Workshop OMICS days in Montpellier 2015

|  |
| --- |
| **IMGT**®**, the Global Reference in Immunogenetics and Immunoinformatics** |
| **Description** |
| IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® (http://www.imgt.org) was created in 1989 by the Laboratoire d'ImmunoGénétique Moléculaire (LIGM) of the Professors Marie-Paule Lefranc and Gérard Lefranc (University Montpellier 2 and CNRS) at Montpellier, France. IMGT® is the global reference in immunogenetics and immunoinformatics and is the first and, up to now, the only integrated information system in immunogenetics and immunoinformatics.The aim of the workshop is to familiarise biologists, bioinformaticians and computer scientists involved in immunogenetics and immunoinformatics research projects with the IMGT unique approach which bridges the gap from genes to 3D structures for immunoglobulin and T cell receptor repertoire analysis from fishes to humans, and for antibody engineering and humanization.This workshop will start with an overview of the IMGT® system built on the IMGT-ONTOLOGY axioms and concepts, and of its major databases. The main topics will be presented from sequences to structures and exemplified with IMGT/V-QUEST and IMGT/JunctionAnalysis for the analysis of nucleotide sequences and IMGT/DomainGapAlign for amino acid sequences, IMGT/3Dstructure-DB for 3D structures, contact analysis and paratope/epitope interactions, and the IMGT/mAb-DB interface with access to therapeutical antibodies data. |
| **Program**  |
| **Session 1. IMGT immunoinformatics for repertoire analysis of the adaptive immune response****Exercice pratique : Analyse des gènes V, D, J**🡺 A partir de "Gene tables", cliquer sur le numéro d'accès **X07448** (IGHV1-2\*01)Se familiariser avec un fichier à plat (flat-file) d’IMGT/LIGM-DB**Exercice pratique : Analyse des séquences réarrangées grâce aux outils IMGT/V-QUEST (pour les séquences nucléotidiques), IMGT/DomainGapAlign et IMGT/Collier-de-Perles (pour les séquences protéiques)**Exemple d’utilisation des outils avec le domaine VH (**séquences humaines** **trouvées dans le set de séquences tests fourni par IMGT/V-QUEST)*** accession number:  **>AF015123**
* accession number:  **> DQ100777**
* accession number: **> L26531** (utilisez les paramètres avancées pour les séquences avec délétions/insertions)

a) Faites une analyse **IMGT/V-QUEST** à partir de ces **3 séquences humaines** **-** donnez le nom des allèles des V, D et J-GENE les plus proches de votre séquence requête (dans result summary)* + quelle est la fonctionnalité de la séquence réarrangée ? Expliquez.
	+ notez la longueur des CDR (dans result summary)
	+ **Pour la séquence DQ100777 :** quel est le taux de mutation du V-GENE? Quelle est la signification d’un tel taux de mutation (séquences nucléotidiques) dans le V-GENE par rapport au pronostique des patients atteints d’une leucémie lymphoïde chronique? (dans result summary)
	+ **Pour la séquence DQ100777**: où sont localisées les mutations ? (**point 9** : tableau de mutations)
		1. **Pour la séquence DQ100777**: analysez les résultats obtenus avec **IMGT/JunctionAnalysis** (**point 4**)
	+ donnez la séquence en acides aminés (AA) de la jonction
	+ donnez les propriétés physicochimiques de ces acides aminés
	+ notez les AA importants.
		1. **Pour la séquence DQ100777**, récupérez la **séquence de la V-D-J-REGION en acides aminés au format FASTA** (**point 12**) et complétez vos résultats par une analyse avec IMGT/DomainGapAlign et IMGT/Collier-de-Perles.

Analyse avec **IMGT/DomainGapAlign** (sélection : 10 alignements)* + identifiez les allèles des V et J-GENE les plus proches de votre séquence requête.
	+ quel est le pourcentage d’identité (séquences protéiques) ?
	+ voir les alignements par paire
	+ donnez le nom et la position des 5 AAconservés

Analysez les **IMGT/Colliers-de-Perles** * + donnez la description du domaine V,
	+ identifiez les régions charpentes (FR-IMGT), les régions hypervariables (CDR-IMGT), les ancres IMGT® et les AAimportants

**Caractérisation d’un VH et d’un V-KAPPA**Utilisation d’IMGT/3Dstructure-DB en relation avec IMGT/Collier-de-Perles (pdb : 1a2y, exemple d’un VH ; pdb: 1eeq, exemple d’un V-KAPPA isolé)* Trouvez une structure de la protéine Len dans « *Molecule name (receptor or ligand*) ». Seules des structures de domaines variables des V-KAPPA isolés de cette protéine ont été déterminées. Sélectionnez le code PDB : 1eeq.
* Cliquez sur « IMGT Collier de Perles on 2 layers ». Repérez la position des CDR-IMGT.
* Notez les positions très conservées (en rouge).
* Délimitez la région V et la région J dans l’onglet « *Chain details* » et observez leur localisation sur le IMGT Collier de Perles ?
* Trouvez la composition en brins de chaque feuillet à partir du IMGT Collier de Perles et vérifiez-la dans l'onglet « *Chain details »*.
* Visualisez la structure avec Jmol.
* Colorez les 5 positions conservées en « *wireframe* » rouge (grâce aux séquences présentes au-dessus de l'applet Jmol). Que remarquez-vous sur leur localisation ?
* Reset. Sélectionnez « *complex colored by chains and CDRs* » et affichez les ponts disulfures.

🡪 Observez le sandwich bêta avec ses 2 feuillets, retenus entre eux par le pont disulfure. CDR2 et CDR3 appartiennent au même feuillet, tandis que CDR1 est entre les 2🡪 Observez les 5 positions IMGT conservées qui forment le cœur du repliement.* Différents formats d’anticorps (scFv, Fab, VH de dromadaire)
	+ Rappels sur la synthèse des IgG de dromadaire et de lama
	+ Analyse de la structure 3D d’un VH de dromadaire : IMGT/3Dstructure-DB, IMGT/DomainSuperimpose (pdb : 1jto)

🡪 Particularité de la boucle CDR3-IMGT (structure, longueur), pont disulfure entre CDR2 et CDR3), 4AA en position 42 (F, Y), 49 (E, Q), 50 (C, R) et 52 (F, G, L, W), rendant CC’ plus hydrophile. * Comparaison structurale du VH de dromadaire avec le VH humain : IMGT/DomainSuperimpose (pdb : 1jto\_A et 1hzh\_H)
* Nanobodies® (Ablynx)

*Note : VH = single-domain antibody* * + *Peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique (intéressant pour neutraliser les agents pathogènes comme la rage où le virus se réplique dans le cerveau ou encore pour traiter les symptômes de la maladie de Alzheimer. Ab conventionnels ne vont pas dans le CNS.*
	+ *Traversent la barrière rénale (<60kDa) donc est rapidement éliminé du sang (serum half life d’environ 2h, ce qui peut poser un pb pour le traitement de l’inflammation par ex)*
	+ *Demi-vie modulable (ex possibilité de pégylation)*
	+ *Très stables, donc très adaptés pour l’administration par voie orale.*
	+ *Production très bon marché.*
	+ *Semblent pas très bon pour la reconnaissance de petits antigènes*
	+ *Ne permettent pas de recruter les effecteurs pour propriétés effectrices comme ADCC ou CDC, ce qui limite leur application.*

**Session 2.** **IMGT immunoinformatics for therapeutic antibodies****Humanisation des anticorps par greffe  de CDR-IMGT**L'humanisation de l’anticorps alemtuzumab a été faite à partir de la séquence de l'anticorps de rat YTH 34.5HL (en vert), en utilisant la séquence humaine Newm (en rouge). Dans la chaîne lourde de l’anticorps humanisé, les délimitations des CDR (en vert) et des FR (en rouge) utilisées sont celles de Kabat. Deux changements d'acides aminés, S28> F et S35> T (en bleu) ont été rajoutés dans la séquence humanisée pour restaurer la spécificité et l’affinité. L’alemtuzumab a un pourcentage d’identité de 73% pour son VH avec le gène humain IGHV4-59\*04.\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_IGH V-D-J-REGION FR1-IMGT **CDR1-IMGT** FR2-IMGT **CDR2-IMGT** FR3-IMGT **CDR3-IMGT** FR4-IMGT (1-26) **(27-38)** (39-55) **(56-65)** (66-104) **(105-117)** (118-128) A B BC C C' C'C" C" D E F FG G  (1-15) (16-26) (27-38) (39-46) (47-55) (56-65) (66-74) (75-84) (85-96) (97-104) (105-117) (118-128) \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 1 10 1516 23 26 27 38 3941 4647 5556 65 66 74 75 80 84 85 89 96 97 104 105 11112 117 118 128 .........|....| |......|..| |..........| |.|....| |.......| |........| |.......| |....|...| |...|......| |......| |.....||....| |.........|Norway rat EVKLLESGG.GLVQP GGSMRLS**C**AGS **GFTF....TDFY** MNWIRQPA GKAPEWLGF **IRDKAKGYTT** EYNPSVK.G RFTISRDNTQ NMLYLQMNTLRA EDTATYY**C AREGHT.AAPFDY** WGQGVMVTVSSHuman QVQLQESGP.GLVRP SQTLSLT**C**TVS **GSTF....SNDY** YTWVRQPP GRGLEWIGY **VFYH...GTS** DDTTPLR.S RVTMLVDTSK NQFSLRLSSVTA ADTAVYY**C ARNLIA..GCIDV** WGQGSLVTVSSHumanized QVQLQESGP.GLVRP SQTLSLT**C**TVS **GFTF....TDFY** MNWVRQPP GRGLEWIGF **IRDKAKGYTT** EYNPSVK.G RVTMLVDTSK NQFSLRLSSVTA ADTAVYY**C AREGHT.AAPFDY** WGQGSLVTVSS 1. Commentez sur ces informations. b) Que proposeriez-vous si vous deviez humaniser cet anticorps de rat à l’heure actuelle ? Et pourquoi ?
* **Knobs-into-holes** pour les anticorps bispécifiques: IMGT/3Dstructure-DB relation avec IMGT/Collier-de-Perles et Contact analysis (pdb : 1hzh)

🡪 AA **T22 et Y86 du CH3** 🡪 Construire un tableau résumant les interactions impliquant les AA T22 et Y86* **Half-IG exchange** pour les anticorps bispécifiques : IMGT/3Dstructure-DB relation avec IMGT/Collier-de-Perles et Contact analysis (pdb : 1hzh)

 🡪AA **P10** 🡪 AA **K88 et F85.1 du CH3** **Anticorps thérapeutiques et FPIA: IMGT/mAb-DB*** INN (nomenclature des anticorps : d’IMGT-ONTOLOGY à la définition DCI (MP Lefranc, IMGT Poster et diaporama)
* mAb-DB : antibody status (development status)

🡪 Active (“preclinical” or “clinical phases”) vs. inactive (“Discontinued” or “withdrawn”) * Phase pré-clinique (ou phase 0): pharmacodynamique and pharmacocinétique
* Phase I: Tolérance et absence d’effets indésirable (sécurité)
* Phase II: Efficacité de la molécule vs. Placebo (détermination de la dose optimale)
* Phase III: Confirmation finale de la sécurité et de l’efficacité
* Phase IV (phase M ?): Suivi à long terme d'un traitement alors que la molécule est sur le marché

🡪 Réflexion sur la cause de l’échec d’un essai clinique (efficacité, sécurité, raisons techniques ou commerciales, …) pour les molécules retirées du marché (withdrawn)* mAb-DB : molécules humanisées (species : humanized ; application : therapeutic)

🡪 91 molécules humanisées dont 13 sur le marché et 16 en phase III  🡪 Réflexion : origine ? Pourcentage d’humanisation ?🡪 Construire un tableau en 2 dimensions avec en X, le % d’humanisation des V-kappa et en Y, le % d’humanisation des VH. Représenter les données pour les anticorps humains (en vert), humanisés (en rouge) et 2 anticorps chimériques (en rouge avec les valeurs des % d’identités comparés aux séquences humaines)* mAb-DB : Réflexion sur mAb-DB

🡪 A partir de la publication «Tremelimumab (CP-675,206), a Cytotoxic T Lymphocyte–Associated Antigen 4 Blocking Monoclonal Antibody in Clinical Development for Patients with Cancer » de Ribas et al. (2007), dégagez les informations importantes pour l’étude d’une molécule et d’un traitement |