

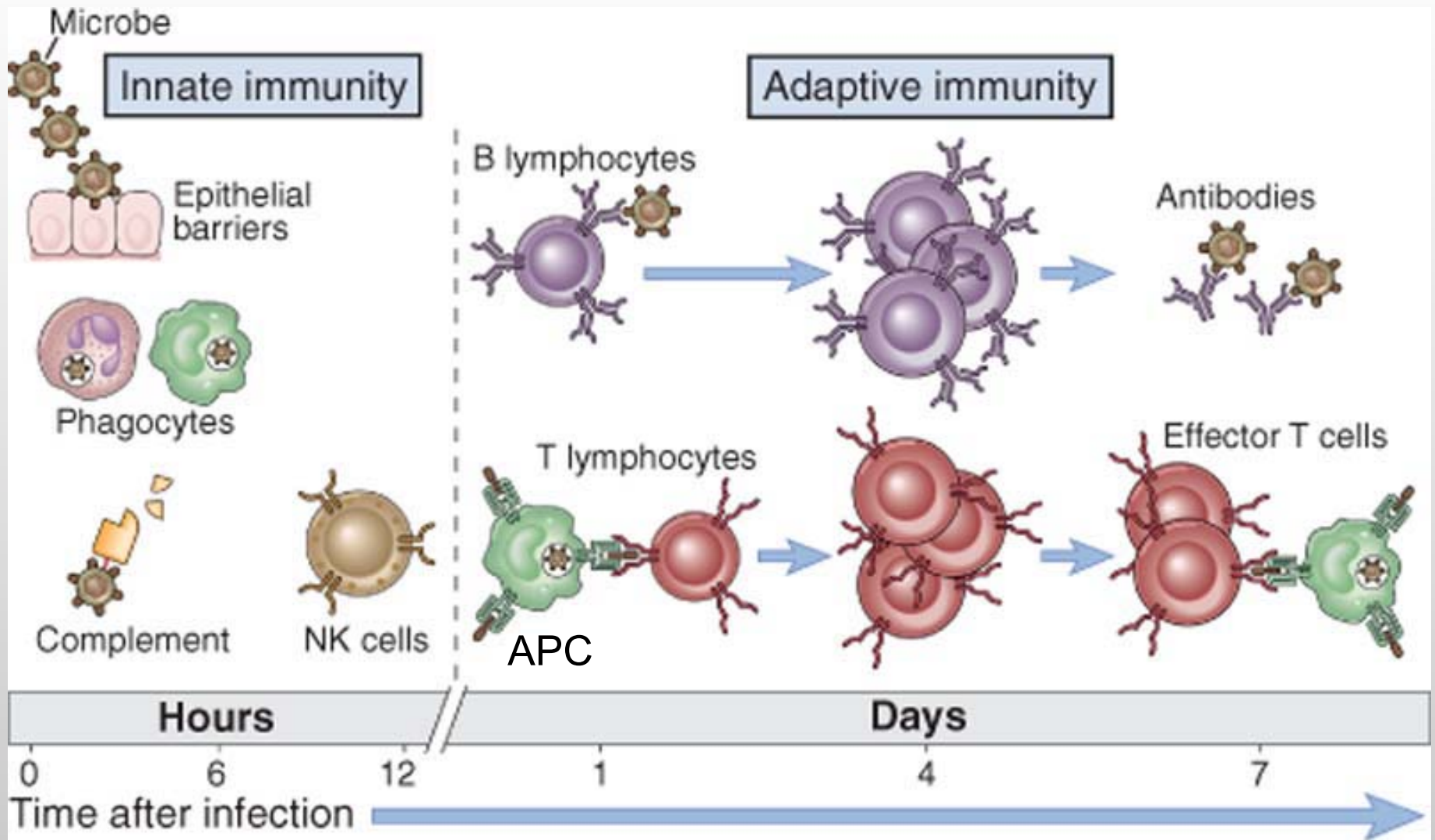
**Dr Ruben F Iacono**







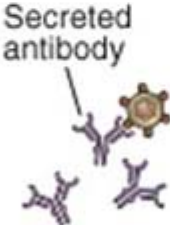
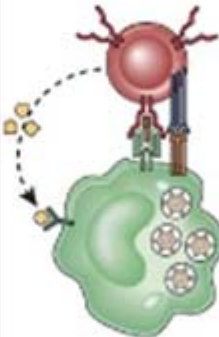

**rubeniac@ffyb.uba.ar**

**Laboratorio de Inmunoendocrinología  
Instituto de Estudios de Inmunidad Humoral  
IDEHU Prof Dr Ricardo A Margni  
CONICET-UBA  
Cátedra de Inmunología,  
Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Universidad de Buenos Aires**



# Génesis de anticuerpos generalidades



	Humoral immunity	Cell-mediated immunity	
Microbe	 Extracellular microbes	 Phagocytosed microbes in macrophage	 Intracellular microbes (e.g., viruses) replicating within infected cell
Responding lymphocytes	 B lymphocyte	 Helper T lymphocyte	 Cytotoxic T lymphocyte
Effector mechanism	 Secreted antibody		
Transferred by	Serum (antibodies)	Cells (T lymphocytes)	Cells (T lymphocytes)
Functions	Block infections and eliminate extracellular microbes	Activate macrophages to kill phagocytosed microbes	Kill infected cells and eliminate reservoirs of infection

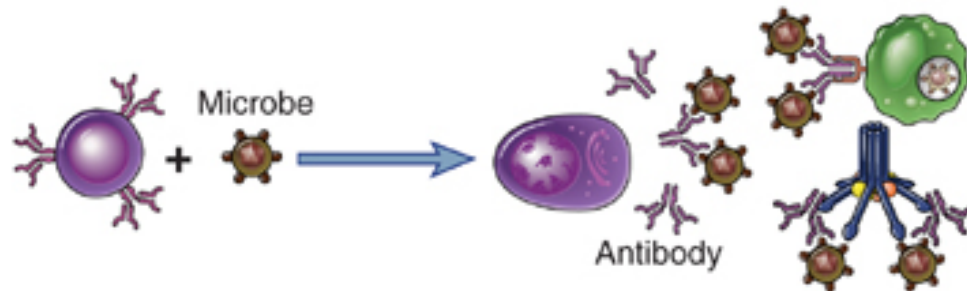


# Antígeno

Sustancias ajenas que producen respuestas inmunitarias específicas o son reconocidas por linfocitos o anticuerpos

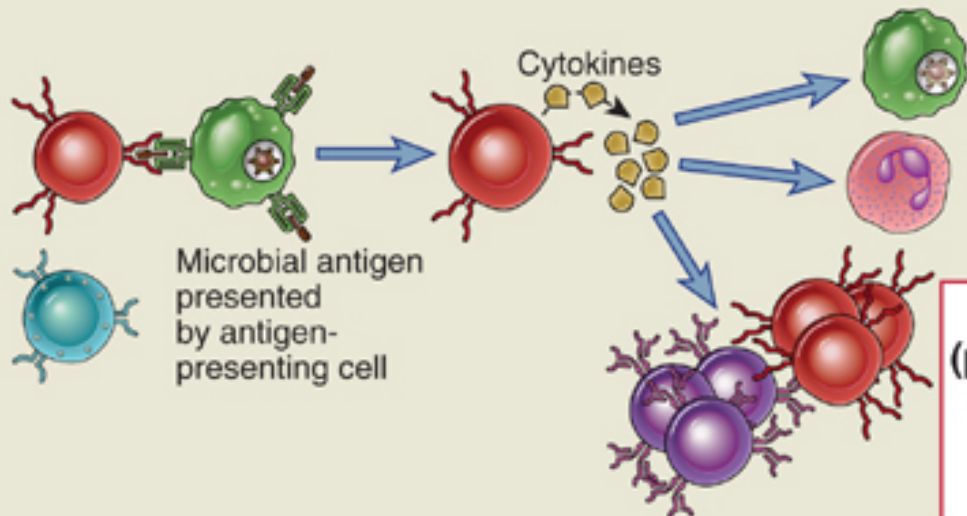


B  
lymphocyte



**Neutralization  
of microbe,  
phagocytosis,  
complement  
activation**

Helper T  
lymphocyte

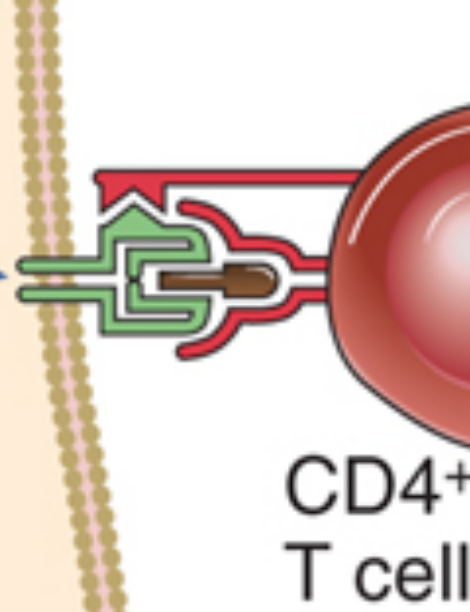
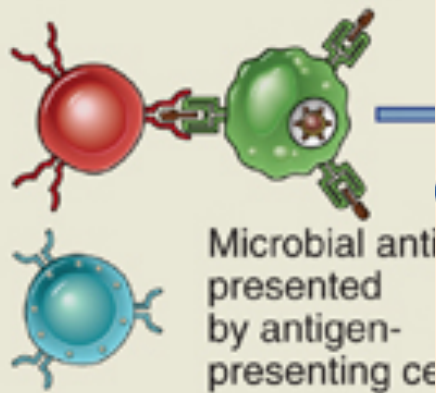


**Activation of  
macrophages**

**Inflammation**

**Activation  
(proliferation and  
differentiation)  
of T and B  
lymphocytes**

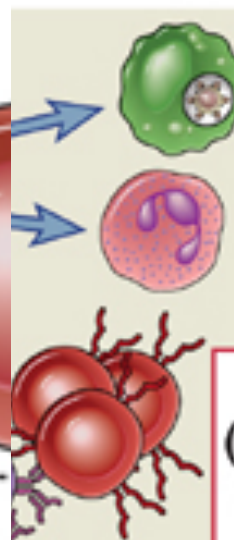
Helper T lymphocyte



Activation of  
macrophages

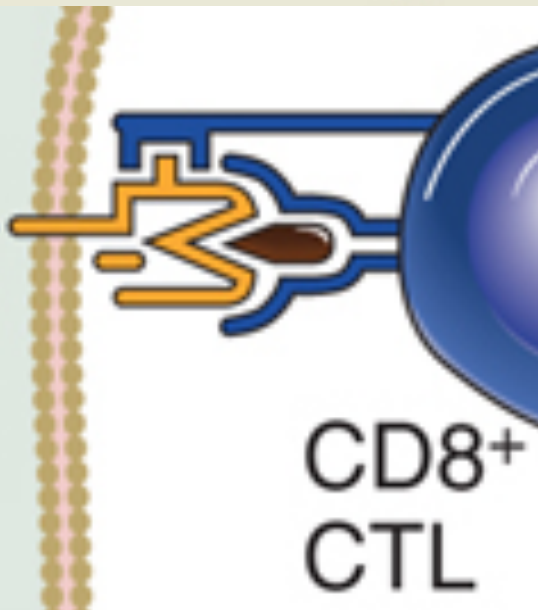
Inflammation

Activation  
(proliferation and  
differentiation)  
of T and B  
lymphocytes

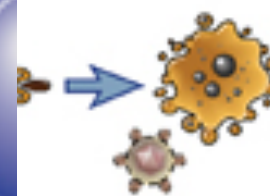


Cytotoxic T lymphocyte  
(CTL)

Infected cell expressing  
microbial antigen

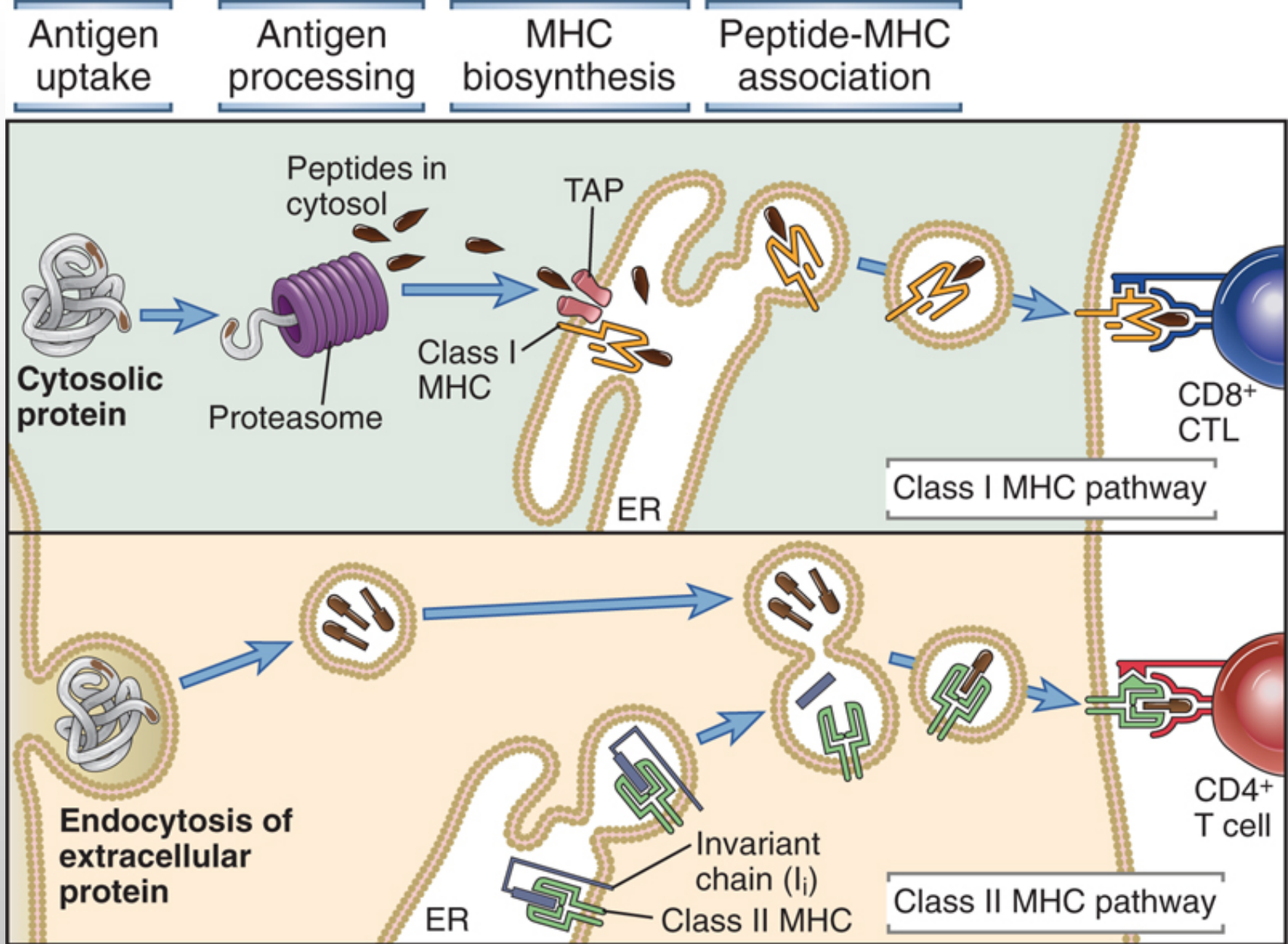


Killing of  
infected cell



Presenta

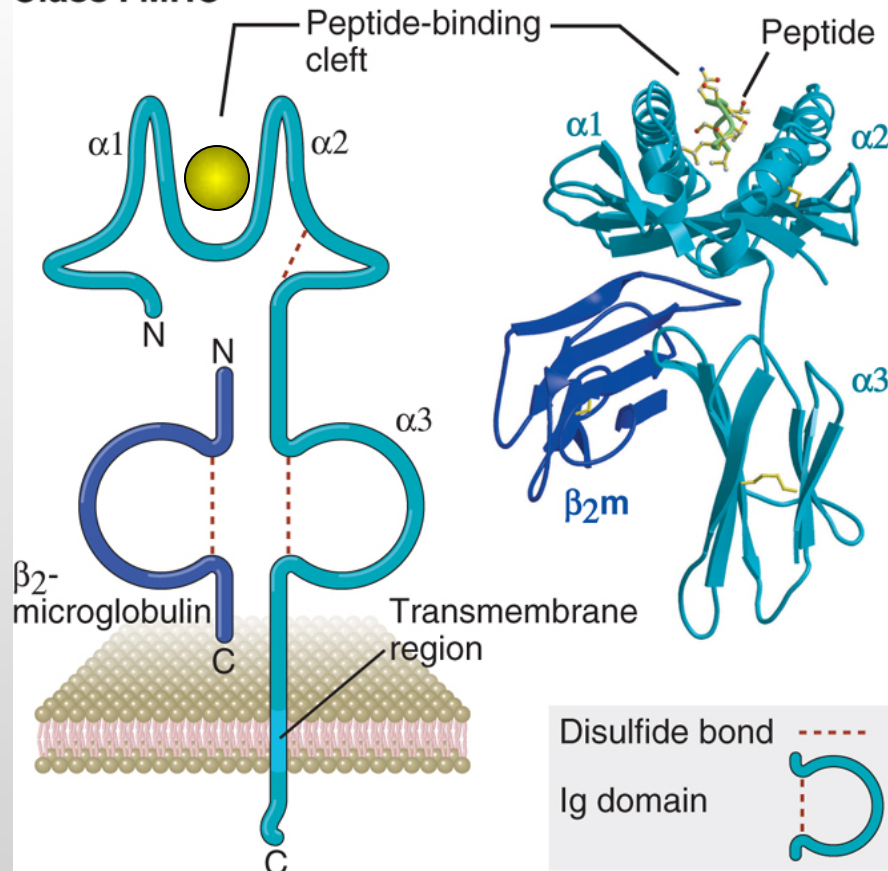
énica



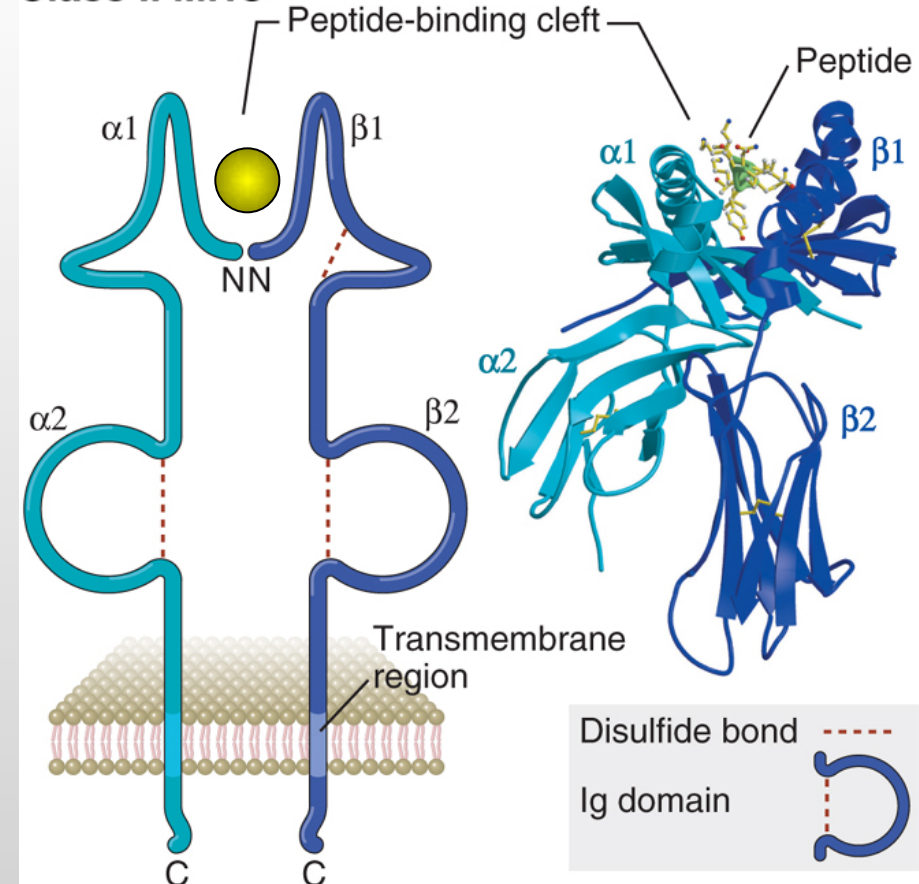
## Presentación antigénica



### Class I MHC



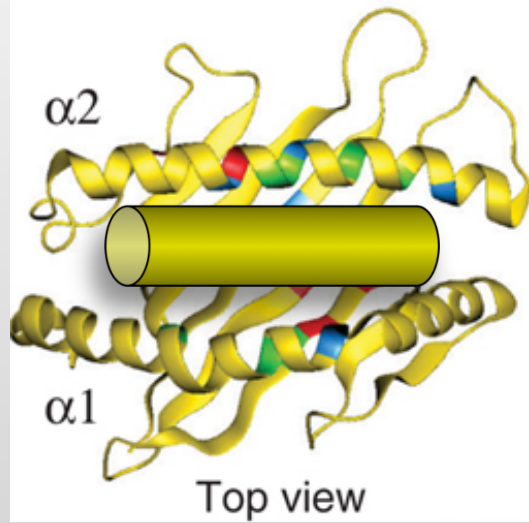
### Class II MHC



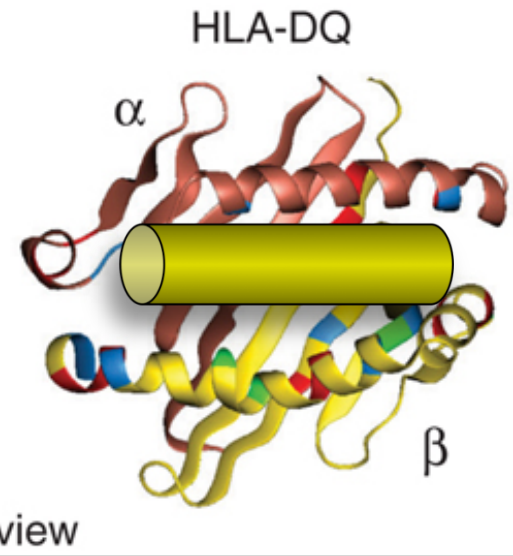
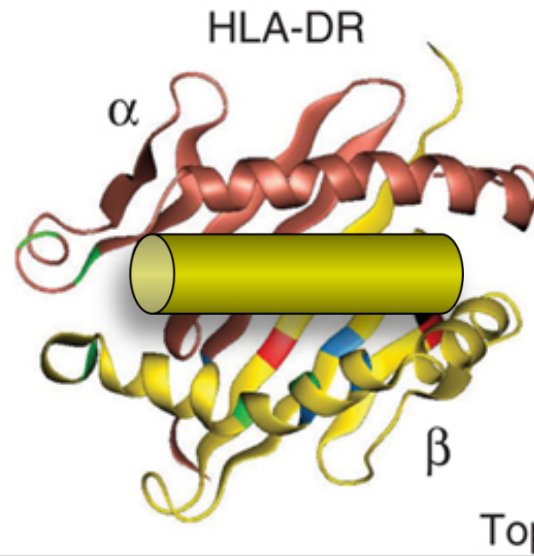
# Moléculas de Histocompatibilidad

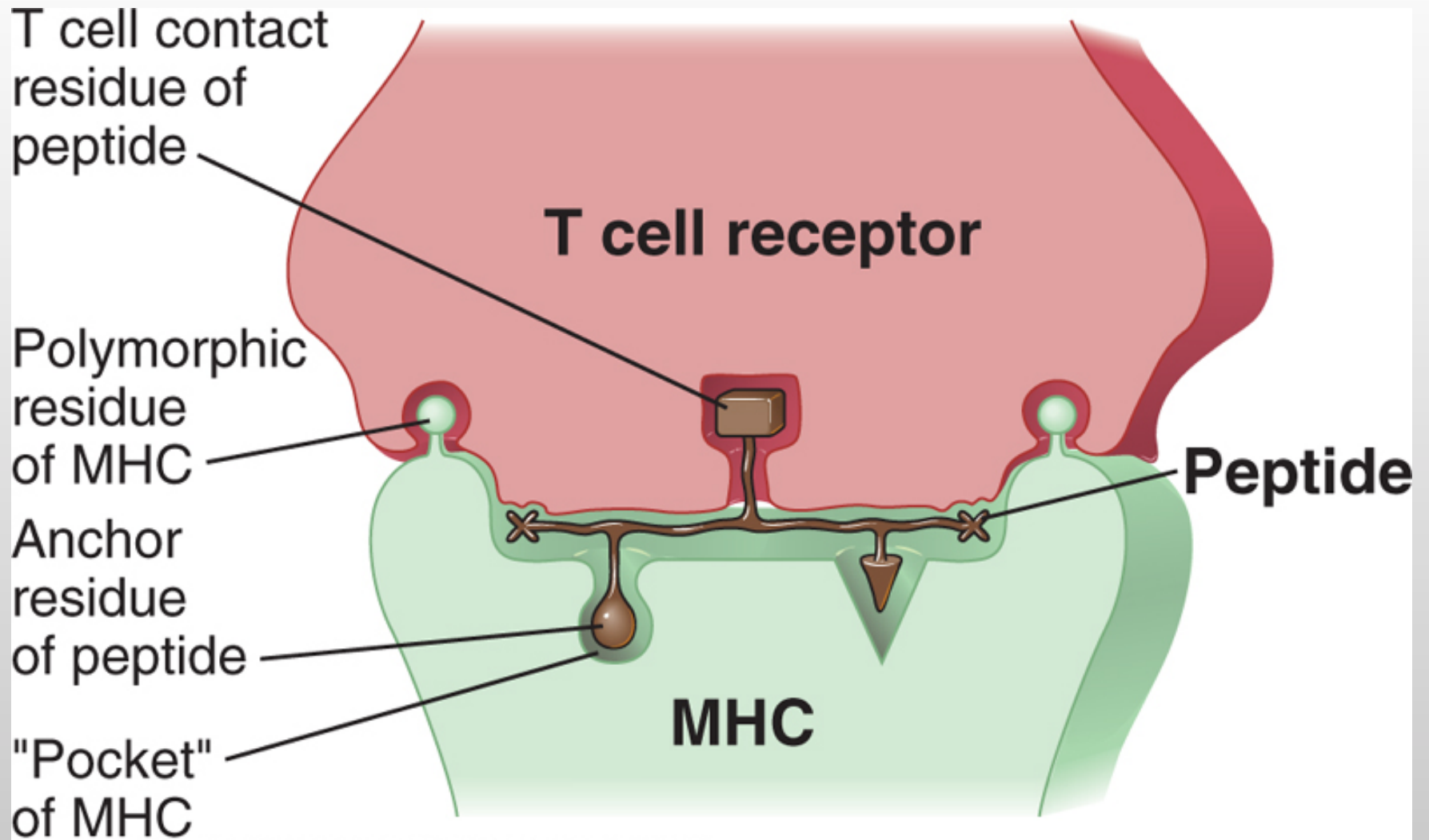


## HLA class I



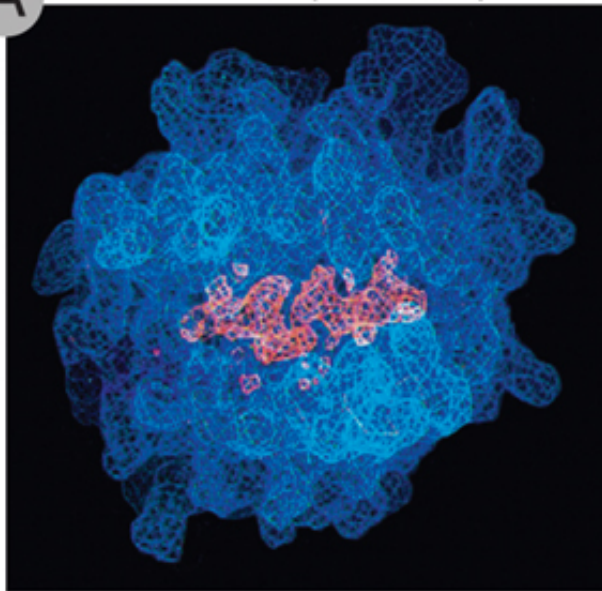
## HLA class II



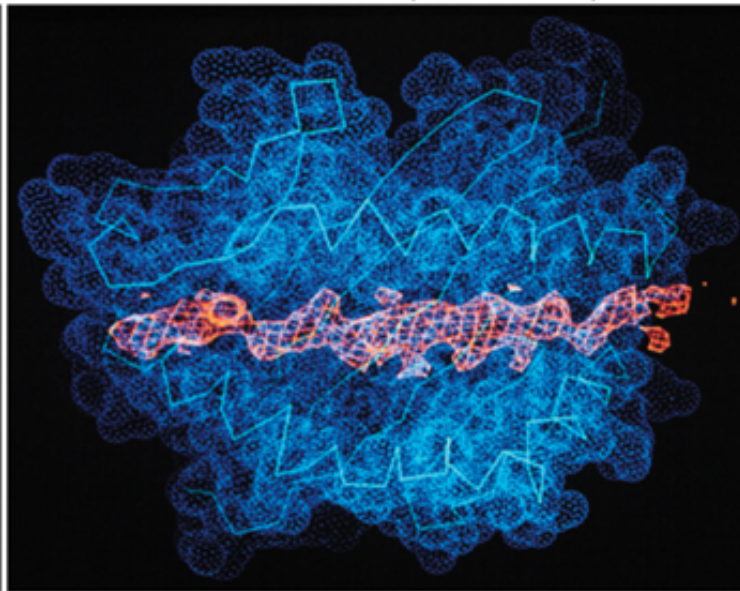


A

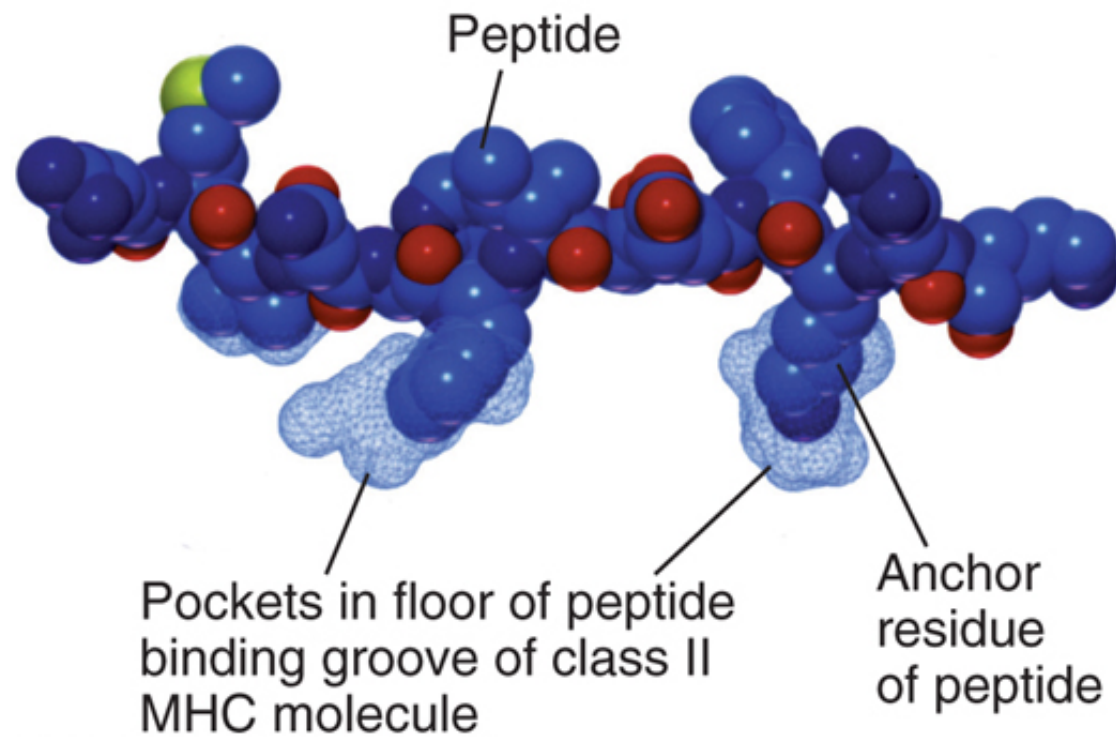
HLA-A2 (Class I)



HLA-DR1 (Class II)



B



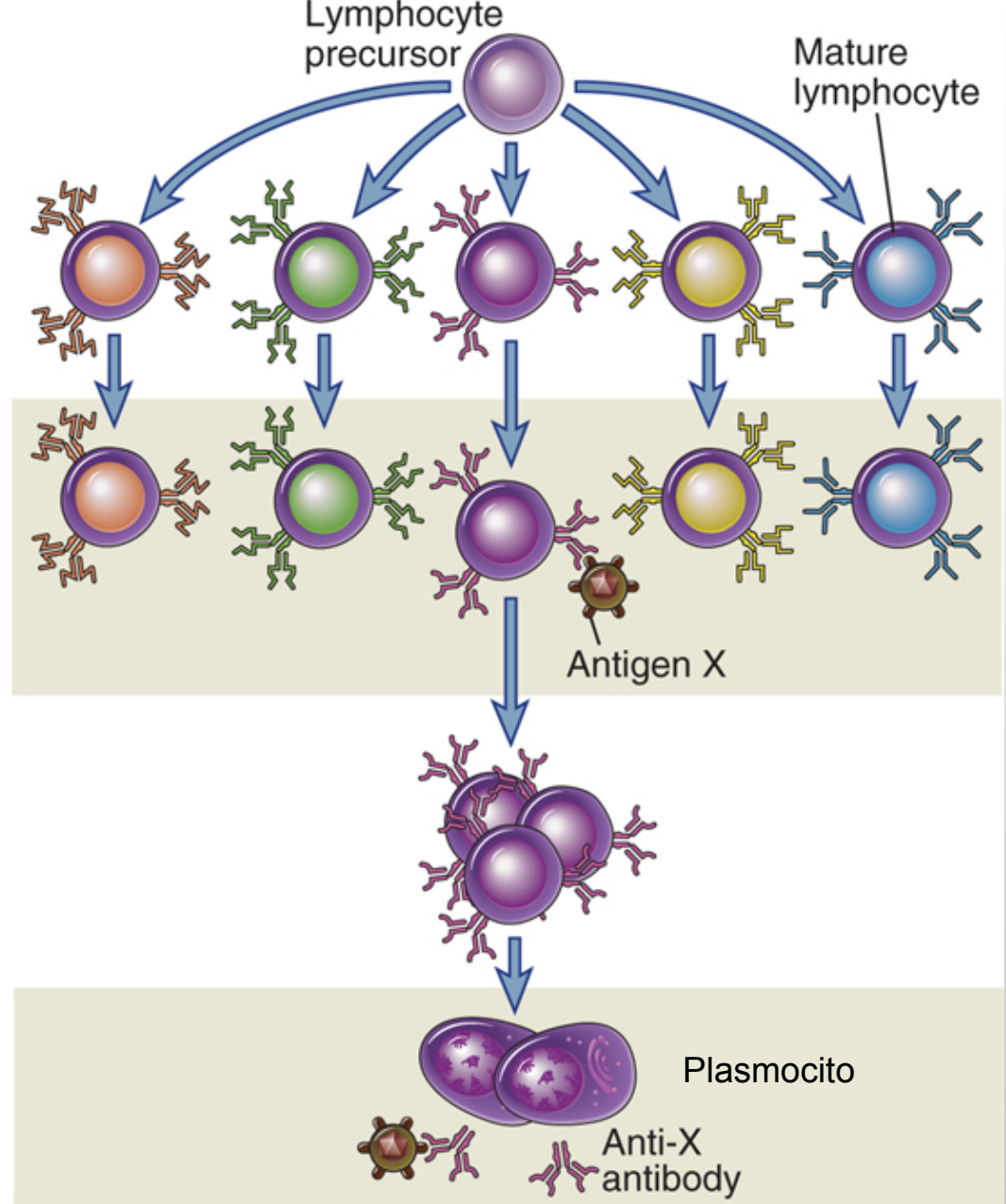


Lymphocyte clones mature in generative lymphoid organs, in the absence of antigens

Clones of mature lymphocytes specific for diverse antigens enter lymphoid tissues

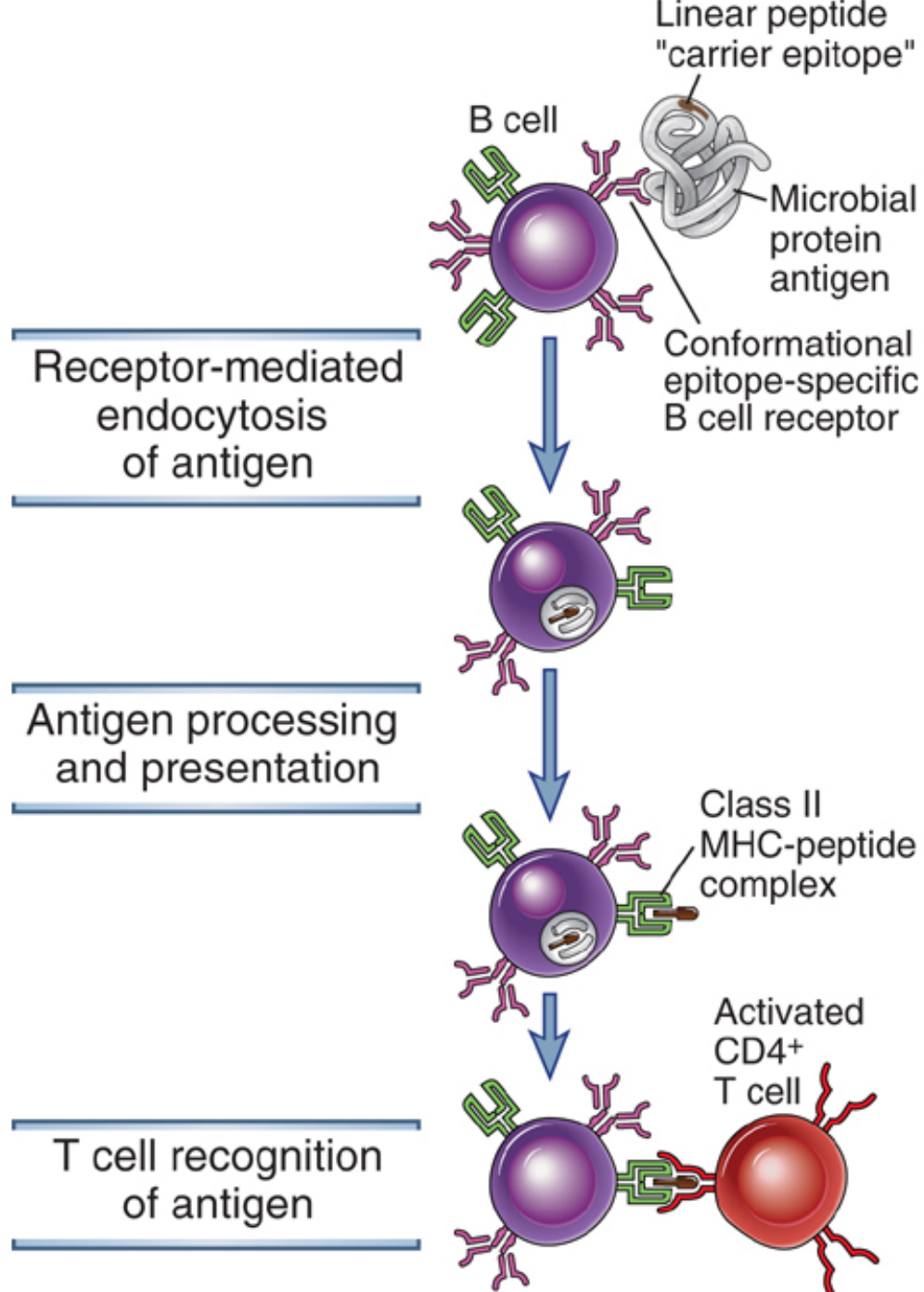
Antigen-specific clones are activated ("selected") by antigens

Antigen-specific immune responses occur

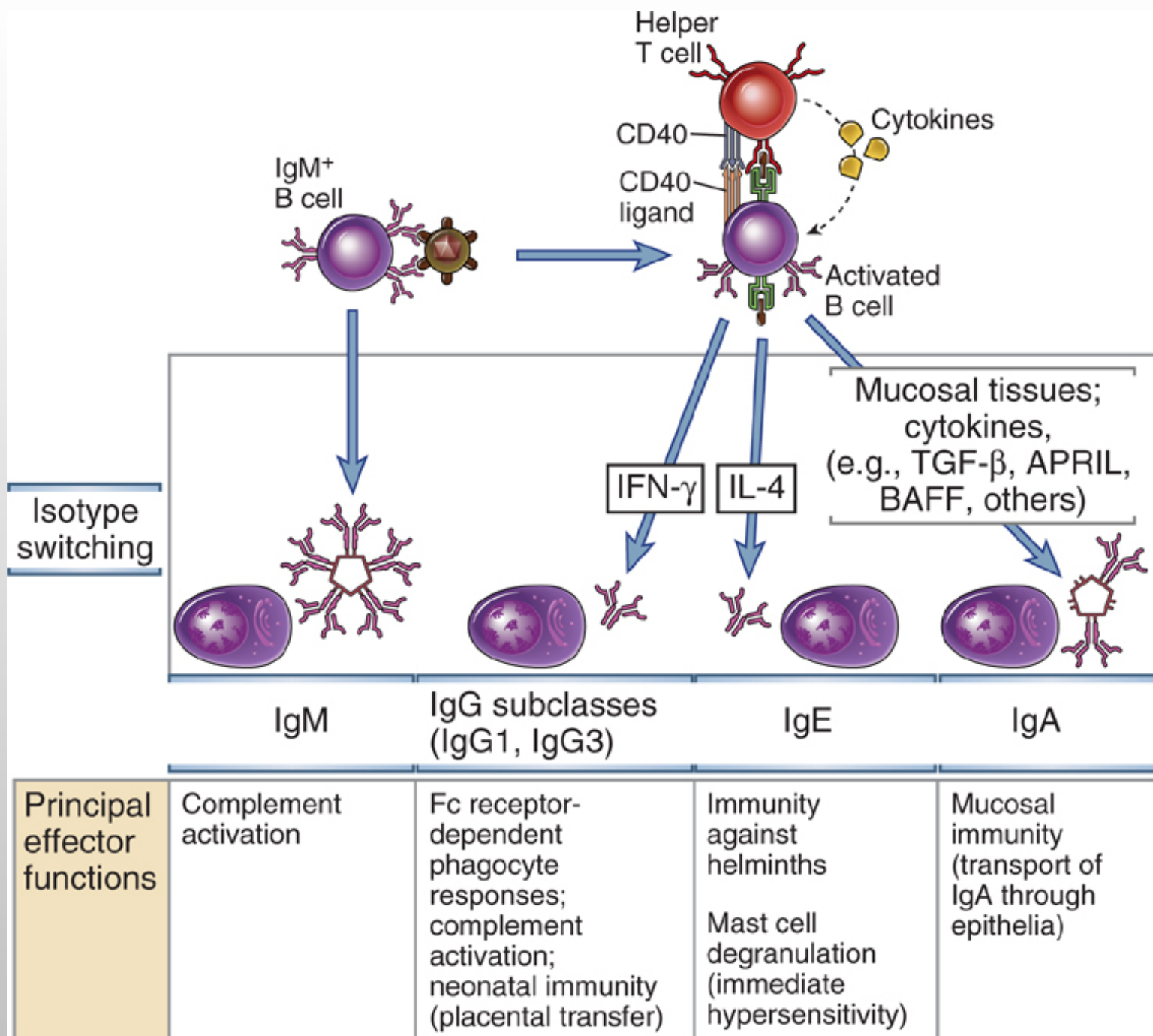


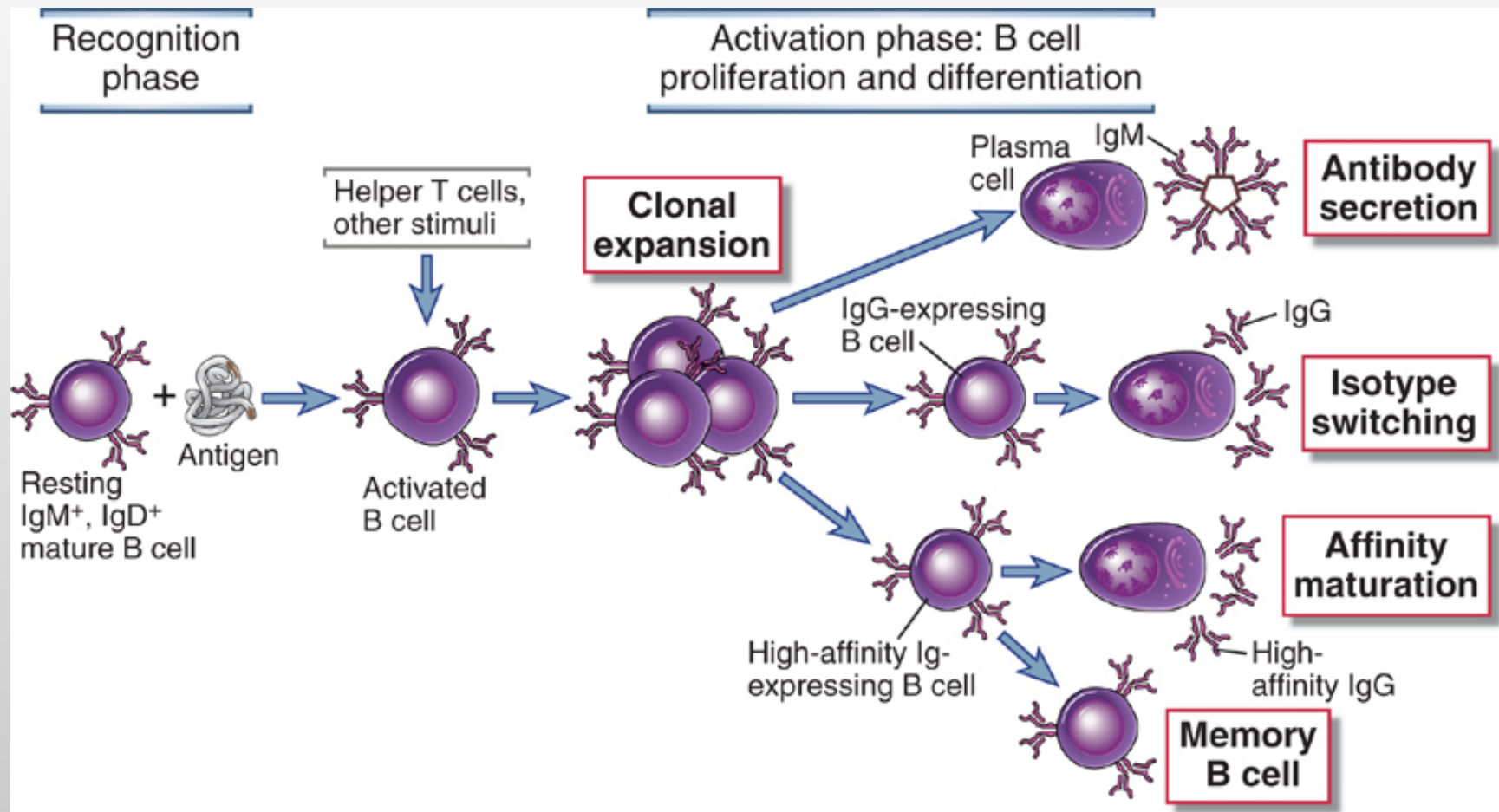
# Selección clonal

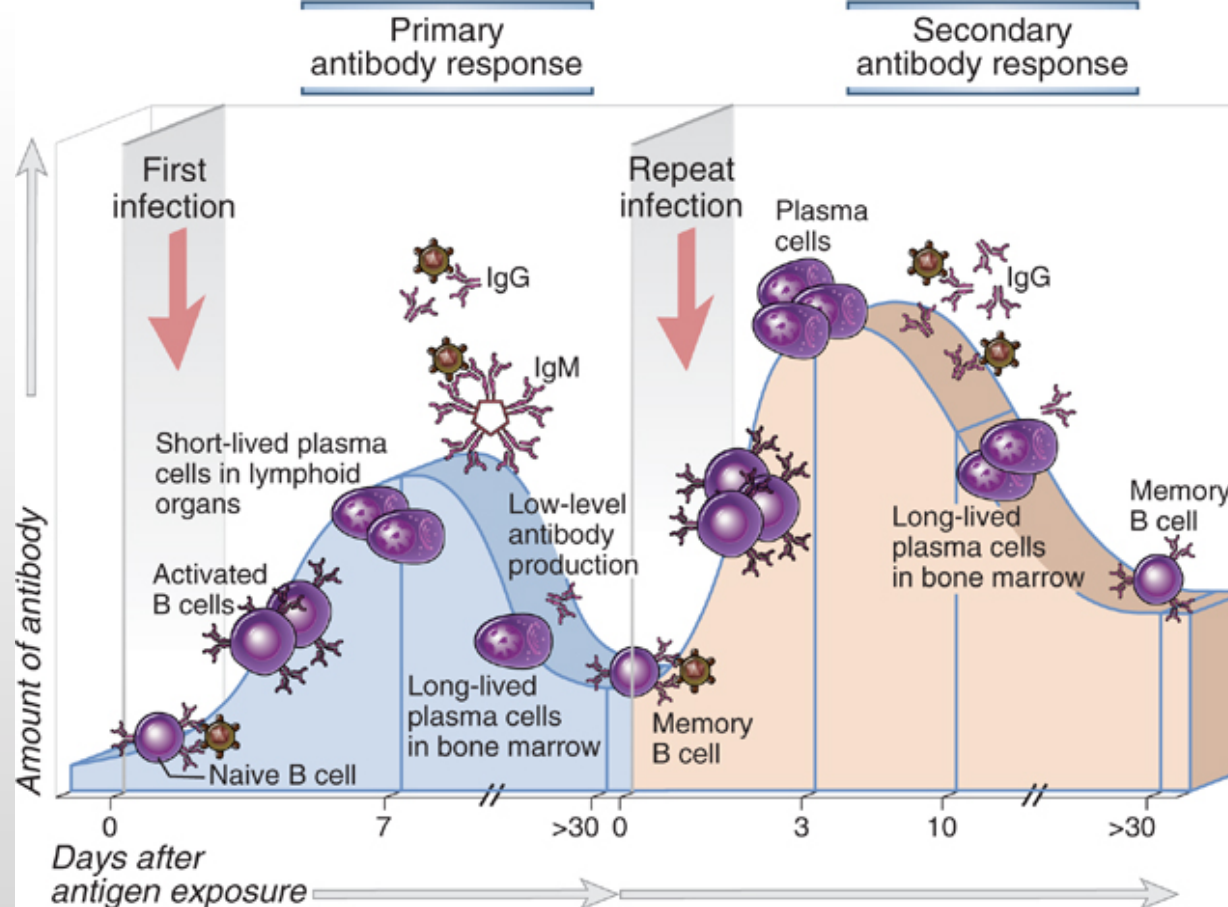








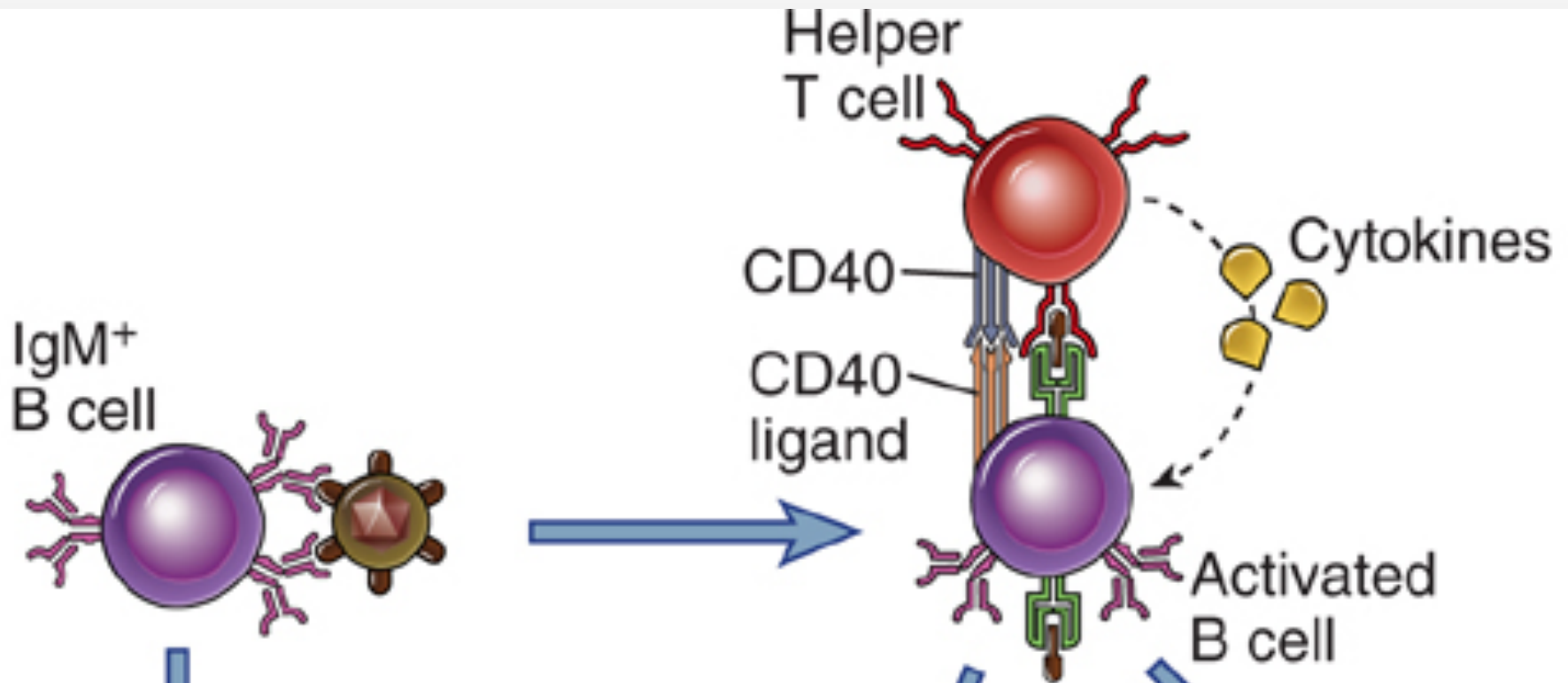




Feature	Primary response	Secondary response
Peak response	Smaller	Larger
Antibody isotype	Usually IgM > IgG	Relative increase in IgG and, under certain situations, in IgA or IgE
Antibody affinity	Lower average affinity, more variable	Higher average affinity (affinity maturation)
Induced by	All immunogens	Only protein antigens

Respuesta inmune-humoral

# Factores que afectan la inmunogenicidad de una proteína



**Presencia de epitopes B candidatos**



**Presencia de epitopes T que promuevan activación Thelper**

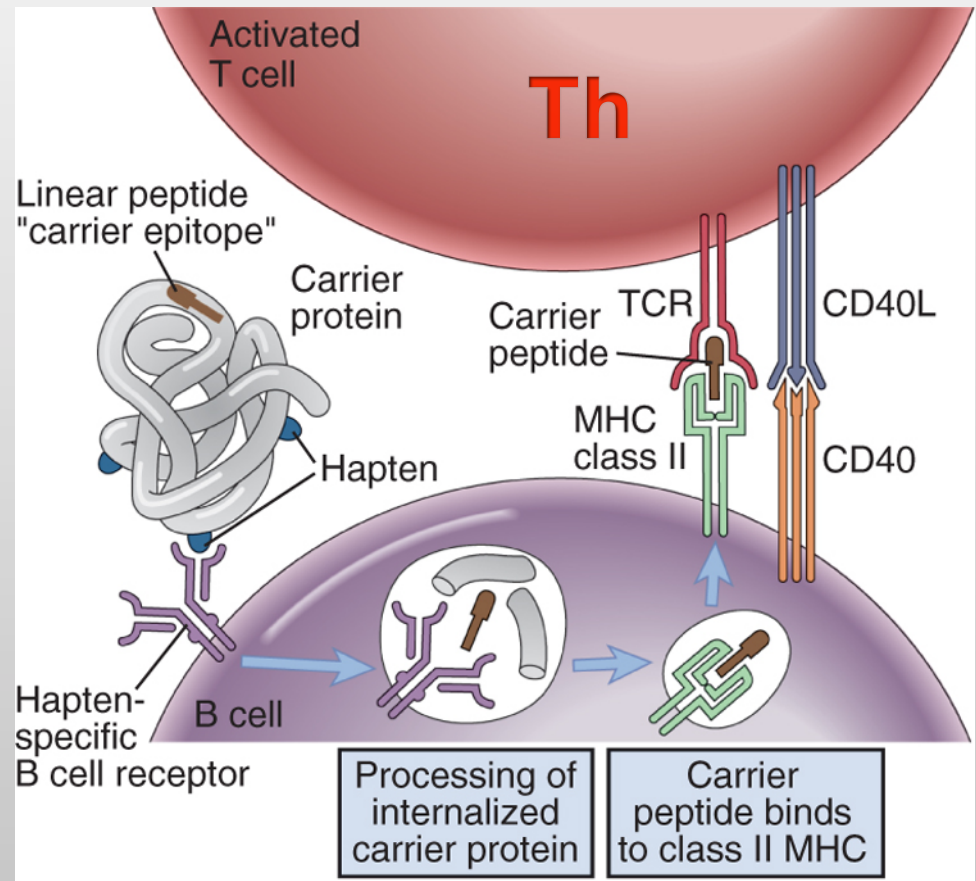


# Factores que afectan la inmunogenicidad de una proteína

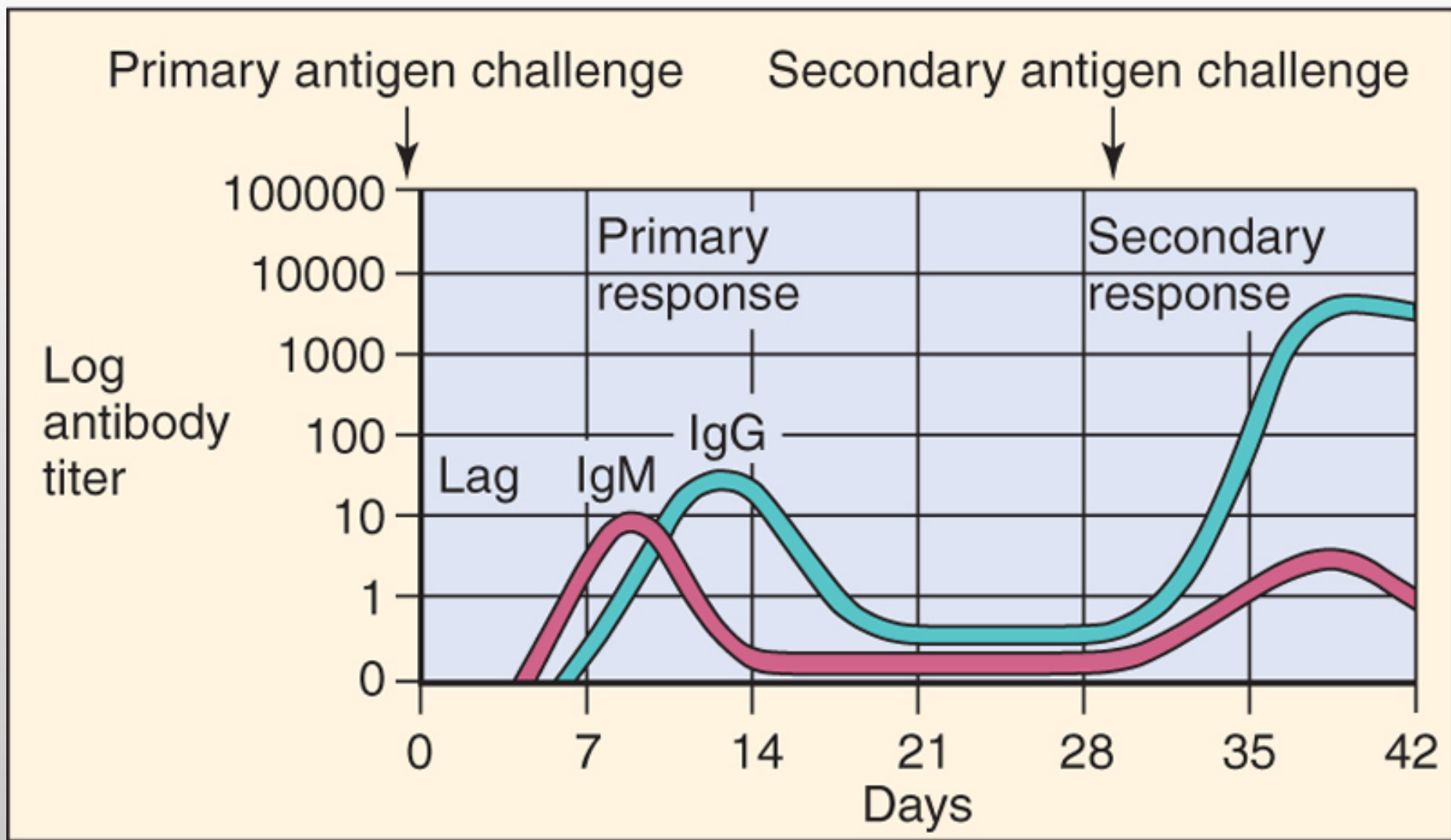
## Estructura química del Ag

- ✓ 1 epitope: unión a LB
- ✓ 1 sitio reconocido por HLA II y TCR
- ✓ Degradable

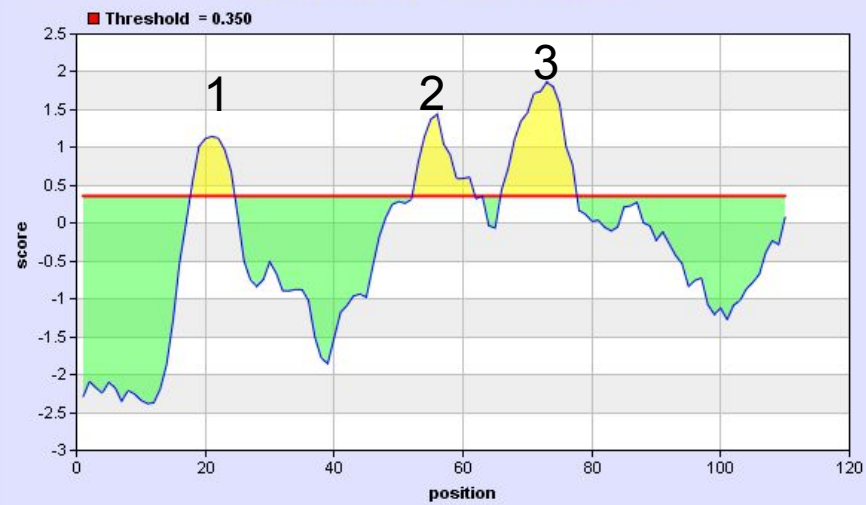
3000-5000 Da



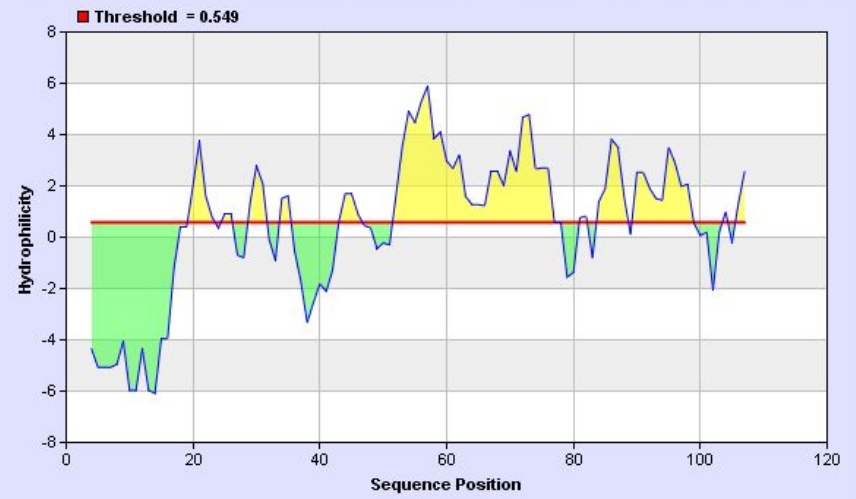




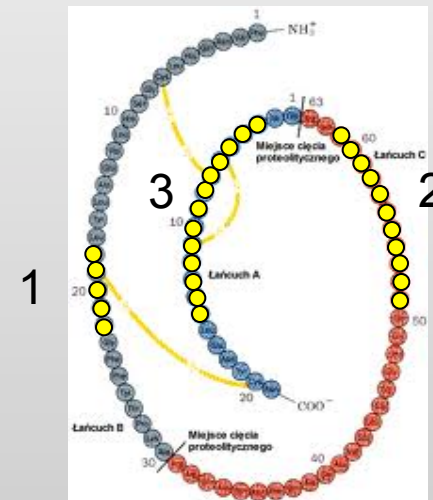
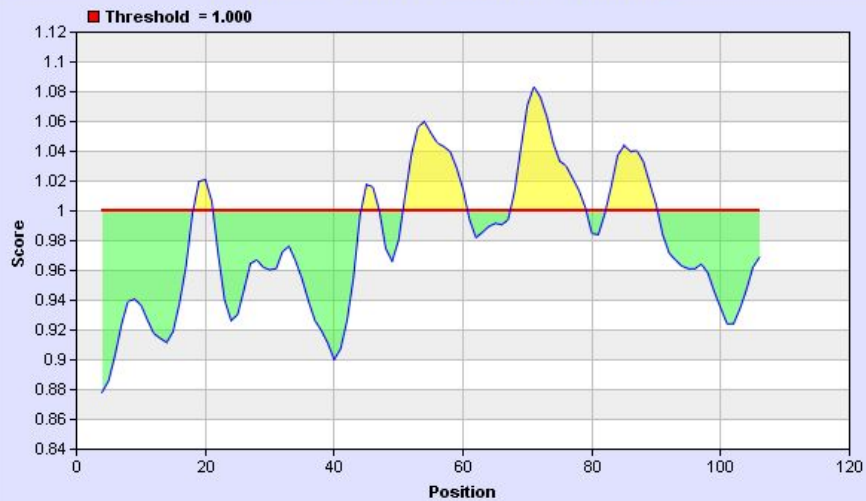
**Bepipred Linear Epitope Prediction**



**Parker Hydrophilicity Prediction**



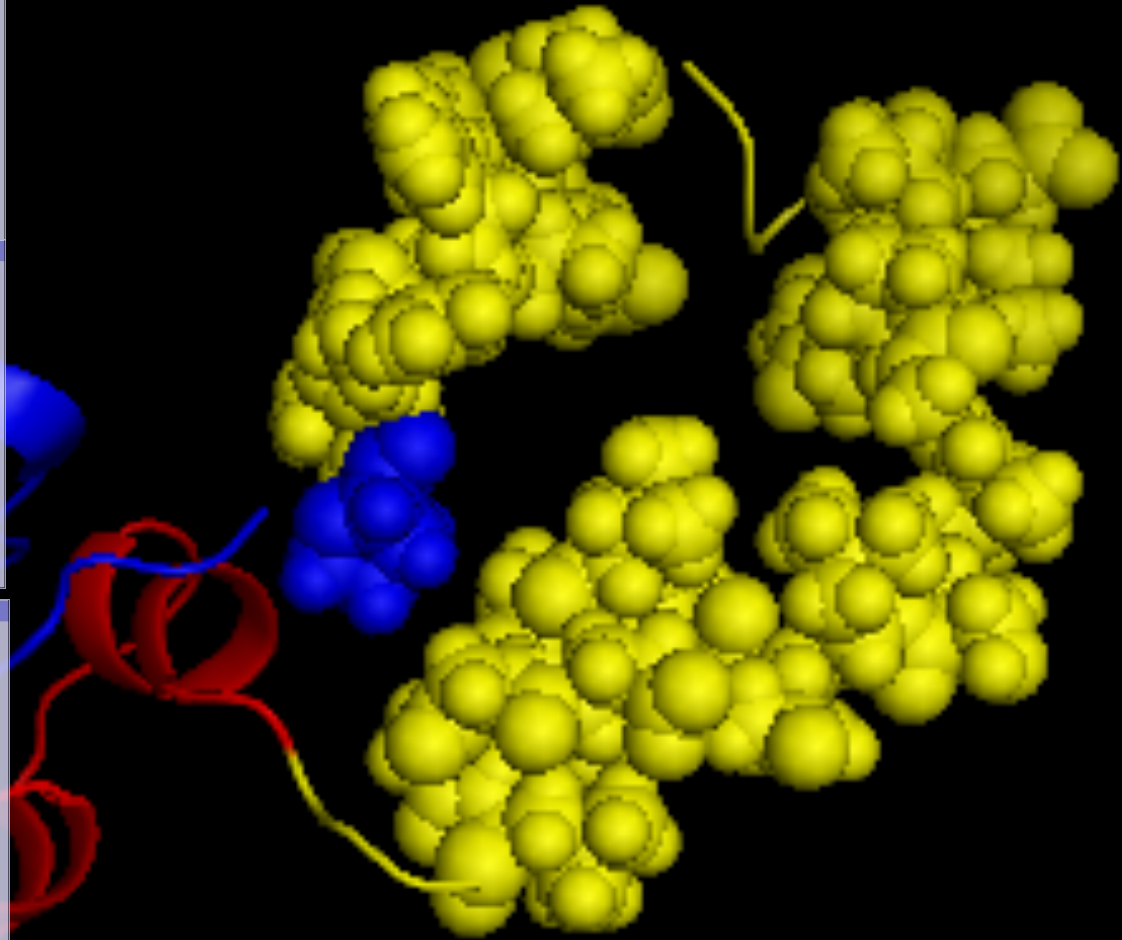
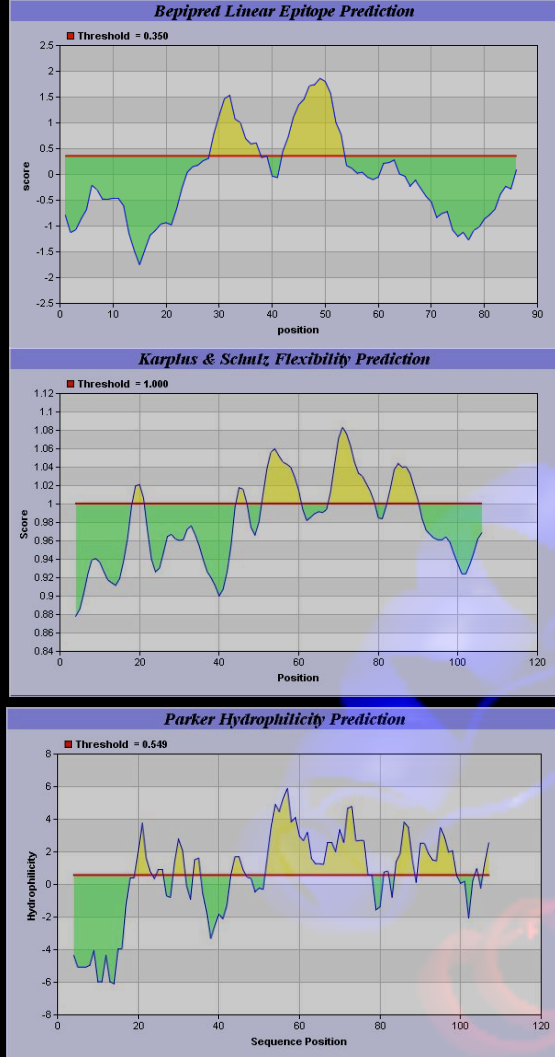
**Karplus & Schultz Flexibility Prediction**



MALWMRLLPLLALLALWGPDAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR  
EAEDLQVGQVELGG GPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSI~~C~~SLYQLENYCN



**Proinsulina humana**



# Epitopes lineales

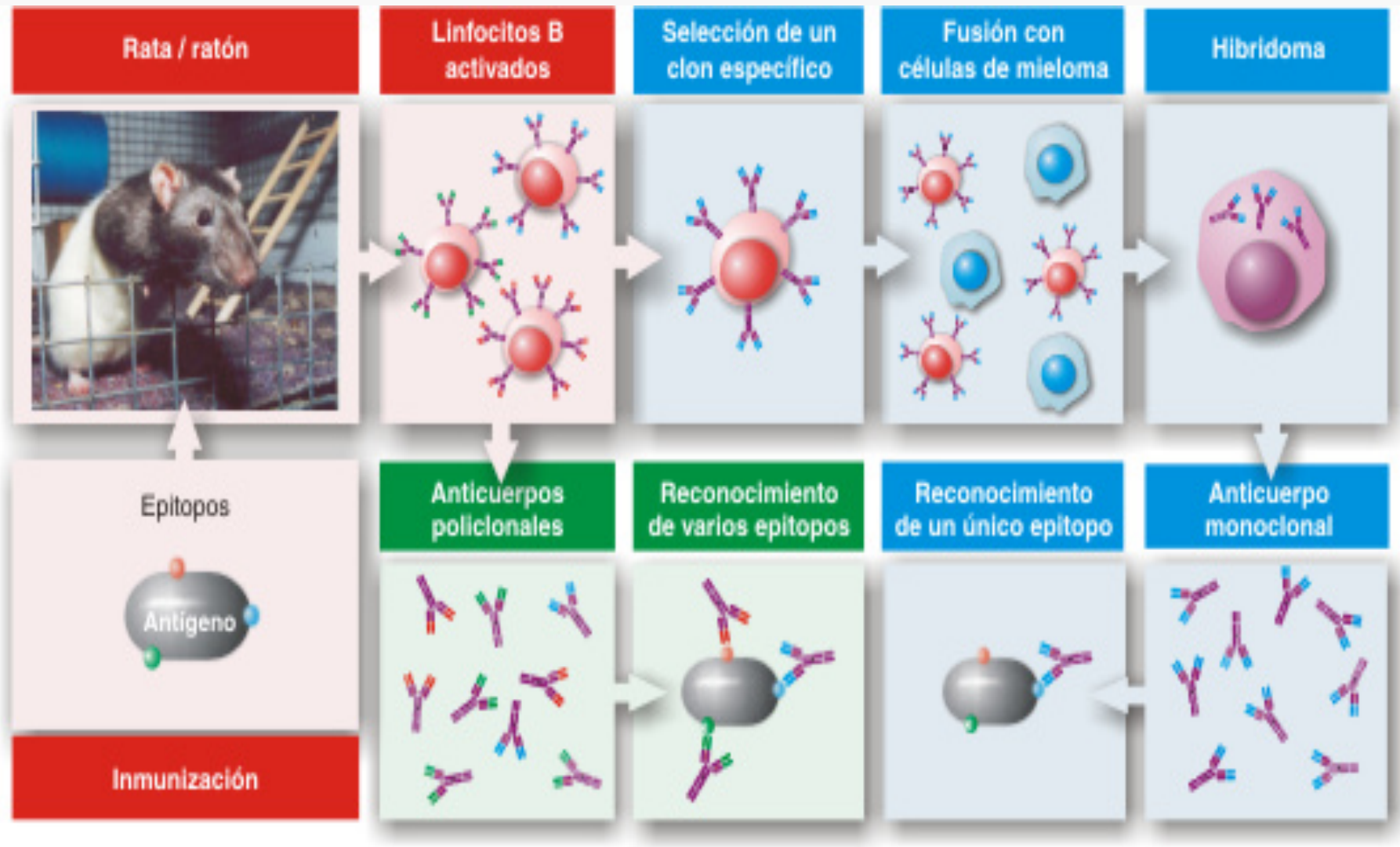
# Desarrollo de anticuerpos con fines analíticos

con fines analíticos

Desarrollo de anticuerpos



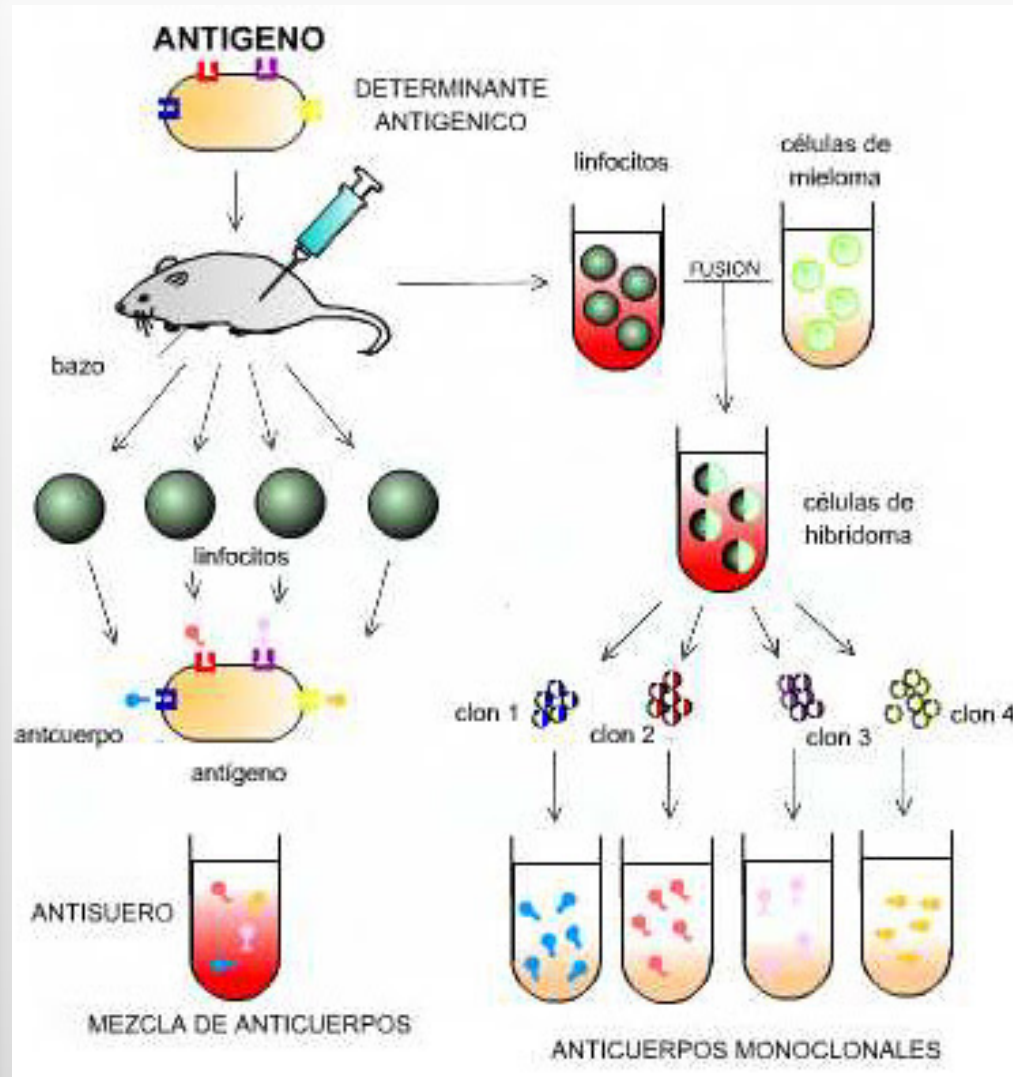
# Producción de anticuerpos



Suero Inmune

Respuesta  
policlonal

Ac Monoclonales



# Producción de anticuerpos

**Anticuerpos policlonales**

**Proceden de distintos clones de linfocitos B estimulados**

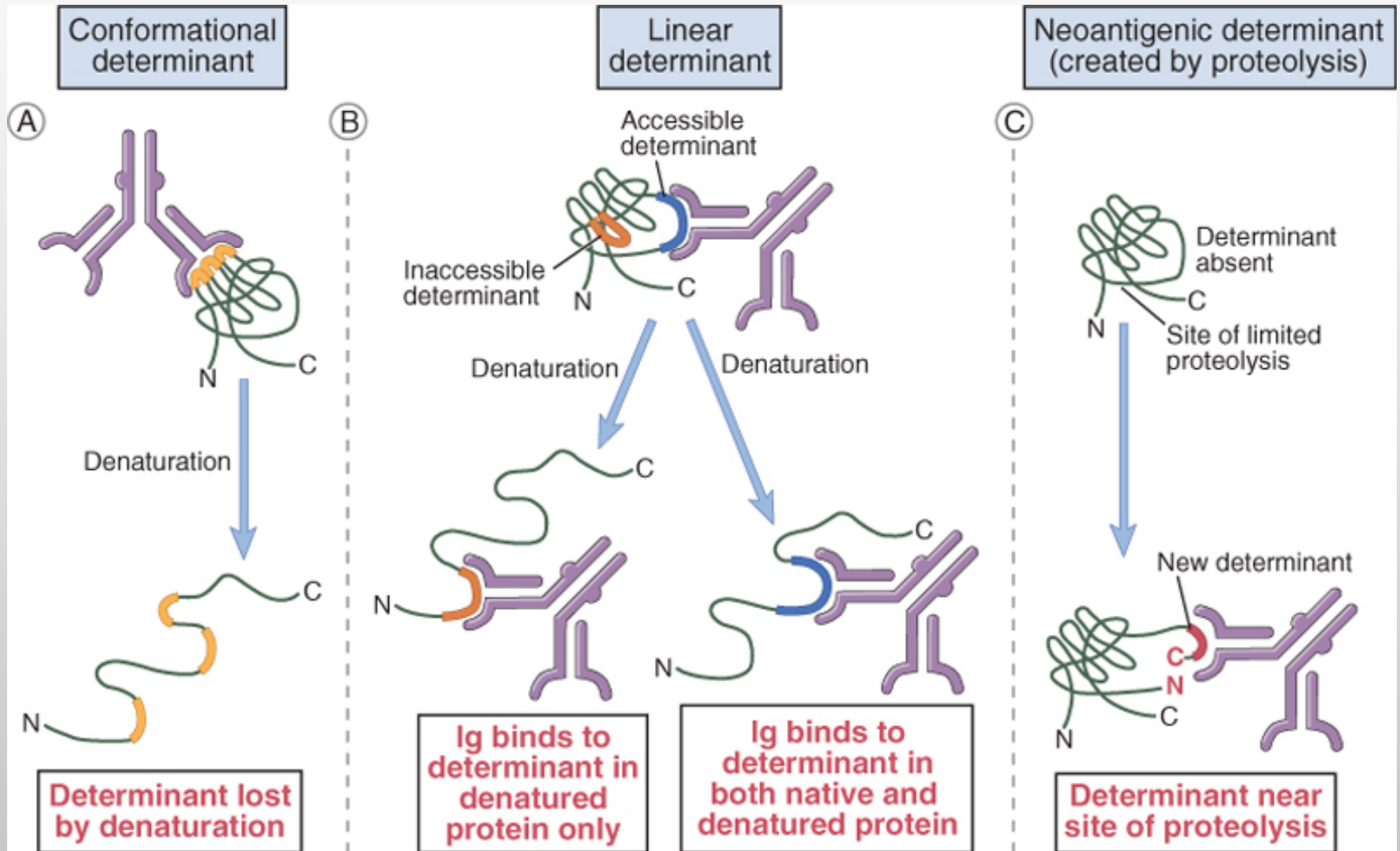
**Anticuerpos monoclonales**

**Derivan de un solo clon de linfocitos B**

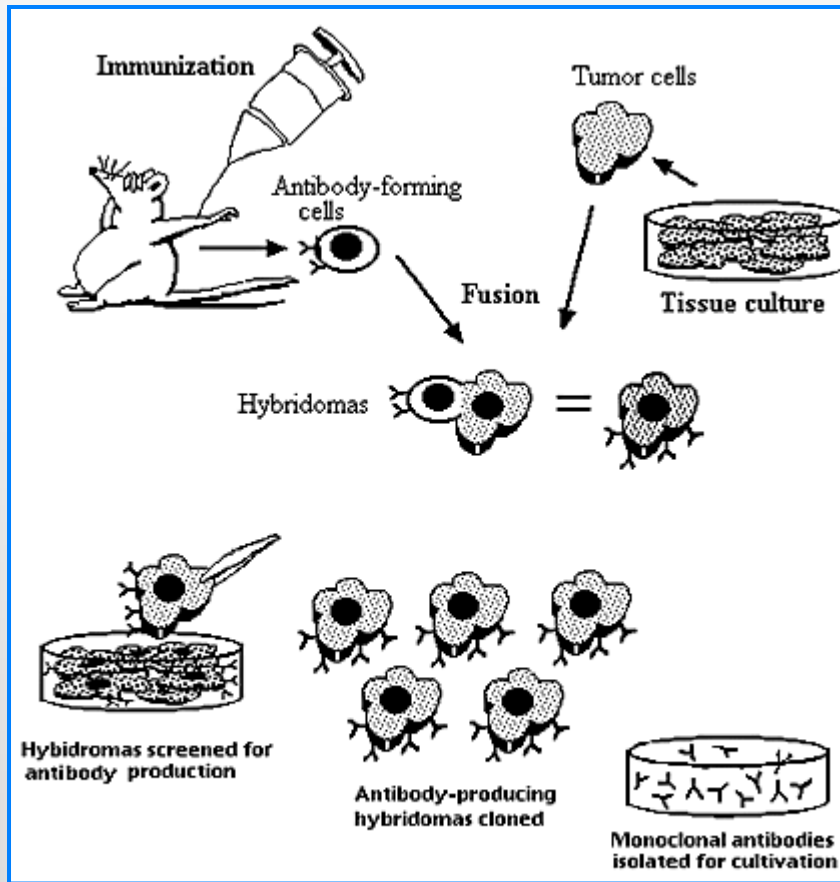
**Específicos para un epítopo**

**Población homogénea**

# Tipo de epitopes



# Producción de anticuerpos monoclonales



- 1) **Animales:** requerimientos y esquemas de inmunización
- 2) **Células tumorales:**  
Características  
Medios de cultivo y de selección
- 3) **Técnicas de fusión y selección de híbridos**
- 4) **Clonado y conservación de las clonas**
- 5) **Detección y caracterización de Acs. Monoclonales**
- 6) **Producción *in vitro* e *in vivo***

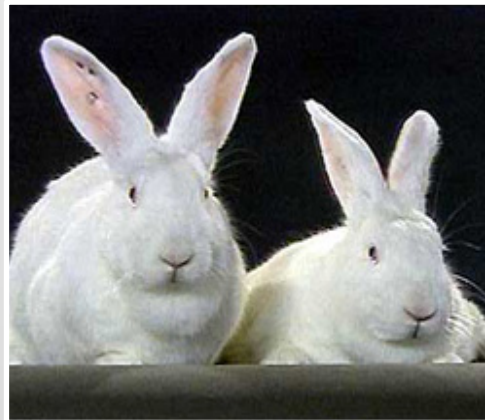


## Anticuerpos Monoclonales



- Líneas celulares productoras de Ac químicamente homogéneos
- Cantidad ilimitada
- Partidas de calidad reproducible
- Especificidad para 1 epítopo
- Constante de afinidad única
- Alta proporción de Ac específicos (90%)
- En general, más específico

## Sueros Policlonales



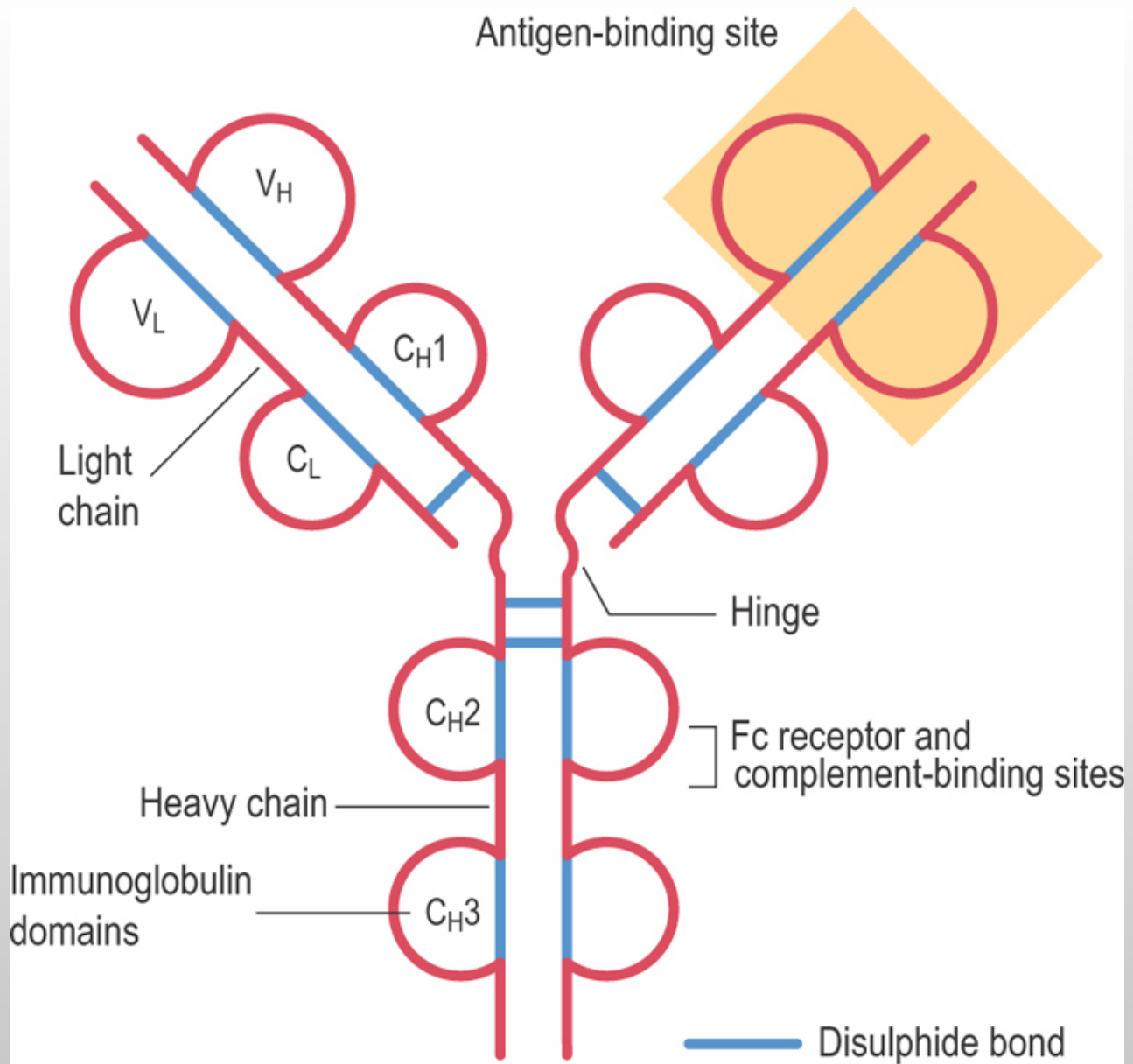
- Mezcla de Ac heterogénea
- Cantidad limitada
- Partidas de distinta calidad
- Especificidad para 1 o más epítopos
- Constante de afinidad promedio
- Baja proporción de Ac específicos (10%)
- Puede dar más inespecífico

# Monoclonal vs Policlonal

	Policlonal	Monoclonal	Pool de monoclonales
<b>Intensidad de la señal</b>	↑↑↑↑↑	Anticuerpo dependiente (mala a excelente)	↑↑↑↑↑
<b>Especificidad</b>	↑ (Background)	↑↑↑↑↑ Alguna reactividad cruzada	↑↑↑↑↑
<b>Ventajas</b>	Estable, interacciones multivalentes	Especificidad ilimitado	Estable, interacciones multivalentes Especificidad ilimitado
<b>Desventajas</b>	Unión específica no deseada	Afinidad variable por proteína A / G	Disponibilidad

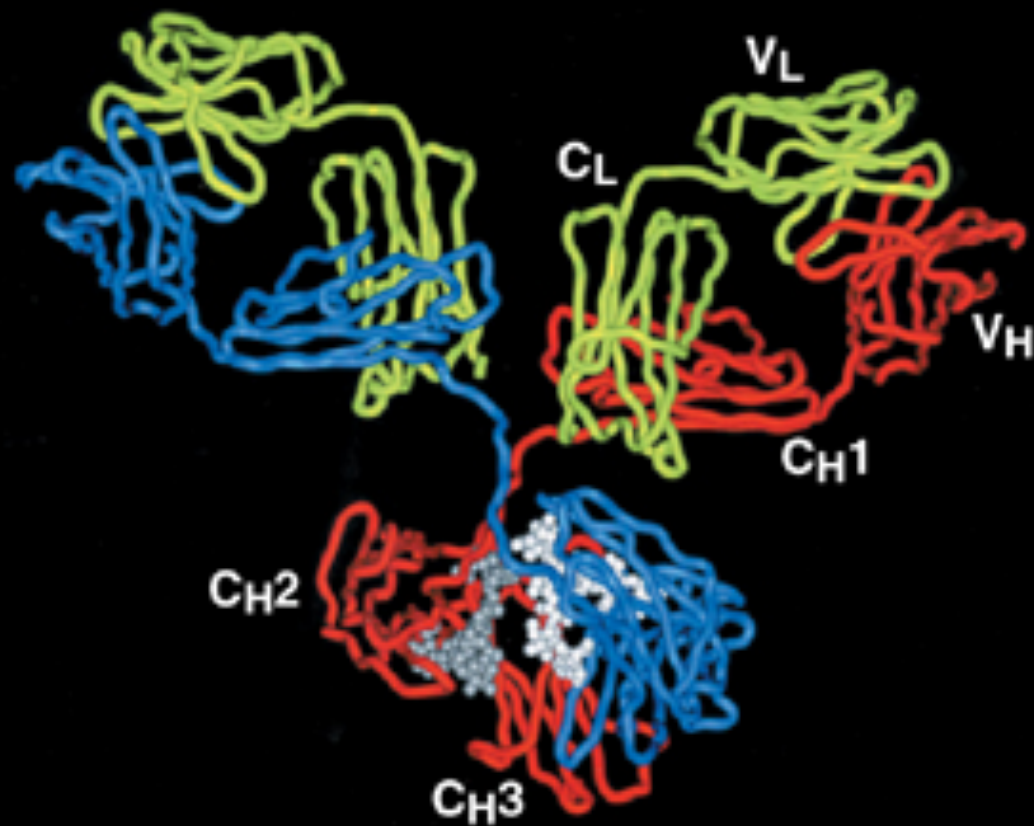
A 3D surface model of an antibody structure, showing two heavy chain domains (blue) and two light chain domains (green) arranged in a Y-shape. The model is rendered with a soft shadow on the white background.

# **Anticuerpos estructura**

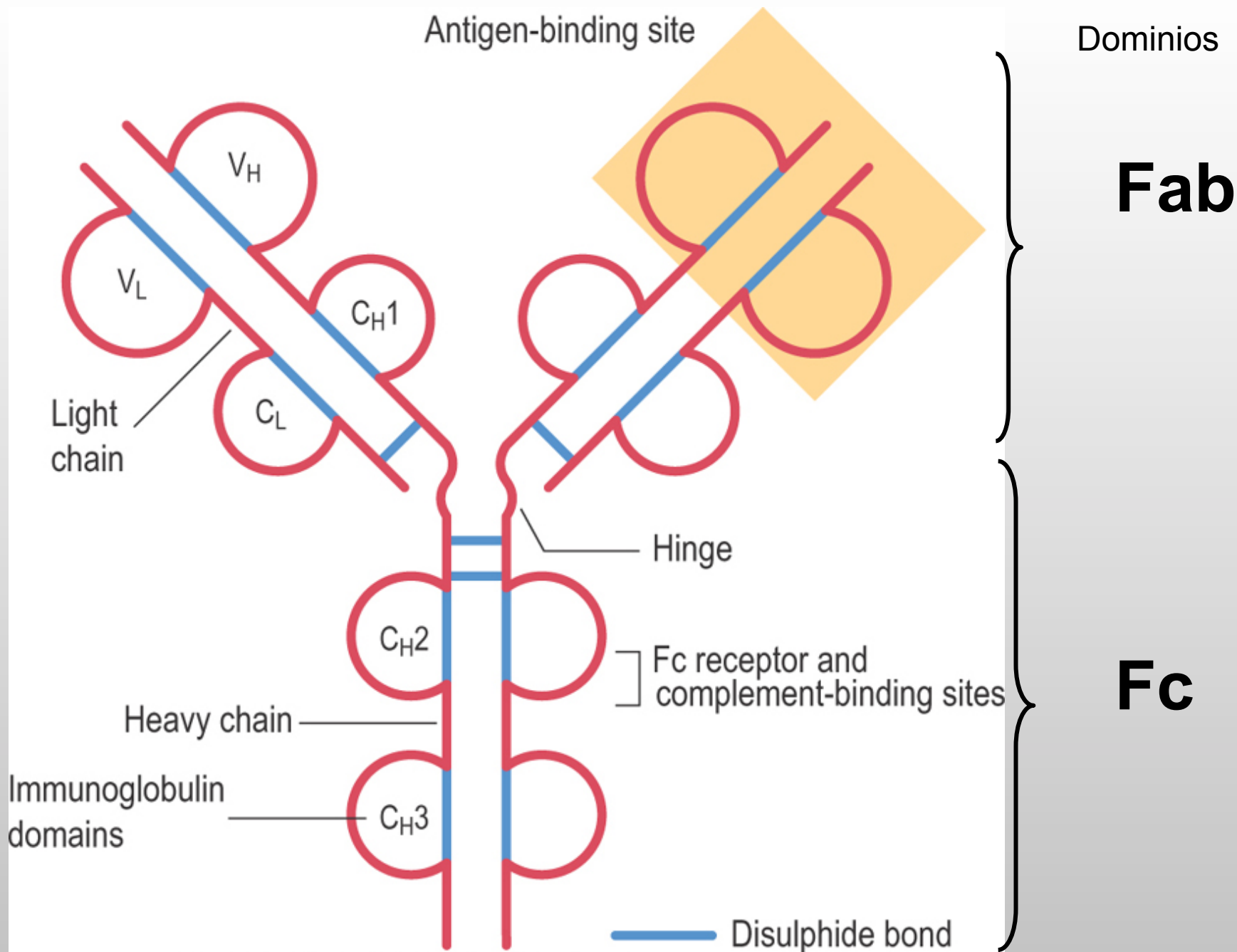


# Estructura de una Inmunoglobulina

©







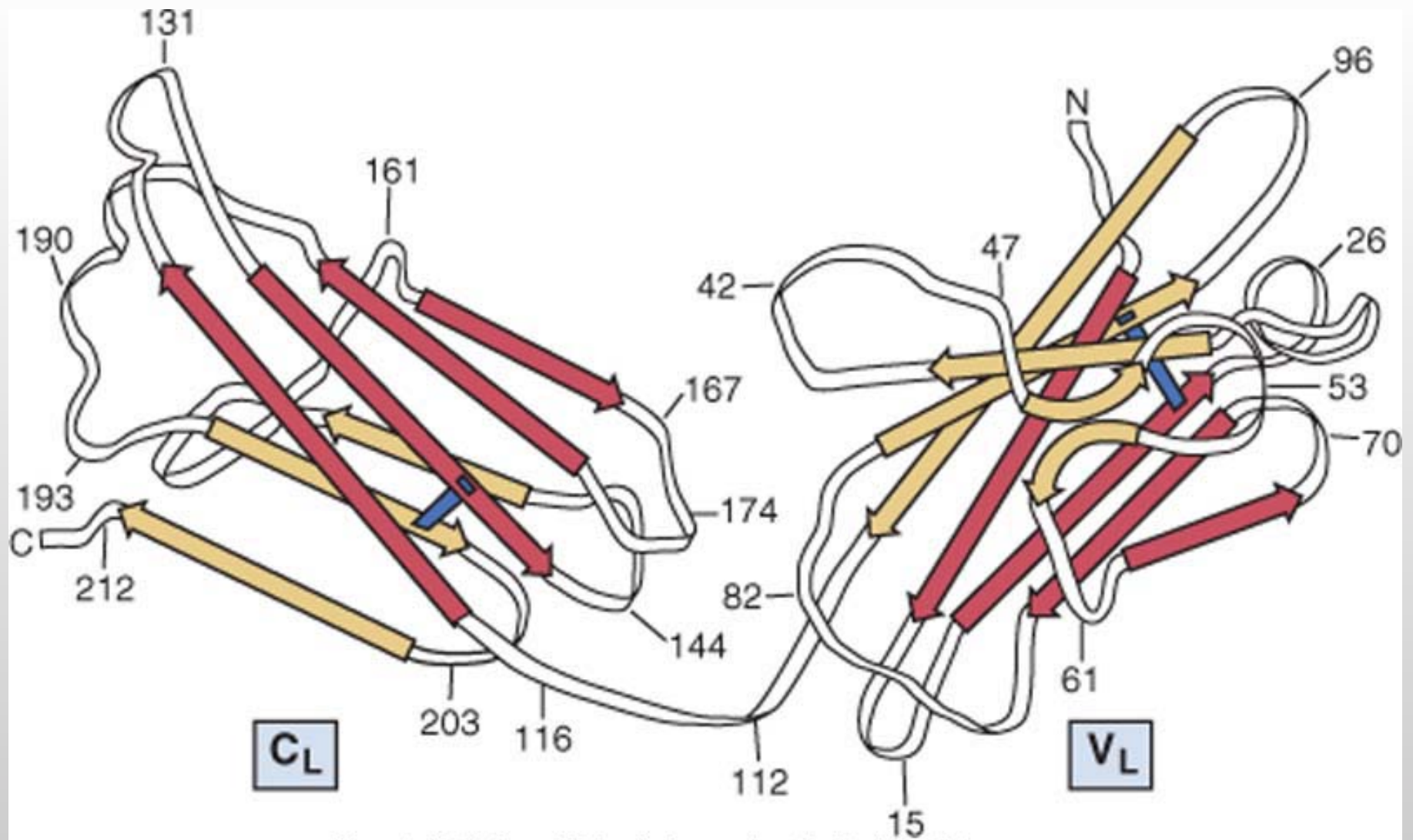
# Peso molecular

***Inmunoglobulina entera:*** 160 kDa

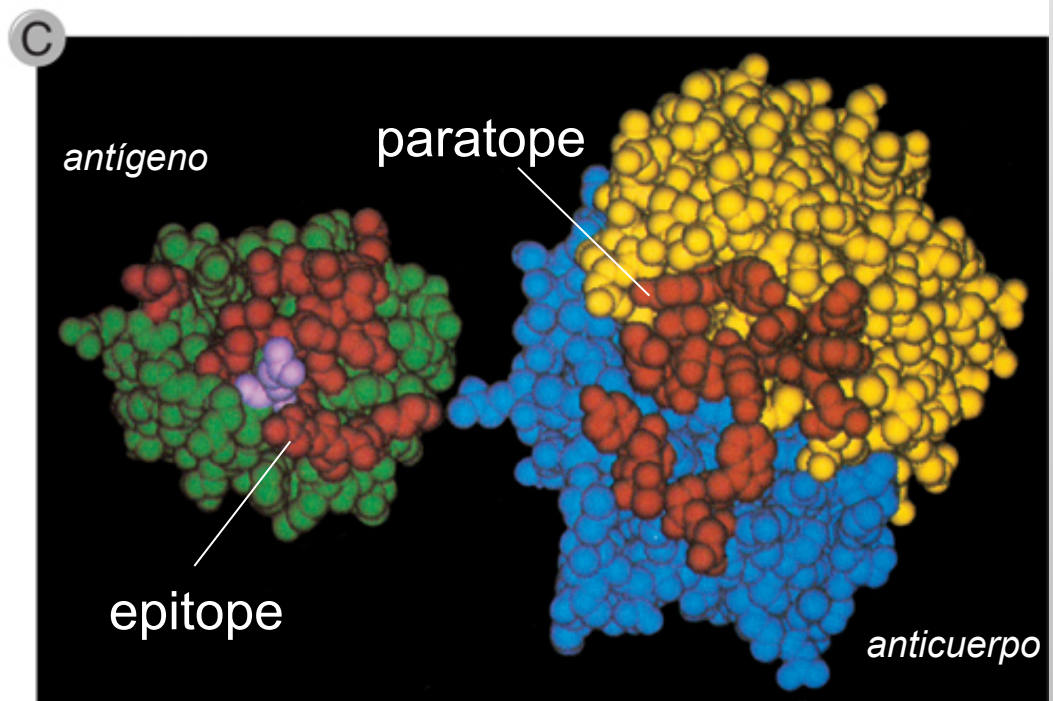
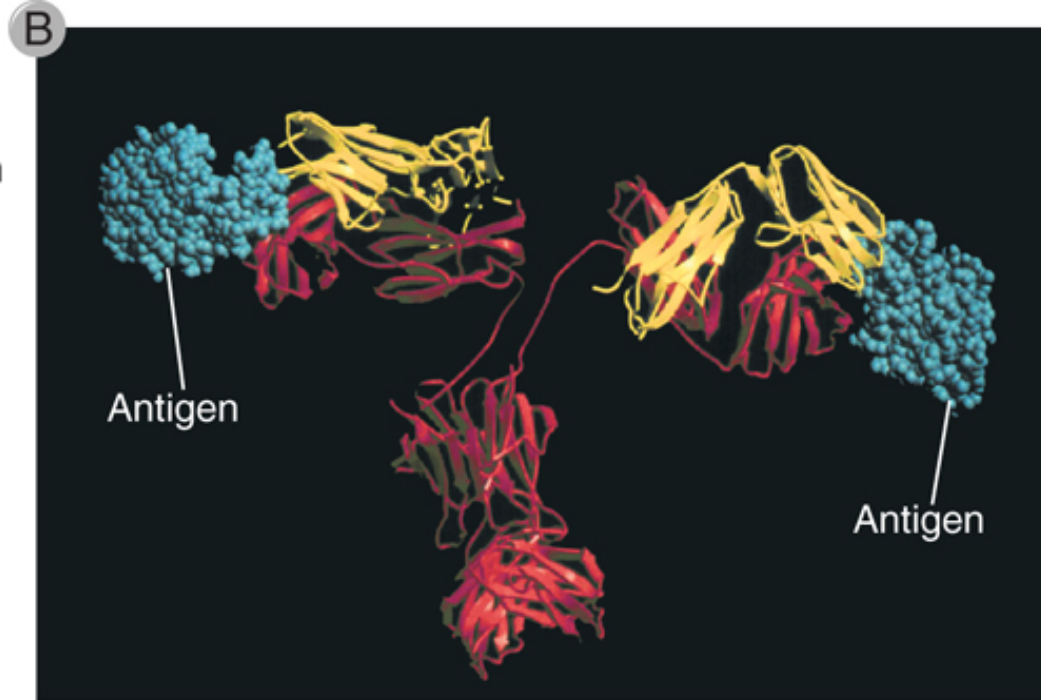
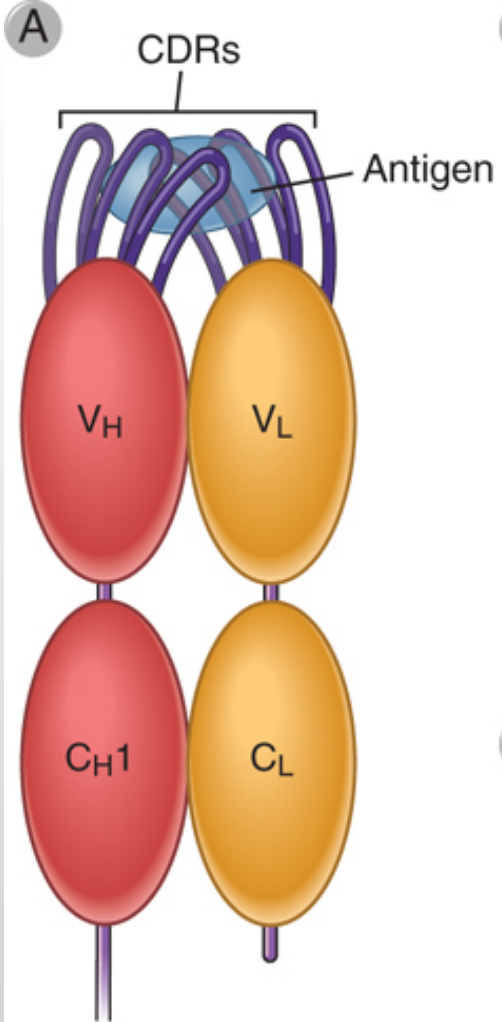
***Cadena liviana:*** 25 kDa

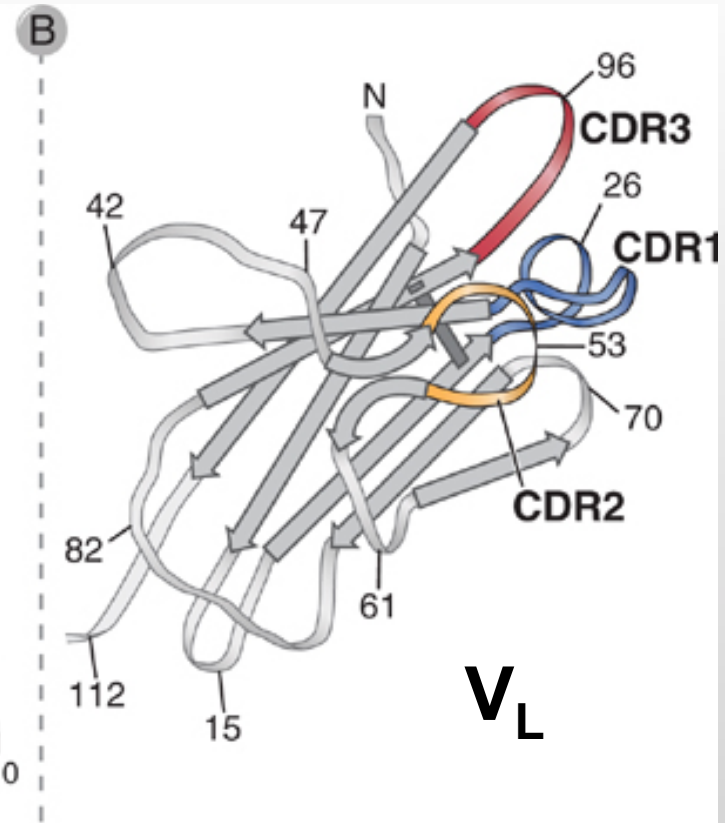
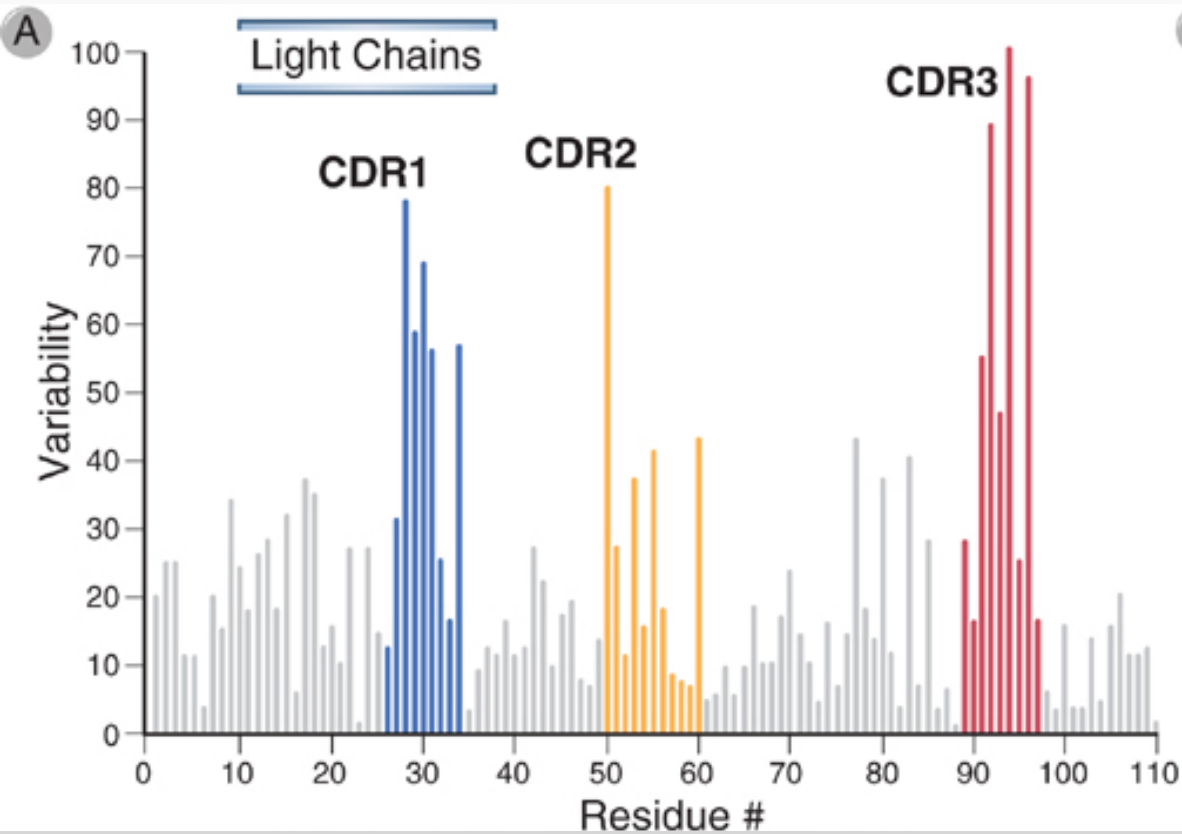
***Cadena pesada:*** 55 a 70 kDa

pI~8

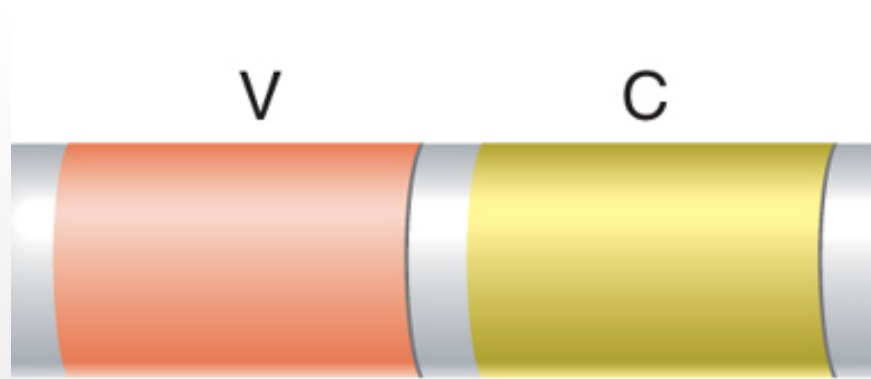


**Dominio Ig**

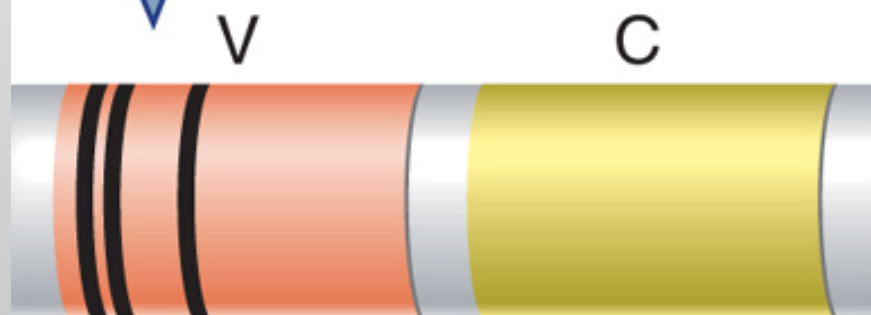




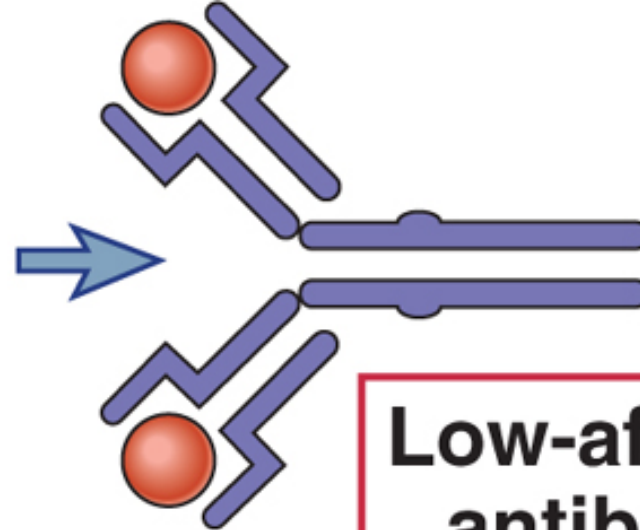




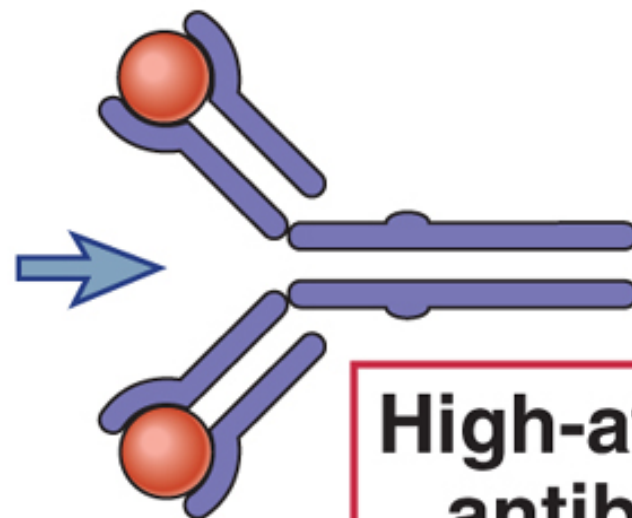
Somatic mutations  
in Ig V genes  $\Rightarrow$   
Selection of  
high-affinity B cells



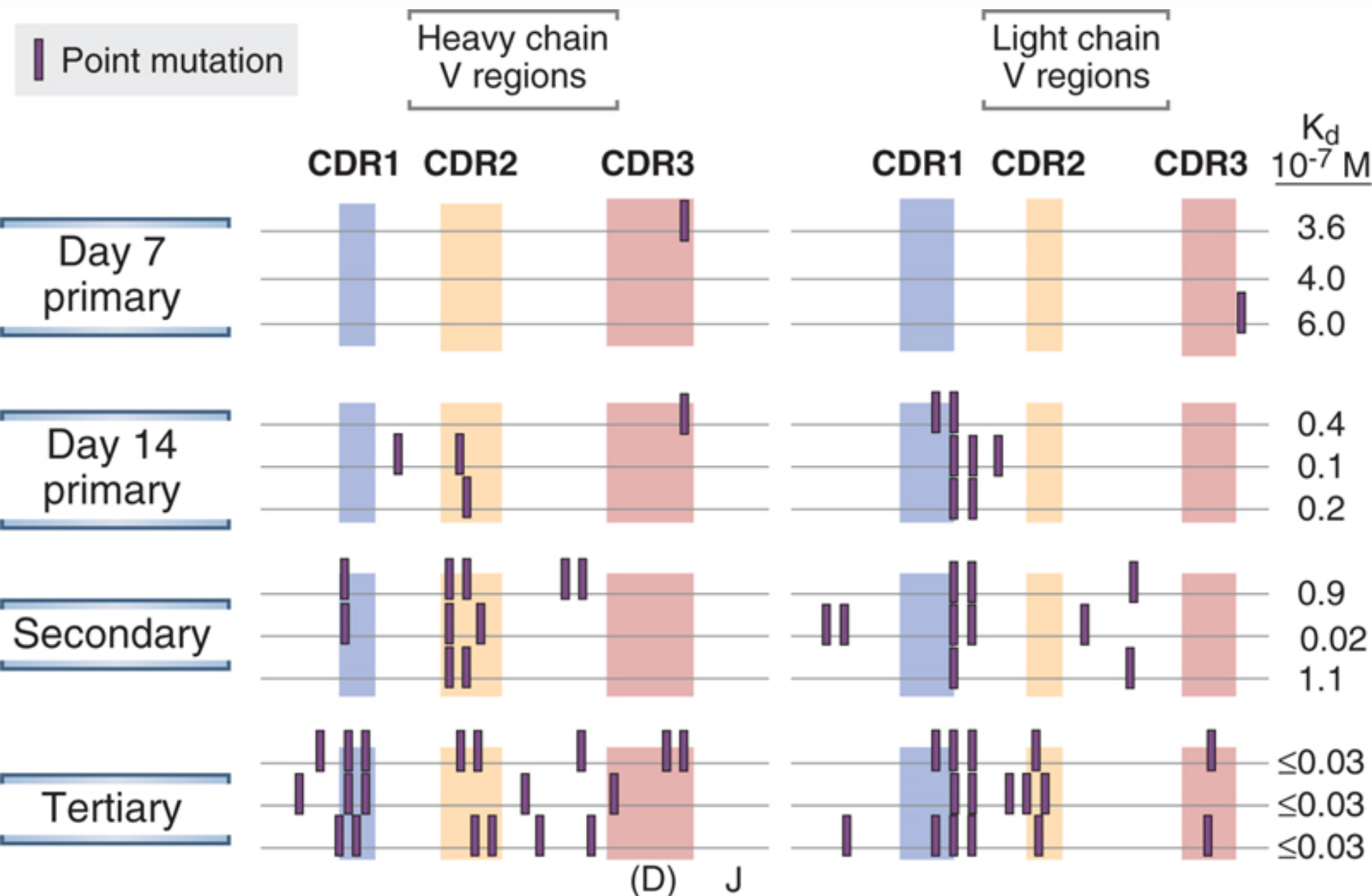
Mutations



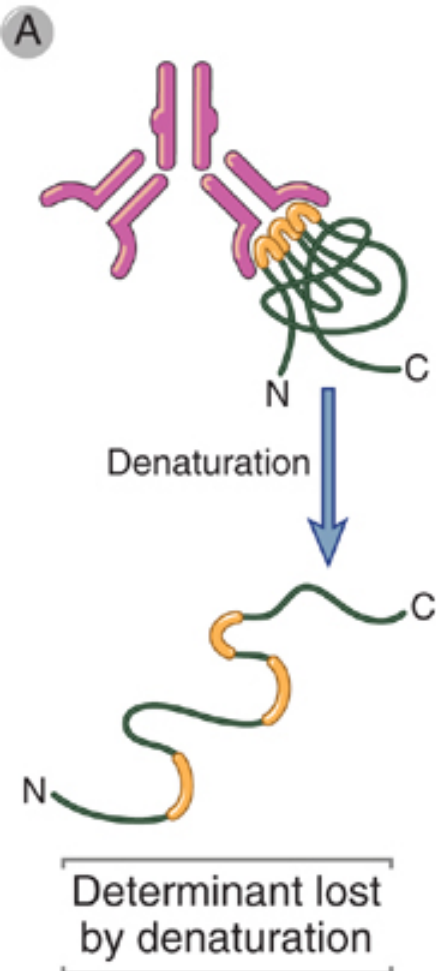
**Low-affinity  
antibody**



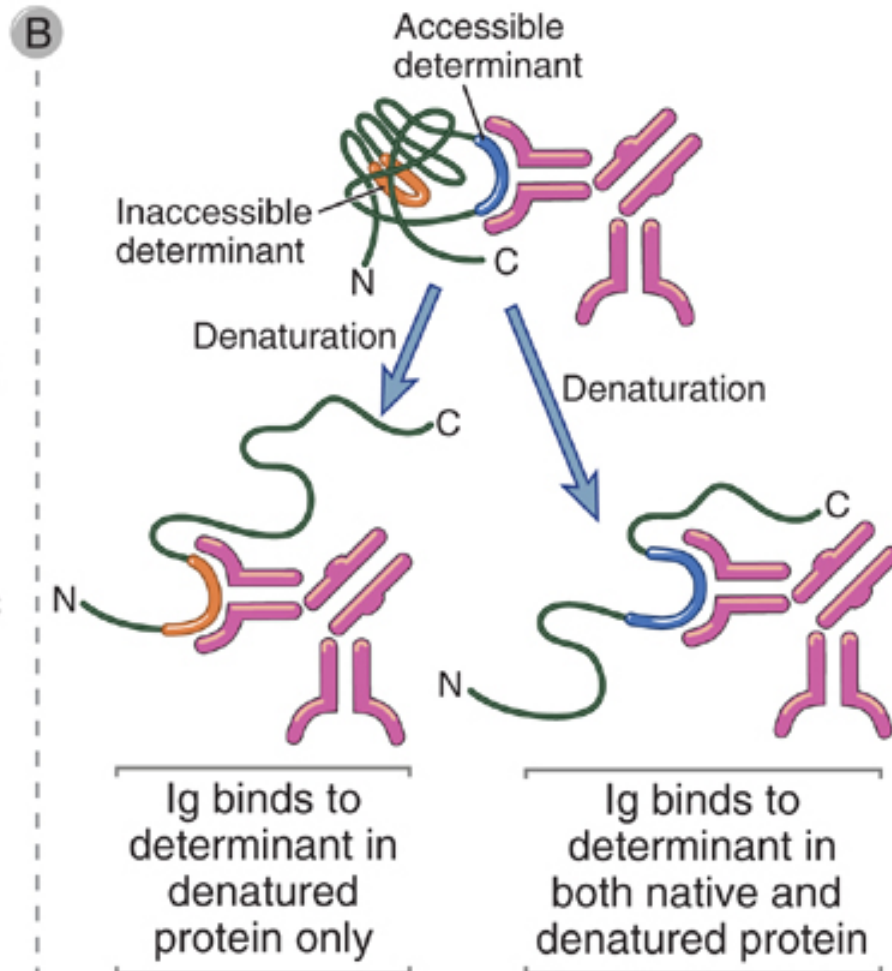
**High-affinity  
antibody**



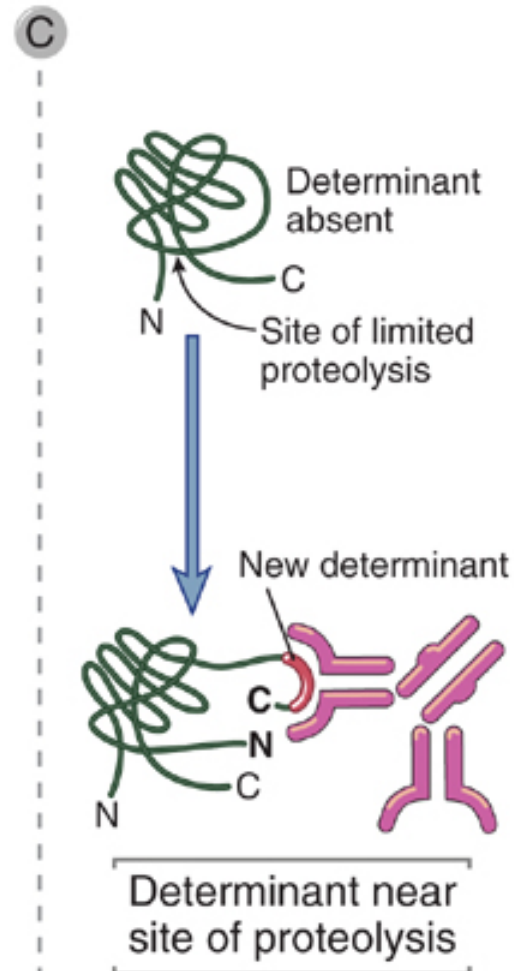
### Conformational determinant

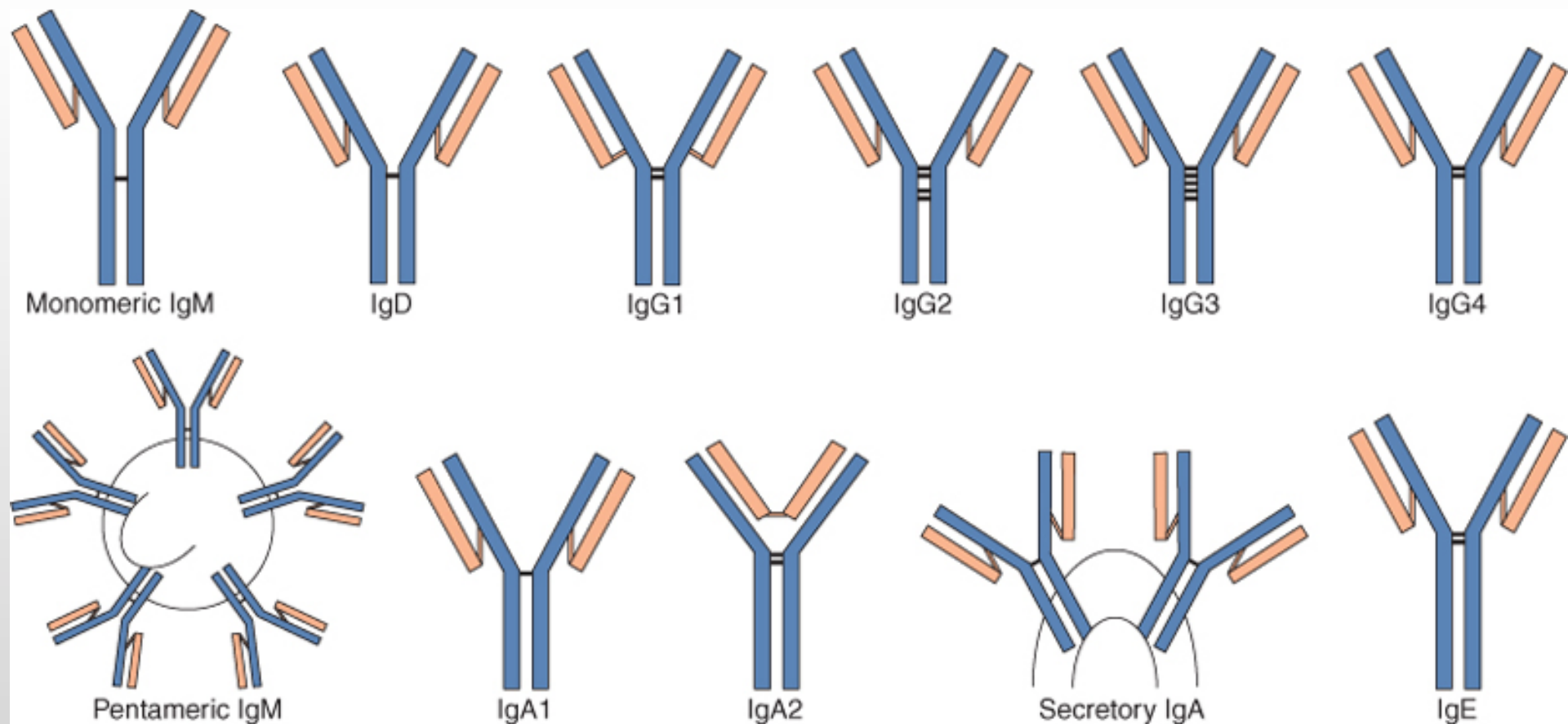


### Linear determinant



### Neoantigenic determinant (created by proteolysis)



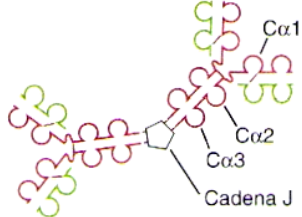
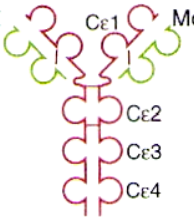
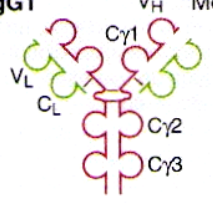
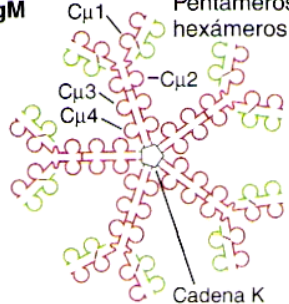


**Clases o Isotipos de anticuerpos: IgG, IgA, IgE, IgM**  
**Subclases: IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4**  
**IgA1, IgA2**

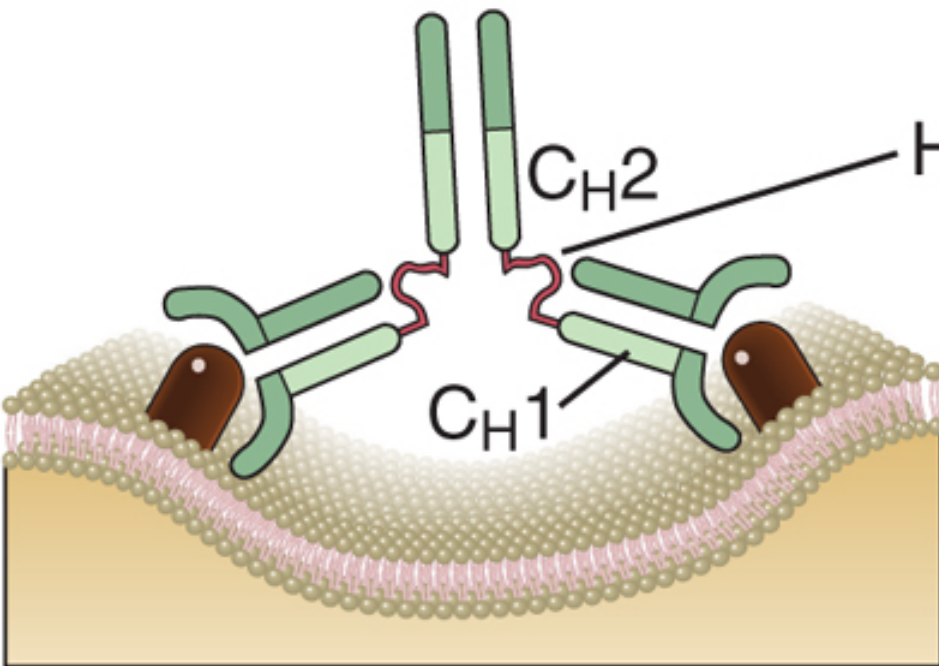
# Clases y subclases de IG

Clase	subclase	Cadena pesada	Cadena liviana
IgG	1	$\gamma_1$	$\kappa$ ó $\lambda$
	2	$\gamma_2$	$\kappa$ ó $\lambda$
	3	$\gamma_3$	$\kappa$ ó $\lambda$
	4	$\gamma_4$	$\kappa$ ó $\lambda$
IgA	1	$\alpha_1$	$\kappa$ ó $\lambda$
	2	$\alpha_2$	$\kappa$ ó $\lambda$
IgD		$\delta$	$\kappa$ ó $\lambda$
IgE		$\epsilon$	$\kappa$ ó $\lambda$
IgM		$\mu$	$\kappa$ ó $\lambda$

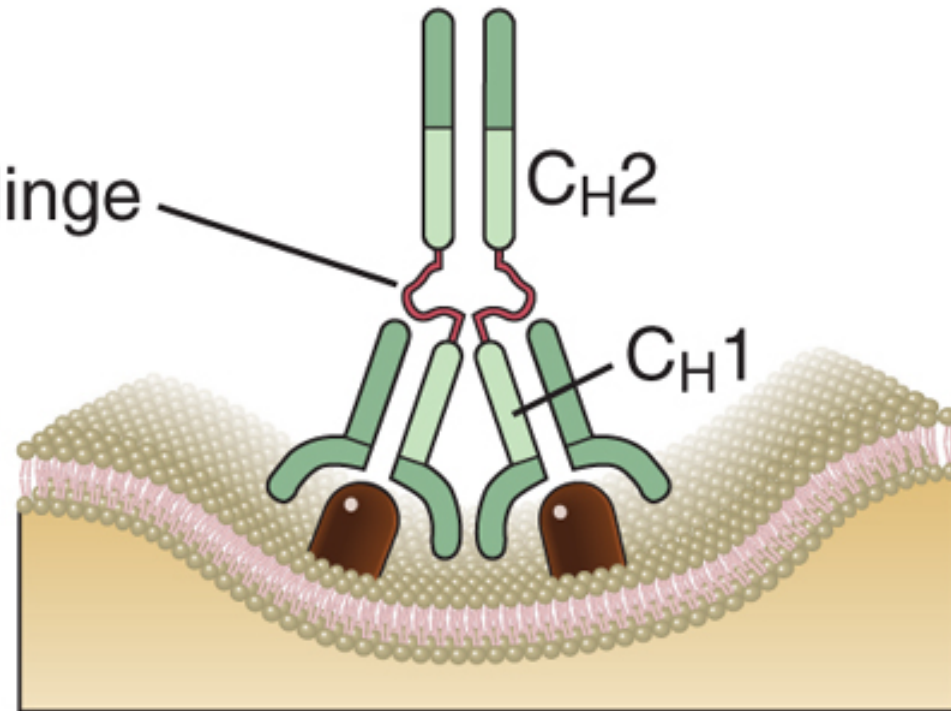


Isotipos de anti-cuerpos	Subtipos	Cadena H	Concentr. sérica (mg/ml)	Semivida en suero (días)	Forma secretada	Funciones
IgA	IgA1,2	$\alpha$ (1 o 2)	3,5	6	<b>IgA (dímero)</b> Monómero, dímero, trímero 	Inmunidad en las mucosas
IgD	Ninguno	$\delta$	Indicios	3	Ninguno	Receptor del antígeno de linfocitos B vírgenes
IgE	Ninguno	$\epsilon$	0,05	2	<b>IgE</b>  Monómero	Defensa frente a parásitos helmínticos, hipersensibilidad inmediata
IgG	IgG1-4	$\gamma$ (1,2,3 o 4)	13,5	23	<b>IgG1</b>  Monómero	Opsonización, activación del complemento, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, inmunidad neonatal, inhibición por retroalimentación de linfocitos B
IgM	Ninguno	$\mu$	1,5	5	<b>IgM</b>  Pentámeros, hexámeros	Receptor del antígeno de linfocitos B vírgenes, activación del complemento

**A** Widely spaced cell surface determinants



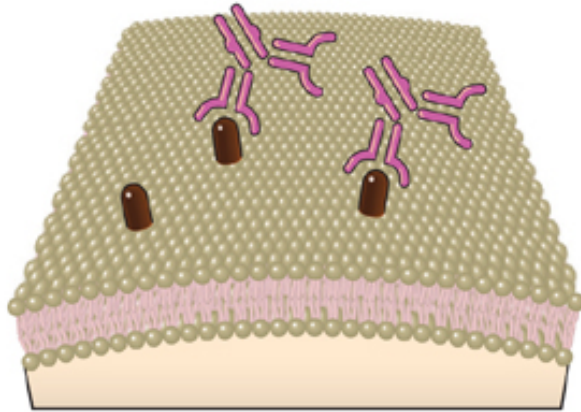
**B** Closely spaced cell surface determinants



**Región bisagra**

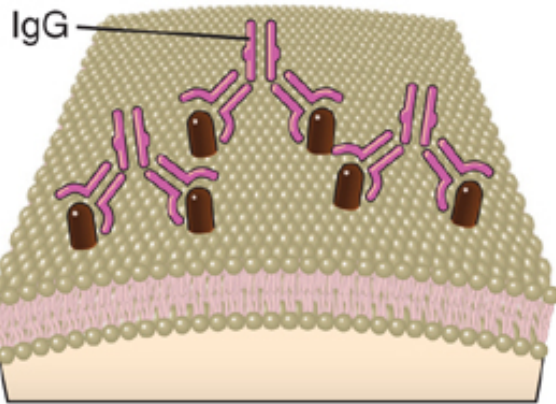
Valency of  
interaction

Avidity of  
interaction



Monovalent

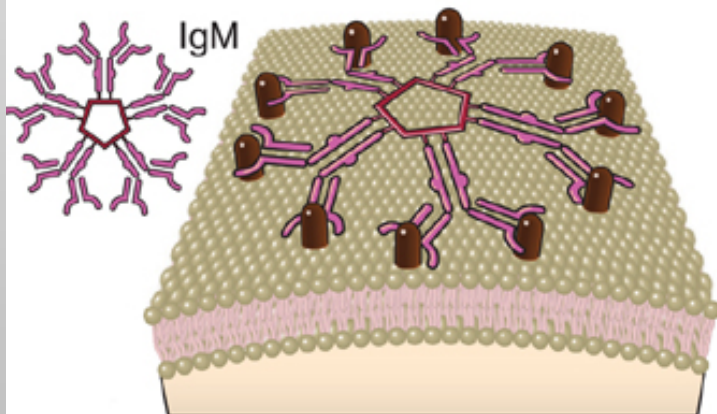
Low



IgG

Bivalent

High

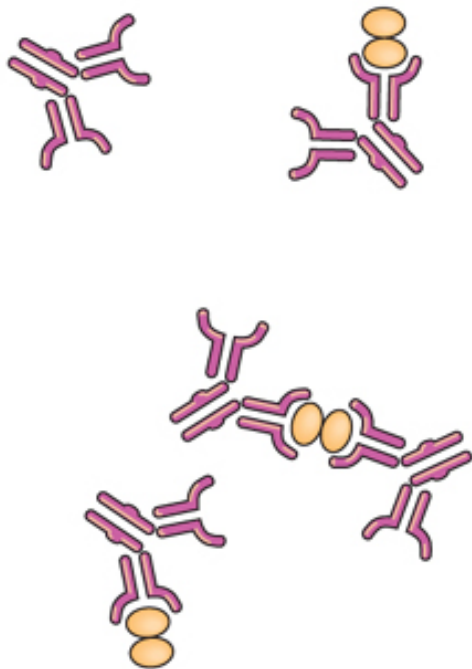


IgM

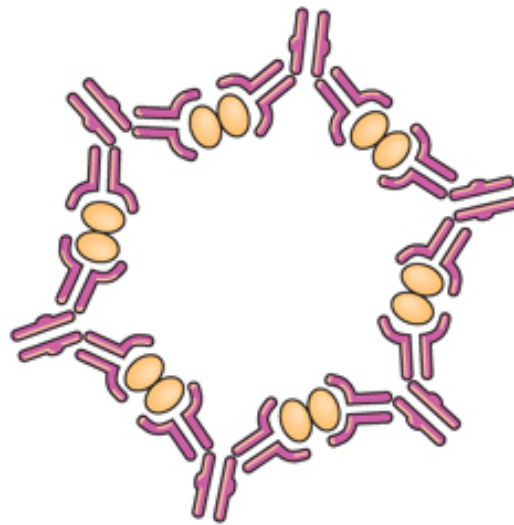
Polyvalent

Very  
high

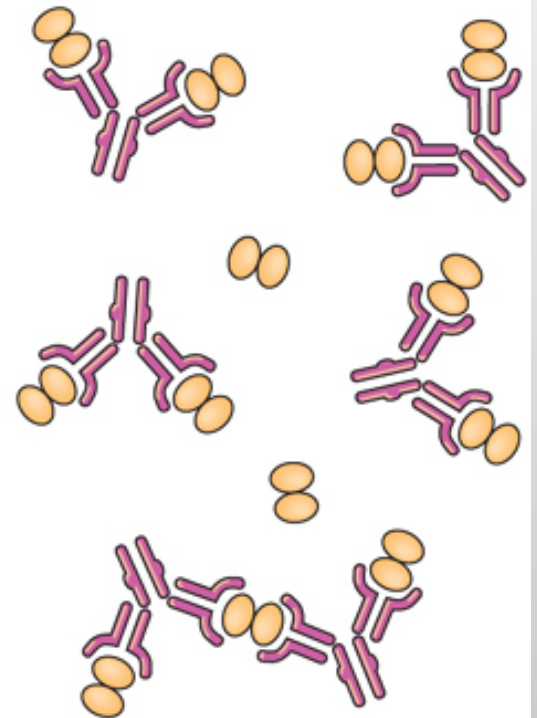
Zone of  
antibody excess  
(small complexes)



Zone of  
equivalence  
(large complexes)



Zone of  
antigen excess  
(small complexes)





# Interacción primaria

Fenómenos dependientes exclusivamente de la interacción Ag-Ac.

Ejemplos:

- Enzimoimmunoensayo

- Radioimmunoensayos

- Fluoroimmunoensayos

- FRET

# Interacción secundaria

Fenómenos dependientes de una reacción primaria entre el Ag y Ac acompañada de una reacción secundaria que permite su visualización

Ejemplos:

- Antígeno soluble

  - Inmunoprecipitación

  - Ouchterlony

  - Contrainmuno-electroforesis

- Antígeno insoluble

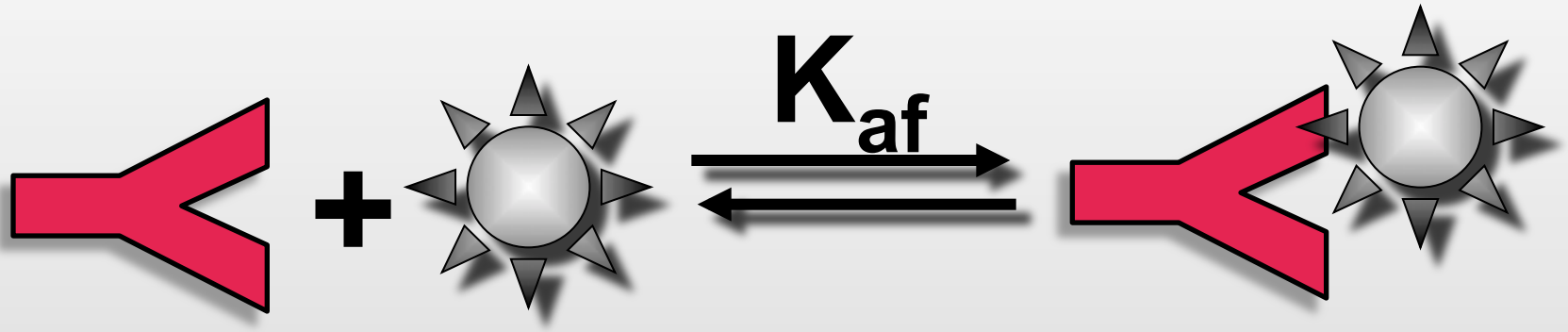
  - Aglutinación directa

  - Hemoagglutinación



# Afinidad del anticuerpo

# Definición de afinidad



$$K_{af} = \frac{\left[ \text{Receptor-Ligand Complex} \right]}{\left[ \text{Receptor} \right] \left[ \text{Ligand} \right]} \approx \underbrace{\Delta G = -RT \ln K_{af}}_{\text{Energía libre}}$$

The diagram shows the definition of the affinity constant  $K_{af}$  as the ratio of the concentration of the bound complex to the product of the concentrations of the free receptor and ligand. This is approximately equal to the negative of the standard Gibbs free energy change ( $\Delta G$ ) divided by  $RT$ , where  $\Delta G$  is labeled as *Energía libre* (free energy).

# Factores que afectan la afinidad del anticuerpo

1. Temperatura
2. Fuerza iónica
3. pH
4. Tiempo

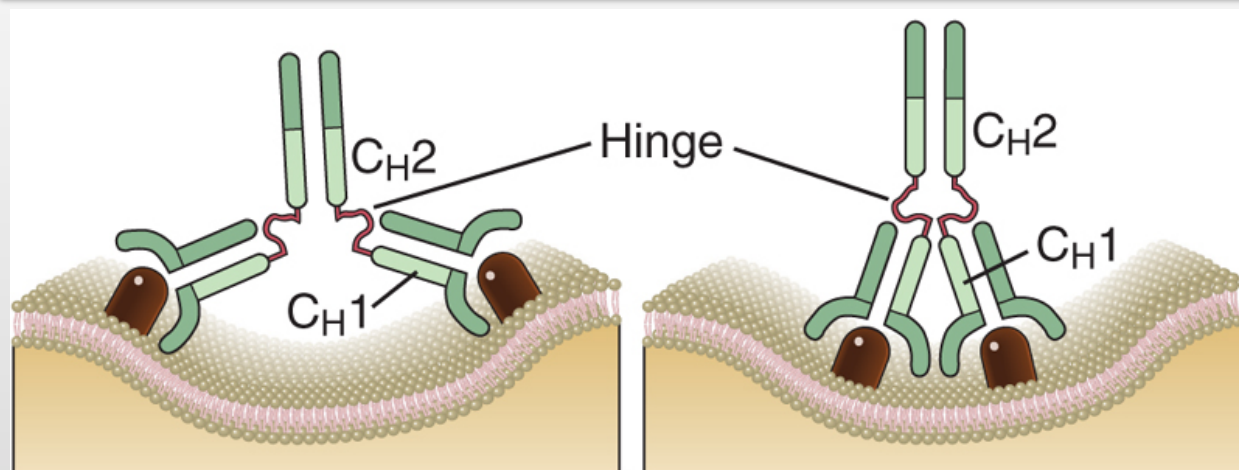
*Aminoácidos  
involucrados  
Estabilidad del  
antígeno*

5. Inmovilización del Ag

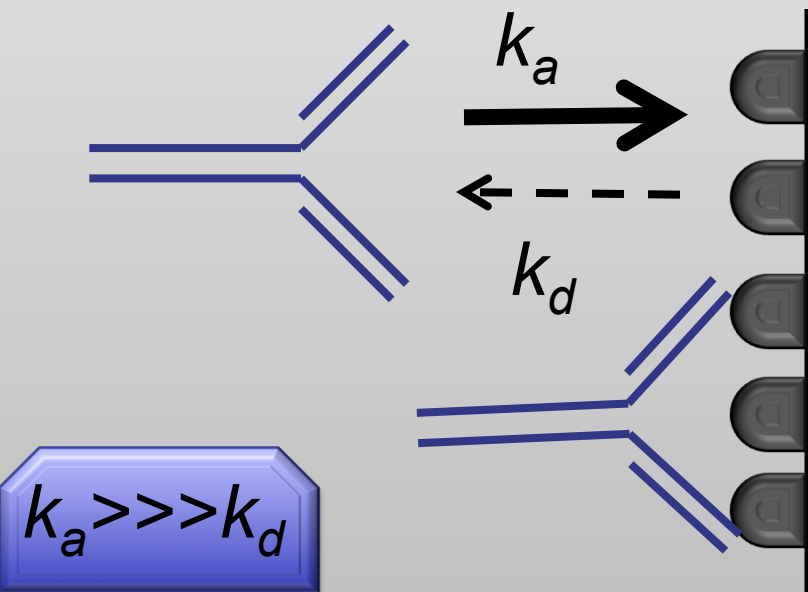
*Aumento de afinidad aparente por  
proximidad entre epitopes*

# Incremento en la afinidad aparente

## $K_{av}$

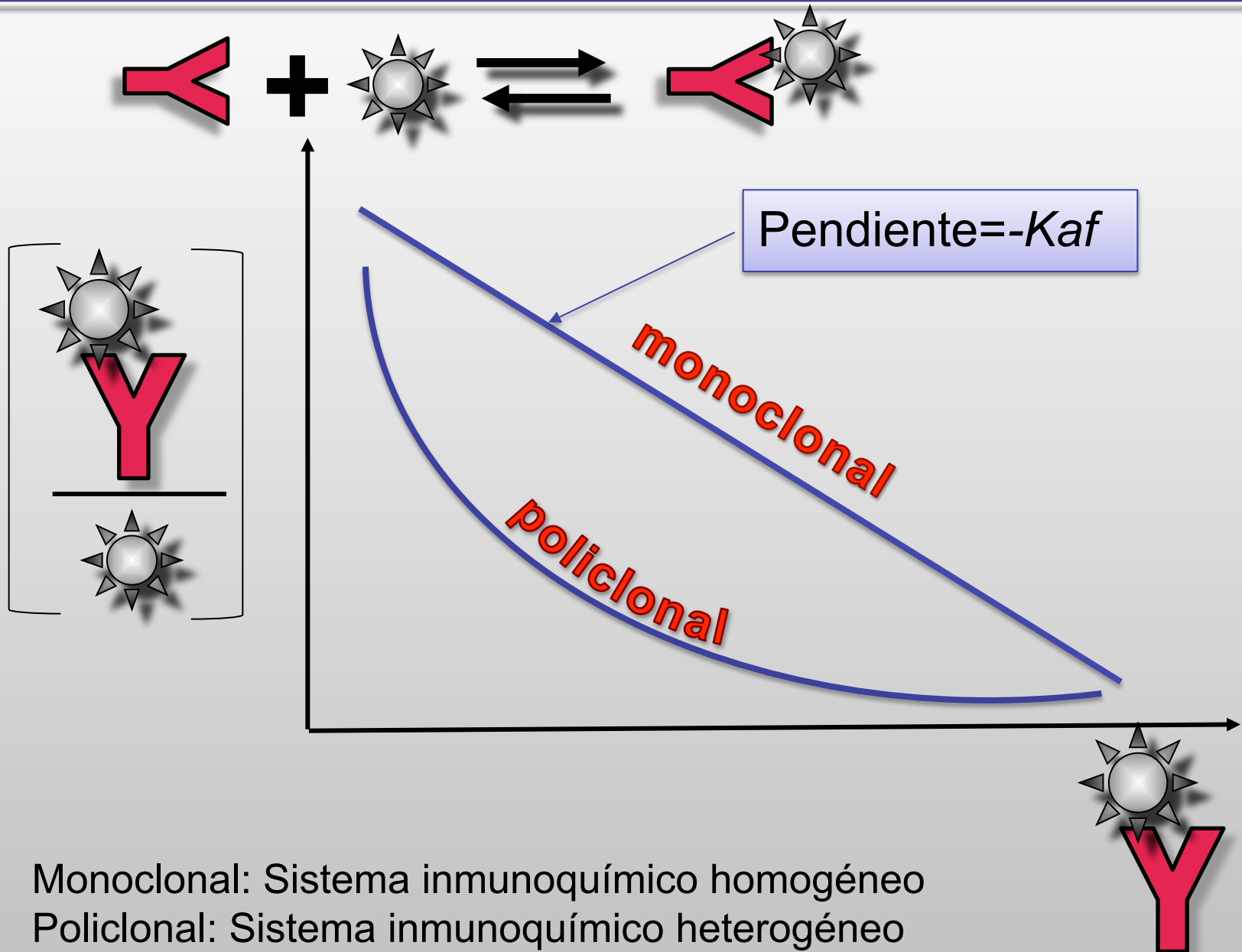


**Efecto  
monogámico  
 $K_{av} \approx [K_{af}]^2$**



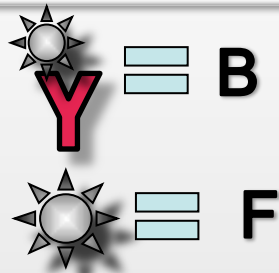
# Efecto de alta concentración local

# Curva de Scatchard





# Determinación de Parámetros de Interacción Primaria de un Anticuerpo



*Modelo de Scatchard*

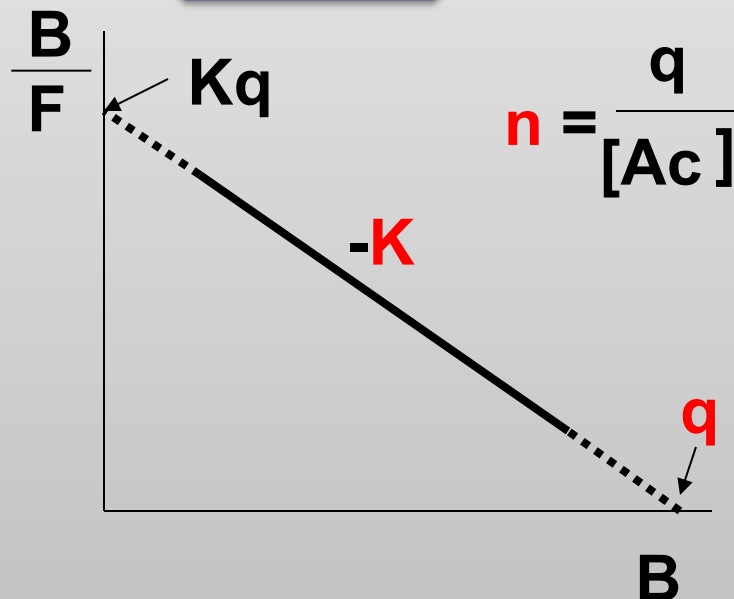
$$\frac{B}{F} = Kq - KB$$

**PIP**

afinidad  
concentración

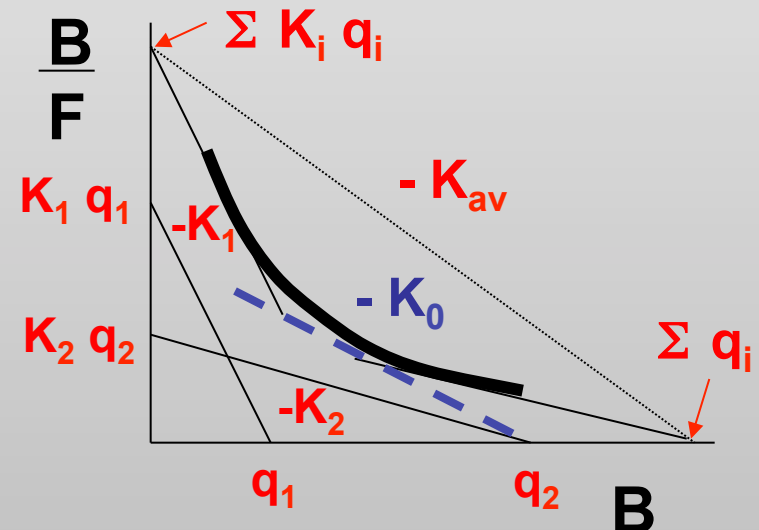
**Monoclonal**

homogéneo



**Policlonal**

heterogéneo



# Modelo monoclonal

Homogéneo

Única  $K_{af}$

*Título o potencia*

$q \times K_{af}$

# Modelo policlonal

Heterogéneo

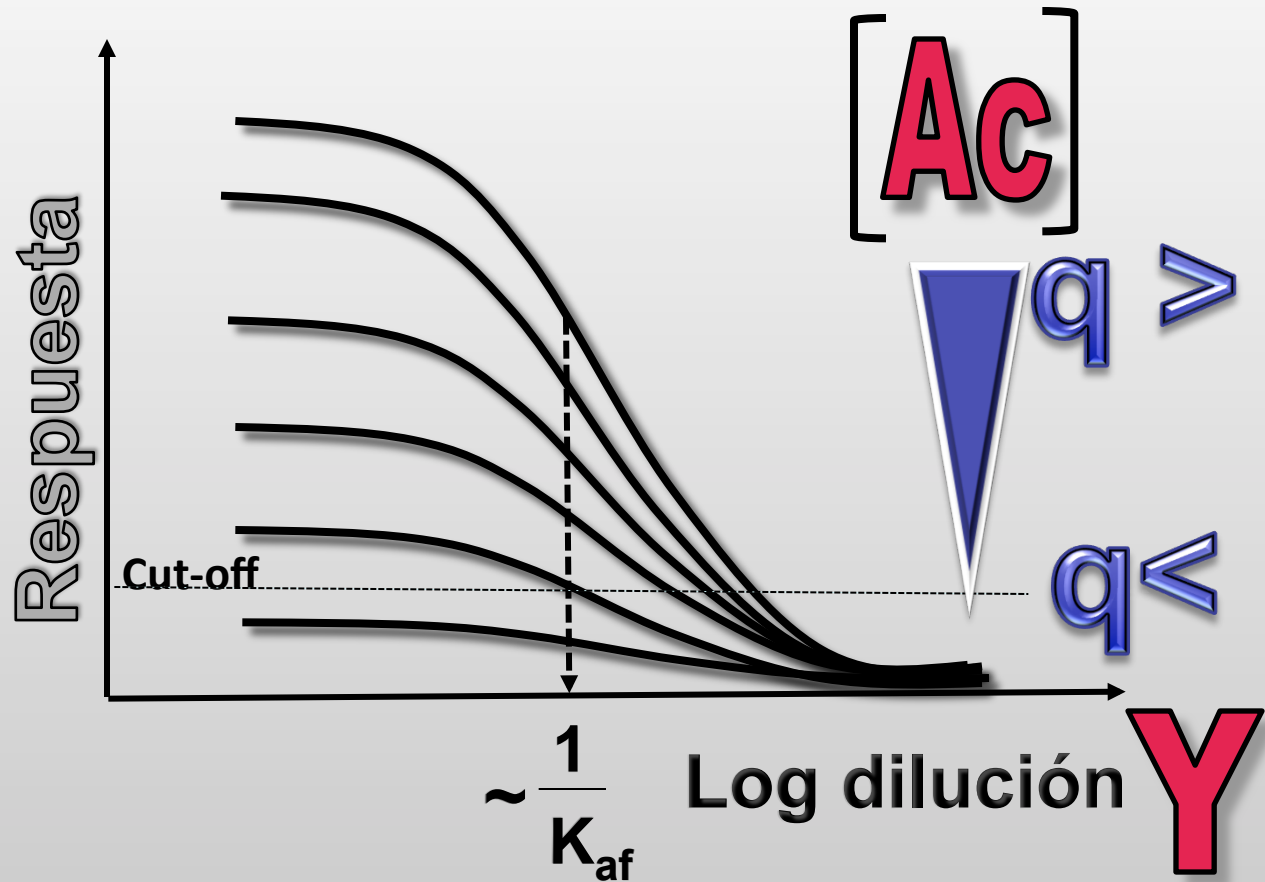
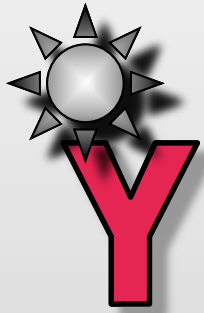
*Mezcla de Ac con  
distintas afinidades*

*Título o potencia*

$$K_{av} = \frac{\sum K_i}{\sum q_i}$$

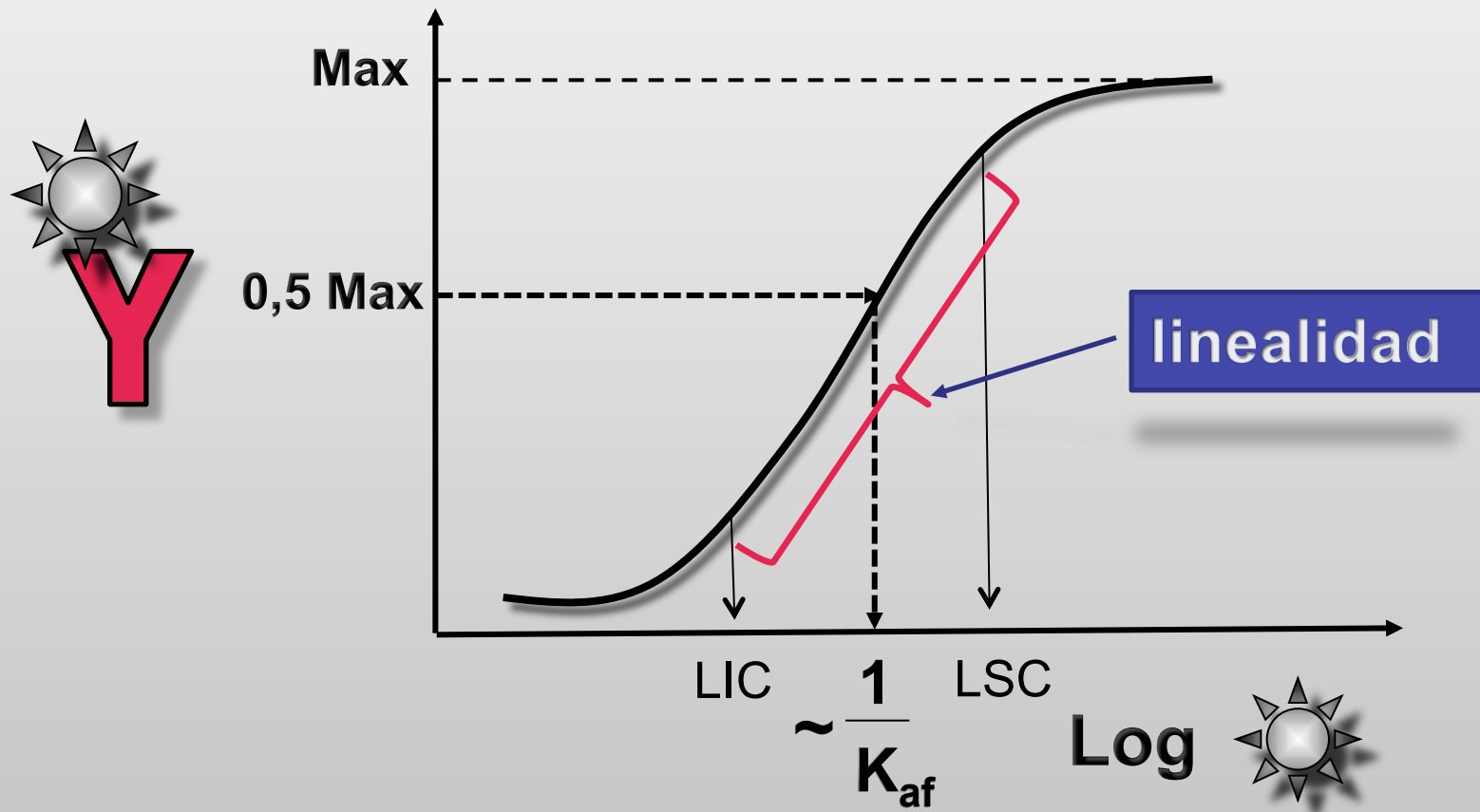
$\sum q_i \times K_i$

# Titulación de Ac

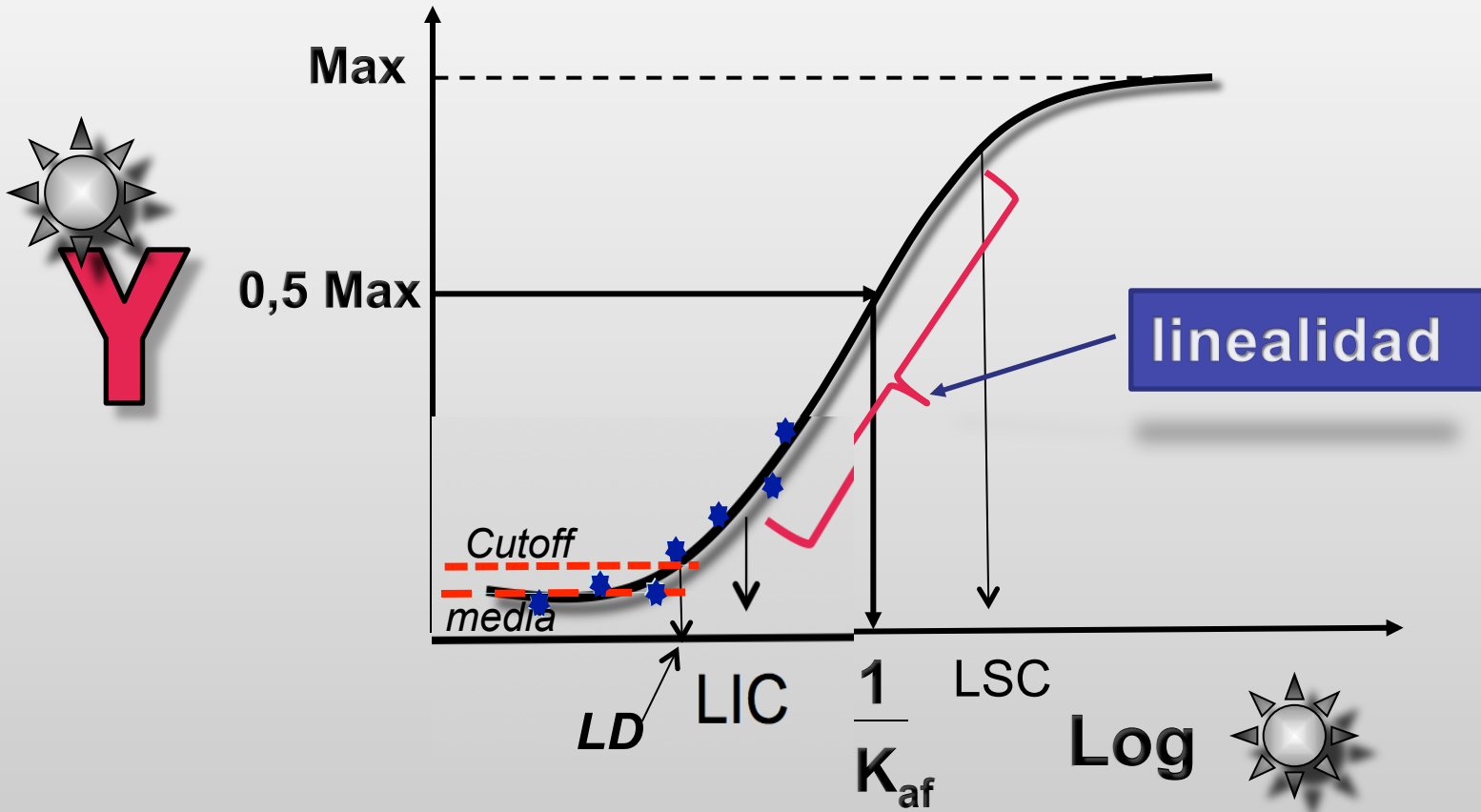


$$R \approx K_{af} \times Ac = \text{Potencia}$$

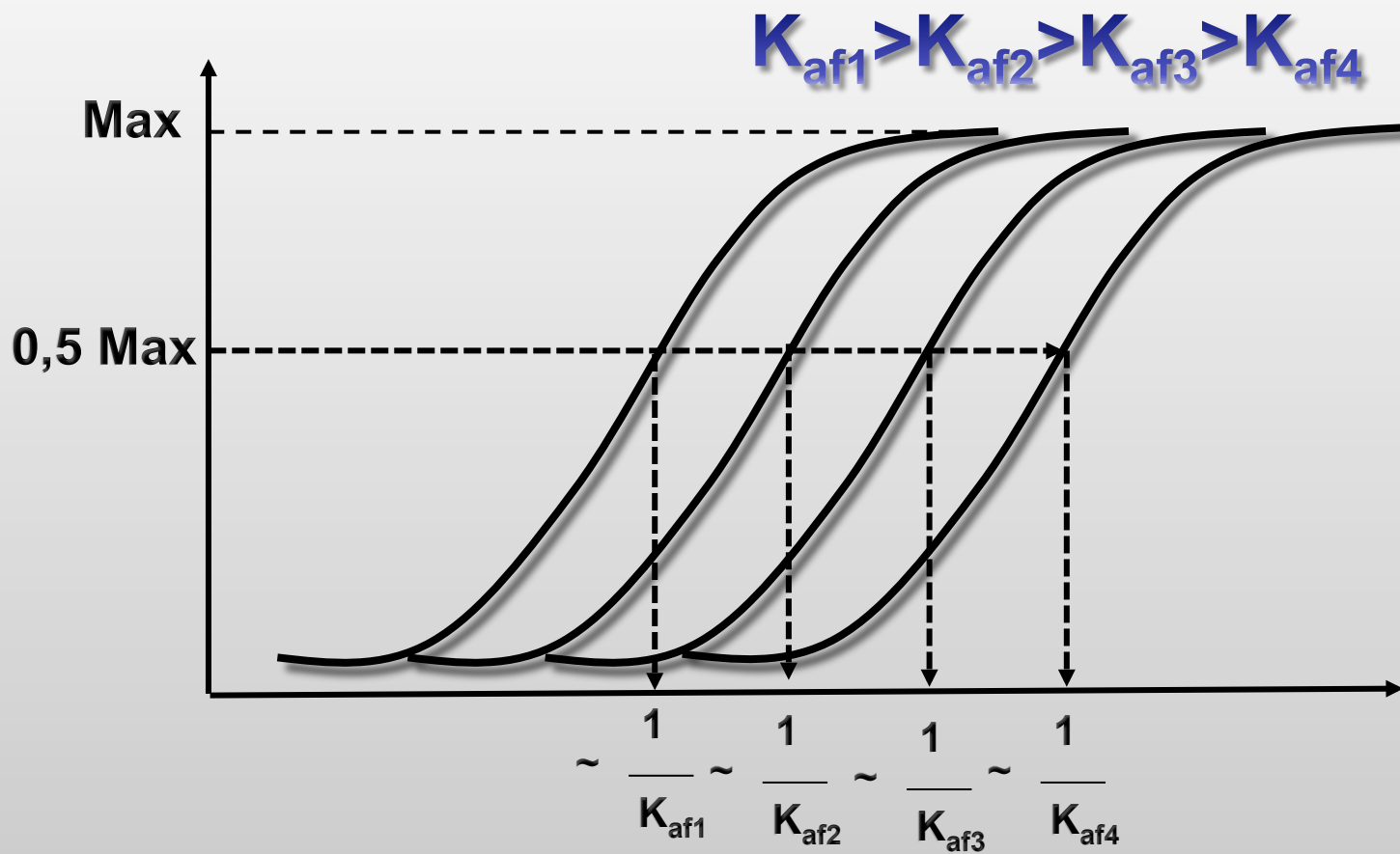
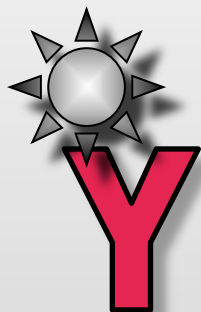
# Curva dosis-respuesta para detección de antígeno



# Curva dosis-respuesta

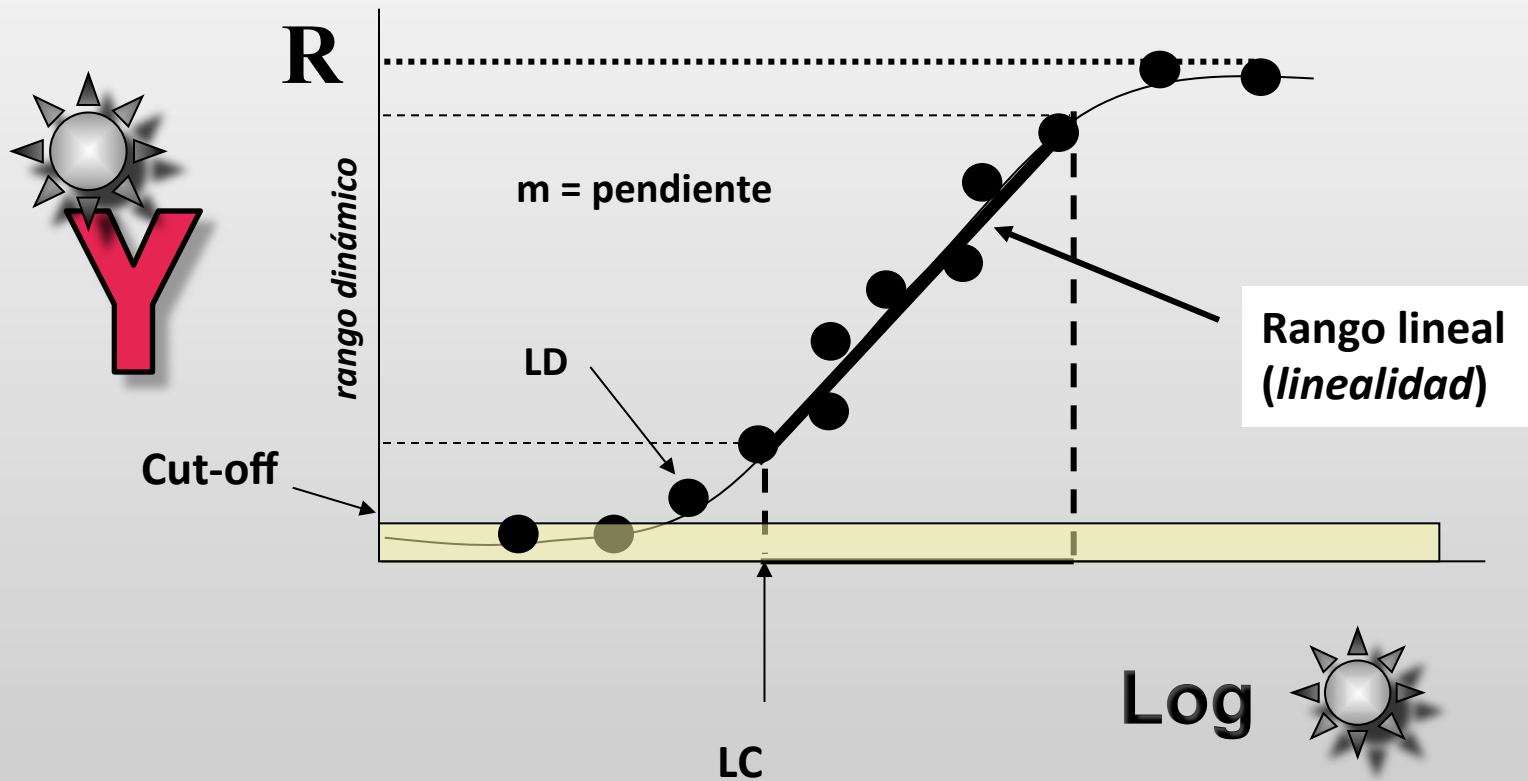




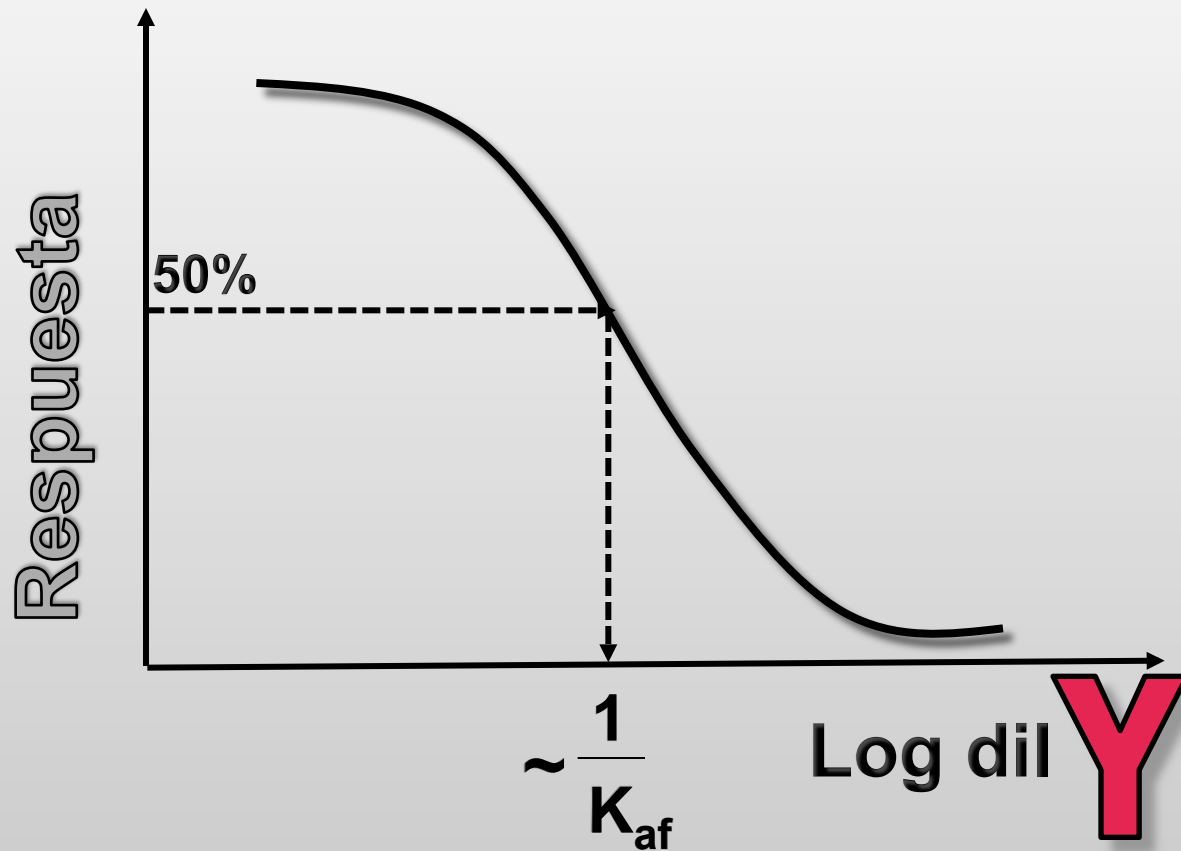


Log

# CUANTIFICACIÓN DEL Ag



# Titulación de Ac



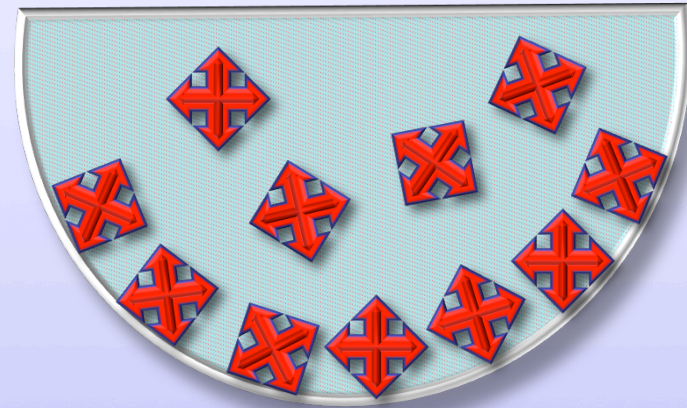
# Matrices plásticas

## Activación

L. A. Cantarero et al. *Analytical Biochemistry*  
**105**, 375-382 (1980)

# CARACTERISTICAS GENERALES DE LA INTERACCION SOLUTO (PROTEINA)- MATRIZ (ADSORCION DE ANTÍGENOS Y DE ANTICUERPOS)

- **La adsorción no sigue leyes de equilibrio químico:**
  - a. El soluto se fija según su **concentración** en la solución
  - b. El porcentaje de fijación a la matriz depende de:
    - el propio **soluto**
    - la **matriz**
    - el **área**
    - el solvente (**pH, fuerza iónica**)
    - temperatura**
    - tiempo**
  - c. La fijación es **irreversible y estable**
  - d. En sistemas mixtos **no hay competencia**
    - a bajas concentracion
    - hay **bloqueo** en altas concentraciones
  - e. No hay “**polarización**” (orientación preferencial) del soluto



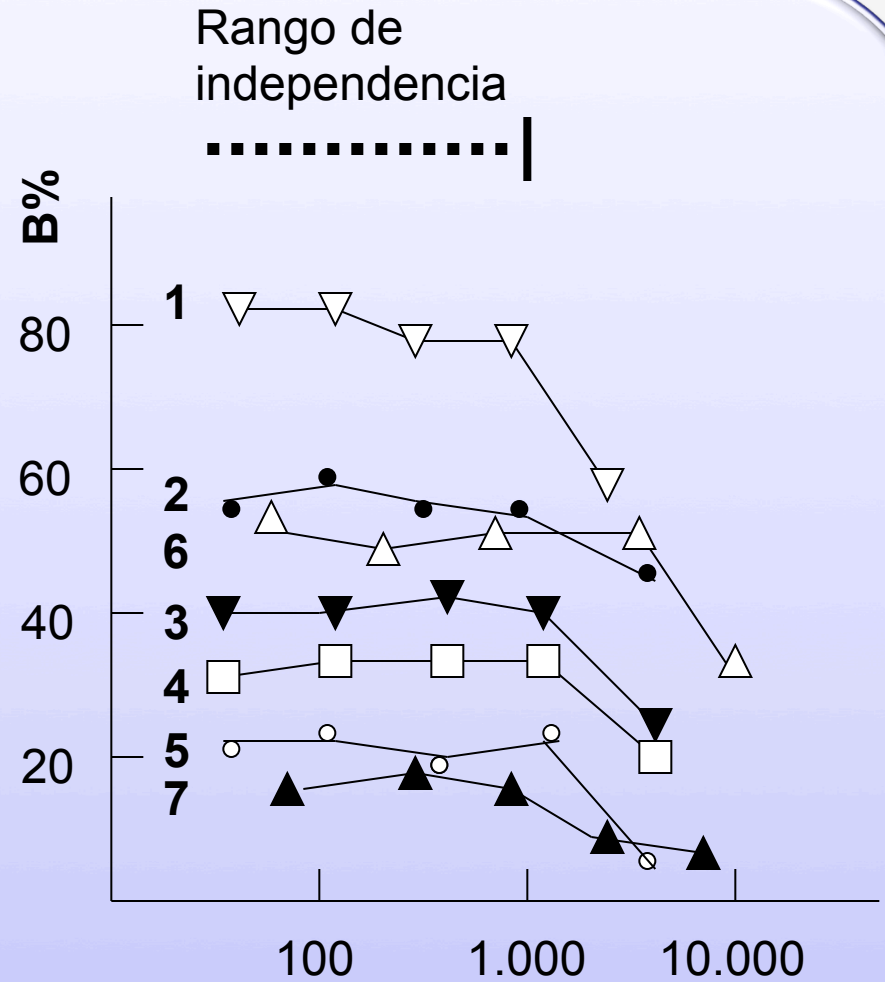
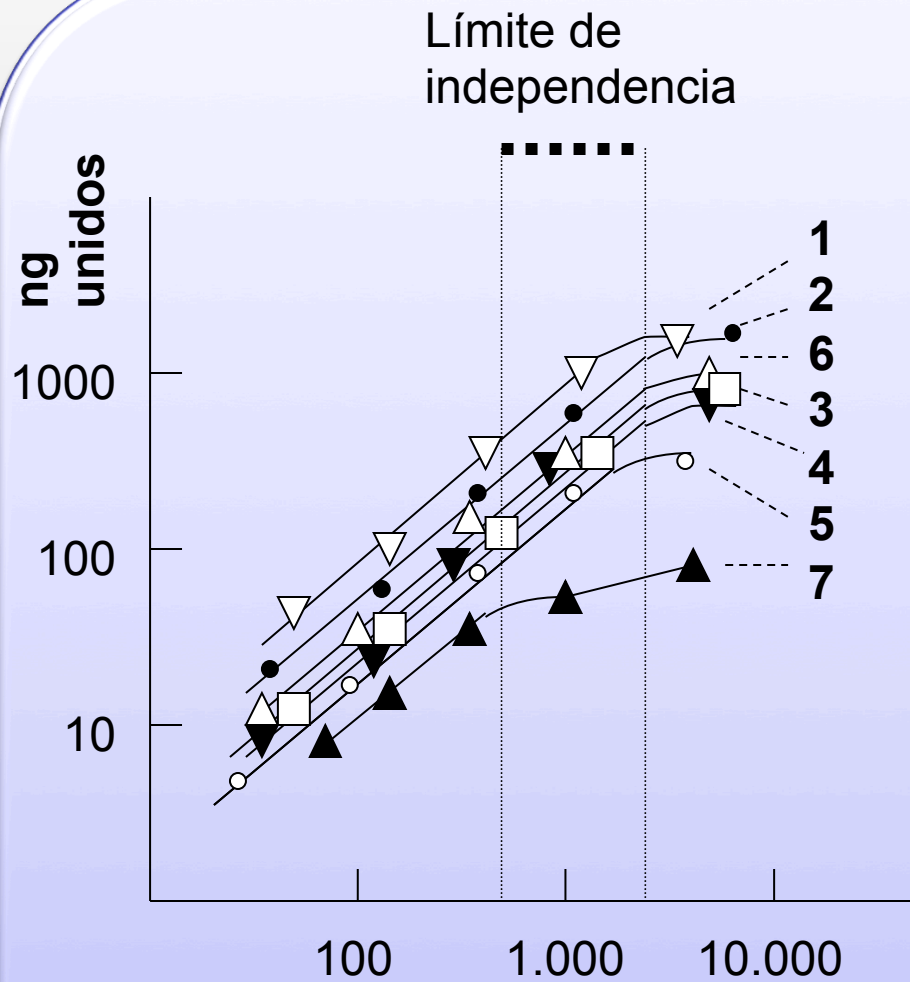
- **Según se fije el antígeno o el anticuerpo, las interacciones ulteriores entre ellos pueden alterarse por:**
  - La interacción monogámica
  - El efecto de la alta concentración local



# CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LAS PROTEINAS MODELO ADSORBIDAS

Proteína	Peso molecular	pI
1) IgM bovina	1.000.000	-
2) IgAs bovina	560.000	-
3) IgG1 bovina	160.000	5.5-6.8
4) IgG2 bovina	160.000	7.5-8.3
5) Seroalbúmina bovina	66.000	5.1
6) Ovoalbúmina	45.000	4.6
7) Lactalbúmina	14.000	4.2-4.5

# UNION DE LAS $^{125}\text{I}$ -PROTEINAS A TUBOS DE POLIESTIRENO



**Proteínas marcadas adicionadas (ng)**

# SENSIBILIDAD-ESPECIFICIDAD, VPP Y VPN DE INMUNOENSAYOS

# Sensibilidad y Especificidad de un Ensayo

$$\text{Sensibilidad} = \frac{[\text{Verdaderos +}]}{[\text{Verdaderos +}] + [\text{Falsos -}]}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{[\text{Verdaderos -}]}{[\text{Verdaderos -}] + [\text{Falsos +}]}$$

La confiabilidad de un resultado (+ o -) depende de la prevalencia del marcador en la población analizada

$$C (+) \text{ o } VPP = \frac{[+ \text{ en el ensayo}]}{[+ \text{ en el ensayo}] + [\text{falsos } +]}$$

$$C (-) \text{ o } VPN = \frac{[- \text{ en el ensayo}]}{[- \text{ en el ensayo}] + [\text{falsos } -]}$$



		Población		
		Marcador (+)	Marcador (-)	
Resultados del ensayo	Positivo (+)	Verdaderos positivos (a)	Falsos positivos (b)	<b>VPP (+)</b> $a / (a+b)$
	Negativo (-)	Falsos negativos (c)	Verdaderos negativos (d)	<b>VPN (-)</b> $d / (c+d)$
		<b>Sensibilidad</b> $a / (a+c)$	<b>Especificidad</b> $d / (b+d)$	<b>Prevalencia</b> $(a+c) / (a+b+c+d)$