SVVCLLNNE	Y PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLSSTLT
Amylpred 2	##	#####				
DSSP	*	*				
Αντικαταστάσεις	N	N				
	190	200	210			
Efalizumab	LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGEC		
Amylpred 2						
DSSP						
Αντικαταστάσεις						
	10	20	30	40	50	60
Efalizumab	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GHWMNWVRQA	PGKGLEWVGM	IHPDSETRY
Amylpred 2			#####	##	####	##
DSSP			*** * **			*
Αντικαταστάσεις						
	70	80	90	100	110	120
Efalizumab	NQKFKDRFTI	SVDKSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGI	YFYGTTYFDY	WGQGLVTVS
Amylpred 2	### ##	## ##		#####	#####	#####
DSSP	* **	* *		* * * * *	** * * * *	**
Αντικαταστάσεις	N NN	N Q		N N R		G Q NN NN
	130	140	150	160	170	180
Efalizumab	SASTKGPSVF	PLAPSSKSTS	CGTAALGLV	KDYFPEPVTV	SWNSGALTSG	VHTFPAVLQS
Amylpred 2			## #			
DSSP						
Αντικαταστάσεις						
	190	200	210			
Efalizumab	SGLYSLSSVV	TVPSSSLGTQ	TYICNVNHKP	SNTKVDKVV		
Amylpred 2	#####	##	### #####			
DSSP		*	*** * *			
Αντικαταστάσεις	N	GNQ	N A			

Χωροπληρωτικά μοντέλα πριν και μετά τις αντικαταστάσεις

ΠΡΙΝ ΤΙΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ



ΜΕΤΑ ΤΙΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ



Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Efalizumab σε χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις πριν (μοντέλα πάνω σειρά) και μετά (μοντέλα κάτω σειρά) τις αντικαταστάσεις. Με ανοιχτό πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα που αντικαταστάθηκαν. Ακόμα, αφαιρέθηκε το κόκκινο χρώμα από τα κατάλοιπα που πλέον δεν προβλέπονται από το εργαλείο AMYLPRED2 να έχουν τάση για συσσωμάτωση μετά τις αντικαταστάσεις που έγιναν.

Πίνακας Αντικαταστάσεων

Ελαφριά αλυσίδα

T20N, T22N, T72N, S76N, S77N, T85N, S114N, F116N, T129N, N138N

Βαριά Αλυσίδα

T69N, S71N, V72N, Y80N, T91N, V93N, L116N, T118N, T191N, T199N, T201N, I203A

4.2.3 Daclizumab

Παρουσίαση ακολουθίας ελαφριάς και βαριάς αλυσίδας του Daclizumab σύμφωνα με τον χρωματικό κώδικα που αναφέρθηκε παραπάνω. Με (*) συμβολίζονται τα κατάλοιπα που είναι επιφανειακά σύμφωνα με τον αλγόριθμο DSSP.

	10	20	30	40	50	60
Daclizumab	DIQMTQSPST	LSASVGDRT	ITCSASSSIS	YMHWYQQKPG	KAPKLLIYTT	SNLASGVPAR
Amylpred 2		## ###	## ###		#####	#
DSSP		* *	* *		* *** *	
Αντικαταστάσεις		N N			R N	

	70	80	90	100	110	120
Daclizumab	FSGSGSGTEF	TLTISSLQPD	DFATYYCHQR	STYPLTFGQG	TKVEVKRTVA	APSVFIFPPS
Amylpred 2	# #####	#####				#####
DSSP	* * **	*				** *
Αντικαταστάσεις	N N NN	N				NN A

	130	140	150	160	170	180
Daclizumab	DEQLKSGTAS	VVCLLNNEYP	REAKVQWKVD	NALQSGNSQE	SVTEQDSKDS	TYSLSSTLTL
Amylpred 2	### #####					
DSSP	*	*				
Αντικαταστάσεις	N	N				

	190	200	210
Daclizumab	SKADYEKHKV	YACEVTHQGL	SSPVTKSFNR GE
Amylpred 2			
DSSP			
Αντικαταστάσεις			

	10	20	30	40	50	60
Daclizumab	OVQLVQSGAE	VKKPGSSVKV	SCKASGYTFT	SYRMEWVROA	PGQGLEWIGY	INPSTGYTEY
Amylpred 2			#####	#####	#####	#
DSSP			*** * ***		*	
Αντικαταστάσεις					D	

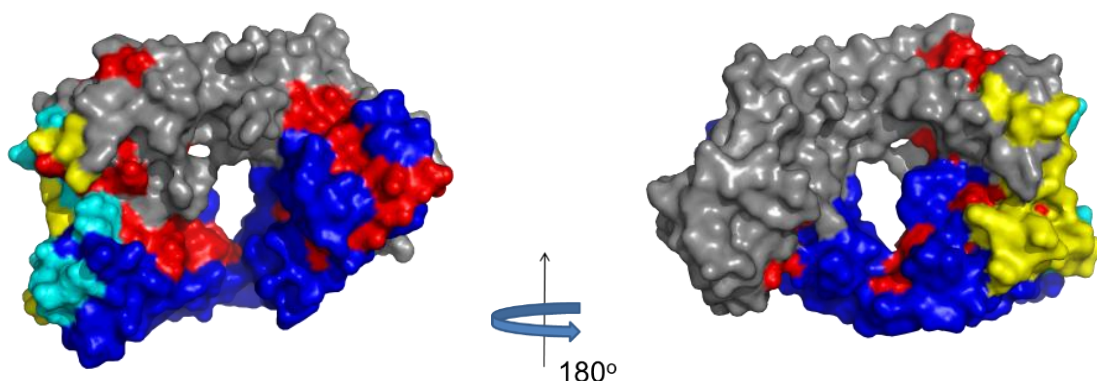
	70	80	90	100	110	120
Daclizumab	NQKFKDKATI	TADESTNTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARGG	GVFDYWGQGT	LVTVTSASTK
Amylpred 2				#####	#####	#####
DSSP				* *	*** * *	* *
Αντικαταστάσεις			N N		Q N N	

	130	140	150	160	170	180
Daclizumab	GPSVFPLAPS	SKSTSGCTAA	LGCLVKDYFP	EPVTVSWNSG	ALTSGVHTFP	AVLQSSGLYS
Amylpred 2			###			
DSSP						
Αντικαταστάσεις						

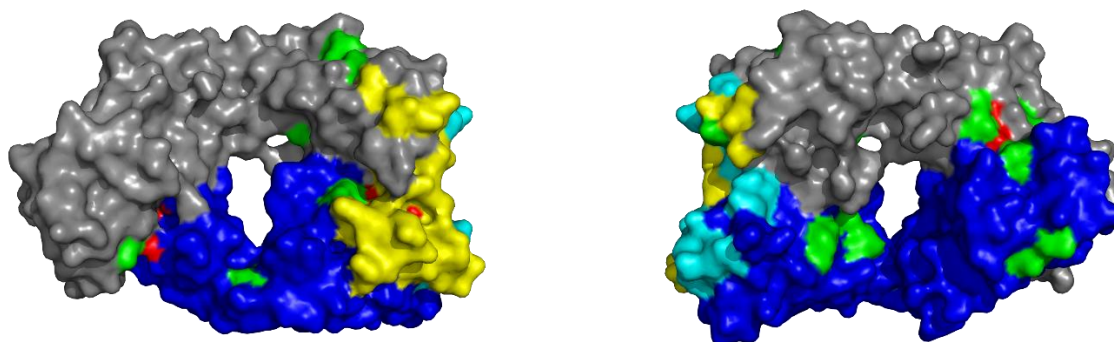
	190	200	210
Daclizumab	LSSVTVPS	SLGTQTYICN	VNHKPSNTKV DKKVEP
Amylpred 2	#####	#####	#
DSSP	*	*** *	
Αντικαταστάσεις	N	GNQN A	

Χωροπληρωτικά μοντέλα πριν και μετά τις αντικαταστάσεις

ΠΡΙΝ ΤΙΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ



ΜΕΤΑ ΤΙΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ



Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Daclizumab σε χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις πριν (μοντέλα πάνω σειρά) και μετά (μοντέλα κάτω σειρά) τις αντικαταστάσεις. Με ανοιχτό πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα που αντικαταστάθηκαν. Ακόμα, αφαιρέθηκε το κόκκινο χρώμα από τα κατάλοιπα που πλέον δεν προβλέπονται από το εργαλείο AMYLPRED2 να έχουν τάση για συσσωμάτωση μετά τις αντικαταστάσεις που έγιναν.

Πίνακας Αντικαταστάσεων

Ελαφριά αλυσίδα

T20N, T22N, K44R, T71N, T73N, S75N, S76N, T84N, S113N, F115N, I116A, T128N

Βαριά Αλυσίδα

E46D, T91N, V93:N, L111N, S115N, T186N, T194N, T196N, I198A

4.2.4 Canacinumab

Παρουσίαση ακολουθίας ελαφριάς και βαριάς αλυσίδας του Canacinumab σύμφωνα με τον χρωματικό κώδικα που αναφέρθηκε παραπάνω. Με (*) συμβολίζονται τα κατάλοιπα που είναι επιφανειακά σύμφωνα με τον αλγόριθμο DSSP.

	10	20	30	40	50	60
Canacinumab	EIVLTC	SPDF	QSVTPKEKVI	ITCRASQSIG	SSLHWYQQKP	DQSPKLLIKY ASQSFS
Amylpred 2	#####		## ###			###
DSSP	* **		* *			
Αντικαταστάσεις	D NNNQ		N N			

	70	80	90	100	110	120
Canacinumab	RFGSGSGTD	FTLTIN	SLEA	EDAAAY	CHQ	SSSLPFTFGP
Amylpred 2		#####		###		#####
DSSP		* *				*
Αντικαταστάσεις		N N				N

	130	140	150	160	170	180
Canacinumab	SDEQLKSGTA	SVVCLLNNEY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSLSTLT
Amylpred 2	##	#####				
DSSP	*	*				
Αντικαταστάσεις	N	N				

	190	200	210
Canacinumab	LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN
Amylpred 2			RGEC
DSSP			
Αντικαταστάσεις			

	10	20	30	40	50	60
Canacinumab	EVOLVESGGG	VVQPGRLRL	SCAA	SCFTFS	VYGMNWRQA	PGKLEWVAI
Amylpred 2			#####	#####		#####
DSSP			**		*	
Αντικαταστάσεις			NG		D	

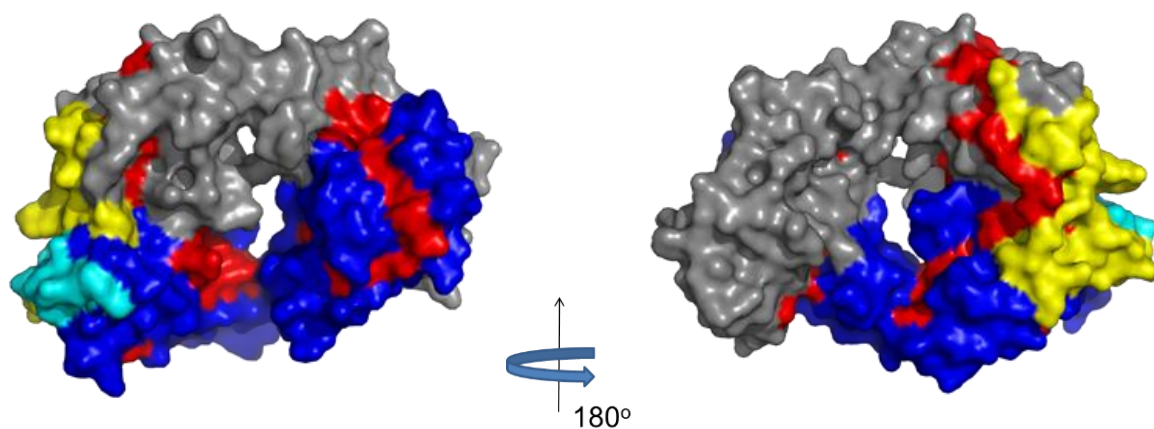
	70	80	90	100	110	120
Canacinumab	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNGLRAED	TAVYYCARDL	RTGPFYWGQ	GTLVTVS
Amylpred 2		## ##		#####		# #####
DSSP		* *		* *		* ** *
Αντικαταστάσεις		N Q		N N		Q NN N

	130	140	150	160	170	180
Canacinumab	TKGPSVFPLA	PSSKSTSGGT	AALGC	LVKDY	FPEPVTVSWN	SGALTSGVHT
Amylpred 2				###		
DSSP						
Αντικαταστάσεις						

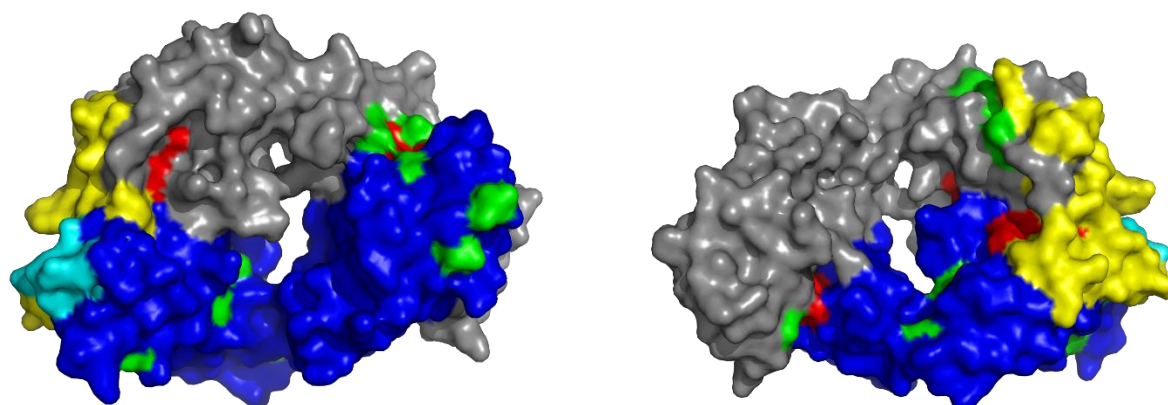
	190	200	210
Canacinumab	YSLSSVTVP	SSSLGTQTYI	CNVNHKPSNT
Amylpred 2	#####	#####	###
DSSP	*	*****	
Αντικαταστάσεις	N	GNQNN	

Χωροπληρωτικά μοντέλα πριν και μετά τις αντικαταστάσεις

ΠΡΙΝ ΤΙΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ



ΜΕΤΑ ΤΙΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ



Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Capacinumab σε χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις πριν (μοντέλα πάνω σειρά) και μετά (μοντέλα κάτω σειρά) τις αντικαταστάσεις. Με ανοιχτό πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα που αντικαταστάθηκαν. Ακόμα, αφαιρέθηκε το κόκκινο χρώμα από τα κατάλοιπα που πλέον δεν προβλέπονται από το εργαλείο AMYLPRED2 να έχουν τάση για συσσωμάτωση μετά τις αντικαταστάσεις που έγιναν.

Πίνακας Αντικαταστάσεων

Ελαφριά αλυσίδα

V3N, T5N, Q6Q, T20N, T22N, T72N, T74N, S114N, T129N, N138N

Βαριά Αλυσίδα

W46G, L78N, L80N, A91S, Y93N, G110G, V113N, V188N, G194G, T195N, Q196Q, T197N, Y198N

4.2.5 Basiliximab

Basiliximab	10	20	30	40	50	60
Basiliximab	QIVSTQSPAI	MSASPGEKVT	MTC SASSRS	YMQWYQQKPG	TSPKRWIYDT	SKLASGVPAR
Amylpred 2						
DSSP						
Αντικαταστάσεις						

Basiliximab	70	80	90	100	110	120
Basiliximab	FSGSGGTSY	SLTIS SMEAE	DAAT Y CHQR	SSYTFGGTK	LEIKRTVAAP	SVFIF PPSDE
Amylpred 2	#	#####	###			#####
DSSP		* * *	*			*
Αντικαταστάσεις		N N N	N			N

Basiliximab	130	140	150	160	170	180
Basiliximab	QLKSG TASVY	CLLNF YPRE	AKVQWKVDNA	LQSGNSQESV	TEQDSKDSTY	SLSS TL LSK
Amylpred 2	#####	#####				
DSSP	*	*				
Αντικαταστάσεις	N	N				

Basiliximab	190	200	210
Basiliximab	ADYE HKVYA	CEV THQ GLSS	PV TKS FNRGE
Amylpred 2			
DSSP			
Αντικαταστάσεις			

Basiliximab	10	20	30	40	50	60
Basiliximab	OLOQSGTVLA	RPGASV KMSC	KASGY S FTRY	WMHWIK QRP G	OGL EWIGAIY	PGNSD TSY NQ
Amylpred 2			####	####	####	
DSSP			***	*	*	
Αντικαταστάσεις					G	

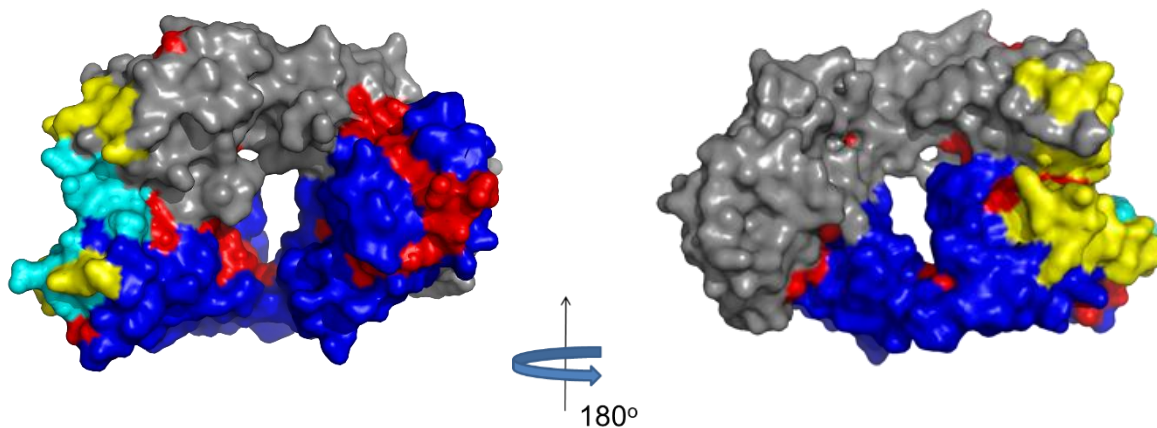
Basiliximab	70	80	90	100	110	120
Basiliximab	KFEGKA KT TA	VTSAS TAYME	LSSL THE DS A	VYYC S RD YGY	YDFE W Q Q CT T	LTVSS AST KG
Amylpred 2	##	##	##	####	###	#####
DSSP	**	**	*	*	*	*****
Αντικαταστάσεις	NS	NN		N		N

Basiliximab	130	140	150	160	170	180
Basiliximab	PSVF PLAPSS	KSTSG GTAAL	GCLV KDYF PE	PVTV SWNSGA	LTSG VH TF PA	VLQ SSGL YS T
Amylpred 2			###			#
DSSP						
Αντικαταστάσεις						

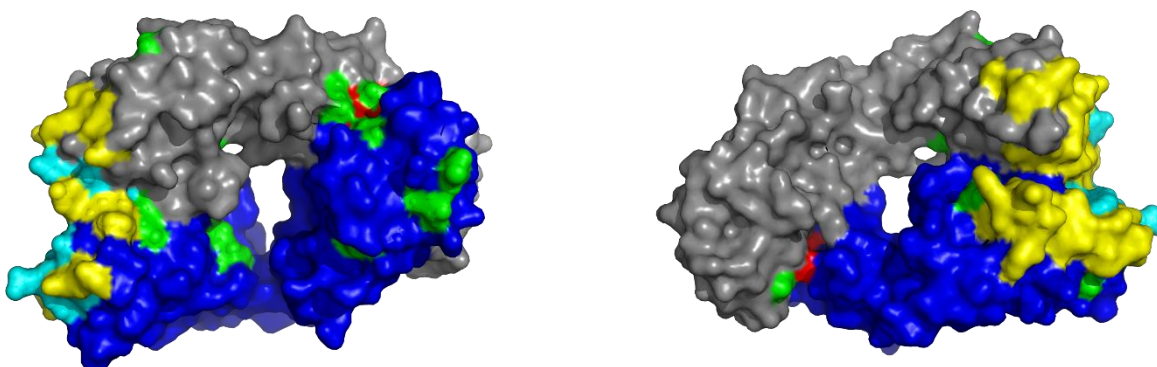
Basiliximab	190	200	210
Basiliximab	SSV TV P SSS	LGTQ TYIC NV	NHKPS NT KV D
Amylpred 2	#####	#####	
DSSP	*	****	* *
Αντικαταστάσεις	N	GNQN	A N

Χωροπληρωτικά μοντέλα πριν και μετά τις αντικαταστάσεις

ΠΡΙΝ ΤΙΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ



ΜΕΤΑ ΤΙΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ



Γραφική απεικόνιση του Fab θραύσματος του μονοκλωνικού αντισώματος Basiliximab σε χωροπληρωτικό μοντέλο σε δύο όψεις πριν (μοντέλα πάνω σειρά) και μετά (μοντέλα κάτω σειρά) τις αντικαταστάσεις. Με ανοιχτό πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα που αντικαταστάθηκαν. Ακόμα, αφαιρέθηκε το κόκκινο χρώμα από τα κατάλοιπα που πλέον δεν προβλέπονται από το εργαλείο AMYLPRED2 να έχουν τάση για συσσωμάτωση μετά τις αντικαταστάσεις που έγιναν.

Πίνακας Αντικαταστάσεων

Ελαφριά αλυσίδα

S71D, T73D, S75D, T84D, S111D, T126D, N135S

Βαριά Αλυσίδα

E44D, T69N, A70S, V71N, T72N, V91N, T110N, T185N, G192G, T193N, Q194Q, T195N, I197A, N199N

Στη συνέχεια παρουσιάζεται ο συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της μεθόδου ANTISOMA στα 5 μονοκλωνικά αντισώματα. Υπολογίζεται το εμβαδόν σε Å των περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση πριν και μετά τις αντικαταστάσεις. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρούμε μείωση των περιοχών αυτών της τάξης του 50% η και παραπάνω.

Πίνακας 4. Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της μεθόδου ANTISOMA

PDB ID	Εμβαδόν (Å) περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση	
	Πριν τις αντικαταστάσεις	Μετά τις αντικαταστάσεις
3EO9	1807	362
4X7S	1458	2170
5BVJ	1883	629
3IU3	1210	157
3NFS	2900	1211

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μετά από τη μελέτη της συμπεριφοράς του αλγορίθμου ANTISOMA στα 5 θεραπευτικά μονοκλωνικά αντισώματα καταλήγουμε στον εξής συγκεντρωτικό πίνακα αντικαταστάσεων. Στην αριστερή στήλη αναφέρονται όλες οι αντικαταστάσεις που πραγματοποιήθηκαν από τον αλγόριθμο ενώ στην αριστερή στήλη υπολογίζεται ο αριθμός των αντικαταστάσεων αυτών.

Αντικατάσταση	Αριθμός αντικαταστάσεων
T μετατροπή σε N	48
S μετατροπή σε N	20
K μετατροπή σε R	2
F μετατροπή σε N	3
W μετατροπή σε G	2
V μετατροπή σε N	9
Y μετατροπή σε N	3
L μετατροπή σε N	5
I μετατροπή σε A	7
A μετατροπή σε S	3
T μετατροπή σε N	48
S μετατροπή σε N	20
K μετατροπή σε R	2

Συνοψίζοντας, στα 5 θεραπευτικά μονοκλωνικά αντισώματα πραγματοποιήθηκαν **102** αντικαταστάσεις. Οι τρεις πιο χρησιμοποιούμενες και αποτελεσματικές αντικαταστάσεις ήταν οι: θρεονίνη σε ασπαρτικό, σερίνη σε ασπαρτικό, βαλίνη σε ασπαρτικό και γλουταμίνη σε ασπαραγίνη. Το ασπαρτικό αποτέλεσε κυρίως το κατάλοιπο που αντικαθιστούσε τα αρχικά λόγω του ότι είναι πολύ υδρόφοβο και αρνητικά φορτισμένο.

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.

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.

Ο υπολογιστικός αλγόριθμος ANTISOMA είναι ένας σχετικά γρήγορος και ακριβής αλγόριθμος που σχεδιάστηκε με σκοπό να μειώσει τις περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση στα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς. Ο αλγόριθμος που αναπτύχθηκε είναι ο μοναδικός που ειδικεύεται αποκλειστικά στα μονοκλωνικά αντισώματα και καταφέρνει να μειώσει αισθητά τις περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση. Ο αλγόριθμος χρησιμοποιεί την τρισδιάστατη δομή ενός μονοκλωνικού αντισώματος και αντικαθιστά κατάλοιπα επιρρεπή στη δημιουργία συσσωματωμάτων μετά από κατάλληλους υπολογισμούς. Σημαντική λειτουργία του αλγορίθμου είναι και η δημιουργία των νέων βελτιστοποιημένων μοντέλων μέσω ομόλογης προτυποποίησης.

Κατά τη σύγκριση του αλγορίθμου με τα αποτελέσματα των άλλων τριών μεθόδων, Solubis, AGGRESCAN3D και CamSol, έγινε εμφανής η εξειδίκευση του ANTISOMA στα μονοκλωνικά αντισώματα και το μεγάλο ποσοστό μείωσης των περιοχών με τάση προς συσσωμάτωση. Επίσης. Σε σύγκριση με τους άλλες μεθόδους ο ANTISOMA είναι από τους πιο φιλικούς προς τον χρήστη αλγόριθμος τόσο λόγω των ευανάγνωστων αποτελεσμάτων όσο και της ευκολίας χρήσης του.

Καθώς η συγκεκριμένη μελέτη είναι εξ'ολοκλήρου υπολογιστική, προτείνεται, τα αποτελέσματά της να πιστοποιηθούν πειραματικά, για να διασφαλιστεί 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.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

Agrawal, N. J., S. Kumar, X. Wang, B. Helk, S. K. Singh and B. L. Trout (2011). "Aggregation in protein-based biotherapeutics: computational studies and tools to identify aggregation-prone regions." J Pharm Sci **100**(12): 5081-5095.

Ashton-Rickardt, P. G. and S. Tonegawa (1994). "A differential-avidity model for T-cell selection." Immunol Today **15**(8): 362-366.

Atlani, M., R. K. Sharma and A. Gupta (2013). "Basiliximab induction in renal transplantation: long-term outcome." Saudi J Kidney Dis Transpl **24**(3): 473-479.

Barkhof, F. and O. Ciccarelli (2014). "Daclizumab in multiple sclerosis: a high-yield extension study." Lancet Neurol **13**(5): 443-444.

Benschop, R. J., D. Melamed, D. Nemazee and J. C. Cambier (1999). "Distinct signal thresholds for the unique antigen receptor-linked gene expression programs in mature and immature B cells." J Exp Med **190**(6): 749-756.

Bentley, G. A., G. Boulot and V. Chitarra (1994). "Cross-reactivity in antibody-antigen interactions." Res Immunol **145**(1): 45-48.

Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov and P. E. Bourne (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.

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

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

Burnet, F. M. (1969). "Life's complexities: misgivings about models." Australas Ann Med **18**(4): 363-367.

Carter, J. D. and F. B. Vasey (2001). "Psoriatic arthritis: genetics, immunology, and therapies." J Clin Rheumatol **7**(6): 363-365.

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

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

Chang, T. W., C. Chen, C. J. Lin, M. Metz, M. K. Church and M. Maurer (2015). "The potential pharmacologic mechanisms of omalizumab in patients with chronic spontaneous urticaria." J Allergy Clin Immunol **135**(2): 337-342.

- Chang, T. W., P. C. Wu, C. L. Hsu and A. F. Hung (2007). "Anti-IgE antibodies for the treatment of IgE-mediated allergic diseases." Adv Immunol **93**: 63-119.
- Chen, H., M. D. Eisner, T. Haselkorn and B. Trzaskoma (2013). "Concomitant asthma medications in moderate-to-severe allergic asthma treated with omalizumab." Respir Med **107**(1): 60-67.
- Chennamsetty, N., V. Voynov, V. Kayser, B. Helk and B. L. Trout (2010). "Prediction of aggregation prone regions of therapeutic proteins." J Phys Chem B **114**(19): 6614-6624.
- Cho, W. H., H. J. Lee, H. T. Kim, E. A. Hwang, S. Y. Han, S. B. Park and H. C. Kim (2008). "Basiliximab does not reduce the early rejection incidence in high-risk kidney recipients under tacrolimus-based immunosuppression." Transplant Proc **40**(7): 2234-2236.
- Cioffi, C. C., R. S. Pollenz, D. L. Middleton, M. R. Wilson, N. W. Miller, L. William Clem, G. W. Warr and D. A. Ross (2002). "Oct2 transcription factor of a teleost fish: activation domains and function from an enhancer." Arch Biochem Biophys **404**(1): 55-61.
- Cromwell, M. E., E. Hilario and F. Jacobson (2006). "Protein aggregation and bioprocessing." AAPS J **8**(3): E572-579.
- Davies, B., G. Burrows and B. Scoggins (1975). "Plasma nortriptyline and clinical response." Aust N Z J Psychiatry **9**(4): 249-253.
- Descamps, V. (2007). "[Efalizumab: raptiva]." Ann Dermatol Venereol **134**(12): 982-986.
- Du, J., H. Wang, C. Zhong, B. Peng, M. Zhang, B. Li, S. Huo, Y. Guo and J. Ding (2007). "Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody Rituximab." J Biol Chem **282**(20): 15073-15080.
- Engvall, E. and P. Perlmann (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G." Immunochemistry **8**(9): 871-874.
- Ferber, M., V. Zoete and O. Michielin (2012). "T-cell receptors binding orientation over peptide/MHC class I is driven by long-range interactions." PLoS One **7**(12): e51943.
- Foy, S. P. and L. Matsuuchi (2001). "Association of B lymphocyte antigen receptor polypeptides with multiple chaperone proteins." Immunol Lett **78**(3): 149-160.
- Germain, R. N. (1988). "Antigen processing and CD4+ T cell depletion in AIDS." Cell **54**(4): 441-444.
- Goldsby, A. R., et al. (2005). "Immunology." Macmillan Higher Education(5th edition).
- Goldsby, A. R., J. T. Kindt, A. B. Osborne and J. Kuby (2005). "Immunology." 5th edition Macmillan Higher Education.
- Gupta, A. K. and A. M. Cherman (2006). "Efalizumab in the treatment of psoriasis." J Cutan Med Surg **10**(2): 57-68.
- Harris, S. R. and U. P. Thorgeirsson (1998). "Tumor angiogenesis: biology and therapeutic prospects." In Vivo **12**(6): 563-570.

- Haste Andersen, P., M. Nielsen and O. Lund (2006). "Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures." Protein Sci **15**(11): 2558-2567.
- Hastings, J., G. Owen, A. Dekker, M. Ennis, N. Kale, V. Muthukrishnan, S. Turner, N. Swainston, P. Mendes and C. Steinbeck (2016). "ChEBI in 2016: Improved services and an expanding collection of metabolites." Nucleic Acids Res **44**(D1): D1214-1219.
- 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.
- Huber, S. A., G. Bigi and Z. J. Lucas (1980). "Cycling of immune responses to a syngeneic murine mammary adenocarcinoma." Cancer Res **40**(10): 3484-3490.
- Hwang, I. and S. Park (2008). "Computational design of protein therapeutics." Drug Discov Today Technol **5**(2-3): e43-48.
- Ivanciuc, O., C. H. Schein, T. Garcia, N. Oezguen, S. S. Negi and W. Braun (2009). "Structural analysis of linear and conformational epitopes of allergens." Regul Toxicol Pharmacol **54**(3 Suppl): S11-19.
- Jensen, R. K., M. Plum, L. Tjerrild, T. Jakob, E. Spillner and G. R. Andersen (2015). "Structure of the omalizumab Fab." Acta Crystallogr F Struct Biol Commun **71**(Pt 4): 419-426.
- Jones, M. D., N. J. Brand and A. R. Fersht (1986). "Single-stranded M13 DNA: use as a cloning vector." Nucleic Acids Res **14**(24): 10116.
- Kanehisa, M., S. Goto, Y. Sato, M. Furumichi and M. Tanabe (2012). "KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets." Nucleic Acids Res **40**(Database issue): D109-114.
- Kim, A. P. and D. E. Baker (2016). "Daclizumab." Hosp Pharm **51**(11): 928-939.
- Knox, C., V. Law, T. Jewison, P. Liu, S. Ly, A. Frolkis, A. Pon, K. Banco, C. Mak, V. Neveu, Y. Djoumbou, R. Eisner, A. C. Guo and D. S. Wishart (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.
- Kozsik, F., G. Stary, N. Selenko-Gebauer and G. Stingl (2010). "Efalizumab modulates T cell function both in vivo and in vitro." J Dermatol Sci **60**(3): 159-166.
- Krishnaswamy, G., O. Ajitawi and D. S. Chi (2006). "The human mast cell: an overview." Methods Mol Biol **315**: 13-34.
- Laskowski, R. A., D. S. Moss and J. M. Thornton (1993). "Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures." J Mol Biol **231**(4): 1049-1067.
- Leonardi, C. L. (2003). "Efalizumab: an overview." J Am Acad Dermatol **49**(2 Suppl): S98-104.
- 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, T. (2010). "Patient selection in non-small cell lung cancer: Histologic versus molecular subtypes?" J Thorac Dis **2**(4): 189-191.

Lin, K. L., L. Zhu, C. Fu, Z. B. Lin and G. Chen (2017). "[Comparison of clinical outcomes between antithymocyte globulin and basiliximab in renal transplantation from donation after citizen death: a matched pair study]." Zhonghua Yi Xue Za Zhi **97**(2): 99-103.

Mareeva, T., E. Martinez-Hackert and Y. Sykulev (2008). "How a T cell receptor-like antibody recognizes major histocompatibility complex-bound peptide." J Biol Chem **283**(43): 29053-29059.

Martin-Mateos, R. M., J. Graus, A. Albillos, C. Arocena, M. A. Rodriguez Gandia, C. Blesa, F. Garcia-Hoz, M. Garcia Gonzalez, F. J. Garcia-Alonso and R. Barcena (2012). "Initial immunosuppression with or without basiliximab: a comparative study." Transplant Proc **44**(9): 2570-2572.

Marwick, C. (2001). "Scientists recall progress and promise of translational research." J Natl Cancer Inst **93**(1): 13-15.

Mauri, C. and A. Bosma (2012). "Immune regulatory function of B cells." Annu Rev Immunol **30**: 221-241.

McDermott, E., S. Murphy, D. Keegan, D. O'Donoghue, H. Mulcahy and G. Doherty (2013). "Efficacy of Adalimumab as a long term maintenance therapy in ulcerative colitis." J Crohns Colitis **7**(2): 150-153.

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.

Middleton, B. (2002). "The future of medical computing." Stud Health Technol Inform **80**: 85-98.

Miller, J. F. (1993). "Self-nonself discrimination and tolerance in T and B lymphocytes." Immunol Res **12**(2): 115-130.

Minna, J. D., P. A. Bunn, Jr., D. N. Carney, M. H. Cohen, F. Cuttita, B. E. Fosieck, Jr., A. F. Gazdar, D. C. Ihde, A. Johnston-Early, M. J. Matthews, R. Makuch, H. Oie, S. Rosen, A. Lichter and E. Glatstein (1982). "Experience of the National Cancer Institute (USA) in the treatment and biology of small cell lung cancer." Bull Cancer **69**(1): 83-93.

Modjtahedi, H., S. Ali and S. Essapen (2012). "Therapeutic application of monoclonal antibodies in cancer: advances and challenges." Br Med Bull **104**: 41-59.

Mouzaki, M., J. Yap, V. Avinashi, A. Babu, A. Fu, M. Deangelis, K. Van Roestel, A. Ghanekar, B. Kamath, Y. Avitzur, A. Fecteau, N. Jones, S. Ling, D. Grant and V. Ng (2013). "Basiliximab with delayed introduction of calcineurin inhibitors as a renal-sparing protocol following liver transplantation in children with renal impairment." Pediatr Transplant **17**(8): 751-756.

- Nelson, P. N., G. M. Reynolds, E. E. Waldron, E. Ward, K. Giannopoulos and P. G. Murray (2000). "Monoclonal antibodies." Mol Pathol **53**(3): 111-117.
- Pancer, Z. and M. D. Cooper (2006). "The evolution of adaptive immunity." Annu Rev Immunol **24**: 497-518.
- Reinherz, E. L. and O. Acuto (2011). "Molecular T cell biology -- basic and translational challenges in the twenty-first century." Front Immunol **2**: 3.
- Roberts, C. J. (2014). "Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control." Trends Biotechnol **32**(7): 372-380.
- Rose, P. W., C. Bi, W. F. Bluhm, C. H. Christie, D. Dimitropoulos, S. Dutta, R. K. Green, D. S. Goodsell, A. Prlic, M. Quesada, G. B. Quinn, A. G. Ramos, J. D. Westbrook, J. Young, C. Zardecki, H. M. Berman and P. E. Bourne (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 and I. A. Wilson (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.
- Schroeder, T., R. Haas and G. Kobbe (2010). "Treatment of graft-versus-host disease with monoclonal antibodies and related fusion proteins." Expert Rev Hematol **3**(5): 633-651.
- Schulman, E. S. (2001). "Development of a monoclonal anti-immunoglobulin E antibody (omalizumab) for the treatment of allergic respiratory disorders." Am J Respir Crit Care Med **164**(8 Pt 2): S6-11.
- Secher, D. S. and D. C. Burke (1980). "A monoclonal antibody for large-scale purification of human leukocyte interferon." Nature **285**(5765): 446-450.
- Sheridan, J. P., R. R. Robinson and J. W. Rose (2014). "Daclizumab, an IL-2 modulating antibody for treatment of multiple sclerosis." Expert Rev Clin Pharmacol **7**(1): 9-19.
- Smith, J. B., L. Smith and G. R. Pettit (1985). "Bryostatins: potent, new mitogens that mimic phorbol ester tumor promoters." Biochem Biophys Res Commun **132**(3): 939-945.
- Sormanni, P., F. A. Aprile and M. Vendruscolo (2015). "The CamSol method of rational design of protein mutants with enhanced solubility." J Mol Biol **427**(2): 478-490.
- Sun, Z. J., X. Du, L. L. Su, X. D. Zhang and W. Wang (2015). "Efficacy and Safety of Basiliximab Versus Daclizumab in Kidney Transplantation: A Meta-Analysis." Transplant Proc **47**(8): 2439-2445.
- Talamonti, M., G. Spallone, A. Di Stefani, A. Costanzo and S. Chimenti (2011). "Efalizumab." Expert Opin Drug Saf **10**(2): 239-251.

Thorn, C. F., T. E. Klein and R. B. Altman (2013). "PharmGKB: the Pharmacogenomics Knowledge Base." Methods Mol Biol **1015**: 311-320.

Tong, X., S. Bogen, R. Chase, V. Girijavallabhan, Z. Guo, F. G. Njoroge, A. Prongay, A. Saksena, A. Skelton, E. Xia and R. Ralston (2008). "Characterization of resistance mutations against HCV ketoamide protease inhibitors." Antiviral Res **77**(3): 177-185.

Tsurushita, N., P. R. Hinton and S. Kumar (2005). "Design of humanized antibodies: from anti-Tac to Zenapax." Methods **36**(1): 69-83.

Van Durme, J., G. De Baets, R. Van Der Kant, M. Ramakers, A. Ganesan, H. Wilkinson, R. Gallardo, F. Rousseau and J. Schymkowitz (2016). "Solubis: a webserver to reduce protein aggregation through mutation." Protein Eng Des Sel **29**(8): 285-289.

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, X., T. K. Das, S. K. Singh and S. Kumar (2009). "Potential aggregation prone regions in biotherapeutics: A survey of commercial monoclonal antibodies." MAbs **1**(3): 254-267.

Wingren, C., T. E. Michaelsen, C. G. Magnusson and U. B. Hansson (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.

Yagudina, R., A. Kulikov and A. Pochuprina (2015). "Budget Impact Analysis of Canacinumab In The Treatment of Patients With Muckle-Wells Syndrome In The Russian Federation." Value Health **18**(7): A663.

Yagudina, R., A. Kulikov and A. Pochuprina (2015). "Cost-Effectiveness Analysis of Canacinumab In The Treatment of Patients Suffering From Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis In Russian Federation." Value Health **18**(7): A646.

Yin, H., T. Lan, H. Zhang, H. Jia, S. Chang and J. Yang (2012). "Theoretical evaluation of scattering effect on retroreflective free-space optical communication." J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis **29**(12): 2608-2611.

Zambrano, R., M. Jamroz, A. Szczasiuk, J. Pujols, S. Kmiecik and S. Ventura (2015). "AGGRESKAN3D (A3D): server for prediction of aggregation properties of protein structures." Nucleic Acids Res **43**(W1): W306-313.

Zhang, H., A. Berezov, Q. Wang, G. Zhang, J. Drebin, R. Murali and M. I. Greene (2007). "ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies." J Clin Invest **117**(8): 2051-2058.

Zhang, Y., M. McClellan, L. Efros, D. Shi, B. Bielekova, M. T. Tang, V. Vexler and J. P. Sheridan (2014). "Daclizumab reduces CD25 levels on T cells through monocyte-mediated trogocytosis." Mult Scler **20**(2): 156-164.

6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

6.1 ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ

Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικότερα οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν για σύγκριση των αποτελεσμάτων με το εργαλείο ANTISOMA. Φαίνονται οι σελίδες υποβολής των εργαλείων όπως και παραδείγματα υποβολής ερωτημάτων δίνοντας ως είσοδο το θεραπευτικό μονοκλωνικό αντίσωμα Efalizumab (pdbID: 3E09)

6.1.1 CamSol

CamSol Instinsic

Input sequence (20 standard amino acids):

Generate a .png plot of the profile:

Alternatively one can provide a [fasta file](#) of protein sequences. Δεν επιλέχθηκε κανένα αρχείο.

Input file:

Run older (published) version:

pH=

IMPORTANT: the next page might take a few minutes to load (especially if you are uploading a fasta file). Please do not hit Submit more than once.

Φόρμα υποβολής του αλγορίθμου CamSol Instinsic

1	Name	protein variant score	intrinsic solubility profile
2	3E09:H PDBID CHAIN SEQUENCE	-0.364918	
		-0.430112904699; -1.02095782054; -0.24184303704; -0.104394480751; -0.494716695087; 0.118866787194; 0.193882511076; 0.179577848989; 0.150391727506; -0.335711037677; -0.227106166845; -0.238642180283; -0.238642180283; -0.266030607887; -0.250572346911; 0.452534211675; 0.14531743943; 0.0304831158106; -0.519353449994; -0.699788066148; -0.85052704945; -0.495682979857; -0.569747799459; -0.696670840192; -0.70820685363; -0.839524867675; -0.913597510687; -0.733162894532; -0.850829397333; -1.5035196299; -1.32044444026; -1.19880547659; -1.1638809623; -1.52295718114; -1.12602739113; -1.02680206419; -0.540241785685; -0.0922228581847; -0.154403277681; 0.817275879852; 1.43478160433; 0.60867737953; 0.989562057333; 0.476584308131; -0.242671973383; -0.213485852968; -0.808373473148; -1.3444519632; -1.09066252801; -1.38846301272; -0.769621375829; 0.215255960867; 0.210824207298; 0.959412254274; 1.26094078138; 1.7339401386; 1.07089126947; 1.13750344253; 0.693962508613; 1.11728507443; 0.171896922939; 0.756352324266; 0.681688335557; 1.58269783416; 0.828172880969; 0.312319239666; -0.577586956586; -0.305173356683; -1.26300964748; -1.29219576256; -1.36955981642; -0.70598804907; 0.207446419412; 0.851503301771; 0.977243061895; 1.2032874906; 0.373596552898; -0.376422217753; -0.457157878781; -1.14825586148; -1.16371412032; -0.948131302194; -0.942824736205; -0.0280873920427; 0.216624469922; 0.606747592686; 1.33042390844; 1.03669290274; 0.913640335462; 0.736739358619; -0.114088466632; -0.496105789218; -1.47467948195; -2.03679036814; -1.3915827632; -1.16535017424; -1.06431171174; -1.06431171174; -1.20597103329; -1.19978268755; -1.04853419288; -1.69997124206; -1.97501260863; -1.96712408086; -2.08824929608; -1.05633497348; -1.027148852; -1.67061027638; -1.41610301721; -1.24814749644; -0.722956892749; -0.330571539975; -1.10936176126; -1.21944234935; -0.832795389382; -1.46691297479; -1.41928567745; -1.45821011849; -1.37906162905; -0.983495424537; -0.593502683743; -0.00570183325554; 0.652526027213; 0.785817967209; 0.785817967209; 0.337210844378; -0.309172256193; 0.00128757225645; -0.754960651181; -0.950853528312; -0.957313695325; -0.950853528312; -0.345277969393; 0.664094355352; 0.56017345007; 0.74689252167; 0.88402701129; 0.802255010514; 0.82268623268; 0.58810170276; 0.074463466947; 0.087504028026; 0.26748822	

Αρχείο αποτελεσμάτων του CamSol Intrinsic όπου φαίνεται η βαθμολογία του κάθε καταλόγου. Θετική βαθμολογία σημαίνει ότι το κατάλογο πιθανόν δεν δημιουργεί συσσωματώματα ενώ αρνητική το αντίθετο.

CamSol Structurally Corrected

* Input PDB file: Δεν επιλέχθηκε κανένα αρχείο.

Generate a colourful [UCSF Chimera model](#):

Generate a .png plot of the profiles:

Run older (published) version:

pH=

Patch radius (Å) =
[The distance below which residues feel each other in the 3D space, used in the calculation of the smoothing weight]

IMPORTANT: the next page might take a few minutes to load (it depends on your molecule size and number of models).
Please do not hit Submit more than once.

Φόρμα υποβολής του αλγορίθμου CamSol Structurally Corrected

Στη φόρμα υποβολής εισάγουμε το pdb αρχείο του μονοκλωνικού Efalizumab. Ο αλγόριθμος βγάζει σαν αποτέλεσμα ένα .zip αρχείο που αποτελείται από τα παρακάτω:

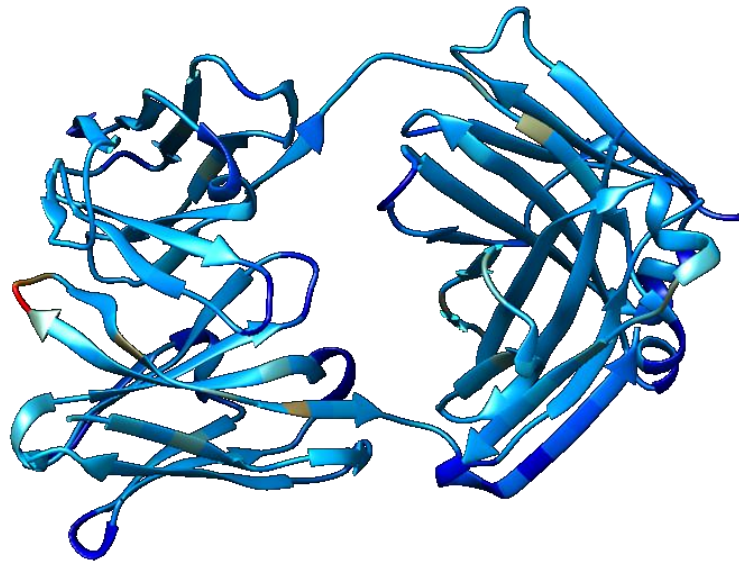
-ένα νέο pdb αρχείο με διορθωμένες τις στήλες occupancy και b-factor στο πεδίο ATOM σύμφωνα με τους υπολογισμούς του εργαλείου. Ο χρήστης μπορεί να χρησιμοποιήσει το νέο αρχείο ως είσοδο στο πρόγραμμα μοριακών γραφικών Chimera και να χρωματίσει διαφορετικά τα κατάλοιπα βάση του συντελεστή κατάληψης (occupancy) και του θερμοκρασιακού παράγοντα (b-factor) του.

-ένα .txt αρχείο (tab separated) με τα πραγματικά αριθμητικά αποτελέσματα και πρόσθετες πληροφορίες (όπως η έκθεση των καταλοίπων στο διαλύτη)

-ένα chimera.py αρχείο που μας δίνει απευθείας τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης χρωματισμένα με έναν συγκεκριμένο χρωματικό κώδικα. Το αρχείο ανοίγει μόνο με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών Chimera.



Χρωματικός κώδικας καταλοίπων της δομικά διορθωμένης πρωτεΐνης από τον αλγόριθμο CamSol Structurally Corrected. Θετικές τιμές αντιπροσωπεύουν διαλυτά κατάλοιπα ενώ αρνητικές το αντίθετο



Το μονοκλωνικό αντίσωμα Efalizumab (pdb ID:3EO9) με κατάλοιπα χρωματισμένα σύμφωνα με τις βαθμολογίες διαλυτότητας τους, όπως δόθηκαν από τον αλγόριθμο CamSol Structurally Corrected.

-ένα rnh αρχείο με γραφήματα των παλιών και των δομικά διορθωμένων προφίλ των βαθμολογιών του CamSol. Παρατηρείται ότι η βαθμολογία κάθε καταλοίπου της διορθωμένης δομικά πρωτεΐνης δεν έχει τόσες διακυμάνσεις και είναι πιο κοντά στο 0.

CamSol design

Τέσσερα βήματα εκτελούνται αυτόματα με τη μέθοδο:

We suggest you [clean your PDB file](#) before using it as input for the CamSol program.

Should your run fail (after trying with a [cleaned pdb file](#)) please report it to [Pietro Sormanni](#) (please include your input pdb file in your email).

* Wild-type PDB file: Δεν επιλέχθηκε αρχείο.

Residues that can't be changed:

* Allowed number of Changes:

IMPORTANT: the next page might take a few minutes to load (it depends on your molecule size and the allowed number of changes). Please do not hit Submit more than once.

Φόρμα

υποβολής του αλγορίθμου CamSol design.

- (1) υπολογισμός του εγγενούς προφίλ διαλυτότητας
- (2) υπολογισμός της διορθωμένης δομικά πρωτεΐνης έχοντας ως δεδομένο το προφίλ διαλυτότητας της
- (3) προσδιορισμός των κατάλληλων θέσεων μετάλλαξης
- (4) έλεγχος όλων των πιθανών μεταλλάξεων σε αυτές τις θέσεις για να προσδιοριστεί η πιο διαλυτή παραλλαγή.

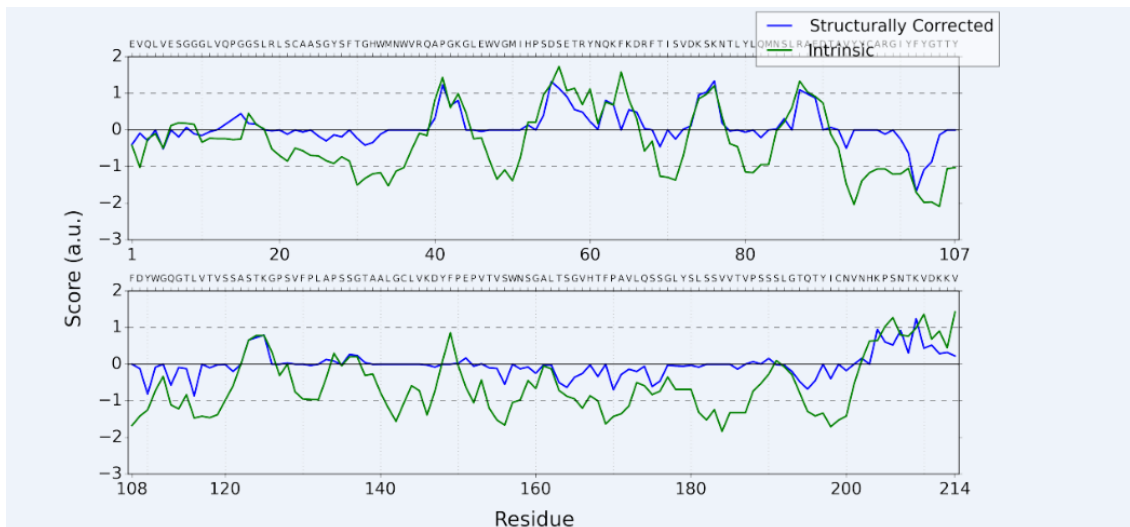
Ο αλγόριθμος βγάζει σαν αποτέλεσμα ένα .zip αρχείο που αποτελείται από τα παρακάτω:

- Ένα .text αρχείο που αποτελεί και το κύριο αρχείο των αποτελεσμάτων. Αυτό περιλαμβάνει ένα πίνακα τεσσάρων τουλάχιστον στηλών.
 - **Variant ID:** όλες οι αλλαγές που έγιναν στα κατάλοιπα πχ η μεταλλαγή H.F102E σημαίνει ότι στην 'H' αλυσίδα της πρωτεΐνης η φαινυλαλανίνη μεταλλάχθηκε σε γλουταμικό.
 - **Scenario:** ένα αναγνωριστικό μεταλλαγών που απεικονίζεται με έναν ακέραιο αριθμό. Εάν διαφορετικές μεταλλαγές έχουν τον ίδιο ακέραιο σαν scenario τότε οι αλλαγές θα έχουν εκτελεστεί στα ίδια κατάλοιπα.
 - **Nchanges:** συνολικές μεταλλάξεις
 - **CamSol overall score:** συνολική βαθμολογία διαλυτότητας της πρωτεΐνης
 - **ch:_ CamSol score:** για κάθε μια από τις αλυσίδες της πρωτεΐνης παρουσιάζεται η επιμέρους βαθμολογία διαλυτότητας. Στη θέση της κάτω παύλας “_” τοποθετείται το γράμμα που αντιστοιχεί στη κάθε αλυσίδα. Στην πρώτη γραμμή του αρχείου μετά τις επικεφαλίδες βλέπουμε τις βαθμολογίες της πρωτεΐνης πριν από οποιαδήποτε αλλαγή (WT=wild type protein). Αρνητικές βαθμολογίες σημαίνουν μικρή διαλυτότητα.

2	Variant ID	scenario	Nchanges	CamSol overall score	ch:H CamSol score	ch:L CamSol score
3	WT	WT	0	-0.575317	-0.773655	-0.376048
4						
5	H.F102E;L116E;T194E	0	3	-0.517186	-0.657664	-0.376048
6	H.F102E;L116E;T194R	0	3	-0.517236	-0.657764	-0.376048
7	H.F102R;L116E;T194E	0	3	-0.517496	-0.658283	-0.376048
8	H.F102R;L116E;T194R	0	3	-0.517546	-0.658382	-0.376048
9						

Αρχείο αποτελεσμάτων του CamSol design για το μονοκλωνικό αντίσωμα efalizumab με PDB ID 3E09. Η πιο αποτελεσματική μετάλλαξη είναι η “H.F102E;L116E;T194E” αφού έχει τη πιο υψηλή βαθμολογία διαλυτότητας.

- Ένα .pdb αρχείο της αρχικής πρωτεΐνης με διορθωμένα τα b-factor και το occupancy του κάθε καταλοίπου
- Ένα .txt αρχείο που το όνομα του αρχίζει με “log_CamSol” και αποτελεί το log αρχείο του εργαλείου. Παρότι δεν είναι φιλικό προς το χρήστη, δίνει διάφορες πληροφορίες, όπως οι μεταλλαγές που έγιναν στην πρωτεΐνη ή οι περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση



Αρχείο με γραφήματα των παλιών και των δομικά διορθωμένων προφίλ των βαθμολογιών του CamSol για την βαριά αλυσίδα του μονοκλωνικού αντισώματος Efalizumab (pdb ID:3E09).

6.1.2 AGGRESCAN3D


Το **input** του AGGRESCAN3D είναι:

-το **pdb αρχείο** μιας πρωτεϊνικής δομής, είτε απευθείας από τη βάση PDB είτε από τον υπολογιστή μας.

-Ένα **όνομα** για το project (προαιρετικό)

-**e-mail** (προαιρετικό)

Ο χρήστης μπορεί να επιλέξει να εργαστεί με **Dynamic mode**, αν θέλει να αντικαταστήσει κάποια κατάλοιπα με κάποια άλλα όπως και με τη **ανάλυση** θα τρέξει ο αλγόριθμος.



Aggrescan3D (A3D)
a server for prediction of aggregation propensity in protein structures and rational design of protein solubility. In dynamic mode, A3D takes into account the flexibility of natural and designed polypeptides.

[Learn more »](#)

Rafael Zambrano, Michal Jamroz, Agata Szczasiuk, Jordi Pujols, Sebastian Kmiecik, and Salvador Ventura, "AGGRESCAN3D (A3D): server for prediction of aggregation properties of protein structures", *Nucleic Acids Research*, 2015 43(W1) W306-W313, doi: 10.1093/nar/gkv359

Input structure

PDB code or **Local PDB file**

Options

Project name

E-mail address

Dynamic mode (max 400 residues) Yes No

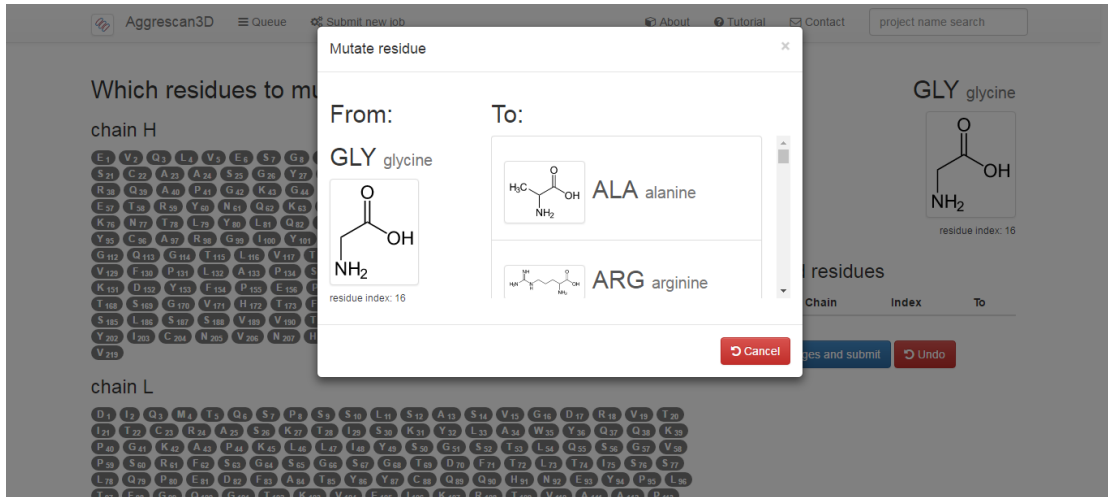
Mutate residues Yes No

Distance of aggregation analysis: 5Å 10Å

Do not show my job on the results page

αρχική σελίδα του server Aggrescan3D

H



Εκ των προτέρων αντικατάσταση καταλοίπων από το χρήστη στον αλγόριθμο AGGRESAN3D

Project details | Aggrescan3D plot | **Aggrescan3D score** | Structure

Minimal score value -4.2272
 Maximal score value 1.4385
 Average score -1.1911
 Total score value -116.7299

The table below lists A3D score for protein residues. Residues with A3D score = 0.0000 are considered as not influent for aggregation propensity and consequently omitted. Residues with A3D score > 0.0000 are marked by yellow rows.

Show chain Show residues from to

residue index	residue name	chain	Aggrescan3D score	mutation
0	M	A	1.2246	mutate
1	I	A	0.5611	mutate
2	Q	A	-0.8164	mutate
3	R	A	-1.4131	mutate
4	T	A	-0.9523	mutate
6	K	A	-1.8831	mutate
7	I	A	-1.0045	mutate
9	Q	A	1.0070	mutate

residue index residue name chain Aggrescan3D score mutation

Καρτέλα AGGRESAN3D του αλγορίθμου AGGRESAN3D του μονοκλωνικού αντισώματος Efalizumab (pdb ID:3EO9).

Project details | Aggrescan3D plot | Aggrescan3D score | Structure

Minimal score value -4.2272
Maximal score value 1.4385
Average score -1.1911
Total score value -116.7299

The table below lists A3D score for protein residues. Residues with A3D score > 0.0000 are marked as aggregation-prone and consequently omitted.

residue index	residue name	chain	Aggrescan3D score	mutation
17				mutate
18				mutate
19	K	A	-2.5214	mutate
20	S	A	-2.5488	mutate
21	N	A	-2.1367	mutate
22	F	A	-1.2781	mutate
26	Y	A	0.2390	mutate
54	L	A	0.2920	mutate

Μετάλλαξη καταλοίπων για τον αλγόριθμο AGGRESKAN3D του μονοκλωνικού αντισώματος Efalizumab (pdb ID:3E09).

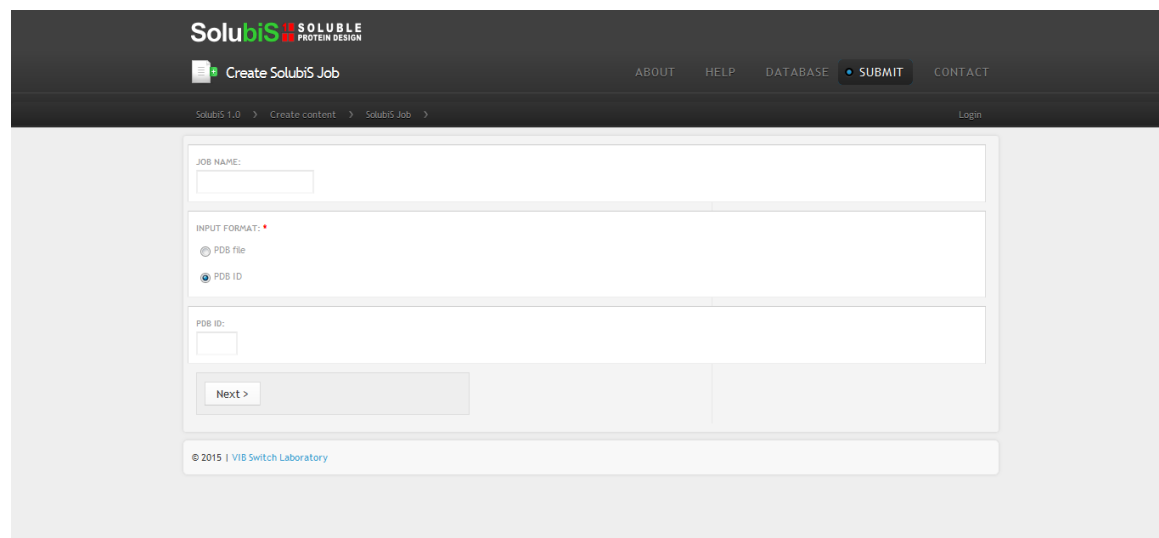


Line plot ως αποτέλεσμα του αλγόριθμου AGGRESKAN3D του μονοκλωνικού αντισώματος Efalizumab (pdb ID:3E09).

6.1.3 SOLUBIS

Βήμα 1^ο

Επιλογή του input: είτε ένα .pdb αρχείο είτε έναν κωδικό PDB.



The screenshot shows the 'Create SolubiS Job' page. At the top, there is a navigation bar with the SolubiS logo and the text 'SOLUBLE PROTEIN DESIGN'. Below the logo, there is a 'Create SolubiS Job' button. To the right of the logo, there are links for 'ABOUT', 'HELP', 'DATABASE', 'SUBMIT', and 'CONTACT'. Below the navigation bar, there is a breadcrumb trail: 'SolubiS 1.0 > Create content > SolubiS Job >'. On the right side of the page, there is a 'Login' link. The main content area contains a form with the following fields: 'JOB NAME:' with a text input field, 'INPUT FORMAT:' with two radio buttons ('PDB file' and 'PDB ID'), and 'PDB ID:' with a text input field. Below the form, there is a 'Next >' button. At the bottom of the page, there is a copyright notice: '© 2015 | VIB Switch Laboratory'.

Submit page της μεθόδου SolubiS

Βήμα 2^ο

Στο επόμενο βήμα επιλέγουμε την αλυσίδα της πρωτεΐνης με την οποία θέλουμε να εργασθούμε. Στη συνέχεια επιλέγουμε το threshold score του αλγορίθμου Tango. Εάν η βαθμολογία κάποιας περιοχής της πρωτεΐνης υπερβεί αυτό το κατώφλι, τότε αυτή η περιοχή θεωρείται περιοχή με τάση προς συσσωμάτωση. Ακολουθεί η επιλογή “Chain range” που εάν επιλεγεί τότε ο αλγόριθμος FoldX λαμβάνει υπόψιν στον υπολογισμό του μόνο την αλυσίδα που έχουμε επιλέξει. Παρόλα αυτά ανεξαρτήτως του εάν έχουμε επιλέξει το Chain range οι μεταλλάξεις θα αφορούν μόνο την αλυσίδα που αρχικά επιλέξαμε. Τελευταία επιλογή αποτελούν τα κατάλοιπα “gatekeepers”. Μπορούμε να επιλέξουμε να χρησιμοποιηθεί είτε ένα από αυτά είτε όλα.

SolubiS Job 1483353132 has been created.

PDB CHAIN: **L**

TANGO THRESHOLD: **5**

CHAIN RANGE:
 Only keep selected chain

GATEKEEPERS:
All gatekeepers
Asp
Glu
Arg

Submit Job

© 2015 | VIB Switch Laboratory

Submit page της μεθόδου SolubiS

Για κάθε μια μετάλλαξη δίνεται ο επιμέρους πίνακας που περιλαμβάνει:

- Average TANGO score: όσο πιο μεγάλη η βαθμολογία τόσο πιο υψηλή η τάση προς συσσωμάτωση
- Average sidechain and main chain burial: Τιμές από 0-1. Υψηλές τιμές υποδηλώνουν ότι η περιοχή βρίσκεται στον υδρόφοβο πυρήνα της πρωτεΐνης.
- Average energy for the zone: Αρνητικές τιμές υποδηλώνουν ότι η περιοχή συνεισφέρει στην θερμοδυναμική σταθερότητα της πρωτεΐνης.

6.2 Περιγραφή των βασικών αρχείων του αλγορίθμου ANTISOMA

Index.html

Η αρχική σελίδα του εργαλείου με την περιγραφή του

Submit.php

Η σελίδα υποβολής όπως επίσης και οι advanced επιλογές του εργαλείου

pdb1.php / php1-upload.php

Ο κεντρικός κώδικας του εργαλείου για σύνδεση με τη βάση pdb ή για το ανέβασμα pdb αρχείου. Υπολογίζονται τα CDRs, τα επιφανειακά κατάλοιπα, τα κατάλοιπα προς αντικατάσταση, η στοίχιση των ακολουθιών πριν και μετά τις αντικαταστάσεις και οι περιοχές με τάση προς συσσωμάτωση. Από αυτή τη σελίδα λαμβάνονται οι απαραίτητες πληροφορίες έτσι ώστε να εκτελεστεί σωστά το αρχείο modeller.php

modeller.php

Κώδικας που χρησιμοποιείται για την ομόλογη προτυποποίηση του μονοκλωνικού αντισώματος, την τρισδιάστατη απεικόνιση της πρωτεΐνης πριν και μετά τις αντικαταστάσεις όπως και για τον υπολογισμό του εμβαδού πριν και μετά τις αντικαταστάσεις

manual.html

Το εγχειρίδιο χρήσης του εργαλείου

Submit.html

Πληροφορίες επικοινωνίας

Φάκελος style

Αρχεία css και εικόνες εφαρμογής

6.3 Abstract εργασίας στο επιστημονικό συνέδριο HSCBB16

Proceedings of the Joint Conference of the Hellenic Crystallographic Association and the Hellenic Society for Computational Biology and Bioinformatics (HECRA-HSCBB16)
Agricultural University of Athens, Athens, Greece, 07-09 October 2016

ANTISOMA: Optimizing the aggregation propensity of monoclonal antibodies

Eleftheria G. Karataraki, Katerina C. Nastou, Paraskevi L. Tsiolaki, Anna-Isabella G. Rerra, Vassiliki P. Grimaneli, Nikos C. Papandreou, Vassiliki A. Iconomidou, Stavros J. Hamodrakas*

Section of Cell Biology and Biophysics, Department of Biology, School of Sciences, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis, Athens, 15701, Greece

*Correspondence to: shamodr@biol.uoa.gr

Abstract—Monoclonal antibodies (mAbs) represent the most promising and rapidly growing class of therapeutic compounds, as efficient implements for treating a wide variety of human chronic and acute diseases. Despite their benefits, human-derived mAbs or murine-derived mAbs do have deficiencies, such as short *in vivo* lifespan and low stability. A major drawback in the exploitation of antibodies is their tendency to form aggregates, a process by which protein molecules assemble into stable and often insoluble complexes. ANTISOMA optimizes a mAb's aggregation tendency. Rational design of mAbs, in combination with additional experimental approaches, will enable improvements in the efficacy and safety of protein therapeutics.

Availability: <http://bioinformatics.biol.uoa.gr/ANTISOMA>

I. INTRODUCTION

Monoclonal antibodies are mono specific antibodies made by identical immune cells. They are used as treatment for autoimmune, cardiovascular and infectious diseases and cancer amongst others, since they can be produced with the ability to specifically bind to almost any substance [1]. Antibodies have a well-characterized conformation. Each antibody is a tetramer which contains two identical pairs of polypeptide chains, the heavy and the light chain, respectively [2]. Both heavy and light chains in mAbs have a variable domain, where Complementarity Determining Regions (CDRs) are key features of recognition and interaction between antibodies and antigens [3][4].

Despite their therapeutic aspects, studies based on clinical data highlighted a major drawback of monoclonal antibodies; high concentration of mAbs results into toxic aggregates and is usually associated with unpleasant side effects and immunogenic response [5]. Hence, our aim was to design and develop an automatic computational method, for optimizing the aggregation propensity of monoclonal antibodies.

II. METHODS

A wide variety of computational tools are available for predicting "aggregation-prone" regions in monoclonal antibodies [6]. Firstly, AMYLPRED2 [8], a consensus method, developed in our lab, is used for the prediction of "aggregation-prone" peptides on amino acid sequences for both light and heavy chains of candidate mAbs.

Secondly, critical substitutions on exposed amino acids, located in "aggregation-prone" regions (APRs) are applied, in order to reduce or even eliminate aggregation potency of mAbs. Candidate residues for substitution should not belong to Complementarity Determining Regions (CDRs), and should be accessible to the solvent, based on the results produced by the DSSP algorithm [9]. Each one of these "hotspot" residues, is substituted, utilizing additional experimental aggregation propensities of amino acids [10], combined with a substitution table published by Rerra et al. [11].

Finally, Modeller, a program for Comparative Protein Structure Modelling [12], is used for the creation of a new three-dimensional model, using the optimized/mutated sequences. A JSmol applet is integrated for the visualization of these structures.

A web interface for our method, ANTISOMA, was build based on HTML, CSS, PHP and Javascript, and is available at <http://bioinformatics.biol.uoa.gr/ANTISOMA>.

III. RESULTS AND DISCUSSION

ANTISOMA is a novel, publicly available user-friendly method for optimizing the aggregation tendency of mAbs. Our method uses information from three-dimensional structures of mAbs and minimizes the "aggregation-prone" surface of a given mAb, utilizing a substitution table [11]. A new optimized model of the antibody is provided and all the files produced by the method are available for download.

Further analysis for the evaluation of our method was performed on five (5) therapeutic monoclonal antibodies, derived from the Protein Data Bank [13]. Table I presents a comparison between the "aggregation-prone" surface before and after substitutions, calculated by ANTISOMA.

ANTISOMA performed efficiently during optimization. In particular, a decrease in the “aggregation-prone” surface was observed for all mAbs, which indicates that targeted substitutions may identically modify the aggregation profile on exposed surfaces of mAbs.

TABLE I. Comparison of the area of “aggregation-prone” regions before and after substitutions

PDB ID	ESTIMATED SURFACE (Å ²)	
	Before substitutions	After substitutions
4X7S	1779	405
3EO9	2739	1160
3IU3	1414	340
3NFS	3104	1210
5BVJ	1883	590

IV. CONCLUSIONS

ANTISOMA is an automatic computational method designed to optimize the aggregation propensity of therapeutic monoclonal antibodies. Our method is the first to specialize entirely in monoclonal antibodies. Since monoclonal antibodies are rapidly entering the pharmaceutical industry, the combination of computational methods together with targeted experiments can be applied on novel and existing bio-therapeutics with promising results. It is our hope that ANTISOMA will assist towards the achievement of this goal.

REFERENCES

- [1] Kohler, G. & Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*. **256**, 495-7.
- [2] Hansel, T. T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J. A. & George, A. J. (2010) The safety and side effects of monoclonal antibodies, *Nat Rev Drug Discov*. **9**, 325-38
- [3] Wu, T. T. & Kabat, E. A. (1970) An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity, *J Exp Med*. **132**, 211-50.
- [4] Bork, P., Holm, L. & Sander, C. (1994) The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core, *J Mol Biol*. **242**, 309-20.
- [5] Rosenberg, A. S. (2006) Effects of protein aggregates: an immunologic perspective, *AAPS J*. **8**, E501-7.
- [6] Hwang, I. & Park, S. (2008) Computational design of protein therapeutics, *Drug Discov Today Technol*. **5**, e43-8.
- [7] Chennamsetty, N., Helk, B., Voynov, V., Kayser, V. & Trout, B. L. (2009) Aggregation-prone motifs in human immunoglobulin G, *J Mol Biol*. **391**, 404-13.
- [8] 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**, e54175M.
- [9] Kabsch, W. & Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features, *Biopolymers*. **22**, 2577-637.
- [10] Rerra A.G., Grimanelli P.V., Papandreou N.C. & Hamodrakas S.J. (2016) Optimizing the aggregation propensity of therapeutic monoclonal antibodies against cancer and autoimmune diseases: a Computational Study, *International Journal of Biochemistry Research & Review*. **10**(1): 1-15
- [11] Sanchez de Groot, N., Pallares, I., Aviles, F. X., Vendrell, J. & Ventura, S. (2005) Prediction of “hot spots” of aggregation in disease-linked polypeptides, *BMC Structural Biology*. **5**, 18.
- [12] Webb & Sali (2014), *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley & Sons, 5.6:1-32
- [13] Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000) The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res*. **28**, 235-42.

6.4 Poster στο επιστημονικό συνέδριο HSCBB16

Optimizing the Aggregation Propensity of Monoclonal Antibodies

Eleftheria G. Karataraki, Katerina C. Nastou, Paraskevi L. Tsiolaki, Anna-Isabella G. Rerra, Vassiliki P. Grimanelli, Nikos C. Papandreou, Vassiliki A. Iconomidou, Stavros J. Hamodrakas

Section of Cell Biology and Biophysics, Department of Biology, School of Sciences, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis, Athens, Greece

Introduction

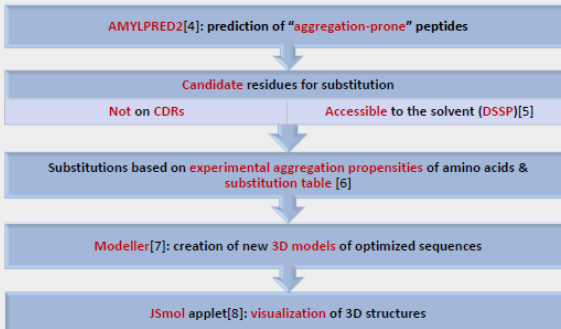
Monoclonal antibodies are mono specific antibodies made by identical immune cells. They are used as treatment for **autoimmune**, **cardiovascular** and **infectious diseases** and **cancer** amongst others, since they can be produced with the ability to specifically bind to almost any substance [1].

Each antibody is a **tetramer** with two identical pairs of polypeptide chains, the **heavy** and the **light** chain. Both these chains have a variable domain, where **Complementarity Determining Regions (CDRs)** are key features of recognition and interaction between antibodies and antigens [2].

Despite their *therapeutic aspects*, studies based on clinical data highlighted a major **drawback** of monoclonal antibodies; **high concentration of mAbs results into toxic aggregates** and is usually associated with **unpleasant effects** and immunogenic response [3].

AIM: design and development of an automatic computational method for optimizing the aggregation propensity of monoclonal antibodies

Methods



A web interface for our method, **ANTISOMA**, was built based on HTML, CSS, PHP and Javascript, and is available at <http://bioinformatics.biol.uoa.gr/ANTISOMA>

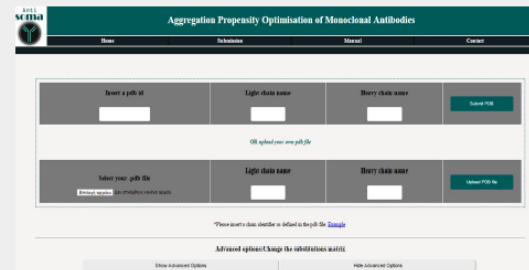
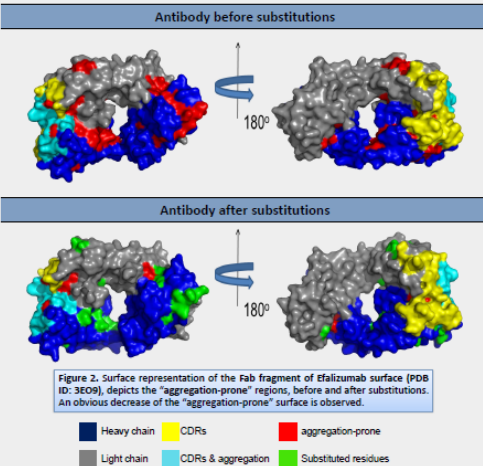


Figure 1. Submission page of the ANTISOMA web server. The user can submit either a PDB ID or a PDB file and define the name of the heavy and the light chain.

Results and Discussion



Our method **reduces the "aggregation-prone" surface** of a given mAb, utilizing a substitution table. A new **optimized model** of the antibody is provided and all the files produced by the method are available for download.

Further analysis for the evaluation of our method was performed on five (5) therapeutic monoclonal antibodies, derived from the Protein Data Bank. Table I presents a comparison between the "aggregation-prone" surface before and after substitutions, calculated by **ANTISOMA**.

PDB ID	Estimated surface area (Å ²)		% decrease in aggregation surface
	Before substitutions	After substitutions	
4X7S	1779	405	77%
3E09	2739	1160	57%
3IU3	1414	340	75%
3NFS	3104	1210	61%
5BVJ	1883	590	70%

Table I. Comparison of "aggregation-prone" regions before and after substitutions. The aggregation propensity is clearly decreased, since in almost every mAb the decrease rate is more than 60%.

4X7S: Omalizumab (allergies)
 3E09: Efalizumab (psoriasis)
 3IU3: Dacizumab (transplant rejection)
 3NFS: Canacizumab (autoinflammatory syndromes)
 5BVJ: Basiliximab (transplant rejection)

Conclusions

ANTISOMA is an automatic computational method designed to **optimize the aggregation propensity of therapeutic monoclonal antibodies**. Our method is the first to specialize entirely in monoclonal antibodies. Since monoclonal antibodies are rapidly entering the pharmaceutical industry, the combination of computational methods together with targeted experiments can be applied on novel and existing bio-therapeutics with promising results. It is our hope that **ANTISOMA** will assist towards the achievement of this goal.

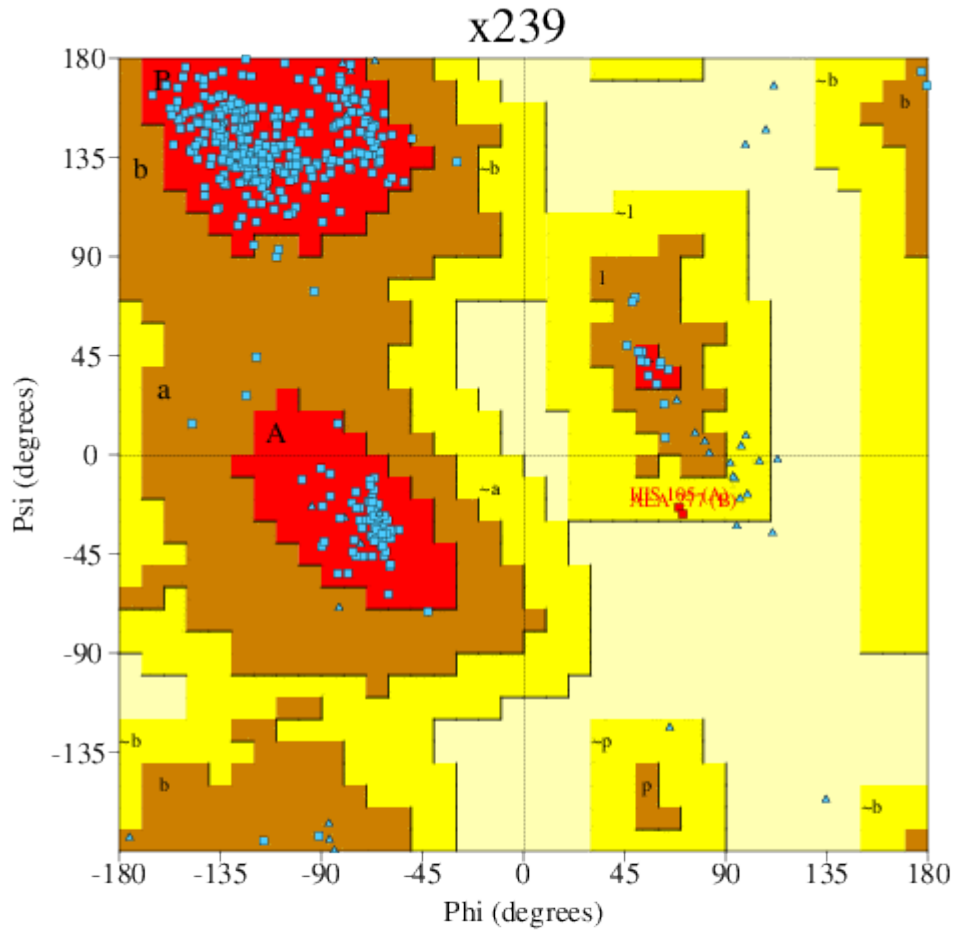
References

- [1] Kohler, G. & Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256, 495-7
- [2] Bork, P., Holm, L. & Sander, C. (1994) The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J Mol Biol*. 242, 309-20
- [3] Rosenberg, A. S. (2006) Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J*. 8, E501-7
- [4] Tsiolis, 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, e54173M
- [5] Kabsch, W. & Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*. 22, 2577-837
- [6] Rerra A.G., Grimanelli P.V., Papandreou N.C. & Hamodrakas S.J. (2016) Optimizing the aggregation propensity of therapeutic monoclonal antibodies against cancer and autoimmune diseases: a Computational Study. *International Journal of Biochemistry Research & Review*. 10(1): 1-15
- [7] Sanohez de Groot, N., Pallares, I., Aviles, F. X., Vendrell, J. & Ventura, S. (2005) Prediction of "hot spots" of aggregation in disease-linked polypeptides. *BMC Structural Biology*. 5, 18
- [8] Webb & Sali (2014). *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley & Sons, 5.6:1-32

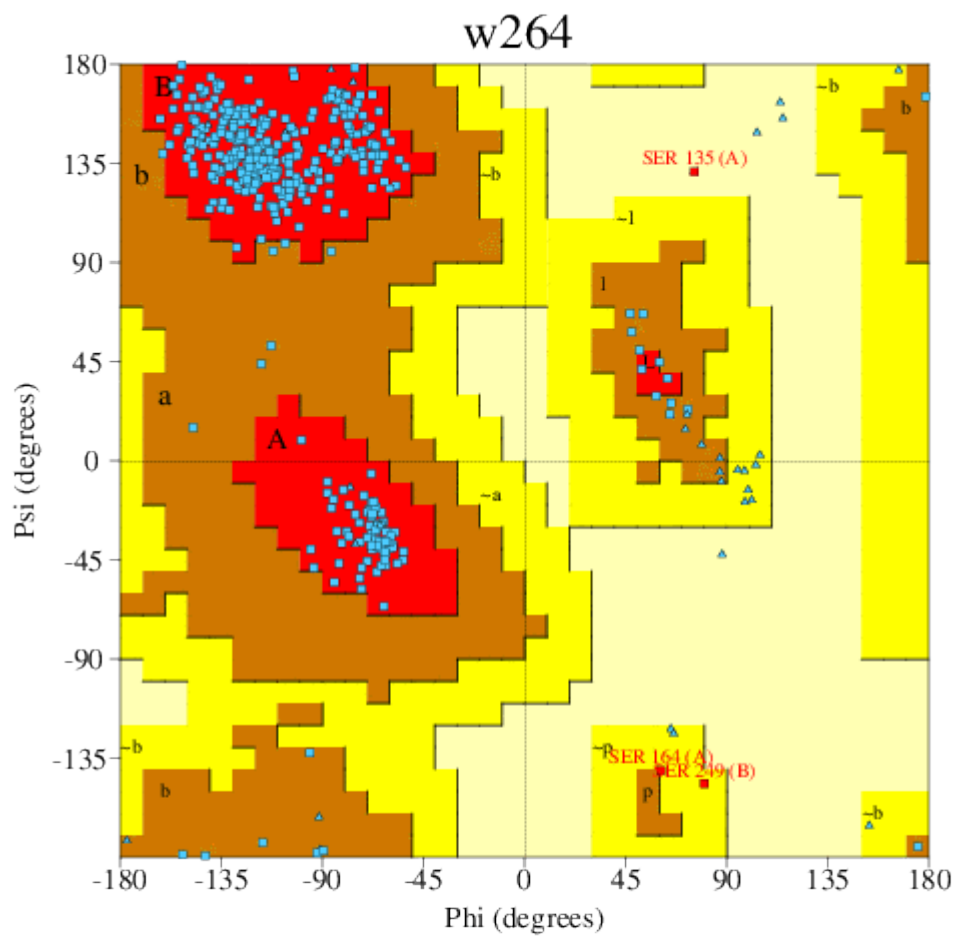
Joint Conference of the Hellenic Crystallographic Association and the Hellenic Society for Computational Biology and Bioinformatics (HECRA-HSCBB16)
 Agricultural University of Athens, Athens, Greece, 07-09 October 2016

6.5 Ramachandran Plots Νέων Μοντέλων

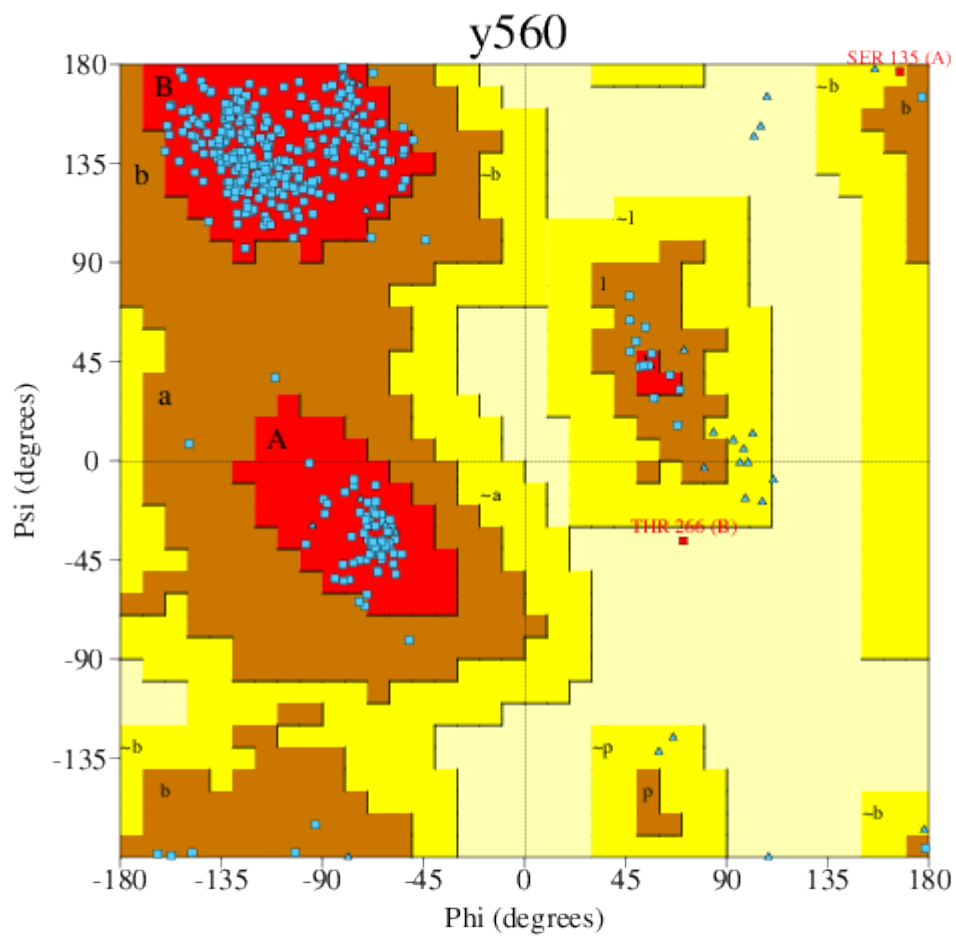
6.5.1 Omalizumab



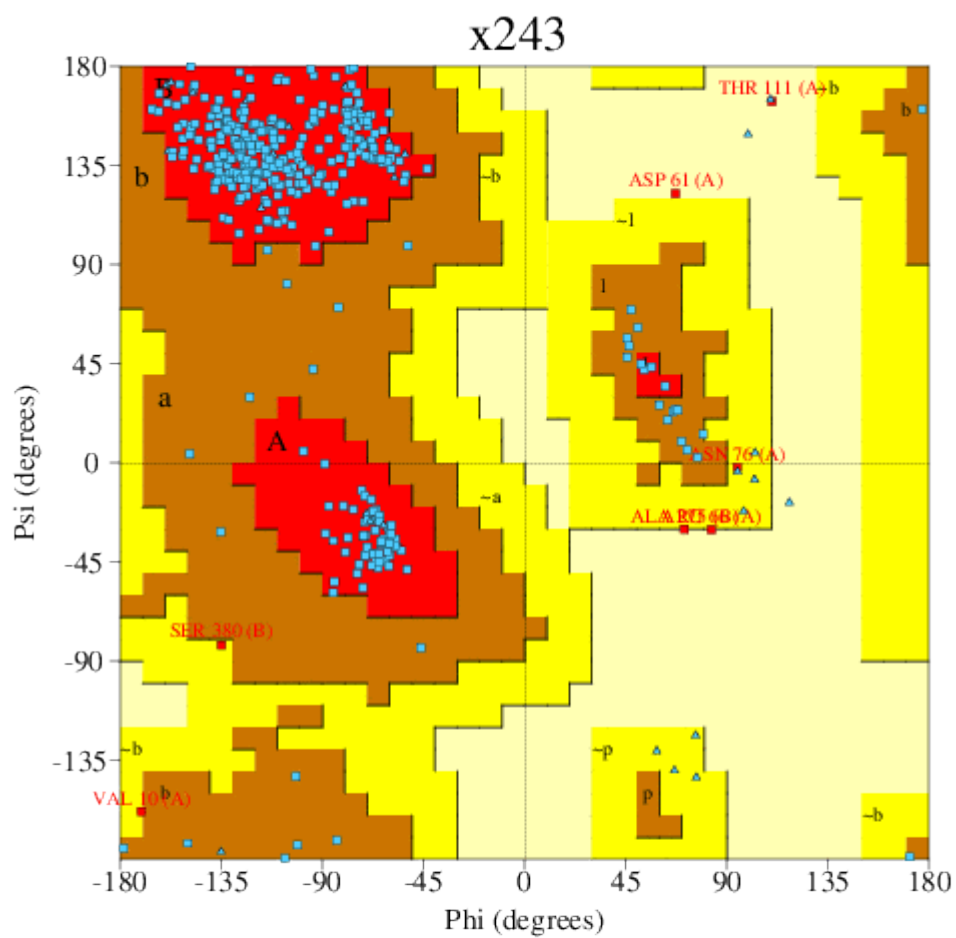
6.5.2 Efalizumab



6.5.3 Daclizumab



6.5.4 Canacinumab



6.5.5 Basiliximab

