Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

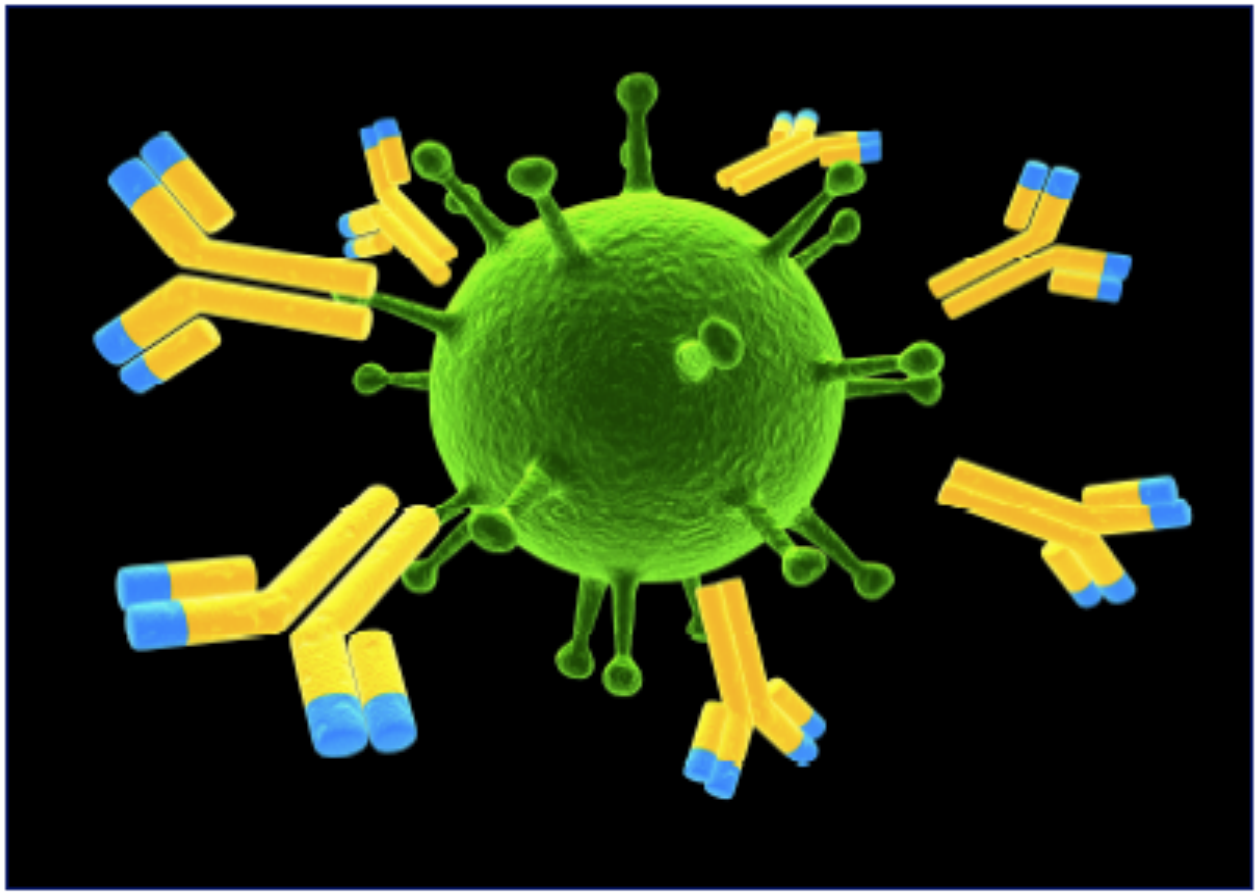
AA 2019-2020

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Lezione 8

Produzione di anticorpi per applicazioni biomediche

TECNICHE IMMUNOCHIMICHE



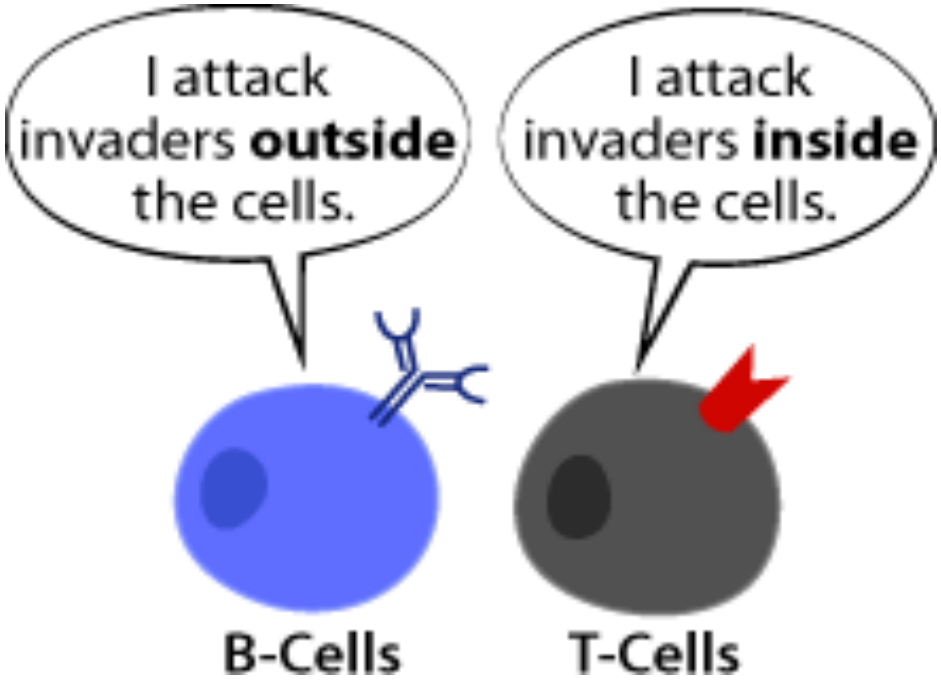
TECNICHE BASATE SULL'INTERAZIONE ANTIGENE-ANTICORPO

Produzione di anticorpi: il sistema immunitario

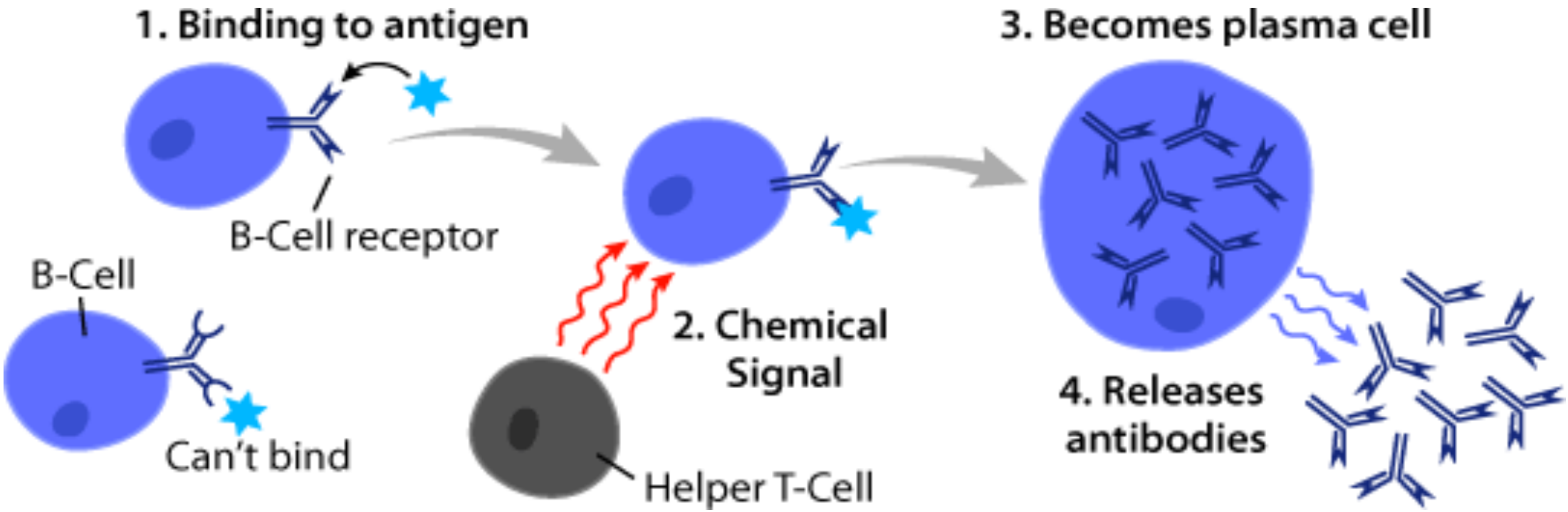
Il sistema immunitario distingue ciò che è proprio (self) da ciò che è estraneo all'organismo (non- self).

Qualsiasi molecola capace di indurre una risposta immunitaria è detta antigene.

La risposta immunitaria umorale è mediata dagli anticorpi (immunoglobuline, IG), glicoproteine prodotte dai linfociti B in grado di riconoscere antigeni specifici.

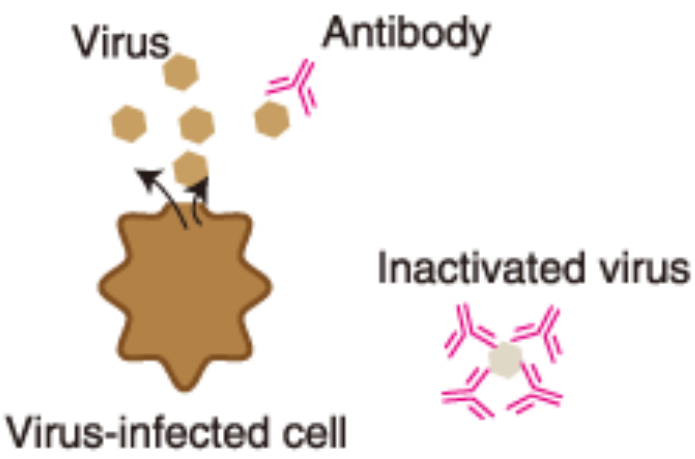


Produzione di anticorpi: il sistema immunitario



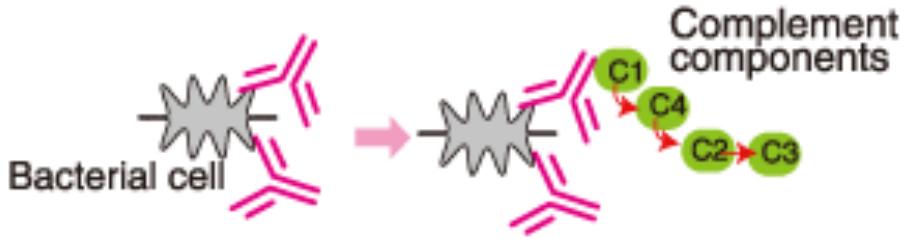
FUNZIONI DEGLI ANTICORPI

Neutralization



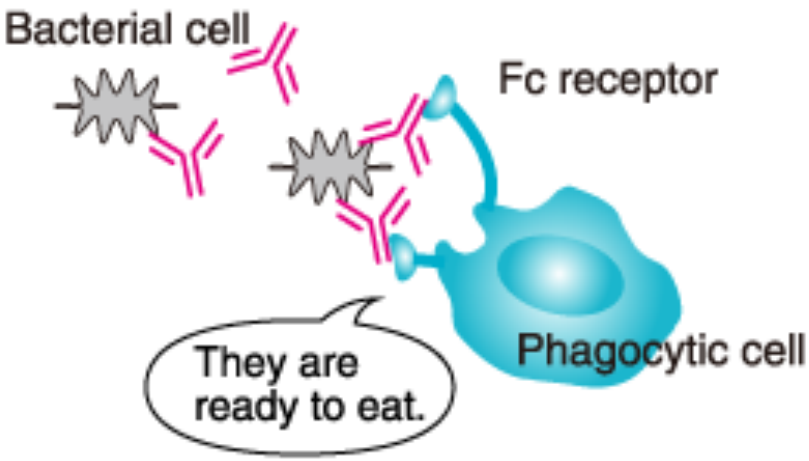
Antibodies bind to and inactivate viruses and toxins.
These antibodies are called "neutralizing antibodies."

Complement recruitment by antibodies



Antigen-antibody complexes activate the complement system (the classical pathway), triggering its antibacterial activity.

Opsonization

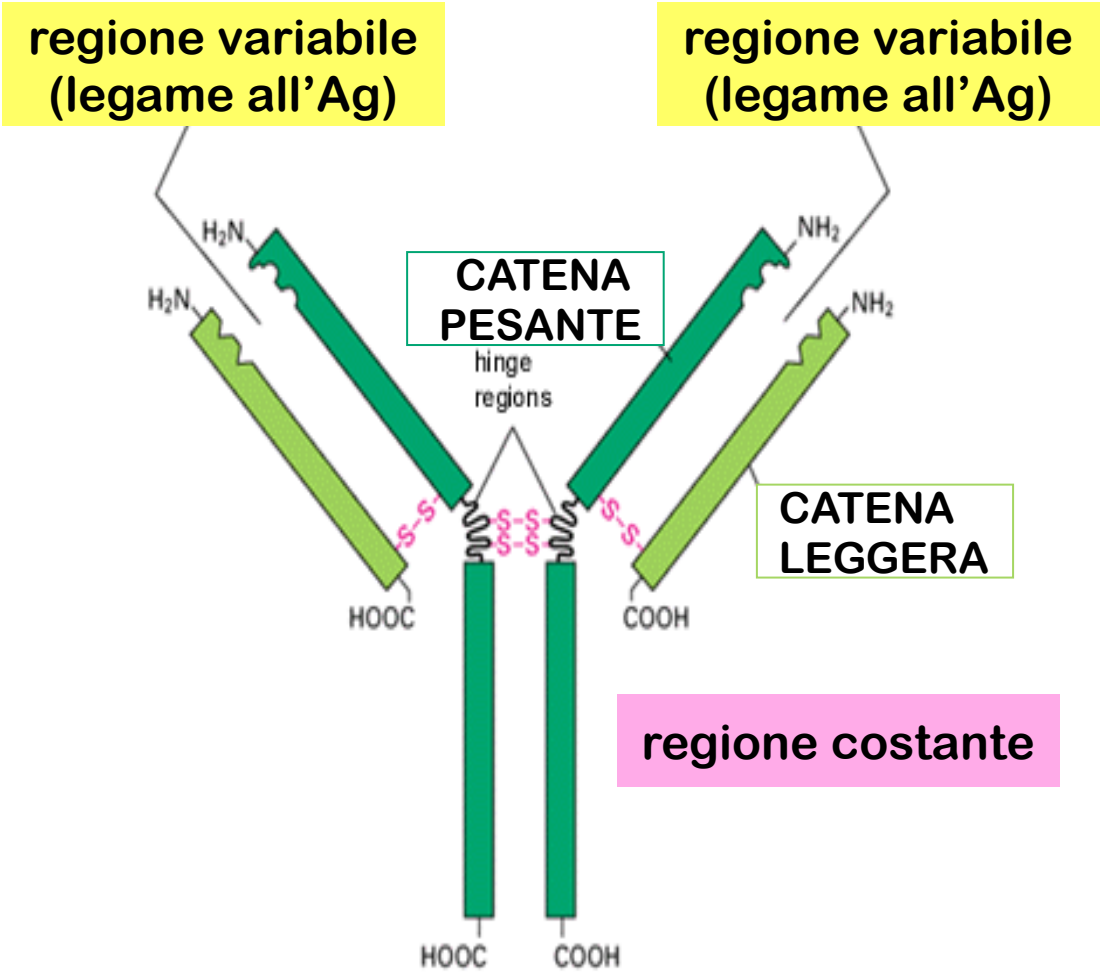


Phagocytic cells grab the antibodies bound to the surface of foreign substances, for efficient phagocytosis.

STRUTTURA degli ANTICORPI

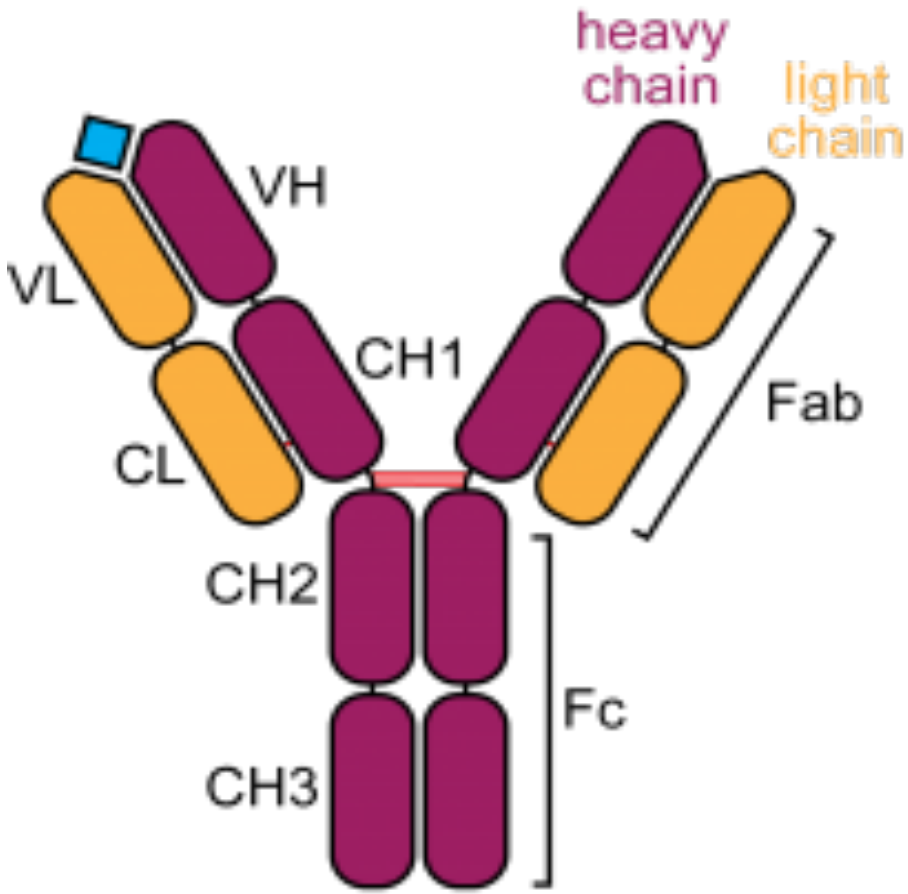
Gli anticorpi sono GLICOPROTEINE TETRAMERICHE
composte da 2 catene leggere e
2 catene pesanti uguali

- Sono in grado di riconoscere in modo estremamente specifico una determinata molecola (antigene)
- La specificità del legame antigene/anticorpo è determinata dalla regione VARIABILE dell'anticorpo
- La regione COSTANTE svolge funzioni strutturali



La regione costante definisce la CLASSE ANTICORPALE E LA FUNZIONE EFFETTRICE

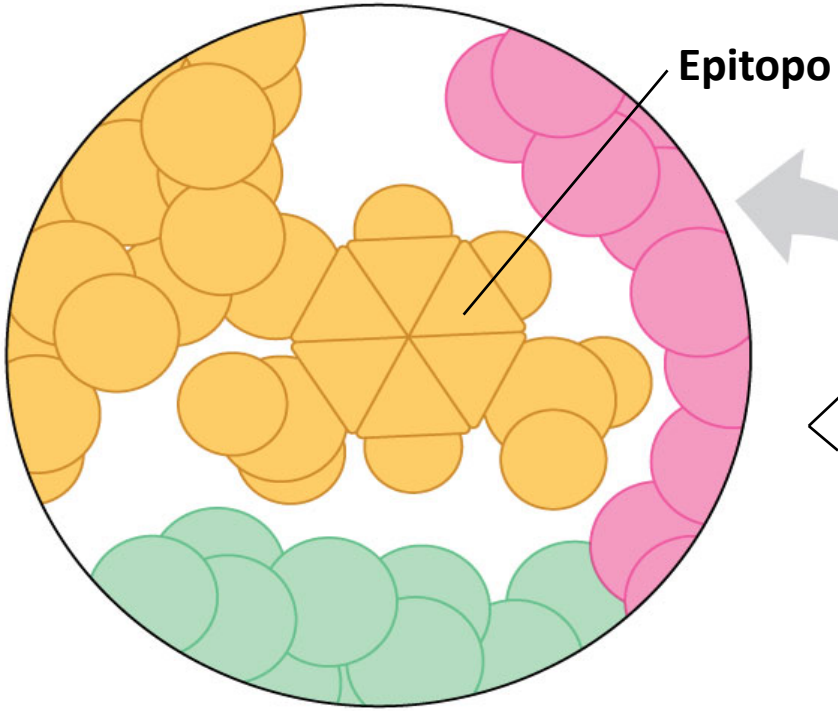
GLI ANTICORPI HANNO UNA STRUTTURA MODULARE



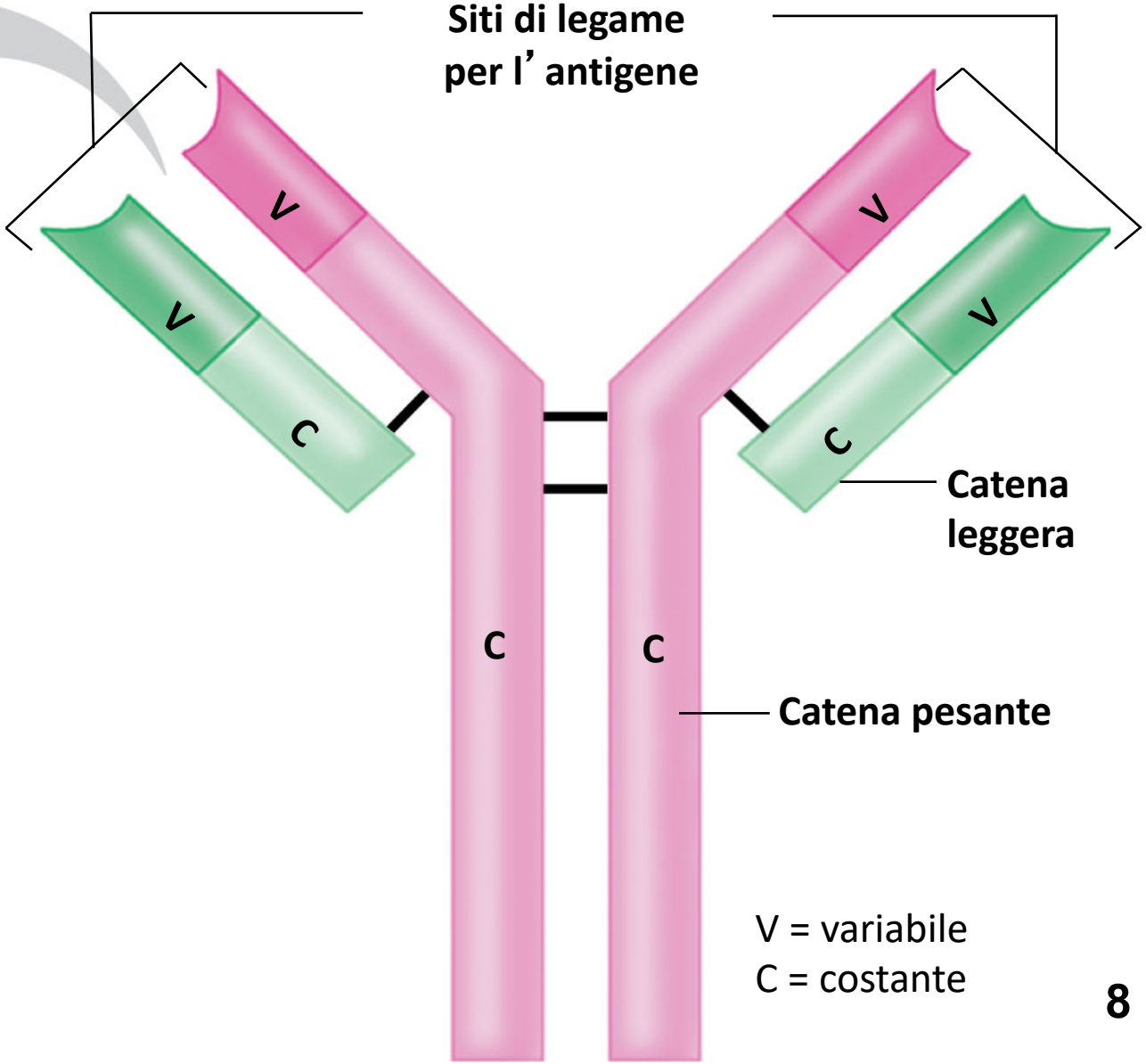
Conventional IgG

ANTIGENI: macromolecole riconosciute specificamente dall'anticorpo

Il **sito di riconoscimento** è detto **EPITOPO:** un antigene normalmente comprende più di un epitopo (6-10 AA) e quindi può essere riconosciuto da più anticorpi diversi.

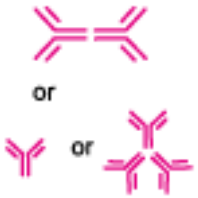


Il sito di legame per l'antigene varia per ogni anticorpo

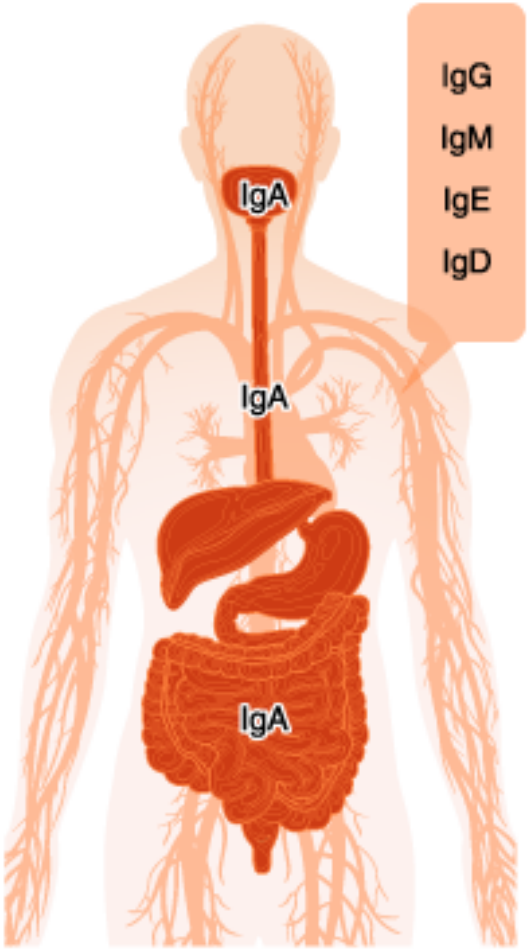


CLASSI ANTICORPALI

Types and characteristics of antibodies

IgG		• Highest opsonization and neutralization activities. • Classified into four subclasses (IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4).
IgM		• Produced first upon antigen invasion. Increases transiently.
IgA		• Expressed in mucosal tissues. Forms dimers after secretion.
IgD		• Unknown function.
IgE		• Involved in allergy.

Distribution in the body



CLASSI ANTICORPALI

M, prodotte durante la prima risposta, sono le più grandi (contengono cinque unità). Sono presenti solo nel sangue e sono le prime prodotte dal neonato.

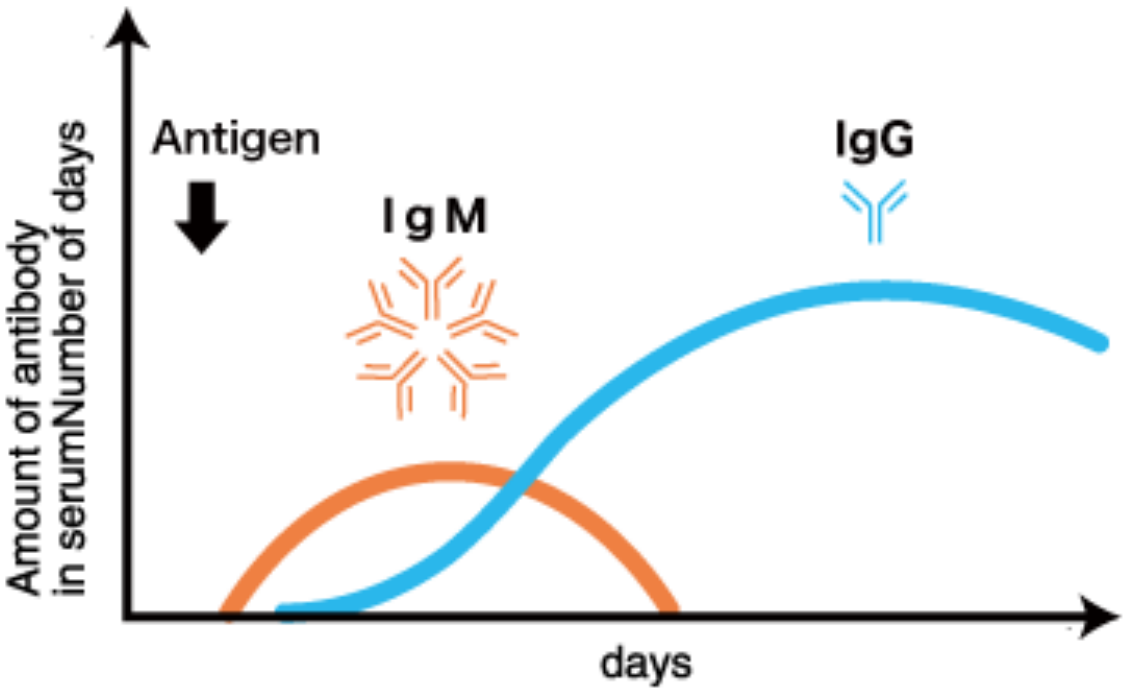
G, le più abbondanti. Possono attraversare le pareti dei vasi e la barriera placentare

A, presenti nelle secrezioni corporee

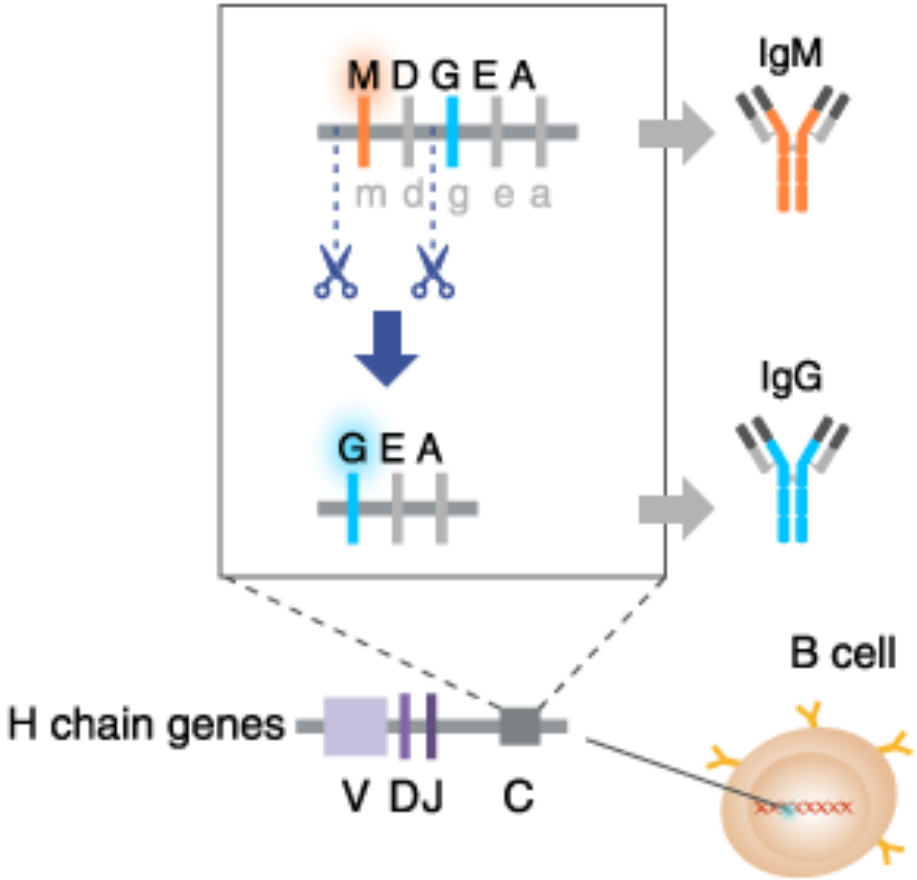
E, mediano la risposta allergica

D, si trovano sulla superficie dei linfociti B

Levels of circulating antibodies to a specific antigen



Class switching

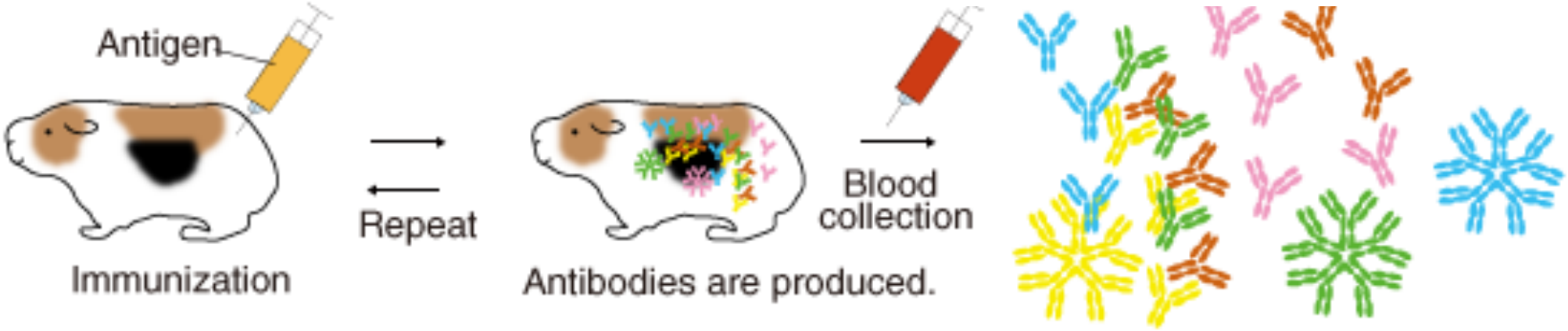


Tecniche per la produzione di anticorpi specifici

OTTENIMENTO di ANTICORPI POLICLONALI:

Mediante **IMMUNIZZAZIONE** di animali da laboratorio = iniezione dell' antigene

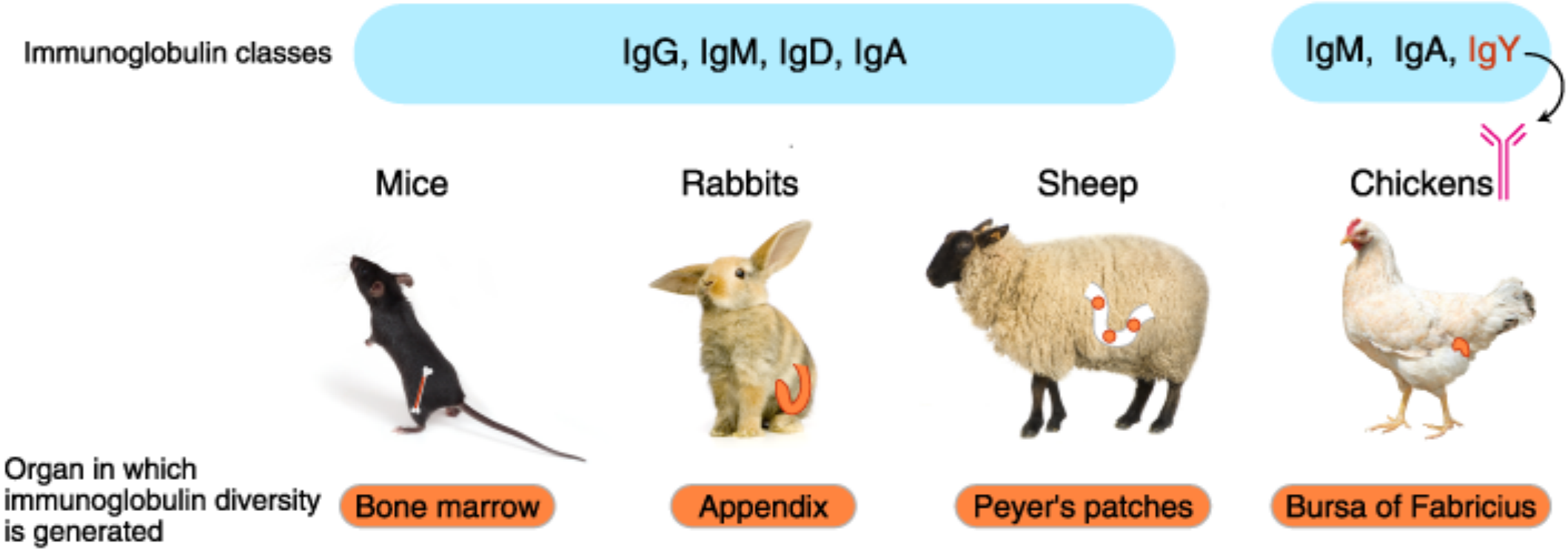
al termine del ciclo di immunizzazione gli **anticorpi policlonali specifici** contro l'antigene sono presenti nel **SIERO** del sangue dell' animale (prelevato senza sacrificare l'animale)



Immunized animals:
rabbits, guinea pigs, goats, sheep, rats, mice, chickens

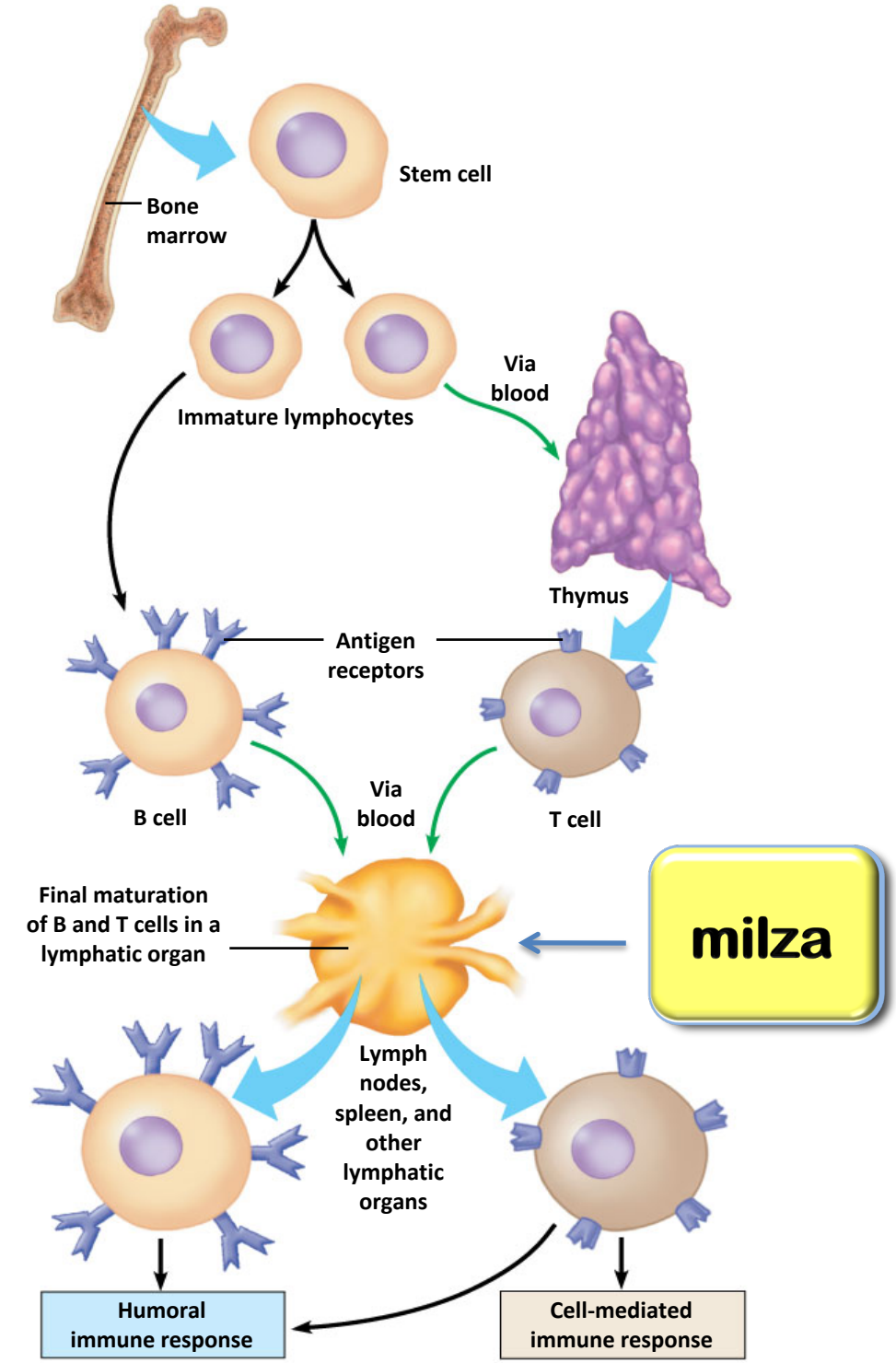
SIERO IMMUNE o ANTISIERO

ANIMALI UTILIZZATI PER L'OTTENIMENTO di ANTICORPI POLICLONALI:



NB:

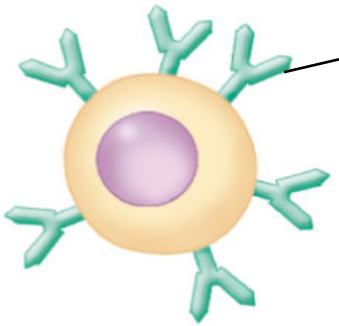
Ciascun linfocita B espone e produce UNO specifico anticorpo



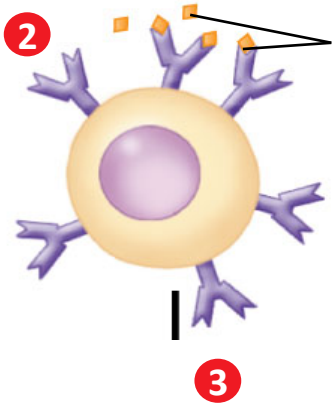
© 2012 Pearson Education, Inc.

RISPOSTA IMMUNE PRIMARIA: RICONOSCIMENTO DELL'ANTIGENE

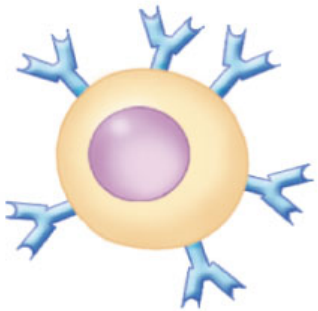
Popolazione
di linfociti B
che espongono
Ciascuno una
diversa Ig
di membrana



Ig
di membrana
= recettore
per l' antigene

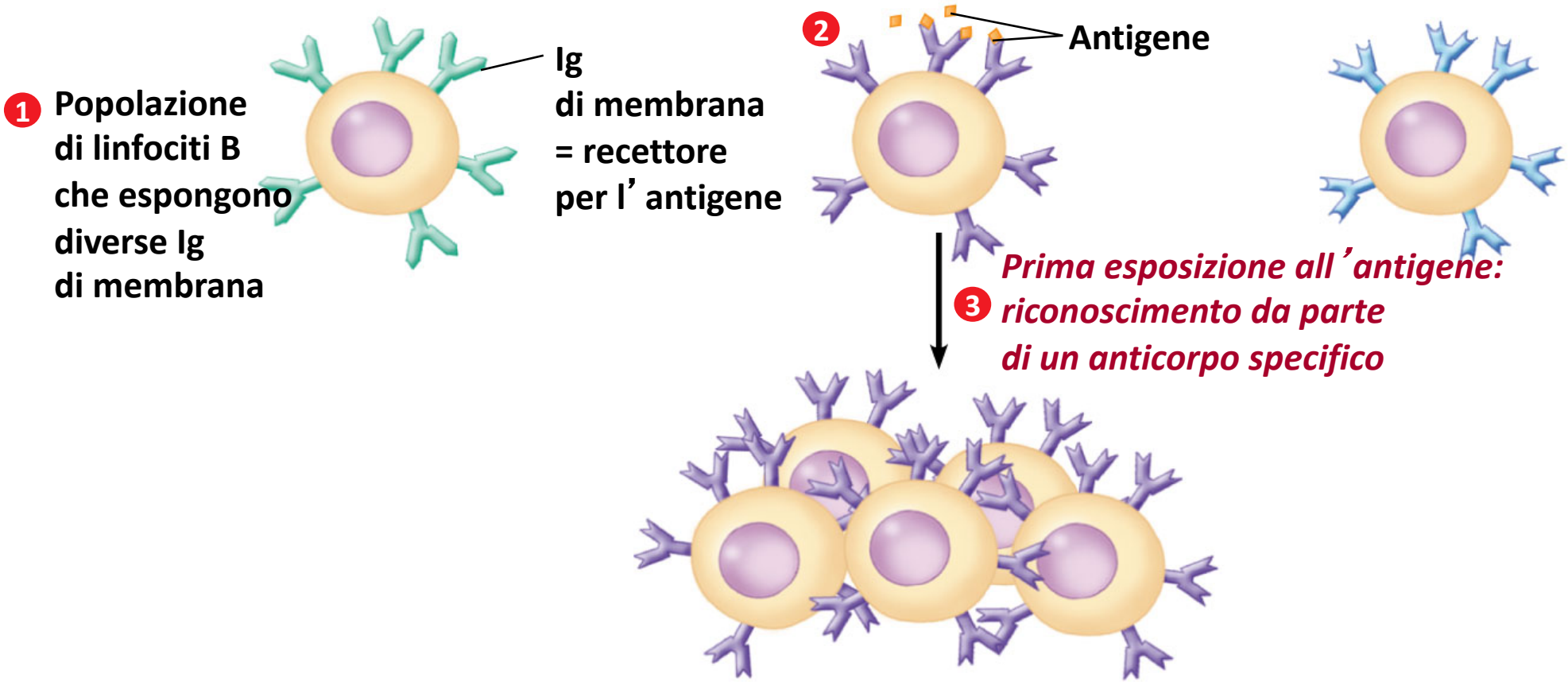


Antigene



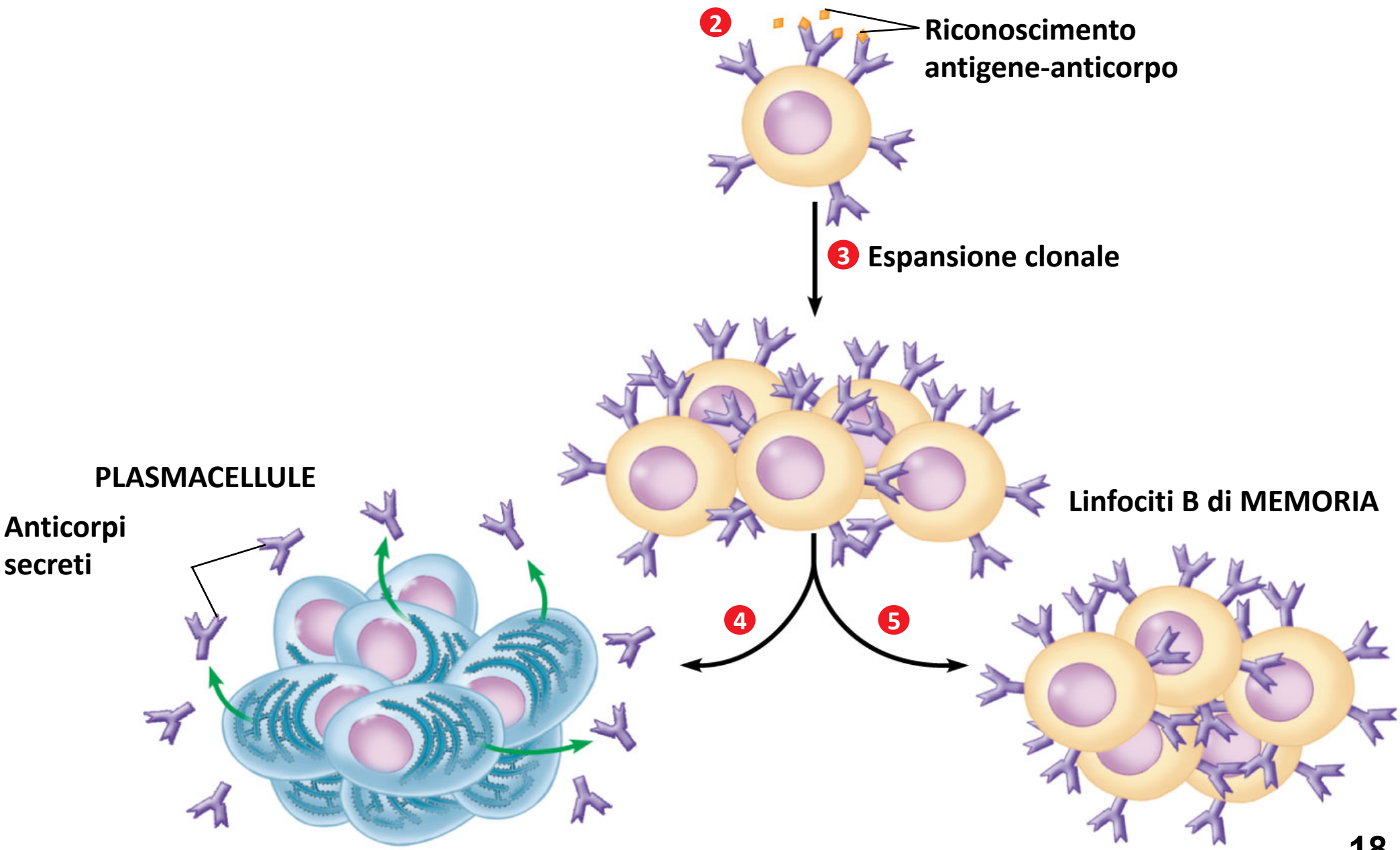
Prima esposizione all'antigene: riconoscimento da parte di un anticorpo specifico

RISPOSTA IMMUNE PRIMARIA: SELEZIONE CLONALE



Rapida divisione del linfocita B selezionato dal legame all'antigene

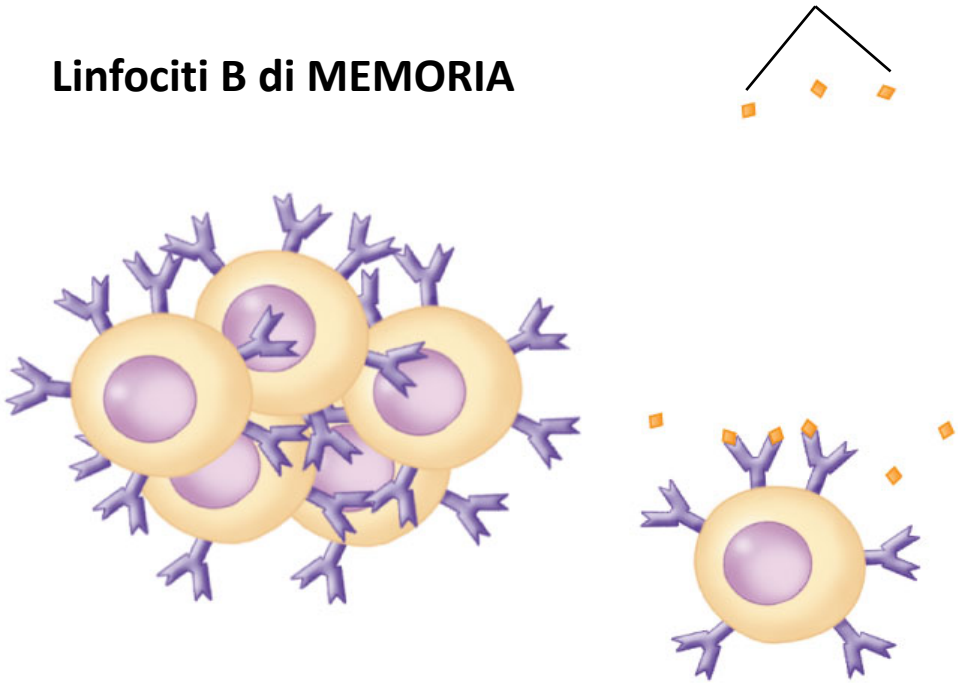
RISPOSTA IMMUNE PRIMARIA: MEMORIA IMMUNITARIA



RISPOSTA IMMUNE SECONDARIA: SECONDA ESPOSIZIONE ALL'ANTIGENE

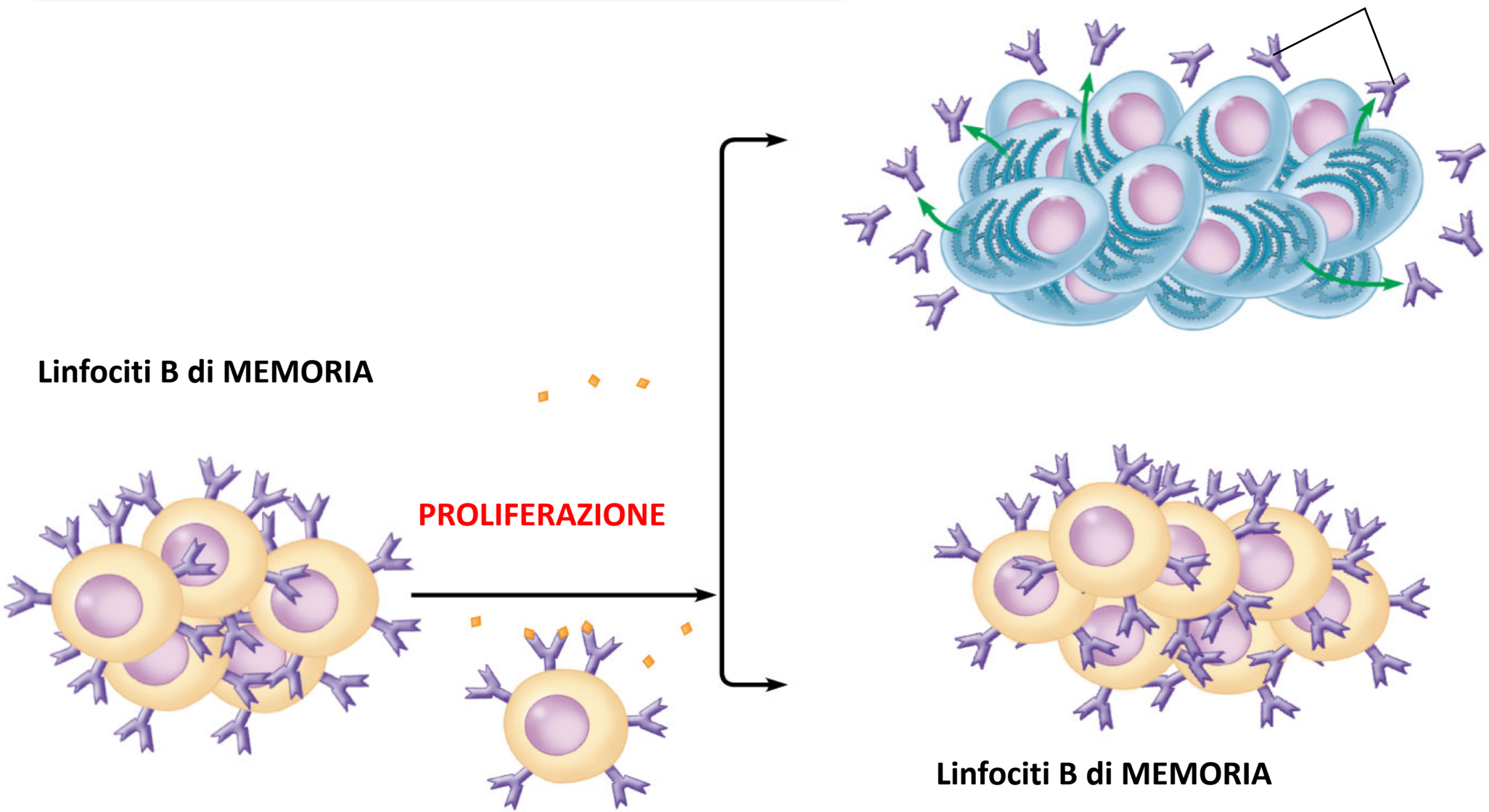
SECONDO INCONTRO CON L' ANTIGENE

Linfociti B di MEMORIA

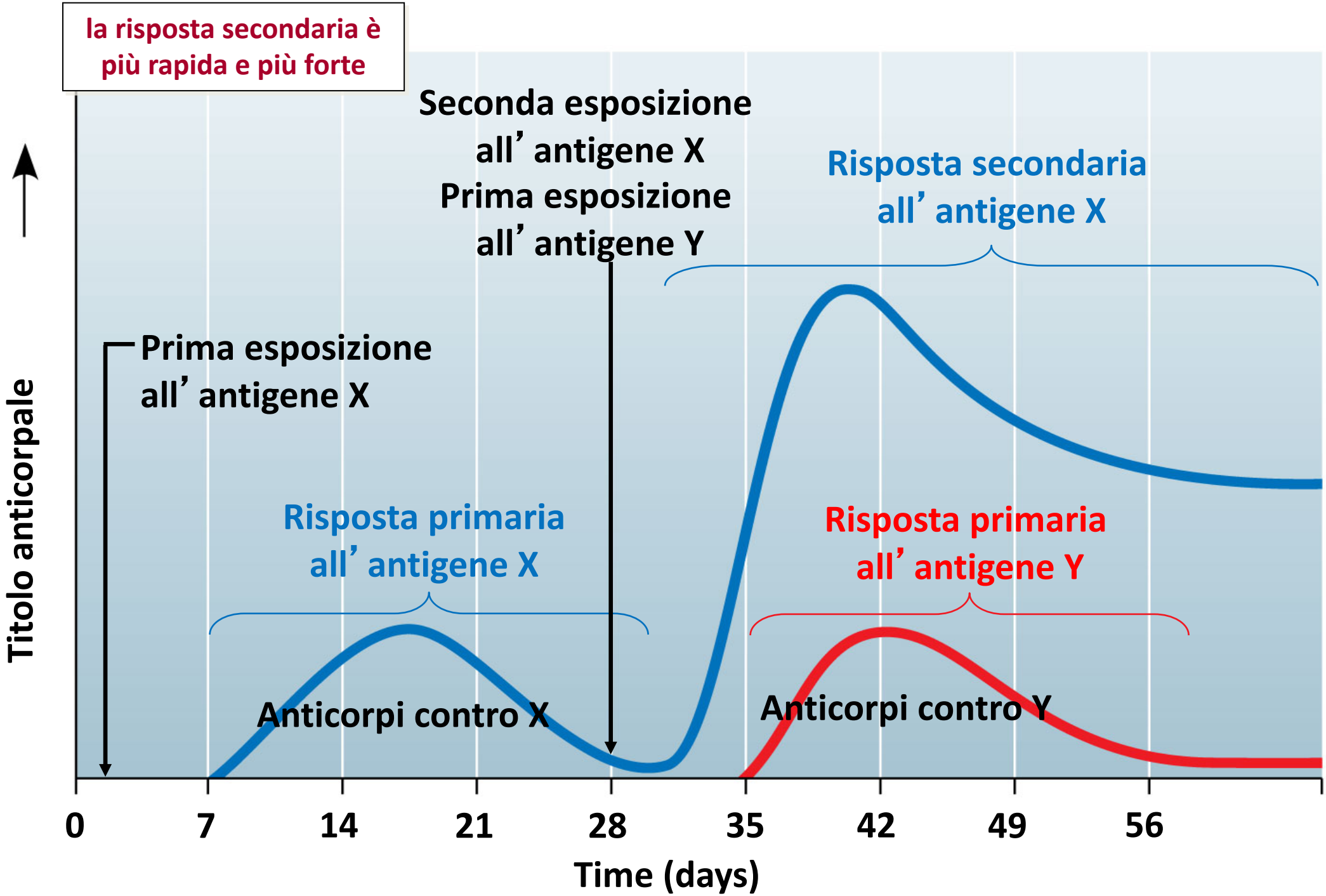


© 2012 Pearson Education, Inc.

RISPOSTA IMMUNE SECONDARIA: ESPANSIONE CLONALE

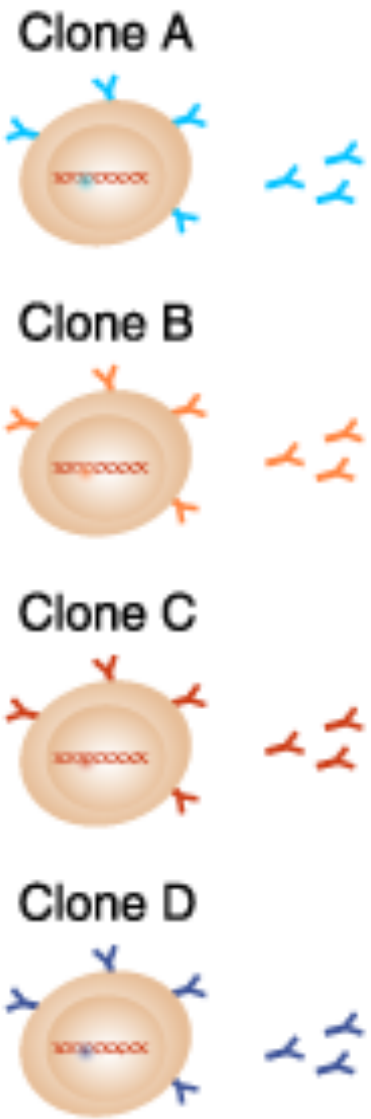


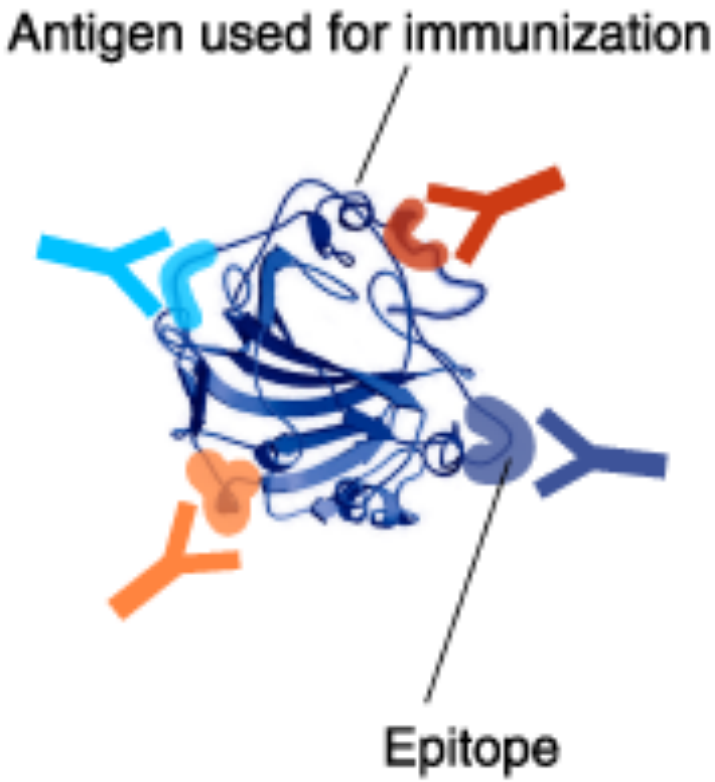
© 2012 Pearson Education, Inc.



© 2012 Pearson Education, Inc.

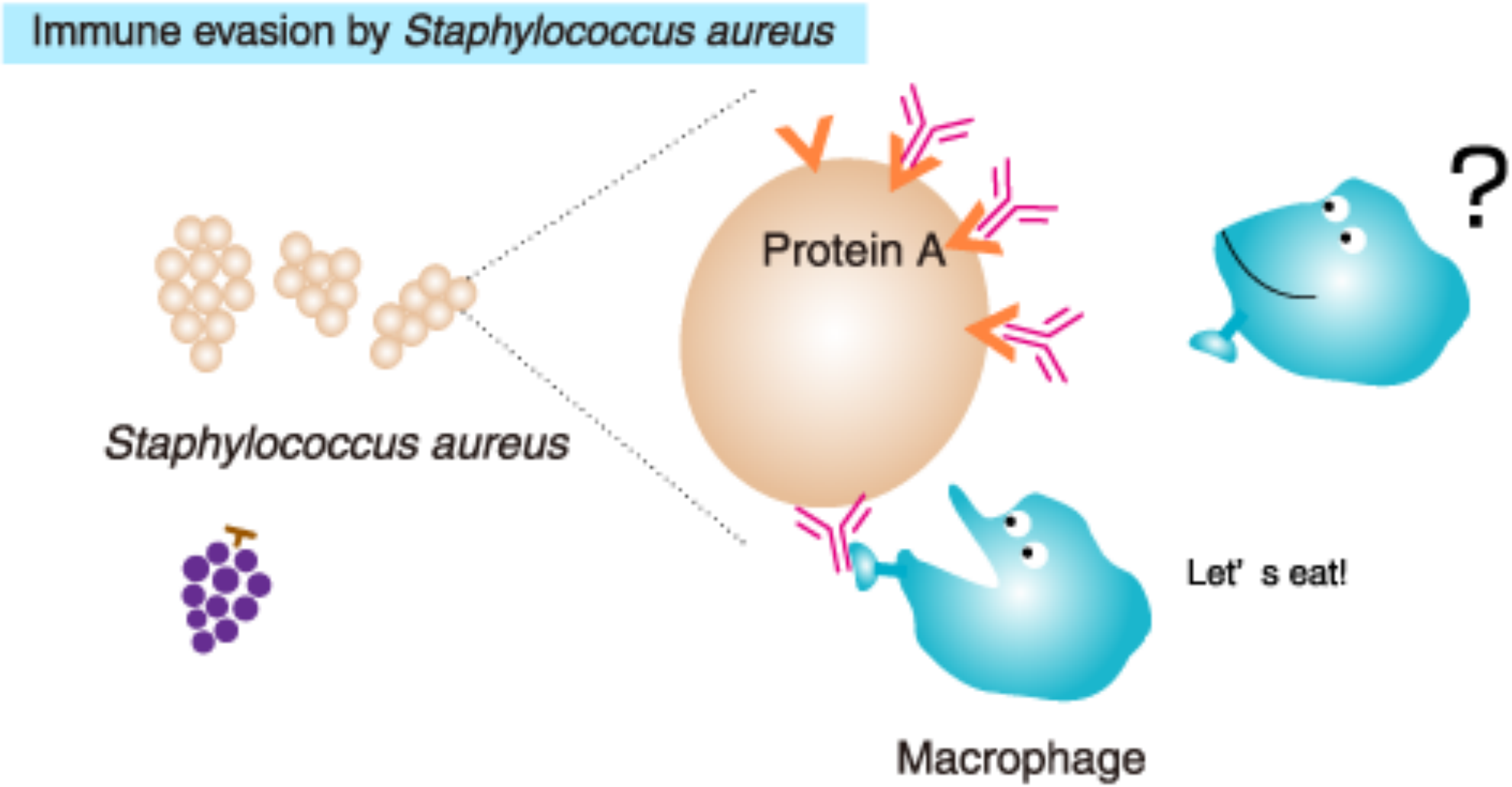
ANTICORPI POLICLONALI:



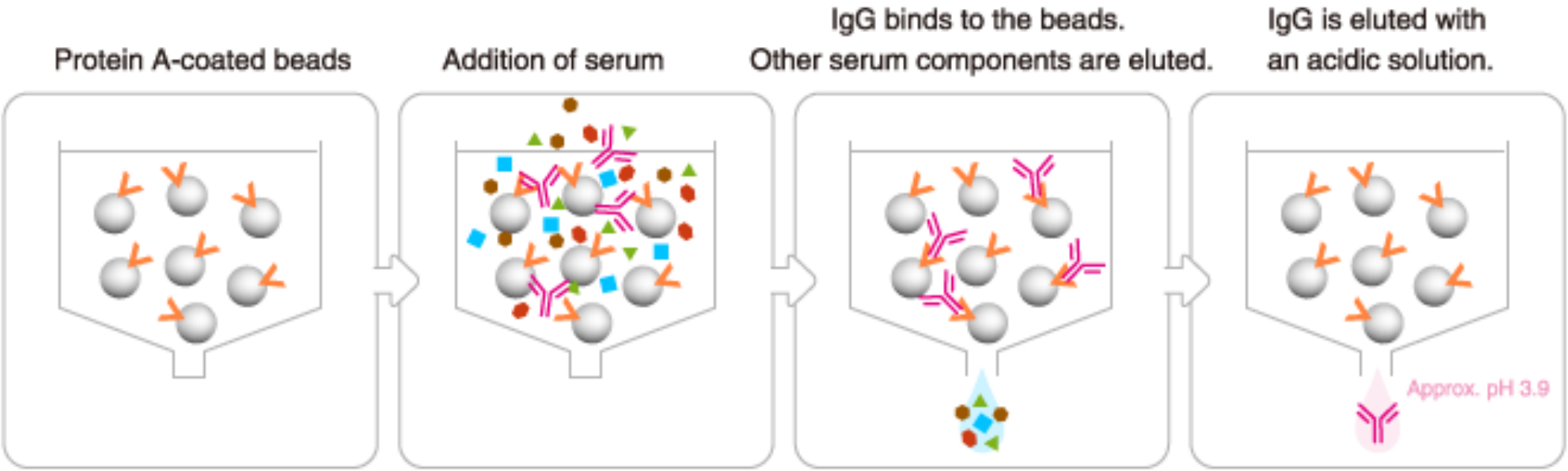


Poichè l'immunizzazione con un antigene stimola molti linfociti diversi, ciascuno dei quali produce un diverso anticorpo, il siero immune contiene una miscela di anticorpi diversi diretti contro lo stesso antigene ma contro epitopi diversi di questo

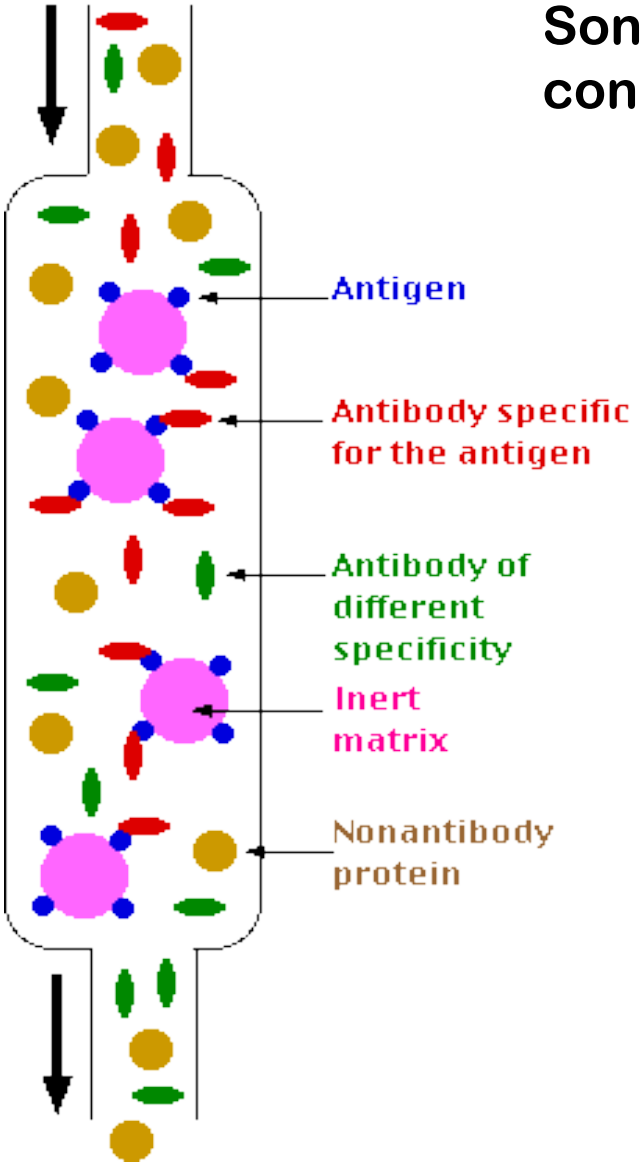
PURIFICAZIONE DI ANTICORPI CON PROTEINA A:



PURIFICAZIONE DI ANTICORPI CON PROTEINA A:



PURIFICAZIONE DI ANTICORPI SPECIFICI MEDIANTE CROMATOGRAFIA DI AFFINITA'



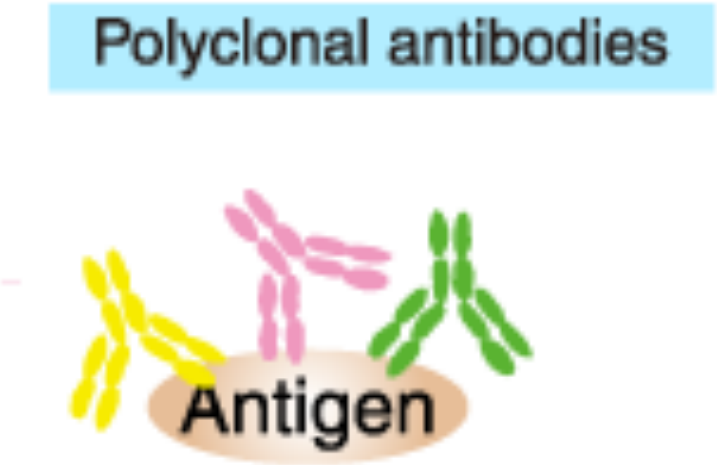
Sono utilizzate resine funzionalizzate con antigeni ricombinanti

ANTICORPI POLICLONALI:

Vantaggi:

✓Segnale forte (più anticorpi riconoscono uno stesso antigene)

✓Basso rischio che l'epitopo sia nascosto / mascherato



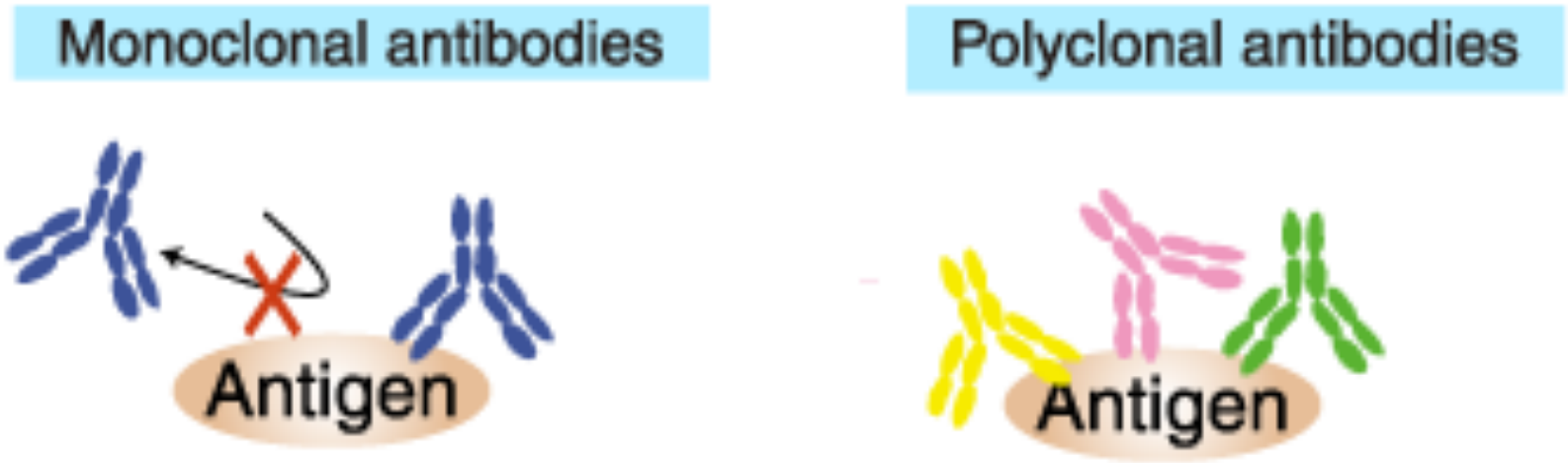
Svantaggi:

- ci può essere crossreattività con antigeni diversi
- presenza di altri anticorpi (risposte immuni) nel siero dell'animale

ANTICORPI MONOCLONALI:

Anticorpi prodotti da un singolo clone di linfociti B

Riconoscono un solo epitopo dell'antigene utilizzato per l'immunizzazione



Vantaggi:

massima specificità di riconoscimento

(posso eliminare Ab che mostrano crossreattività)

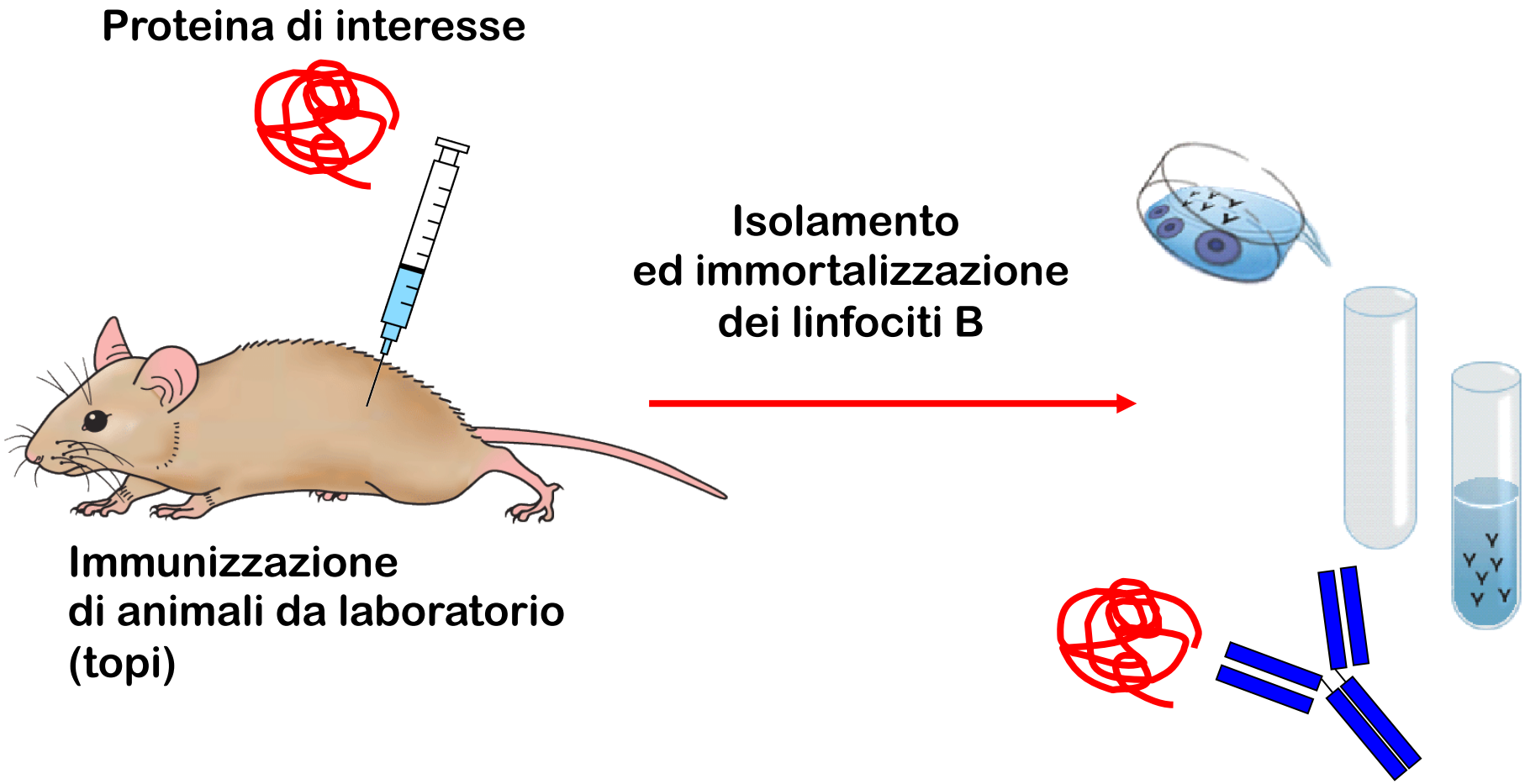
Svantaggi:

Segnale più debole (riconosce un solo epitopo dell'antigene)

Rischio che l'epitopo sia nascosto/mascherato

ANTICORPI MONOCLONALI:

Prodotti mediante isolamento e immortalizzazione di singoli linfociti per ottenere CLONI di cellule che producono e secernono anticorpi in vitro

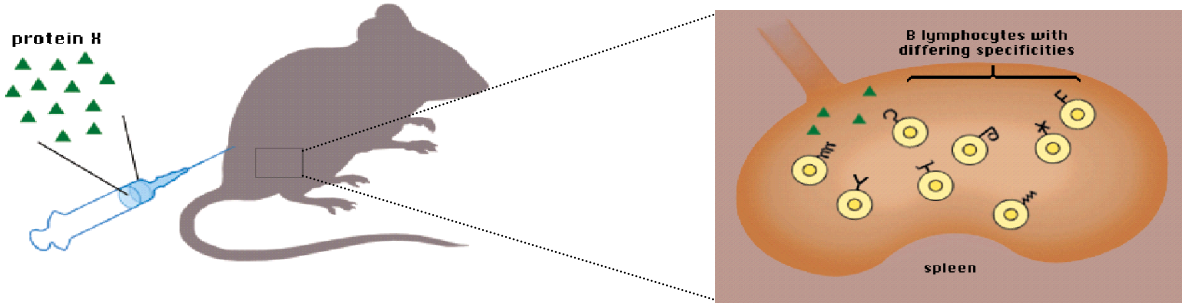


Anticorpi monoclonali diretti contro singoli epitopi dell'antigene di interesse

Produzione di anticorpi monoclonali

1

La proteina purificata viene inoculata nel topo



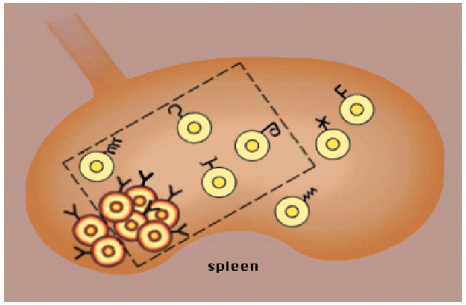
2

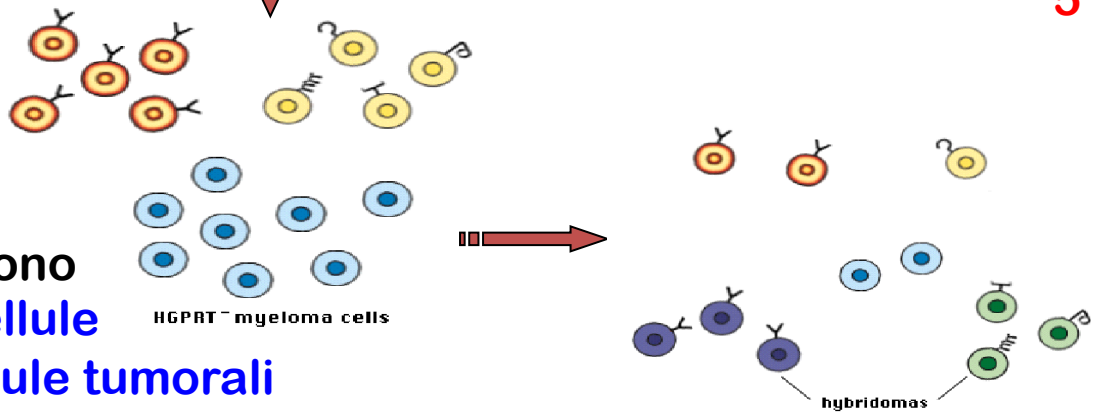
Nella milza i linfociti B contro l'Ag

si attivano ed iniziano a proliferare

3

La milza viene prelevata e si isolano i linfociti





4

I linfociti vengono mescolati a cellule immortali (cellule tumorali di MIELOMA)

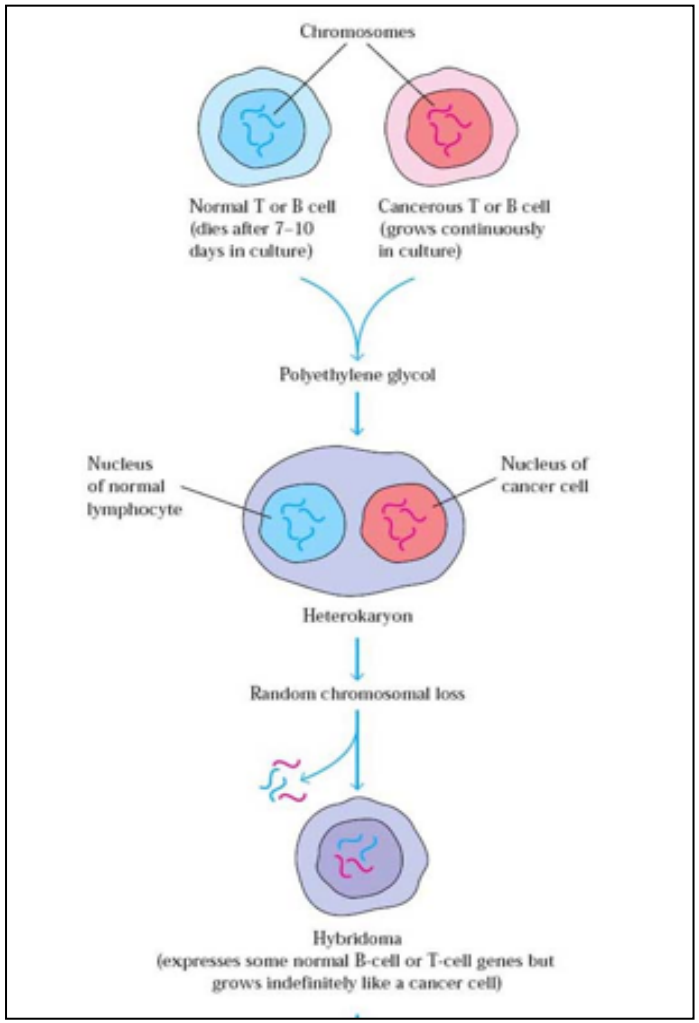
5

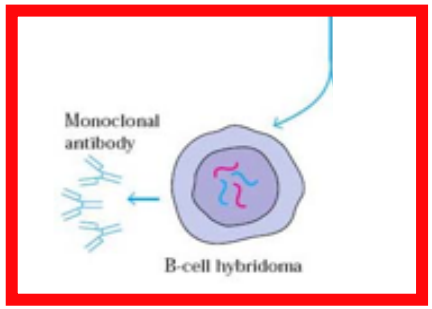
Si effettua una FUSIONE CELLULARE:

i linfociti B fusi alle cellule di mieloma si dicono IBRIDOMI:

= linee cellulari immortali che producono anticorpi

Formazione di ibridomi attraverso fusione cellulare



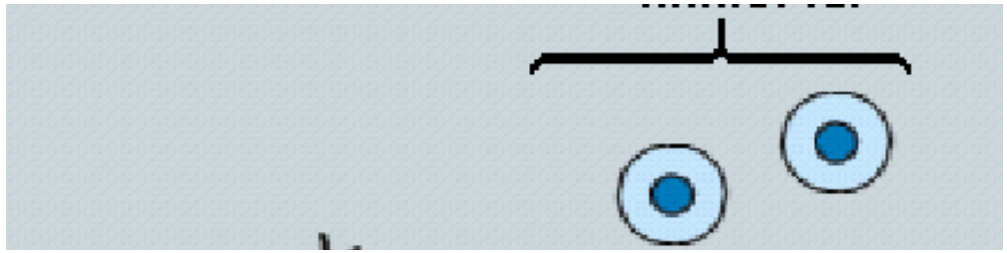


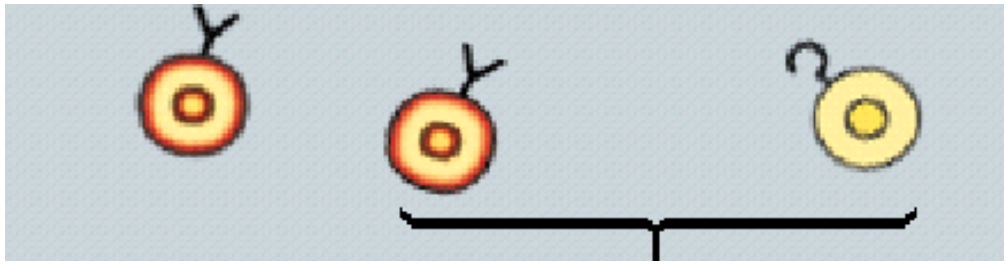
Selezione degli ibridomi in terreno HAT

(Hypoxantine Aminopterine Timidine)

Il terreno HAT blocca la via biosintetica "de novo" dei nucleotidi purinici: le cellule possono crescere solo se hanno l'enzima HGPRT della via biosintetica "di salvataggio"

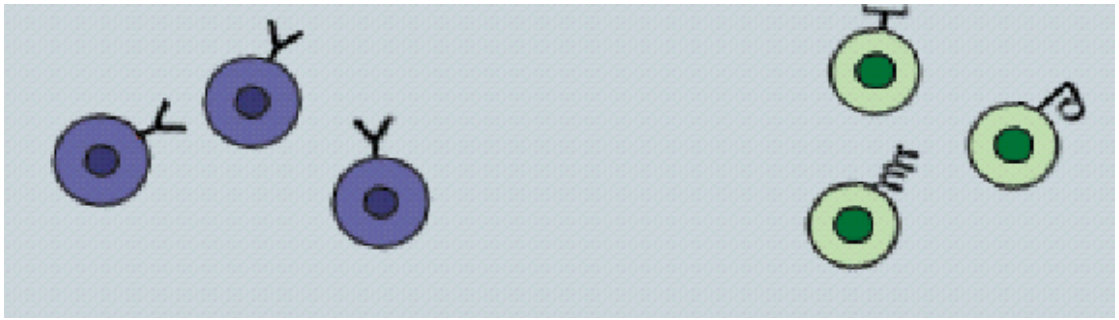
Cellule di mieloma: immortali ma HGPRT- → muoiono





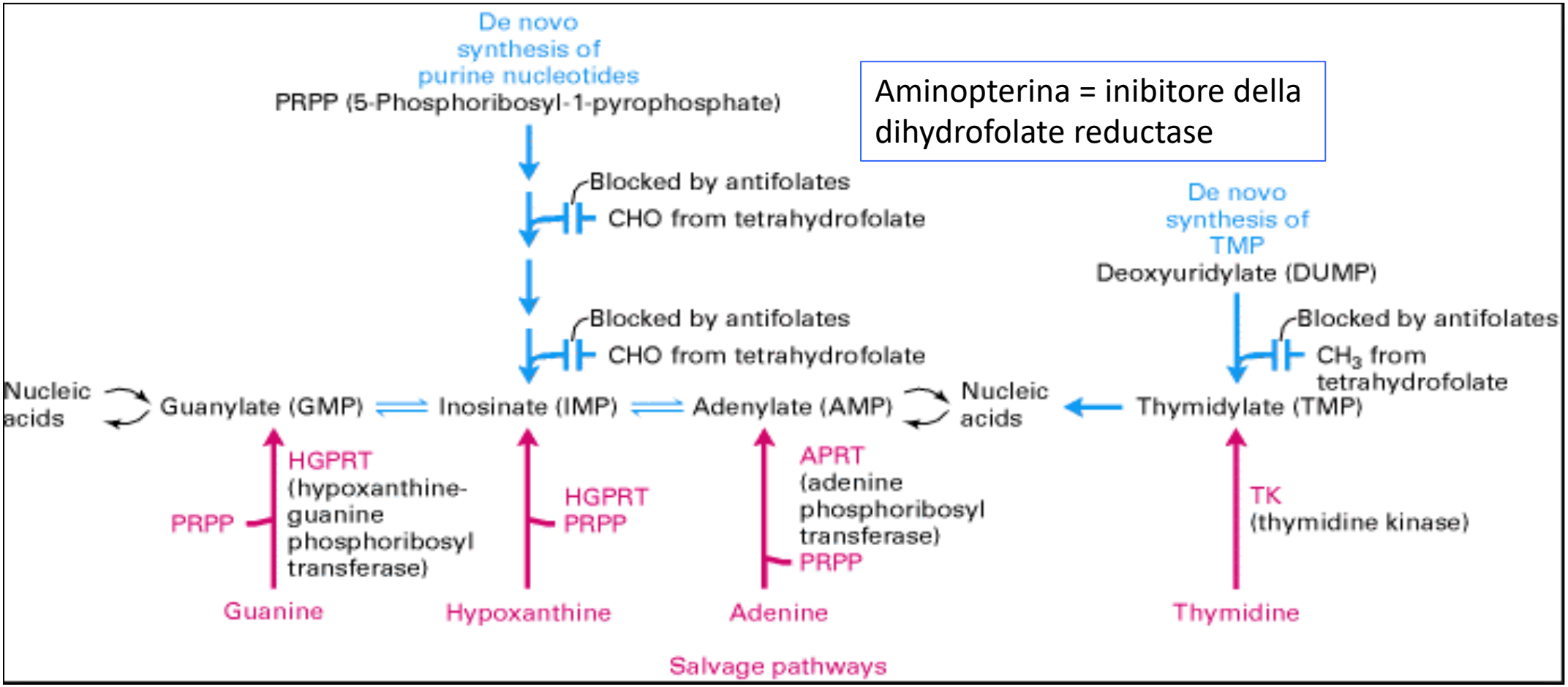
Linfociti: HGPRT + ma non crescono in coltura

Ibridomi: immortali e HGPRT +: possono crescere in terreno HAT



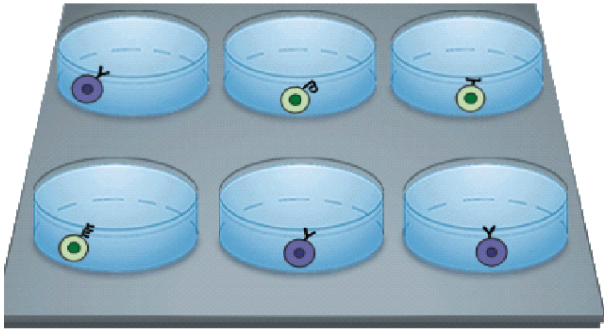
Il terreno HAT (Aminopterina, Hypoxantina, Timidina) blocca la via biosintetica "de novo" dei nucleotidi purinici: le cellule possono crescere solo se hanno l'enzima HGPRT della via biosintetica "di salvataggio"

Biosintesi delle purine



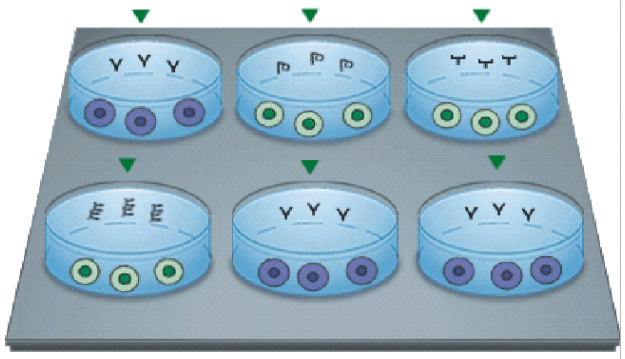
Produzione di anticorpi monoclonali

7 Gli **IBRIDOMI** ottenuti vengono diluiti e piastrati in piastre multiwell, in modo da avere in media una singola cellula per pozzetto

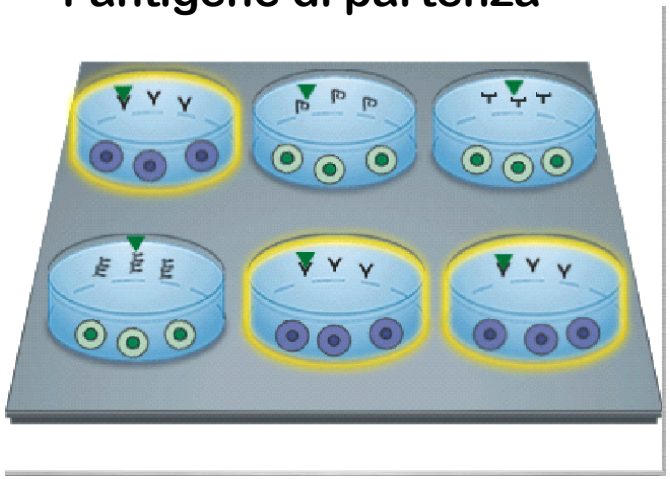


8 I **CLONI** crescono e cominciano a **produrre anticorpi**.

Ogni clone produrrà un anticorpo con diversa specificità di antigene

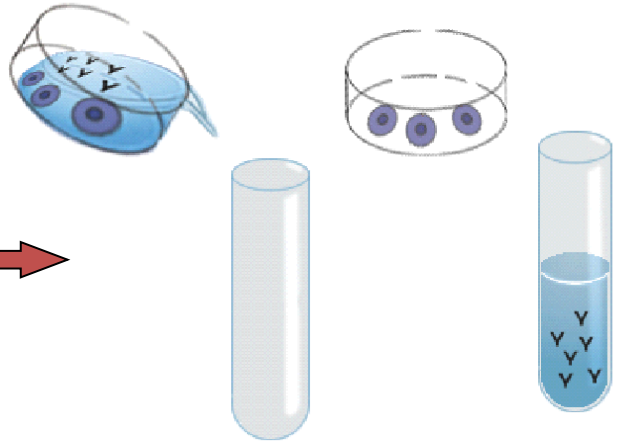


9 Con un saggio immunochimico (ELISA) si può determinare quale clone riconosce l'antigene di partenza

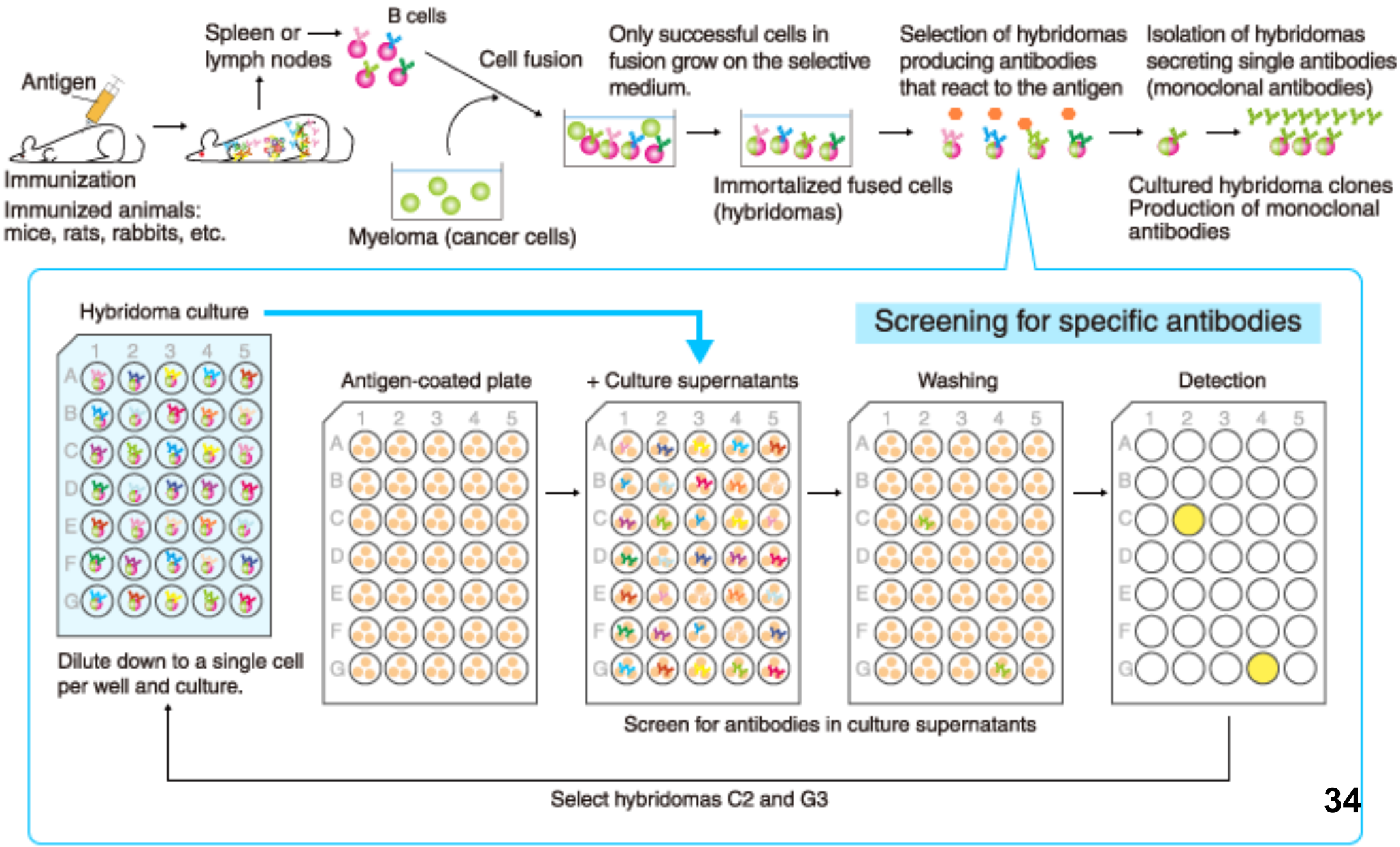


10 Si ottiene una popolazione pura di **ANTICORPI MONOCLONALI**

(derivati da un singolo clone) che riconoscono lo specifico antigene X

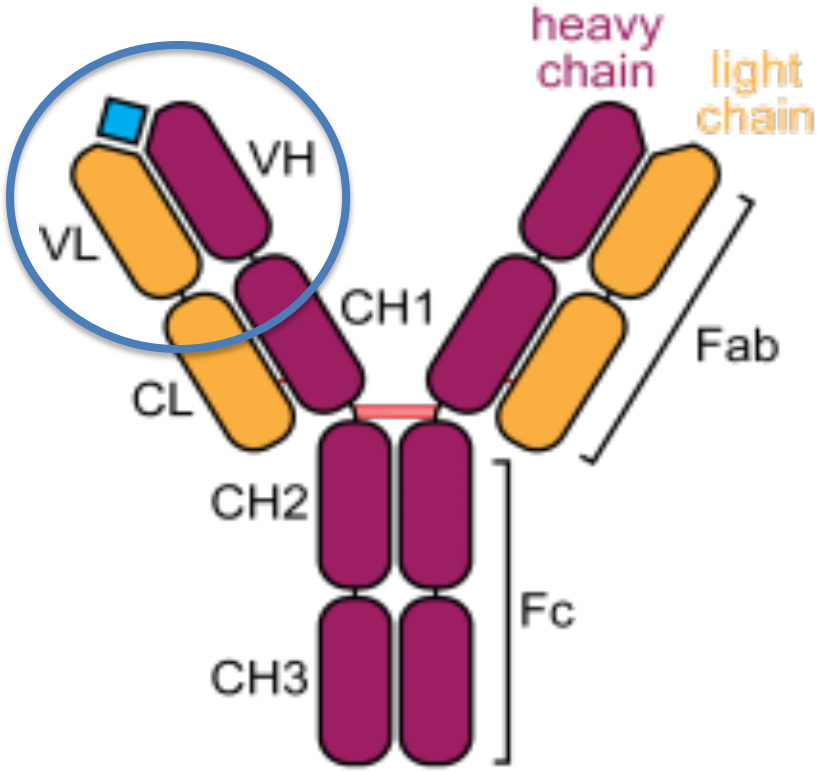


Tecnica utilizzata per selezionare cloni di linfociti B nella produzione di anticorpi monoclonali



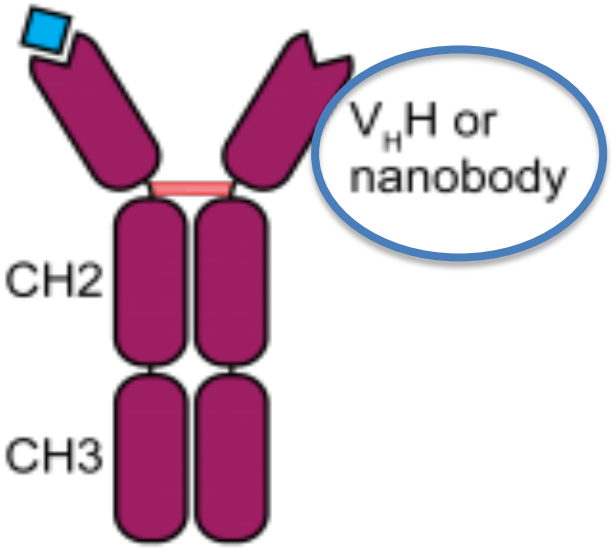
	Polyclonal antibodies	Monoclonal Antibodies
Animal species	Rabbit, guinea pig, goat, sheep, rat, mouse, chicken, etc.	Rat, mouse, chicken, rabbit, human, etc.
Form	Antiserum	Hybridoma
Class, subclass	Mixed classes	Single class
Epitope	React to multiple epitopes	React to a single epitope
Specificity	Lower than monoclonal antibodies because multiple types of antibodies are present.	High if good quality antibodies are selected.
Reproducibility	Variable among lots	The same antibodies are produced indefinitely.
Stability	Binding ability tends to be unaffected by fixation/denaturation of the antigen, because multiple different antibody molecules are present. Tolerate modifications, such as labeling and removal of the Fc region.	Binding ability may be lost if the epitope is lost by fixation/denaturation of the antigen, because monoclonal antibodies are homogeneous. Tend to be sensitive to modifications, such as labeling and removal of the Fc region.

Anticorpi camelidi, nanobodies, single chain Fv, sono prodotti in vitro con tecniche di biologia molecolare



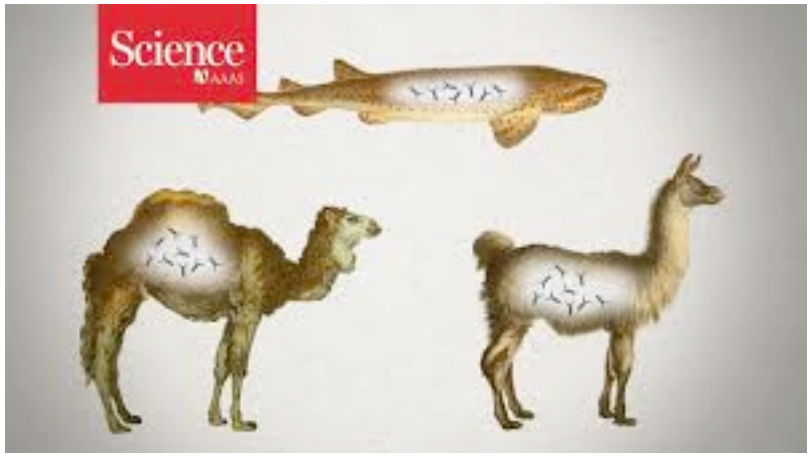
Conventional IgG

Single domain antibodies

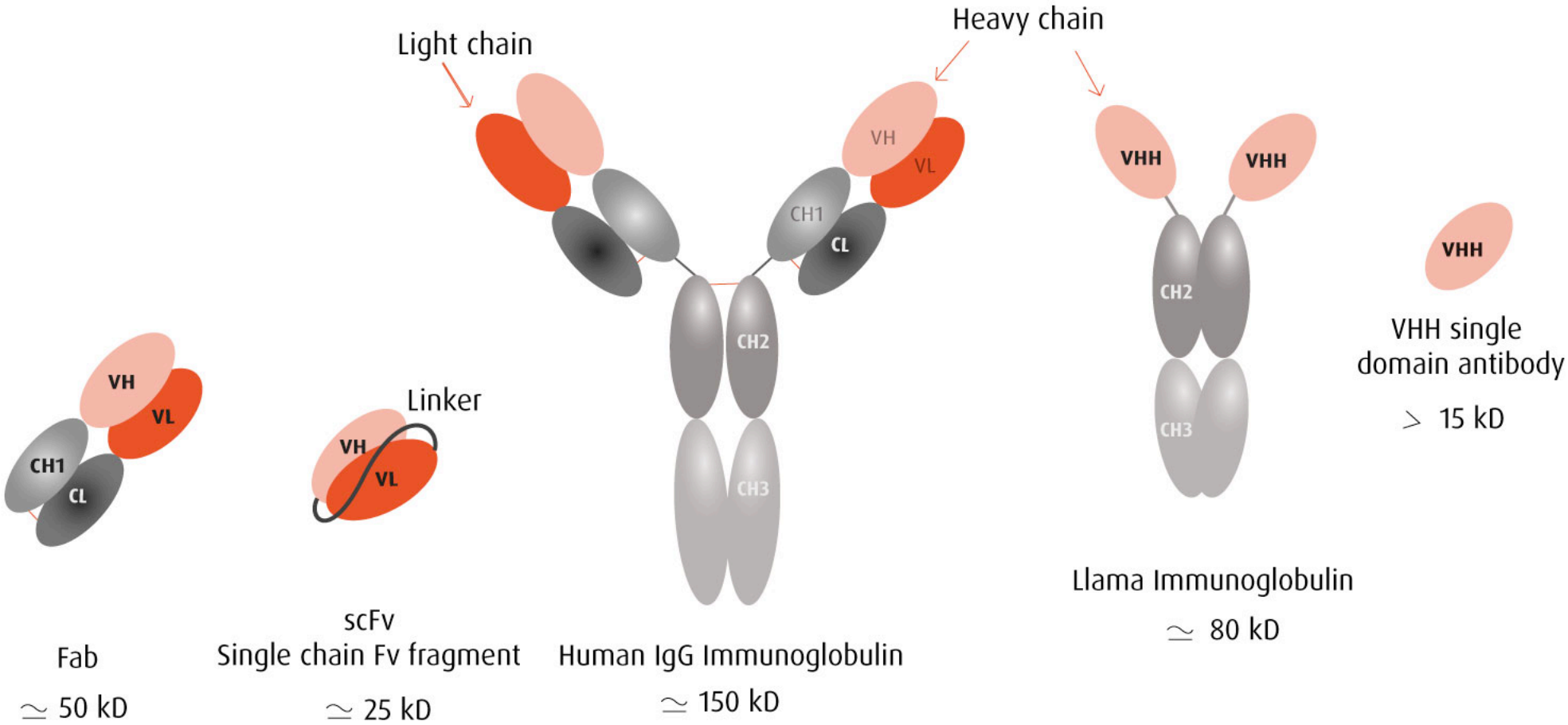


Camelid Heavy chain-only

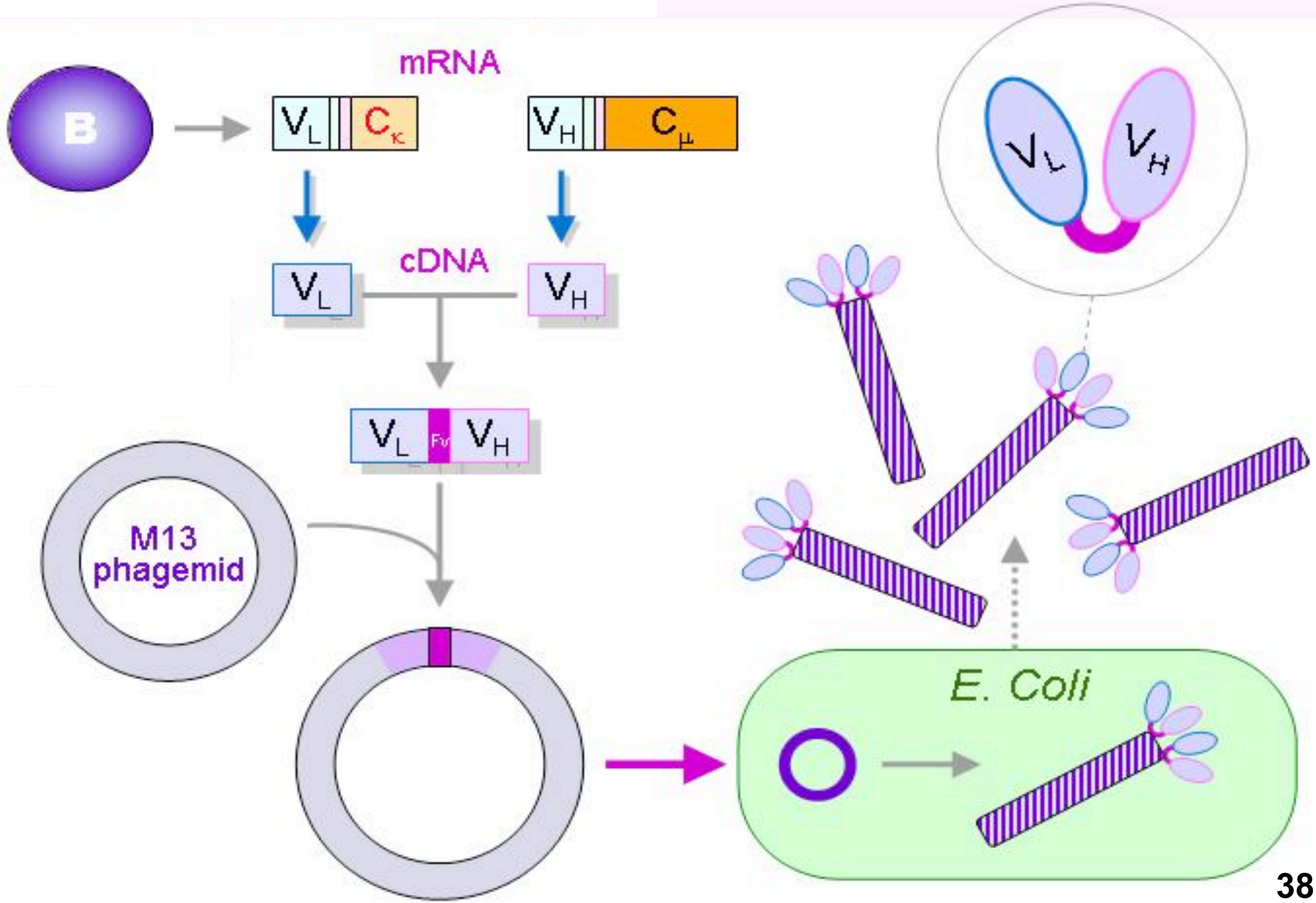
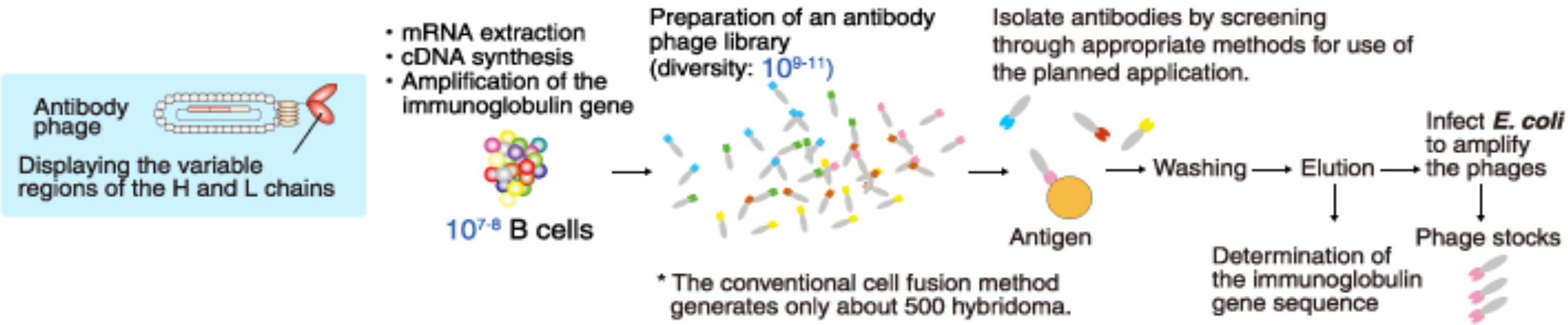
Chromobody



IgG, scFv, VHH


Light chain
Heavy chain
VH
VL
CH1
CL
CH2
CH3
VHH
VHH
VHH
Linker
VH single
domain antibody
> 15 kD
Fab
≃ 50 kD
scFv
Single chain Fv fragment
≃ 25 kD
Human IgG Immunoglobulin
≃ 150 kD
Llama Immunoglobulin
≃ 80 kD

Produzione e selezione di anticorpi in vitro: Phage display



Produzione e selezione di anticorpi in vitro: Phage display