



**Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο  
Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας**

**Μεταπτυχιακή Ειδίκευση Καθηγητών Φυσικών Επιστημών**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Αντισώματα, φυσιολογικός ρόλος και σύγχρονες εφαρμογές  
τους για την έγκαιρη διάγνωση και αποτελεσματική  
θεραπεία των ανθρωπίνων νοσημάτων. Ένα εκλαϊκευμένο  
επιμορφωτικό σεμινάριο**

Δεληγιώργη Τριανταφυλλιά

Επιβλέπων καθηγητής: Αυγέρης Μαργαρίτης

Πάτρα, Μάιος 2022

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή/ της φοιτήτριας («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο/η συγγραφέας/ δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του/της συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του/της συγγραφέα/δημιουργού. Ο/Η συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.



**Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο**  
**Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας**

**Μεταπτυχιακή Ειδίκευση Καθηγητών Φυσικών Επιστημών**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Αντισώματα, φυσιολογικός ρόλος και σύγχρονες εφαρμογές τους για την έγκαιρη διάγνωση και αποτελεσματική θεραπεία των ανθρωπίνων νοσημάτων. Ένα εκλαϊκευμένο επιμορφωτικό σεμινάριο**

Δεληγιώργη Τριανταφυλλιά

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής	Συν-Επιβλέπων Καθηγητής
Αυγέρης Μαργαρίτης	Σκορίλας Ανδρέας
Αναπληρωτής Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ	Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Πάτρα, Μάιος 2022

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος του ΕΑΠ «Μεταπτυχιακή Ειδίκευση Καθηγητών Φυσικών Επιστημών» υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Κλινικής Βιοχημείας, του Τμήματος Ιατρικής του ΕΚΠΑ Αυγέρη Μαργαρίτη και την συν-επίβλεψη του Καθηγητή Κλινικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ Σκορίλα Ανδρέα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αυγέρη Μαργαρίτη, που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την παρούσα εργασία σε ένα επιστημονικό πεδίο εξαιρετικά επίκαιρο και ενδιαφέρον. Η επιστημονική καθοδήγηση του, οι συμβουλές του και οι εμπειριστατωμένες παρατηρήσεις του ήταν πολύτιμες για την ολοκλήρωση της.

Επίσης, ιδιαίτερες ευχαριστίες στον Καθηγητή Σκορίλα Ανδρέα για τις σύγχρονες γνώσεις που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια των μαθημάτων του μεταπτυχιακού καθώς και για τη συμβολή του στη παρούσα διπλωματική εργασία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τον γιο μου για την αμέριστη συμπαράσταση και κατανόηση που έδειξαν προς το πρόσωπό μου το χρονικό αυτό διάστημα.

## Περίληψη

Τα αντισώματα (Ab) ή ανοσοσφαιρίνες (Ig) είναι μεγαλομοριακά, σχήματος Υ πρωτεϊνικά μόρια τα οποία παράγονται από τα Β λεμφοκύτταρα και τα πλασματοκύτταρα και συμβάλλουν στην ανοσολογική απόκριση των ανώτερων ζωικών οργανισμών, μέσω ειδικής αναγνώρισης και σύνδεσης με τα αντιγόνα.

Τα τελευταία χρόνια έχουν βελτιωθεί οι τεχνικές παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAb), τα οποία προέρχονται από ένα μοναδικό κλώνο Β λεμφοκυττάρων και αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο αντιγονικό επίτοπο ενισχύοντας σημαντικά την αναλυτική και διαγνωστική αξία των ανοσολογικών τεχνικών. Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των ανοσοδοκιμασιών είναι η υψηλή αναλυτική ειδικότητα και ευαισθησία, η ταχύτητα και η δυνατότητα αυτοματοποίησης, καθιστώντας τα αναπόσπαστο κομμάτι της σύγχρονη εργαστηριακής ιατρικής. Η ELISA, η ραδιοανοσοανάλυση, ο ανοσοφθορισμός, η ανοσοϊστοχημεία και η ανοσοχρωματογραφία είναι μερικές από τις ανοσολογικές μεθόδους που βασίζονται στο σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος και αξιοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη για την έγκαιρη διάγνωση, πρόγνωση και θεραπεία πλήθους σημαντικών ανθρωπίνων νοσημάτων, όπως οι κακοήθειες, οι λοιμώξεις, αλλά και στην υποστήριξη της σύγχρονης βιοϊατρικής έρευνας. Ιδιαίτερα, στις μέρες μας αποτελούν ένα χρήσιμο, φθινό και πρακτικό διαγνωστικό εργαλείο για την διάγνωση και εκτίμηση ανοσίας του πληθυσμού έναντι της νόσου COVID-19.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα, εκτός από το σπουδαίο ρόλο τους στη διάγνωση ασθενειών, χρησιμοποιούνται και στην σύγχρονη κλινική πράξη. Αρκετά έχουν ήδη λάβει έγκριση άδειας κυκλοφορίας από τον FDA για την αποτελεσματική θεραπεία διαφόρων νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένου της COVID-19 και ιδιαίτερα ορισμένων κακοηθειών.

Συμπερασματικά, τα μονοκλωνικά αντισώματα φαίνεται να έχουν σημαντικές διαγνωστικές και θεραπευτικές εφαρμογές, γι' αυτό ερευνητές και κλινικοί ιατροί από όλο τον κόσμο συνεχίζουν να καταβάλλουν προσπάθειες για να βελτιωθούν οι ιδιότητες τους και να διευρυνθεί περισσότερο η χρήση τους.

### Λέξεις- Κλειδιά

Αντισώματα, μονοκλωνικά αντισώματα, ανοσολογική απόκριση, ανοσολογικές τεχνικές, διάγνωση, θεραπεία, ανθρώπινα νοσήματα, COVID-19.

## **Antibodies, role in normal physiology and modern applications for the early diagnosis and effective treatment of human diseases. A popular training seminar.**

**Deligiorgi Triantafyllia**

### **Abstract**

Antibodies (Ab) or immunoglobulins (Ig) are large, Y-shaped protein molecules produced by B lymphocytes and plasma cells that contribute to the immune response of higher animal organisms through specific recognition and binding to antigens.

In recent years, the techniques for producing monoclonal antibodies (mAb), which come from a single B cell clone and recognize a specific antigenic epitope, have greatly enhanced the analytical and diagnostic value of immunological techniques. The most important advantages of immunoassays are the high analytical specificity and sensitivity, the speed and the possibility of automation, making them an integral part of modern laboratory medicine. ELISA, radioimmunoassay, immunofluorescence, immunohistochemistry and immunochromatography are some of the antigen-antibody complex immunological methods used in daily clinical practice for the early diagnosis, prognosis and treatment of a number of important human diseases, such as malignancies, infections, but also in support of modern biomedical research. In particular, nowadays, they are a useful, cheap and practical diagnostic tool for the diagnosis and assessment of immunity of the population against COVID-19 disease.

Monoclonal antibodies, in addition to their important role in the diagnosis of diseases, are also used in modern clinical practice. Several monoclonal antibodies have already received marketing authorization from the FDA for the effective treatment of a variety of diseases, including COVID-19 and certain malignancies.

In conclusion, monoclonal antibodies appear to have important diagnostic and therapeutic applications so researchers and clinicians around the world continue to work to improve their properties and expand their use.

### **Keywords**

Antibodies, monoclonal antibodies, immune response, immunological techniques, diagnosis, treatment, human diseases, COVID-19.

## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	iv
Περίληψη.....	v
Abstract .....	vi
Περιεχόμενα .....	vii
Κατάλογος εικόνων .....	x
1.1 Ανοσία.....	1
1.1.1 Μη ειδική ανοσία .....	1
1.1.2 Ειδική ανοσία .....	3
1.2 Λεμφοκύτταρα.....	4
1.3 Ανοσολογική απόκριση.....	7
1.3.1 Χυμική ανοσία.....	8
1.3.2 Κυτταρική ανοσία.....	9
2. Αντισώματα.....	11
2.1 Δομή αντισωμάτων.....	11
2.2 Τάξεις ανοσοσφαιρινών .....	14
2.2.1 IgG.....	14
2.2.2 IgM .....	15
2.2.3 IgA.....	16
2.2.4 IgD.....	18
2.2.5 IgE .....	18
2.3 Ρόλος των αντισωμάτων και μηχανισμός δράσης.....	19
3. Παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων .....	24
3.1 Πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα.....	24
3.2 Τεχνική του υβριδώματος.....	25
3.3 Χιμαϊρικά ανθρωποποιημένα αντισώματα .....	26
3.4 Αντισώματα αποκλειστικά ανθρώπινης προέλευσης .....	27
Διπλωματική Εργασία	vii

3.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των αντισωμάτων .....	32
3.6 Αντισώματα διπλής εξειδίκευσης.....	43
3.7 Συμπλέγματα αντισώματος-φαρμάκου (Antibody-drug conjugates, ADCs) .....	47
4. Ανοσολογικές διαγνωστικές τεχνικές για την έγκαιρη διάγνωση των ανθρωπίνων νοσημάτων.....	49
4.1 ELISA (ανοσοαπορροφητική μέθοδος συνδεδεμένου ενζύμου).....	49
4.1.1 Άμεση ELISA.....	50
4.1.2 Έμμεση ELISA.....	51
4.1.3 ELISA τύπου sandwich .....	52
4.1.4 Συναγωνιστική ELISA .....	54
4.1.5 Μη συναγωνιστική ELISA.....	55
4.1.6 ELISPOT (δοκιμασία ανοσοαπορροφητικής κηλίδας συνδεδεμένου ενζύμου).....	55
4.2 RIA (Ραδιοανοσοανάλυση) .....	57
4.2.1 IRMA (ανοσοραδιομετρική ανάλυση) .....	59
4.3 Ανοσοφθορισμός.....	60
4.4 Ανοσοϊστοχημεία .....	62
4.5 Ανοσοχρωματογραφία.....	63
5. Εφαρμογές των ανοσολογικών διαγνωστικών τεχνικών για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του ιού SARS-CoV-2 .....	66
5.1 ELISA (ανοσοαπορροφητική μέθοδος συνδεδεμένου ενζύμου).....	66
5.2 Δοκιμασία πλευρικής ροής (lateral flow immunoassay- LFIA).....	68
6. Εφαρμογές των αντισωμάτων για την αποτελεσματική θεραπεία στην σύγχρονη κλινική πράξη.....	71
6.1 Θεραπευτικά αντισώματα για τον καρκίνο του μαστού.....	73
6.2 Θεραπευτικά αντισώματα για τον καρκίνο του πνεύμονα .....	74
6.3 Θεραπευτικά αντισώματα για τον καρκίνο του παχέος εντέρου .....	74
6.4 Θεραπευτικά αντισώματα για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης .....	75
6.5 Θεραπευτικά αντισώματα για το μελάνωμα.....	76
6.6 Θεραπευτικά αντισώματα για την οφθαλμική νόσο του θυρεοειδούς .....	77



6.7 Θεραπευτικά αντισώματα για την χρόνια ημικρανία .....	77
6.8 Θεραπευτικά αντισώματα για το πολλαπλό μυέλωμα.....	77
6.9 Θεραπευτικά αντισώματα για τον Τριπλά Αρνητικό καρκίνο του Μαστού (TNBC) ...	79
6.10 Θεραπευτικά αντισώματα για την διαταραχή του φάσματος της οπτικής νευρομυελίτιδας (NMOSD) .....	80
6.11 Θεραπευτικά αντισώματα για το διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-κυττάρα (DLBCL) .....	81
6.12 Θεραπευτικά αντισώματα για την νόσο που προκαλείται από τον ιό του Έμπολα.....	82
6.13 Θεραπευτικά αντισώματα για το νευροβλάστωμα .....	82
6.14 Θεραπευτικά αντισώματα για τη νόσο COVID-19 .....	83
7. Ένα εκλαϊκευμένο επιμορφωτικό σεμινάριο.....	86
7.1 Αμυντικοί μηχανισμοί του ανθρώπινου οργανισμού .....	86
7.2 Αντισώματα.....	88
7.3 Ρόλος των αντισωμάτων.....	89
7.4 Μονοκλωνικά αντισώματα.....	90
7.5 Εφαρμογές των αντισωμάτων για την έγκαιρη διάγνωση ανθρωπίνων νοσημάτων....	90
7.6 Ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του ιού SARS-CoV-2 .....	93
7.7 Εφαρμογές των αντισωμάτων για την θεραπεία ανθρωπίνων νοσημάτων .....	93
Βιβλιογραφικές Αναφορές .....	95

## Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1-1. Σχηματική απεικόνιση των κύριων μηχανισμών της μη ειδικής ανοσίας .	3
Εικόνα 1-2. Τα κύρια συστατικά της ειδικής ανοσίας σε μία ιογενής λοίμωξη.	5
Εικόνα 1-3. Ανοσολογικές αποκρίσεις των Β λεμφοκυττάρων .	6
Εικόνα 2-1. Δομή της IgG1	12
Εικόνα 2-2. Ανοσοσφαιρινικό δίπλωμα	13
Εικόνα 2-3. Αναπαράσταση της δομής του αντισώματος IgG	14
Εικόνα 2-4. Δομή της ανθρώπινης IgM .	16
Εικόνα 2-5. Σχηματικό μοντέλο Α) της μονομερούς IgA1, IgA2m(1) και IgA2m(2), Β) της διμερούς IgA2 και Γ) της εκκριτικής IgA2.	17
Εικόνα 2-6. Σχηματισμός του μεμβρανοεπιθητικού συμπλέγματος (Membrane Attack Complex- MAC)	21
Εικόνα 2-7. Ο μηχανισμός α) της εξαρτώμενης από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητικής κυτταροτοξικότητας (ADCC), β) της εξαρτώμενης από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητας (CDC)	22
Εικόνα 3-1. Αντιπροσωπευτική διάταξη των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs) της Fab περιοχής	27
Εικόνα 3-2. Βασικά χαρακτηριστικά των αντισωμάτων που πρέπει να βελτιστοποιηθούν για τη δημιουργία ανοσοσφαιρινών που είναι αποτελεσματικές για διαφορετικές εφαρμογές. ...	34
Εικόνα 3-3. Μέθοδοι σχεδιασμού για την αύξηση της διαλυτότητας των αντισωμάτων. Διάφορες προσεγγίσεις βρέθηκαν να αυξάνουν τη διαλυτότητα ενός αντισώματος έναντι της γλυκοπρωτεΐνης LINGO-1 χωρίς να έχουν σημαντική επίδραση στη συγγένεια δέσμευσης.	39
Εικόνα 3-4. Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών στρατηγικών που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία αντισωμάτων διπλής εξειδίκευσης (BsAbs) που προέρχονται από τις θέσεις πρόσδεσης αντιγόνου δύο διαφορετικών αντισωμάτων.	46
Εικόνα 4-1. Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει τις διαφορές της άμεσης ELISA (Α), της έμμεσης ELISA (Β), ELISA τύπου sandwich (C) και συναγωνιστική ELISA (D).	50
Εικόνα 4-2. Σχηματικό διάγραμμα της ELISA τύπου sandwich. Το αντίσωμα σύλληψης (CAb) ακινητοποιείται στην πλάκα των 96 βοθρίων και προσδένεται με το αντιγόνο, το οποίο στη συγκεκριμένη μελέτη είναι η γλυκοπρωτεΐνη Wnt5a. Η ανίχνευση του αντιγόνου γίνεται με δεύτερο αντίσωμα ανίχνευσης (DAb), το οποίο με τη σειρά του αναγνωρίζεται από ένα αντίσωμα συνδεδεμένου ενζύμου (EAb). Ακολουθεί προσθήκη υποστρώματος του ενζύμου (OPD) και οπτική ανάλυση του σήματος (έγχρωμο προϊόν).	54

Εικόνα 4-3. Δοκιμασία ELISPOT .....	56
Εικόνα 4-4. Σχηματικό διάγραμμα της ραδιοανοσοανάλυσης RIA. ....	59
Εικόνα 4-5. Άμεσος ανοσοφθορισμός.....	61
Εικόνα 4-6. Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....	62
Εικόνα 4-7. Σχηματική απεικόνιση της δοκιμασίας της ανοσοχρωματογραφίας (δοκιμασία πλευρικής ροής-lateral flow immunoassay-LFIA). ....	65
Εικόνα 5-1. Δύο ανοσολογικές δοκιμασίες για τη διάγνωση του COVID-19. α) Έμμεση ELISA που ανιχνεύει αντισώματα έναντι του ιού SARS-CoV-2 και β) ELISA τύπου sandwich που ανιχνεύει αντιγόνα του ιού SARS-CoV-2. ....	68
Εικόνα 5-2. Ορολογικός διαγνωστικός έλεγχος για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του ιού SARS-CoV-2.....	69
Εικόνα 6-1. Αριθμός των θεραπευτικών αντισωμάτων που εγκρίνονται κάθε χρόνο από το 1997 έως το 2020 στις ΗΠΑ και στην Ευρωπαϊκή Ένωση. ....	73

## **1.1 Ανοσία**

Καθημερινά ο ανθρώπινος οργανισμός έρχεται σε επαφή με διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς (όπως βακτήρια, ιούς, μύκητες και παράσιτα), άλλες ξένες ουσίες μη μικροβιακής φύσεως (όπως τοξίνες, χημικοί παράγοντες) και καρκινικά κύτταρα που διαταράσσουν την ομοιόσταση του και μπορούν να προκαλέσουν μία ασθένεια. Όλοι αυτοί οι παράγοντες που είναι ξένοι ως προς τον οργανισμό αποτελούν αντιγόνα. Συνεπώς για την άμυνα και την προστασία του οργανισμού έχει αναπτυχθεί ένα πολύπλοκο και πολύ σημαντικό σύστημα που ονομάζεται ανοσοποιητικό σύστημα. Η ανοσία περιλαμβάνει όλους τους μηχανισμούς που διαθέτει ο άνθρωπος για να αναγνωρίζει και αντιδρά εναντίον των μολυσματικών ή ξένων παραγόντων. Η ανοσία διακρίνεται σε δύο κατηγορίες: τη φυσική ή μη ειδική ανοσία και την ειδική ή επίκτητη ανοσία (Vander, Sherman & Luciano, 2001).

### **1.1.1 Μη ειδική ανοσία**

Η μη ειδική ή αλλιώς φυσική ανοσία περιλαμβάνει όλους τους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος που προστατεύουν τον οργανισμό χωρίς να αναγνωρίζουν την ειδική ταυτότητα των βλαπτικών παραγόντων. Είναι η πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού. Πρόκειται για γενικούς μηχανισμούς άμυνας που δεν είναι μοναδικοί για ένα συγκεκριμένο μικροοργανισμό ή ξένη ουσία.

Πολλά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος διαθέτουν μεμβρανικούς υποδοχείς που έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να συνδέονται με συγκεκριμένους υδατάνθρακες, γλυκολιπίδια και λιποπρωτεΐνες που συναντώνται στα κυτταρικά τοιχώματα των μικροοργανισμών (Takeuchi & Akira, 2010).

Στις επιφάνειες του σώματος βρίσκονται φραγμοί όπως η κεράτινη στοιβάδα του ακέρατου δέρματος που εμποδίζει τη διείσδυση των μικροοργανισμών (Matsui & Amagai, 2015). Οι ιδρωτοποιοί και σμηγματογόνοι αδένες εκκρίνουν ουσίες που έχουν αντιμικροβιακή δράση. Επίσης τα επιθήλια που καλύπτουν εσωτερικά το αναπνευστικό, το ανώτερο πεπτικό και το ουροποιητικό σύστημα παράγουν και εκκρίνουν βλέννα. Οι βλενώδεις εκκρίσεις είναι πλούσιες σε πρωτεΐνες με αντιμικροβιακή δράση. Για παράδειγμα η λυσοζύμη είναι ένα ένζυμο που συναντάται

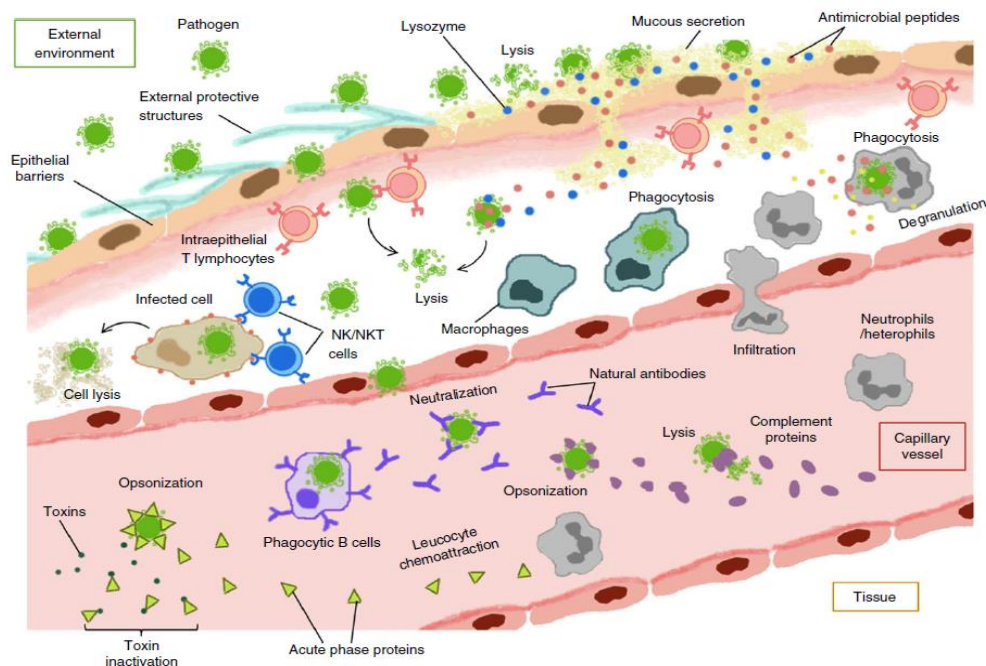
σε μεγάλες ποσότητες στα δάκρυα, στο σάλιο και στις ρινικές εκκρίσεις και καταστρέφει τα βακτήρια προκαλώντας υδρόλυση του κυτταρικού τους τοιχώματος (Zimmerman et al, 2010). Η βλέννα είναι κολλώδης και παγιδεύει τους μικροοργανισμούς, οι οποίοι στη συνέχεια καταστρέφονται. Στους βλεννογόνους που διαθέτουν κροσσούς οι μικροοργανισμοί προωθούνται και αποβάλλονται από το σώμα. Στη μη ειδική ανοσία συμβάλλουν ακόμη τα μη παθογόνα μικρόβια που συναντώνται φυσιολογικά σε διάφορα σημεία του σώματος (όπως στο δέρμα και στο έντερο). Τα μικρόβια αυτά εμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων παθογόνων μικροβίων που μπορούν να εγκατασταθούν στην ίδια περιοχή του σώματος.

Σε περίπτωση μόλυνσης ή τραυματισμού τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος συγκεντρώνονται στο σημείο αυτό και πραγματοποιούνται οι διαδικασίες της φλεγμονής. Σκοπός της είναι η εξουδετέρωση του ξένου εισβολέα και η αποκατάσταση της ιστικής βλάβης (Akira et al, 2006). Η αλληλουχία των γεγονότων της φλεγμονώδους αντίδρασης περιλαμβάνει αρχικά την αύξηση της κυκλοφορίας του αίματος λόγω της διαστολής των τοπικών αιμοφόρων αγγείων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την τοπική ερυθρότητα και την αύξηση της θερμοκρασίας. Επίσης αυξάνεται η διαπερατότητα των τριχοειδών και έτσι διαχέονται οι πρωτεΐνες και διηθείται πλάσμα στο μεσοκυττάριο υγρό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία οιδήματος στη φλεγμαίνουσα περιοχή. Τέλος τα λευκοκύτταρα μεταναστεύουν από τα φλεβίδια προς τους γύρω ιστούς και συγκεκριμένα προς τη θέση της φλεγμονής. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται χημειοταξία και αρχικά αφορά τα ουδετερόφιλα, στη συνέχεια όμως εμπλέκονται τα μονοκύτταρα, που μετατρέπονται σε μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί καταστρέφονται με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης ή κάποιες φορές καταστρέφονται από αντιμικροβιακές ουσίες που απελευθερώνονται από τα φαγοκύτταρα στο εξωκυττάριο υγρό.

Το συμπλήρωμα είναι μια οικογένεια τριάντα πρωτεϊνών στον ορό του αίματος με διάφορες λειτουργίες. Μπορούν να εξολοθρεύσουν τους μικροοργανισμούς χωρίς τη διαμεσολάβηση της φαγοκυττάρωσης. Προκαλούν βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών μέσω του μεμβρανοεπιθητικού συμπλέγματος (Membrane Attack Complex- MAC) και τελικώς τον θάνατό τους. Στο σύστημα του συμπληρώματος συμβαίνει ένας καταρράκτης ενεργοποιήσεων και η μία πρωτεΐνη ενεργοποιεί την επόμενη. Όταν υπάρξει μία μόλυνση από κάποιο

μικροοργανισμό μπορεί να ενεργοποιηθεί η εναλλακτική οδός του συμπληρώματος και στη συνέχεια η φαγοκυττάρωση. Επίσης τα μόρια του συμπληρώματος ελέγχουν τις λειτουργίες της φλεγμονής καθώς προκαλούν διαστολή των αγγείων, αυξημένη διαπερατότητα των τριχοειδών για τις πρωτεΐνες και χημειοταξία (Dunkelberger & Song, 2010).

Οι ιντερφερόνες (INF) είναι κυτταροκίνες που εμποδίζουν μη ειδικά την εξάπλωση αρκετών ιογενών μολύνσεων. Στα θηλαστικά έχουν εντοπιστεί μέχρι στιγμής τρεις τύποι INF: INF τύπου I, που περιλαμβάνει τις INF-α, INF-β, INF-ω, INF-κ και INF-ε, INF τύπου II που περιλαμβάνει την INF- γ και INF τύπου III που περιλαμβάνει την INF-λ (Riera Romo et al, 2016). Όταν ένα κύτταρο μολυνθεί από κάποιο ιό παράγει ιντερφερόνη και την εκκρίνει στο εξωκυττάριο υγρό. Στη συνέχεια η ιντερφερόνη συνδέεται με υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια του ίδιου κυττάρου ή σε γειτονικά του και προκαλεί τη σύνθεση πρωτεϊνών που εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό του ιού (Vander, Sherman & Luciano, 2001).



Εικόνα 1-1. Σχηματική απεικόνιση των κύριων μηχανισμών της μη ειδικής ανοσίας (Riera Romo et al, 2016).

### 1.1.2 Ειδική ανοσία

Η μη ειδική ανοσία ενεργοποιεί την ειδική ή επίκτητη ή αλλιώς προσαρμοστική ανοσία (Iwasaki & Medzhitov, 2015). Η ειδική ανοσία αναγνωρίζει

εξειδικευμένα κάποιοι ξένο ως προς τον ανθρώπινο οργανισμό παράγοντα, δηλαδή κάποιο αντιγόνο όπως έναν παθογόνο μικροοργανισμό, μία ξένη ουσία μη μικροβιακής φύσεως ή κύτταρο. Αντιδρά παράγοντας εξειδικευμένα κύτταρα (λεμφοκύτταρα) και πρωτεΐνες (αντισώματα), ώστε να εξουδετερώσει τον εισβολέα. Η επίκτητη ανοσία εκτός από την ειδικότητα εμφανίζει μνήμη, δηλαδή ικανότητα διατήρησης της ανάμνησης των αντιγόνων με τα οποία έχει έλθει σε επαφή, έτσι ώστε όταν έρθει για δεύτερη φορά σε επαφή με αυτά να αντιδρά γρηγορότερα (Bonilla & Oettgen, 2010).

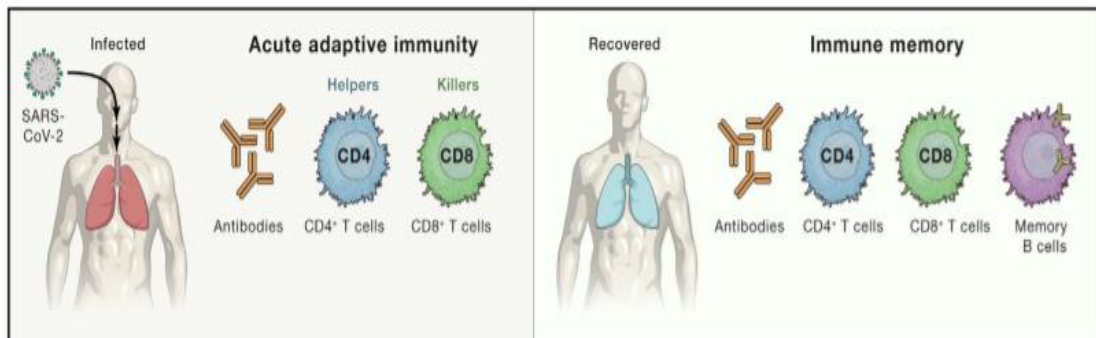
## **1.2 Λεμφοκύτταρα**

Στους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος συμμετέχουν πολλά και διαφορετικά είδη κυττάρων. Τα κύτταρα όμως που διαδραματίζουν το σπουδαιότερο ρόλο στην ειδική ανοσία είναι τα λεμφοκύτταρα που αποτελούν το 20-35 % των λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος. Πρόκειται για σχεδόν στρογγυλά κύτταρα με διάμετρο 6- 10 μm και πολύ μεγάλο πυρήνα. Τα λεμφοκύτταρα διαθέτουν στην κυτταρική τους μεμβράνη υποδοχείς με τους οποίους αναγνωρίζουν τα αντιγόνα. Το κάθε λεμφοκύτταρο είναι ειδικό για έναν και μόνο τύπο αντιγόνου.

Η σύνδεση του αντιγόνου με τον υποδοχέα προκαλεί την λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση. Δηλαδή πυροδοτείται ένας κύκλος κυτταρικών διαιρέσεων από όπου προκύπτουν πολλά λεμφοκύτταρα. Μάλιστα διαφοροποιούνται σε δύο τύπους, τα Β λεμφοκύτταρα και τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα. Επίσης παράγεται και ένας τρίτος τύπος λεμφοκυττάρων τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα που εκκρίνουν κυτταροκίνες που ενισχύουν την ενεργοποίηση και τη λειτουργία των Β λεμφοκυττάρων και των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων (Vander, Sherman & Luciano, 2001).

Όλοι αυτοί οι τύποι των ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων επιτίθενται εναντίον των ειδικών αντιγόνων που προκάλεσαν την παραγωγή τους. Μόλις ολοκληρωθεί η ανοσολογική απόκριση τα περισσότερα από αυτά τα κύτταρα οδηγούνται σε θάνατο με απόπτωση. Κάποια όμως από αυτά τα κύτταρα παραμένουν

ως κύτταρα μνήμης που θα βοηθήσουν τον οργανισμό να ανταπεξέλθει ταχύτατα και αποτελεσματικά σε περίπτωση μελλοντικής έκθεσης στο ίδιο αντιγόνο.

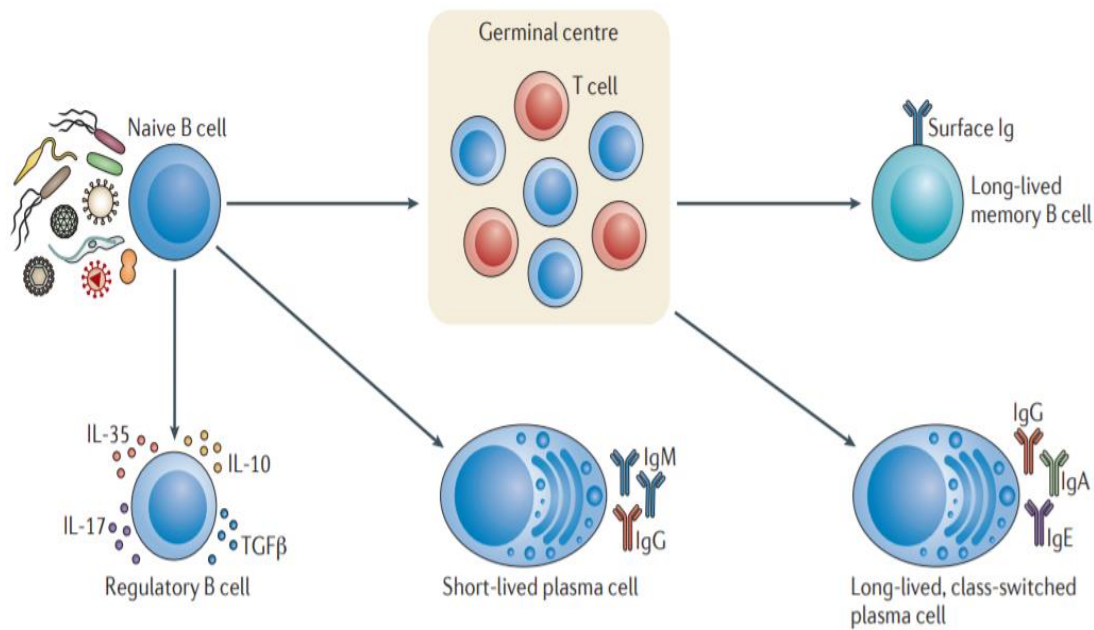


**Εικόνα 1-2.** Τα κύρια συστατικά της ειδικής ανοσίας σε μία ιογενής λοίμωξη (Sette & Crotty, 2021).

Όλα τα λεμφοκύτταρα παράγονται από ένα αρχέγονο πολυδύναμο κύτταρο στο μυελό των οστών, που είναι ένα πρωτογενές λεμφοειδές όργανο. Τα B λεμφοκύτταρα ωριμάζουν στο μυελό των οστών και στη συνέχεια μεταφέρονται μέσω του αίματος στα δευτερογενή λεμφοειδή όργανα όπου προκύπτουν νέα B λεμφοκύτταρα με κυτταρική διαίρεση (Nothelfer et al, 2015). Δευτερογενή λεμφοειδή όργανα είναι οι λεμφαδένες, ο σπλήνας, οι αμυγδαλές και οι περιοχές με λεμφικό ιστό στους βλεννογόνους του εντερικού, του αναπνευστικού, του γεννητικού και του ουροποιητικού σωλήνα. Τα B λεμφοκύτταρα με την ενεργοποίησή τους διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα και παράγουν αντισώματα (Mauri & Bosma, 2012). Τα αντισώματα είναι πρωτεΐνες που διοχετεύονται μέσω του αίματος σε όλο τον οργανισμό για να στοχεύσουν συγκεκριμένα αντιγόνα. Συνδέονται με αυτά τα αντιγόνα και κατευθύνουν μια επίθεση κατά την οποία εξοντώνονται τα αντιγόνα ή τα κύτταρα που φέρουν τα αντιγόνα. Τα B λεμφοκύτταρα όμως μπορούν να διαφοροποιηθούν και σε κύτταρα μνήμης, που έχουν την ικανότητα να απαντούν πιο γρήγορα και πιο αποτελεσματικά σε περίπτωση που ξαναεμφανιστεί το συγκεκριμένο αντιγόνο και μολύνει ξανά τον οργανισμό. Τα B κύτταρα μνήμης ζουν για μεγάλο χρονικό διάστημα και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε πλασματοκύτταρα μετά από μία δευτερογενή μόλυνση. Ακόμη παράγονται τα B ρυθμιστικά κύτταρα που έχουν ανοσοκατασταλτική λειτουργία. Αναστέλλουν τη δράση των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων εκκρίνοντας αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως η ιντερλευκίνη-10 (IL-10), ιντερλευκίνη-17 (IL-17), ιντερλευκίνη-35 (IL-35) και αυξητικός παράγοντας



μετασχηματισμού  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Εικόνα 1-3). Η ανοσολογική απόκριση που επιτελείται από τα αντισώματα είναι η λεγόμενη χυμική ανοσία που πήρε το όνομά της από το γεγονός ότι τα αντισώματα κυκλοφορούν στο αίμα και στο εξωκυττάριο υγρό, δηλαδή στους χυμούς του σώματος (Zimmerman et al, 2010).



**Εικόνα 1-3. Ανοσολογικές αποκρίσεις των B λεμφοκυττάρων (Nothelfer et al, 2015).**

Τα T λεμφοκύτταρα σε αντίθεση με τα B λεμφοκύτταρα όταν φεύγουν από τον μυελό των οστών είναι ακόμη ανώριμα. Γι' αυτό μετακινούνται προς το θύμο αδένι, που είναι επίσης ένα πρωτογενές λεμφοειδές όργανο, όπου ωριμάζουν (Takahama, 2006). Στη συνέχεια κινούνται και αυτά προς τα δευτερογενή λεμφοειδή όργανα όπου υφίστανται κυτταρική διαίρεση και έτσι προκύπτουν νέα T λεμφοκύτταρα. Τα ώριμα T κύτταρα κατηγοριοποιούνται σε δύο κατηγορίες με βάση την έκφραση των πρωτεϊνών CD4 ή CD8 στις κυτταρικές τους μεμβράνες. Έτσι προκύπτουν τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα ( $CD8^+$  T) και τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα ( $CD4^+$  T) (Germain, 2002). Τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα ( $CD8^+$  T) μετά την ενεργοποίησή τους στοχεύουν και σκοτώνουν κύτταρα που έχουν προσβληθεί από ιούς και καρκινικά κύτταρα (Zhang & Bevan, 2011). Τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα ( $CD4^+$  T) συμμετέχουν σε μια σειρά βοηθητικών και εκτελεστικών λειτουργιών (Zhu, et al, 2010). Μόλις ενεργοποιηθούν παράγουν τις κυτταροκίνες, οι

οποίες διεγείρουν και επιστρατεύουν τα Β λεμφοκύτταρα ώστε να παράγουν τα αντισώματα και τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα που με τη σειρά τους εξοντώνουν το βλαπτικό παράγοντα (Kishton, 2017). Αυτή η ανοσολογική απόκριση που επιτελείται χωρίς τη συμμετοχή αντισωμάτων αλλά με τη συμμετοχή μόνο ενεργοποιημένων Τ λεμφοκυττάρων είναι η λεγόμενη κυτταρική ανοσία. Οι δύο μηχανισμοί ειδικής ανοσίας, η χυμική και η κυτταρική ανοσία, δεν είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους αλλά συσχετίζονται και συνεργάζονται μεταξύ τους αρμονικά (Zimmerman et al, 2010).

Τέλος υπάρχει και ένας ακόμη πληθυσμός λευκοκυττάρων, που παράγονται επίσης στο μυελό των οστών, τα λεγόμενα φυσικά φονικά κύτταρα (Natural Killer Cells- NK κύτταρα). Τα NK κύτταρα είναι μεγάλα σε μέγεθος λευκοκύτταρα με άφθονα κοκκία στο κυτταρόπλασμά τους. Στοχεύουν τα ίδια κύτταρα που στοχεύουν και τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα, δηλαδή κύτταρα που έχουν προσβληθεί από ιούς και καρκινικά κύτταρα (Kucuksezer et al, 2021). Σε αντίθεση με τα Β και τα Τ λεμφοκύτταρα τα NK κύτταρα δεν έχουν ειδικότητα όσον αφορά στα αντιγόνα, καθώς δεν διαθέτουν ειδικούς υποδοχείς ούτε αναγνωρίζουν κάποιο ειδικό αντιγόνο. Λαμβάνουν μέρος όμως στην ειδική ανοσία επειδή η δράση τους ενισχύεται σημαντικά είτε από ορισμένα αντισώματα είτε από ορισμένες κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα που ενεργοποιούνται στη διάρκεια των ειδικών ανοσολογικών αποκρίσεων. Μάλιστα, τα NK κύτταρα όταν ενεργοποιούνται παράγουν διάφορες κυτταροκίνες όπως την ιντερφερόνη- γ (IFN- γ), την ιντερλευκίνη- 1 (IL- 1) και τον αυξητικό παράγοντα των πολυμορφοπύρηνων και μονοπύρηνων (GM- CSF) που βοηθούν στη ρύθμιση της ανοσολογικής αντίδρασης του οργανισμού.

### **1.3 Ανοσολογική απόκριση**

Η ειδική ανοσολογική απόκριση ως απάντηση σε ένα αντιγόνο εκδηλώνεται με δύο βασικούς μηχανισμούς, που δεν είναι αποκομμένοι μεταξύ τους αλλά συνεργάζονται, την χυμική ανοσία και την κυτταρική ανοσία (Zimmerman et al, 2010).

### **1.3.1 Χυμική ανοσία**

Η απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος που πραγματοποιείται με τη βοήθεια αντισωμάτων είναι γνωστή ως χυμική ανοσία. Η χυμική ανοσία πήρε το όνομά της από το γεγονός ότι τα αντισώματα κυκλοφορούν στο αίμα και στο εξωκυττάριο υγρό, δηλαδή στους χυμούς του σώματος (Zimmerman et al, 2010). Αντιμετωπίζει κυρίως τους μικροοργανισμούς που δεν εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων του οργανισμού καθώς και τις τοξίνες που παράγουν αυτοί οι μικροοργανισμοί.

Τα Β λεμφοκύτταρα όπως προαναφέρθηκε μετά την ενεργοποίησή τους διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα και παράγουν αντισώματα. Κάθε Β λεμφοκύτταρο ή κάθε κλώνος Β λεμφοκυττάρων μπορεί να εκκρίνει μόνο ένα ειδικό αντίσωμα. Τα Β λεμφοκύτταρα διαθέτουν στην κυτταρική τους επιφάνεια υποδοχείς που είναι αντίγραφα του ειδικού αντισώματος που το κύτταρο έχει την ικανότητα να εκκρίνει. Η ποικιλομορφία των Β λεμφοκυττάρων οφείλεται στην έκφραση διαφορετικών υποδοχέων (Budeus et al, 2010). Αυτοί οι υποδοχείς των Β λεμφοκυττάρων μπορούν να συνδέονται με το αντιγόνο είτε αυτό είναι ελεύθερο μόριο διαλυμένο στο εξωκυττάριο υγρό είτε βρίσκεται στην επιφάνεια ενός ξένου ως προς τον οργανισμό κυττάρου ή ουσίας.

Κατά την πρώτη επαφή τους με το αντιγόνο τα Β λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται, διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα και παράγουν αντισώματα. Αυτή η πρωτογενής αντίδραση και η παραγωγή των αντισωμάτων είναι πολύ αργή και διαρκεί αρκετές μέρες. Όμως τα Β λεμφοκύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν και σε Β κύτταρα μνήμης, επομένως σε περίπτωση νέας έκθεσης του οργανισμού στο ίδιο αντιγόνο θα υπάρξει μία ταχύτερη και πολύ πιο έντονη δευτερογενής αντίδραση με άφθονη παραγωγή αντισωμάτων.

Η χυμική ανοσία διακρίνεται σε ενεργός και παθητική χυμική ανοσία. Στην ενεργό χυμική ανοσία ο ίδιος ο οργανισμός παράγει μόνος του τα αντισώματα όταν έρθει σε επαφή με το αντιγόνο ή όταν δεχθεί ένα εμβόλιο. Αντιθέτως, στην παθητική χυμική ανοσία χορηγούνται στον οργανισμό έτοιμα αντισώματα, όπως για παράδειγμα από τη μητέρα στο έμβρυο μέσω του πλακούντα καθώς και από τη μητέρα στο νεογνό μέσω του μητρικού θηλασμού, για την άμυνα του τους πρώτους

μήνες της ζωής του. Η παθητική χυμική ανοσία χρησιμοποιείται κλινικά όταν χορηγείται για παράδειγμα ανθρώπινη γ-σφαιρίνη σε ασθενείς που έχουν εκτεθεί στον ιό της ηπατίτιδας. Όμως η χυμική παθητική ανοσία προσφέρει πρόσκαιρη προστασία που διαρκεί μόνο δύο ή τρεις εβδομάδες περίπου (Vander, Sherman & Luciano, 2001).

### **1.3.2 Κυτταρική ανοσία**

Η απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος που διαμεσολαμβάνεται χωρίς τη συμμετοχή αντισωμάτων, αλλά με τη συμμετοχή κυρίως ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων και φαγοκυττάρων λέγεται κυτταρική ανοσία. Η κυτταρική ανοσία αντιμετωπίζει κυρίως τους μικροοργανισμούς που έχει εισβάλει στο εσωτερικό των κυττάρων του οργανισμού (Roitt, Brostoff & Male, 2000).

Τα Τ λεμφοκύτταρα διαθέτουν στην κυτταρική τους επιφάνεια υποδοχείς που δεν είναι αντισώματα καθώς αυτά τα λεμφοκύτταρα δεν μπορούν να παράγουν αντισώματα. Οι υποδοχείς αυτοί είναι ειδικές περιοχές σύνδεσης με το αντιγόνο που διαφέρουν από τον ένα κλώνο Τ λεμφοκυττάρων στον άλλο. Ο υποδοχέας των Τ λεμφοκυττάρων δεν μπορεί να συνδεθεί εξειδικευμένα με κάποιο αντιγόνο παρά μόνο αν το αντιγόνο έχει πρώτα σχηματίσει σύμπλεγμα με μία από τις πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης του ίδιου του οργανισμού. Αυτές οι μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι γνωστές ως μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC πρωτεΐνες) και είναι μοναδικές για κάθε άτομο, με εξαίρεση τα μονοζυγωτικά δίδυμα (Barber & Parham, 1993). Υπάρχουν δύο τάξεις MHC πρωτεϊνών. Οι MHC πρωτεΐνες τάξης I συναντώνται στην κυτταρική μεμβράνη όλων των σωματικών κυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού, με μοναδική εξαίρεση τα ερυθροκύτταρα. Αντιθέτως, οι MHC πρωτεΐνες τάξης II συναντώνται μόνο στην κυτταρική μεμβράνη των μακροφάγων, των Β λεμφοκυττάρων και των μακροφαγομιμητικών κυττάρων. Τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα ( $CD8^+$  Τ) απαιτούν το αντιγόνο να είναι συνδεδεμένο με MHC πρωτεΐνες τάξης I, ενώ τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα ( $CD4^+$  Τ) απαιτούν το αντιγόνο να είναι συνδεδεμένο με MHC πρωτεΐνες τάξης II (Song & Deng, 2020).

Τα κύτταρα που μπορούν να σχηματίσουν αυτά τα συμπλέγματα με τις ΜHC πρωτεΐνες και να παρουσιάσουν το αντιγόνο στα Τ λεμφοκύτταρα είναι γνωστά ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs). Για τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα λειτουργούν μόνο τα μακροφάγα, τα Β λεμφοκύτταρα και τα μακροφαγοκυτταρικά κύτταρα. Αυτά φαγοκυτταρώνουν μη ειδικά ένα αντιγόνο και το υδρολύουν σε μικρά πεπτιδικά τμήματα που συνδέονται στη συνέχεια με ΜHC πρωτεΐνες τάξης II (Ting & Trowsdale, 2002). Αυτά τα πεπτιδικά τμήματα είναι οι λεγόμενοι επίτοποι του αντιγόνου που σχηματίζουν συμπλέγματα με τις ΜHC πρωτεΐνες. Τα συμπλέγματα αυτά συνδέονται με τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα, προκαλούν την έκκριση της ιντερλευκίνης-1 (IL- 1) και του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor- TNF) και τα διεγείρουν. Για τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα λειτουργούν κύτταρα που έχουν προσβληθεί από ιούς και καρκινικά κύτταρα. Στην περίπτωση αυτή τα αντιγόνα είναι ενδογενή, δηλαδή είναι πρωτεΐνες που συντίθενται από τα κύτταρα που έχουν μολυνθεί από ιούς και τα καρκινικά κύτταρα και υδρολύονται σε μικρά πεπτιδικά τμήματα που συνδέονται στη συνέχεια με ΜHC πρωτεΐνες τάξης I. Τα συμπλέγματα αυτά έπειτα συνδέονται με τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα και τα ενεργοποιούν.

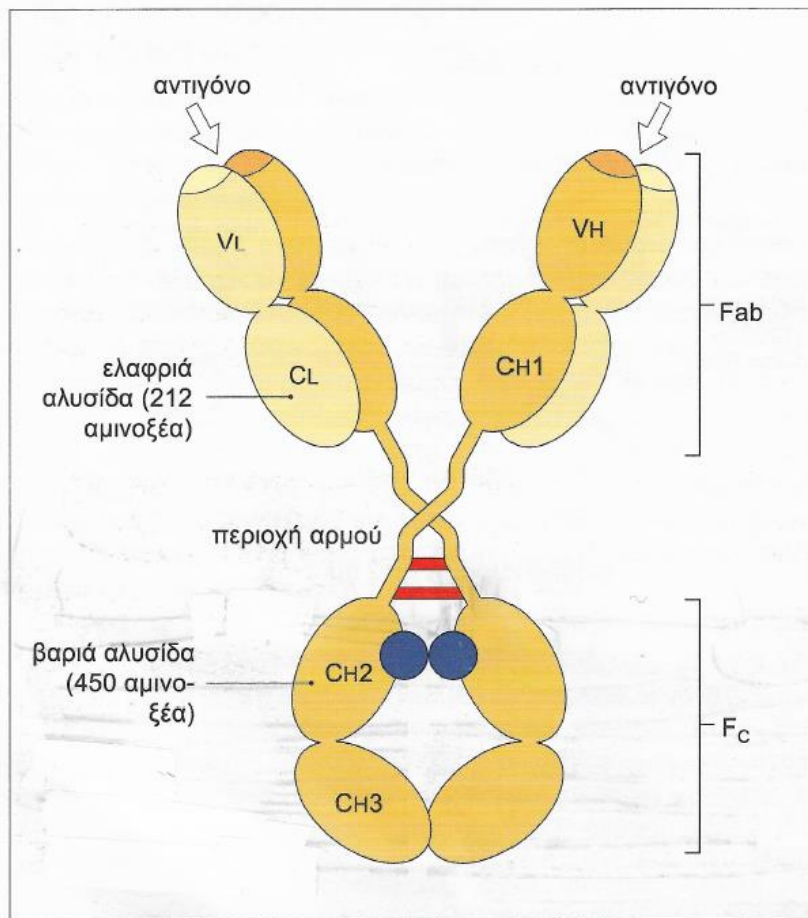
Τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα μετά την ενεργοποίησή τους στοχεύουν και καταστρέφουν κύτταρα που έχουν προσβληθεί από ιούς και καρκινικά κύτταρα (Zhang & Bevan, 2011). Τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα ( $CD4^+$  Τ) συμμετέχουν σε μια σειρά βοηθητικών και εκτελεστικών λειτουργιών (Zhu, et al, 2010). Μόλις ενεργοποιηθούν παράγουν τις κυτταροκίνες, οι οποίες διεγείρουν και επιστρατεύουν τα Β λεμφοκύτταρα ώστε να παράγουν τα αντισώματα και τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα που με τη σειρά τους εξοντώνουν το βλαπτικό παράγοντα (Kishton, 2017). Μόλις ολοκληρωθεί η ανοσολογική απόκριση τα περισσότερα Τ λεμφοκύτταρα οδηγούνται σε θάνατο με απόπτωση. Κάποια όμως από αυτά τα κύτταρα παραμένουν ως Τ κύτταρα μνήμης ακόμη και απουσία αντιγόνου και θα βοηθήσουν τον οργανισμό να ανταπεξέλθει ταχύτατα και αποτελεσματικά σε περίπτωση μελλοντικής έκθεσης στο ίδιο αντιγόνο (Busch et al, 2016).

## 2. Αντισώματα

### 2.1 Δομή αντισωμάτων

Κρυσταλλογραφικές μελέτες με ακτίνες X που ξεκίνησαν τη δεκαετία του 1970 αποκάλυψαν την τρισδιάστατη δομή των αντισωμάτων. Στη βάση δεδομένων Protein Data Bank (PDB) υπάρχουν παραπάνω από 3500 δομές τμημάτων αντισωμάτων καθώς και ένας αριθμός δομών ανέπαφων αντισωμάτων. Η δομή των αντισωμάτων περιλαμβάνει την αναδίπλωση των διαφόρων περιοχών τους και τα βασικά χαρακτηριστικά των θέσεων πρόσδεσης των αντιγόνων (Berman et al, 2000).

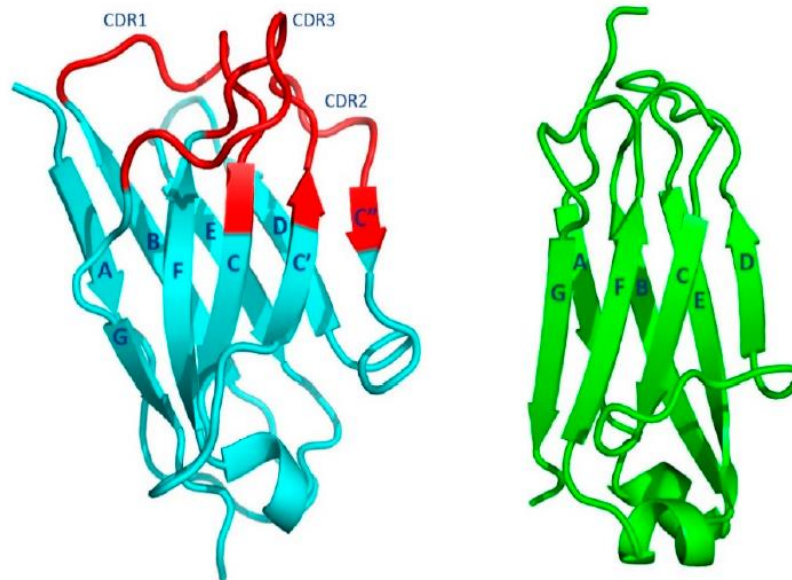
Οι ανθρώπινες ανοσοσφαιρίνες είναι πρωτεΐνες σχήματος όπως το γράμμα Y και αποτελούνται από δύο πανομοιότυπες ελαφριές αλυσίδες (Light Chains- LCs) και δύο πανομοιότυπες βαριές αλυσίδες (Heavy Chains- HCs). Στα φυσικά συστήματα μία ελαφριά και μία βαριά αλυσίδα σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές το οποίο συνδέεται με ένα άλλο πανομοιότυπο ετεροδιμερές για να σχηματίσουν μια ανέπαφη ανοσοσφαιρίνη. Οι δύο βαριές αλυσίδες μεταξύ τους καθώς και η κάθε βαριά αλυσίδα με την αντίστοιχη ελαφριά του ετεροδιμερούς συγκρατούνται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Στον άνθρωπο οι ελαφριές αλυσίδες είναι δύο τύπων, κ ή λ. Οι δύο αυτοί τύποι έχουν δύο περιοχές, μία σταθερή (CL) και μία μεταβλητή (VL). Κατά ανάλογο τρόπο και οι βαριές αλυσίδες διακρίνονται σε πέντε τύπους (α, δ, ε, γ και μ) οι οποίοι καθορίζουν την τάξη στην οποία ανήκει η ανοσοσφαιρίνη (IgA, IgD, IgE, IgG και IgM) με ένα ξεχωριστό ρόλο η καθεμία στο ανοσοποιητικό σύστημα. Σε κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης οι δύο ελαφριές αλυσίδες είναι του ίδιου τύπου καθώς και οι δύο βαριές αλυσίδες είναι επίσης του ίδιου τύπου. Οι IgA, IgD και IgG έχουν μία μεταβλητή και τρεις σταθερές περιοχές, ενώ οι IgE και IgM έχουν μία μεταβλητή και τέσσερις σταθερές περιοχές. Μία επιπρόσθετη συνδετική αλυσίδα J επιτρέπει το σχηματισμό διμερών στην IgA και πενταμερών στην IgM (Chiu et al, 2019).



Εικόνα 2-1. Δομή της IgG1 (Roitt, Brostoff & Male, 2000).

Οι μεταβλητές περιοχές των ανοσοσφαιρινών, που αλληλεπιδρούν με το αντιγόνο-στόχο, είναι το N-τελικό μισό των ελαφριών και βαριών αλυσίδων. Ενώ το C-τελικό μισό των ελαφριών και βαριών αλυσίδων αποτελούν τις σταθερές περιοχές των ανοσοσφαιρινών. Οι μεταβλητές αλλά και οι σταθερές περιοχές τόσο στις ελαφριές όσο και στις βαριές αλυσίδες αποτελούνται από περίπου 110 αμινοξέα. Η αναδίπλωση των αμινοξέων αυτών στο χώρο είναι γνωστή ως «Ανοσοσφαιρινικό δίπλωμα» (Immunoglobulin fold). Η διαμόρφωση αυτή αποτελείται από δύο β-πτυχωτά φύλλα (β-sheets) καθένα από τα οποία αποτελείται από αντιπαράλληλους β-κλώνους (β-strands). Στη σταθερή περιοχή το ένα β-πτυχωτό φύλλο έχει τέσσερις αντιπαράλληλους β-κλώνους και το άλλο β-πτυχωτό φύλλο τρεις. Τα δύο β-πτυχωτά φύλλα συγκρατούνται με δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης σχηματίζοντας πεπτιδικές θηλειές ανάμεσα στους β-κλώνους. Στη μεταβλητή περιοχή

το ένα β-πτυχωτό φύλλο έχει τέσσερις αντιπαράλληλους β-κλώνους και το άλλο β-πτυχωτό φύλλο πέντε και συγκρατούνται επίσης με δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι μεταβλητές περιοχές είναι λιγότερο συμπαγείς και σχηματίζουν μεγαλύτερες θηλιές για τη σύνδεση των β-κλώνων (Chiu et al, 2019).



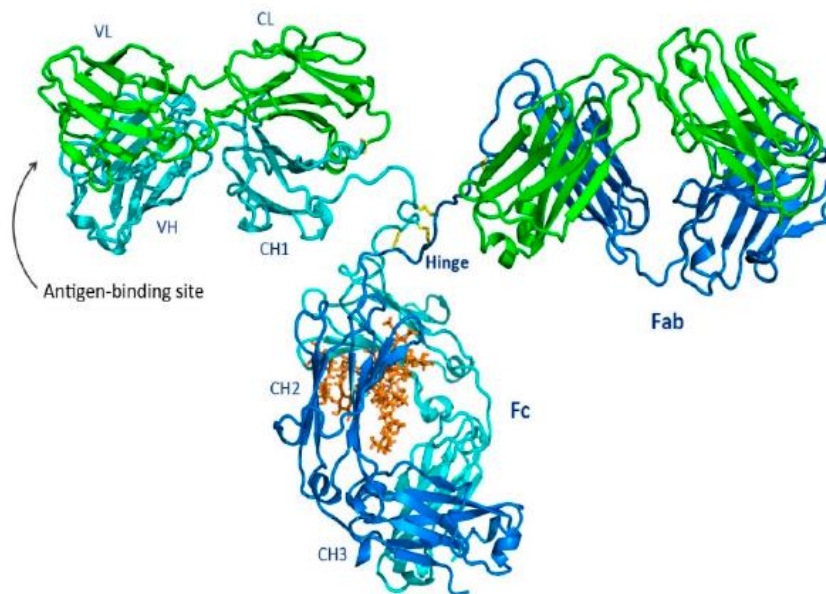
Εικόνα 2-2. Ανοσοσφαιρικό δίπλωμα (Chiu et al, 2019).

Το μόριο του αντισώματος αποτελείται από τρία λειτουργικά συστατικά, δύο θραύσματα που είναι περιοχές σύνδεσης με το αντιγόνο (Fabs: fragments antigen binding) και ένα θραύσμα που κρυσταλλώνεται εύκολα (Fc: fragment crystallizable). Τα δύο θραύσματα Fabs εμφανίζουν ένα μεγάλο βαθμό ευελιξίας στη διαμόρφωση καθώς συνδέονται στην περιοχή του αρμού με το θραύσμα Fc. Η ανακάλυψη αυτή πραγματοποιήθηκε το 1950 με τη χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων (παπαΐνης) για τη διάσπαση του μορίου της ανοσοσφαιρίνης σε μικρότερα κομμάτια.

Οι Fab περιοχές του αντισώματος σχηματίζονται από το ζευγάρι της μεταβλητής περιοχής VL και της σταθερής περιοχής CL των ελαφριών αλυσίδων καθώς και της μεταβλητής περιοχής VH και της σταθερής περιοχής CH1 των βαριών αλυσίδων. Συγκεκριμένα το ζευγάρι των VL και VH περιοχών σχηματίζουν την περιοχή σύνδεσης με το αντιγόνο. Η Fc περιοχή του αντισώματος σχηματίζεται από τις σταθερές περιοχές CH2 και CH3 των βαριών αλυσίδων (Chiu et al, 2019).



Η Fc περιοχή είναι υπεύθυνη για τις εκτελεστικές λειτουργίες και συμβάλλει στον παρατεταμένο χρόνο ημιζωής του μορίου του αντισώματος στο πλάσμα του αίματος. Οι εκτελεστικές λειτουργίες της Fc περιοχής περιλαμβάνουν τη συμμετοχή της σε μηχανισμούς θανάτωσης κυττάρων μέσω των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών και υδατανθράκων με υποδοχείς Fcγ και με συστατικά του συστήματος συμπληρώματος (Chiu & Gilliland, 2016).



Εικόνα 2-3. Αναπαράσταση της δομής του αντισώματος IgG (Chiu & Gilliland, 2016).

## 2.2 Τάξεις ανοσοσφαιρινών

### 2.2.1 IgG

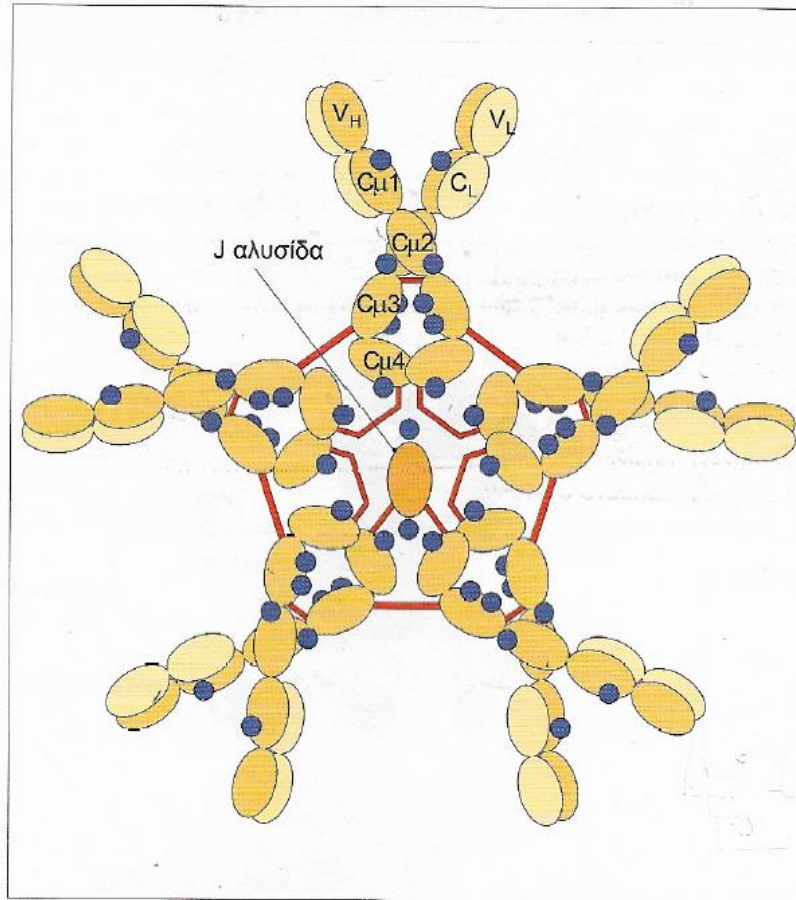
Η ανοσοσφαιρίνη G (IgG) είναι η κύρια ανοσοσφαιρίνη στον ορό του αίματος και αποτελεί το 75 % του συνολικού ποσού των ανοσοσφαιρινών. Η IgG αποτελείται από δύο βαριές αλυσίδες τύπου γ και δύο ελαφριές αλυσίδες τύπου κ ή λ. Από το 1960 γνωρίζουμε ότι υπάρχουν 4 υποτάξεις, IgG1, IgG2, IgG3 και IgG4, που έχουν κάποιες διαφορές στην αμινοξική αλληλουχία των γ αλυσίδων τους και σε κάποιες βιολογικές δράσεις όπως στην ικανότητα να συνδέονται στους Fc κυτταρικούς υποδοχείς για IgG (Fc-γRs). Η αρίθμηση αυτών των υποτάξεων αντιστοιχεί στην

αναλογία της συγκέντρωσης τους στον ορό φυσιολογικού ανθρώπου (Aschermann et al, 2010). Μια αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ των υποτάξεων της IgG είναι η θέση των δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ της σταθερής περιοχής CH1 των βαριών αλυσίδων και της σταθερής περιοχής CL των ελαφριών αλυσίδων (που συνδέουν τις βαριές με τις ελαφριές αλυσίδες) και ο αριθμός των δισουλφιδικών δεσμών στην περιοχή του αρμού (που συνδέουν τις βαριές αλυσίδες μεταξύ τους).

Ελλείψεις των IgG2, IgG3 και IgG4, μεμονωμένες ή σε συνδυασμό σχετίζονται με χρόνιες μολύνσεις, οι οποίες δεν θα γινόταν αντιληπτές αν μετρούσαμε μόνο τη συνολική συγκέντρωση της IgG (Papadea & Check, 1989). Η IgG έχει την ικανότητα να προσκολλάται στα μικρόβια βοηθώντας έτσι τη φαγοκυττάρωσή τους, μια λειτουργία που είναι γνωστή ως οψωνισμός. Όσον αφορά την ενεργοποίηση του συμπληρώματος η IgG3 είναι πιο δραστική, ενώ οι IgG1 και IgG2 λιγότερο δραστικές. Η IgG4 δεν μπορεί να ενεργοποιήσει το συμπλήρωμα. Ακόμη οι υποτάξεις IgG1, IgG2 και IgG4 διέρχονται από τον πλακούντα, συνεπώς περνούν από την έγκυο μητέρα προς το έμβρυο, οπότε παρέχουν κάποια προστασία τους πρώτους μήνες της ζωής του νεογέννητου. (Valenzuela & Schaub, 2018).

### **2.2.2 IgM**

Η ανοσοσφαιρίνη M (IgM) αποτελεί περίπου το 10 % του συνολικού ποσού των ανοσοσφαιρινών. Το μόριο της έχει μεγάλο μοριακό βάρος (M.B. = 970.000) που οφείλεται στο ότι είναι ένα πενταμερές της βασικής δομής των 4 αλυσίδων. Οι βαριές αλυσίδες μ διαθέτουν μία επιπλέον επικράτεια στη σταθερή περιοχή, δηλαδή αντί για τρεις διαθέτουν τέσσερις. Επίσης υπάρχει μία επιπρόσθετη πεπτιδική αλυσίδα J, 137 αμινοξέων, η οποία συνδέεται με δισουλφιδικούς δεσμούς στα καρβοξυτελικά 18-αμινοξικά ακραία πεπτίδια των ξεχωριστών μονομερών.



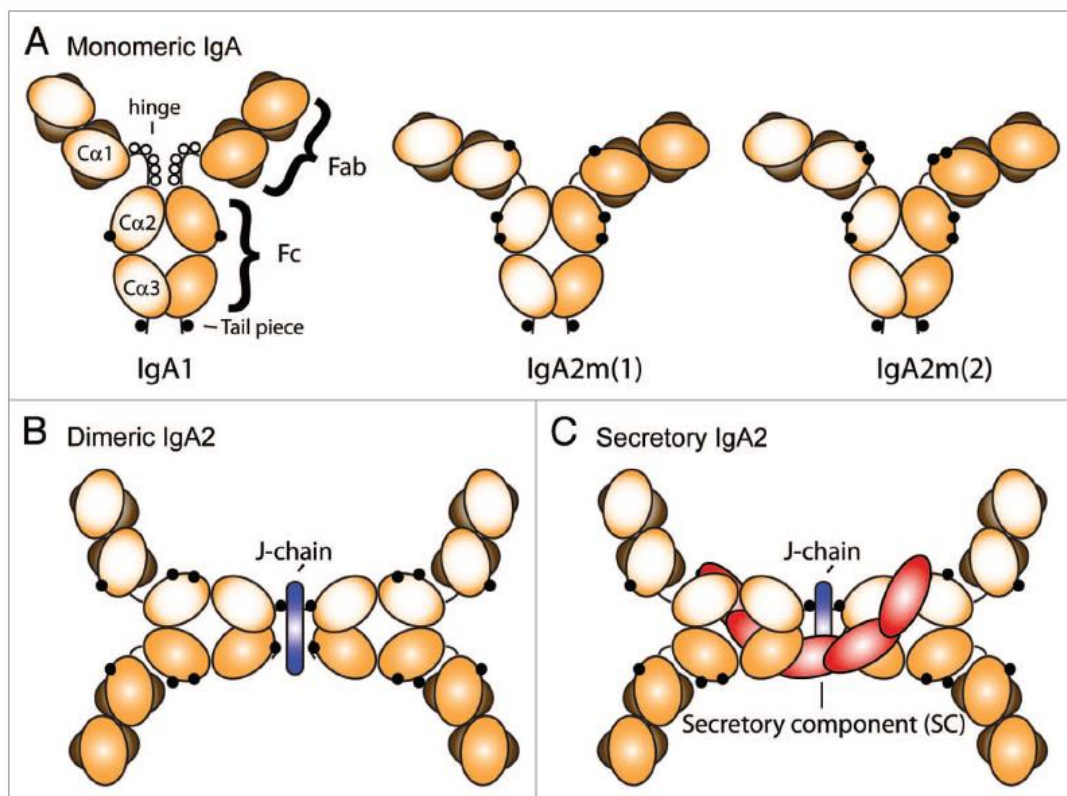
Εικόνα 2-4. Δομή της ανθρώπινης IgM (Roitt, Brostoff & Male, 2000).

Η IgM είναι η πρώτη ανοσοσφαιρίνη που παράγεται κατά την ανοσοποιητική απόκριση ως απάντηση στην αρχική έκθεση στο αντιγόνο και στη συνέχεια ακολουθεί η παραγωγή της IgG. Επίσης είναι η πρώτη ανοσοσφαιρίνη που εκφράζεται στο έμβρυο, περίπου στις είκοσι πρώτες εβδομάδες. Η παρουσία της περιορίζεται μόνο μέσα στα αγγεία, σε αντίθεση με την IgG που διεισδύει και σε όλα τα υγρά του σώματος. Σ' αυτήν ανήκουν τα αντισώματα που ενεργοποιούν το συμπλήρωμα για να γίνει η κυτταρόλυση και να αμυνθεί ο οργανισμός σε καταστάσεις μικροβιαμίας (Roitt, Brostoff & Male, 2000).

### 2.2.3 IgA

Η ανοσοσφαιρίνη A (IgA) αποτελεί το 15% των ανοσοσφαιρινών του ανθρώπινου ορού. Εκτός από τον ορό του αίματος ανευρίσκεται και σε Διπλωματική Εργασία

οροβλεννογόνες εκκρίσεις του σώματος όπως σάλιο, δάκρυα, πρωτόγαλα, γάλα, τραχειοβρογχικές και ουρογεννητικές εκκρίσεις. Στον ανθρώπινο ορό η IgA εμφανίζεται ως μονομερές που αποτελείται από τέσσερις αλυσίδες, ενώ στα πιο πολλά θηλαστικά οι IgA του ορού είναι κυρίως πολυμερείς και συγκεκριμένα συνήθως διμερείς. Επιπλέον, στον άνθρωπο η IgA συναντάται σε δύο υποτάξεις, IgA1 και IgA2, που διαφέρουν στην περιοχή του αρμού σε 18 αμινοξέα. Η IgA1 έχει ένα αρμό που είναι μακρύτερος κατά 13 αμινοξέα από ότι εκείνος του IgA2, συνεπώς είναι πιο ευάλωτος σε βακτηριακές πρωτεάσες. Η IgA2 υποδιαιρείται σε IgA2m(1) και σε IgA2m(2). Η IgA1 είναι η επικρατούσα υποτάξη στον ορό, ενώ η IgA2 στις εκκρίσεις. Η μεταμεταφραστική γλυκοσυλίωση διαφέρει στις υποτάξεις IgA1 και IgA2 καθώς και στις IgA2m(1) και σε IgA2m(2) (Bakema & Egmond, 2011).



Εικόνα 2-5. Σχηματικό μοντέλο Α) της μονομερούς IgA1, IgA2m(1) και IgA2m(2), Β) της διμερούς IgA2 και Γ) της εκκριτικής IgA2 (Bakema & Egmond, 2011).

Η εκκριτική IgA (sIgA) υπάρχει κυρίως στη διμερή μορφή και μπορεί να ανήκει στη μία ή στην άλλη υπόταξη (IgA1 ή IgA2). Είναι άφθονη στις εκκρίσεις και

Διπλωματική Εργασία 17

αποτελείται από δύο μονάδες IgA, ένα εκκριτικό συστατικό και μία αλυσίδα J. Οι μονάδες IgA και η αλυσίδα J συντίθενται στα πλασματοκύτταρα, ενώ το εκκριτικό συστατικό συντίθεται στα επιθηλιακά κύτταρα και προστατεύει την IgA από πρωτεολυτική διάσπαση. Αρκετοί μικροοργανισμοί που βρίσκονται στην ανώτερη αναπνευστική οδό ελευθερώνουν πρωτεάσες που διασπούν την IgA1 (Roitt, Brostoff & Male, 2000).

#### **2.2.4 IgD**

Η ανοσοσφαιρίνη D (IgD) βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα στον ορό του αίματος, καθώς αποτελεί λιγότερο από το 1% του συνόλου των ανοσοσφαιρινών. Βρίσκεται σε αφθονία στην κυτταρική μεμβράνη πολλών B λεμφοκυττάρων και ίσως παίζει κάποιο ρόλο στην ενεργοποίησή τους από τα αντιγόνα αλλά η ακριβής λειτουργία της δεν είναι πλήρως γνωστή. Επίσης η IgD προσδέεται σε βασεόφιλα ενεργοποιώντας τα να παράγουν αντιμικροβιακούς παράγοντες για την άμυνα του αναπνευστικού συστήματος (Chen & Cerutti, 2011).

#### **2.2.5 IgE**

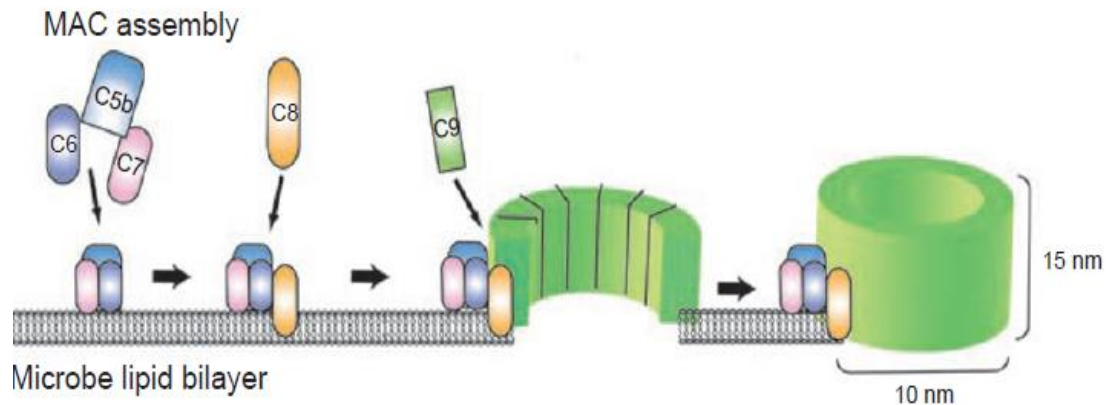
Η ποσότητα της ανοσοσφαιρίνης E (IgE) στον ορό φυσιολογικών ατόμων είναι απειροελάχιστη καθώς αποτελεί 0,005% της συνολικής ποσότητας των ανοσοσφαιρινών. Τα αντισώματα της κατηγορίας αυτής βρίσκονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των βασεόφιλων και των μαστοκυττάρων. Ευαισθητοποιούν τα κύτταρα των βλεννογόνων επιφανειών όπως του επιπεφυκότα, του ρινικού και του βρογχικού βλεννογόνου που σχετίζονται με φαινόμενα των αλλεργικών νοσημάτων όπως το άσθμα, η αλλεργική ρινίτιδα και η αποπική δερματίτιδα. Η IgE φαίνεται ότι παίζει κάποιο ρόλο στις λοιμώξεις από παράσιτα και κυρίως από έλμινθες, γι' αυτό στις καταστάσεις αυτές η συγκέντρωσή της στον ορό αυξάνεται σημαντικά (Gould et al, 2003)

## **2.3 Ρόλος των αντισωμάτων και μηχανισμός δράσης**

Η βασική λειτουργία ενός αντισώματος είναι η πρόσδεσή του στο αντιγόνο. Όπως προαναφέρθηκε τα Β λεμφοκύτταρα διαθέτουν στην κυτταρική τους επιφάνεια ανοσοσφαιρίνες- υποδοχείς που συνδέουν το αντιγόνο. Από τη σύνδεση αυτή πυροδοτείται άμεσα η ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων. Άλλοτε βέβαια προηγείται η δράση των αντιγονοπαρουσιαστικών κύτταρα (APCs) που παρουσιάσουν το αντιγόνο στα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους απελευθερώνουν κυτταροκίνες και ενεργοποιούν τα Β λεμφοκύτταρα. Ακολούθως τα Β λεμφοκύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα τα οποία στη συνέχεια έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν αντισώματα. Συνεπώς τα αντισώματα που βρίσκονται στην επιφάνεια των Β λεμφοκυττάρων με την πρόσδεσή τους στο αντιγόνο βοηθούν στην αναγνώρισή του αντιγόνου. Επιπλέον τα αντισώματα που εκκρίνονται από τα πλασματοκύτταρα μεταφέρονται με την κυκλοφορία του αίματος σε ολόκληρο τον οργανισμό και συνδέονται με τους μικροοργανισμούς που φέρουν το ίδιο αντιγόνο ώστε αυτά να αποτελέσουν τους στόχους της επίθεσης του ανοσοποιητικού συστήματος. Κάποιες φορές το σύμπλεγμα αντιγόνου- αντισώματος έχει ένα άμεσο αποτέλεσμα, παραδείγματος χάριν την εξουδετέρωση των βακτηριακών τοξινών ή την παρεμπόδιση της εισόδου των ιών στα κύτταρα του οργανισμού. Όμως τις περισσότερες φορές η αλληλεπίδραση του αντισώματος με το αντιγόνο δεν φέρει ένα σημαντικό αποτέλεσμα αν δεν ενεργοποιήσει κάποιους φυσιολογικούς εκτελεστικούς μηχανισμούς. Δηλαδή τα αντισώματα δεν σκοτώνουν απευθείας τον εισβολέα αλλά αντιθέτως αποτελούν μία φυσική γέφυρα που συνδέει τους μικροοργανισμούς με τους μηχανισμούς εξολόθρευσής τους. Έτσι οι μηχανισμοί επίθεσης του ανοσοποιητικού συστήματος δρουν στοχευμένα και δεν καταστρέφουν τις φυσιολογικές δομές του οργανισμού.

Ένας πολύ σημαντικός εκτελεστικός μηχανισμός των ανοσοσφαιρινών IgM, IgG1 και IgG3 όταν βρίσκονται συνδεδεμένες με το αντιγόνο είναι η ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος. Το συμπλήρωμα αποτελεί τμήμα των μη ειδικών ανοσολογικών μηχανισμών άμυνας. Πρόκειται για ένα σύμπλεγμα πρωτεολυτικού καταρράκτη που αποτελείται από περισσότερες από τριάντα

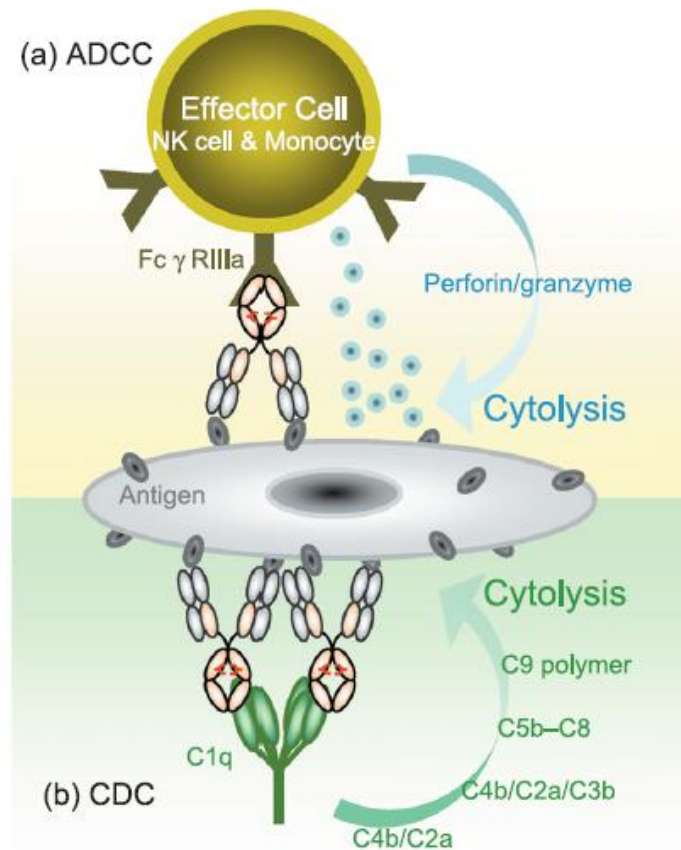
πρωτεΐνες. Όταν δύο ή περισσότερα αντισώματα προσδένονται σε ένα ξένο κύτταρο ενεργοποιείται η κλασική οδός του συμπληρώματος. Η ενεργοποίηση αρχίζει με την πρόσδεση της πρωτεΐνης C1 στο αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με το αντιγόνο. Αυτή η πρωτεάση σερίνης C1 είναι ένα σύμπλεγμα που αποτελείται από τις πρωτεΐνες C1q, C1r και C1s και προσδένεται πολύ ισχυρά στην Fc περιοχή του αντισώματος. Η πρόσδεση αυτή δεν γίνεται στο σημείο σύνδεσης του αντιγόνου πάνω στο αντίσωμα αλλά σε ένα σημείο της Fc περιοχής του αντισώματος που είναι ειδικό για τη σύνδεση με το συμπλήρωμα. Έτσι ενεργοποιείται ένας πρωτεολυτικός καταρράκτης από ένζυμα που οδηγεί στην παραγωγή του πρωτεϊνικού συμπλέγματος που επιτίθεται στη μεμβράνη (μεμβρανοεπιθετικό σύμπλεγμα, Membrane Attack Complex- MAC). Το σύμπλεγμα αυτό μπορεί να καταστρέψει τα κύτταρα-στόχους με τα οποία έχει συνδεθεί το αντίσωμα. Πρόκειται για την εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC) (Shuptrine et al, 2012). Η διάσπαση της πρωτεΐνης C5 από τη C5 κονβερτάση οδηγεί στην απελευθέρωση της C5b η οποία δεσμεύεται με την C6 και τη C7 και σχηματίζουν τη βάση του συμπλέγματος MAC. Η πρωτεΐνη C8 συνδέεται με αυτό το σύμπλεγμα και εισάγεται εν μέρει στη μεμβρανική διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων. Αυτό επιτρέπει στην πρωτεΐνη C9 να εισαχθεί στη συνέχεια στη διπλοστιβάδα και να πολυμεριστεί σχηματίζοντας σταθερούς πόρους με μέγιστη διάμετρο 10 nm που αντιστοιχούν σε 12-15 περίπου μόρια C9. Έτσι σχηματίζεται πλήρως το σύμπλεγμα MAC (Εικόνα 2-6). Αυτοί οι πόροι λοιπόν που δημιουργούνται στην μεμβρανική διπλοστιβάδα των μικροοργανισμών οδηγούν στην λύση αυτής της κυτταρικής μεμβράνης. Έτσι οι μεμβράνες τους γίνονται διαπερατές σε νερό και ηλεκτρολύτες. Πολύ μεγάλες ποσότητες ύδατος και ηλεκτρολυτών εισέρχονται στους μικροοργανισμούς διαταράσσοντας το ιοντικό τους περιβάλλον και έτσι σκοτώνονται (Dunkelberger & Song, 2010).



Εικόνα 2-6. Σχηματισμός του μεμβρανοεπιθετικού συμπλέγματος (Membrane Attack Complex-MAC) (Dunkelberger & Song, 2010).

Τα αντισώματα μπορούν να ενισχύσουν την φαγοκυττάρωση των μικροοργανισμών δρώντας άμεσα ως οψωνίνες. Με την πρόσδεση των Fc περιοχών τους στους Fc κυτταρικούς υποδοχείς για IgG (Fc-γRs) μπορούν να ενεργοποιήσουν την εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC). Οι υποδοχείς Fc-γRs εκφράζονται στην μεμβράνη κυττάρων όπως τα φυσικά φονικά κύτταρα (NK), κυρίως, αλλά και τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα και τα ουδετερόφιλα, τα οποία λειτουργούν ως φαγοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά λοιπόν συνδέονται με τα αντισώματα τα οποία είναι δεσμευμένα πάνω σε ένα κύτταρο στόχο και προκαλούν τη λύση του ξένου κυττάρου απελευθερώνοντας με εξωκυττάρωση εκκριτικά κοκκία. Αυτά τα εκκριτικά κοκκία περιέχουν το κυτταρολυτικό σύμπλοκο περφορίνης/θρυμματίνης. Η περφορίνη είναι μία πρωτεΐνη που έχει δομή παραπλήσια με τις πρωτεΐνες του συμπληρώματος. Εισέρχεται λοιπόν στη μεμβράνη του κυττάρου στόχου και σχηματίζει πόρους από τους οποίους μπορούν να περάσουν πολύ μεγάλες ποσότητες ύδατος και ηλεκτρολυτών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον θάνατο του μικροοργανισμού. Ουσιαστικά, σε αυτό τον μηχανισμό οψωνινοποίησης, το αντίσωμα συνδέει το φαγοκύτταρο με το αντιγόνο (Kubota et al, 2009).





**Εικόνα 2-7. Ο μηχανισμός α) της εξαρτώμενης από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητικής κυτταροτοξικότητας (ADCC), β) της εξαρτώμενης από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητας (CDC) (Kubota et al, 2009).**

Μέχρι στιγμής αναφέρθηκε ότι τα αντισώματα που βρίσκονται συνδεδεμένα με το αντιγόνο στρατολογούν τα συστατικά του συμπληρώματος που σκοτώνουν τον μικροοργανισμό απευθείας με την εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα (CDC). Υπάρχει όμως και η δυνατότητα τα αντισώματα να στρατολογούν τα συστατικά του συμπληρώματος που σκοτώνουν τον μικροοργανισμό μέσω διαδικασιών οψωνινοποίησης που περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες C1q και/ή C3b που ενεργοποιούν με τη σειρά τους τα λευκοκύτταρα. Πρόκειται για την εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα κυττάρων (Complement Dependent Cell Cytotoxicity- CDCC) (Wibroe et al, 2014).

Είναι σαφές ότι η πρωτεΐνη C3b διαδραματίζει βασικό ρόλο στους εκτελεστικούς μηχανισμούς του συμπληρώματος. Το μόριο αυτό λειτουργεί ως οψωνίνη για να ενισχύσει τη φαγοκυττάρωση των μικροοργανισμών. Πρόκειται

δηλαδή για ένα μηχανισμό οψωνινοποίησης που διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη C3b το συμπληρώματος. Μεγάλες ποσότητες της πρωτεΐνης C3b επικαλύπτουν αποτελεσματικά την επιφάνεια του παθογόνου και το επισημαίνουν για αναγνώριση από ουδετερόφιλα, NK κύτταρα και μονοκύτταρα που φέρουν τους υποδοχείς CRs και C1q. Σε αντίθεση με τους υποδοχείς των αντισωμάτων FcRs που ενεργοποιούν τα φαγοκύτταρα, οι υποδοχείς CRs δεν κάνουν ενδοκυττάρωση των σωματιδίων εκτός εάν συνδιεγερθούν από εξωτερικούς παράγοντες όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), ο παράγοντας διέγερσης των αποικιών (Colony Stimulating Factor- CSF) ή οι αναφυλατοξίνες του συμπληρώματος C3a και C5a. Επιπλέον, η φαγοκυττάρωση, με τη μεσολάβηση του υποδοχέα CR, δεν απελευθερώνει μεσολαβητές της φλεγμονής όπως ρίζες ενεργού οξυγόνου και μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος.

Θα πρέπει να αναφερθεί τέλος, ότι η ενεργοποίηση του συμπληρώματος διευκολύνει επίσης τους ειδικούς ανοσολογικούς μηχανισμούς (επίκτητη ανοσία) μέσω της δέσμευσης των οψωνοποιημένων αντιγόνων στον υποδοχέα CR2 στα B λεμφοκύτταρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της παραγωγής ειδικών αντισωμάτων και τη διαφοροποίηση των B κυττάρων μνήμης. Έτσι, το συμπλήρωμα δεν ενεργοποιείται μόνο από τα αντισώματα, αλλά μπορεί και εκείνο να κατευθύνει την παραγωγή αντισωμάτων εναντίον των μικροοργανισμών που συνδέονται με την πρωτεΐνη C3b (Wibroet al, 2014).

### **3. Παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων**

#### **3.1 Πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα**

Τα φυσικά αντισώματα προστατεύουν τον οργανισμό από τα επιβλαβή παθογόνα και τις λοιμώξεις που αυτά προκαλούν. Κάθε αντιγόνο προκαλεί την παραγωγή πλήθους εξειδικευμένων αντισωμάτων που στοχεύουν διαφορετικούς επιτόπους, δηλαδή διαφορετικές περιοχές του ίδιου αντιγόνου που αποτελούνται από έξι έως οκτώ αμινοξέα. Τα αντισώματα αυτά παράγονται συχνά από πολλαπλούς κλώνους Β λεμφοκυττάρων και είναι γνωστά ως πολυκλωνικά αντισώματα. Τα πολυκλωνικά αντισώματα μπορούν να αναγνωρίσουν και να αλληλεπιδράσουν με «συνεχείς» επιτόπους, δηλαδή γραμμικές περιοχές αμινοξέων. Τις περισσότερες φορές όμως συνδέονται με «ασυνεχείς» επιτόπους, δηλαδή με ένα τρισδιάστατο σχήμα που αποτελείται από κατάλοιπα αμινοξέων που δεν είναι σε σειρά αλλά έρχονται κοντά και πλησιάζουν εξαιτίας της αναδίπλωσης του μορίου στον χώρο. Αντιθέτως, κάθε μόριο αντισώματος που είναι ειδικό για έναν μόνο επίτοπο και προέρχεται από έναν μόνο κλώνο Β λεμφοκυττάρων ονομάζεται μονοκλωνικό αντίσωμα (Nelson et al, 2000).

Τα πολυκλωνικά αντισώματα εμφανίζουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να ανιχνεύουν πολλαπλούς επιτόπους και επομένως να αναγνωρίζουν πιο αποτελεσματικά το αντιγόνο. Αυτό μπορεί να είναι πολύ σημαντικό σε ορισμένες αναλυτικές μεθόδους όπου η ανίχνευση της προσδιοριζόμενης ουσίας εξαρτάται από τη χρήση ενός μόνο επιτόπου. Επιπλέον, τα πολυκλωνικά αντισώματα είναι σχετικά απλά και φθηνά αντιδραστήρια στην βραχυπρόθεσμη παραγωγή τους σε σύγκριση με τα μονοκλωνικά αντισώματα. Η χρήση ορού αίματος που προέρχεται από μεγαλύτερα ζώα (όπως άλογα, κατσίκες και κουνέλια) επιτρέπει την ανάκτηση μεγάλου όγκου ορού πλούσιου σε πολυκλωνικά αντισώματα. Ωστόσο, κάποια στιγμή το αρχικό απόθεμα θα τελειώσει και θα χρειαστεί μια νέα παρτίδα ορού αίματος που θα διαφέρει αναπόφευκτα από την αρχική παρτίδα ως προς την αντιδραστικότητα και τον τίτλο αντισωμάτων. Επομένως τα πολυκλωνικά αντισώματα γενικά υστερούν στην έλλειψη αναπαραγωγιμότητας. Αντιθέτως, τα μονοκλωνικά αντισώματα επιτρέπουν

την ανάπτυξη τυποποιημένων και ασφαλών τεχνικών ανοσοδοκιμασίας με υψηλή ειδικότητα (Nelson et al, 2000).

Ο εξαιρετικά εξελιγμένος μηχανισμός του ανοσοποιητικού συστήματος οδήγησε τα τελευταία χρόνια τους επιστήμονες να χρησιμοποιήσουν εκτεταμένως τα μονοκλωνικά αντισώματα. Πρόκειται για δομικά και λειτουργικά πολύπλοκα μόρια παράγονται από έναν μόνο κλώνο Β λεμφοκυττάρων (Wootla et al, 2014). Τα μονοκλωνικά αντισώματα (monoclonal Antibodies- mAbs) και οι πρωτεΐνες που προέρχονται εν μέρει από τα mAbs έχουν καθιερωθεί ως μία από τις μεγαλύτερες ομάδες βιολογικών (βιοθεραπευτικών πρωτεϊνών) που βρίσκουν εφαρμογή στις μέρες μας σε μια μεγάλη ποικιλία θεραπευτικών παρεμβάσεων. Η ανακάλυψη και η ανάπτυξη της τεχνικής του υβριδισμού δημιούργησε τα θεμέλια για τη σύγχρονη ανακάλυψη και ανάπτυξη των mAbs (Chiu & Gilliland, 2016).

### **3.2 Τεχνική του υβριδώματος**

Η χρήση των αντισωμάτων ως εργαλείο για την έγκαιρη διάγνωση και την θεραπεία διαφόρων σημαντικών νοσημάτων ξεκίνησε με τη δημιουργία των mAbs μέσω της σύντηξης των Β κυττάρων ποντικού και των κυττάρων μυελώματος ποντικού. Το αποτέλεσμα αυτής τη σύντηξης ήταν η παραγωγή απλών συντηγμένων κυτταρικών σειρών (υβριδώματα) που παράγουν μονοκλωνικά Abs (mAbs) με μια μοναδική εξειδίκευση. Τα υβριδώματα έχουν την ιδιότητα να πολλαπλασιάζονται σε κυτταροκαλλιέργειες απεριόριστα, όπως τα κύτταρα του μυελώματος, καθώς και να παράγουν και να εκκρίνουν αντισώματα (Köhler & Milstein, 1975).

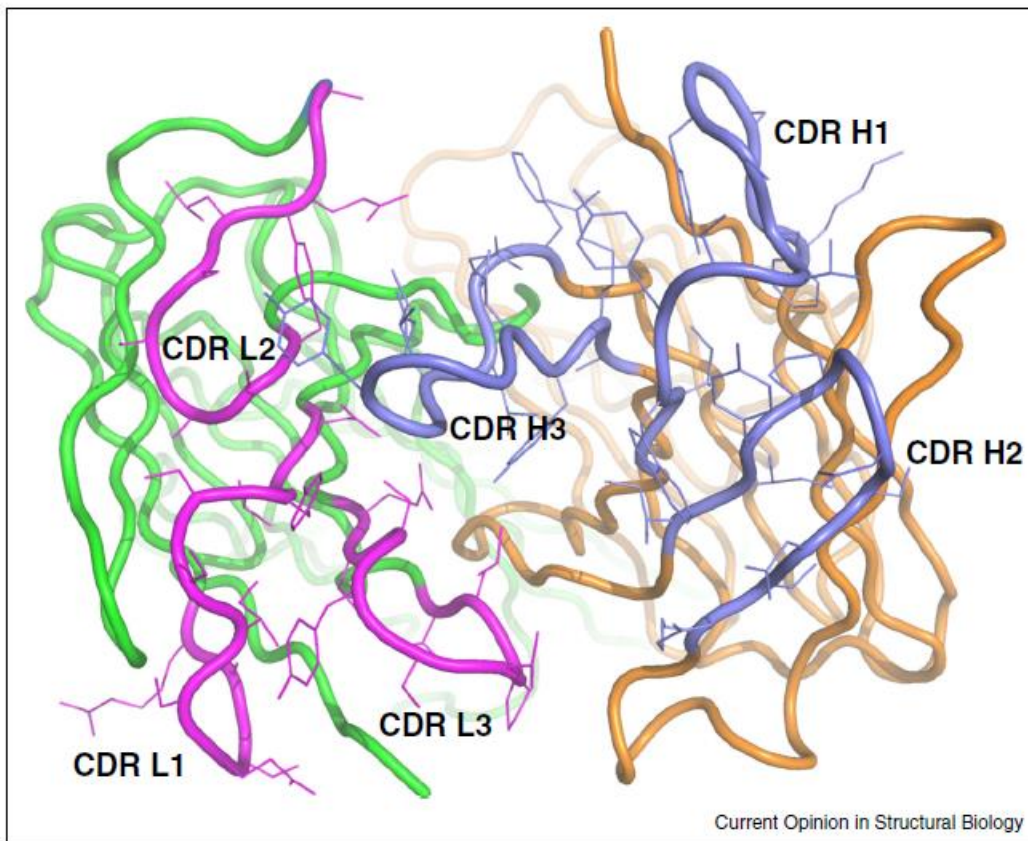
Με αυτόν τον τρόπο, μπορούν να δημιουργηθούν mAbs έναντι σχεδόν οποιουδήποτε αντιγόνου. Όμως η άμεση θεραπευτική χρήση των mAbs που παράγονται από κύτταρα ποντικού στους ανθρώπους εμφανίζει κάποιους περιορισμούς. Πρώτον τα mAbs που παράγονται από κύτταρα ποντικού συχνά αναγνωρίζονται ως ξένα στον ανθρώπινο οργανισμό και αναπτύσσονται επιβλαβείς ανοσολογικές αποκρίσεις και δεύτερον δεν υπάρχει επαρκής λειτουργία τελεστή για τα mAbs που παράγονται από κύτταρα ποντικού (Chiu & Gilliland, 2016).

### **3.3 Χιμαιρικά ανθρωποποιημένα αντισώματα**

Σήμερα ανοσοποιούνται διάφορα ζώα (κυρίως ποντίκια ή αρουραίοι) για να παράγουν mAbs που θα χρησιμοποιηθούν στη διάγνωση και στη θεραπεία σημαντικών ασθενειών στον άνθρωπο. Στη συνέχεια αυτά τα mAbs, εξαιτίας του γεγονότος ότι πρόκειται για μη ανθρώπινες αλληλουχίες, χρειάζονται εξανθρωπισμό δηλαδή κατασκευάζονται έτσι ώστε να αποτρέπουν μια ανοσολογική απόκριση στους ασθενείς στους οποίους θα χορηγηθούν.

Αρχικά αυτό επιτεύχθηκε εν μέρει με τη δημιουργία μιας χίμαιρας, αντικαθιστώντας τις σταθερές περιοχές των ζωικών αντισωμάτων με εκείνες των ανθρώπινων αντισωμάτων, με τη βοήθεια της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA. Έτσι παρήχθησαν αντισώματα που ήταν κατά 70% ανθρώπινα αλλά με αντιγονική ειδικότητα που καθορίζεται από τα γονίδια των ποντικιών ή των αρουραίων. Σε αρκετές περιπτώσεις τα χιμαιρικά αντισώματα μπόρεσαν να μην προκαλέσουν ανοσολογική απάντηση και να αλληλεπιδράσουν με το αντιγόνο-στόχο τους (Morrison et al, 1984).

Ένας από τους τομείς που εστιάζει η έρευνα σχετικά με τα αντισώματα είναι οι μεταβλητές περιοχές (V) της Fab περιοχής του αντισώματος εξαιτίας του ρόλου που διαδραματίζουν στη δέσμευση του αντιγόνου. Η περιοχή πρόσδεσης του αντιγόνου σχηματίζεται από το συνδυασμό έξι υπερμεταβλητών περιοχών (Complementarity-determining regions, CDRs), τρεις από την βαριά αλυσίδα HC και τρεις από την ελαφριά αλυσίδα (LC) (Εικόνα 3-1). Οι CDRs είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση και την αλληλεπίδραση με το αντιγόνο στόχο. Τα κατάλοιπα αμινοξέων των V περιοχών που βρίσκονται σε άμεση επαφή με το αντιγόνο αναφέρονται ως παράτοπος. Η επιφανειακή περιοχή του αντιγόνου που βρίσκεται σε άμεση επαφή με τον παράτοπο του αντισώματος αναφέρεται ως επίτοπος (Chiu & Gilliland, 2016).



Εικόνα 3-1. Αντιπροσωπευτική διάταξη των υπερμεταβλητών περιοχών (CDRs) της Fab περιοχής (Chiu & Gilliland , 2016).

Σήμερα, ο εξανθρωπισμός της μεταβλητής περιοχής περιλαμβάνει τη μεταφορά CDRs από ένα μη ανθρώπινο αντίσωμα (συνήθως ποντικίου) στις αλληλουχίες πλαισίου της μεταβλητής περιοχής ενός ανθρώπινου αντισώματος. Αυτή η διαδικασία όμως μειώνει τη συγγένεια του mAb, και ως εκ τούτου, συνήθως ακολουθείται από ωρίμανση συγγένειας (Jones et al, 1986).

### 3.4 Αντισώματα αποκλειστικά ανθρώπινης προέλευσης

Μια μέθοδος στην οποία δεν χρειάζεται να γίνει εξανθρωπισμός των mAbs είναι τα γενετικά τροποποιημένα στελέχη ποντικών και αρουραίων στα οποία τα γονίδια των ανοσοσφαιρινών έχουν αντικατασταθεί με τα αντίστοιχα ανθρώπινα γονίδια. Ένας αριθμός διαφορετικών προσεγγίσεων χρησιμοποιούνται για τη

δημιουργία mAbs απευθείας χρησιμοποιώντας διαγονιδιακά ζώα (Chiu & Gilliland, 2016).

Εκτός από τη μέθοδο με τις CDRs έχουν αναπτυχθεί και άλλες μέθοδοι οι οποίες μάλιστα επιτυγχάνουν την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων αποκλειστικά ανθρώπινης προέλευσης. Μια τέτοια μέθοδος περιλαμβάνει την παραγωγή συνθετικών συνδυαστικών βιβλιοθηκών για την αναγνώριση ανθρωπίνων mAbs για συγκεκριμένους στόχους. Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στην ανάπτυξη mAbs έναντι αντιγόνων που θα ήταν δύσκολο να αναπτυχθούν χρησιμοποιώντας τεχνολογίες που βασίζονται σε ζώα, συμπεριλαμβανομένων τοξικών αντιγόνων, μη ανοσογόνων αντιγόνων ή αυτοαντιγόνων.

Επίσης χρησιμοποιείται η τεχνολογία έκθεσης φάγων. Η τεχνολογία έκθεσης περιγράφηκε αρχικά από τον Smith με τη μορφή έκθεσης πεπτιδίων από φάγους μέσω της ενσωμάτωσής τους ως σύντηξη στην αλληλουχία της πρωτεΐνης του γονιδίου III του φάγου. Ο φάγος σύντηξης μπορεί να παρέχει έναν απλό τρόπο κλωνοποίησης ενός γονιδίου όταν είναι διαθέσιμο ένα αντίσωμα κατά του προϊόντος αυτού του γονιδίου (Smith, 1985). Τροποποιημένες προσέγγισεις της έκθεσης φάγων χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανακάλυψη μονοκλωνικών αντισωμάτων. Μεταξύ των τεχνολογιών επιλογής που είναι διαθέσιμες επί του παρόντος, η συχνότερα χρησιμοποιούμενη είναι η έκθεση βιβλιοθηκών αντισωμάτων στον βακτηριοφάγο M13 με γενετική σύντηξη των θραυσμάτων αντισώματος με τη δευτερεύουσα για το φάγο πρωτεΐνη περιβλήματος pIII ή με την καρβοξυτελική περιοχή της. Η πρόκληση είναι να συνδεθεί η αλληλουχία DNA μέσα στο σωματίδιο του φάγου με την πρωτεΐνη ή το πεπτίδιο που εκτίθεται στην επιφάνεια του φάγου. Αυτή η σύνδεση διευκολύνει την επιλογή της εξειδικευμένης σύνδεσης. Η τεχνολογία έκθεσης φάγων χρησιμοποιείται συχνά με θραύσματα αντισωμάτων που περιλαμβάνουν θραύσματα της μεταβλητής περιοχής μονής αλυσίδας καθώς και θραύσματα που είναι περιοχές σύνδεσης με το αντιγόνο (Fabs). Γίνεται επιλογή μορίων με επιθυμητές ιδιότητες όπως δέσμευση του αντιγόνου, διασταυρούμενη αντιδραστικότητα στη σύνδεση μεταξύ καθορισμένων ειδών, αυξημένη σταθερότητα κ.ά. (Hoogenboom, 2005).

Τα συνηθέστερα προβλήματα με τα αντισώματα που απομονώνονται από τις βιβλιοθήκες είναι η περιορισμένη έκφραση και η τοξικότητα στο βακτήριο- ξενιστή.

Επίσης είναι δύσκολο να παραχθούν αντισώματα έναντι ενός αντιγόνου που είναι πολύ ομόλογο με τις πρωτεΐνες του ξενιστή. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να ξεπεραστεί χρησιμοποιώντας την *in vitro* παραγωγή των αντισωμάτων που μπορούν να συνδεθούν σε έναν επιθυμητό αντιγόνο. Οι βιβλιοθήκες των αλληλουχιών DNA που κωδικοποιούν τα αντισώματα μπορούν να προέρχονται από βιβλιοθήκες συνθετικών αντισωμάτων, από έκθεση ζυμομυκήτων, από έκθεση κυττάρων θηλαστικών και από *in vitro* έκθεση του ιού δαμαλίτιδας. Η αλληλουχία κάθε αντισώματος μεταγράφεται και μεταφράζεται *in vitro*. Η βιβλιοθήκη DNA τυπικά συντήκεται σε μια αλληλουχία που δεν διαθέτει κωδικόνιο λήξης επομένως παρεμποδίζεται η σύνδεση των παραγόντων απελευθέρωσης και η ενεργοποίηση της αποσυναρμολόγησης του μεταφραστικού συμπλόκου. Έτσι το αντίσωμα μπορεί να προεξέχει έξω από το ριβόσωμα και να αναδιπλωθεί, αποτελώντας έτσι μέρος ενός συμπλέγματος mRNA, ριβοσώματος και πρωτεΐνης που μπορεί να συνδεθεί με τον επιφανειακά δεσμευμένο αντιγόνο. Τα συμπλέγματα που συνδέονται καλά ακινητοποιούνται και ύστερα από έκλυση δίστανται και το αντίστοιχο mRNA μπορεί στη συνέχεια να μεταγραφεί αντίστροφα σε cDNA ώστε να ταυτοποιηθεί. Πρόσθετοι παράγοντες που υπάρχουν στην έκθεση του ευκαρυωτικού ριβοσώματος και όχι στο προκαρυωτικό, μπορούν να ενισχύσουν τη μετάφραση και την αναδίπλωση της πρωτεΐνης, ειδικά με μια ποικιλία μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Η έκθεση ριβοσώματος μπορεί να επιλέξει αντισώματα με σπάνιες αλληλουχίες και θέσεις πρόσδεσης υψηλής συγγένειας, εξαρτάται όμως και από την ποιότητα του αντιγόνου που χρησιμοποιείται για την επιλογή. Επιπλέον, με την βοήθεια της PCR, μπορεί να εισαχθεί περαιτέρω ποικιλομορφία στο DNA των αντισωμάτων. Ακόμη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν συστήματα χωρίς κύτταρα για την εύρεση αντισωμάτων έναντι τοξικών και πρωτεολυτικά ευαίσθητων ή ασταθών πρωτεϊνών-αντιγόνων. Κάτι τέτοιο θα ήταν δύσκολο χρησιμοποιώντας μεθόδους με μικρόβια ή ζώα (Chiu & Gilliland, 2016).

Ένα μειονέκτημα των συστημάτων με τα διαγονιδιακά ζώα (κυρίως ποντίκια) είναι ότι δεν μπορούν να μιμηθούν επακριβώς την ανθρώπινη ανοσολογική απόκριση καθώς τα ποντίκια επεξεργάζονται το αντιγόνο και ρυθμίζουν τα B κύτταρα με διαφορετικό τρόπο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα αντισώματα που παράγονται να μην εμφανίζουν την ακριβή εξειδίκευση των φυσικών ανθρώπινων αντισωμάτων. Επίσης υπάρχουν διαφορές στις ιδιότητες δέσμευσης μεταξύ των αντισωμάτων που



εκφράζονται στα βακτηριακά και εκείνων που εκφράζονται στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Επιπλέον, η έκθεση φάγων μπορεί να οδηγήσει σε συνδυασμούς βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας αντισωμάτων που δεν εμφανίζονται *in vivo* στο ίδιο Β κύτταρο.

Στην ανάπτυξη των αντισωμάτων είναι πολύ σημαντικό να διατηρείται το αρχικό ζεύγος VH και VL όπως υπάρχει στα ανθρώπινα Β κύτταρα. Έχουν σχεδιαστεί λοιπόν αποτελεσματικές στρατηγικές που βασίζονται στην άμεση ενίσχυση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις περιοχές VH και VL από μεμονωμένα ανθρώπινα Β κύτταρα και στην συνέχεια εκφράζουν αυτά τα γονίδια σε συστήματα κυτταροκαλλιέργειας. Τα ανθρώπινα Β κύτταρα γίνονται αθάνατα με ηλεκτροσύντηξη ή με μετασχηματισμό του ιού Epstein-Barr (EBV). Για την παραγωγή των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι δυνατό να αξιοποιηθεί η ανθρώπινη ανοσολογική απόκριση. Τα αντισώματα μεμονωμένων Β κυττάρων μπορούν να αντιδράσουν έναντι καθοριστικών παραγόντων διαμόρφωσης που παρουσιάζονται κυρίως *in vivo* και όχι *in vitro*. Η τεχνολογία παραγωγής αντισωμάτων από μεμονωμένα Β κύτταρα φαίνεται ότι θα κυριαρχήσει στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών αντισωμάτων. Πρόκειται για μία απλή και γρήγορη στρατηγική με υψηλή αποτελεσματικότητα, που χρειάζεται σχετικά μικρό αριθμό κυττάρων. Έχει όμως το μειονέκτημα της ανάγκης επαρκούς αριθμού ανθρωπίνων δοτών και τον περιορισμό σε συγκεκριμένα μόρια στόχους (Duvall & Fiorini, 2014).

Τα αντισώματα που παράγονται είτε από έκθεση φάγων, είτε από έκθεση ευκαρυωτικού ριβοσώματος ή από διαγονιδιακά ζώα συχνά υποβάλλονται σε περαιτέρω επεξεργασία. Η επεξεργασία αυτή περιλαμβάνει την αντικατάσταση καταλοίπων στην περιοχή δέσμευσης ώστε να μειωθεί η πιθανότητα αναγνώρισης αυτών των αντισωμάτων ως ξένα στον ανθρώπινο οργανισμό και η ανάπτυξη ανοσολογικής απόκρισης. Η ανάπτυξη ανοσολογικής απόκρισης μπορεί να έχει πολλαπλές αιτίες και να επηρεάζεται από τη δοσολογία, την οδό χορήγησης, την παρουσία συσσωματωμάτων πρωτεΐνης, την ταυτόχρονη χρήση φαρμακευτικής αγωγής, το γενετικό υπόβαθρο και την ανοσολογική κατάσταση του ασθενούς, την απελευθέρωση κυτοκίνης καθώς και την αλληλουχία των αμινοξέων. Η ανοσολογική απόκριση επηρεάζεται επίσης από άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των αντισωμάτων όπως η γλυκοζυλίωση, η απαμίνωση και η οξειδωση των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων. Επιπλέον, η παρουσία επιτόπων των Τ βοηθητικών

Διπλωματική Εργασία

κυττάρων (CD4+) σε ένα μόριο είναι ένας από τους παράγοντες που συσχετίζονται με την αύξηση της ανοσολογικής απόκρισης. Επομένως ο περιορισμός της ανοσολογικής απόκρισης μπορεί να επιτευχθεί όχι μόνο με τη μείωση των μη ανθρωπίνων αλληλουχιών αλλά και με την αναγνώριση και την αφαίρεση των επιτόπων των T βοηθητικών κυττάρων. Η επεξεργασία αυτή λοιπόν που μειώνει την πιθανότητα αναγνώρισης των αντισωμάτων ως ξένα στον ανθρώπινο οργανισμό και την ανάπτυξη ανοσολογικής απόκρισης συχνά οδηγεί σε μείωση της συγγένειας και της εξειδίκευσης σύνδεσης του αντισώματος. Αυτό συνήθως διορθώνεται με μια *in vitro* διαδικασία ωρίμανσης συγγένειας (Büttel et al, 2011).

Πολλά μονοκλωνικά αντισώματα εμφανίζουν μειωμένη συγγένεια για το αντιγόνο τους, το οποίο μπορεί να εμποδίσει σε μεγάλο βαθμό τις εφαρμογές τους για την έγκαιρη διάγνωση και την αποτελεσματική θεραπεία των ανθρωπίνων νοσημάτων. Αυτό φαίνεται να είναι συνέπεια του ανώτατου ορίου συγγένειας που χαρακτηρίζει το ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών και τις αποκρίσεις των B κυττάρων. Η αύξηση της συγγένειας ενός αντισώματος μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας (με μειωμένη δόση αντισώματος), σε ισχυρότερες εκτελεστικές λειτουργίες με τη μεσολάβηση της περιοχής Fc και στην ανάπτυξη δοκιμών υψηλής ευαισθησίας στον τομέα της *in vitro* διάγνωσης (Ducancel & Muller, 2012).

Η ωρίμανση συγγένειας ενός αντισώματος εξαρτάται από την τεχνική που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή των αντισωμάτων. Υπάρχουν δύο κατηγορίες, οι τεχνικές που βασίζονται στην έκθεση και οι τεχνικές που βασίζονται στη δομή. Οι τεχνικές που βασίζονται στην έκθεση περιλαμβάνουν τη δημιουργία βιβλιοθηκών αντισωμάτων που εμφανίζουν αλλαγές που επηρεάζουν την σύνδεση με το αντιγόνο. Λόγω περιορισμών στο μέγεθος της κατασκευής της βιβλιοθήκης, μπορεί να είναι δύσκολη η διαδικασία ωρίμανσης συγγένειας. Ο αριθμός και η θέση των περιοχών σύνδεσης αντισώματος-αντιγόνου διαφέρει για τους διάφορους τύπους αντιγόνου. Οι τεχνικές που βασίζονται στη δομή επικεντρώνονται σε ακριβείς δομικές πληροφορίες των αλληλεπιδράσεων αντισώματος-αντιγόνου και σε μικρό αριθμό πολύ ειδικών μεταλλάξεων στη θέση πρόσδεσης του αντισώματος για την επίτευξη της αύξησης της συγγένειας και της επιθυμητής εξειδίκευσης σύνδεσης (Raghunathan et al, 2012).

Αν και το πρώτο θεραπευτικό μονοκλωνικό αντίσωμα που εγκρίθηκε στα μέσα της δεκαετίας του 1990 προήλθε από υβριδώματα ποντικού (Orthoclone OKT3®/muromomab anti-CD3), λίγα τέτοια μονοκλωνικά αντισώματα αναπτύσσονται και χρησιμοποιούνται στις μέρες μας. Τα περισσότερα μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν εγκριθεί μέχρι σήμερα, καθώς και εκείνα που βρίσκονται σε κλινική έρευνα, είναι ανθρωποποιημένα αντισώματα, ενώ λιγότερα είναι αντισώματα αποκλειστικά ανθρώπινης προέλευσης και ακόμη λιγότερα χμαιοειδή αντισώματα (Ducancel & Muller, 2012).

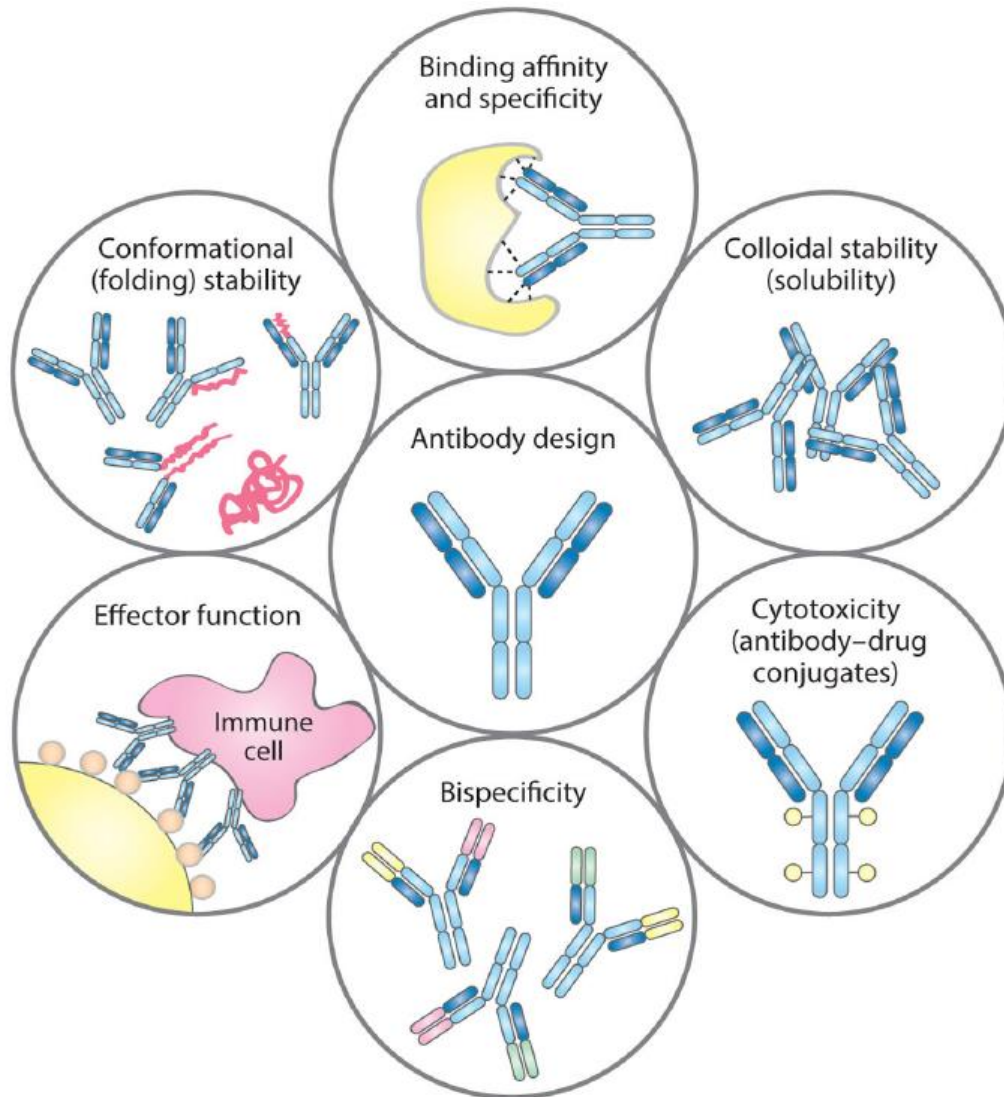
Παρά τους ηθικούς περιορισμούς σχετικά με τη χρήση των διαγονιδιακών ζώων σε αυτές τις μελέτες, μπόρεσαν να παραχθούν μονοκλωνικά αντισώματα υψηλής συγγένειας (Ducancel & Muller, 2012). Εκτός από το θέμα της βιοηθικής υπάρχει πάντα και το ζήτημα της καταλληλότητας των ζωικών μοντέλων για την πρόβλεψη της ανοσολογικής απόκρισης και αποτελεσματικότητας των θεραπευτικών μονοκλωνικών αντισωμάτων στον άνθρωπο. Πρόσφατες μελέτες χρησιμοποίησαν γενετικά τροποποιημένα φυτά (καπνών, πατάτας, σόγιας, ρυζιού και καλαμποκιού), στα οποία εισήγαγαν το επιθυμητό γονίδιο για να παράγουν αντισώματα που στοχεύουν συγκεκριμένα αντιγόνα για τη θεραπεία όγκων και αιματολογικών καρκίνων. Κάποια από αυτά τα αντισώματα έχουν πάρει έγκριση από τον FDA για να χρησιμοποιηθούν. Η χρήση των φυτών για την παραγωγή αντισωμάτων για θεραπευτικούς σκοπούς, σε σύγκριση με τη χρήση κυττάρων των θηλαστικών ή διαγονιδιακών ζώων, παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα και οφέλη. Τα μονοκλωνικά αντισώματα φυτικής προέλευσης, που παράγονται με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής, έχουν μικρότερο κόστος παραγωγής, αναπτύσσονται σε μεγάλη κλίμακα πιο εύκολα και γρήγορα. Είναι αποτελεσματικά και θεωρούνται ασφαλέστερα καθώς είναι λιγότερο πιθανό να εισαγάγουν ανθρώπινα ή ζωικά παθογόνα (Nessa et al, 2020).

### **3.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των αντισωμάτων**

Η δομή του αντισώματος καθορίζει τη λειτουργία του συνεπώς γίνεται προσπάθεια δημιουργίας αντισωμάτων με τις κατάλληλες λειτουργικές και

βιοφυσικές ιδιότητες. Η γενετική μηχανική χρησιμοποιείται στην παραγωγή ανθρωποποιημένων αντισωμάτων, στην τροποποίηση της συγγένειας, στην αύξηση της σταθερότητας και την βελτίωση της αποτελεσματικότητας και της παραγωγής των αντισωμάτων.

Υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη μεθόδων σχεδιασμού αντισωμάτων που βρίσκουν εφαρμογή στην έγκαιρη διάγνωση και αποτελεσματική θεραπεία στην σύγχρονη κλινική πράξη. Στην Εικόνα 3-2 συνοψίζονται τα βασικά χαρακτηριστικά των αντισωμάτων που πρέπει να βελτιστοποιηθούν για τη δημιουργία ανοσοσφαιρινών που είναι αποτελεσματικές σε διαφορετικές εφαρμογές με χρήση παραδοσιακών μεθόδων ανοσοποίησης και αντίχενυσης. Τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά των αντισωμάτων είναι η συγγένεια και η ειδικότητα δέσμευσης, που περιλαμβάνουν τη βελτιστοποίηση των μεταβλητών περιοχών και ειδικότερα των CDRs. Η κολλοειδής σταθερότητα (η διαλυτότητα) και η σταθερότητα διαμόρφωσης (η αναδίπλωση) είναι επίσης κρίσιμα χαρακτηριστικά των αντισωμάτων. Αυτό συμβαίνει επειδή τα θεραπευτικά mAbs πρέπει να είναι διαλυτά για να παρέχονται σε υψηλή συγκέντρωση καθώς και σταθερά για να μπορούν να αποθηκεύονται μακροχρόνια. Αυτό τυπικά απαιτεί βελτιστοποίηση όσον αφορά τη διαλυτότητα για τα κατάλοιπα που εκτίθενται στον διαλύτη και όσον αφορά τη σταθερότητα διαμόρφωσης για τα κατάλοιπα που είναι θωρακισμένα με διαλύτη. Οι εκτελεστικές λειτουργίες των αντισωμάτων είναι επίσης κρίσιμες για τη βιοδραστικότητά τους και μπορούν να προσαρμοστούν με το χειρισμό των αρμών και των Fc περιοχών (Tiller & Tessier, 2015). Η ικανότητα των αντισωμάτων να ενεργοποιούν τους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος επηρεάζεται πολύ από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της Fc περιοχής (Shuptrine et al, 2012).



Εικόνα 3-2. Βασικά χαρακτηριστικά των αντισωμάτων που πρέπει να βελτιστοποιηθούν για τη δημιουργία ανοσοσφαιρινών που είναι αποτελεσματικές για διαφορετικές εφαρμογές (Tiller & Tessier, 2015).

Ένα άλλο ολοένα και πιο σημαντικό χαρακτηριστικό αντισωμάτων, το οποίο είναι ασυνήθιστο στα φυσικά αντισώματα, είναι η διπλή εξειδίκευση είτε για πολλαπλά αντιγόνα είτε για πολλαπλούς επιτόπους στο ίδιο αντιγόνο. Για να επιτύχουμε τη διπλή εξειδίκευση απαιτούνται μέθοδοι για να συνδυάσουμε πολλαπλά αντισώματα σε ένα μόνο καθώς και για να βελτιστοποιήσουμε τα βασικά χαρακτηριστικά των συμβατικών αντισωμάτων. Ένα δεύτερο μη συμβατικό χαρακτηριστικό των αντισωμάτων που γίνεται ολοένα και πιο σημαντικό είναι η

Διπλωματική Εργασία

βιοδραστικότητά τους όταν συνδέονται με μικρά μοριακά φάρμακα. Η ανάπτυξη του συμπλέγματος αντισώματος-φαρμάκου (Antibody-drug conjugates, ADCs) απαιτεί την βελτιστοποίηση πολλών πτυχών των χημικών ουσιών και των συνδετών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των αντισωμάτων εκτός από τις υπόλοιπες βασικές ιδιότητες των συμβατικών αντισωμάτων (Tiller & Tessier, 2015).

Τα αντισώματα μπορούν να συνδεθούν με μια ποικιλία αντιγόνων, όπως πρωτεΐνες, πεπτίδια, αλυσίδες σακχάρων, νουκλεϊνικά οξέα και μικρά μόρια, με υψηλή ειδικότητα και συγγένεια. Αυτή η ικανότητα καθιστά τα αντισώματα ένα ελκυστικό εργαλείο στον τομέα της θεραπείας και της διάγνωσης ασθενειών (Ducancel & Muller, 2012).

Τα αντισώματα προκειμένου να στοχεύσουν διάφορα αντιγόνα, χρησιμοποιούν έξι βρόγχους που ονομάζονται υπερμεταβλητές περιοχές (Complementarity determining regions, CDRs). Τρεις CDRs βρίσκονται στη μεταβλητή περιοχή VH και τρεις στην μεταβλητή περιοχή VL. Οι CDRs σχηματίζουν μια επιφανειακή δομή, η οποία είναι συμπληρωματική με το αντιγόνο-στόχο συνεπώς διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην συγγένεια και στην ειδικότητα δέσμευσης των αντισωμάτων. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται αρκετοί μη ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ του αντισώματος και του αντιγόνου του και σταθεροποιούν τη σύνθετη δομή. Αυτές οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν δεσμούς υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις van der Waals, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (Makabe, 2020).

Κάθε CDR περιβάλλεται από δύο περιοχές πλαισίου (framework region- FR). Αν και σε ορισμένες περιπτώσεις τα κατάλοιπα που ανήκουν στις FRs συμμετέχουν στην αναγνώριση και την αλληλεπίδραση με το αντιγόνο, ο κύριος ρόλος των FRs είναι δομικός. Είναι υπεύθυνα για τη σταθερότητα της περιοχής Fv των αντισωμάτων και εξασφαλίζουν την τρισδιάστατη λειτουργική μορφή των CDRs. Έχει βρεθεί ότι στοχευμένες αλλά και τυχαίες μεταλλάξεις όχι μόνο στις CDRs αλλά και στις FRs μπορούν να επηρεάσουν τη συγγένεια και την ειδικότητα δέσμευσης των αντισωμάτων. Σε κάποιες περιπτώσεις ο συνδυασμός πολλών στοχευμένων μεταλλάξεων βελτίωσε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης των αντισωμάτων.

Οι περισσότερες προσπάθειες που γίνονται για τη βελτιστοποίηση της συγγένειας και της ειδικότητας δέσμευσης αφορούν κυρίως αντισώματα που στοχεύουν τα απτένια. Τα απτένια είναι αντιγόνα μικρού μοριακού βάρους, όπως οι στεροειδείς ορμόνες που εμπλέκονται σε πολλές φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες (όπως ο μεταβολισμός, η αναπαραγωγή κ.τ.λ) και αλληλεπιδρούν με τα αντισώματα σε κοιλότητες πλούσιες σε αρωματικά και υδρόφοβα κατάλοιπα. Επιπλέον αποτελούν δείκτες σημαντικών νοσημάτων. Συνεπώς ο ακριβής προσδιορισμός της συγκέντρωσής τους στο αίμα ή στα ούρα έχει μεγάλη σημασία για την κλινική διάγνωση και για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας μιας θεραπευτικής προσέγγισης. Επειδή αρκετοί μεταβολίτες, που μοιάζουν χημικά και δομικά με το υπό προσδιορισμό στεροειδές, μπορεί να συνυπάρχουν στο αίμα ή στα ούρα, είναι απαραίτητη η υψηλή ειδικότητα δέσμευσης των αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται στους ανοσοπροσδιορισμούς (Ducancel & Muller, 2012).

Για το σχεδιασμό των CDRs έχουν αναπτυχθεί αρκετές καινοτόμες προσεγγίσεις. Σε αυτές περιλαμβάνονται μέθοδοι de novo σχεδιασμού καθώς και μέθοδοι επανασχεδιασμού των ήδη υπάρχοντων αντισωμάτων για την αναγνώριση συγκεκριμένων επιτόπων σε ένα αντιγόνο- στόχο. Ορισμένες από αυτές τις μεθόδους μιμούνται τις φυσικές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών για να επιτύχουν υψηλή συγγένεια και ειδικότητα δέσμευσης για αντιγόνα που είναι δύσκολο να στοχευτούν. Ο de novo σχεδιασμός είναι δύσκολος και περίπλοκος εξαιτίας πολλών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της δυσκολίας ακριβούς πρόβλεψης της διαμόρφωσης των CDRs (ειδικά για τις CDRs που είναι μακριές και μεταβλητού μήκους) καθώς και των δομών των συμπλεγμάτων αντισώματος-αντιγόνου (Pantazes & Maranas, 2010). /

Τα πεπτίδια είναι ένας από τους πιο συχνούς στόχους των αντισωμάτων, χωρίς όμως να έχει κατανοηθεί πλήρως ο μηχανισμός δέσμευσης μεταξύ αντισωμάτων και εύκαμπτων πεπτιδικών αντιγόνων. Γενικά, τα πεπτίδια τείνουν να είναι λιγότερο δομημένα σε διάλυμα λόγω της έλλειψης έντονων ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων και αυτή η ευελιξία καθιστά δύσκολη την αξιολόγησή τους από δομική άποψη. Από θερμοδυναμική άποψη, ο σχηματισμός συμπλόκου αντισώματος-πεπτιδίου καθορίζει τη διαμόρφωση του πεπτιδίου και οδηγεί σε δυσμενή μεταβολή της εντροπίας διαμόρφωσης ( $\Delta S_{conf}$ ), προκαλώντας σχηματισμό αρκετών μη

ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ του αντισώματος και του πεπτιδίου και συμβάλλει στην ευνοϊκή μεταβολή της ενθαλπίας ( $\Delta H$ ) (Makabe, 2020).

Η ακριβής κατανόηση του μηχανισμού δέσμευσης των αντισωμάτων στα πεπτίδια θα βοηθούσε πολύ στο σχεδιασμό αντισωμάτων μελλοντικά. Επί του παρόντος, είναι πολύ δύσκολο να δημιουργηθεί ένα αντίσωμα για ορισμένα αντιγόνα-στόχους από την αρχή, αν και έχουν γίνει πολλές προσπάθειες σχεδιασμού. Ένας από τους λόγους αυτής της δυσκολίας είναι η δυναμική και ευέλικτη φύση των CDRs και της δομής του πεπτιδικού αντιγόνου. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν τη σημασία των ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται στην αδέσμευτη κατάσταση του πεπτιδικού αντιγόνου. Αυτοί οι δεσμοί παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση του πεπτιδίου από το αντίσωμα. Τέτοιοι ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου περιορίζουν τη διακύμανση του πεπτιδίου και μειώνουν την εντροπία διαμόρφωσης, με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση της αδέσμευτης κατάστασης και την αύξηση της συγγένειας δέσμευσης αυξάνοντας την μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας ( $\Delta G$ ) (Miyabe et al, 2018).

Η σταθερότητα διαμόρφωσης (η αναδίπλωση) είναι κρίσιμο χαρακτηριστικό των αντισωμάτων για τη διατήρηση της μακροχρόνιας δραστηριότητάς τους. Ο υψηλός βαθμός ομοιότητας μεταξύ των αλληλουχιών διαφορετικών αντισωμάτων, καθώς και ο μεγάλος αριθμός διαθέσιμων αλληλουχιών και δομών των αντισωμάτων, έχει οδηγήσει στο να κατανοήσουμε επαρκώς τον τρόπο σταθεροποίησης των αντισωμάτων. Αυτές οι μέθοδοι βασίζονται στη γνώση από προηγούμενες πειραματικές μελέτες στις οποίες έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις που αυξάνουν τη σταθερότητα διαμόρφωσης και είναι σπάνιες ή απουσιάζουν στα συμβατικά αντισώματα. Οι μεταλλάξεις επηρεάζουν την αναδίπλωση των αντισωμάτων και τη δομή τους στο χώρο. Επίσης βασίζονται σε στατιστικά στοιχεία για τον εντοπισμό σταθεροποιητικών μεταλλάξεων με βάση την υπόθεση ότι οι πιο κοινές αλληλουχίες των αντισωμάτων είναι και οι βέλτιστες (Honegger, 2008). Η σταθερότητα της αναδίπλωσης των αντισωμάτων πρέπει οπωσδήποτε να ληφθεί υπόψη όταν εισάγονται μεταλλάξεις στις CDRs των αντισωμάτων για τη βελτίωση της συγγένειας και της ειδικότητας δέσμευσης (Helms & Wetzel, 1995). Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι η εισαγωγή στα αντισώματα πρόσθετων ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών αυξάνει τη σταθερότητα της αναδίπλωσης τους (Kim et al, 2012).



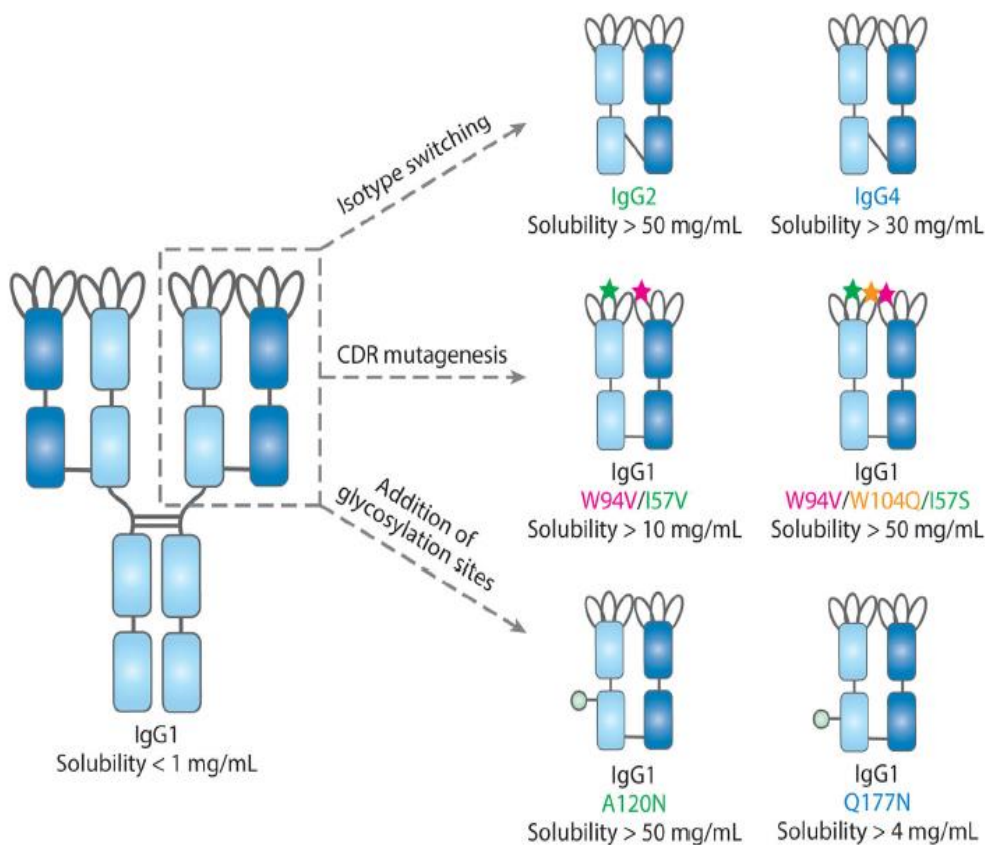
Η κολλοειδής σταθερότητα είναι ένα χαρακτηριστικό των αντισωμάτων που σχετίζεται με τη διαλυτότητα των καταλοίπων τους που εκτίθενται στον διαλύτη καθώς βρίσκονται αναδιπλωμένα στη φυσική τους δομή. Το χαρακτηριστικό αυτό δεν είναι τόσο κατανοητό όσο η σταθερότητα της διαμόρφωσης. Ωστόσο, η κολλοειδής σταθερότητα είναι ένα κρίσιμο χαρακτηριστικό των αντισωμάτων, ειδικά για εκείνα τα αντισώματα που έχουν υψηλή σταθερότητα διαμόρφωσης, όπως παρατηρείται σε πολλές ανοσοσφαιρίνες IgG.

Υπάρχουν τρία βασικά στοιχεία των αντισωμάτων που επηρεάζουν τη διαλυτότητά τους, συγκεκριμένα οι CDRs, τα πλαίσια των μεταβλητών και σταθερών περιοχών καθώς και οι γλυκάνες. Οι CDRs συνήθως περιέχουν υδρόφοβα και φορτισμένα κατάλοιπα που μεσολαβούν στην υψηλή συγγένεια δέσμησης. Όμως αυτά τα ίδια κατάλοιπα μπορούν να μεσολαβήσουν επίσης στην συσσωμάτωση των αντισωμάτων η οποία επιδρά αρνητικά στις διαγνωστικές και θεραπευτικές εφαρμογές των αντισωμάτων, καθώς προκαλεί τόσο μείωση του ενεργού κλάσματος των αντισωμάτων όσο και πιθανή αύξηση της ανοσολογικής απόκρισής τους. Επομένως, οι μεταλλάξεις στις CDRs μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τη διαλυτότητα των αντισωμάτων. Τα πλαίσια των μεταβλητών και σταθερών περιοχών των αντισωμάτων είναι επίσης σημαντικοί καθοριστικοί παράγοντες της διαλυτότητάς τους. Αυτές οι περιοχές τυπικά περιέχουν υδρόφοβες περιοχές (π.χ. θέσεις πρόσδεσης του υποδοχέα Fc) και αντίθετα φορτισμένες περιοχές που μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους ή με τις CDRs και να μειώσουν τη διαλυτότητα (Perchiacca et al, 2014). Τέλος οι γλυκάνες επηρεάζουν συνήθως με θετικό τρόπο τη διαλυτότητα (Kayser et al, 2011).

Στην εικόνα 3-3 συνοψίζεται η επίδραση των τριών αυτών παραγόντων στη διαλυτότητα των αντισωμάτων. Ο Pepinsky και οι συνεργάτες του (2010) προσπάθησαν να αυξήσουν την διαλυτότητα ενός αντισώματος έναντι της γλυκοπρωτεΐνης LINGO-1. Επειδή αυτό το αντίσωμα έχει πολύ υψηλή συγγένεια δέσμησης και βιοδραστικότητα, μελετήθηκαν διάφορες προσεγγίσεις για την αύξηση της διαλυτότητάς του χωρίς μείωση της συγγένεια δέσμησης.

Η πρώτη προσέγγιση ήταν η αλλαγή του πλαισίου των μεταβλητών και σταθερών περιοχών από ένα αντίσωμα IgG1 σε IgG2 και IgG4. Αυτή η αλλαγή είχε

ως αποτέλεσμα τεράστιες αυξήσεις στη διαλυτότητα. Η διαλυτότητα ήταν μικρότερη από 1 mg/mL και έφτασε τα 30 mg/mL για το αντίσωμα IgG4 και τα 50 mg/mL για το αντίσωμα IgG2. Η αιτία αυτής της αύξησης δεν είναι πλήρως ξεκάθαρη καθώς τα ισοηλεκτρικά σημεία των τριών υποτάξεων είναι όλα υψηλά (>pH 8,2) και τα αντισώματα IgG2 και IgG4 εμφανίζουν σταθερότητα αναδίπλωσης παρόμοιες ή λίγο μικρότερη από εκείνη του μητρικού αντισώματος IgG1.



**Εικόνα 3-3. Μέθοδοι σχεδιασμού για την αύξηση της διαλυτότητας των αντισωμάτων. Διάφορες προσεγγίσεις βρέθηκαν να αυξάνουν τη διαλυτότητα ενός αντισώματος έναντι της γλυκοπρωτεΐνης LINGO-1 χωρίς να έχουν σημαντική επίδραση στη συγγένεια δέσμευσης (Pepinsky et al, 2010).**

Στις διάφορες θεραπευτικές εφαρμογές προτιμώνται συγκεκριμένες υποτάξεις IgG γι' αυτό οι ερευνητές μελέτησαν επιπλέον την επίδραση των μεταλλάξεων στις CDRs καθώς και των γλυκανών στη διαλυτότητα του μητρικού αντισώματος IgG1 (έναντι της γλυκοπρωτεΐνης LINGO-1). Υδροφοβα κατάλοιπα σε HCDR2

(ισολευκίνη 57), HCDR3 (τρυπτοφάνη 104) και LCDR3 (τρυπτοφάνη 94) μεταλλάχθηκαν για να είναι λιγότερο υδρόφοβα ή πολικά. Πολλαπλές μεταλλάξεις σε αυτές τις θέσεις αύξησαν τη διαλυτότητα περισσότερο από μια τάξη μεγέθους χωρίς να μειώσουν τη συγγένεια δέσμευσης.

Η γλυκοζυλίωση βρέθηκε επίσης ότι επηρεάζει σημαντικά τη διαλυτότητα του μητρικού αντισώματος IgG1. Για παράδειγμα, η αφαίρεση των γλυκανών από τις υποτάξεις IgG2 και IgG4 μείωσε τη διαλυτότητα σε επίπεδα παρόμοια με εκείνα του μητρικού αντισώματος IgG1 (είτε με ή χωρίς γλυκάνες). Αυτό υποδηλώνει ότι οι γλυκάνες ευθύνονται για την μεγαλύτερη διαλυτότητα των υποτάξεων IgG2 και IgG4. Οι ερευνητές εισήγαγαν επίσης τέσσερις διαφορετικές θέσεις γλυκοζυλίωσης εντός της περιοχής CH1 του αντισώματος IgG1. Παρατηρήθηκε ότι η διαλυτότητα των γλυκοζυλιωμένων αντισωμάτων ήταν υψηλή για τις δύο περιπτώσεις (>50 mg/mL) και μέτρια για τις άλλες δύο (3-5 mg/mL), όμως δεν κατέστη εφικτό να αιτιολογηθούν οι διαφορές με βάση την εγγύτητα των θέσεων γλυκοζυλίωσης στις μεταβλητές περιοχές (Pepinsky et al, 2010).

Όταν τα αντισώματα στοχεύουν παθογόνα κύτταρα είναι απαραίτητο να αυξηθούν οι εκτελεστικές λειτουργίες τους. Πολλές μελέτες ερευνούν τον τρόπο με τον οποίο μπορούν να ενισχυθούν οι εκτελεστικές λειτουργίες των αντισωμάτων αλλάζοντας τα αμινοξέα στην Fc περιοχή ή τροποποιώντας τη γλυκοζυλίωση της Fc περιοχής. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με ενίσχυση της εξαρτώμενης από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητικής κυτταροτοξικότητας (ADCC) που επιτυγχάνεται με μεταλλάξεις στα αμινοξέα της Fc περιοχής ή με αφαίρεση της φουκόζης από την Fc περιοχή (αποφουκοζυλιωμένο αντίσωμα). Οι στοχευμένες μεταλλάξεις αφορούν κυρίως τα κατάλοιπα αμινοξέων της Fc περιοχής που συνήθως αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς Fcγ και C1q όπως Gly<sup>236</sup>, Ser<sup>239</sup>, Phe<sup>243</sup>, Pro<sup>247</sup>, Asp<sup>280</sup>, Lys<sup>290</sup>, Arg<sup>292</sup>, Ser<sup>298</sup>, Thr<sup>299</sup>, Tyr<sup>300</sup>, Val<sup>305</sup>, Lys<sup>326</sup>, Ala<sup>330</sup>, Ile<sup>332</sup>, Glu<sup>333</sup>, Lys<sup>334</sup>, Ala<sup>339</sup> και Pro<sup>396</sup> (Strohl, 2009). Επίσης η ενίσχυση των εκτελεστικών λειτουργιών των αντισωμάτων μπορεί να πραγματοποιηθεί με ενίσχυση της εξαρτώμενης από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητας (CDC) που επιτυγχάνεται με ανάμιξη των υποτάξεων IgG1 και IgG3. Τα αντισώματα που παράγονται με τη χρήση αυτών των τεχνολογιών έχουν δείξει αυξημένη αποτελεσματικότητα σε μια σειρά προκλινικών πειραμάτων.

Η ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη IgG έχει δύο N-συνδεδεμένους ολιγοσακχαρίτες στη θέση της συντηρημένης ασπαραγίνης 297 (Asn297) που βρίσκεται στην περιοχή CH2 και έτσι δημιουργείται μία ετερογένεια με 30 ή περισσότερες γλυκομορφές. Η ίδια η γλυκοζυλίωση και οι διάφορες γλυκομορφές επηρεάζουν τις βιολογικές λειτουργίες της IgG. Τα αντισώματα με αποφουκοζυλιωμένους ολιγοσακχαρίτες έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν περίπου 100 φορές υψηλότερη δραστηριότητα ADCC από τα πλήρως φουκοζυλιωμένα αντίστοιχα αντισώματα και ότι διαθέτουν αυξημένη *in vivo* αντικαρκινική δράση.

Παρά τα πλεονεκτήματα που εμφανίζουν τα αποφουκοζυλιωμένα αντισώματα, τα θεραπευτικά αντισώματα που κυκλοφορούν σήμερα στην αγορά αποτελούνται ως επί το πλείστον από μία εξαιρετικά φουκοζυλιωμένη γλυκομορφή (> 90%). Αυτό οφείλεται κυρίως στα χαρακτηριστικά των κυτταρικών σειρών του ξενιστή. Οι περισσότερες εγκεκριμένες διαδικασίες παραγωγής θεραπευτικών αντισωμάτων χρησιμοποιούν ως κυτταρικές σειρές ξενιστών κύτταρα θηλαστικών τρωκτικών. Για παράδειγμα χρησιμοποιούνται κυτταρικές σειρές CHO (που προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα ωοθηκών κινέζικου χάμστερ) και κυτταρικές σειρές μυελώματος ποντικού NS0 και SP2/0 επειδή έχουν εύκολες και υψηλής απόδοσης διαδικασίες παραγωγής. Ωστόσο, αυτές οι κυτταρικές σειρές των τρωκτικών δεν είναι κατάλληλες για την παραγωγή πλήρως αποφουκοζυλιωμένων αντισωμάτων καθώς διατηρούν ένα υψηλό επίπεδο ενδογενούς δραστηριότητας του ενζύμου α-1,6-φουκοζυλοτρανσφεράση (FUT8), το οποίο είναι υπεύθυνο για τη φουκοζυλίωση των N-συνδεδεμένων ολιγοσακχαριτών. Συνεπώς γίνονται προσπάθειες να παραχθούν, με την γονιδιακή στόχευση και την τεχνική του ομόλογου ανασυνδυασμού, κυτταρικές σειρές CHO με νοκ-άουτ γονίδιο για την FUT8. Τα κύτταρα CHO που δεν εκφράζουν το γονίδιο της FUT8 έχουν αμετάβλητες όλες τις υπόλοιπες ιδιότητες των μητρικών κυττάρων όσον αφορά τη μορφολογία, την ανάπτυξη και την παραγωγή τους. Αυτά τα κύτταρα λοιπόν παράγουν πλήρως αποφουκοζυλιωμένα αντισώματα με σταθερή ποιότητα και σταθερά ενισχυμένη ADCC δραστηριότητα. Μάλιστα τα αποφουκοζυλιωμένα θεραπευτικά αντισώματα προκαλούν μικρότερη ή καμία ανεπιθύμητη ανοσολογική απόκριση από τον ασθενή. Επίσης έχουν αρχίσει να επιδεικνύουν κλινικά αποτελέσματα σε δόσεις σημαντικά χαμηλότερες από το τυπικό εύρος δόσεων των

θεραπευτικών αντισωμάτων που κυκλοφορούν σήμερα στην αγορά (της τάξης του 1,0 mg/kg) και φαίνονται αρκετά ασφαλή ώστε να αποτελέσουν τα θεραπευτικά αντισώματα της επόμενης γενιάς. Ως εκ τούτου, όπως αποδεικνύεται από μια σειρά προκλινικών μελετών τα αποφουκοζυλιωμένα αντισώματα θα μπορούσαν να προσφέρουν μεγάλα οφέλη μειώνοντας σημαντικά τις χορηγούμενες δόσεις.

Η έκφραση ρυθμιστικών πρωτεϊνών του συμπληρώματος (complement regulatory proteins- CRPs) όπως CD35, CD46, CD55 και CD59 οι οποίες αναστέλλουν τον καταρράκτη του συμπληρώματος, μειώνουν σημαντικά τη εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα (CDC). Επομένως η αποτελεσματικότητα των θεραπευτικών αντισωμάτων που πραγματοποιείται μέσω της CDC θα μπορούσε να παρεμποδιστεί από τις CRPs. Αντιθέτως, ενίσχυση της δραστηριότητας της CDC θα μπορούσε να επιτευχθεί με μεταλλάξεις των αντισωμάτων που έχουν ως αποτέλεσμα την τροποποίηση αμινοξέων στην περιοχή CH2 ή στην περιοχή του αρμού και διευκολύνουν τη σύνδεση της περιοχής Fc στην C1q. Μια άλλη προσέγγιση για την ενίσχυση της δραστηριότητας της CDC είναι η ανάμιξη των αλληλουχιών της βαριάς αλυσίδας των υποτάξεων IgG1 και IgG3.

Τέλος, μπορεί να γίνει επιτυχημένος συνδυασμός της ενίσχυση της δραστηριότητας ADCC (με αφαίρεση της φουκόζης από την Fc περιοχή) και της ταυτόχρονης ενίσχυσης της δραστηριότητας της CDC (με ανάμιξη των υποτάξεων IgG1 και IgG3) χωρίς να επηρεάζουν η μία την άλλη, για να δημιουργήσουν ένα πολύ κλινικά αποτελεσματικό αντίσωμα με διπλά ενισχυμένες εκτελεστικές λειτουργίες (Kubota et al, 2009).

Μια άλλη τεχνική για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας των θεραπευτικών αντισωμάτων μπορεί να είναι η παράταση του χρόνου ημιζωής τους *in vivo*. Στους ανθρώπους τα αντισώματα συνήθως έχουν χρόνο ημιζωής 2 εβδομάδες. Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες που επιχειρούν να εισαγάγουν μεταλλάξεις στην περιοχή Fc οι οποίες καθιστούν τα αντισώματα ικανά να δεσμεύουν πιο ισχυρά τον νεογνικό υποδοχέα FcRn (neonatal Fc Receptor). Οι στοχευμένες μεταλλάξεις αφορούν κυρίως κατάλοιπα αμινοξέων όπως Ile<sup>253</sup>, His<sup>310</sup>, Gln<sup>311</sup>, His ή Arg<sup>435</sup> και Phe ή Tyr<sup>436</sup> καθώς και εκείνα που περιβάλλουν αυτές τις κρίσιμες θέσεις (Petkova, 2006). Ο υποδοχέας FcRn εκφράζεται σε μια ποικιλία ενδοθηλιακών κυττάρων και

μεσολαβεί στην ομοιόσταση της ανοσοσφαιρίνης IgG αυξάνοντας τον χρόνο ημιζωής της στον ορό. Η πρόσδεση της IgG στον FcRn εξαρτάται αυστηρά από το pH. Η IgG μπορεί να δεσμεύσει τον FcRn σε ενδοσώματα κάτω από ελαφρώς όξινες συνθήκες (pH 6,0-6,5) και μπορεί να απελευθερωθεί από την κυτταρική επιφάνεια κάτω από ελαφρώς βασικές συνθήκες (pH 7,0-7,4). Η παράταση του χρόνου ημιζωής των αντισωμάτων μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του κόστους της θεραπείας βελτιώνοντας την αποτελεσματικότητα, μειώνοντας τη δόση και τη συχνότητα χορήγησης των αντισωμάτων (Raghavan et al, 1995).

Γενικά οι προσπάθειες βελτιστοποίησης ενός αντισώματος δεν είναι μία εύκολη διαδικασία καθώς περιορίζονται από το γεγονός ότι βελτιώνοντας ένα χαρακτηριστικό (όπως τη συγγένεια δέσμευσης) μπορεί να χειροτερεύουμε ένα άλλο χαρακτηριστικό (όπως τη διαλυτότητα). Συνεπώς οι έρευνες στον τομέα αυτό θα συνεχιστούν. Δεδομένου του μεγάλου μεγέθους και της πολυπλοκότητας των αντισωμάτων, οι περισσότερες προσπάθειες σχεδιασμού έχουν επικεντρωθεί στη βελτιστοποίηση των ήδη υπαρχόντων αντισωμάτων παρά στον *de novo* σχεδιασμό νέων αντισωμάτων. Ένα κοινό χαρακτηριστικό των μεθόδων αυτών είναι ότι προσπαθούν να μειώσουν την ανάγκη ελέγχου και διαλογής των αντισωμάτων καθώς και την ανεπιθύμητη ανοσολογική απόκριση τους. Αυτό οδήγησε στη δημιουργία αντισωμάτων με ιδιότητες που είναι ασυνήθιστες ή απουσιάζουν στα συμβατικά αντισώματα (Tiller & Tessier, 2015).

### **3.6 Αντισώματα διπλής εξειδίκευσης**

Οι περισσότερες ασθένειες περιλαμβάνουν πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Συνεπώς η ταυτόχρονη στόχευση μπορεί να περιορίσει την αντίσταση της νόσου στη μεμονωμένη ή συνδυαστική θεραπεία. Πολλαπλές αναστολές των υποδοχέων και των συνδετών μπορούν να προκαλέσουν καλύτερες θεραπευτικές παρεμβάσεις στα σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται, για παράδειγμα με τον καρκίνο, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή τις φλεγμονώδεις ασθένειες. Η συνδυαστική θεραπεία έχει χρησιμοποιηθεί στην ανακάλυψη μικρών φαρμακευτικών μορίων και επεκτείνεται στα θεραπευτικά αντισώματα. Πρόκειται για τα αντισώματα διπλής εξειδίκευσης (Bispecific antibodies- BsAbs). Τα αντισώματα διπλής εξειδίκευσης

συνδυάζουν ειδικότητες δύο αντισωμάτων και συνδέονται ταυτόχρονα με διαφορετικά αντιγόνα ή επίτοπους. Ο κύριος σκοπός είναι να αντιμετωπιστούν ταυτόχρονα διαφορετικοί στόχοι που εμπλέκονται σε παθοφυσιολογικές διεργασίες και έτσι να αυξηθεί η θεραπευτική αποτελεσματικότητα.

Μεταξύ των πλεονεκτημάτων των αντισωμάτων διπλής εξειδίκευσης περιλαμβάνεται η βελτίωση των εκτελεστικών λειτουργιών τους στοχεύοντας συγκεκριμένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος εκτός από τον θεραπευτικό στόχο, η παροχή αντισωμάτων σε διαφορετικά όργανα (όπως ο εγκέφαλος) στοχεύοντας πρωτεΐνες μεταφοράς εκτός από τον θεραπευτικό στόχο, η αύξηση της εξειδίκευσης για παθογόνα κύτταρα στοχεύοντας ταυτόχρονα δύο αντιγόνα της κυτταρικής επιφάνειας και η αύξηση της θεραπευτικής δράσης εμποδίζοντας ταυτόχρονα δύο διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Αυτά και τα σχετικά πλεονεκτήματα των διειδικών αντισωμάτων έχουν προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη και τη βελτιστοποίησή τους.

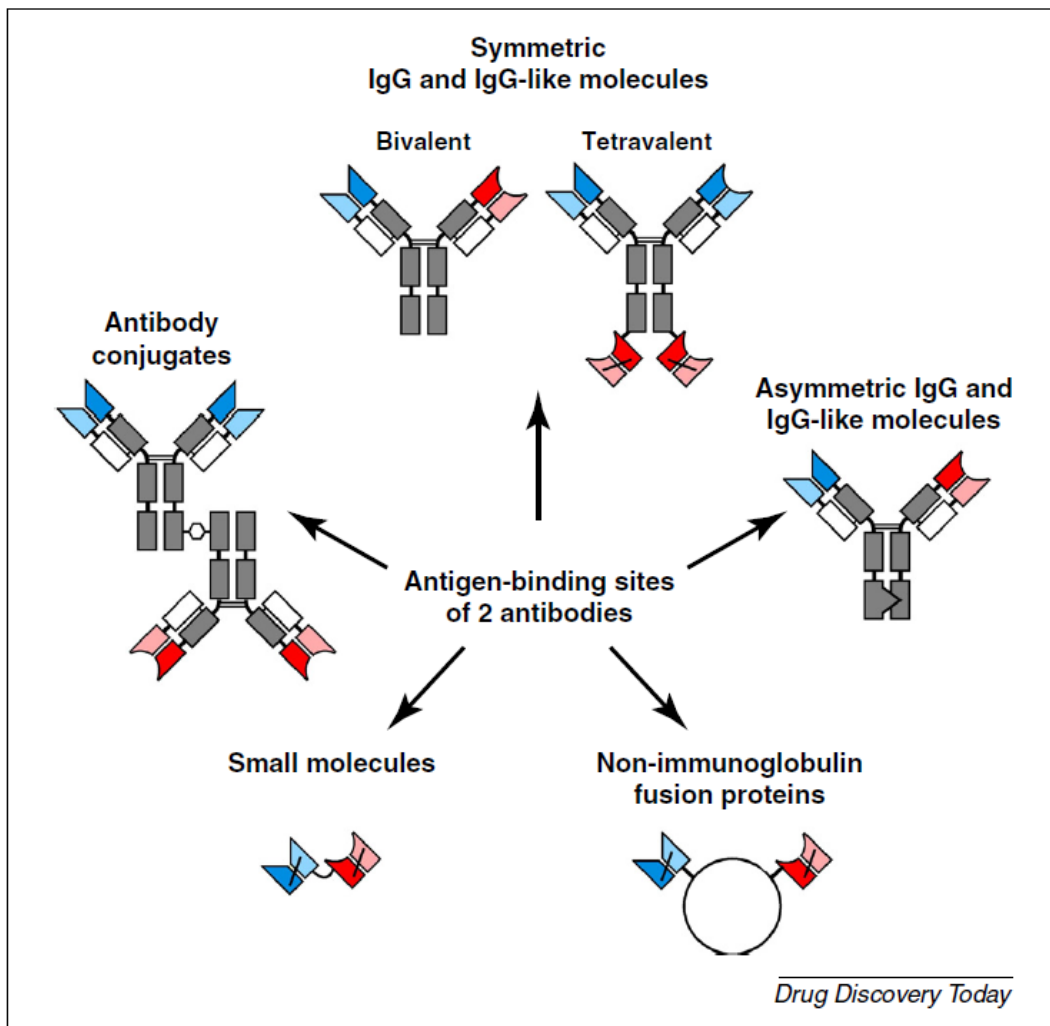
Μία από τις πρώτες εφαρμογές των αντισωμάτων διπλής εξειδίκευσης ήταν η ανακατεύθυνση των T κυττάρων. Ο ένας βραχίονας Fv στόχευε την περιοχή CD3 στο σύμπλεγμα του υποδοχέα των T κυττάρων και ο άλλος βραχίονας Fv μπορούσε να προσδεθεί στον επίτοπο ενός κυττάρου- στόχου φέρνοντας έτσι τα κυτταροτοξικά T κύτταρα πολύ κοντά με το κύτταρο- στόχο και προωθώντας τη λύση και την αποβολή του κυττάρου- στόχου.

Τα αντισώματα διπλής εξειδίκευσης άλλοτε είναι θραύσματα αντισωμάτων με ή χωρίς περιοχές Fc, άλλοτε περιοχές Fc που μπορούν επίσης να είναι συνδεθούν με το αντιγόνο και άλλοτε πλήρη αντισώματα IgG. Γενικά, τα αντισώματα διπλής εξειδίκευσης μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες κατηγορίες, εκείνα που φέρουν μια περιοχή Fc και εκείνα που δεν διαθέτουν περιοχή Fc. Η περιοχή Fc διευκολύνει τον καθαρισμό του αντισώματος διπλής εξειδίκευσης και συμβάλει στη βελτιωμένη διαλυτότητα και σταθερότητα του. Επιπλέον, η παρουσία της περιοχής Fc ενεργοποιεί κάποιους φυσιολογικούς εκτελεστικούς μηχανισμούς που είναι απαραίτητοι για τη θεραπευτική δράση, όπως η εξαρτώμενη από αντίσωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα (ADCC) και η εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα (CDC). Επίσης λόγω της περιοχής Fc τα αντισώματα έχουν

μεγάλο χρόνο ημιζωής που προκύπτει από το μεγαλύτερο μέγεθος και τις διαδικασίες ανακύκλωσης που συμπεριλαμβάνουν τον νεογενικό υποδοχέα FcRn (neonatal Fc Receptor). Αντίθετα, τα αντισώματα διπλής εξειδίκευσης που δεν έχουν περιοχή Fc βασίζονται εξ ολοκλήρου στην ικανότητα δέσμευσης αντιγόνου για να ασκήσουν τις θεραπευτικές τους δραστηριότητες. (Kontermann & Brinkmann, 2015).

Υπάρχουν διάφορες στρατηγικές που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία αντισωμάτων διπλής εξειδίκευσης (BsAbs) που προέρχονται από τις θέσεις πρόσδεσης αντιγόνου δύο διαφορετικών αντισωμάτων (Εικόνα 3-4). Τα συμμετρικά αντισώματα διπλής εξειδίκευσης δημιουργούνται από τη συναρμολόγηση αντισωμάτων με μη τροποποιημένες σταθερές περιοχές βαριάς αλυσίδας, όπως με ετεροδιμερισμό βαριών αλυσίδων από δύο διαφορετικά αντισώματα ή ομοδιμερισμό βαριών αλυσίδων που επεκτείνονται από μια πρόσθετη θέση πρόσδεσης που οδηγεί σε δισθενή ή τετρασθενή μόρια αντίστοιχα. Ο ετεροδιμερισμός τροποποιημένων βαριών αλυσίδων οδηγεί σε ασύμμετρα αντισώματα διπλής εξειδίκευσης. Εναλλακτικά, δύο διαφορετικά θραύσματα αντισώματος, όπως το scFv, μπορούν να συντηχθούν με μια πρωτεΐνη που δεν είναι ανοσοσφαιρίνη, όπως η λευκωματίνη. Ακόμη, δύο θραύσματα που δεσμεύουν το αντιγόνο μπορούν να συντηχθούν απευθείας, με αποτέλεσμα να προκύπτουν μικρά μόρια αντισωμάτων διπλής εξειδίκευσης. Τέλος, το αντίσωμα διπλής εξειδίκευσης μπορεί επίσης να δημιουργηθεί με χημική σύζευξη δύο διαφορετικών αντισωμάτων (Kontermann & Brinkmann, 2015).





Εικόνα 3-4. Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών στρατηγικών που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία αντισωμάτων διπλής εξειδίκευσης (BsAbs) που προέρχονται από τις θέσεις πρόσδεσης αντιγόνου δύο διαφορετικών αντισωμάτων (Kontermann & Brinkmann, 2015).

Υπάρχουν πλεονεκτήματα στη χρησιμοποίηση αντισωμάτων που διαθέτουν δύο εξειδικεύσεις σύνδεσης όμως υπάρχουν και κάποια μειονεκτήματα. Ειδικά τα πρώτα αντισώματα διπλής εξειδίκευσης ήταν δύσκολο να παραχθούν σε μεγάλη κλίμακα. Ήταν χμιαρικά αντισώματα που είχαν ως αποτέλεσμα μια ανεπιθύμητη ανοσολογική απόκριση από τον ασθενή μειώνοντας έτσι την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητά τους. Τα αντισώματα διπλής εξειδίκευσης δεύτερης γενιάς χρησιμοποίησαν θραύσματα αντισωμάτων, όπως το scFv, που συνδέθηκαν με πεπτίδια για να δημιουργήσουν μόρια βασισμένα στα αντισώματα διπλής εξειδίκευσης. Όμως οι διαδικασίες αυτές απαιτούσαν βελτιστοποίηση για να

παράγουν αντισώματα με τις πιο ευνοϊκές βιοφυσικές ιδιότητες για μια επιτυχημένη θεραπευτική εφαρμογή τους (Chiu & Gilliland, 2016).

Στις μέρες μας ο σχεδιασμός των αντισωμάτων διπλής εξειδίκευσης έχει προχωρήσει πολύ ώστε να μοιάζουν περισσότερο με το ανθρώπινο αντίσωμα IgG αυξάνοντας την κλινική αποτελεσματικότητά τους. Αυτό επιτρέπει την παρασκευή αρκετών νέων μορφών αντισωμάτων διπλής εξειδίκευσης με υψηλές αποδόσεις και υψηλή ομοιογένεια χρησιμοποιώντας συμβατικές τεχνικές έκφρασης και καθαρισμού (Grote et al, 2012).

Η βελτιστοποίηση των αντισωμάτων γίνεται επιλέγοντας βραχίονες Fab για τη ρύθμιση της εξειδίκευσης αντιγόνου και της συγγένειας δέσμευσης χρησιμοποιώντας την ωρίμανση συγγένειας της μεταβλητής περιοχής. Επιπλέον η ανθρωποποίηση του αντισώματος γίνεται για τη μείωση της ανεπιθύμητης ανοσολογικής απόκρισης. Εκτός από τον βραχίονα Fab και η περιοχή Fc μπορεί να τροποποιηθεί για να αυξηθεί η θεραπευτική αποτελεσματικότητα των αντισωμάτων. Υπάρχουν σημειακές μεταλλάξεις στις περιοχές Fc που μπορούν να ενισχύσουν ή να μειώσουν την πρόσδεση τους. Η γλυκοζυλίωση των περιοχών Fc αυξάνει την ασφάλεια ή την αποτελεσματικότητα των αντισωμάτων καθώς οι περιοχές Fc ενεργοποιούν τους φυσιολογικούς εκτελεστικούς μηχανισμούς που είναι απαραίτητοι για τη θεραπευτική δράση (Chiu & Gilliland, 2016).

### **3.7 Συμπλέγματα αντισώματος-φαρμάκου (Antibody-drug conjugates, ADCs)**

Τα θεραπευτικά αντισώματα που στοχεύουν επιφανειακά αντιγόνα στα καρκινικά κύτταρα συνδέονται χημικά με κυτταροτοξικά φάρμακα και σχηματίζουν συμπλέγματα αντισώματος-φαρμάκου (Antibody-drug conjugates, ADCs) προκειμένου να αυξηθεί η κυτταροτοξικότητά τους (Sievers & Senter, 2013).

Η παραγωγή αποτελεσματικών ADCs που μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια είναι εξαιρετικά δύσκολη. Μπορεί να παρουσιαστούν πολλά πιθανά προβλήματα όπως μειωμένη βιοδραστικότητα των συζευγμένων φαρμάκων, μειωμένη ειδικότητα ή συγγένεια δέσμευσης των τροποποιημένων αντισωμάτων,

πρόωρη απελευθέρωση του συζευγμένου φαρμάκου, ανεπαρκής ενδοκυττάρωση και μικρός χρόνος ημιζωής και βιοδιαθεσιμότητας. Χρειάζονται λοιπόν νέες ερευνητικές προσπάθειες για την βελτιστοποίηση της αλληλουχίας και της δομής των φαρμάκων, των αντισωμάτων και των συνδετών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των ADCs.

Συγκεκριμένα, τα περισσότερα ADCs δημιουργούνται με τη σύνδεση φαρμάκων σε κυστεΐνες ή λυσίνες που εκτίθενται στην επιφάνεια των αντισωμάτων. Σε κάποιες περιπτώσεις εισάγονται σπάνια αμινοξέα (όπως η σεληνοκυστεΐνη) ή ακόμη και συνθετικά αμινοξέα στα αντισώματα και τα βοηθούν στη σύνδεσή τους με τα φάρμακα (Tiller & Tessier, 2015).

## **4. Ανοσολογικές διαγνωστικές τεχνικές για την έγκαιρη διάγνωση των ανθρωπίνων νοσημάτων**

Η σύνδεση αντισώματος- αντιγόνου βρίσκει εφαρμογή σε διάφορες ανοσολογικές τεχνικές που βοηθούν στην διάγνωση σημαντικών ανθρώπινων ασθενειών. Πρόκειται για αναλυτικές ποσοτικές μεθόδους που εφαρμόζονται στον ανοσολογικό προσδιορισμό και στηρίζονται στη μοναδική ειδικότητα και συγγένεια των αντισωμάτων προς τα αντίστοιχα αντιγόνα. Διακρίνονται λοιπόν για την υψηλή ειδικότητα, την ταχύτητα και την ευαισθησία με την οποία επιτρέπουν την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πλήθους βιομορίων.

Αυτές οι αναλύσεις βρίσκουν εφαρμογή στην ανάπτυξη διαγνωστικών τεστ στον τομέα της υγείας, δοκιμασιών αλλεργιογόνων στη βιομηχανία τροφίμων και ανίχνευσης της ανοσίας. Με τη βοήθεια αυτών των ανοσολογικών διαγνωστικών τεχνικών μπορούν να ανιχνευθούν έγκαιρα διάφοροι παθογόνοι μικροοργανισμοί που ευθύνονται για πολλές λοιμώξεις βοηθώντας στην ταχύτερη και αποτελεσματικότερη αντιμετώπισή τους.

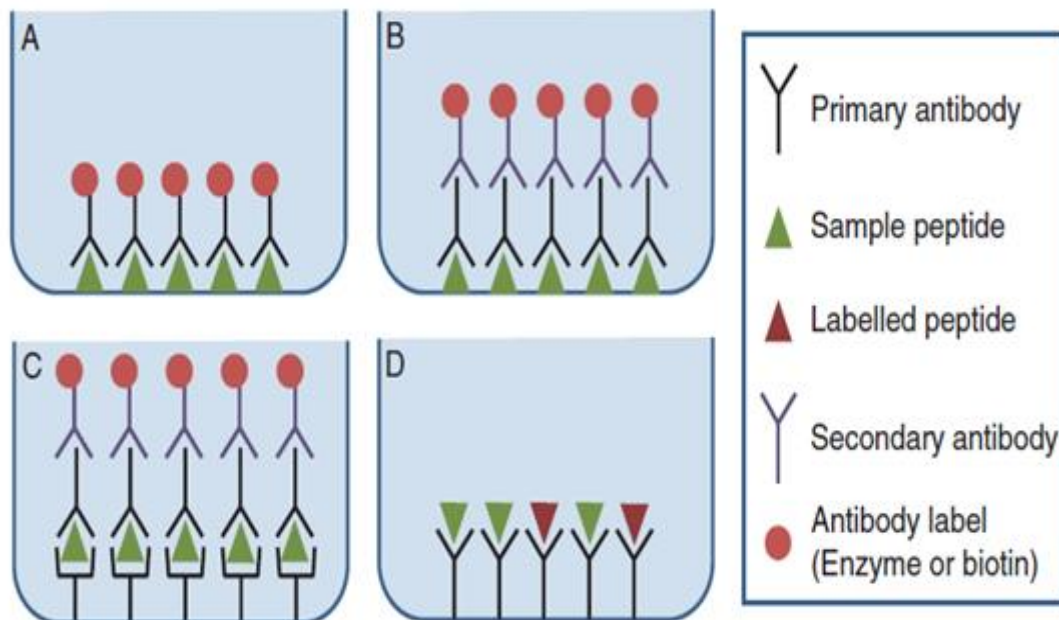
### **4.1 ELISA (ανοσοαπορροφητική μέθοδος συνδεδεμένου ενζύμου)**

Η ανοσοαπορροφητική μέθοδος συνδεδεμένου ενζύμου ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) είναι μία μέθοδος με την οποία γίνεται ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων όταν υπάρχει διαθέσιμο το αντίστοιχο αντιγόνο και αντίστροφα, ανίχνευση του αντιγόνου εφ' όσον υπάρχουν διαθέσιμα τα αντίστοιχα αντισώματα (Aydin, 2015). Η ELISA πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1971. Αρχικά, τα αντιγόνα ακινητοποιήθηκαν σε ένα μικροπλακίδιο και επώαστηκαν με αντιορό. Στη συνέχεια η συγκέντρωση του αντισώματος στον αντιορό προσδιορίστηκε ποσοτικά χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα το οποίο είναι συνδεδεμένο με ένζυμο και στοχεύει την ανοσοσφαιρίνη (Engvall & Perlmann, 1971).

Ο έλεγχος ELISA χρησιμοποιείται κυρίως όταν θέλουμε να προσδιορίσουμε με ειδικό τρόπο και ποσοτικά ένα αντιγόνο που βρίσκεται σε πολύ μικρή συγκέντρωση σε κάποιο δείγμα. Είναι μία ετερογενής ανοσοενζυμική μέθοδος στην

οποία χρησιμοποιείται αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο (συνήθως υπεροξειδάση ή αλκαλική φωσφατάση) που καταλύει μια αντίδραση χημειοφωταύγειας ή δίνει ένα έγχρωμο ή φθορίζον προϊόν.

Η ELISA βρίσκει εφαρμογή ως διαγνωστική δοκιμασία για διάφορες μολύνσεις όπως από τον ιό της ηπατίτιδας A και C (Duermeyer et al, 1979) (Major & Law, 2019), τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (human immunodeficiency virus- HIV) (Yeom et al, 2006), τον κυτταρομεγαλοϊό CMV (Busse et al, 2008), τον ιό της γρίπης τύπου A (Chen et al, 2019) και τον ιό Epstein Barr της λοιμώδους μονοπυρήνωσης (Mitchell et al, 1998). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4-1 υπάρχουν διάφορες παραλλαγές της ELISA.



Εικόνα 4-1. Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει τις διαφορές της άμεσης ELISA (A), της έμμεσης ELISA (B), ELISA τύπου sandwich (C) και συναγωνιστική ELISA (D) (Grange et al, 2014).

#### 4.1.1 Άμεση ELISA

Η απλούστερη παραλλαγή είναι η άμεση ELISA. Το δείγμα που περιέχει το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει προστίθεται πρώτα στο μικροπλακίδιο και επωάζεται. Το αντιγόνο απορροφάται στην επιφάνεια του βοθρίου. Τα βοθρία στη συνέχεια πλένονται καλά και έτσι παραμένει μόνο το απορροφημένο αντιγόνο. Στη συνέχεια

αποκλείονται οι εναπομείναντες θέσεις δέσμευσης στο βοθρίο. Ένα αντίσωμα, συμπληρωματικό προς το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει, προστίθεται στη συνέχεια στα βοθρία και συνδέεται με το αντιγόνο. Ακολουθεί πάλι πλύσιμο των βοθρίων και έτσι μένει ένα δεσμευμένο σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος στην επιφάνεια του βοθρίου. Το δεσμευμένο αντίσωμα θα έχει προσδεδεμένο ένα ένζυμο. Όταν λοιπόν προστεθεί το υπόστρωμα του ενζύμου παράγεται ένα ανιχνεύσιμο προϊόν. Η ανίχνευση του μπορεί να βασίζεται στο χρώμα, στον φθορισμό ή στη χημειοφωτάγεια.

Η άμεση ELISA έχει το πλεονέκτημα ότι είναι ταχύτερη και απλούστερη από τις άλλες μεθόδους ELISA καθώς απαιτεί λιγότερα βήματα και μόνο ένα αντίσωμα. Ωστόσο, έχει κάποιους περιορισμούς. Σε σύνθετα δείγματα, που περιέχουν μια σειρά διαφορετικών πρωτεϊνών, εκτός από το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει να προσδιορίσουμε θα υπάρχουν και πολλές άλλες πρωτεΐνες προσροφημένες στο βοθρίο. Συνεπώς η ευαισθησία της άμεσης ELISA είναι μικρή και αυτό αποτελεί πρόβλημα όταν το αντιγόνο που ενδιαφέρει είναι σε χαμηλή συγκέντρωση. Ένα άλλο θέμα είναι ότι το αντίσωμα πρέπει να έχει ένα ένζυμο συνδεδεμένο σε αυτό. Αυτή η δαπανηρή και χρονοβόρα διαδικασία πρέπει να επαναλαμβάνεται για κάθε μεμονωμένη ELISA, ένα πρόβλημα που αποφεύγεται με τις άλλες μεθόδους. Επιπλέον, η σύζευξη του αντισώματος με ένα ένζυμο υπάρχει περίπτωση να μειώσει τη συγγένεια του αντισώματος προς το αντιγόνο, και έτσι να μειώσει την ευαισθησία της ELISA (Grange et al, 2014).

#### **4.1.2 Έμμεση ELISA**

Στην έμμεση ELISA το δείγμα που περιέχει το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει προσροφάται στα βοθρία του μικροπλακιδίου, Στη συνέχεια αποκλείονται οι εναπομείναντες θέσεις δέσμευσης στο βοθρίο. Έπειτα προστίθεται ένα αντίσωμα συμπληρωματικό προς το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει (πρωτεύον αντίσωμα- primary antibody). Το πρωτεύον αντίσωμα συνδέεται με το αντιγόνο σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα αντιγόνου- αντισώματος. Η έμμεση ELISA διαφέρει από την άμεση μέθοδο στο γεγονός ότι το αντίσωμα που συνδέεται με το αντιγόνο δεν έχει συνδεδεμένο κάποιο ένζυμο ή οποιαδήποτε άλλη ουσία που παράγει σήμα. Αντίθετα,

ο σκοπός αυτού του αντισώματος είναι να λειτουργεί ως γέφυρα μεταξύ του αντιγόνου και ενός δευτερεύοντος αντισώματος που έχει συνδεδεμένο ένα ένζυμο. Αυτό το δευτερεύον αντίσωμα θα έχει αναπτυχθεί σε ένα ζώο διαφορετικό από εκείνο στο οποίο έχει αναπτυχθεί το πρωτογενές αντίσωμα και θα στοχεύει την περιοχή Fc του πρωτογενούς αντισώματος. Το δευτερεύον αντίσωμα προέρχεται από διαφορετικά Β λεμφοκύτταρα και είναι συχνά πολυκλωνικό συνεπώς θα ανταποκρίνεται σε διαφορετικούς επιτόπους του πρωτεύοντος αντισώματος. Αυτό επιτρέπει σε πολλαπλά δευτερεύοντα αντισώματα να συνδεθούν με το ίδιο πρωτεύον αντίσωμα, ενισχύοντας έτσι το σήμα και αυξάνοντας την ευαισθησία της τεχνικής. Εξακολουθεί όμως να υπάρχει το ζήτημα των σύνθετων δειγμάτων που έχουν πολλαπλές πρωτεΐνες προσροφημένες στην επιφάνεια του βοθρίου. Ένα άλλο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι το πρωτεύον αντίσωμα δεν είναι συζευγμένο με κάποιο ένζυμο και έτσι αποφεύγονται τα προβλήματα που περιγράφηκαν παραπάνω. Ως εκ τούτου, τα δευτερεύοντα αντισώματα μπορούν να διατεθούν στο εμπόριο σε πολύ χαμηλότερη τιμή και με μια ποικιλία συζεύξεων που παράγουν σήμα (δηλαδή, όλες οι ELISA που χρησιμοποιούν πρωτεύον αντίσωμα προερχόμενο από κουνέλι θα μπορούσαν να χρησιμοποιούν το ίδιο δευτερεύον αντίσωμα που στοχεύει την ανοσοσφαιρίνη IgG του κουνελιού) (Grange et al, 2014).

#### **4.1.3 ELISA τύπου sandwich**

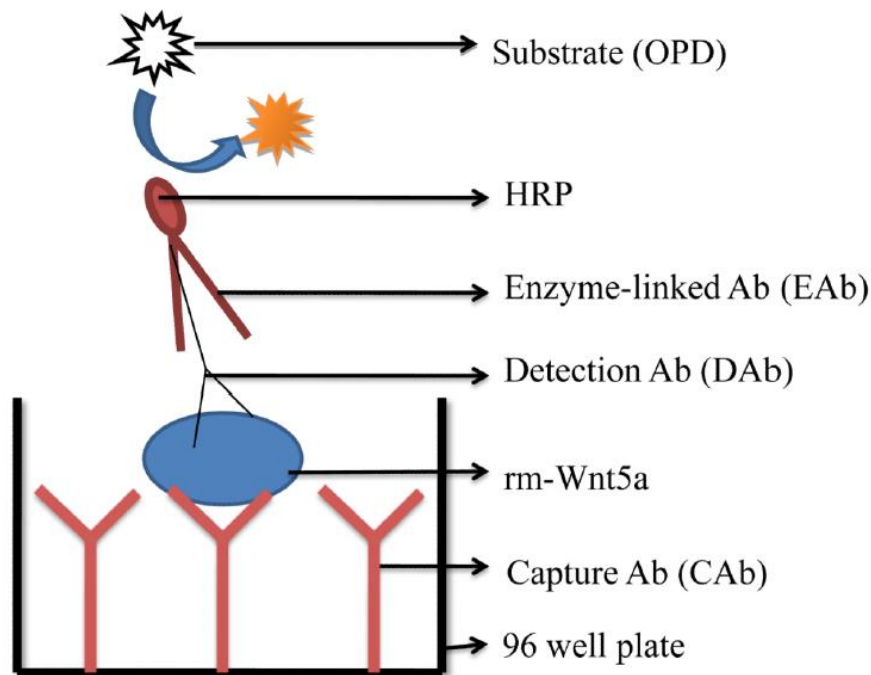
Η ELISA τύπου sandwich είναι η πιο συχνή παραλλαγή της ELISA (Εικόνα 4-2). Αρχικά το αντίσωμα που είναι συμπληρωματικό προς το αντιγόνο που θέλουμε να μετρήσουμε (αντίσωμα σύλληψης) ακινητοποιείται σε στερεή επιφάνεια (συνήθως μικροπλακίδιο από πολυστυρένιο με 96 ή 360 βοθρία) με διαμοριακές συνήθως δυνάμεις. Για την βελτιστοποίηση της ακινητοποίησης χρησιμοποιούνται μη ιονικά ουδέτερα απορρυπαντικά (όπως Triton X-100 και Tween 20). Έπειτα γίνεται έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα για να απομακρυνθούν όσα αντισώματα δεν προσδέθηκαν στο μικροπλακίδιο και στη συνέχεια αποκλείονται οι εναπομείναντες θέσεις δέσμησης στο βοθρίο. Ακολούθως προστίθεται το δείγμα του βιολογικού υγρού (π.χ. ορός αίματος) στο οποίο θέλουμε να προσδιορίσουμε το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει. Μετά από επώαση 20-30 min υπό ανάδευση, το αντιγόνο του δείγματος συνδέεται με το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Στη συνέχεια, γίνεται έκλυση των συστατικών του

Διπλωματική Εργασία

βιολογικού υγρού που δεν έχουν συνδεθεί στο αντίσωμα. Μόνο το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει μπορεί να παραμείνει στο μικροπλακίδιο αφού μπορεί να δεσμευτεί στο αντίσωμα. Από το σημείο αυτό και έπειτα η τεχνική προχωράει ακολουθώντας τα ίδια βήματα όπως μια άμεση ή έμμεση ELISA. Έτσι, προστίθεται στο διάλυμα της αντίδρασης ένα δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο και το οποίο αναγνωρίζει και συνδέεται σε ένα διαφορετικό αντιγονικό επίτοπο. Το δεύτερο αυτό αντίσωμα μπορεί να είναι προσδεδεμένο με χημειοφωταυγές μόριο ή με φθορίζον μόριο ή με χρωμοφόρο μόριο. Στο τέλος, αφού γίνει πάλι μια έκπλυση προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου και η ποσότητα του εξεταζόμενου αντιγόνου εκτιμάται μετρώντας την ποσότητα του τελικού προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης καθώς τα μεγέθη είναι ανάλογα. Η μέτρηση γίνεται με λουμινόμετρο για το χημειοφωταυγές μόριο, με φθορισμόμετρο για το φθορίζον μόριο και με φασματοφωτόμετρο για το χρωμοφόρο μόριο. Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των αντιγόνων πραγματοποιείται με τη χρήση καμπύλης αναφοράς (Roitt, Brostoff & Male, 2000).

Και στην άμεση και στην έμμεση ELISA υπάρχει το πρόβλημα ότι τα σύνθετα δείγματα μειώνουν την ευαισθησία αυτών των ανοσολογικών τεχνικών λόγω μιας ποικιλίας πρωτεϊνών που προσροφώνται στην επιφάνεια του βοθρίου. Στην ELISA τύπου sandwich το πρόβλημα αυτό ξεπερνιέται. Το πλεονέκτημα λοιπόν αυτής της μεθόδου είναι η μεγαλύτερη ευαισθησία της. Ωστόσο, έχει υψηλότερο κόστος γιατί απαιτεί δύο εξειδικευμένα για το αντιγόνο αντισώματα. Τα αντισώματα αυτά πρέπει να αναγνωρίζουν και να συνδέονται σε διαφορετικούς αντιγονικούς επιτόπους οι οποίοι πρέπει να είναι αρκετά μακριά ο ένας από τον άλλο ώστε να μην εμποδίζουν ο ένας τη δέσμευση του άλλου. Εάν χρησιμοποιείται ένα δευτερεύον αντίσωμα (όπως στην έμμεση ELISA), είναι σημαντικό το αντίσωμα σύλληψης και το πρωτεύον αντίσωμα να αναπτύσσονται σε διαφορετικά είδη. Αυτό είναι απαραίτητο επειδή το δευτερεύον αντίσωμα θα έχει αναπτυχθεί και θα στοχεύει το είδος του πρωτογενούς αντισώματος. Εάν και το αντίσωμα σύλληψης και το πρωτεύον αντίσωμα αναπτύσσονταν από το ίδιο είδος, τότε το δευτερεύον αντίσωμα θα δεσμευόταν και στα δύο και δεν θα αντανάκλυνε διαφορές στο δεσμευμένο αντιγόνο (Grange et al, 2014).





**Εικόνα 4-2.** Σχηματικό διάγραμμα της ELISA τύπου sandwich. Το αντίσωμα σύλληψης (CAb) ακινητοποιείται στην πλάκα των 96 βοθρίων και προσδένεται με το αντιγόνο, το οποίο στη συγκεκριμένη μελέτη είναι η γλυκοπρωτεΐνη Wnt5a. Η ανίχνευση του αντιγόνου γίνεται με δεύτερο αντίσωμα ανίχνευσης (DAb), το οποίο με τη σειρά του αναγνωρίζεται από ένα αντίσωμα συνδεδεμένου ενζύμου (EAb). Ακολουθεί προσθήκη υποστρώματος του ενζύμου (OPD) και οπτική ανάλυση του σήματος (έγχρωμο προϊόν) (Kummitha et al, 2010).

#### 4.1.4 Συναγωνιστική ELISA

Η συναγωνιστική ELISA απαιτεί δύο συνδέτες που ανταγωνίζονται μεταξύ τους για περιορισμένο αριθμό θέσεων των αντισωμάτων. Ο ένας συνδέτης θα είναι το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει και θέλουμε να προσδιορίσουμε και ο άλλος θα είναι ένα παρόμοιο μόριο που μπορεί να προσδεθεί στο αντίσωμα, το οποίο όμως έχει μια παραλλαγή που επιτρέπει σε ένα ακόμη μόριο να συνδεθεί αποκλειστικά με αυτό. Αυτό επιτυγχάνεται συνήθως με την προσθήκη βιοτίνης στο ανταγωνιστικό αντιγόνο. Η βιοτίνη είναι ένα χρήσιμο μόριο δεδομένου ότι είναι μικρό σε μέγεθος και επομένως δεν μειώνει σημαντικά τη συγγένεια του αντιγόνου για το αντίσωμα. Επίσης, δεσμεύεται σταθερά και εξειδικευμένα με τη στρεπταβιδίνη. Η στρεπταβιδίνη είναι μια πρωτεΐνη που συζεύγνυται εύκολα με μια ποικιλία μορίων, επιτρέποντας τη παραγωγή σήματος από διάφορες πηγές όπως αλλαγές χρώματος, χημειοφωταύγεια και φθορισμό. Το σύμπλεγμα βιοτίνης-στρεπταβιδίνης μπορεί επίσης να

Διπλωματική Εργασία

χρησιμοποιηθεί ως ενισχυτής σήματος. Το αντιγόνο του δείγματος και το συνδεδεμένο με βιοτίνη αντιγόνο θα ανταγωνίζονται για την ίδια θέση στο αντίσωμα. Το σήμα που παράγεται από την συναγωνιστική ELISA θα είναι αντιστρόφως ανάλογο με την ποσότητα του αντιγόνου στο δείγμα (Grange et al, 2014).

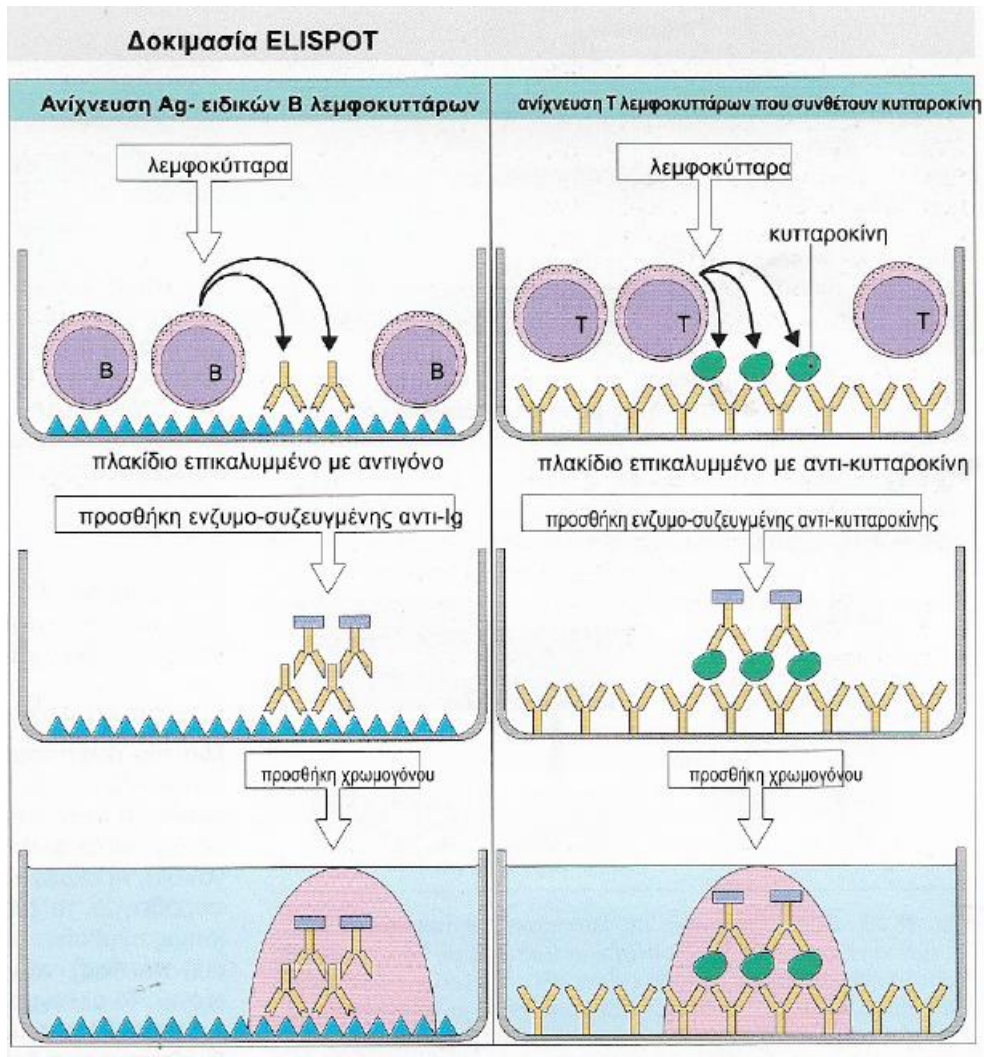
#### **4.1.5 Μη συναγωνιστική ELISA**

Στη μη συναγωνιστική ELISA το αντίσωμα που είναι συμπληρωματικό προς το αντιγόνο που θέλουμε να μετρήσουμε ακινητοποιείται σε στερεή επιφάνεια. Έπειτα προστίθεται το δείγμα του βιολογικού υγρού που περιέχει το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει, το οποίο συνδέεται με το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Ακολουθεί έκλυση των συστατικών του βιολογικού υγρού που δεν έχουν συνδεθεί στο αντίσωμα και έτσι παραμένει συνδεδεμένο μόνο το αντιγόνο που θέλουμε να μετρήσουμε. Στη συνέχεια μπορεί να προστεθεί ένα δεύτερο αντίσωμα το οποίο είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο και το οποίο αναγνωρίζει και συνδέεται σε ένα διαφορετικό αντιγονικό επίτοπο. Το δεύτερο αυτό αντίσωμα μπορεί να είναι προσδεδεμένο με χημειοφωταυγές μόριο ή με φθορίζον μόριο ή με χρωμοφόρο μόριο. Στο τέλος, αφού γίνει άλλη μια έκπλυση και απομακρυνθούν τα αντισώματα που δεν κατάφεραν να συνδεθούν, προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου και η ποσότητα του εξεταζόμενου αντιγόνου εκτιμάται μετρώντας την ποσότητα του τελικού προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης. Η μέτρηση γίνεται με λουμινόμετρο για το χημειοφωταυγές μόριο, με φθορισμόμετρο για το φθορίζον μόριο και με φασματοφωτόμετρο για το χρωμοφόρο μόριο. Το σήμα που παράγεται από τη μη συναγωνιστική ELISA θα είναι ανάλογο με την ποσότητα του αντιγόνου στο δείγμα. Συνεπώς για να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση του αντιγόνου χρησιμοποιείται η καμπύλη αναφοράς (Raghava & Agrewala, 1994).

#### **4.1.6 ELISPOT (δοκιμασία ανοσοαπορροφητικής κηλίδας συνδεδεμένου ενζύμου)**

Η δοκιμασία ανοσοαπορροφητικής κηλίδας συνδεδεμένου ενζύμου (Enzyme Linked Immunospot- ELISPOT) είναι μία ανοσολογική τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό Β λεμφοκυττάρων που παράγουν ειδικά

αντισώματα ή T λεμφοκυττάρων που εκκρίνουν συγκεκριμένες κυτταροκίνες (Εικόνα 4-3). Πρόκειται για μία διαγνωστική ενζυμική μέθοδο που εφαρμόζεται σήμερα ευρέως για τη διερεύνηση ειδικών ανοσολογικών αποκρίσεων σε καρκίνο, λοιμώξεις, αλλεργίες και αυτοάνοσα νοσήματα (Ji & Forsthuber, 2016).



Εικόνα 4-3. Δοκιμασία ELISPOT (Roitt, Brostoff & Male, 2000).

Για τον προσδιορισμό των B λεμφοκυττάρων που παράγουν ειδικά αντισώματα χρησιμοποιείται πλακίδιο νιτροκυτταρίνης ή φθοριούχου πολυβινυλιδενίου ευαισθητοποιημένο με το αντίστοιχο αντιγόνο. Μετά την επίστρωση των B λεμφοκυττάρων τα αντισώματα συνδέονται με το αντιγόνο και σχηματίζεται μία κηλίδα. Η κηλίδα αυτή γίνεται ορατή καθώς προστίθεται ένα δεύτερο αντίσωμα (αντί- IgG) που είναι προσδεδεμένο με ένα ένζυμο. Όταν λοιπόν

Διπλωματική Εργασία

προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου προκύπτει ένα έγχρωμο προϊόν και η μέτρηση του σήματος που παράγεται πραγματοποιείται χρωματογραφικά.

Για τον προσδιορισμό των T λεμφοκυττάρων που εκκρίνουν συγκεκριμένες κυτταροκίνες χρησιμοποιείται πλακίδιο ευαισθητοποιημένο με ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει και συνδέεται με αυτή την κυτταροκίνη. Στη θέση που βρίσκεται η κυτταροκίνη σχηματίζονται κηλίδες που γίνονται ορατές καθώς προστίθεται ένα δεύτερο αντίσωμα, που στοχεύει ένα διαφορετικό επίτοπο του ίδιου αντιγόνου, δηλαδή της κυτταροκίνης. Το αντίσωμα αυτό είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο επομένως μετά την προσθήκη του υποστρώματος του ενζύμου προκύπτει ένα έγχρωμο προϊόν που ανιχνεύεται χρωματογραφικά (Slota et al, 2011).

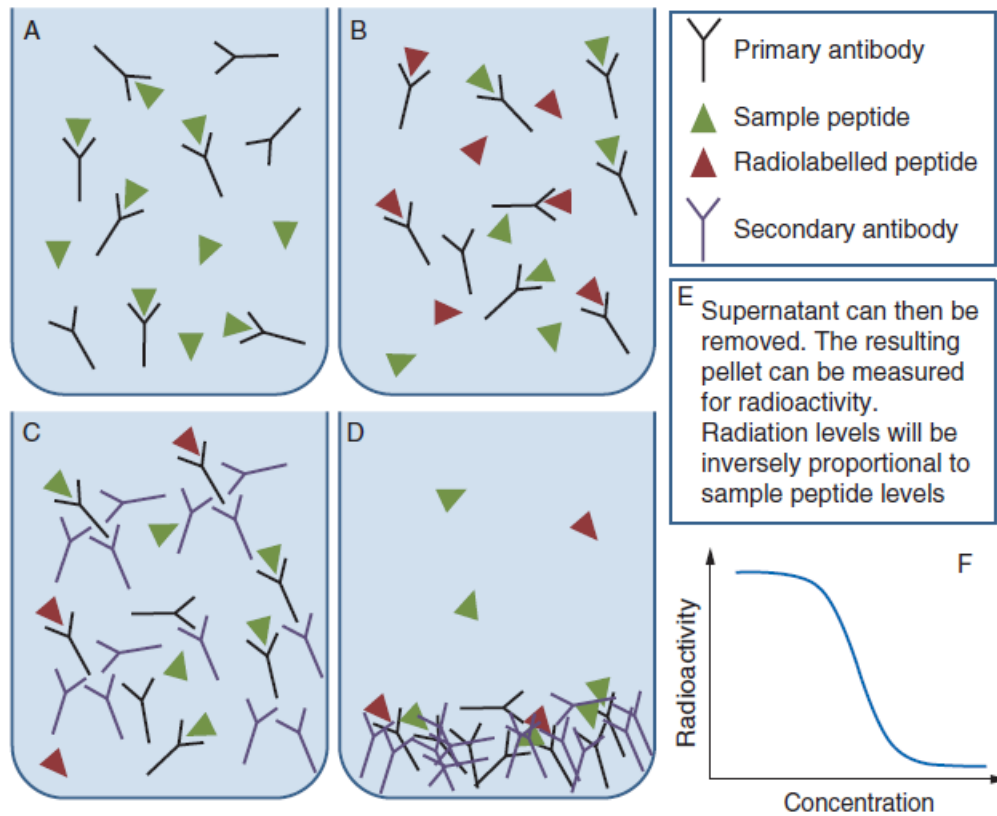
## **4.2 RIA (Ραδιοανοσοανάλυση)**

Η ραδιοανοσολογική μέθοδος (Radioimmunoassay- RIA) είναι μία ανοσοχημική μέθοδος συναγωνιστικού τύπου με πολύ μεγάλη ευαισθησία με την οποία ανιχνεύονται αντιγόνα σε συγκέντρωση της τάξης των fM. Ο πρώτος ανοσολογικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε το 1959. Ήταν η πρώτη ραδιοανοσοανάλυση (RIA) στην οποία χρησιμοποίησαν ραδιοσημασμένη ινσουλίνη για να προσδιορίσουν τη συγκέντρωση της ινσουλίνης στο ανθρώπινο πλάσμα (Yalow & Berson, 1959).

Στην τεχνική αυτή διακρίνουμε το ενδογενές αντιγόνο του δείγματος, που μας ενδιαφέρει και θέλουμε να μετρήσουμε και το ραδιοσημασμένο αντιγόνο που ανταγωνίζονται για τη σύνδεση σε καθορισμένη και περιορισμένη ποσότητα αντισώματος. Αρχικά το αντιγόνο του δείγματος και το αντίσωμα επωάζονται μαζί και συνδέονται. Στη συνέχεια προστίθεται το ραδιοσημασμένο αντιγόνο. Χρησιμοποιούνται ασταθή νουκλίδια (πυρήνες στοιχείων), που όταν διασπώνται εκπέμπουν ραδιενέργεια (π.χ.  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ) ώστε να σημάνουμε το συνθετικά παρασκευασμένο αντιγόνο γνωστής συγκέντρωσης. Πραγματοποιούνται ανταγωνιστικές αντιδράσεις και σχηματίζονται τα σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος. Το ραδιοσημασμένο αντιγόνο ανταγωνίζεται το αντιγόνο του δείγματος και το εκτοπίζει από το αντίσωμα. Όσο περισσότερο δείγμα αντιγόνου υπάρχει, τόσο λιγότερο το ραδιοσημασμένο αντιγόνο μπορεί να συνδεθεί με το αντίσωμα. Ένα

Διπλωματική Εργασία 57

δευτερεύον αντίσωμα που δεσμεύει το πρωτεύον αντίσωμα μπορεί στη συνέχεια να προστεθεί, μαζί με ορό από το είδος του πρωτεύοντος αντισώματος. Αυτό προκαλεί την κροκίδωση του διαλύματος και επιτρέπει τον διαχωρισμό του πρωτεύοντος αντισώματος από το διάλυμα. Απαιτείται διαχωρισμός του ελεύθερου από το δεσμευμένο αντιγόνο κυρίως με προσρόφηση σε ενεργό άνθρακα ή σε πρωτεΐνη *A Staphylococcus aureus* ή με καταβύθιση, με πολυαιθυλενογλυκόλη, αιθανόλη ή θειικό αμμώνιο και μετά γίνεται η μέτρηση της ακτινοβολίας. Το διάλυμα που περιέχει το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος είναι πιο πυκνό από εκείνο που περιέχει ελεύθερο αντιγόνο. Συνεπώς η φυγοκέντρηση αυτού του μείγματος επιτρέπει τον διαχωρισμό τους, με αποτέλεσμα να προκύπτει ένα σφαιρίδιο που περιέχει το δεσμευμένο αντιγόνο του δείγματος και το δεσμευμένο ραδιοσημασμένο αντιγόνο. Μετρώντας τη ραδιενέργεια του σφαιριδίου, είναι δυνατό να προσδιοριστεί η ποσότητα του ραδιοσημασμένου αντιγόνου που έχει δεσμευτεί στο αντίσωμα και επομένως η συγκέντρωση του αντιγόνου στο δείγμα (Εικόνα 4-4). Αν το μη σημασμένο αντιγόνο βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση παίρνουμε μικρότερο ραδιενεργό σήμα στο μετρητή γ ή β ακτινοβολίας. Πραγματοποιείται καμπύλη αναφοράς με πρότυπα διαλύματα και από εκεί προσδιορίζεται η συγκέντρωση των αντιγόνων. Τα μειονεκτήματα της RIA σχετίζονται με τη χρήση της ραδιοσήμανσης που έχει μικρή διάρκεια ζωής. Απ' την άλλη πλευρά αυτές οι αναλύσεις δεν χρησιμοποιούν ένζυμα και έτσι μειώνεται ο κίνδυνος παρεμβολής από το ίδιο το δείγμα.



Εικόνα 4-4. Σχηματικό διάγραμμα της ραδιοανοσοανάλυσης RIA (Grange et al, 2014).

#### 4.2.1 IRMA (ανοσοραδιομετρική ανάλυση)

Η ανοσοραδιομετρική ανάλυση (Immunoradiometric assay- IRMA) είναι μία μέθοδος που ανήκει στην κατηγορία των ανοσολογικών διαγνωστικών τεχνικών μη συναγωνιστικού τύπου. Σε αυτήν χρησιμοποιούνται σε περίσσεια αντισώματα που είναι σημασμένα με ραδιενεργό ιχνηθέτη. Η ένταση του ραδιενεργού σήματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ενδογενούς αντιγόνου που προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας καμπύλη αναφοράς. Απαιτείται βέβαια να γίνει διαχωρισμός του ελεύθερου από το δεσμευμένο αντίσωμα κυρίως με προσρόφηση σε ενεργό άνθρακα ή με καταβύθιση, με πολυαιθυλενογλυκόλη, αιθανόλη ή θειικό αμμώνιο. Έτσι πραγματοποιείται η μέτρηση της ραδιενεργούς ακτινοβολίας μόνο του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος.

Ανάλογα με τη φάση στην οποία βρίσκονται το αντιγόνο και το αντίσωμα, η IRMA χαρακτηρίζεται ως:

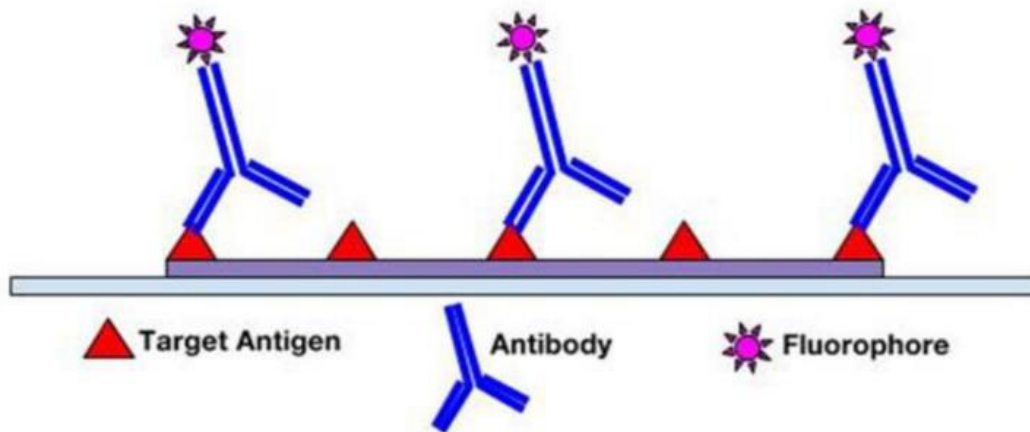
1. IRMA μιας θέσεως (One site), όπου το αντιγόνο προσροφάται σε στερεά φάση και το αντίσωμα βρίσκεται σε υγρή φάση.
2. IRMA υγρής φάσης δύο θέσεων (Two-site), όπου χρησιμοποιούνται δύο μονοκλωνικά αντισώματα έναντι διαφορετικών επιτόπων του ίδιου αντιγόνου και το ένα μόνο αντίσωμα είναι σημασμένο ραδιενεργά. Και τα δυο βρίσκονται στην υγρή φάση και ο διαχωρισμός του ελεύθερου αντισώματος από το σύμπλοκο επιτυγχάνεται ύστερα από καταβύθιση με δευτερογενές αντίσωμα (αντι-IgG).
3. IRMA στερεάς φάσης δύο θέσεων (Two-site), όπου το ραδιοσημασμένο αντίσωμα βρίσκεται στην υγρή φάση ενώ το άλλο αντίσωμα είναι καθηλωμένο στη στερεά φάση σε μικροσφαιρίδια ή σε πλαστικά σωληνάκια.

Η IRMA δύο θέσεων (Two-site) παρουσιάζει πλεονεκτήματα καθώς εμφανίζει υψηλή εξειδίκευση (με τη χρήση δύο ξεχωριστών αντισωμάτων έναντι διαφορετικών επιτόπων του ίδιου αντιγόνου), μεγάλη ευαισθησία και επιτρέπει την ποσοτικοποίηση αντιγόνων σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (Miles, 1975).

### **4.3 Ανοσοφθορισμός**

Ο ανοσοφθορισμός ανιχνεύει αντιγόνα στη θέση που βρίσκονται χρησιμοποιώντας φθορίζοντα αντισώματα. Συνήθως τα αντισώματα αυτά είναι σημασμένα με φλουοροσκεΐνη, μια χρωστική η οποία όταν ακτινοβοληθεί με υπεριώδες φως, μήκους κύματος 290-495 nm, εκπέμπει ορατό φως μήκους κύματος 525 nm. Πρόκειται για μία μέθοδο που μπορεί να πραγματοποιηθεί σε καλλιεργημένα κύτταρα, σε κυτταρικά εναιωρήματα, καθώς και σε δείγματα ιστών ή σε ολόκληρους οργανισμούς. Τα προς ανίχνευση αντιγόνα (βακτήρια, κύτταρα μολυσμένα με ιούς ή παράσιτα) μονιμοποιούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

Στον άμεσο ανοσοφθορισμό το διάλυμα του φθορίζοντος αντισώματος επικαλύπτει το παρασκεύασμα (Εικόνα 4-5). Μετά από πολλά ξεπλύματα με φυσιολογικό ορό για την απομάκρυνση του μη συνδεδεμένου αντισώματος πραγματοποιείται παρατήρηση σε μικροσκόπιο υπεριώδους φωτός (Im et al, 2019).

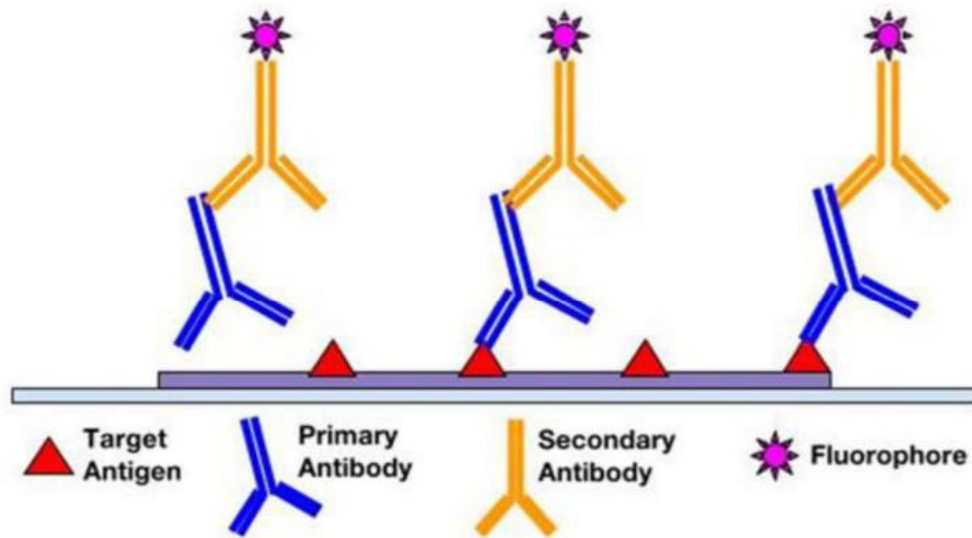


Εικόνα 4-5. Άμεσος ανοσοφθορισμός (Im et al, 2019).

Στον έμμεσο ανοσοφθορισμό το διάλυμα ενός πρωτεύοντος αντισώματος επικαλύπτει το παρασκεύασμα. Ακολουθεί ξεπλύματα με φυσιολογικό ορό για την απομάκρυνση του μη συνδεδεμένου αντισώματος. Ένα δευτερεύον φθορίζον αντίσωμα (συνδεδεμένο με φλουροροσκεΐνη) συνδέεται στο πρωτεύον αντίσωμα (Εικόνα 4-6). Μετά από πολλά ξεπλύματα με φυσιολογικό ορό για την απομάκρυνση του μη συνδεδεμένου αντισώματος πραγματοποιείται παρατήρηση σε μικροσκόπιο υπεριώδους φωτός.

Αν και ο άμεσος ανοσοφθορισμός είναι ταχύτερος, ο έμμεσος ανοσοφθορισμός χρησιμοποιείται ευρύτατα λόγω της υψηλής ευαισθησίας του, της ενίσχυσης του σήματος και της ικανότητά του να ανιχνεύει πολλούς στόχους στο ίδιο δείγμα (Im et al, 2019).





Εικόνα 4-6. Έμμεσος ανοσοφθορισμός (Im et al, 2019).

#### 4.4 Ανοσοϊστοχημεία

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ ειδικών αντισωμάτων και των αντιγόνων που μας ενδιαφέρουν. Έτσι μπορούν να προσδιοριστούν αντιγόνα σε κύτταρα από τομές ιστών και η οπτικοποίηση τους μπορεί να επιτευχθεί κυρίως με δύο τρόπους. Πρώτον, με την πρόσδεση στο αντίσωμα μιας φθορίζουσας ένωσης όπως η φλουοροσκεΐνη (fluorescein), η ροδαμίνη (rhodamine), η φυκοερυθρίνη (phycoerythrin), σύμπλοκα του Ευρωπαϊού ή του Τερβίου. Οι φθορίζουσες αυτές ενώσεις απορροφούν ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος φωτός (διέγερση) και εκπέμπουν ένα μεγαλύτερο μήκος κύματος φωτός (εκπομπή) το οποίο γίνεται ορατό με μικροσκόπιο φθορισμού. Υπεριώδες φως κατευθύνεται επάνω στην τομή μέσω του αντικειμενικού φακού, έτσι το πεδίο είναι σκοτεινό και οι περιοχές με συνδεδεμένο φθορίζον αντίσωμα εκπέμπουν πράσινο φθορισμό. Δεύτερος τρόπος είναι η πρόσδεση στο αντίσωμα μιας χρωμογόνου ουσίας όπως η 3,3 διάμινοβενζιδίνη (DAB). Υπάρχει η διάκριση σε άμεση ή έμμεση χρώση. Στην άμεση χρώση το αντίσωμα προσδένεται απευθείας με τη φθορίζουσα ή τη χρωμογόνο ένωση ενώ στην έμμεση χρώση το πρωτεύον αντίσωμα δεν είναι σημασμένο και χρησιμοποιείται η αντι-ανοσοσφαιρίνη (ένα δεύτερο αντίσωμα που αναγνωρίζει και συνδέεται στο πρώτο) συνδεδεμένη με τη φθορίζουσα ή τη χρωμογόνο ένωση.

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη διαγνωστική τεχνική στην παθολογία των ιστών. Εφαρμόζεται για την ταυτοποίηση υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων (ανοσοκυτταροχημεία), την ανίχνευση αντισωμάτων σε αυτοάνοσες ασθένειες, την ταυτοποίηση βακτηριακών ειδών, την ανίχνευση συστατικών του συμπληρώματος σε ιστούς, το χαρακτηρισμό και την ταξινόμηση καρκινικών όγκων, τον εντοπισμό ορμονών και άλλων κυτταρικών προϊόντων (Taube et al, 2020).

## **4.5 Ανοσοχρωματογραφία**

Η μέθοδος της ανοσοχρωματογραφίας, που ονομάζεται αλλιώς και δοκιμασία πλευρικής ροής (lateral flow immunoassay-LFIA), βασίζεται σε μία μεμβράνη από νιτροκυτταρίνη (NC) ή κάποιο πολυμερές. Η ανίχνευση των επιθυμητών αντισωμάτων ή αντιγόνων πραγματοποιείται μέσω των αλληλεπιδράσεων αντισώματος- αντιγόνου. Πρόκειται για μια κυρίως ποιοτική χρωματογραφική δοκιμασία που δίνει ένα θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα. Το δείγμα του βιολογικού υγρού που χρησιμοποιείται μεταφέρεται μέσω της διάχυσης με τριχοειδείς δυνάμεις κατά μήκος αυτής της μεμβράνης. Μπορούν επίσης να αναλυθούν διάφορα υγρά βιολογικά δείγματα όπως ούρα, σάλιο, ιδρώτας, ορός, πλάσμα και πλήρες αίμα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4-7 το δείγμα φορτώνεται στο επίθεμα (sample pad) και ρέει μέσω του συζευγμένου επιθέματος (conjugated pad) στο οποίο τα υπό προσδιορισμό αντισώματα ή αντιγόνα είναι συζευγμένα με μια έγχρωμη ουσία (νανοσωματίδια χρυσού κόκκινου χρώματος ή μικροσφαιρίδια latex μπλε χρώματος) ή με μία φθορίζουσα ουσία. Στη συνέχεια, το σύμπλεγμα φτάνει στη μεμβράνη NC, όπου συγκεκριμένα αντισώματα ή αντιγόνα στερεώνονται σε μια καθορισμένη περιοχή, που ονομάζεται γραμμή δοκιμής (test line). Επιπλέον, μια γραμμή ελέγχου (control line) συζεύγνυται περαιτέρω κατά μήκος της μεμβράνης NC εξασφαλίζοντας την ορθή λειτουργία της τεχνικής. Το θετικό αποτέλεσμα, δηλαδή η ανίχνευση του αντισώματος ή του αντιγόνου στο δείγμα γίνεται αντιληπτή με τον σχηματισμό χρώματος ή φθορισμού στη γραμμή δοκιμής της μεμβράνης. Πρόσθετες γραμμές δοκιμής μπορούν επίσης να ακινητοποιηθούν στη μεμβράνη NC, επιτρέποντας την ανίχνευση πολλαπλών αντισωμάτων/αντιγόνων σε μία μόνο δοκιμή. Η

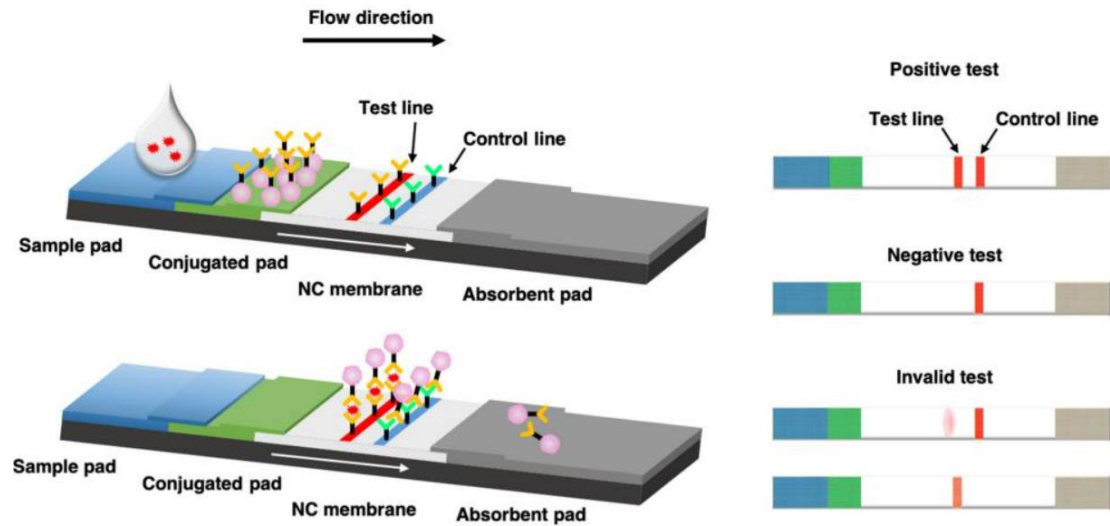
ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος μπορεί γίνει μετρώντας την ένταση του χρώματος ή του φθορισμού με φασματοφωτόμετρο ή φθορισμόμετρο αντίστοιχα.

Υπάρχουν δύο τύποι ανοσοχρωματογραφίας, παρόμοια με την ELISA, η συναγωνιστική και η τύπου sandwich. Η συναγωνιστική ανοσοχρωματογραφία έχει σχεδιαστεί για αντιγόνα που έχουν μόνο έναν επίτοπο που δεν μπορεί να συνδεθεί ταυτόχρονα με δύο αντισώματα. Παρουσία της προσδιοριζόμενης ουσίας, σχηματίζεται η αλληλεπίδραση αντισώματος-αντιγόνου, αναστέλλοντας το σχηματισμό σήματος στη γραμμή δοκιμής. Επομένως, στην συναγωνιστική ανοσοχρωματογραφία η ένταση του σήματος είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας στο δείγμα. Από την άλλη πλευρά, η ανοσοχρωματογραφία τύπου sandwich χρησιμοποιείται για αντιγόνα, τα οποία έχουν δύο επιτόπους που μπορούν ταυτόχρονα να συνδεθούν με δύο διαφορετικούς τύπους αντισωμάτων. Το αντιγόνο παγιδεύεται μεταξύ δύο αντισωμάτων στη γραμμή δοκιμής, και επομένως, η ένταση του σήματος είναι ανάλογη με την συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας στο δείγμα (Hsiao et al, 2021).

Η ανοσοχρωματογραφία αρχικά ανακαλύφθηκε το 1980 και από το 1984 είναι εμπορικά διαθέσιμη βρίσκοντας εφαρμογή στα τεστ κνήσεως. Είναι μία ταχύτατη και εύκολη ανίχνευση της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) στα ούρα που μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμη και στο σπίτι. Έκτοτε βρίσκει εφαρμογή ως διαγνωστική δοκιμασία για διάφορες μολύνσεις όπως από τον ιό της ηπατίτιδας Β και C, τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (human immunodeficiency virus- HIV), τα χλαμύδια, τον β-αιμολυτικού στρεπτόκοκκου ομάδας Α, για καρδιακές παθήσεις, όγκους, φυτοφάρμακα, τοξίνες και μεταλλικά ιόντα (Hsiao et al, 2021).

Στις μέρες μας αποτελεί ένα χρήσιμο, φθινό και πρακτικό διαγνωστικό εργαλείο για τον εντοπισμό της παρουσίας αντισωμάτων IgM και IgG έναντι της νόσου του κορωνοϊού 2019 (COVID-19) σε δείγματα αίματος ή ιστών μετά από μόλυνση από τον ιό SARS-CoV-2. Πρόκειται για έναν τύπο ταχείας διαγνωστικής εξέτασης (rapid diagnostic test- RDT) καθώς το αποτέλεσμα μπορεί να ληφθεί σε 15 λεπτά. Στο υπόστρωμα (μεμβράνη) της συσκευής της δοκιμασίας αυτής ενσωματώνονται ανασυνδυασμένα αντιγόνα της νόσου COVID-19 όπως η πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου (N) που εκφράζεται από το βακτήριο *Escherichia coli* και η

περιοχή δέσμησης του υποδοχέα (receptor-binding domain- RBD) της πρωτεϊνικής ακίδας (S) που εκφράζεται από κύτταρα HEK293S (Choe et al, 2020).



Εικόνα 4-7. Σχηματική απεικόνιση της δοκιμασίας της ανοσοχρωματογραφίας (δοκιμασία πλευρικής ροής-lateral flow immunoassay-LFIA) (Hsiao et al, 2021).

## **5. Εφαρμογές των ανοσολογικών διαγνωστικών τεχνικών για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του ιού SARS-CoV-2**

Το Δεκέμβριο του 2019 έγινε η πρώτη αναφορά της μόλυνσης από τον ιό SARS-CoV-2 που ανήκει στο γένος Betacoronavirus, που περιλαμβάνει επίσης τον SARS-CoV και τον MERS-CoV. Εκ τότε έχουν αναπτυχθεί διάφορες διαγνωστικές τεχνικές που είναι απαραίτητες για την πρόγνωση και την παρακολούθηση κάθε σταδίου της νόσου του κορωνοϊού 2019 (COVID-19). Η κυριότερη πρόκληση προκειμένου να αποφευχθεί η εξάπλωση της λοίμωξης του ιού SARS-CoV-2 είναι ο εντοπισμός των ασυμπτωματικών φορέων. Συνεπώς χρειάζεται να αναπτυχθούν τεχνικές οικονομικά αποδοτικές, με υψηλή ακρίβεια που μπορούν όμως να πραγματοποιηθούν ταχύτατα. Εξαιτίας λοιπόν της πανδημίας του COVID-19 ερευνητές από όλο τον κόσμο έχουν αναπτύξει διάφορες διαγνωστικές μεθόδους οικονομικές και αποτελεσματικές για την επιβεβαίωση της λοίμωξης από τον ιό SARS-CoV-2.

### **5.1 ELISA (ανοσοαπορροφητική μέθοδος συνδεδεμένου ενζύμου)**

Ο ορολογικός έλεγχος χρησιμοποιείται γενικά για την παρακολούθηση της προόδου της νόσου COVID-19. Περιλαμβάνει την ανάλυση ορού αίματος ή βιολογικών υγρών, όπως σάλιου ή πτυέλων, για τον εντοπισμό της παρουσίας ορισμένων βιοδεικτών, κυρίως των αντισωμάτων. Διάφορες ορολογικές τεχνικές και ιδιαίτερα η ανοσοαπορροφητική μέθοδος συνδεδεμένου ενζύμου (ELISA) έχουν διερευνηθεί για τον εντοπισμό των ατόμων που έχουν αναπτύξει αντισώματα IgG/IgM έναντι του ιού SARS-CoV-2. Οι τεχνικές αυτές βοηθούν στην αξιολόγηση του βαθμού ανοσοποίησης και στον εντοπισμό των επαφών των ασθενών της νόσου COVID-19 (Nuccetelli et al, 2020).

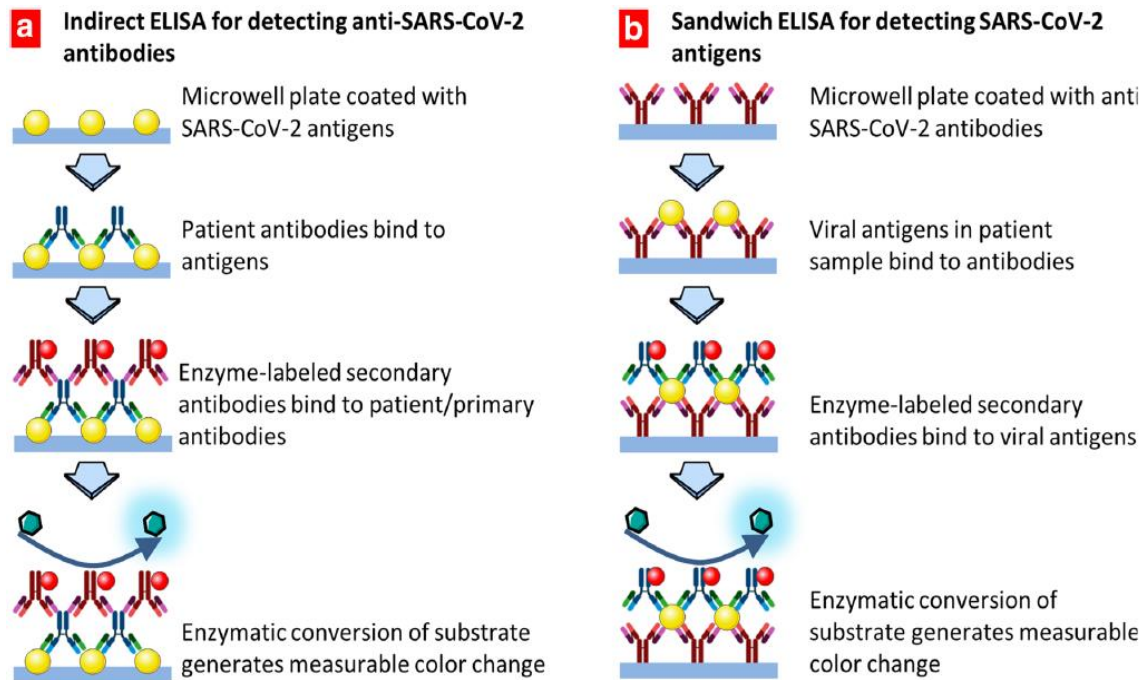
Η ανοσοσφαιρίνη M (IgM) ανιχνεύεται στον ορό αίματος λίγες ημέρες μετά τη μόλυνση και αυτό διαρκεί για μερικές εβδομάδες. Στη συνέχεια ακολουθεί μια αλλαγή σε ανοσοσφαιρίνη G (IgG). Έτσι, η IgM μπορεί να είναι ένας δείκτης μόλυνσης πρώιμου σταδίου, ενώ η IgG μπορεί να είναι δείκτης τρέχουσας ή προηγούμενης μόλυνσης. Επίσης η IgG μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να υποδηλώσει

την παρουσία ανοσίας μετά από μία μόλυνση. Τα αντισωμάτων IgM και IgG είναι ειδικά για διάφορα ιικά αντιγόνα, συμπεριλαμβανομένων της γλυκοπρωτεϊνικής ακίδας (υπομονάδες S1 και S2, περιοχή δέσμευσης του υποδοχέα) και της πρωτεΐνης νουκλεοκαψιδίου (Carter et al, 2020).

Στην Εικόνα 5-1 φαίνεται μία σχηματική απεικόνιση δύο διαφορετικών τύπων ορολογικών δοκιμών που βασίζονται στην ELISA. Στην πρώτη ανοσολογική δοκιμασία γίνεται ανίχνευση αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του ιού SARS-CoV-2, ενώ στη δεύτερη γίνεται ανίχνευση αντιγόνων του ιού. Αυτές οι δοκιμασίες είναι παρόμοιες και διαφέρουν ως προς την επίστρωση του μικροπλακιδίου. Όπως φαίνεται σε αυτό το σχήμα στην πρώτη περίπτωση (έμμεση ELISA) το μικροπλακίδιο είναι επικαλυμμένο με αντιγόνα του ιού SARS-CoV-2. Το δείγμα του ασθενούς περιέχει αντισώματα που δημιουργούνται κατά του ιού τα οποία συνδέονται με το αντιγόνο σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα αντιγόνου- αντισώματος. Ακολουθεί η προσθήκη ενός δευτερεύοντος αντισώματος που έχει συνδεδεμένο ένα ένζυμο και το οποίο συνδέεται με το πρωτεύον αντίσωμα του ασθενούς. Όταν λοιπόν προστεθεί το υπόστρωμα του ενζύμου παράγεται ένα ανιχνεύσιμο προϊόν. Η ανίχνευση αυτή βασίζεται στο χρώμα και πραγματοποιείται με φασματοφωτόμετρο.

Αντιθέτως, στη δεύτερη περίπτωση (ELISA τύπου sandwich) το μικροπλακίδιο είναι επικαλυμμένο με αντισώματα έναντι του κορωνοϊού. Αρχικά προστίθεται το δείγμα του ασθενούς που περιέχει τα ιικά αντιγόνα τα οποία συνδέονται με το αντίσωμα σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα αντιγόνου- αντισώματος. Έπειτα προστίθεται ένα δεύτερο αντίσωμα ανίχνευσης το οποίο είναι σημασμένο με ένα ένζυμο και το οποίο αναγνωρίζει και συνδέεται σε ένα διαφορετικό επίτοπο του αντιγόνου. Στο τέλος πραγματοποιείται η προσθήκη κατάλληλου για το ένζυμο υποστρώματος και παράγεται ένα σήμα, το οποίο μπορεί να μετρηθεί χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτομετρικό αναγνώστη πλακών.

Η μέθοδος ELISA ως εργαλείο στη διάγνωση της νόσου COVID-19 έχει το πλεονέκτημα ότι είναι γρήγορη και δίνει τη δυνατότητα να εξετάζονται ταυτόχρονα πολλαπλά δείγματα, αυτοματοποιημένα και με αυξημένη απόδοση (Majumder & Minko, 2021).

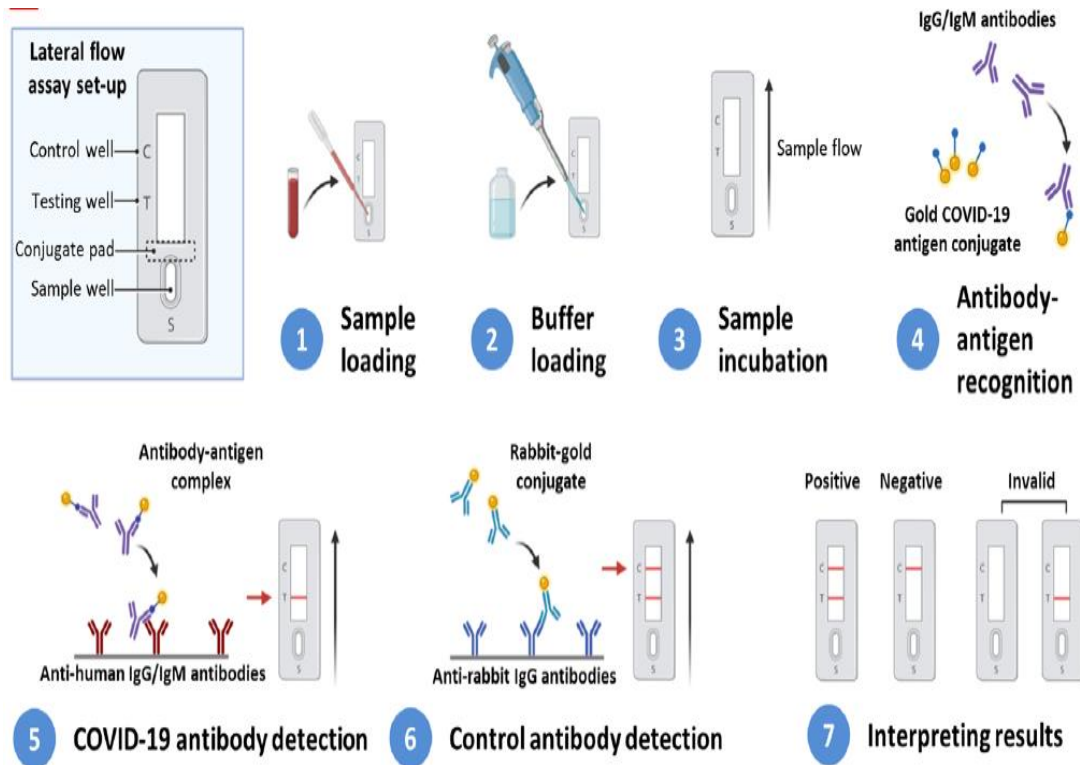


Εικόνα 5-1. Δύο ανοσολογικές δοκιμασίες για τη διάγνωση του COVID-19. α) Έμμεση ELISA που ανιχνεύει αντισώματα έναντι του ιού SARS-CoV-2 και β) ELISA τύπου sandwich που ανιχνεύει αντιγόνα του ιού SARS-CoV-2 (Majumder & Minko, 2021).

## 5.2 Δοκιμασία πλευρικής ροής (lateral flow immunoassay- LFIA)

Οι χρωματομετρικές διαγνωστικές τεχνικές που βασίζονται σε νανοσωματίδια έχουν αναπτυχθεί ταχέως τα τελευταία χρόνια. Πρόκειται για ένα πολλά υποσχόμενο διαγνωστικό εργαλείο για πολλές ασθένειες, κυρίως λόγω της απλής οργανολογίας και της οπτικοποίησης των αποτελεσμάτων του. Πρόσφατα οι ερευνητές διερεύνησαν τα νανοσωματίδια χρυσού (AuNP) για πιθανή διάγνωση της νόσου COVID-19. Έτσι χρησιμοποιήθηκε μία δοκιμασία πλευρικής ροής με βάση τα νανοσωματίδια χρυσού (AuNP-lateral flow, AuNP- LF) για την ανίχνευση του αντισώματος IgM που αναπτύχθηκε σε δείγμα ορού ασθενούς έναντι του ιικού παθογόνου SARS-CoV-2. Η γραμμή ανίχνευσης της AuNP- LF επιστρώθηκε με νουκλεοπρωτεΐνη του ιού SARS-CoV-2 ως αντιγόνο που ακολουθείται από συζευγμένο αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης IgM. Αυτό το σύστημα ταινιών AuNP-LF θα μπορούσε να ανιχνεύσει τον ιό SARS-CoV-2 σε κλινικά δείγματα εντός 15 λεπτών. Έτσι ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration- FDA) έδωσε έγκριση σε αυτή την ορολογική ανοσοδοκιμασία ως ένα γρήγορο τεστ ανίχνευσης αντισωμάτων

IgG/IgM για τον SARS-CoV-2. Στην Εικόνα 5-2 φαίνεται ένα γενικό σχήμα ταχείας ορολογικής ανάλυσης για την ανίχνευση αντισωμάτων IgG και IgM έναντι του ιού SARS-CoV-2.



Εικόνα 5-2. Ορολογικός διαγνωστικός έλεγχος για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του ιού SARS-CoV-2 (Majumder & Minko, 2021).

Ένα μικρό δείγμα αίματος φορτώνεται σε μια δοκιμαστική ταινία και ακολουθεί η προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης. Το δείγμα επωάζεται έτσι ώστε τα συζευγμένα με χρυσό αντιγόνα της νόσου COVID-19 να αντιδράσουν με τα επισημασμένα IgG/IgM αντισώματα. Δευτερεύοντα αντίσωμα που αναπτύχθηκαν σε κουνέλια και είναι συζευγμένα με παρόμοια επισημασμένα νανοσωματίδια χρυσού χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση IgG αντισωμάτων ελέγχου που επίσης αναπτύχθηκαν σε κουνέλια. Το τεστ θεωρείται θετικό όταν εμφανιστούν δύο γραμμές, μία γραμμή για τα αντισώματα της νόσου COVID-19 και μία για τα αντισώματα ελέγχου. Εάν εμφανισθεί μόνο η γραμμή ελέγχου, το αποτέλεσμα ορίζεται ως αρνητικό. Εάν δεν εμφανιστεί η γραμμή ελέγχου, η δοκιμασία θεωρείται άκυρη και πρέπει να επαναληφθεί (Majumder & Minko, 2021).



Οι μέθοδοι λοιπόν που βασίζονται στη νανοτεχνολογία παρέχουν μεγάλες δυνατότητες οικονομικής, γρήγορης και έγκαιρης ανίχνευσης του ιού SARS-CoV-2 και δεν απαιτούν εκπαιδευμένο προσωπικό για την πραγματοποίησή τους. Παρόλο που έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες τον τελευταίο καιρό για την ανάπτυξη νέων διαγνωστικών προσεγγίσεων για τη νόσο COVID-19, εξακολουθούν να υπάρχουν πολλά ερωτήματα και προκλήσεις. Αυτά σχετίζονται με το βαθμό ευαισθησίας και την ειδικότητα των ορολογικών διαγνωστικών ελέγχων για την ανίχνευση στο κλινικό δείγμα αντισωμάτων έναντι του SARS-CoV-2. Επίσης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως εάν η παρουσία αυτών των αντισωμάτων μπορεί να προκαλέσει ανοσία στη νόσο COVID-19. Δεν χωρά αμφιβολία όμως πως η έγκαιρη διάγνωση, είναι το κλειδί για την παρεμπόδιση της μετάδοσης και τον έλεγχο της πανδημίας του COVID-19. Συνεπώς οι διαγνωστικές τεχνικές που προαναφέρθηκαν διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στον έλεγχο των συμπτωματικών και ασυμπτωματικών ατόμων, στην ιχνηλάτηση των στενών επαφών τους καθώς και στην κοινωνική απομόνωση (καραντίνα) των ατόμων που έχουν μολυνθεί από τον ιό SARS-CoV-2 με στόχο την αποτελεσματική και υποστηρικτική θεραπεία τους. Αδιαμφισβήτητα λοιπόν αυτοί οι ανοσολογικοί διαγνωστικοί έλεγχοι συμβάλλουν καθοριστικά στην διαχείριση της πανδημίας.

## **6. Εφαρμογές των αντισωμάτων για την αποτελεσματική θεραπεία στην σύγχρονη κλινική πράξη**

Από τα μέσα της δεκαετίας του 1990, μία νέα κατηγορία φαρμάκων, τα μονοκλωνικά αντισώματα άρχισαν να έχουν τεράστιες δυνατότητες. Αυτά τα εγκεκριμένα θεραπευτικά αντισώματα χρησιμοποιούνται τώρα συνήθως στην κλινική πράξη ως αποτελεσματικά εργαλεία για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών και ιδιαίτερα για τη θεραπεία ορισμένων κακοηθειών. Για τη βελτίωση της επιβίωσης ασθενών με καρκίνο του μαστού χρησιμοποιούνται αντισώματα που αναπτύχθηκαν ώστε να στοχεύουν τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) (Marty & Rivot, 2008) καθώς και αντισώματα που στοχεύουν τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα ErbB2 (επίσης γνωστό ως Her2/neu) (Hudis, 2007). Επίσης τα αντισώματα που στοχεύουν τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα χρησιμοποιούνται συχνά για να καθυστερήσουν την εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου (Peeters et al, 2009). Ακόμη σε αιματολογικούς καρκίνους, όπως στο λέμφωμα Non- Hodgkin's βρίσκουν εφαρμογή αντισώματα που στοχεύουν την πρωτεΐνη CD20 (Cheson & Leonard, 2008).

Σε σύγκριση με τα συμβατικά φάρμακα, τα θεραπευτικά αντισώματα παρουσιάζουν πλεονεκτήματα που οφείλονται κυρίως στο γεγονός ότι αποτελούν ανοσολογικά πρωτεϊνικά μόρια που αναπτύχθηκαν αρχικά στον οργανισμό. Εμφανίζουν υψηλή ειδικότητα δέσμευσης και ικανότητα επαγωγής εκτελεστικών λειτουργιών που σχετίζονται με τις Fc περιοχές. Η υψηλή ειδικότητα των αντισωμάτων έχει ως αποτέλεσμα σπάνιες παρενέργειες και σχετικά προβλέψιμη τοξικότητα. Επίσης τα θεραπευτικά αντισώματα έχουν μεγάλους χρόνους ημιζωής στον ορό (στον άνθρωπο συνήθως περίπου 2 εβδομάδες) και εκτελεστικές λειτουργίες που χρησιμοποιούν εγγενείς ανοσολογικούς μηχανισμούς για να καταστρέψουν τα κύτταρα-στόχους.

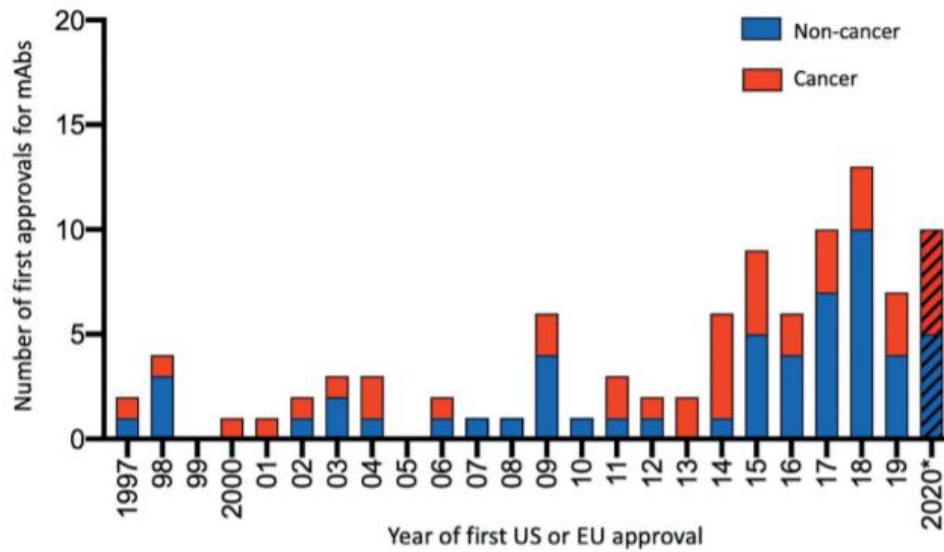
Απ' την άλλη όμως, τα θεραπευτικά αντισώματα λόγω των μεγάλων μοριακών τους μεγεθών (~150 kDa), έχουν ορισμένους περιορισμούς. Δεν μπορούν να στοχεύσουν ενδοκυτταρικά μόρια, είναι λιγότερο αποτελεσματικά στη διείσδυση στον ιστό και εμφανίζουν μικρή βιοδιαθεσιμότητα όταν χορηγούνται από το στόμα. Ένα άλλο μειονέκτημα στην χρήση των θεραπευτικών αντισωμάτων είναι το

οικονομικά αφόρητο κόστος τους. Αυτό οφείλεται κυρίως στη χρήση των θηλαστικών ως συστήματα έκφρασης για την παραγωγή των αντισωμάτων καθώς και στις μεγάλης κλίμακας διεργασίες καθαρισμού που απαιτούνται. Για να διατηρηθεί μια αποτελεσματική συγκέντρωση ενός θεραπευτικού αντισώματος στον ορό και να προκληθεί ένα κλινικό αποτέλεσμα απαιτείται συνεχής χορήγηση υψηλής δόσης (συνήθως 2-8 mg/kg ανά χορήγηση). Αυτό περιορίζει την τρέχουσα κλινική εφαρμογή λόγω των δοσοεξαρτώμενων παρενεργειών και περιορίζει τα πιθανά πεδία ένδειξης τους (Kubota et al, 2009).

Οι τρέχουσες μελέτες επικεντρώνονται κυρίως στην διερεύνηση μεθόδων μείωσης της τοξικότητας και των παρενεργειών που παρουσιάζονται στον οργανισμό λόγω των αντισωμάτων. Επίσης βρίσκονται σε εξέλιξη μελέτες για την εύρεση του βέλτιστου χρόνου χορήγησης των κατάλληλων αντισωμάτων ώστε να επιτευχθούν τα καλύτερα δυνατά κλινικά αποτελέσματα.

Αν και υπάρχουν αρκετές κατηγορίες ανοσοσφαιρινών στον άνθρωπο, τα τρέχοντα θεραπευτικά αντισώματα είναι ως επί το πλείστον της υποτάξης IgG1 λόγω της μεγάλης ημιζωής τους στον ορό και της ικανότητάς τους για ισχυρές εκτελεστικές λειτουργίες σε σύγκριση με τις ανοσοσφαιρίνες άλλων κατηγοριών (Clark, 1997).

Την επταετία από το 2014 έως το 2020 οι εταιρείες της φαρμακευτικής βιομηχανίας πέτυχαν την έγκριση άδειας κυκλοφορίας στις ΗΠΑ ή στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) συνολικά 61 θεραπευτικών αντισωμάτων (Εικόνα 6-1). Αντίθετα, μόνο 34 αντισώματα εγκρίθηκαν κατά την προηγούμενη 17ετία (1997–2013). Το 2020 δέκα νέα αντισώματα για την αντιμετώπιση διαφόρων νόσων έλαβαν την πρώτη έγκριση στις ΗΠΑ ή την ΕΕ. Πρόκειται για τα αντισώματα teprotumumab-trbw (Tepezza®), eptinezumab-jjmr (Vyepi™), isatuximab-irfc (Sarclisa®), sacituzumab govitecan-hziy (Trodelvy™), inebilizumab-cdon (Uplizna™), tafasitamab -cxix (Monjuvi®), belantamab mafodotin-blmf (Blenrep®), satralizumab-mwge (ENSPRYNG™), atoltivimab/maftivimab/odesivimab-ebgn (Inmazole™) και naxitamab-gqgk (DANYELZA).



Εικόνα 6-1. Αριθμός των θεραπευτικών αντισωμάτων που εγκρίνονται κάθε χρόνο από το 1997 έως το 2020 στις ΗΠΑ και στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Karlson & Reichert, 2021).

## 6.1 Θεραπευτικά αντισώματα για τον καρκίνο του μαστού

Το trastuzumab (Herceptin™) είναι ένα ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει τον διαμεμβρανικό υποδοχέα HER2/neu που μεσολαβεί στην ανάπτυξη, στη διαφοροποίηση και στην επιβίωση των κυττάρων. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης HER-2, η ενίσχυση του γονιδίου HER2 ή και τα δύο εμφανίζονται σε περίπου 15 έως 25 τις εκατό των καρκίνων του μαστού και σχετίζονται με επιθετική συμπεριφορά του όγκο. Βρέθηκε ότι όταν το trastuzumab χορηγείται εβδομαδιαίως ή κάθε τρεις εβδομάδες μόνο του ή σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, βελτιώνει σημαντικά την επιβίωση γυναικών με θετικό σε HER2 καρκίνο του μαστού. Στα πλεονεκτήματά του συγκαταλέγεται το γεγονός ότι δεν σχετίζεται με ανεπιθύμητες ενέργειες που εμφανίζονται συνήθως με τη χημειοθεραπεία, όπως αλωπεκία, μυελοκαταστολή, ναυτία και έμετος (Piccart-Gebhart et al, 2005). Επίσης η χρήση του Herceptin αύξησε τον χρόνο εξέλιξης της νόσου και τα ποσοστά ανταπόκρισης στη θεραπεία όταν χορηγήθηκε σε συνδυασμό είτε με αδριαμυκίνη-κυτοξάνη είτε με πακλιταξέλη (Nelson et al, 2000).

## **6.2 Θεραπευτικά αντισώματα για τον καρκίνο του πνεύμονα**

Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC) αποτελεί το 85% των περιπτώσεων του καρκίνου του πνεύμονα. Ασθενείς με NSCLC στους οποίους χορηγήθηκαν τα ανθρωποποιημένα μονοκλωνικά αντισώματα nivolumab και pembrolizumab ανταποκρίθηκαν θετικά στη θεραπεία και αυξήθηκε σημαντικά ο χρόνος επιβίωσης τους. Τα αντισώματα nivolumab και pembrolizumab αναστέλλουν την πρωτεΐνη 1 του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου PD-1. Η πρωτεΐνη αυτή είναι υποδοχέας των T λεμφοκυττάρων. Φυσιολογικά όταν συνδεθεί ένας ανασταλτικός συνδέτης σε αυτό τον υποδοχέα η δραστηριότητα των T κυττάρων θα ανασταλεί για να αποφευχθούν υπερβολικές ανοσολογικές αποκρίσεις που μπορεί να βλάψουν τα φυσιολογικά κύτταρα και τους υγιείς ιστούς. Ουσιαστικά πρόκειται για ένα φυσιολογικό μηχανισμό πρόληψης της αυτοανοσίας. Όμως τα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα μπορούν να εκφράζουν περισσότερους ανασταλτικούς συνδέτες της πρωτεΐνης 1 του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (PD-L1) που δεσμεύονται στους υποδοχείς PD-1 και αναστέλλουν την ανοσολογική λειτουργία των T κυττάρων. Ωστόσο, εάν οι αναστολείς για τον υποδοχέα PD-1 ή τον συνδέτη PD-L1 δεσμευτούν στον υποδοχέα PD-1 ή στον συνδέτη PD-L1 αντίστοιχα, τα T λεμφοκύτταρα θα μπορέσουν να αναγνωρίσουν τα καρκινικά κύτταρα και να ξεκινήσουν την αντικαρκινική δράση τους (El Karak et al, 2019).

## **6.3 Θεραπευτικά αντισώματα για τον καρκίνο του παχέος εντέρου**

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ένας καρκίνος που εξαιτίας της μη φυσιολογικής ανάπτυξης των κυττάρων του μπορεί να εισβάλει ή να δώσει μεταστάσεις σε άλλα μέρη του σώματος. Συνήθως η εμφάνιση του καρκίνου του παχέος εντέρου ξεκινάει αρχικά με την ανάπτυξη πολυπόδων οι οποίοι στη συνέχεια εξελίσσονται σε όγκους. Οι πρωτεΐνες MMR (mismatch repair) είναι πρωτεΐνες που δρουν ως ενδονουκλεάσες και επιδιορθώνουν τα λάθη που συμβαίνουν στη διαδικασία σύνθεσης του DNA. Εάν αυτές οι πρωτεΐνες MMR απουσιάζουν, θα προκύψει μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability- MSI), όπου οι μικροδορυφόροι είναι μικρές και επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου σχετίζεται με υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite

Διπλωματική Εργασία

instability-high, MSI-H) ή με ελαττωματικό μηχανισμό MMR (deficient MMR-dMMR).

Η αναστολή της πρωτεΐνης 1 του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (PD-1) και του αντιγόνου 4 των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων (cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4, CTLA-4) βρέθηκε ότι είναι εξαιρετικά αποτελεσματική σε dMMR καρκίνο του παχέος εντέρου προχωρημένου σταδίου, αλλά όχι σε όγκους με λειτουργικό μηχανισμό MMR (proficient MMR, pMMR). Οι πρωτεΐνες PD-1 και CTLA-4 είναι υποδοχείς των Τ λεμφοκυττάρων και οι αναστολείς τους απενεργοποιούν τον μηχανισμό αναστολής που παρουσιάζουν τα κυτταροτοξικά Τ κύτταρα για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων και έτσι ενισχύουν την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού έναντι των καρκινικών κυττάρων. Το 2020 ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration- FDA) των ΗΠΑ ενέκρινε τα αντισώματα pembrolizumab και nivolumab, που είναι αναστολείς της PD-1, ως θεραπεία πρώτης γραμμής για ασθενείς με ανεγχείρητο ή μεταστατικό MSI-H ή dMMR καρκίνο του παχέος εντέρου (Chen et al, 2021).

#### **6.4 Θεραπευτικά αντισώματα για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης**

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης (Bladder cancer- BC) συγκαταλέγεται στους δέκα πιο συχνούς καρκίνους παγκοσμίως και διακρίνεται στο μη μυοδιηθητικό (non-muscle invasive bladder cancer - NMIBC) και στο μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης (muscle invasive bladder cancer- MIBC), ο οποίος είναι και μεταστατικός. Τα τελευταία χρόνια, η αναστολή της πρωτεΐνης 1 του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (PD-1) ή του συνδέτη της πρωτεΐνης 1 του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (PD-L1) έχει προταθεί ως νέα μέθοδο θεραπείας τόσο στον NMIBC όσο και στο MIBC καρκίνο που δεν ανταποκρίνονται σε άλλες μεθόδους θεραπείας. Συγκεκριμένα, τα μονοκλωνικά αντισώματα pembrolizumab, atezolizumab, nivolumab, durvalumab και avelumab χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες κλινικές μελέτες και παρατηρήθηκαν θετικά αποτελέσματα, σημαντική καθυστέρηση στην ανάπτυξη του όγκου και αύξηση της επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο της ουροδόχου κύστης (De Jong et al, 2021).

Μάλιστα αυτά τα πέντε μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν την πρωτεΐνη PD-1 ή τον συνδέτη PD-L1 έχουν εγκριθεί ήδη από το 2016 για τη θεραπεία του μεταστατικού και ανθεκτικού καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Ακόμη ο FDA των ΗΠΑ ενέκρινε το enfortumab vedotin (EV), που είναι ένα σύμπλεγμα αντισώματος-φαρμάκου (ADC), για τη θεραπεία ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Αυτό που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι ότι το EV παρά την αποτελεσματικότητά του, έχει οικονομικό κόστος που είναι σημαντικά πιο υψηλό από εκείνο των μονοκλωνικών αντισωμάτων (Bednova & Leyton, 2020).

## **6.5 Θεραπευτικά αντισώματα για το μελάνωμα**

Ασθενείς με μελάνωμα, που είναι καρκίνος του δέρματος, συχνά εμφανίζουν μεταστάσεις στον εγκέφαλο που οδηγούν σε νευρολογική αναπηρία και σε θάνατο. Το 2011 ο FDA των ΗΠΑ ενέκρινε το αντίσωμα ipilimumab για τη θεραπεία του μελανώματος. Το ipilimumab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναστέλλει το αντιγόνο 4 των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων (CTLA-4) και έχει αποδειχθεί ότι έχει δράση απέναντι στις εγκεφαλικές μεταστάσεις από μελάνωμα όταν χρησιμοποιείται ως μονοθεραπεία σε τέσσερις δόσεις του 1 mg ανά χιλιόγραμμο σωματικού βάρους κάθε 3 εβδομάδες (Margolin et al, 2012).

Σε άλλες μελέτες, χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα nivolumab, που είναι αναστολέας της PD-1 σε συνδυασμό με το αντίσωμα ipilimumab. Συγκεκριμένα χορηγήθηκε σε ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα σε τέσσερις δόσεις, κάθε 3 εβδομάδες το αντίσωμα nivolumab (1 mg ανά χιλιόγραμμο σωματικού βάρους) σε συνδυασμό με το αντίσωμα ipilimumab (3 mg ανά χιλιόγραμμο σωματικού βάρους) και στη συνέχεια χορηγήθηκε το nivolumab (3 mg ανά χιλιόγραμμο σωματικού βάρους) κάθε 2 εβδομάδες μέχρι την εξέλιξη της νόσου. Η συνδυαστική αυτή χορήγηση των δύο αντισωμάτων είχε θετικά κλινικά αποτελέσματα ανώτερα από εκείνα της μονοθεραπείας. Τελικά, αυτό το δοσολογικό σχήμα εγκρίθηκε από τον FDA ως θεραπεία πρώτης γραμμής για το μελάνωμα προχωρημένου σταδίου (Tawbi et al, 2018).

## **6.6 Θεραπευτικά αντισώματα για την οφθαλμική νόσο του θυρεοειδούς**

Το teprotumumab (Tepezza®) είναι ένα ανθρώπινο αντίσωμα IgG1κ που στοχεύει τον υποδοχέα του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα 1 (insulin-like growth factor 1 receptor- IGF-1R). Αναπτύχθηκε αρχικά στα μέσα της δεκαετίας του 2000 ως θεραπεία για συμπαγείς όγκους. Στις 21 Ιανουαρίου 2020, ο FDA ενέκρινε το Tepezza (teprotumumab-trbw) για τη θεραπεία ενηλίκων με οφθαλμική νόσο του θυρεοειδούς, η οποία σχετίζεται με ένα εξόγκωμα του ματιού προς τα έξω που μπορεί να προκαλέσει πόνο στα μάτια, διπλή όραση, ευαισθησία στο φως ή δυσκολία στο κλείσιμο του μάτι. Στις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν οι ασθενείς λάμβαναν ενδοφλέβια το teprotumumab μία φορά κάθε 3 εβδομάδες για 21 εβδομάδες (10 mg ανά χιλιόγραμμο σωματικού βάρους για την πρώτη έγχυση και 20 mg ανά χιλιόγραμμο για τις επόμενες εγχύσεις). Το teprotumumab έλαβε τις ονομασίες Fast Track, Πρωτοποριακής Θεραπείας και Ορφανού Φαρμάκου από τον FDA (Douglas et al, 2020).

## **6.7 Θεραπευτικά αντισώματα για την χρόνια ημικρανία**

Το eptinezumab (Vyerti™) είναι ένα ανθρωποποιημένο, μη γλυκοζυλιωμένο αντίσωμα IgG1κ που προέρχεται από κουνέλι και στοχεύει ένα πεπτίδιο που σχετίζεται με το γονίδιο της καλσιτονίνης. Παράγεται σε ζυμομύκητες *Pichia pastoris* με τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA. Στις 21 Φεβρουαρίου 2020, ο FDA ενέκρινε το eptinezumab-jjmr για την προληπτική θεραπεία της χρόνιας ημικρανίας (chronic migraine- CM) στους ενήλικες. Η συνιστώμενη δόση είναι 100 mg ως ενδοφλέβια έγχυση για περίπου 30 λεπτά κάθε 3 μήνες ή μια μόνο δόση 300 mg και φάνηκε ότι μείωσε τον μηνιαίο αριθμό ημικρανιών των ασθενών (Lipton et al, 2020).

## **6.8 Θεραπευτικά αντισώματα για το πολλαπλό μυέλωμα**

Το isatuximab (Sarclisa®, isatuximab-irfc) είναι ένα χμαιοκτικό IgG1κ που στοχεύει την γλυκοπρωτεΐνη CD38 που υπερεκφράζεται σε κύτταρα του πλάσματος



στο πολλαπλό μυέλωμα (MM). Το Ixatuximab έλαβε την ονομασία Ορφανού Φαρμάκου από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medicines Agency-EMA) το 2014 και από τον FDA το 2016. Το isatuximab εγκρίθηκε για πρώτη φορά στις ΗΠΑ στις 2 Μαρτίου 2020, σε συνδυασμό με την πομαλιδομίδη και την δεξαμεθαζόνη, για ενήλικες ασθενείς με MM που είχαν λάβει τουλάχιστον δύο προηγούμενες θεραπείες, συμπεριλαμβανομένης της λεναλιδομίδης και ενός αναστολέα πρωτεασώματος. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή χορήγησε στο isatuximab την ίδια έγκριση κυκλοφορίας στις 30 Μαΐου 2020. Η συνιστώμενη δόση για το isatuximab είναι 10 mg/kg ενδοφλέβια κάθε εβδομάδα για 4 εβδομάδες, η οποία ακολουθείται από την ίδια δόση κάθε 2 εβδομάδες σε συνδυασμό με πομαλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη και φάνηκε ότι καθυστερεί την εξέλιξη της νόσου και αυξάνει την επιβίωση (Schjesvold et al,2021).

Το belantamab mafodotin (GSK2857916, belantamab mafodotin-blmf, Blenrep®) είναι μια συζευγμένη ένωση αντισώματος-φαρμάκου (antibody-drug conjugate - ADC). Περιλαμβάνει ένα ανθρωποποιημένο, αφουκοζυλιωμένο αντίσωμα IgG1k που στοχεύει το αντιγόνο ωρίμανσης των Β κυττάρων (BCMA) και είναι συζευγμένο με τον κυτταροτοξικό παράγοντα μαλεϊμιδοκαπροϋλική μονομεθυλαυριστατίνη (maleimidocaproyl monomethyl auristatin- MAM).

Ο FDA έδωσε στο belantamab mafodotin την ονομασία Ορφανού Φαρμάκου και Πρωτοποριακής Θεραπείας για το πολλαπλό μυέλωμα (MM). Στις 5 Αυγούστου 2020, το Blenrep® έλαβε ταχεία έγκριση από τον FDA ως μονοθεραπεία για το MM σε ενήλικες ασθενείς που έχουν λάβει τουλάχιστον τέσσερις προηγούμενες θεραπείες και έχουν δείξει εξέλιξη της νόσου στην τελευταία θεραπεία τους. Η νόσος αυτών των ασθενών παρέμενε ανθεκτική σε τουλάχιστον έναν αναστολέα πρωτεασώματος, έναν ανοσοτροποποιητικό παράγοντα και ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει την γλυκοπρωτεΐνη CD38. Οι ασθενείς λαμβάνουν ενδοφλέβια τον μονοπαράγοντα belantamab mafodotin σε δόση 2,5 mg/kg ή 3,4 mg/kg κάθε 3 εβδομάδες. Οι πληροφορίες συνταγογράφησης για το Blenrep® περιλαμβάνουν μια προειδοποίηση που σχετίζεται με αλλοιώσεις στην όραση, όπως σοβαρή απώλεια όρασης και έλκος του κερατοειδούς. Γι' αυτό η Ευρωπαϊκή Επιτροπή χορήγησε στο belantamab mafodotin στις 25 Αυγούστου 2020 άδεια κυκλοφορίας υπό όρους (Lonial et al, 2020).

## **6.9 Θεραπευτικά αντισώματα για τον Τριπλά Αρνητικό καρκίνο του Μαστού (TNBC)**

Το sacituzumab govitecan (IMMU-132, sacituzumab govitecan-hziy, Trodelvy<sup>TM</sup>) είναι μια συζευγμένη ένωση αντισώματος-φαρμάκου (antibody-drug conjugate - ADC) που περιλαμβάνει ένα ανθρωποποιημένο αντίσωμα IgG1k. Το αντίσωμα αυτό στοχεύει την γλυκοπρωτεΐνη TROP-2 και είναι συζευγμένο με τον ενεργό μεταβολίτη SN-38 ο οποίος προέρχεται από το δημοφιλές αντικαρκινικό φάρμακο, την ιρινοτεκάνη. Η γλυκοπρωτεΐνη TROP-2 εμπλέκεται σε μονοπάτια σηματοδότησης του καρκίνου και έχει αυξημένη έκφραση από πολλούς τύπους καρκινικών κυττάρων.

Στις 22 Απριλίου 2020 ο FDA χορήγησε στο Trodelvy® μια ταχεία έγκριση για ενήλικες ασθενείς με μεταστατικό Τριπλά Αρνητικό καρκίνο του Μαστού (Triple-negative breast cancer- TNBC) που είχαν λάβει τουλάχιστον δύο θεραπείες για μεταστατική νόσο. Το sacituzumab govitecan είχε ήδη ονομαστεί Fast Track και Πρωτοποριακής Θεραπείας για το μεταστατικό TNBC από τον FDA. Η έγκριση του FDA βασίστηκε σε ευρήματα κλινικών δοκιμών στις οποίες συμμετείχαν ασθενείς που είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία για μεταστατικό TNBC. Το sacituzumab govitecan χορηγήθηκε ενδοφλέβια σε δόση 10 mg/kg τις Ημέρες 1 και 8 κάθε 21 ημέρες. Η απεικόνιση του όγκου λαμβανόταν κάθε 8 εβδομάδες. Με τη σύζευξη μεγαλύτερου αριθμού μορίων SN-38 με την ανοσοσφαιρίνη (αναλογία φαρμάκου προς αντισώματα = 7-8:1) και δίνοντας υψηλότερους (10 mg/kg) και επαναλαμβανόμενους κύκλους θεραπείας (Ημέρες 1 και 8 κάθε 21 ημέρες), επιτυγχάνεται ενισχυμένη πρόσληψη φαρμάκου από τα στοχευμένα καρκινικά κύτταρα (Goldenberg & Sharkey, 2019).

## **6.10 Θεραπευτικά αντισώματα για την διαταραχή του φάσματος της οπτικής νευρομυελίτιδας (NMOSD)**

Το inebilizumab-cdon (Uplizna<sup>TM</sup>) είναι ένα ανθρωποποιημένο αντίσωμα IgG1k που στοχεύει το αντιγόνο CD19 και ενδείκνυται ως θεραπεία της διαταραχής του φάσματος της οπτικής νευρομυελίτιδας (Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder- NMOSD). Πρόκειται για μια σπάνια αυτοάνοση διαταραχή του κεντρικού νευρικού συστήματος που καταστρέφει κυρίως το οπτικό νεύρο και το νωτιαίο μυελό, προκαλώντας τύφλωση, μυϊκή αδυναμία και παράλυση. Οι περισσότεροι ασθενείς με αυτή τη διαταραχή έχουν αυτοαντισώματα έναντι της ακουαπορίνης-4 (AQP4). Το inebilizumab εξαντλεί τα Β κύτταρα που εκφράζουν το αντιγόνο CD19, που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή αυτοαντισωμάτων που στρέφονται κατά της AQP4.

Το inebilizumab πήρε την ονομασία Πρωτοποριακής Θεραπείας από τον FDA για τη θεραπεία της διαταραχής NMOSD, καθώς και την ονομασία Ορφανού Φαρμάκου από τον FDA και τον EMA. Στις 11 Ιουνίου 2020 ο FDA ενέκρινε το inebilizumab-cdon για τη θεραπεία της διαταραχής NMOSD σε ενήλικες ασθενείς που είναι θετικοί για το αντίσωμα έναντι της AQP4. Η συνιστώμενη δόση του Uplizna περιλαμβάνει μια αρχική δόση 300 mg με ενδοφλέβια χορήγηση που ακολουθείται 2 εβδομάδες αργότερα από μια δεύτερη ενδοφλέβια χορήγηση 300 mg. Στη συνέχεια ακολουθούν εφάπαξ δόσεις 300 mg ενδοφλέβια κάθε 6 μήνες, ξεκινώντας το πρώτο εξάμηνο μετά την πρώτη χορήγηση (Cree et al,2019).

Το satralizumab (ENSPRYNG<sup>TM</sup>) είναι ένα ανασυνδυασμένο ανθρωποποιημένο αντίσωμα IgG2k που στοχεύει τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης 6 (IL-6). Η IL-6 είναι μια προφλεγμονώδης κυτοκίνη που εμπλέκεται στην παθολογία της διαταραχής του φάσματος της οπτικής νευρομυελίτιδας (NMOSD). Το αντίσωμα satralizumab έχει σχεδιαστεί για να δεσμεύεται στον διαλυτό υποδοχέα της IL-6 με βάση το pH. Έχει επομένως μεγαλύτερη διάρκεια σε σύγκριση με τα συμβατικά αντισώματα επειδή μπορεί να απελευθερώσει τους δεσμευμένους υποδοχείς της IL-6 στα λυσοσώματα και να ανακυκλωθεί μέσω ενός μονοπατιού που συμπεριλαμβάνει τον νεογνικό υποδοχέα FcRn (neonatal Fc Receptor).

Το satralizumab πήρε την ονομασία Ορφανού Φαρμάκου στις ΗΠΑ, την Ευρώπη και την Ιαπωνία ενώ ο FDA του έδωσε τον Δεκέμβριο του 2018 την

ονομασία Πρωτοποριακής Θεραπείας για τη διαταραχή NMOSD. Στις 13 Αυγούστου 2020 ο FDA ενέκρινε το satralizumab-mwge (ENSPRYNG) για τη θεραπεία της διαταραχής NMOSD σε ενήλικες ασθενείς που είναι θετικοί για το αντίσωμα έναντι της ακουαπορίνης-4 (AQP4). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των κλινικών μελετών, η συνιστώμενη δόση του ENSPRYNG για τις τρεις πρώτες χορηγήσεις, τις εβδομάδες 0, 2 και 4, είναι 120 mg με υποδόρια (SC) ένεση και ακολουθείται από δόση συντήρησης 120 mg κάθε 4 εβδομάδες (Yamamura et al, 2019).

### **6.11 Θεραπευτικά αντισώματα για το διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-κυττάρα (DLBCL)**

Το tafasitamab (Monjuvi®, tafasitamab-cxix) είναι επίσης γνωστό ως MOR208 και XmAb5574. Πρόκειται για ένα ανθρωποποιημένο αντίσωμα που στοχεύει το αντιγόνο CD19. Διαθέτει μία περιοχή Fc που λειτουργεί μέσω της απόπτωσης και μέσω Fc εξαρτώμενων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της εξαρτώμενης από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητικής κυτταροτοξικότητας (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) και της εξαρτώμενης από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητικής φαγοκυττάρωσης (ADCP).

Το tafasitamab πήρε τις ονομασίες Πρωτοποριακής Θεραπείας και Fast Track από τον FDA καθώς και την ονομασία Ορφανού Φαρμάκου από τον FDA και τον EMA για τη θεραπεία του υποτροπιάζοντος ή ανθεκτικού διάχυτου λεμφώματος από μεγάλα Β-κυττάρα (diffuse large B-cell lymphoma- DLBCL). Στις 31 Ιουλίου 2020 ο FDA χορήγησε ταχεία έγκριση για το Monjuvi® σε συνδυασμό με την λεναλιδομίδη για ενήλικες ασθενείς με υποτροπιάζον ή ανθεκτικό DLBCL που δεν μπορούσαν να υποβληθούν σε μεταμόσχευση αυτόλογων βλαστοκυττάρων. Το συνιστώμενο σχήμα χορήγησης είναι ενδοφλέβια χορήγηση του tafasitamab σε δόση 12 mg/kg σε συνδυασμό με λεναλιδομίδη χορηγούμενη από το στόμα σε δόση 25 mg ανά ημέρα για μέγιστο διάστημα 12 κύκλων (28 ημερών ο καθένας). Στη συνέχεια ακολουθεί μονοθεραπεία με tafasitamab (σε ασθενείς με σταθερή ή βελτιωμένη νόσο) μέχρι την εξέλιξη της νόσου (Salles et al, 2020).

## **6.12 Θεραπευτικά αντισώματα για την νόσο που προκαλείται από τον ιό του Έμπολα**

Το atoltivimab, το maftivimab και το odesivimab είναι αντισώματα IgG1 που δεσμεύουν τη γλυκοπρωτεΐνη στην επιφάνεια του ιού Έμπολα, εμποδίζοντας έτσι την προσκόλληση και την είσοδο του ιού στα κύτταρα. Το Inmazeb<sup>TM</sup> είναι ένα κοκτέιλ από αυτά τα τρία αντισώματα το οποίο αναπτύχθηκε και αξιολογήθηκε ως θεραπεία για τη μόλυνση από τον ιό Έμπολα. Το Inmazeb<sup>TM</sup> πήρε την ονομασία Πρωτοποριακής Θεραπείας και Ορφανού Φαρμάκου από τον FDA. Στις 14 Οκτωβρίου 2020, ο FDA ενέκρινε το τριπλό κοκτέιλ αντισωμάτων atoltivimab, maftivimab και odesivimab-ebgn (Inmazeb<sup>TM</sup>) για τη θεραπεία της λοίμωξης από τον ιό Έμπολα του Ζαΐρ (ιός Έμπολα) σε ενήλικες και παιδιά. Η συνιστώμενη δόση του Inmazeb περιλαμβάνει μια εφάπαξ ενδοφλέβια χορήγηση 50 mg από κάθε μονοκλωνικό αντίσωμα (Karlon & Reichert, 2021).

## **6.13 Θεραπευτικά αντισώματα για το νευροβλάστωμα**

Το naxitamab (hu3F8, naxitamab-gqgk, Danyelza<sup>TM</sup>) είναι ένα ανθρωποποιημένο αντίσωμα IgG1k που στοχεύει το αντιγόνο GD2 που εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε διάφορους όγκους και σαρκώματα που προέρχονται από το νευροεκτόδερμα.

Ο FDA έδωσε στο naxitamab την ονομασία Πρωτοποριακής Θεραπείας και Σπάνιου Παιδιατρικού Φαρμάκου για τη θεραπεία ασθενών με νευροβλάστωμα. Στην ΕΕ και τις ΗΠΑ το naxitamab έλαβε την ονομασία Ορφανού Φαρμάκου. Στις 25 Νοεμβρίου 2020 ο FDA ενέκρινε τη χορήγηση 40 mg/10 ml naxitamab-gqgk σε συνδυασμό με τον αυξητικό παράγοντα GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) για τη θεραπεία παιδιών ηλικίας 1 έτους και άνω καθώς και ενηλίκων ασθενών με υποτροπιάζον ή ανθεκτικό νευροβλάστωμα υψηλού κινδύνου. Πρόκειται για νευροβλάστωμα στα οστά ή στο μυελό των οστών και για ασθενείς που έχουν δείξει μερική ή μικρή ανταπόκριση ή σταθερή νόσο σε προηγούμενη θεραπεία (Karlon & Reichert, 2021).

## **6.14 Θεραπευτικά αντισώματα για τη νόσο COVID-19**

Η φαρμακευτική βιομηχανία ήταν ανέκαθεν εξαιρετικά δραστήρια στην παραγωγή αντισωμάτων. Το 2020 όμως συνέβησαν γεγονότα άνευ προηγουμένου λόγω της νόσου του κορωνοϊού 2019 (COVID-19). Από τον Ιανουάριο ως το Νοέμβριο του 2020, πάνω από 60 εκατομμύρια άνθρωποι μολύνθηκαν από τον ιό SARS-CoV-2 παγκοσμίως και περίπου 1,5 εκατομμύριο άνθρωποι έχασαν τη ζωή τους. Οι Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (ΗΠΑ) είχαν τον υψηλότερο αριθμό μολύνσεων και θανάτων, όσον αφορά τους απόλυτους αριθμούς ανά χώρα. Καταγράφηκαν πάνω από 13 εκατομμύρια μολύνσεις και πάνω από 260 χιλιάδες θάνατοι.

Ήταν ξεκάθαρο απ' την αρχή ότι θα χρειαζόνταν πολλές νέες θεραπείες και εμβόλια για τη διαχείριση της πανδημίας. Εκατοντάδες φαρμακευτικοί, ακαδημαϊκοί, κυβερνητικοί και μη κερδοσκοπικοί οργανισμοί, παράλληλα με τις συνήθειες δραστηριότητές τους, άρχισαν να μελετούν τον ιό και την ασθένεια και να αναπτύσσουν εμβόλια και θεραπείες, συμπεριλαμβανομένου κλινικές μελέτες τελικού σταδίου θεραπευτικών αντισωμάτων.

Η νόσος COVID-19 χαρακτηρίζεται από σύνδρομο οξείας αναπνευστικής ανεπάρκειας (acute respiratory distress syndrome- ARDS), που προκαλείται από μία καταγίδα κυτοκινών, μέτρια έως σοβαρή πνευμονία, βλάβη ιστού που προκαλείται από υπερφλεγμονή και μη φυσιολογική πήξη. Συγκεκριμένα, το συμπλήρωμα 5, η ιντερλευκίνη 1 (IL-1), η ιντερλευκίνη 6 (IL-6), η ιντερφερόνη (IFN) και ο παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF) έχουν εμπλακεί στην παθολογία της νόσου. Καθώς η πανδημία άρχισε να εξαπλώνεται στις αρχές του 2020, περισσότερα από 60 θεραπευτικά αντισώματα που βρίσκονταν σε κλινικές μελέτες ή κυκλοφορούσαν ήδη στην αγορά με παρόμοιες εφαρμογές χρησιμοποιήθηκαν ως πιθανές παρεμβάσεις για την νόσο COVID-19. Τον Νοέμβριο του 2020 χορηγήθηκαν εξουσιοδοτήσεις επείγουσας χρήσης (emergency use authorizations -EUAs) για τα αντισώματα levilimab, itolizumab και leronlimab. Το levilimab είναι ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα που μπλοκάρει τον υποδοχέα της IL-6. Αρχικά αναπτύχθηκε στη Ρωσία για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας χωρίς όμως να μπορέσει να πάρει έγκριση για αυτή την εφαρμογή και

τελικά πήρε εξουσιοδότηση επείγουσας χρήσης (EUA) για τη νόσο COVID-19. Το itolizumab είναι ένα εξανθρωπισμένο IgG1 αντίσωμα που μπλοκάρει την γλυκοπρωτεΐνη CD6. Αρχικά είχε εγκριθεί στην Ινδία για την ψωρίαση κατά πλάκας, στη συνέχεια έλαβε περιορισμένη επείγουσα χρήση για τη θεραπεία του συνδρόμου απελευθέρωσης κυτοκίνης σε ασθενείς με COVID-19 που παρουσίασαν μέτρια έως σοβαρή οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια (ARDS). Το Ieronlimab είναι ένα εξανθρωπισμένο IgG4 αντίσωμα που αναπτύχθηκε στις ΗΠΑ για την αντιμετώπιση του HIV, του εγκεφαλικού επεισοδίου, της νόσου μοσχεύματος έναντι ξενιστή (Graft versus host disease- GvHD), του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού (Triple Negative Breast Cancer- TNBC), καθώς και της νόσου COVID-19. Το Ieronlimab μπλοκάρει τον υποδοχέα C-C της χημειοκίνης τύπου 5 (CCR5) ο οποίος ρυθμίζει τη διακίνηση των ανοσοκυττάρων στα σημεία της φλεγμονής.

Επίσης πολλοί οργανισμοί προσπάθησαν να ανακαλύψουν νέα αντισώματα που δεσμεύουν την πρωτεΐνη ακίδας (spike protein) που βρίσκεται στην επιφάνεια του ιού SARS-CoV-2 και η οποία είναι απαραίτητη για να εισέλθει ο ιός στα κύτταρα. Τα αντισώματα αυτά εμποδίζουν την είσοδο του ιού στα κύτταρα ξενιστές διαταράσσοντας τις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης ακίδας με τον υποδοχέα του μετατρεπτικού ενζύμου 2 της αγγειοτενσίνης (Angiotensin Converting Enzyme 2- ACE2). Τέτοια αντισώματα που στοχεύουν την πρωτεΐνη ακίδας του ιού, όπως το bamlanivimab (LY-CoV555) και το REGN-COV2 (casirivimab και imdevimab) πήραν εξουσιοδοτήσεις επείγουσας χρήσης (emergency use authorizations -EUAs) από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration- FDA). Το REGN-COV2 είναι ένα κοκτέιλ δύο ανθρώπινων αντισωμάτων που προέρχονται χρησιμοποιώντας τόσο διαγονιδιακά ποντίκια όσο και B κύτταρα από ασθενείς με COVID-19 οι οποίοι έχουν αναρρώσει. Το bamlanivimab και το REGN-COV2 που στοχεύουν την πρωτεΐνη ακίδας του ιού SARS-CoV-2 μειώνουν το ιικό φορτίο, ενώ το Ieronlimab που μπλοκάρει τον υποδοχέα CCR5 προορίζεται για τη θεραπεία των συμπτωμάτων του COVID-19 (Kaplon & Reichert, 2021).

Συμπερασματικά, την τελευταία δεκαετία νέα αντισώματα εγκρίνονται διαρκώς για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς και εκατοντάδες βρίσκονται υπό κλινική αξιολόγηση. Επιπλέον, εκτός από τις ανοσοσφαιρίνες πλήρους μήκους Διπλωματική Εργασία

χρησιμοποιούνται τα θραύσματα αντισωμάτων που ανταποκρίνονται στις ανάγκες απεικόνισης για την έγκαιρη διάγνωση και αποτελεσματική θεραπεία στην σύγχρονη κλινική πράξη. Τα μονοκλωνικά αντισώματα θα μπορούσαν να αποτελέσουν μία εναλλακτική επιλογή ως αποτελεσματικοί θεραπευτικοί παράγοντες για την αντιμετώπιση ποικιλίας λοιμώξεων, συμπεριλαμβανομένου της λοίμωξης από τον ιό SARS-CoV-2. Συνεπώς αποτελούν θεραπευτικά μόρια με σημαντικές εφαρμογές, γι' αυτό ερευνητές και κλινικοί ιατροί από όλο τον κόσμο συνεχίζουν να καταβάλλουν προσπάθειες για να βελτιωθούν οι ιδιότητες τους και να διευρυνθεί περισσότερο η χρήση τους.



## **7. Ένα εκλαϊκευμένο επιμορφωτικό σεμινάριο**

Τίτλος Σεμιναρίου: Αντισώματα, φυσιολογικός ρόλος και σύγχρονες εφαρμογές τους για την έγκαιρη διάγνωση και αποτελεσματική θεραπεία των ανθρωπίνων νοσημάτων.

Προφίλ Εκπαιδευομένων: Το παρόν επιμορφωτικό σεμινάριο απευθύνεται σε άτομα διαφόρων ηλικιών, άνδρες και γυναίκες. Όλοι οι εκπαιδευόμενοι είναι απόφοιτοι λυκείου, που δεν έχουν ειδικές γνώσεις στον τομέα της υγείας.

Εκπαιδευτικές τεχνικές: Εισήγηση, Ερωτήσεις- Απαντήσεις.

Εκπαιδευτικά μέσα: Διαφάνειες παρουσίασης στο power point.

### **7.1 Αμυντικοί μηχανισμοί του ανθρώπινου οργανισμού**

Ο ανθρώπινος οργανισμός έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει οποιαδήποτε ξένη προς αυτόν ουσία και να αντιδρά με διάφορους μηχανισμούς για να την αντιμετωπίσει. Η ικανότητα αυτή ονομάζεται ανοσία. Η ξένη ουσία που προκαλεί την αντίδραση του οργανισμού και ονομάζεται αντιγόνο μπορεί να είναι κάποιος παθογόνος μικροοργανισμός (βακτήριο, ιός, μύκητας και παράσιτο) ή μία ουσία μη μικροβιακής φύσεως (όπως τοξίνες, χημικοί παράγοντες) ή τέλος κάποια καρκινικά κύτταρα. Η ανοσία διακρίνεται σε φυσική ή μη ειδική ανοσία και σε επίκτητη ή ειδική ανοσία.

Η μη ειδική ανοσία περιλαμβάνει όλους τους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος που δεν είναι μοναδικοί για ένα συγκεκριμένο μικροοργανισμό ή ξένο ουσία όπως η κεράτινη στοιβάδα του δέρματος, ο ιδρώτας, το σμήγμα, η βλέννα, το σάλιο και τα δάκρυα που περιέχουν ουσίες με αντιμικροβιακή δράση. Ακόμη σε αυτό το είδος ανοσίας ανήκουν τα μη παθογόνα μικρόβια που συναντώνται φυσιολογικά σε διάφορα σημεία του σώματος (όπως στο δέρμα και στο έντερο), η φλεγμονή και το συμπλήρωμα που εξουδετερώνουν τον ξένο εισβολέα και οι ιντερφερόνες (INF) που εμποδίζουν την εξάπλωση αρκετών ιογενών μολύνσεων. Η

μη ειδική ανοσία ενεργοποιεί την ειδική ή επίκτητη ή αλλιώς προσαρμοστική ανοσία. Η ειδική ανοσία αναγνωρίζει κάποιο αντιγόνο και αντιδρά παράγοντας εξειδικευμένα κύτταρα (λεμφοκύτταρα) και πρωτεΐνες (αντισώματα), ώστε να εξουδετερώσει τον εισβολέα.

Τα λεμφοκύτταρα που αποτελούν το 20-35 % των λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος διαθέτουν στην κυτταρική τους μεμβράνη υποδοχείς με τους οποίους αναγνωρίζουν τα αντιγόνα. Το κάθε λεμφοκύτταρο είναι ειδικό για έναν και μόνο τύπο αντιγόνου. Η σύνδεση του αντιγόνου με τον υποδοχέα προκαλεί την λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση και συνεπώς την κυτταρική διαίρεση τους. Έτσι ωριμάζουν και διαφοροποιούνται σε τρεις τύπους. Τα Β λεμφοκύτταρα με την ενεργοποίηση τους διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα και παράγουν αντισώματα που είναι πρωτεΐνες που διοχετεύονται μέσω του αίματος σε όλο τον οργανισμό για να στοχεύσουν συγκεκριμένα αντιγόνα. Τα Τ λεμφοκύτταρα κατηγοριοποιούνται σε κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα ( $CD8^+$  Τ) και βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα ( $CD4^+$  Τ). Τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα μετά την ενεργοποίηση τους στοχεύουν και σκοτώνουν κύτταρα που έχουν προσβληθεί από ιούς και καρκινικά κύτταρα. Τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες που ενισχύουν την ενεργοποίηση και τη λειτουργία των Β λεμφοκυττάρων και των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων. Τέλος τα φυσικά φονικά κύτταρα (NK κύτταρα) εξουδετερώνουν κύτταρα που έχουν προσβληθεί από ιούς και καρκινικά κύτταρα.

Η ανοσολογική απόκριση που επιτελείται από τα αντισώματα είναι η λεγόμενη χυμική ανοσία που πήρε το όνομά της από το γεγονός ότι τα αντισώματα κυκλοφορούν στο αίμα και στο εξωκυττάριο υγρό, δηλαδή στους χυμούς του σώματος. Αντιθέτως η ανοσολογική απόκριση που επιτελείται χωρίς τη συμμετοχή αντισωμάτων αλλά με τη συμμετοχή κυρίως ενεργοποιημένων Τ λεμφοκυττάρων είναι η λεγόμενη κυτταρική ανοσία. Μόλις ολοκληρωθεί η ανοσολογική απόκριση τα περισσότερα από αυτά τα κύτταρα οδηγούνται σε θάνατο με απόπτωση. Κάποια όμως Τ και Β λεμφοκύτταρα παραμένουν ως κύτταρα μνήμης που θα βοηθήσουν τον οργανισμό να ανταπεξέλθει ταχύτατα και αποτελεσματικά σε περίπτωση μελλοντικής έκθεσης στο ίδιο αντιγόνο.

## 7.2 Αντισώματα

Τα αντισώματα ή ανοσοσφαιρίνες είναι πρωτεΐνες σχήματος όπως το γράμμα Υ και αποτελούνται από δύο πανομοιότυπες ελαφριές αλυσίδες (Light Chains- LCs) και δύο πανομοιότυπες βαριές αλυσίδες (Heavy Chains- HCs). Οι δύο βαριές αλυσίδες μεταξύ τους καθώς και η κάθε βαριά αλυσίδα με την αντίστοιχη ελαφριά του ετεροδιμερούς συγκρατούνται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Στον άνθρωπο οι ελαφριές αλυσίδες είναι δύο τύπων, κ ή λ. Οι δύο αυτοί τύποι έχουν δύο περιοχές, μία σταθερή (CL) και μία μεταβλητή (VL). Κατά ανάλογο τρόπο και οι βαριές αλυσίδες διακρίνονται σε πέντε τύπους (α, δ, ε, γ και μ) οι οποίοι καθορίζουν την τάξη στην οποία ανήκει η ανοσοσφαιρίνη. Έτσι προκύπτουν πέντε τάξεις ανοσοσφαιρινών, IgA, IgD, IgE, IgG και IgM, με ένα ξεχωριστό ρόλο η καθεμία στο ανοσοποιητικό σύστημα. Σε κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης οι δύο ελαφριές αλυσίδες είναι του ίδιου τύπου καθώς και οι δύο βαριές αλυσίδες είναι επίσης του ίδιου τύπου. Οι IgA, IgD και IgG έχουν μία μεταβλητή και τρεις σταθερές περιοχές, ενώ οι IgE και IgM έχουν μία μεταβλητή και τέσσερις σταθερές περιοχές. Μία επιπρόσθετη συνδετική αλυσίδα J επιτρέπει το σχηματισμό διμερών στην IgA και πενταμερών στην IgM.

Οι μεταβλητές περιοχές των ανοσοσφαιρινών, που αλληλεπιδρούν με το αντιγόνο-στόχο, είναι το N-τελικό μισό των ελαφριών και βαριών αλυσίδων. Ενώ το C-τελικό μισό των ελαφριών και βαριών αλυσίδων αποτελούν τις σταθερές περιοχές των ανοσοσφαιρινών. Οι μεταβλητές αλλά και οι σταθερές περιοχές αποτελούνται από περίπου 110 αμινοξέα και η αναδίπλωση τους στο χώρο είναι γνωστή ως «Ανοσοσφαιρινικό δίπλωμα» (Immunoglobulin fold). Το μόριο του αντισώματος αποτελείται από τρία λειτουργικά συστατικά, δύο θραύσματα που είναι περιοχές σύνδεσης με το αντιγόνο (Fabs: fragments antigen binding) που συνδέονται στην περιοχή του αρμού με ένα τρίτο θραύσμα που κρυσταλλώνεται εύκολα (Fc: fragment crystallizable). Οι Fab περιοχές του αντισώματος σχηματίζονται από το ζευγάρι της μεταβλητής περιοχής VL και της σταθερής περιοχής CL των ελαφριών αλυσίδων καθώς και της μεταβλητής περιοχής VH και της σταθερής περιοχής CH1 των βαριών αλυσίδων. Η Fc περιοχή του αντισώματος σχηματίζεται από τις σταθερές περιοχές CH2 και CH3 των βαριών αλυσίδων, είναι υπεύθυνη για τις εκτελεστικές λειτουργίες και συμβάλλει στον παρατεταμένο χρόνο ημιζωής του μορίου του αντισώματος στο

πλάσμα του αίματος. Οι εκτελεστικές λειτουργίες της Fc περιοχής περιλαμβάνουν τη συμμετοχή της σε μηχανισμούς θανάτωσης κυττάρων μέσω των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών και υδατανθράκων με υποδοχείς Fcγ και με συστατικά του συστήματος συμπληρώματος. Η IgM είναι η πρώτη ανοσοσφαιρίνη που παράγεται κατά την ανοσοποιητική απόκριση ως απάντηση στην αρχική έκθεση στο αντιγόνο και στη συνέχεια ακολουθεί η παραγωγή της IgG.

### **7.3 Ρόλος των αντισωμάτων**

Η βασική λειτουργία ενός αντισώματος είναι η πρόσδεσή του στο αντιγόνο. Όπως προαναφέρθηκε τα Β λεμφοκύτταρα διαθέτουν στην κυτταρική τους επιφάνεια ανοσοσφαιρίνες- υποδοχείς που συνδέουν το αντιγόνο και βοηθούν στην αναγνώρισή του. Επιπλέον τα αντισώματα που εκκρίνονται από τα πλασματοκύτταρα μεταφέρονται με την κυκλοφορία του αίματος σε ολόκληρο τον οργανισμό και συνδέονται με τους μικροοργανισμούς που φέρουν το ίδιο αντιγόνο ώστε αυτά να αποτελέσουν τους στόχους της επίθεσης του ανοσοποιητικού συστήματος.

Ένας πολύ σημαντικός εκτελεστικός μηχανισμός των αντισωμάτων είναι η ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος και η παραγωγή του πρωτεϊνικού συμπλέγματος που επιτίθεται στη μεμβράνη (μεμβρανοεπιθετικό σύμπλεγμα, Membrane Attack Complex- MAC). Το σύμπλεγμα αυτό μπορεί να καταστρέψει τα κύτταρα-στόχους με τα οποία έχει συνδεθεί το αντίσωμα. Πρόκειται για την εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC). Υπάρχει όμως και η δυνατότητα τα αντισώματα να στρατολογούν τα συστατικά του συμπληρώματος που σκοτώνουν τον μικροοργανισμό μέσω διαδικασιών οψωνινοποίησης που περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες C1q και/ή C3b που ενεργοποιούν με τη σειρά τους τα λευκοκύτταρα. Πρόκειται για την εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα κυττάρων (Complement Dependent Cell Cytotoxicity- CDCC). Επίσης με την πρόσδεση των Fc περιοχών τους στους Fc κυτταρικούς υποδοχείς για IgG (Fc-γRs) που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη των φαγοκυττάρων μπορούν να ενεργοποιήσουν την εξαρτώμενη από το αντίσωμα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC). Ουσιαστικά, σε αυτό τον μηχανισμό

οψωνινοποίησης, το αντίσωμα συνδέει το φαγοκύτταρο με το αντιγόνο και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη λύση του ξένου κυττάρου.

## **7.4 Μονοκλωνικά αντισώματα**

Κάθε αντιγόνο προκαλεί την παραγωγή πλήθους εξειδικευμένων αντισωμάτων που στοχεύουν διαφορετικούς επιτόπους, δηλαδή διαφορετικές περιοχές του ίδιου αντιγόνου. Τα αντισώματα αυτά παράγονται συχνά από πολλαπλούς κλώνους Β λεμφοκυττάρων και είναι γνωστά ως πολυκλωνικά αντισώματα. Ωστόσο η χρήση τους σε αναλυτικές μεθόδους παρουσιάζει μειονεκτήματα και έτσι προτιμώνται τα μονοκλωνικά αντισώματα που επιτρέπουν την ανάπτυξη τυποποιημένων και ασφαλών ανοσολογικών τεχνικών με υψηλή ειδικότητα. Πρόκειται για πρωτεΐνες που παράγονται από έναν μόνο κλώνο Β λεμφοκυττάρων.

Αρχικά, η παραγωγή των μονοκλωνικών αντισωμάτων ξεκίνησε με την τεχνική του υβριδισμού μέσω της σύντηξης των Β κυττάρων ποντικού και των κυττάρων μυελώματος ποντικού. Έπειτα βελτιώθηκε με τον εξανθρωπισμό και τη δημιουργία μιας χίμαιρας, αντικαθιστώντας τις σταθερές περιοχές των ζωικών αντισωμάτων με εκείνες των ανθρώπινων αντισωμάτων, με τη βοήθεια της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA. Τέλος δημιουργήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα αποκλειστικά ανθρώπινης προέλευσης και οι έρευνες συνεχίζονται για την βελτιστοποίηση βασικών χαρακτηριστικών των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Για παράδειγμα τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αντισώματα διπλής εξειδίκευσης (Bispecific antibodies- BsAbs) καθώς και συμπλέγματα αντισώματος-φαρμάκου (Antibody-drug conjugates, ADCs) τα οποία φαίνεται να είναι αρκετά αποτελεσματικά.

## **7.5 Εφαρμογές των αντισωμάτων για την έγκαιρη διάγνωση ανθρωπίνων νοσημάτων**

Τα μονοκλωνικά αντισώματα βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορες ανοσολογικές τεχνικές για την έγκαιρη διάγνωση διαφόρων σημαντικών ανθρωπίνων νοσημάτων.

Αυτές οι αναλύσεις που διακρίνονται για την υψηλή ειδικότητα, την ταχύτητα και την ευαισθησία βρίσκουν εφαρμογή στην ανάπτυξη διαγνωστικών τεστ στον τομέα της υγείας, δοκιμασιών αλλεργιογόνων στη βιομηχανία τροφίμων και ανίχνευσης της ανοσίας. Με τη βοήθεια αυτών των ανοσολογικών διαγνωστικών τεχνικών μπορούν να ανιχνευθούν έγκαιρα διάφοροι παθογόνοι μικροοργανισμοί που ευθύνονται για πολλές λοιμώξεις βοηθώντας στην ταχύτερη και αποτελεσματικότερη αντιμετώπισή τους.

Η ανοσοαπορροφητική μέθοδος συνδεδεμένου ενζύμου ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) είναι μία μέθοδος με την οποία γίνεται ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων όταν υπάρχει διαθέσιμο το αντίστοιχο αντιγόνο και αντίστροφα, ανίχνευση του αντιγόνου εφ' όσον υπάρχουν διαθέσιμα τα αντίστοιχα αντισώματα. Το αντίσωμα που χρησιμοποιείται είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο (συνήθως υπεροξειδάση ή αλκαλική φωσφατάση) που καταλύει μια αντίδραση χημειοφωταύγειας ή δίνει ένα έγχρωμο ή φθορίζον προϊόν το οποίο μπορεί να μετρηθεί. Η ELISA βρίσκει εφαρμογή ως διαγνωστική δοκιμασία για διάφορες μολύνσεις όπως από τον ιό της ηπατίτιδας Α και C, τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (human immunodeficiency virus- HIV), τον κυτταρομεγαλοϊό CMV, τον ιό της γρίπης τύπου Α και τον ιό Epstein Barr της λοιμώδους μονοπυρήνωσης. Χρησιμοποιείται σε διάφορες παραλλαγές όπως άμεση ELISA, έμμεση ELISA, ELISA τύπου sandwich, συναγωνιστική ELISA, μη συναγωνιστική ELISA και ELISPOT.

Η ραδιοανοσολογική μέθοδος (Radioimmunoassay- RIA) είναι μία ανοσοχημική μέθοδος στην οποία το αντιγόνο του δείγματος που θέλουμε να μετρήσουμε και το ραδιοσημασμένο αντιγόνο ανταγωνίζονται για τη σύνδεση σε μία ορισμένη ποσότητα αντισώματος. Μετρώντας τη ραδιενέργεια είναι δυνατό να προσδιοριστεί η ποσότητα του ραδιοσημασμένου αντιγόνου που έχει δεσμευτεί στο αντίσωμα και επομένως η συγκέντρωση του αντιγόνου στο δείγμα. Η ανοσοραδιομετρική ανάλυση (Immunoradiometric assay- IRMA) είναι μία παραλλαγή της μεθόδου στην οποία χρησιμοποιούνται σε περίσσεια αντισώματα που είναι σημασμένα με ραδιενεργό ιχνηθέτη. Επομένως η ένταση του ραδιενεργού σήματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του προς μέτρηση αντιγόνου.

Ο ανοσοφθορισμός ανιχνεύει αντιγόνα άμεσα ή έμμεσα στη θέση που βρίσκονται χρησιμοποιώντας φθορίζοντα αντισώματα. Πρόκειται για μία μέθοδο που μπορεί να πραγματοποιηθεί σε καλλιεργημένα κύτταρα, σε κυτταρικά εναιωρήματα, καθώς και σε δείγματα ιστών ή σε ολόκληρους οργανισμούς.

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη διαγνωστική τεχνική στην παθολογία των ιστών. Με αυτήν μπορούν να προσδιοριστούν αντιγόνα σε κύτταρα από τομές ιστών και να καταστούν ορατά είτε με την πρόσδεση στο αντίσωμα μιας φθορίζουσας ένωσης ή μιας χρωμογόνου ουσίας.

Τέλος στη μέθοδο της ανοσοχρωματογραφίας, που ονομάζεται αλλιώς και δοκιμασία πλευρικής ροής (lateral flow immunoassay-LFIA) το δείγμα του βιολογικού υγρού που χρησιμοποιείται μεταφέρεται μέσω της διάχυσης με τριχοειδείς δυνάμεις κατά μήκος μιας μεμβράνης συνήθως νιτροκυτταρίνης. Τα υπό προσδιορισμό αντισώματα ή αντιγόνα είναι συζευγμένα με μια έγχρωμη ουσία (νανοσωματίδια χρυσού κόκκινου χρώματος ή μικροσφαιρίδια latex μπλε χρώματος) ή με μία φθορίζουσα ουσία. Στη συνέχεια, το σύμπλεγμα φτάνει στη μεμβράνη, όπου συγκεκριμένα αντισώματα ή αντιγόνα στερεώνονται σε μια καθορισμένη περιοχή, που ονομάζεται γραμμή δοκιμής (test line). Επιπλέον, μια γραμμή ελέγχου (control line) συζεύγνυται περαιτέρω κατά μήκος της μεμβράνης εξασφαλίζοντας την ορθή λειτουργία της τεχνικής. Το θετικό αποτέλεσμα, δηλαδή η ανίχνευση του αντισώματος ή του αντιγόνου στο δείγμα γίνεται αντιληπτή με τον σχηματισμό χρώματος ή φθορισμού στη γραμμή δοκιμής της μεμβράνης. Η ανοσοχρωματογραφία αρχικά βρήκε εφαρμογή στα τεστ κήσεως και έκτοτε χρησιμοποιείται ως διαγνωστική δοκιμασία για διάφορες μολύνσεις όπως από τον ιό της ηπατίτιδας Β και C, τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), τα χλαμύδια, τον β-αιμολυτικού στρεπτόκοκκου ομάδας Α, για καρδιακές παθήσεις, όγκους, φυτοφάρμακα, τοξίνες και μεταλλικά ιόντα. Στις μέρες μας αποτελεί ένα χρήσιμο, φθινό και πρακτικό διαγνωστικό εργαλείο για τον εντοπισμό της παρουσίας αντισωμάτων IgM και IgG έναντι της νόσου του κορωνοϊού 2019 (COVID-19).

## **7.6 Ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του ιού SARS-CoV-2**

Εξαιτίας της πανδημίας του COVID-19 ερευνητές από όλο τον κόσμο έχουν αναπτύξει διάφορες διαγνωστικές μεθόδους, οικονομικές, γρήγορες και αποτελεσματικές, για τον εντοπισμό κυρίως των ασυμπτωματικών φορέων και την παρεμπόδιση της εξάπλωσης της λοίμωξης του ιού SARS-CoV-2. Η μέθοδος ELISA εντοπίζει άτομα που έχουν αναπτύξει αντισώματα IgG/IgM έναντι του ιού SARS-CoV-2 ή ασθενείς που το βιολογικό τους δείγμα περιέχει τα ιικά αντιγόνα. Επίσης όπως προαναφέρθηκε η δοκιμασία πλευρικής ροής με βάση τα νανοσωματίδια χρυσού (AuNP-lateral flow, AuNP- LF) χρησιμοποιείται ευρέως στις μέρες μας για την ανίχνευση του αντισώματος IgM που αναπτύχθηκε σε δείγμα ορού ασθενούς έναντι του ιικού παθογόνου SARS-CoV-2. Το τεστ θεωρείται θετικό όταν εμφανιστούν δύο γραμμές, μία γραμμή για τα αντισώματα της νόσου COVID-19 και μία για τα αντισώματα ελέγχου. Εάν εμφανισθεί μόνο η γραμμή ελέγχου, το αποτέλεσμα ορίζεται ως αρνητικό. Εάν δεν εμφανιστεί η γραμμή ελέγχου, η δοκιμασία θεωρείται άκυρη και πρέπει να επαναληφθεί.

## **7.7 Εφαρμογές των αντισωμάτων για την θεραπεία ανθρωπίνων νοσημάτων**

Τα μονοκλωνικά αντισώματα, εκτός από το σπουδαίο ρόλο τους στη διάγνωση ασθενειών, χρησιμοποιούνται και στην κλινική πράξη ως αποτελεσματικά εργαλεία για την θεραπεία διαφόρων νοσημάτων και ιδιαίτερα ορισμένων κακοηθειών. Είναι γνωστά θεραπευτικά αντισώματα για τον καρκίνο του μαστού, του πνεύμονα, του παχέος εντέρου και της ουροδόχου κύστης. Επίσης εντός του 2020 νέα αντισώματα έλαβαν έγκριση άδειας κυκλοφορίας για την αντιμετώπιση διαφόρων νόσων. Πρόκειται για θεραπευτικά αντισώματα για το μελάνωμα, την οφθαλμική νόσο του θυρεοειδούς, την χρόνια ημικρανία, το πολλαπλό μυέλωμα, τον Τριπλά Αρνητικό καρκίνο του Μαστού (TNBC), την διαταραχή του φάσματος της οπτικής νευρομυελίτιδας (NMOSD), το διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-κυττάρα (DLBCL), τη νόσο που προκαλείται από τον ιό του Έμπολα, το νευροβλάστωμα και τη νόσο COVID-19.



Συμπερασματικά, τα μονοκλωνικά αντισώματα φαίνεται να έχουν σημαντικές διαγνωστικές και θεραπευτικές εφαρμογές, γι' αυτό ερευνητές και κλινικοί ιατροί από όλο τον κόσμο συνεχίζουν να καταβάλλουν προσπάθειες για να βελτιωθούν οι ιδιότητες τους και να διευρυνθεί περισσότερο η χρήση τους.

## Βιβλιογραφικές Αναφορές

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>

Aschermann, S., Lux, A., Baerenwaldt, A., Biburger, M., & Nimmerjahn, F. (2010). The other side of immunoglobulin G: suppressor of inflammation. *Clinical and experimental immunology*, 160(2), 161–167. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.04081.x>

Aydin S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>

Bakema, J. E., & van Egmond, M. (2011). Immunoglobulin A: A next generation of therapeutic antibodies?. *mAbs*, 3(4), 352–361. <https://doi.org/10.4161/mabs.3.4.16092>

Barber, L. D., & Parham, P. (1993). Peptide binding to major histocompatibility complex molecules. *Annual review of cell biology*, 9, 163–206. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.09.110193.001115>

Bednova, O., & Leyton, J. V. (2020). Targeted Molecular Therapeutics for Bladder Cancer-A New Option beyond the Mixed Fortunes of Immune Checkpoint Inhibitors?. *International journal of molecular sciences*, 21(19), 7268. <https://doi.org/10.3390/ijms21197268>

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 research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>

Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S33–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>

Busch, D. H., Fräßle, S. P., Sommermeyer, D., Buchholz, V. R., & Riddell, S. R. (2016). Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy. *Seminars in immunology*, 28(1), 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.02.001>

Budeus, B., Schweigle de Reynoso, S., Przekopowitz, M., Hoffmann, D., Seifert, M., & Küppers, R. (2015). Complexity of the human memory B-cell compartment is determined by the versatility of clonal diversification in germinal centers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(38), E5281–E5289. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511270112>

Busse, C., Strubel, A., & Schnitzler, P. (2008). Combination of native and recombinant cytomegalovirus antigens in a new ELISA for detection of CMV-specific antibodies. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 43(2), 137–141. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.05.011>

Büttel, I. C., Chamberlain, P., Chowers, Y., Ehmann, F., Greinacher, A., Jefferis, R., Kramer, D., Kropshofer, H., Lloyd, P., Lubiniecki, A., Krause, R., Mire-Sluis, A., Platts-Mills, T., Ragheb, J. A., Reipert, B. M., Schellekens, H., Seitz, R., Stas, P., Subramanyam, M., Thorpe, R., ... Schneider, C. K. (2011). Taking immunogenicity assessment of therapeutic proteins to the next level. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, 39(2), 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.01.006>

Carter, L. J., Garner, L. V., Smoot, J. W., Li, Y., Zhou, Q., Saveson, C. J., Sasso, J. M., Gregg, A. C., Soares, D. J., Beskid, T. R., Jervey, S. R., & Liu, C. (2020). Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS central science*, 6(5), 591–605. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00501>

Chen, K., & Cerutti, A. (2011). The function and regulation of immunoglobulin D. *Current opinion in immunology*, 23(3), 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.01.006>

Chen, L., Ruan, F., Liu, M., Zhou, J., Song, W., & Qin, K. (2019). A sandwich ELISA for detecting the hemagglutinin of avian influenza A (H10N8) virus. *Journal of medical virology*, 91(5), 877–880. <https://doi.org/10.1002/jmv.25387>

Chen, S. J., Wang, S. C., & Chen, Y. C. (2021). The Immunotherapy for Colorectal Cancer, Lung Cancer and Pancreatic Cancer. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12836. <https://doi.org/10.3390/ijms222312836>

Cheson, B. D., & Leonard, J. P. (2008). Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *The New England journal of medicine*, 359(6), 613–626. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0708875>

Chiu, M. L., & Gilliland, G. L. (2016). Engineering antibody therapeutics. *Current opinion in structural biology*, 38, 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.07.012>

Chiu, M. L., Goulet, D. R., Teplyakov, A., & Gilliland, G. L. (2019). Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, 8(4), 55. <https://doi.org/10.3390/antib8040055>

Choe, J. Y., Kim, J. W., Kwon, H. H., Hong, H. L., Jung, C. Y., Jeon, C. H., Park, E. J., & Kim, S. K. (2020). Diagnostic performance of immunochromatography assay for rapid detection of IgM and IgG in coronavirus disease 2019. *Journal of medical virology*, 92(11), 2567–2572. <https://doi.org/10.1002/jmv.26060>

Clark M. R. (1997). IgG effector mechanisms. *Chemical immunology*, 65, 88–110.

Cree, B., Bennett, J. L., Kim, H. J., Weinshenker, B. G., Pittock, S. J., Wingerchuk, D. M., Fujihara, K., Paul, F., Cutter, G. R., Marignier, R., Green, A. J., Aktas, O., Hartung, H. P., Lublin, F. D., Drappa, J., Barron, G., Madani, S., Ratchford, J. N., She, D., Cimbora, D., ... N-MOmentum study investigators (2019). Inebilizumab for the treatment of neuromyelitis optica spectrum disorder (N-MOmentum): a double-blind, randomised placebo-controlled phase 2/3 trial. *Lancet (London, England)*, 394(10206), 1352–1363. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31817-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31817-3)

De Jong, F. C., Rutten, V. C., Zuiverloon, T., & Theodorescu, D. (2021). Improving Anti-PD-1/PD-L1 Therapy for Localized Bladder Cancer. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 2800. <https://doi.org/10.3390/ijms22062800>

Douglas, R. S., Kahaly, G. J., Patel, A., Sile, S., Thompson, E., Perdok, R., Fleming, J. C., Fowler, B. T., Marcocci, C., Marinò, M., Antonelli, A., Dailey, R., Harris, G. J., Eckstein, A., Schiffman, J., Tang, R., Nelson, C., Salvi, M., Wester, S., Sherman, J. W., ... Smith, T. J. (2020). Teprotumumab for the Treatment of Active Thyroid Eye Disease. *The New England journal of medicine*, 382(4), 341–352. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910434>

Ducancel, F., & Muller, B. H. (2012). Molecular engineering of antibodies for therapeutic and diagnostic purposes. *mAbs*, 4(4), 445–457. <https://doi.org/10.4161/mabs.20776>

Duermeyer, W., Wielaard, F., & van der Veen, J. (1979). A new principle for the detection of specific IgM antibodies applied in an ELISA for hepatitis A. *Journal of medical virology*, 4(1), 25–32. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890040104>

Duvall, M. R., & Fiorini, R. N. (2014). Different approaches for obtaining antibodies from human B cells. *Current drug discovery technologies*, 11(1), 41–47. <https://doi.org/10.2174/1570163811666140121154649>

Dunkelberger, J. R., & Song, W. C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell research*, 20(1), 34–50. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.139>

Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871–874. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-x](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-x)

El Karak, F., Gh Haddad, F., Eid, R., Al Ghor, M., El Rassy, E., Ahmadiéh, N., Choullamy, T., Halim, N. A., Tfayli, A., Farhat, F., Kattan, J., Nasr, F., Ghosn, M., & Assi, H. I. (2019). Lung cancer and immunotherapy: a real-life experience from second line and beyond. *Future oncology (London, England)*, 15(26), 3025–3032. <https://doi.org/10.2217/fon-2019-0144>

Germain R. N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nature reviews. Immunology*, 2(5), 309–322. <https://doi.org/10.1038/nri798>

Goldenberg, D. M., & Sharkey, R. M. (2019). Antibody-drug conjugates targeting TROP-2 and incorporating SN-38: A case study of anti-TROP-2 sacituzumab govitecan. *mAbs*, *11*(6), 987–995. <https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1632115>

Gould, H. J., Sutton, B. J., Bevil, A. J., Bevil, R. L., McCloskey, N., Coker, H. A., Fear, D., & Smurthwaite, L. (2003). The biology of IGE and the basis of allergic disease. *Annual review of immunology*, *21*, 579–628. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141103>

Grange, R. D., Thompson, J. P., & Lambert, D. G. (2014). Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. *British journal of anaesthesia*, *112*(2), 213–216. <https://doi.org/10.1093/bja/aet293>

Grote, M., Haas, A. K., Klein, C., Schaefer, W., & Brinkmann, U. (2012). Bispecific antibody derivatives based on full-length IgG formats. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *901*, 247–263. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-931-0\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-931-0_16)

Helms, L. R., & Wetzel, R. (1995). Destabilizing loop swaps in the CDRs of an immunoglobulin VL domain. *Protein science : a publication of the Protein Society*, *4*(10), 2073–2081. <https://doi.org/10.1002/pro.5560041012>

Honegger A. (2008). Engineering antibodies for stability and efficient folding. *Handbook of experimental pharmacology*, (181), 47–68. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-73259-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-540-73259-4_3)

Hoogenboom H. R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature biotechnology*, *23*(9), 1105–1116. <https://doi.org/10.1038/nbt1126>

Hsiao, W. W., Le, T. N., Pham, D. M., Ko, H. H., Chang, H. C., Lee, C. C., Sharma, N., Lee, C. K., & Chiang, W. H. (2021). Recent Advances in Novel Lateral Flow Technologies for Detection of COVID-19. *Biosensors*, *11*(9), 295. <https://doi.org/10.3390/bios11090295>

Hudis C. A. (2007). Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *The New England journal of medicine*, *357*(1), 39–51. <https://doi.org/10.1056/NEJMra043186>

Im, K., Mareninov, S., Diaz, M., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1897, 299–311. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5\\_26](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26)

Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology*, 16(4), 343–353. <https://doi.org/10.1038/ni.3123>

Ji, N., & Forsthuber, T. G. (2016). ELISPOT Techniques. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1304, 63–71. [https://doi.org/10.1007/7651\\_2014\\_111](https://doi.org/10.1007/7651_2014_111)

Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., & Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 321(6069), 522–525. <https://doi.org/10.1038/321522a0>

Kaplon, H., & Reichert, J. M. (2021). Antibodies to watch in 2021. *mAbs*, 13(1), 1860476. <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1860476>

Kayser, V., Chennamsetty, N., Voynov, V., Forrer, K., Helk, B., & Trout, B. L. (2011). Glycosylation influences on the aggregation propensity of therapeutic monoclonal antibodies. *Biotechnology journal*, 6(1), 38–44. <https://doi.org/10.1002/biot.201000091>

Kim, J., Adhikari, M., Dhamane, S., Hagström, A. E., Kourentzi, K., Strych, U., Willson, R. C., & Conrad, J. C. (2015). Detection of viruses by counting single fluorescent genetically biotinylated reporter immunophage using a lateral flow assay. *ACS applied materials & interfaces*, 7(4), 2891–2898. <https://doi.org/10.1021/am5082556>

Kim, D. Y., Kandalaf, H., Ding, W., Ryan, S., van Faassen, H., Hiram, T., Foote, S. J., MacKenzie, R., & Tanha, J. (2012). Disulfide linkage engineering for improving biophysical properties of human VH domains. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, 25(10), 581–589. <https://doi.org/10.1093/protein/gzs055>

Kishton, R. J., Sukumar, M., & Restifo, N. P. (2017). Metabolic Regulation of T Cell Longevity and Function in Tumor Immunotherapy. *Cell metabolism*, 26(1), 94–109. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.06.016>

Kontermann, R. E., & Brinkmann, U. (2015). Bispecific antibodies. *Drug discovery today*, 20(7), 838–847. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.02.008>

Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>

Kubota, T., Niwa, R., Satoh, M., Akinaga, S., Shitara, K., & Hanai, N. (2009). Engineered therapeutic antibodies with improved effector functions. *Cancer science*, 100(9), 1566–1572. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01222.x>

Kucuksezer, U. C., Aktas Cetin, E., Esen, F., Tahrali, I., Akdeniz, N., Gelmez, M. Y., & Deniz, G. (2021). The Role of Natural Killer Cells in Autoimmune Diseases. *Frontiers in immunology*, 12, 622306. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.622306>

Kummitha, C. M., Mayle, K. M., Christman, M. A., 2nd, Deosarkar, S. P., Schwartz, A. L., McCall, K. D., Kohn, L. D., Malgor, R., & Goetz, D. J. (2010). A sandwich ELISA for the detection of Wnt5a. *Journal of immunological methods*, 352(1-2), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.11.005>

Lipton, R. B., Goadsby, P. J., Smith, J., Schaeffler, B. A., Biondi, D. M., Hirman, J., Pederson, S., Allan, B., & Cady, R. (2020). Efficacy and safety of eptinezumab in patients with chronic migraine: PROMISE-2. *Neurology*, 94(13), e1365–e1377. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000009169>

Lonial, S., Lee, H. C., Badros, A., Trudel, S., Nooka, A. K., Chari, A., Abdallah, A. O., Callander, N., Lendvai, N., Sborov, D., Suvannasankha, A., Weisel, K., Karlin, L., Libby, E., Arnulf, B., Facon, T., Hulin, C., Kortüm, K. M., Rodríguez-Otero, P., Usmani, S. Z., ... Cohen, A. D. (2020). Belantamab mafodotin for relapsed or refractory multiple myeloma (DREAMM-2): a two-arm, randomised, open-label, phase 2 study. *The Lancet Oncology*, 21(2), 207–221. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30788-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30788-0)



Major, M., & Law, M. (2019). Detection of Antibodies to HCV E1E2 by Lectin-Capture ELISA. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 1911*, 421–432. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8976-8\\_28](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8976-8_28)

Majumder, J., & Minko, T. (2021). Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19. *The AAPS journal*, 23(1), 14. <https://doi.org/10.1208/s12248-020-00532-2>

Makabe K. (2020). Molecular basis of flexible peptide recognition by an antibody. *Journal of biochemistry*, 167(4), 343–345. <https://doi.org/10.1093/jb/mvaa017>

Margolin, K., Ernstoff, M. S., Hamid, O., Lawrence, D., McDermott, D., Puzanov, I., Wolchok, J. D., Clark, J. I., Sznol, M., Logan, T. F., Richards, J., Michener, T., Balogh, A., Heller, K. N., & Hodi, F. S. (2012). Ipilimumab in patients with melanoma and brain metastases: an open-label, phase 2 trial. *The Lancet. Oncology*, 13(5), 459–465. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70090-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70090-6)

Marty, M., & Pivot, X. (2008). The potential of anti-vascular endothelial growth factor therapy in metastatic breast cancer: clinical experience with anti-angiogenic agents, focusing on bevacizumab. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 44(7), 912–920. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.01.005>

Matsui, T., & Amagai, M. (2015). Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *International immunology*, 27(6), 269–280. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv013>

Mauri, C., & Bosma, A. (2012). Immune regulatory function of B cells. *Annual review of immunology*, 30, 221–241. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074934>

Miles L. E. (1975). Properties, variants, and applications of the immunoradiometric assay method. *La Ricerca in clinica e in laboratorio*, 5(1), 59–72. <https://doi.org/10.1007/BF02910016>

Mitchell, J. L., Doyle, C. M., Land, M. V., & Devine, P. L. (1998). Comparison of commercial ELISA for detection of antibodies to the viral capsid antigen (VCA) of Epstein-Barr virus (EBV). *Disease markers*, *13*(4), 245–249. <https://doi.org/10.1155/1998/245906>

Miyanabe, K., Akiba, H., Kuroda, D., Nakakido, M., Kusano-Arai, O., Iwanari, H., Hamakubo, T., Caaveiro, J., & Tsumoto, K. (2018). Intramolecular H-bonds govern the recognition of a flexible peptide by an antibody. *Journal of biochemistry*, *164*(1), 65–76. <https://doi.org/10.1093/jb/mvy032>

Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A., & Oi, V. T. (1984). Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(21), 6851–6855. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.21.6851>

Nelson, P. N., Reynolds, G. M., Waldron, E. E., Ward, E., Giannopoulos, K., & Murray, P. G. (2000). Monoclonal antibodies. *Molecular pathology : MP*, *53*(3), 111–117. <https://doi.org/10.1136/mp.53.3.111>

Nessa, M. U., Rahman, M. A., & Kabir, Y. (2020). Plant-Produced Monoclonal Antibody as Immunotherapy for Cancer. *BioMed research international*, *2020*, 3038564. <https://doi.org/10.1155/2020/3038564>

Nothelfer, K., Sansonetti, P. J., & Phalipon, A. (2015). Pathogen manipulation of B cells: the best defence is a good offence. *Nature reviews. Microbiology*, *13*(3), 173–184. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3415>

Nuccetelli, M., Pieri, M., Grelli, S., Ciotti, M., Miano, R., Andreoni, M., & Bernardini, S. (2020). SARS-CoV-2 infection serology: a useful tool to overcome lockdown?. *Cell death discovery*, *6*, 38. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0275-2>

Pantazes, R. J., & Maranas, C. D. (2010). OptCDR: a general computational method for the design of antibody complementarity determining regions for targeted epitope binding. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, *23*(11), 849–858. <https://doi.org/10.1093/protein/gzq061>

Papadea, C., & Check, I. J. (1989). Human immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses: biochemical, genetic, and clinical aspects. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 27(1), 27–58. <https://doi.org/10.3109/10408368909106589>

Peeters, M., Price, T., & Van Laethem, J. L. (2009). Anti-epidermal growth factor receptor monotherapy in the treatment of metastatic colorectal cancer: where are we today?. *The oncologist*, 14(1), 29–39. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2008-0167>

Pepinsky, R. B., Silvian, L., Berkowitz, S. A., Farrington, G., Lugovskoy, A., Walus, L., Eldredge, J., Capili, A., Mi, S., Graff, C., & Garber, E. (2010). Improving the solubility of anti-LINGO-1 monoclonal antibody Li33 by isotype switching and targeted mutagenesis. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 19(5), 954–966. <https://doi.org/10.1002/pro.372>

Perchiacca, J. M., Lee, C. C., & Tessier, P. M. (2014). Optimal charged mutations in the complementarity-determining regions that prevent domain antibody aggregation are dependent on the antibody scaffold. *Protein engineering, design & selection : PEDS*, 27(2), 29–39. <https://doi.org/10.1093/protein/gzt058>

Petkova, S. B., Akilesh, S., Sproule, T. J., Christianson, G. J., Al Khabbaz, H., Brown, A. C., Presta, L. G., Meng, Y. G., & Roopenian, D. C. (2006). Enhanced half-life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease. *International immunology*, 18(12), 1759–1769. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxl110>

Piccart-Gebhart, M. J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R., Jackisch, C., Cameron, D., Dowsett, M., Barrios, C. H., Steger, G., Huang, C. S., Andersson, M., Inbar, M., Lichinitser, M., Láng, I., Nitz, U., ... Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine*, 353(16), 1659–1672. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052306>

Raghavan, M., Bonagura, V. R., Morrison, S. L., & Bjorkman, P. J. (1995). Analysis of the pH dependence of the neonatal Fc receptor/immunoglobulin G interaction using antibody and receptor variants. *Biochemistry*, 34(45), 14649–14657. <https://doi.org/10.1021/bi00045a005>

Raghava, G. P., & Agrewala, J. N. (1994). Method for determining the affinity of monoclonal antibody using non-competitive ELISA: a computer program. *Journal of immunoassay*, 15(2), 115–128. <https://doi.org/10.1080/15321819408013942>

Raghunathan, G., Smart, J., Williams, J., & Almagro, J. C. (2012). Antigen-binding site anatomy and somatic mutations in antibodies that recognize different types of antigens. *Journal of molecular recognition : JMR*, 25(3), 103–113. <https://doi.org/10.1002/jmr.2158>

Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D., & Castillo Ferrer, C. (2016). Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*, 148(2), 125–139. <https://doi.org/10.1111/imm.12597>

Roitt I, Brostoff J, Male D. (2000). Κυτταρομεσολαβητικές, ανοσοποιητικές αντιδράσεις. Στο Λ. Μαργαρίτης & Σ. Κουσουλάκος (Επιμ. στα ελληνικά), *Ανοσολογία* (σσ. 121- 137). Αθήνα: Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε.

Roitt I, Brostoff J, Male D. (2000). Τα αντισώματα και οι υποδοχείς τους. Στο Λ. Μαργαρίτης & Σ. Κουσουλάκος (Επιμ. στα ελληνικά), *Ανοσολογία* (σσ. 71- 81). Αθήνα: Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε.

Roitt I, Brostoff J, Male D. (2000). Ανοσολογικές τεχνικές. Στο Λ. Μαργαρίτης & Σ. Κουσουλάκος (Επιμ. στα ελληνικά), *Ανοσολογία* (σσ. 381- 395). Αθήνα: Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε.

Salles, G., Duell, J., González Barca, E., Tournilhac, O., Jurczak, W., Liberati, A. M., Nagy, Z., Obr, A., Gaidano, G., André, M., Kalakonda, N., Dreyling, M., Weirather, J., Dirnberger-Hertweck, M., Ambarkhane, S., Fingerle-Rowson, G., & Maddocks, K. (2020). Tafasitamab plus lenalidomide in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (L-MIND): a multicentre, prospective, single-arm, phase 2 study. *The Lancet. Oncology*, 21(7), 978–988. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30225-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30225-4)

Schjesvold, F. H., Richardson, P. G., Facon, T., Alegre, A., Spencer, A., Jurczynszyn, A., Sunami, K., Frenzel, L., Min, C. K., Guillonneau, S., Lin, P. L., Le-Guenneec, S., Campana, F., van de Velde, H., Bensfia, S., & Bringhen, S. (2021). Isatuximab plus pomalidomide and dexamethasone in elderly patients with relapsed/refractory multiple myeloma: ICARIA-MM subgroup analysis. *Haematologica*, *106*(4), 1182–1187. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.253450>

Shuptrine, C. W., Surana, R., & Weiner, L. M. (2012). Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Seminars in cancer biology*, *22*(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.12.009>

Sievers, E. L., & Senter, P. D. (2013). Antibody-drug conjugates in cancer therapy. *Annual review of medicine*, *64*, 15–29. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050311-201823>

Sette, A., & Crotty, S. (2021). Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, *184*(4), 861–880. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.007>

Slota, M., Lim, J. B., Dang, Y., & Disis, M. L. (2011). ELISpot for measuring human immune responses to vaccines. *Expert review of vaccines*, *10*(3), 299–306. <https://doi.org/10.1586/erv.10.169>

Smith G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (New York, N.Y.)*, *228*(4705), 1315–1317. <https://doi.org/10.1126/science.4001944>

Song, J., & Deng, T. (2020). The Adipocyte and Adaptive Immunity. *Frontiers in immunology*, *11*, 593058. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.593058>

Strohl W. R. (2009). Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. *Current opinion in biotechnology*, *20*(6), 685–691. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.10.011>

Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>

Takahama Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nature reviews. Immunology*, 6(2), 127–135. <https://doi.org/10.1038/nri1781>

Taube, J. M., Akturk, G., Angelo, M., Engle, E. L., Gnjjatic, S., Greenbaum, S., Greenwald, N. F., Hedvat, C. V., Hollmann, T. J., Juco, J., Parra, E. R., Rebelatto, M. C., Rimm, D. L., Rodriguez-Canales, J., Schalper, K. A., Stack, E. C., Ferreira, C. S., Korski, K., Lako, A., Rodig, S. J., ... Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) Pathology Task Force. (2020). The Society for Immunotherapy of Cancer statement on best practices for multiplex immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) staining and validation. *Journal for immunotherapy of cancer*, 8(1), e000155. <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000155>

Tawbi, H. A., Forsyth, P. A., Algazi, A., Hamid, O., Hodi, F. S., Moschos, S. J., Khushalani, N. I., Lewis, K., Lao, C. D., Postow, M. A., Atkins, M. B., Ernstoff, M. S., Reardon, D. A., Puzanov, I., Kudchadkar, R. R., Thomas, R. P., Tarhini, A., Pavlick, A. C., Jiang, J., Avila, A., ... Margolin, K. (2018). Combined Nivolumab and Ipilimumab in Melanoma Metastatic to the Brain. *The New England journal of medicine*, 379(8), 722–730. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1805453>

Tiller, K. E., & Tessier, P. M. (2015). Advances in Antibody Design. *Annual review of biomedical engineering*, 17, 191–216. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071114-040733>

Ting, J. P., & Trowsdale, J. (2002). Genetic control of MHC class II expression. *Cell*, 109 Suppl, S21–S33. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00696-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00696-7)

Valenzuela, N. M., & Schaub, S. (2018). The Biology of IgG Subclasses and Their Clinical Relevance to Transplantation. *Transplantation*, 102(1S Suppl 1), S7–S13. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001816>

Vander, A., Sherman, J. & Luciano, D. (2001). Αμυντικοί μηχανισμοί του οργανισμού. Στο Ν. Γελαδάς & Μ. Τσακόπουλος (Επιμ. στα ελληνικά), Φυσιολογία του Ανθρώπου Δεύτερος Τόμος (σσ. 904- 935). Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη.

Wibro, P. P., Helvig, S. Y., & Moein Moghimi, S. (2014). The Role of Complement in Antibody Therapy for Infectious Diseases. *Microbiology spectrum*, 2(2), 10.1128/microbiolspec.AID-0015-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0015-2014>

Wootla, B., Denic, A., & Rodriguez, M. (2014). Polyclonal and monoclonal antibodies in clinic. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1060, 79–110. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-586-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-586-6_5)

Yalow, R. S., & Berson, S. A. (1959). Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*, 184 (Suppl 21), 1648–1649. <https://doi.org/10.1038/1841648b0>

Yamamura, T., Kleiter, I., Fujihara, K., Palace, J., Greenberg, B., Zakrzewska-Pniewska, B., Patti, F., Tsai, C. P., Saiz, A., Yamazaki, H., Kawata, Y., Wright, P., & De Seze, J. (2019). Trial of Satralizumab in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *The New England journal of medicine*, 381(22), 2114–2124. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1901747>

Yeom, J. S., Lee, J. B., Ryu, S. H., Kang, H. J., Kim, S., Kim, Y. A., Ahn, S. Y., Cha, J. E., & Park, J. W. (2006). Evaluation of a new third-generation ELISA for the detection of HIV infection. *Annals of clinical and laboratory science*, 36(1), 73–78.

Zhang, N., & Bevan, M. J. (2011). CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*, 35(2), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.010>

Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W. E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annual review of immunology*, 28, 445–489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212>

Zimmerman, L. M., Vogel, L. A., & Bowden, R. M. (2010). Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *The Journal of experimental biology*, 213(5), 661–671. <https://doi.org/10.1242/jeb.038315>

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν. 1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.