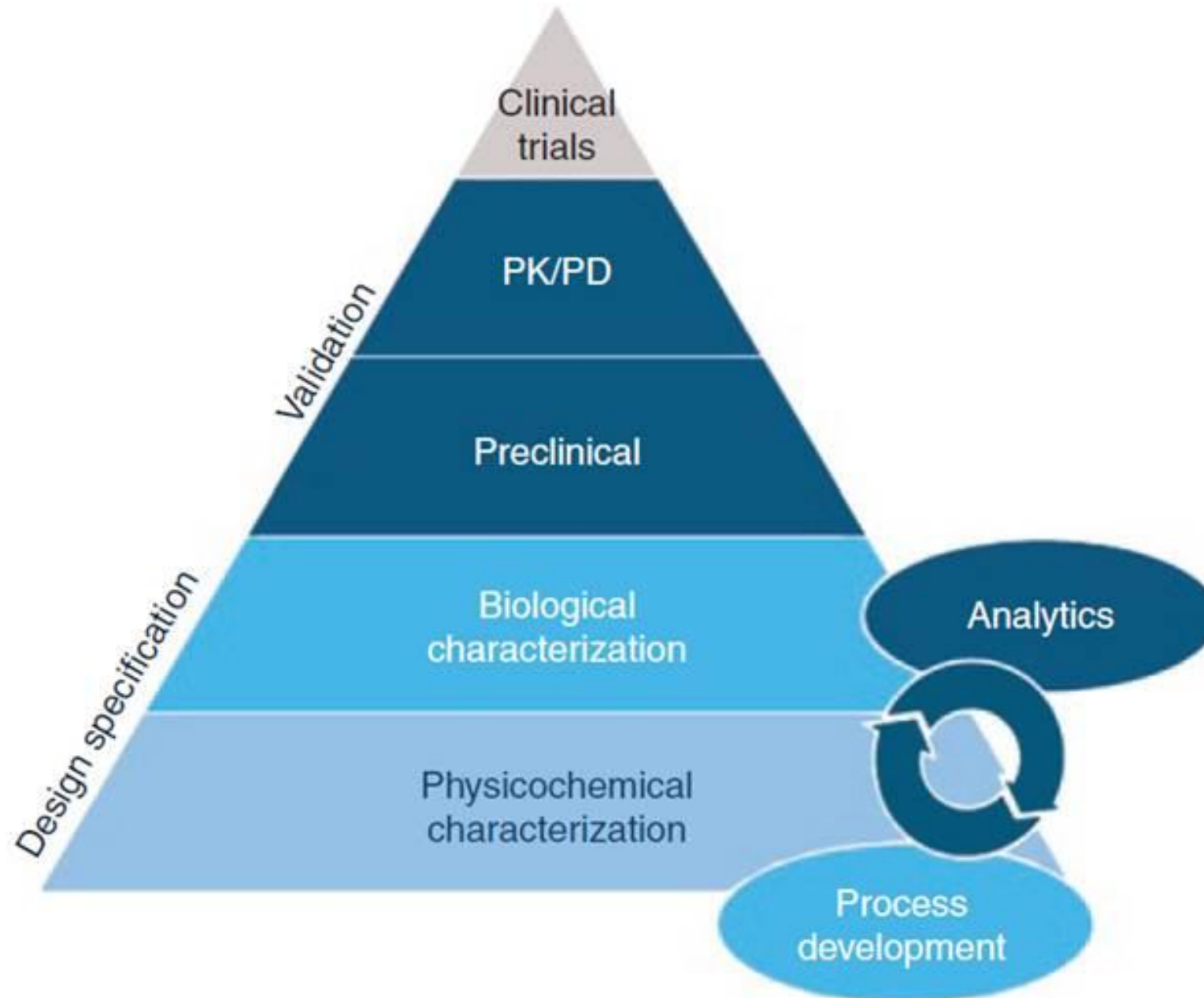


Fehérje hatóanyagok vizsgálata bioassay módszerekkel

Dr. Rábai Erzsébet

Richter Gedeon Nyrt.

„TOTALITY OF EVIDENCE”

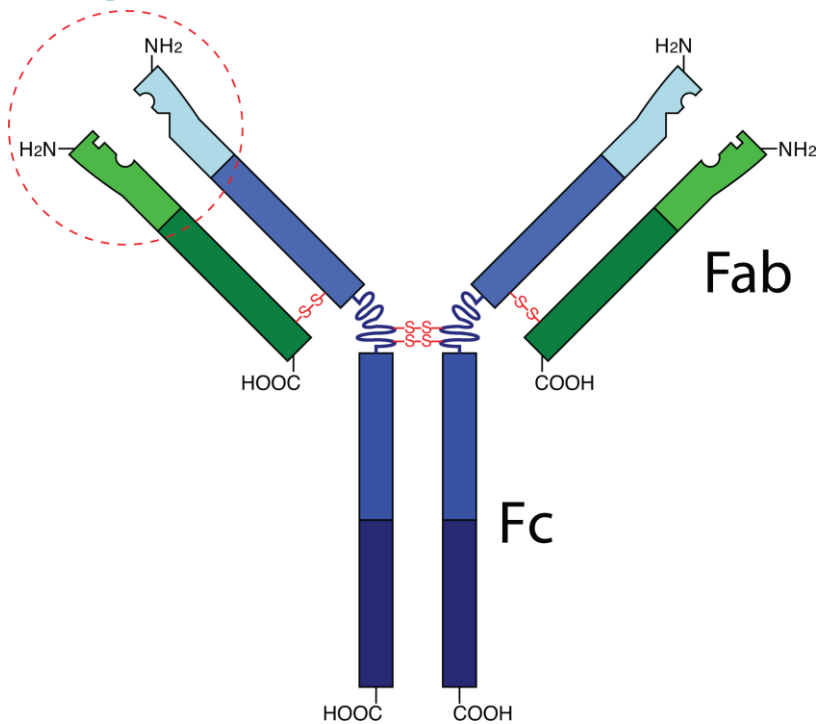


Biológiai karakterizálás

- Állatkísérleteknek nincs értelme – az antitestek fajspecifikusak
- A biológiai karakterizálást a klinikai vizsgálat követi
- Nagy a hangsúly az összes hatásmechanizmust korrekten modellező módszerek eredményein
 - Biohasonlóság igazolása

Biológiai vizsgálatok

antigénkötés



Fc-függő effektor funkciók

1. Kötési

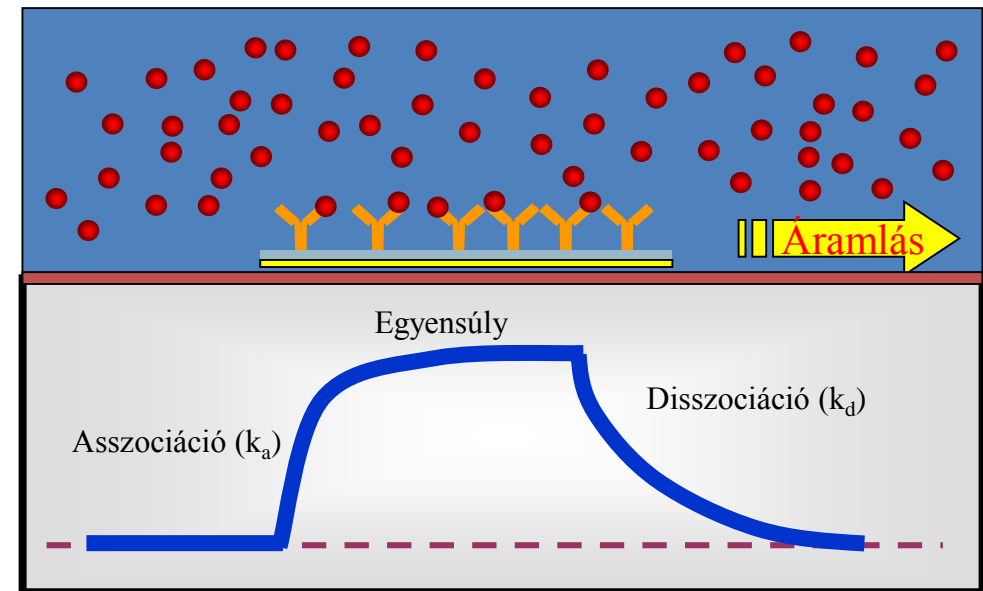
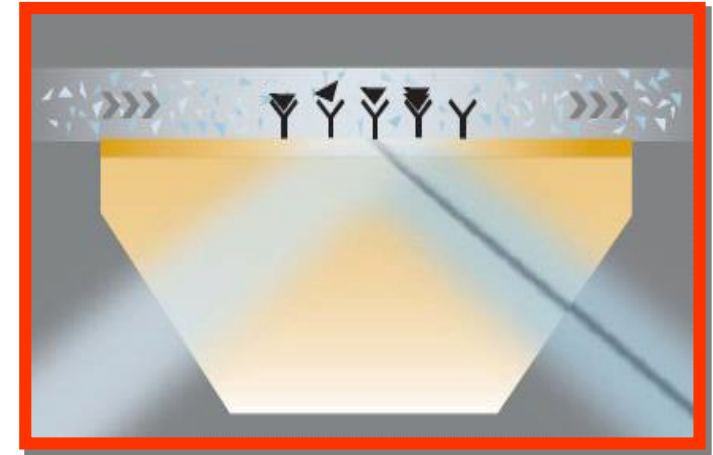
- antigén
- Fcγ receptorok
- FcRn receptorhoz
- komplementkötő képesség (C1q)

2. Funkcionális

- **Fab** régióhoz kapcsolódó funkciók
 - neutralizáció
 - receptor aktiváció, pl. proliferációgátlás
- **Fc** régióhoz kapcsolódó effektor funkciók
 - ADCC (antitestfüggő sejtes citotoxicitás)
 - CDC (komplementfüggő citotoxicitás)
 - Stb.

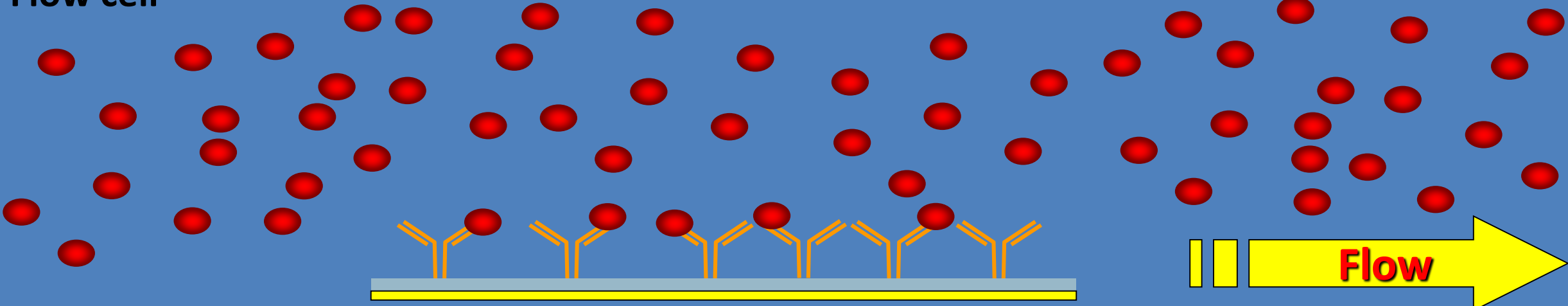
Surface Plasmon Resonance (SPR)

- Kötődés hatására megváltozik a felszín (változás a refraktív indexben)
- A változás arányos a felszínre kötődött anyag mennyiségével
- Előnyök:
 - Nem szükséges jelölés
 - Folyamatos követés (real time)
 - Olyan adatok számolhatók vele, melyek a kötést jellemzik
- Hátrány: immobilizálás szükséges
- Megválaszolható kérdések:
 - Mennyire specifikus a kötődés?
 - Milyen gyors a kölcsönhatás (k_a)?
 - Milyen stabil a komplex (k_d)?
 - Milyen erős a kölcsönhatás (K_D)?



From binding to SPR sensorgram

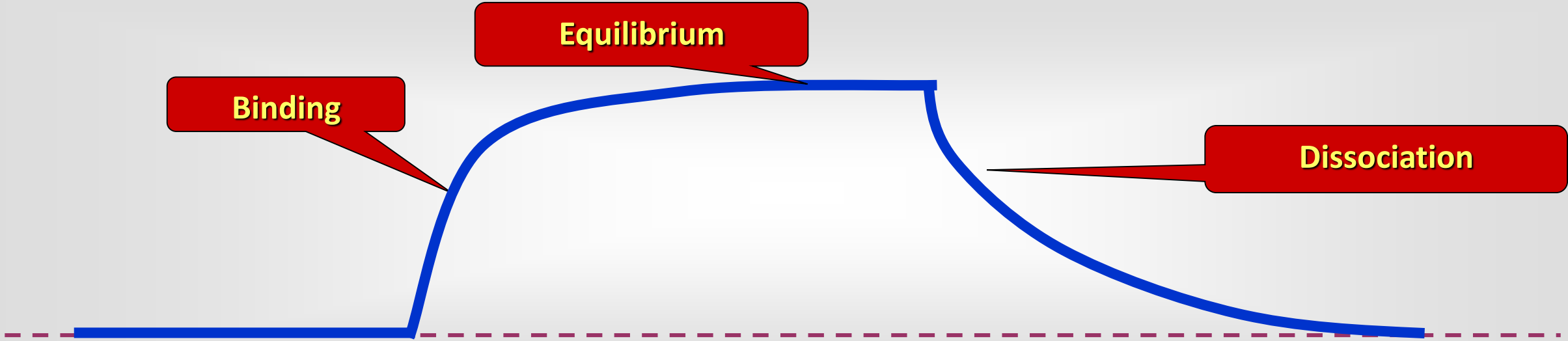
Flow cell



Equilibrium

Binding

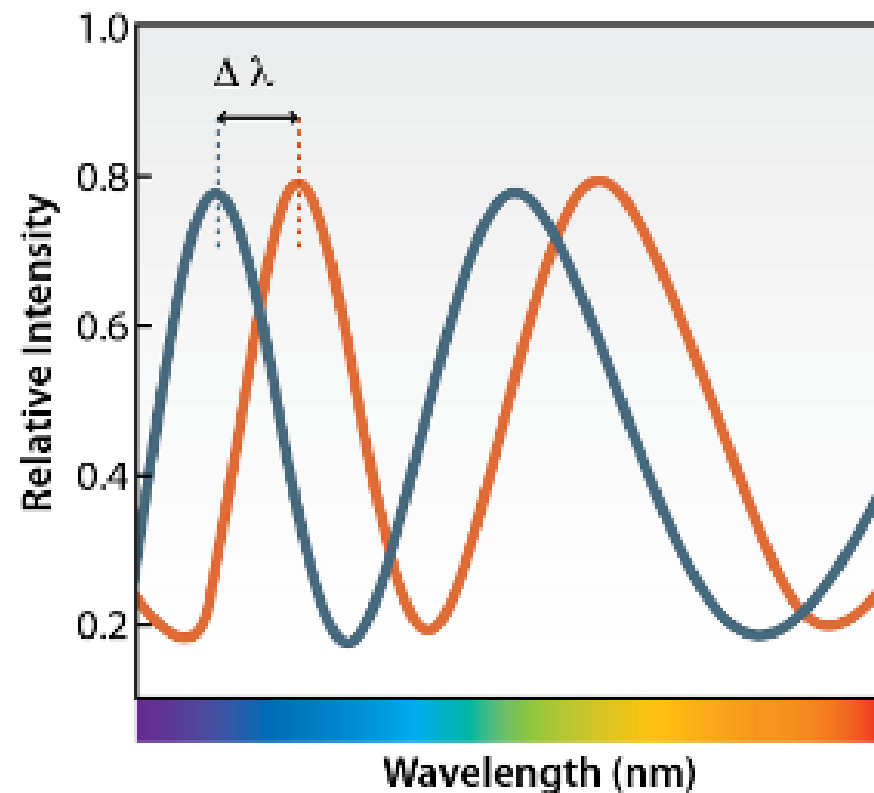
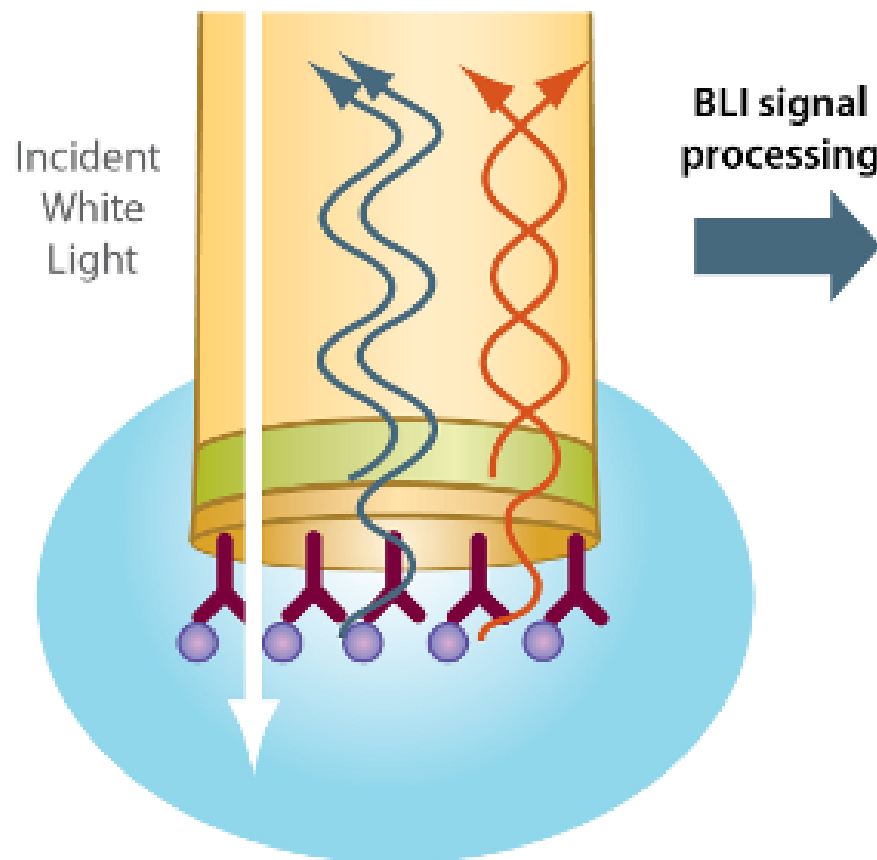
Dissociation



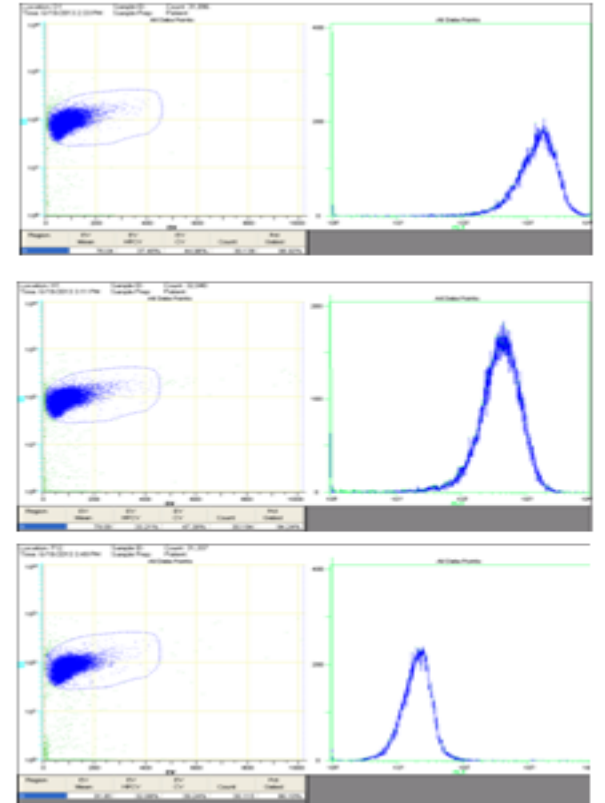
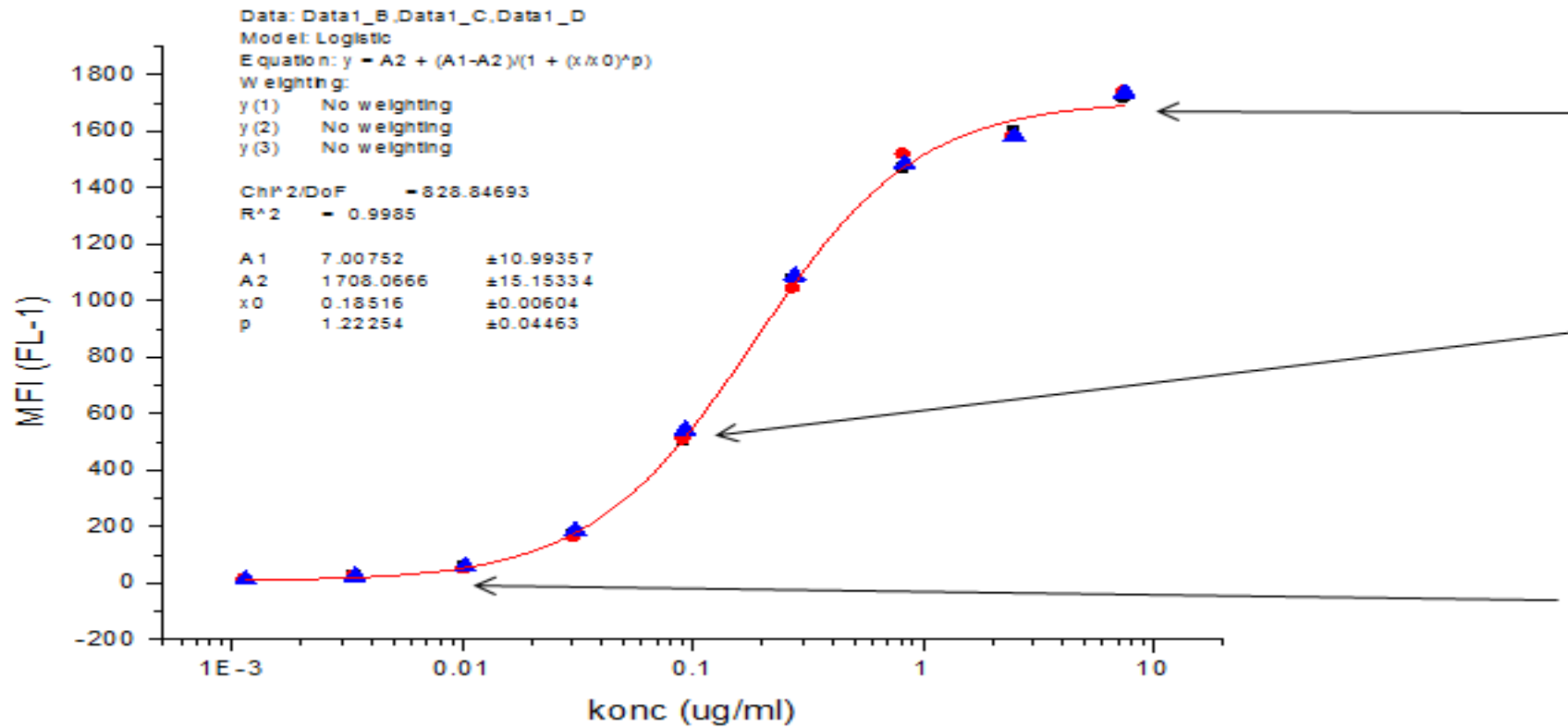


Octet Red

Bio-layer interferometry (BLI)

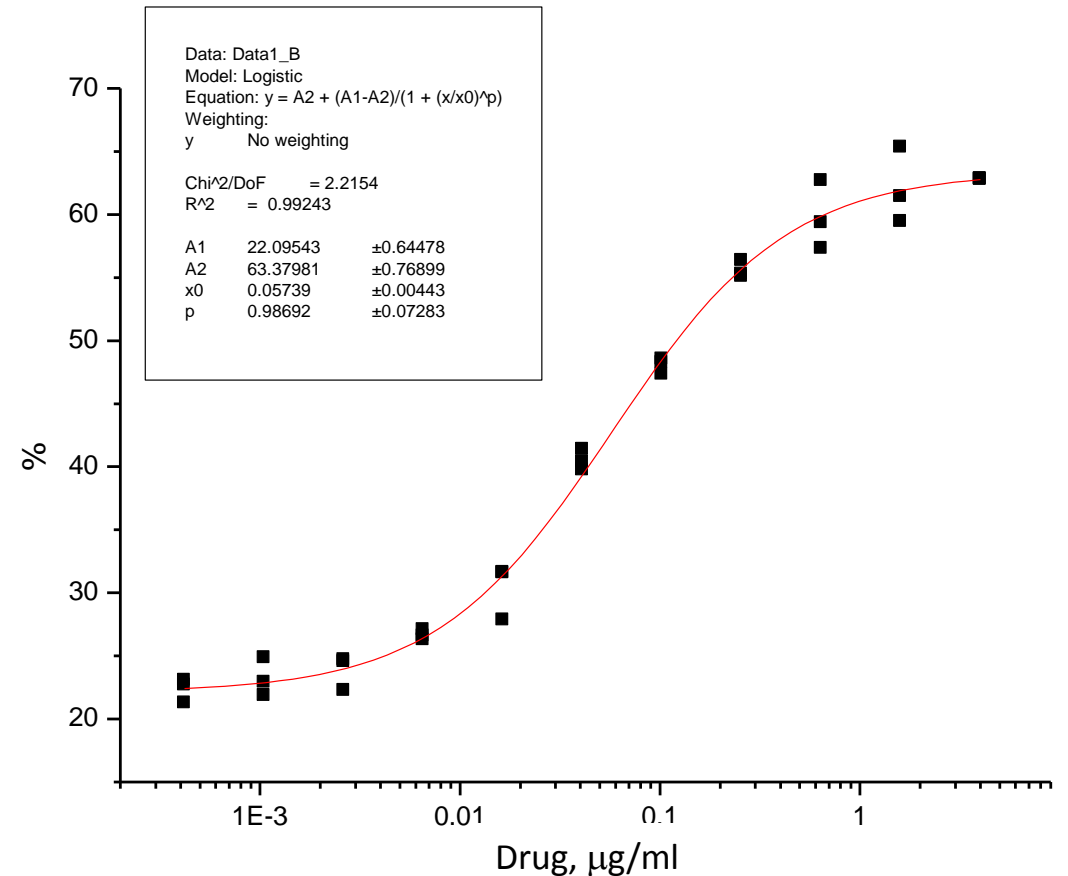


Sejtes kötési assay

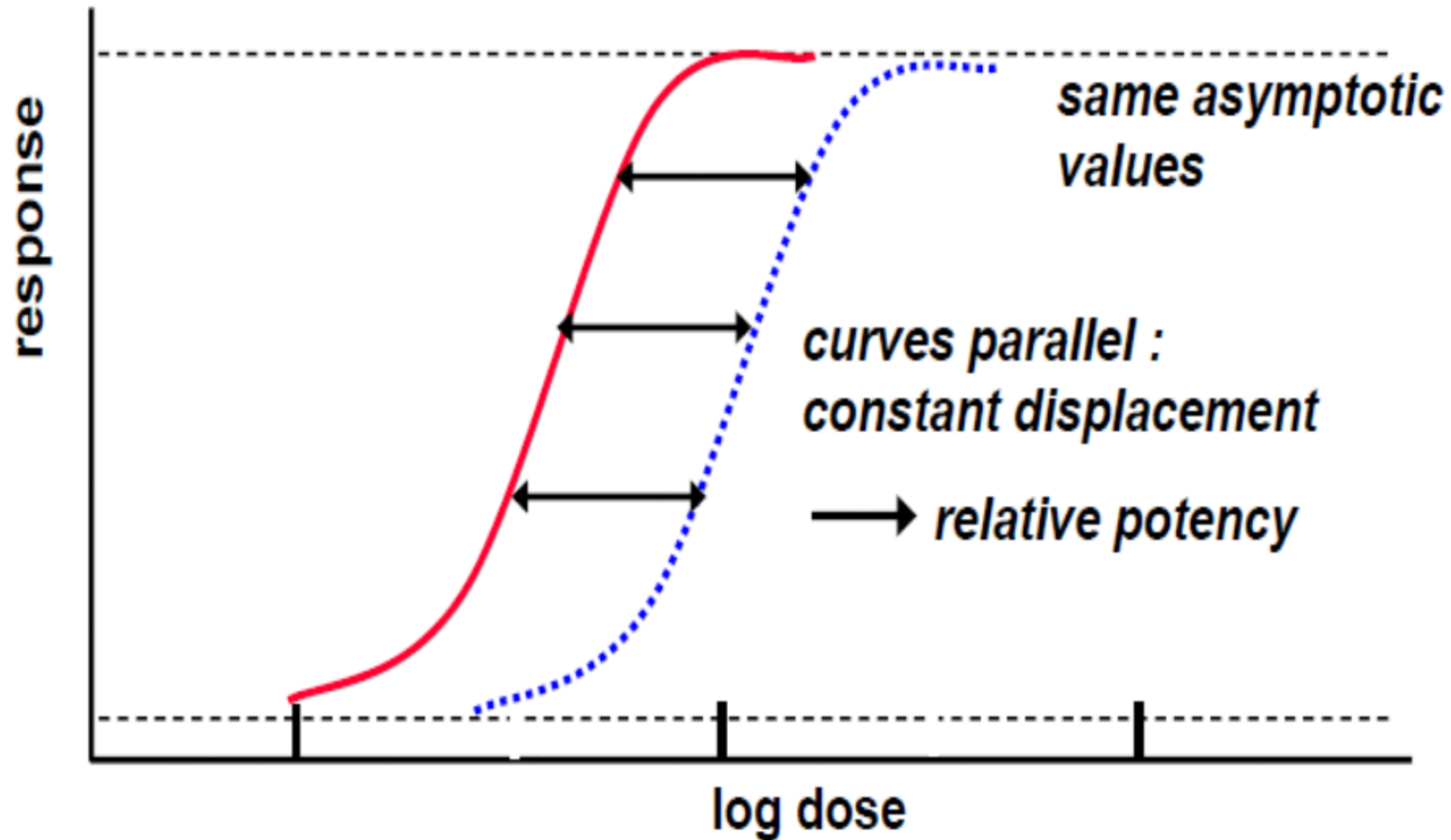


Sejtalapú biológiai vizsgálatok

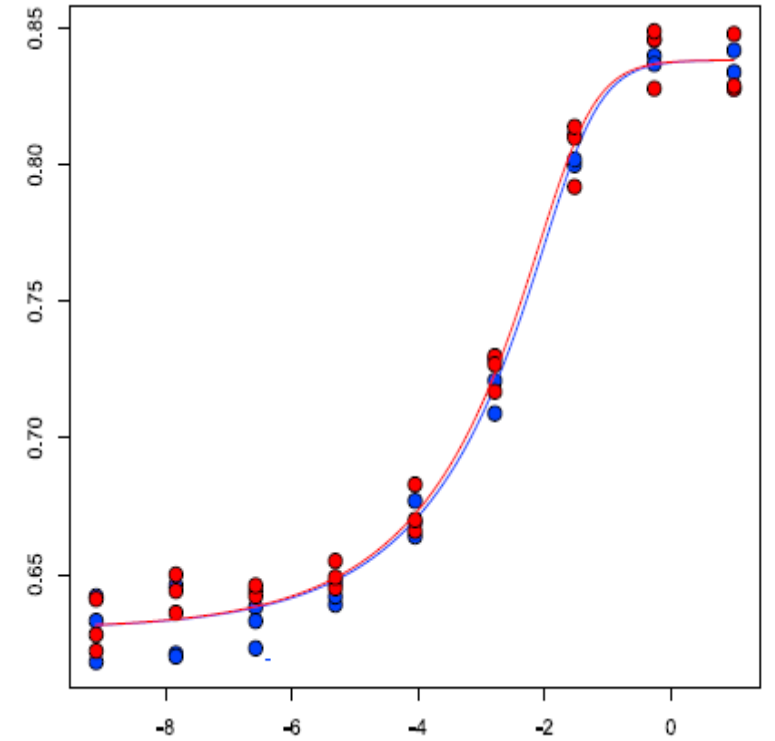
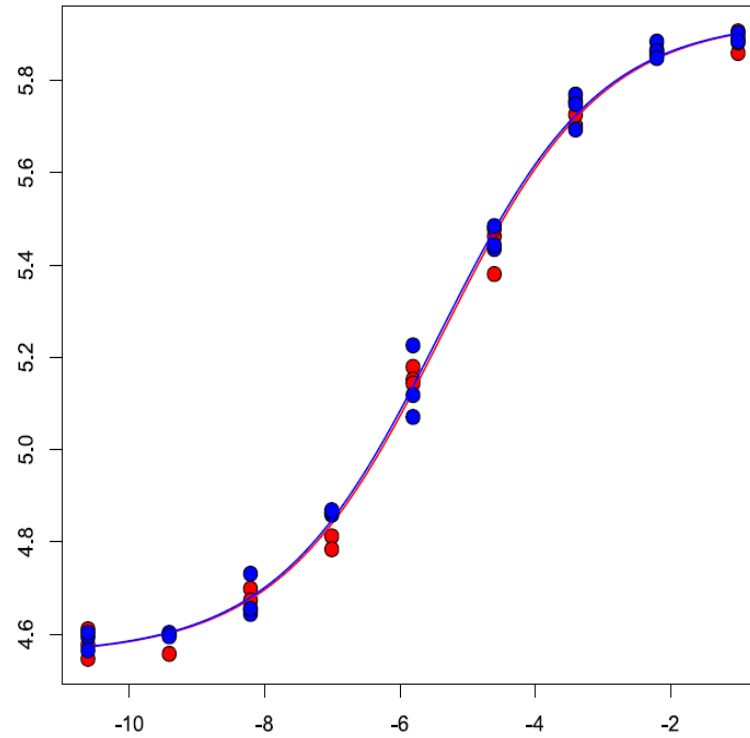
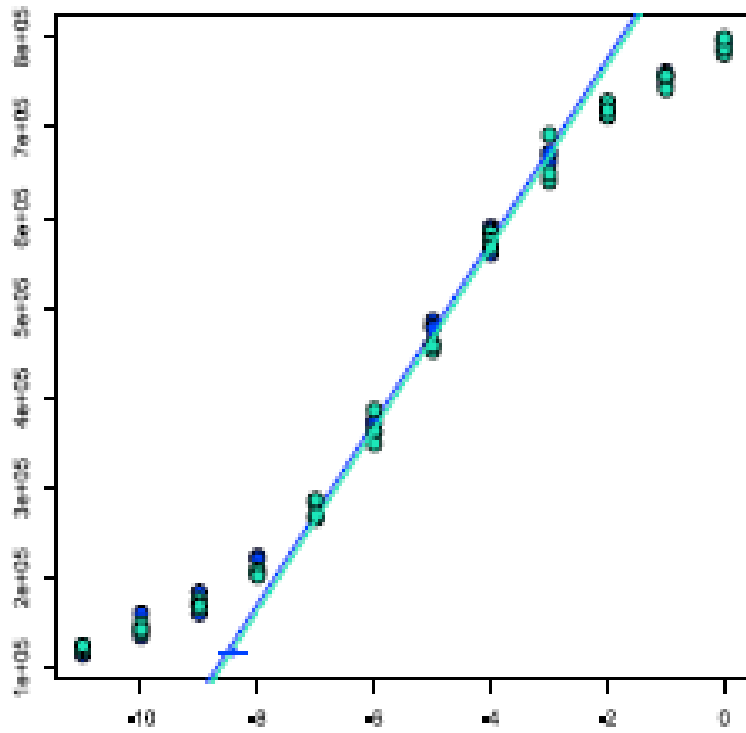
- A sejteken a hatóanyag által kiváltott
 - Proliferáció
 - Receptoraktiváció
 - Apoptózis
 - Sejtpusztulás
 - Citokintermelés
 - Génexpresszió
 - stb.
- EC50 változékonysága



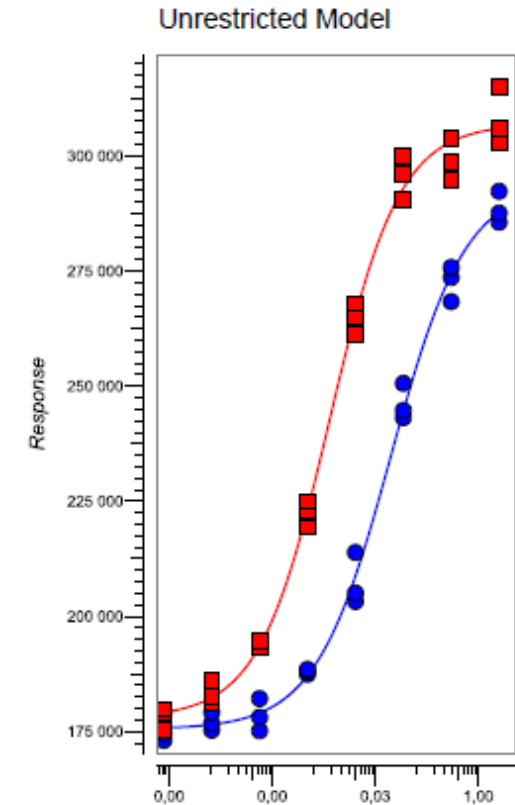
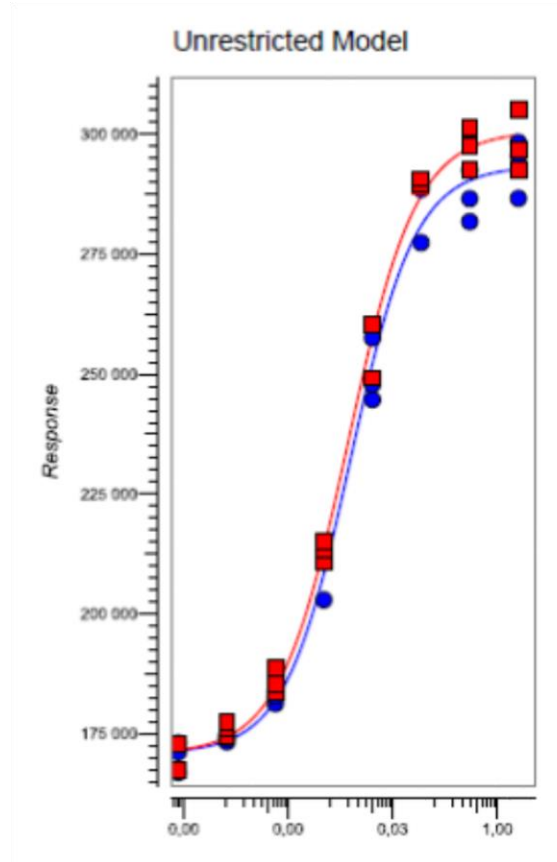
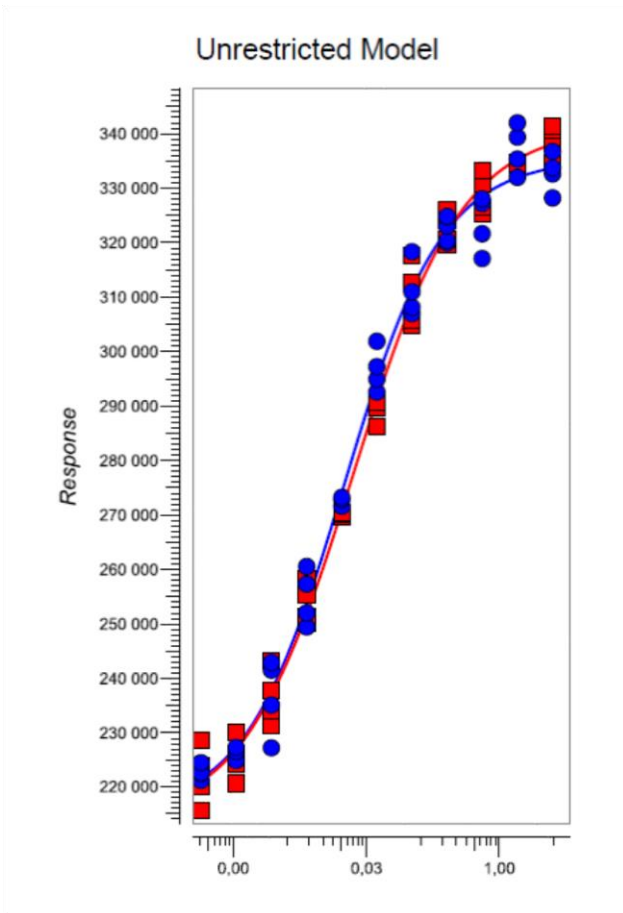
Megoldás: referenciához viszonyított, relatív mérések



Lineáris, 4 PL és 5 PL modell



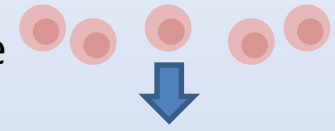
Ha a görbék nem párhuzamosak



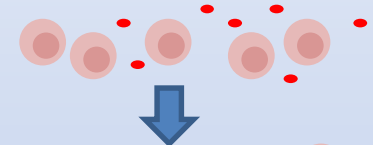
Proliferációs bioassay

- Az NFS60 egér leukémia sejtekben a pegfilgrasztim proliferációt indukál
- 96 órás pegfilgrasztim kezelés, AlamarBlue detektálás
- Értékelés: „parallel line” analízis

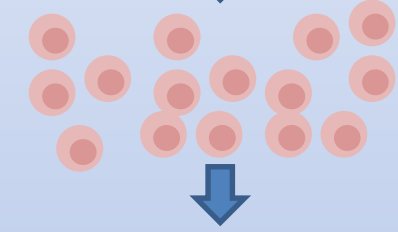
NFS60 sejtek kiültetése



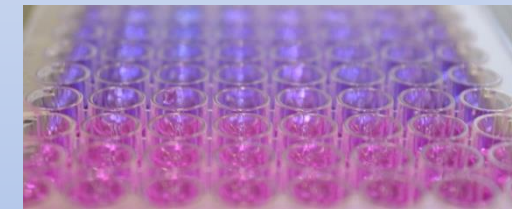
Pegfilgrasztim kezelés



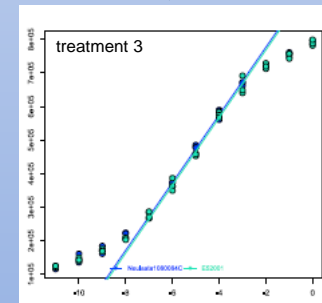
Proliferáció



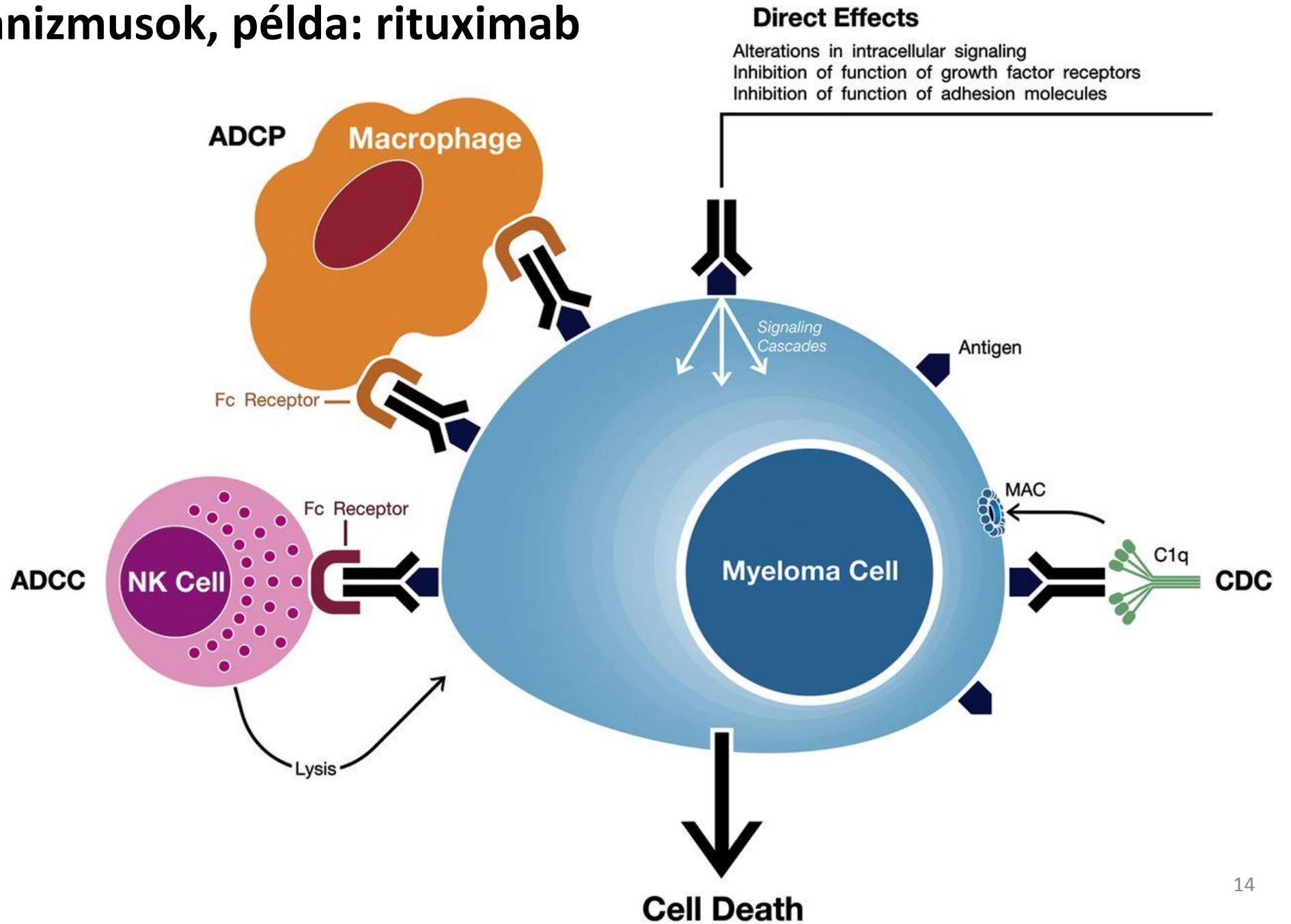
Detektálás:
AlamarBlue



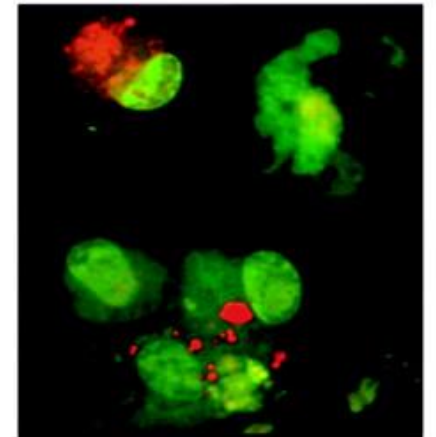
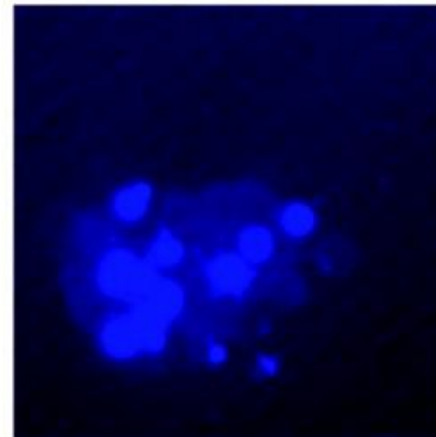
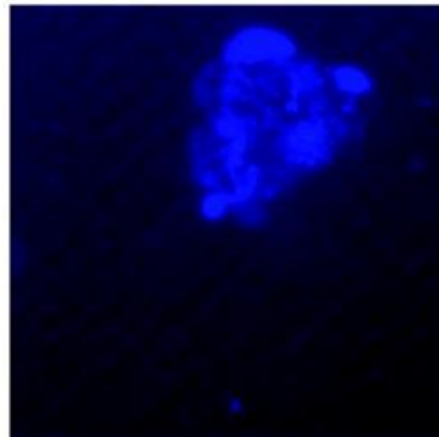
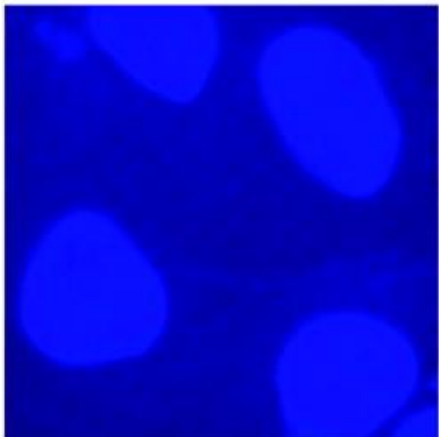
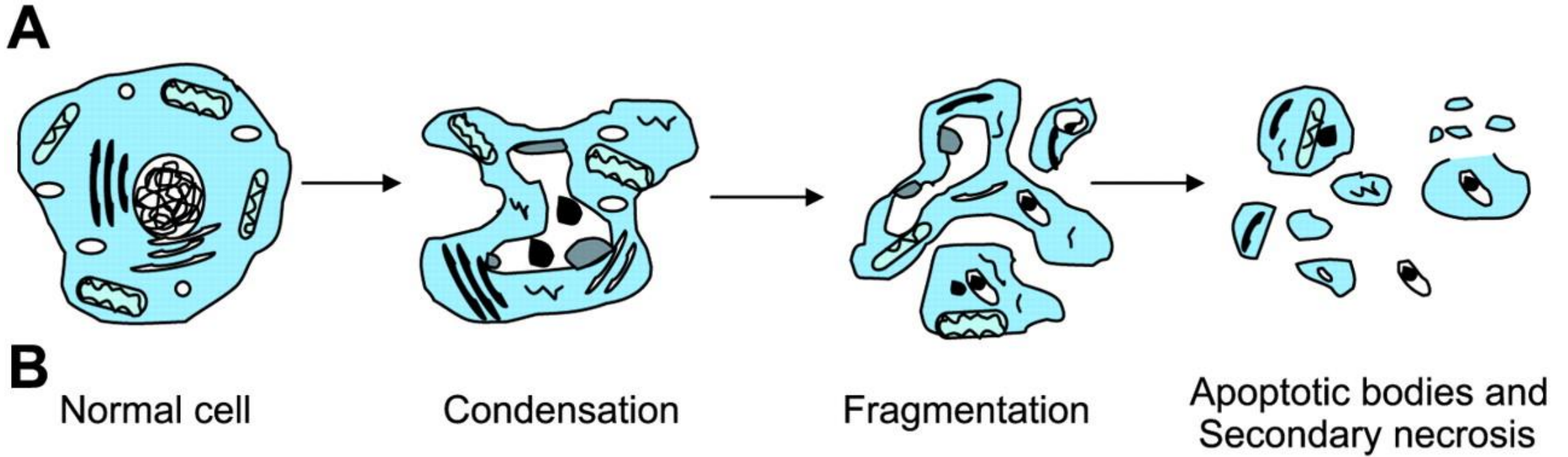
Értékelés



Fő hatásmechanizmusok, példa: rituximab

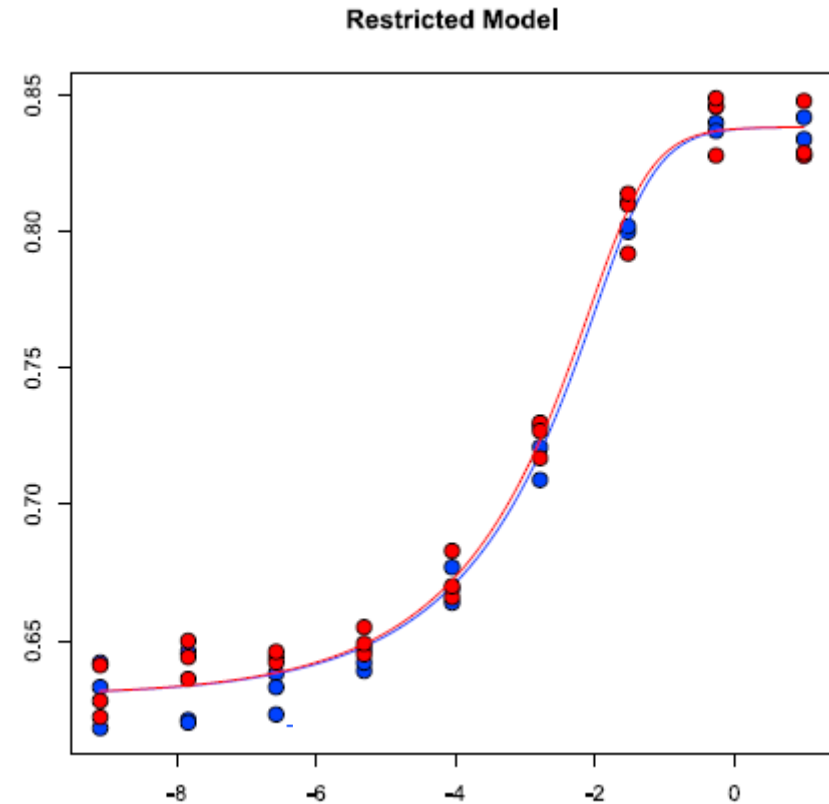


Apoptózis

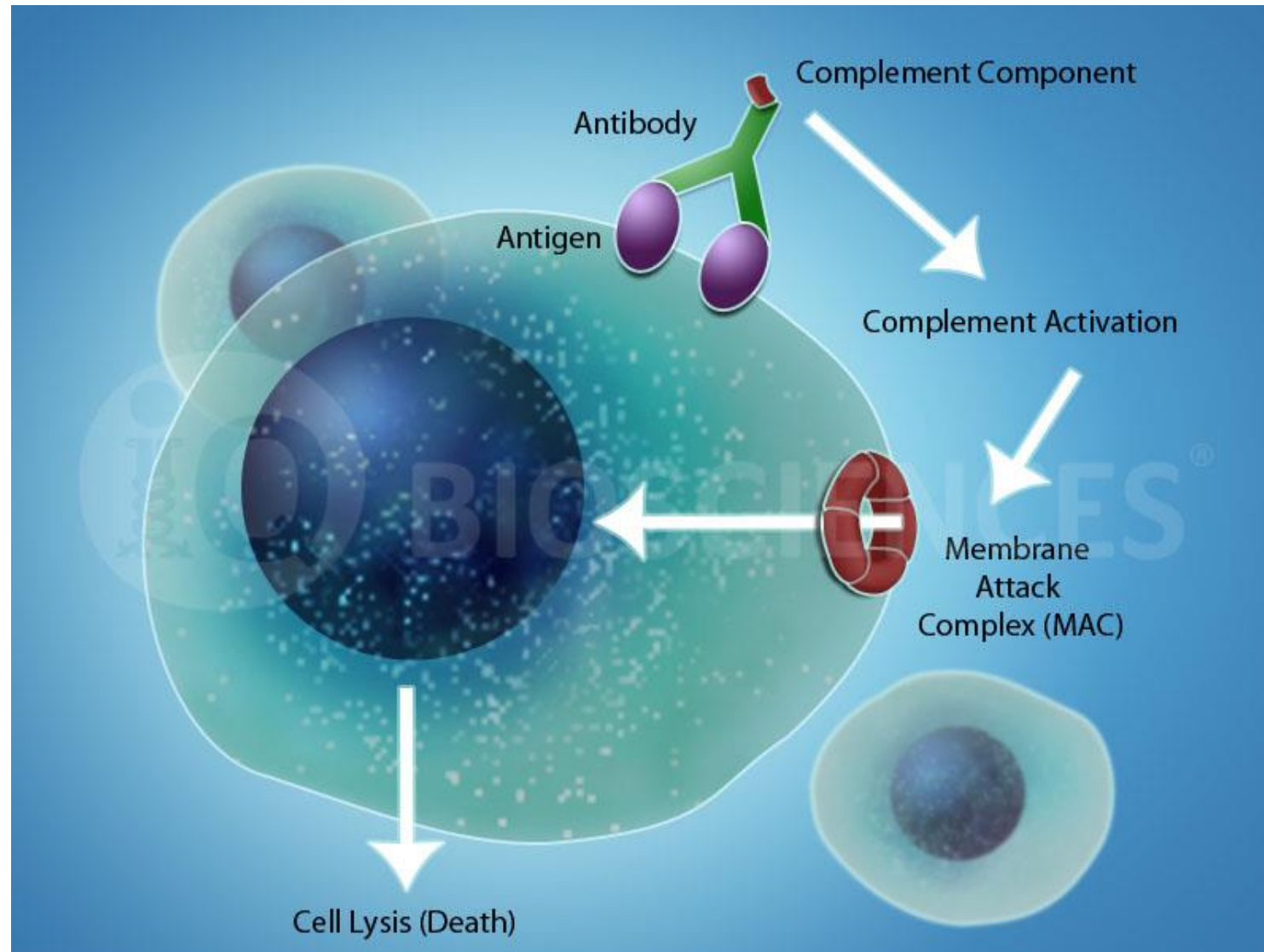


Apoptózis

- CD20 kötése által kiváltott folyamat
- 4 napos vizsgálat
- AlamarBlue detektálás

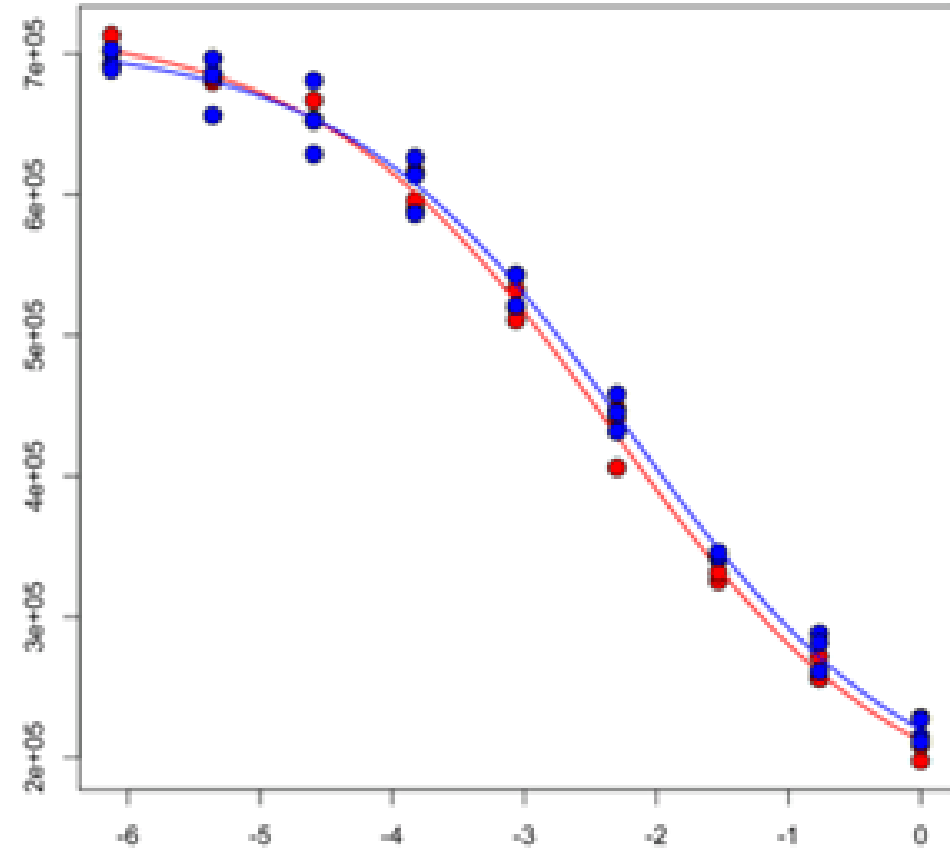


Komplementfüggő citotoxicitás (CDC)

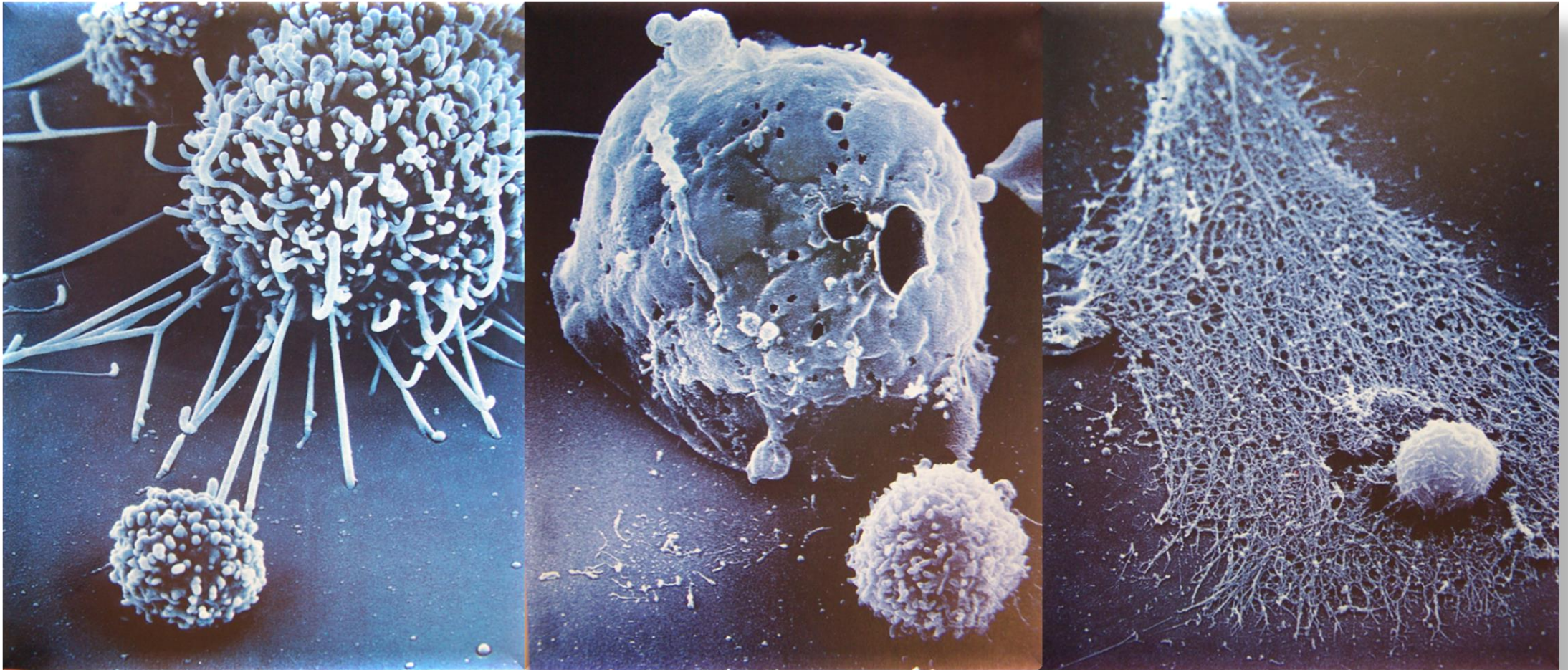


Komplementfüggő citotoxicitás (CDC)

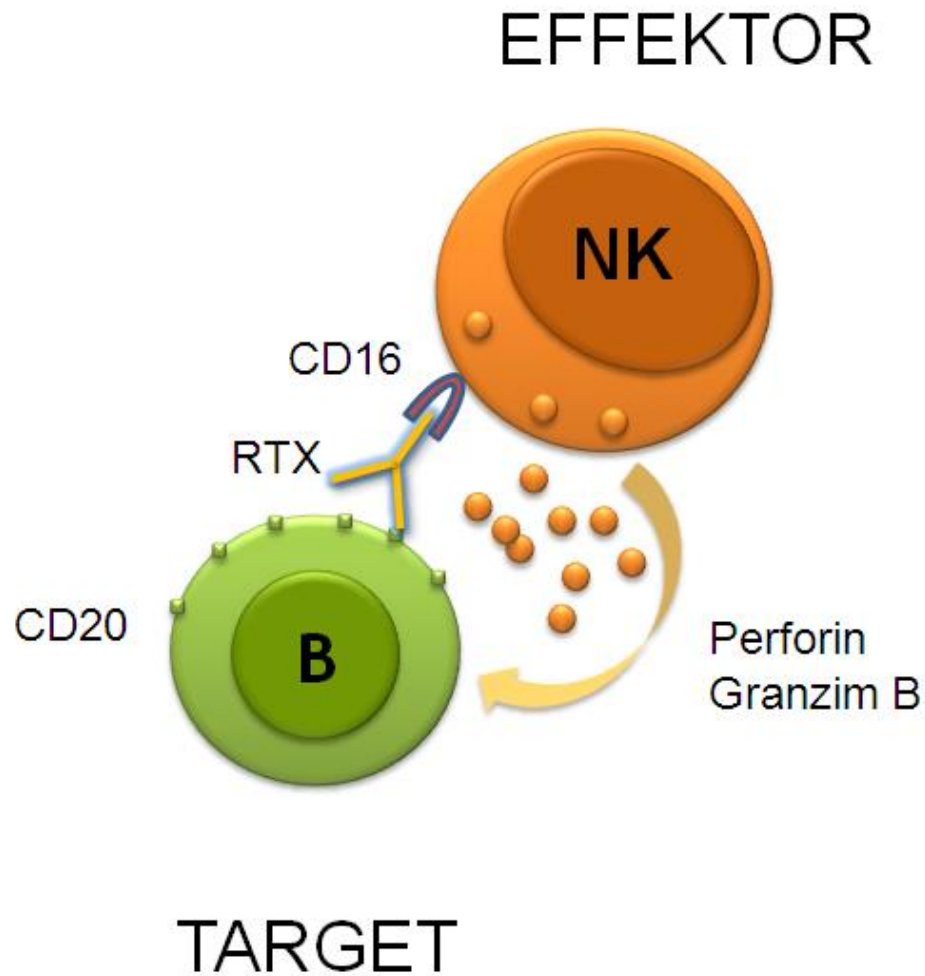
- CD20-at hordozó célsejt
- Rituximab kötődése hatására aktiválódik a komplement-rendszer → membránkárosító komplex (MAC) → lízis
- Detektálás: AlamarBlue



Antitestfüggő sejtes citotoxicitás (ADCC)



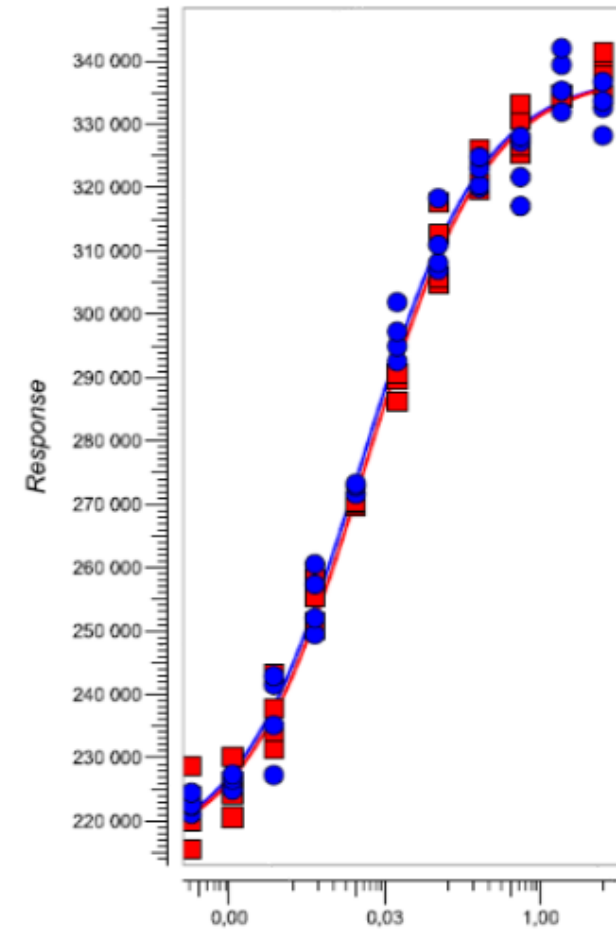
Hagyományos antitestfüggő sejtes citotoxicitás (ADCC)



- CD20-at hordozó célsejtek
- FcγRIIIa-t hordozó természetes ölősejtek
- A rituximab az antigénhez és az Fcγ receptorhoz kötődése által összekapcsolja a sejteket, és aktiválja az ölősejtet
- Hatására citotoxikus fehérjék szabadulnak fel → lízis

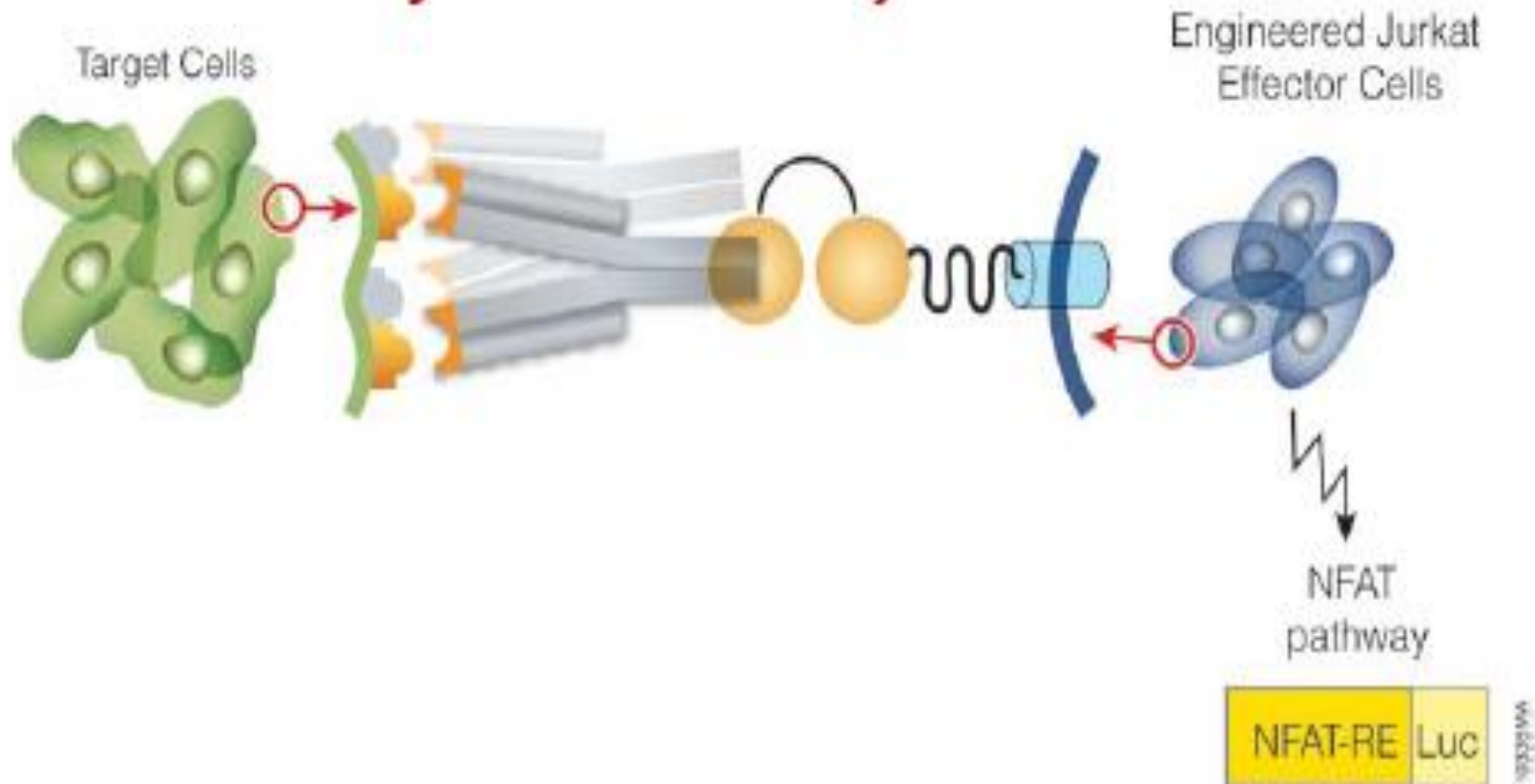
Hagyományos ADCC bioassay

- Végpontja: citotoxicitás
- Effektorsejtek: PBMC vagy sejtvonalak
- Variabilitás
- Reprodukálhatóság problémás



Riportergénes ADCCC bioassay

NFAT-RE luciferase bioassay



Az ADCC bioassay kivitelezése

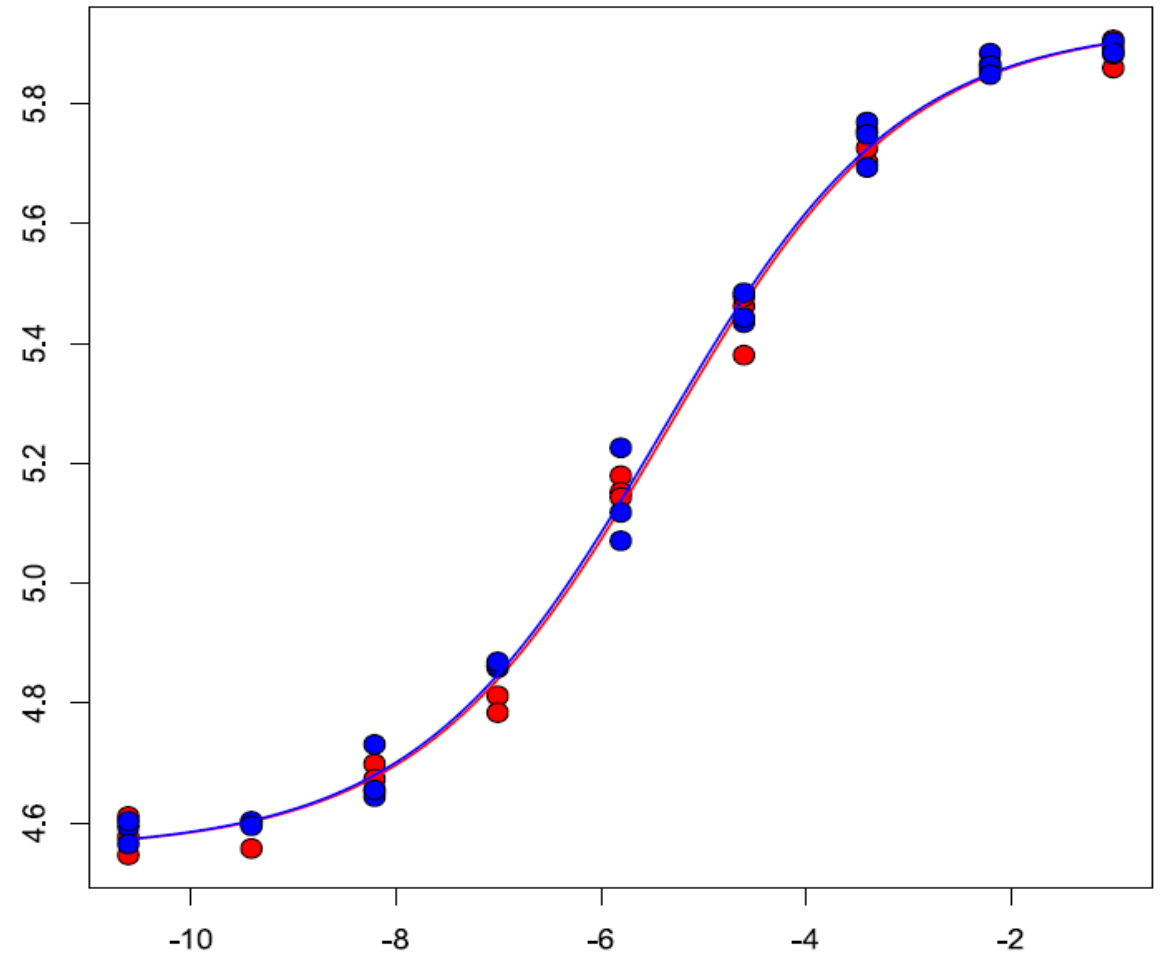
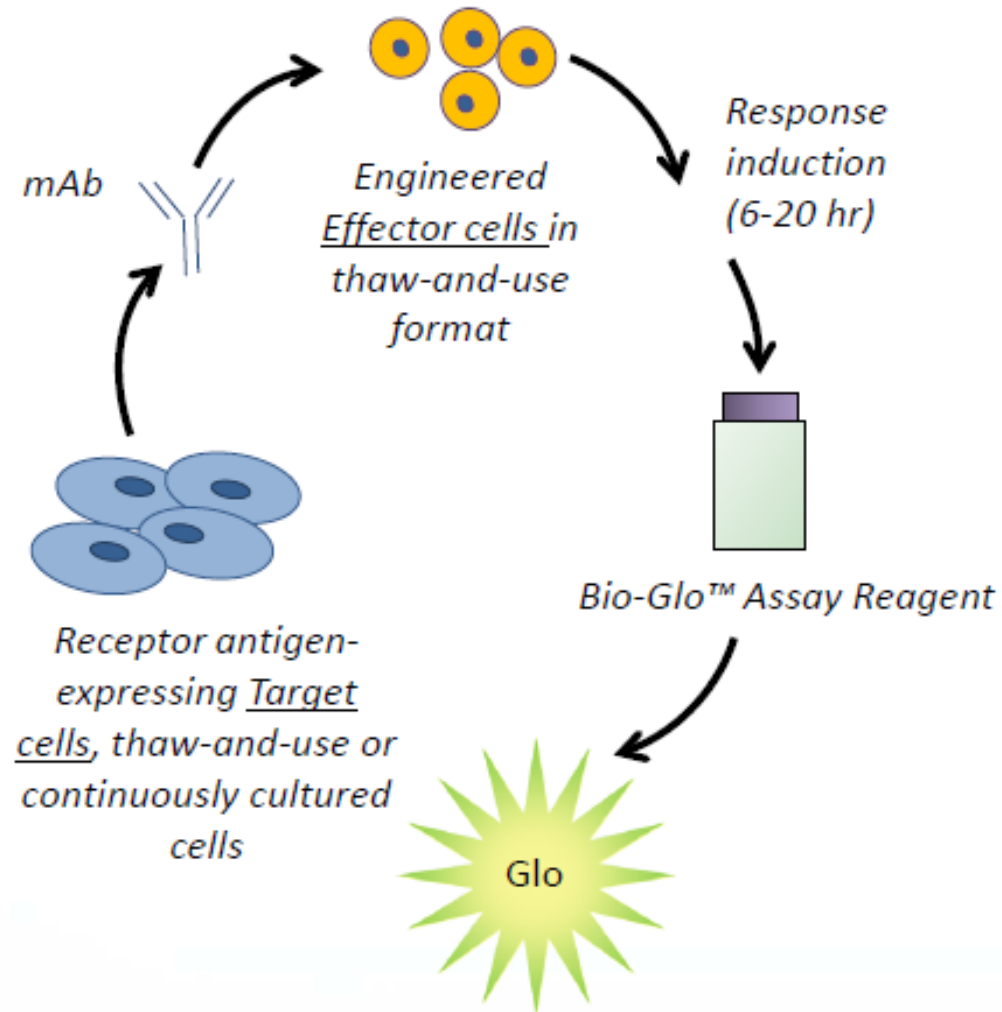
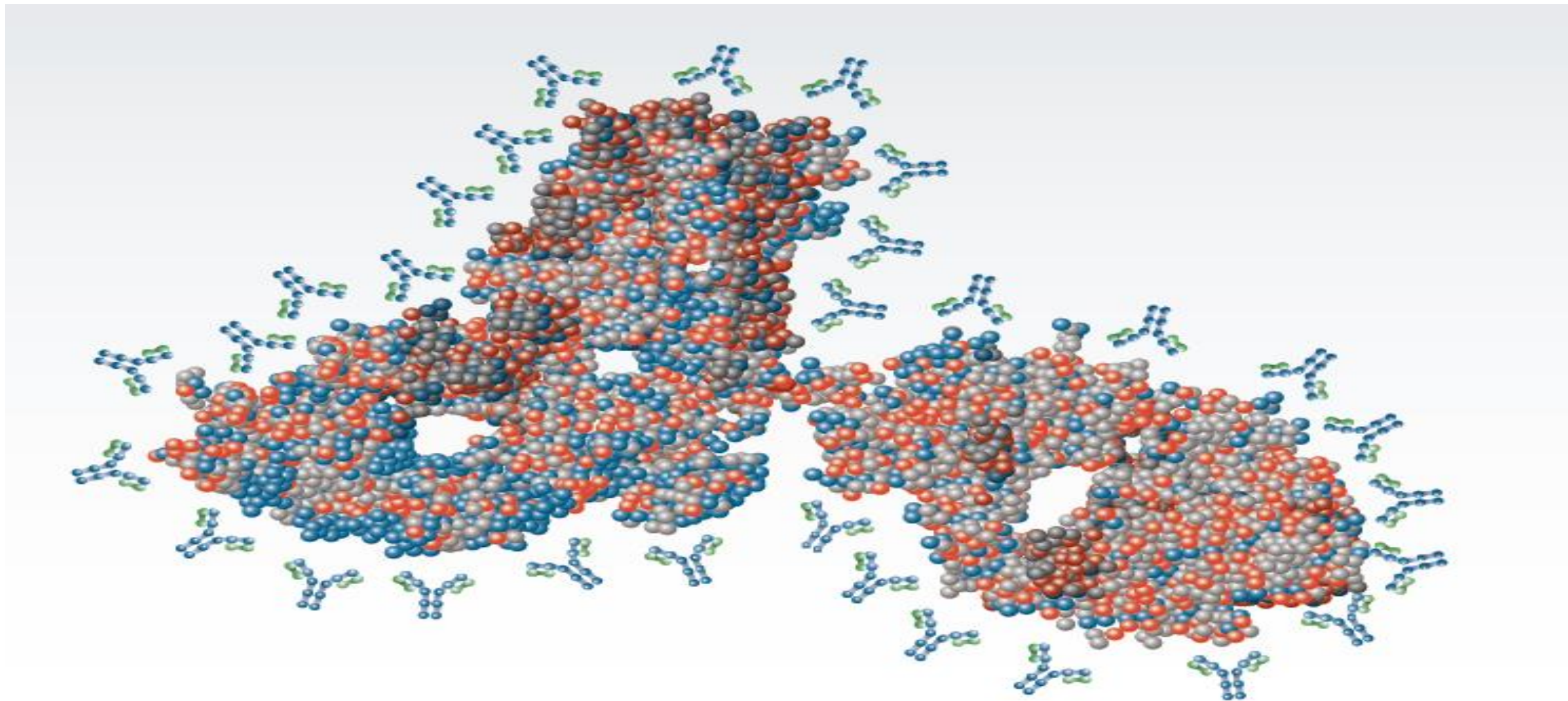
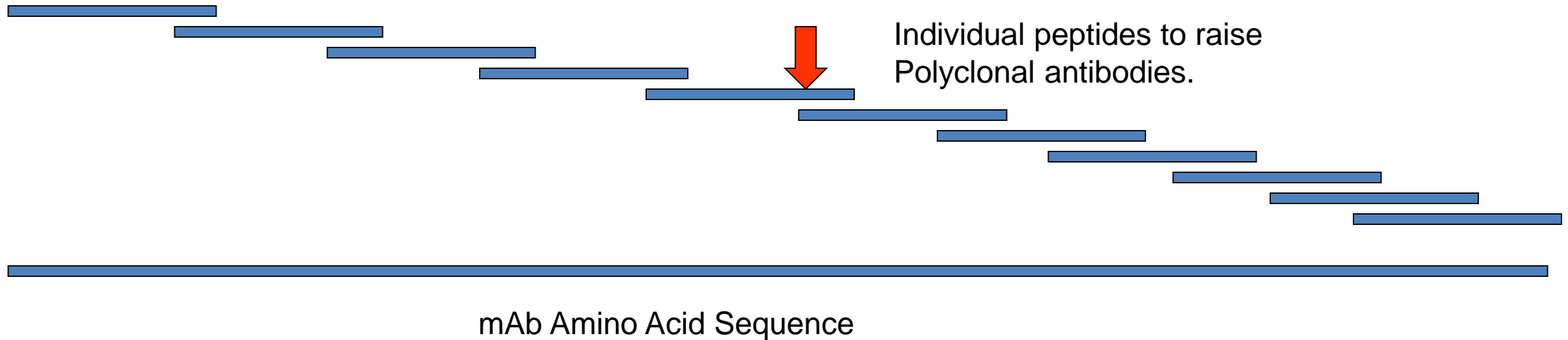


Diagram For Conformational Comparability Array

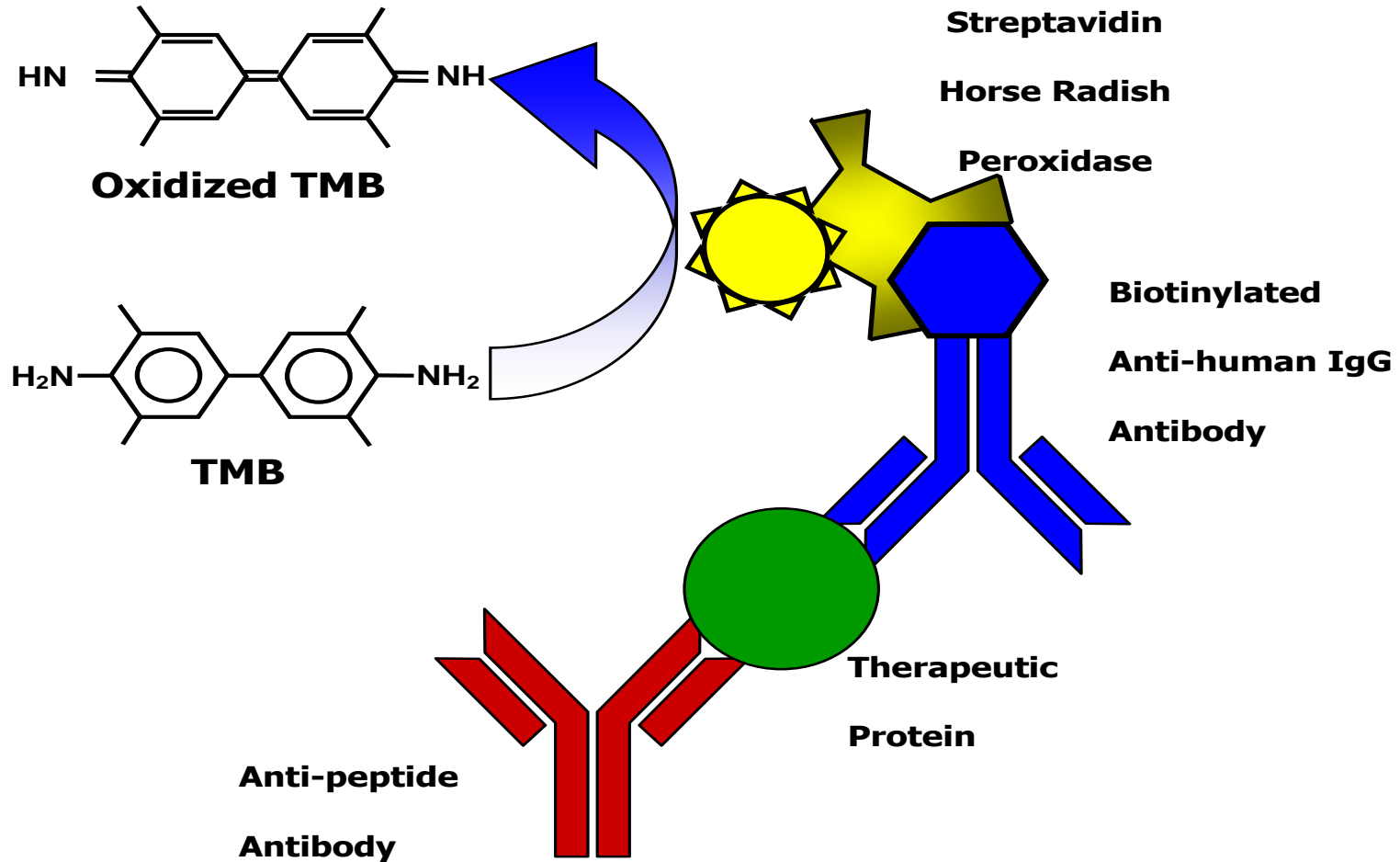


Technology Development



Antibody amino acid sequence is used to design the antibody array with overlapping regions to cover the whole mAb molecule

Diagram of the Sandwich ELISA



Conformational Array Can Detect Differences Not Detected by Bioassay

