

Rekombináns termékek és technológiák

Az orvosi célú rekombináns fehérjék funkció szerint lehetnek:

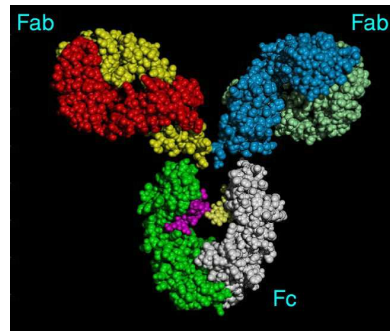
- Hormonok (inzulin, eritropoietin)
- Hemosztázis fehérjék (VIII faktor, IX faktor, tPA)
- **ANTITESTEK** (terápia - analitika; Herceptin - ProstaScint)
- Vakcinák (alegység vakcinák)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

Monoklonális ellenanyagok



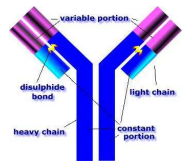
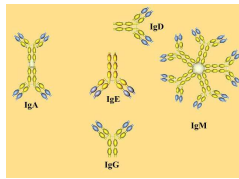
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Antitestek

Az ellenanyag molekulák nagy része az úgynevezett immunoglobulin (Ig) fehérjecsald tagja. Feladatuk, hogy specifikusan az adott antigénhez kapcsolódva olyan folyamatokat indítsanak el ami az antigén hatástalanításához vezet:

- vírusinaktiválás
- baktériumok agglutinálása
- megjelölés fagocitózisra

Az antigén felületén a kapcsolódási rész: epitóp

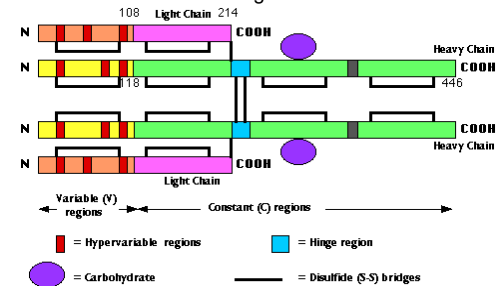


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Az antitestek fehérjeszerkezete

Két-két egyforma könnyű és nehéz láncból állnak, ezen belül állandó és variábilis régióból.

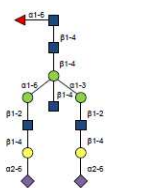
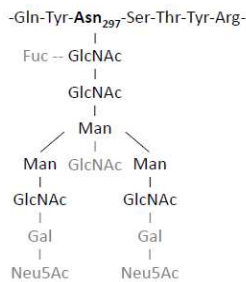


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

Az antitestek glikozilálása

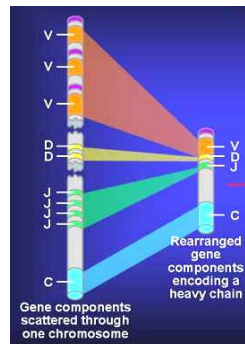
A nehéz láncokon egy-egy N-glikozilálási hely van (Asn-297). A galaktózok és a neuraminsavak száma szerint több izoforma létezik.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Antitestek



A szervezet ~10⁷-10⁹ féle különböző antitest előállítására képes. Ennek alapja, hogy antitest doménjei sok változatban tárolódnak a génállományban, és a kiírás során ezek random módon kombinálódhatnak.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

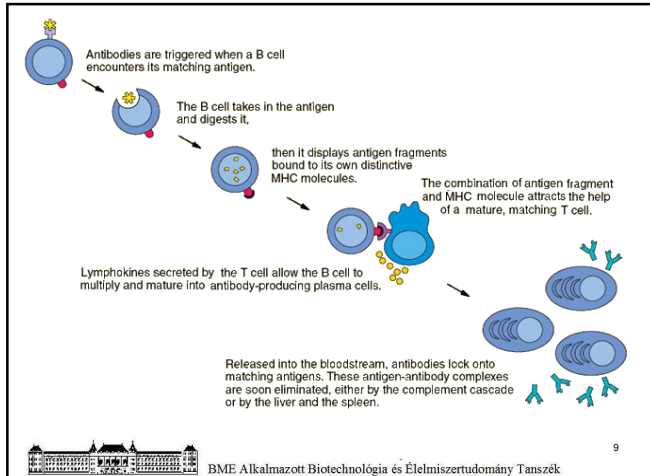
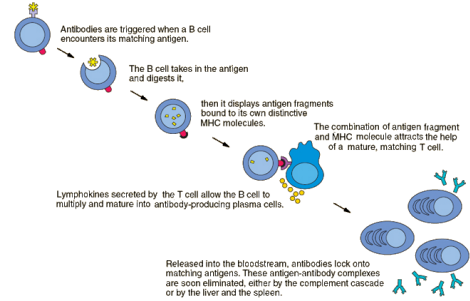
Antitestek

A könnyű lánc kétféle izoformában létezik, ezek mindkét doménje is több változatban létezik, ami további kombinációkat tesz lehetővé:

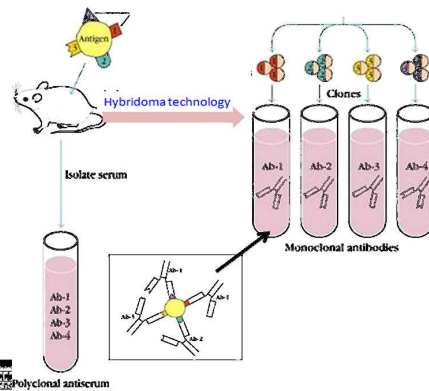
	Domének	Génváltozatok	Lehetséges kombinációk	Lehetséges kombinációk	Lehetséges kombinációk
Könnyű lánc	V _κ	40	200 féle κ lánc	324 féle könnyű lánc	2.5 x 10 ⁶ féle antitest
	J _κ	5			
	V _λ	31	124 féle λ lánc		
	J _λ	4			
Nehéz lánc	V _H	51	7650 féle nehéz lánc		
	D _H	25			
	J _H	6			

Antitestek

A szervezetben egy adott antitest tömeges termelését a plazmasejtje alakult B sejtek végzik.



Poliklonális és monoklonális antitestek



Monoklonális ellenanyagok

- egyetlen B-limfocita klón termékei
- homogének (antigénspecifitás, affinitás, izotípus)
- kiszámítható hatás, kevés mellékhatás
- előnye a poliklonális ellenanyaggal szemben, hogy a meghatározott specifitású és izotípusú ellenanyagok **nagy mennyiségben** és **azonos minőségben** („pharmacology-grade”) állíthatók elő
- jelentős a szerepük biokémia, a molekuláris genetika, és a gyógyszerészet területein

Miért hibridóma?

Az antitesteket termelő plazmasejték nem képesek osztódni, nem lehet sejtenyészetben szaporítani és termeltetni.

Csak a tumorsejték képesek korlátlanul osztódni (immortality).

E két tulajdonság egyesítésével kaphatunk olyan sejtvonalat, amely:

- monoklonális antitestet termel
- korlátlanul szaporítható

Monoklonális ellenanyag előállítás menete

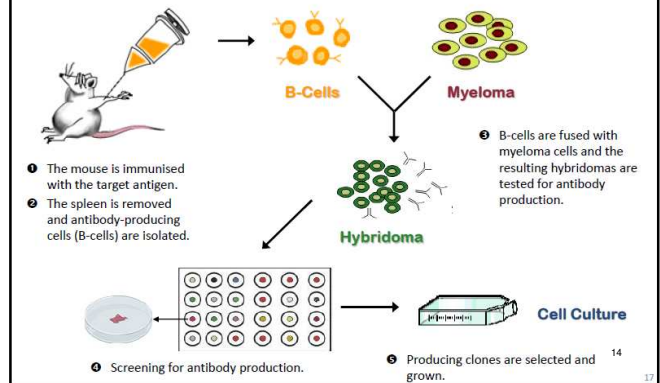
- egér/patkány beoltása antigénnel (több lépcsőben)
- lép vagy nyirokcsomó eltávolítása, homogenizálása
- lépből származó plazmasejtek + egér tumorsejtek (plazmacitóma/mielóma sejtek) fúziója
- Az ellenanyag termelő klónok azonosítása, izolálása
- A termelő hibridómák folyamatosan szaporodnak és ellenanyagot termelnek, ami a tápoldatban feldúsul



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

Hibridóma technológia



Hibridóma szelekció, a "HAT Trick"

A fúzió után többféle sejt van jelen:

- fuzionálatlan plazmasejtek
- fuzionálatlan tumorsejtek
- hibridómák

ezek közül kell izolálni a hibridómákat.

A szelekció azon alapul, hogy a tumorsejtekbe még a fúzió előtt két anyagcsere markert építenek be (két enzim hiánya) →

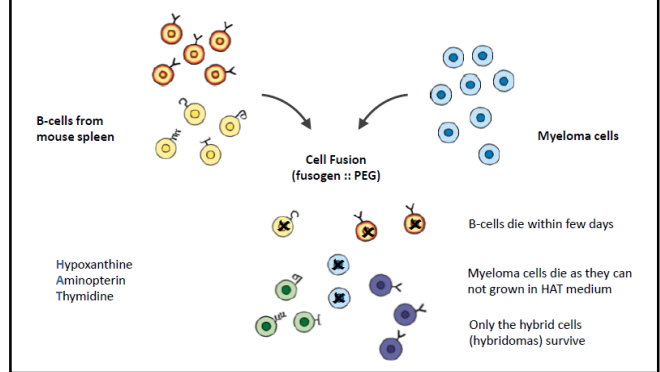
HAT médiumon (hipoxantin, aminopterin, timidin) csak a fuzionált sejtek képesek szaporodni. →



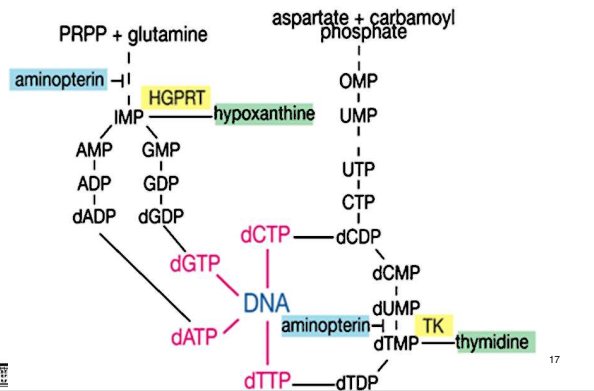
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

Hibridóma szelekció, a "HAT Trick"



Hibridóma szelekció, a "HAT Trick"

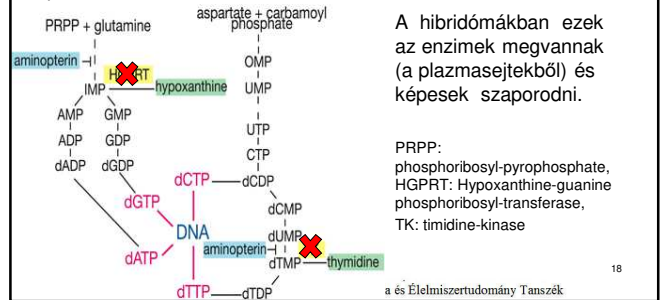


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

Hibridóma szelekció, a "HAT Trick"

HGPRT és TK hiányos mutánsok hiába kapnak segítséget (hipoxantin, timidin), nincs nukleotid szintézis – a mielóma sejtek elpusztulnak.



A hibridómákban ezek az enzimek megvannak (a plazmasejtekből) és képesek szaporodni.

PRPP: phosphoribosyl-pyrophosphate, HGPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase, TK: thymidine-kinase


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

A monoklonális antitestek felhasználása

Az antitestek több célra is felhasználhatók:

- Nem terápiás antitestek:**
 - Biokémiai kutatások
 - Immun-analitikai eljárások
 - Feldolgozási műveletekben (pl. affinkromatográfia)
- Humán (in vivo) felhasználású antitestek:**
 - Diagnosztikában (pl. Proscint)
 - Terápiában (elsősorban tumorok ellen)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 19


Mi a különbség?

Az egérben termelt antitestek az egérre jellemző aminosav-szekvenciákat és glikozilálást tartalmaznak, tehát emberbe adva fajidegen fehérjeként immunválaszt indukálnak

→ allergia (HAMA: Human Anti-Mouse Antibodies)

Hogyan kerülhető meg a probléma?

→ a terápiás antitestek humanizálása



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 20

Murine típusú antitestek


A kezdeti antitestek murine (= rágcsáló) fehérjék voltak - in vitro működött, a terápiában nem.

A kudarc okai: rövid felezési idő (in vivo), limitált bejutás a tumorba, elégtelen funkció = kicsi a citotoxikus stimuláló hatás

Anyaga az ismételt beadás után gyakran erős allergiás rohambat, rosszabb esetben anafilaxiás sokkot okozott.

Ezért rekombináns DNS manipulációs technikákkal fokozatosan lecserélték az állati génszakaszokat emberire.

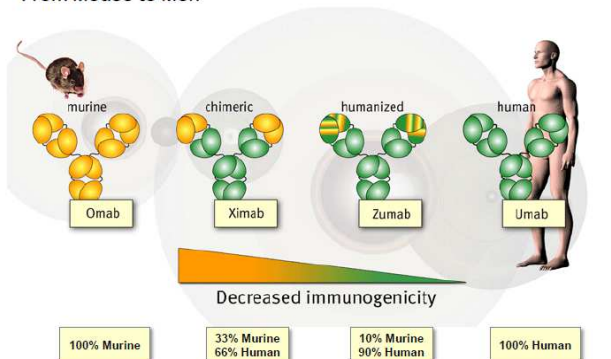
HIBRIDÓMA → génmanipuláció → SEJTNYÉSZET



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 21

A monoklonális antitestek fejlesztése

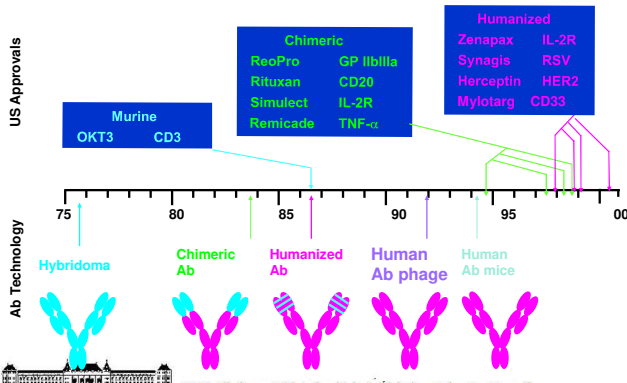
From Mouse to Men



Decreased immunogenicity

100% Murine 33% Murine 66% Human 10% Murine 90% Human 100% Human

Történeti áttekintés



US Approvals


Murine: OKT3, CD3

Chimeric: NeoPro, GP IIb/IIIa, Rituxan, CD20, Simulect, IL-2R, Remicade, TNF-α

Humanized: Zenapax, IL-2R, Synagis, RSV, Herceptin, HER2, Mylotarg, CD33

Ab Technology: Hybridoma, Chimeric Ab, Humanized Ab, Human Ab phage, Human Ab mice


75 80 85 90 95 00



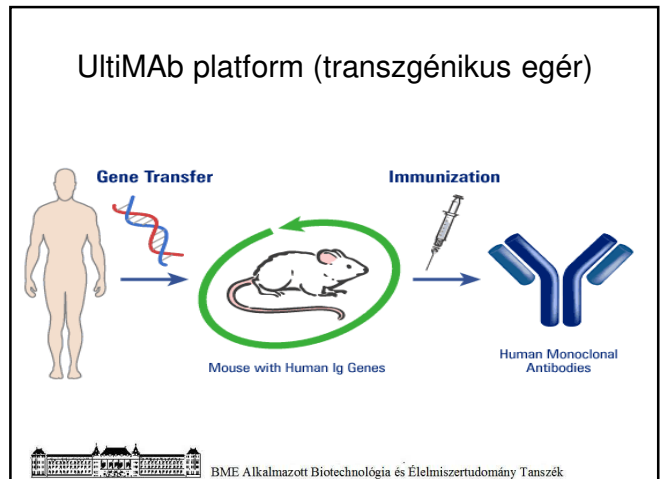
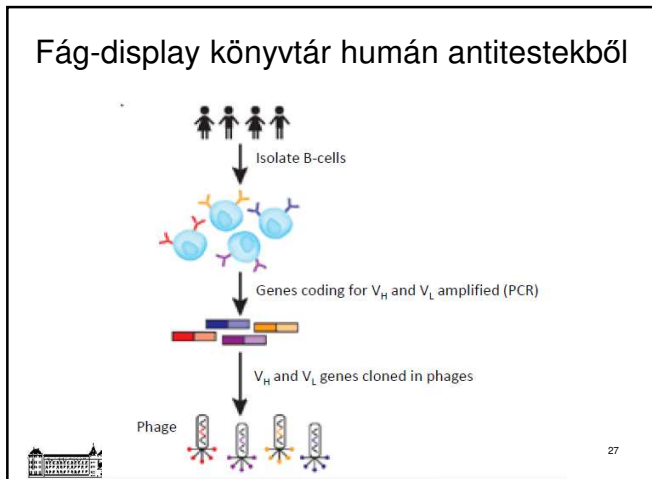
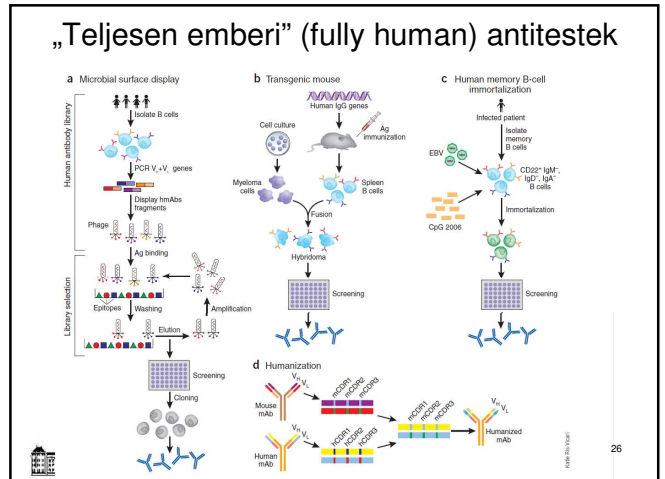
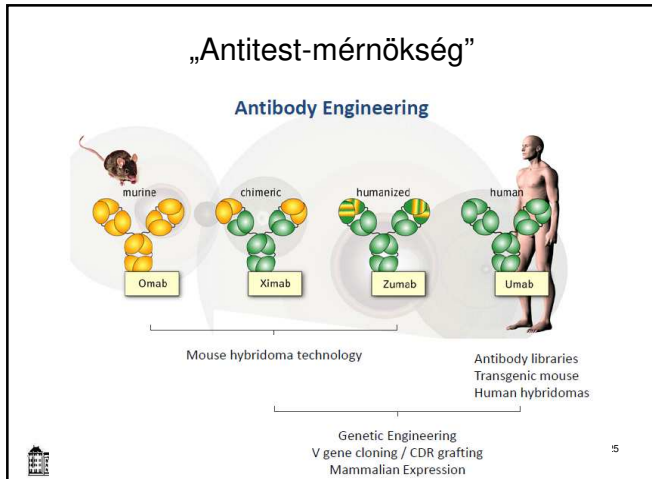
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Kiméra és humanizált monoklonális antitestek

- A kiméra antitestek: murine antitest variábilis régióját egyesítették a humán konstans régióval. Az eredmény 65% humán antitest (κ könnyűlánc + nehézlánc)
- Humanizált antitesthez akkor jutunk a murine antitestből "átvisszük" a hipervariábilis domént a humán antitestbe. 95%-a humán eredetű, de valamiért a kötődés az antigénnel gyengébb, valamint az affinitása is kisebb, mint a kiindulási murine antitestnek



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 24



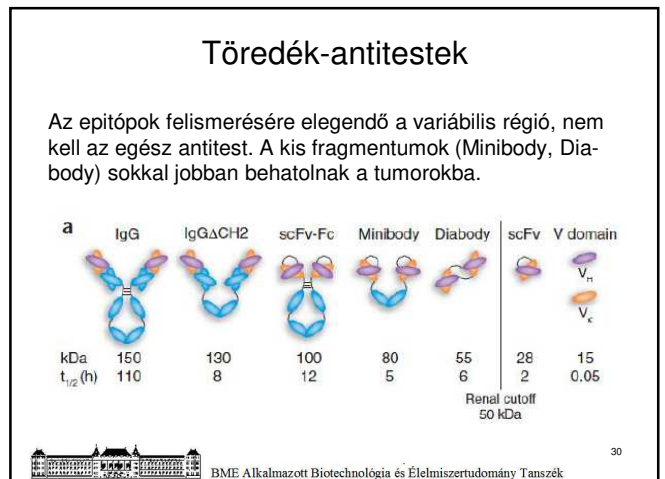
In vitro antitest-kutatás

Számítógépes antitest-könyvtárak - fontos az antitest-molekulák részletes szerkezeti és funkcionális ismerete. Típusaik:

- természetes: az ellenanyag-gének adat formájába történő konvertálásával alakítják ki, s az így kapott repertoárt használják fel az aktuális vizsgálatokhoz.
- szintetikus könyvtárak: precízen megtervezett, mesterségesen megalkotott DNS-molekulákat (a mesterséges antitestek génei) építenek fel. A természetes immunrepertoárt meghaladó diverzitás is létrehozható, illetve az ellenanyag-molekulák specifikálásában is hihetetlen pontosság érhető el.
- szemi-szintetikus könyvtárak: amelyekben egyes mesterségesen kialakított antigénkötő oldalakat természetesekkel kombinálnak.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

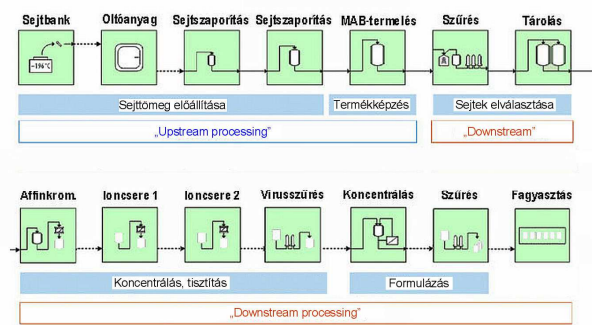
29



MAB termelési technológiák

Product	Culture system	Bioreactor Train Scale
ReoPro	Continuous/Perfusion (spin-filter)	10 – 500 L
Zenapax	Fed-batch (stirred tank)	Not disclosed
Simulect	Continuous/Perfusion (membrane)	Not disclosed
Synagis	Fed-batch (stirred tank)	400 – 10000 L
Remicade	Continuous/Perfusion (spin-filter)	10 – 500 L
Herceptin	Fed-batch (stirred tank)	80 – 12000 L
MyoScint	Continuous/Perfusion (spin-filter)	10 – 500 L
Humaspect	Continuous/Perfusion (hollow-fibre)	Not disclosed

Teljes technológia (upstream+downstream)



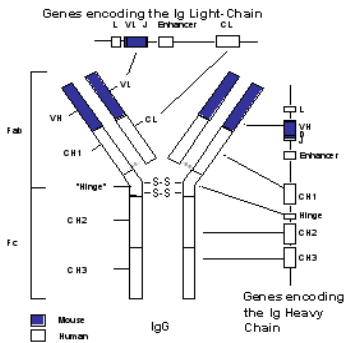
Esettanulmány: Simulect

Immunszuppresszáns, szervátültetésekénél 30-40 napra kiüti a limfocitákat.

Humanizált, a génszerelvényt SP2/0 sejtvonalba építették be.

Szuszpenziós tenyésztés, folytonos, sejtviasszatartással → nagy sejtsűrűség

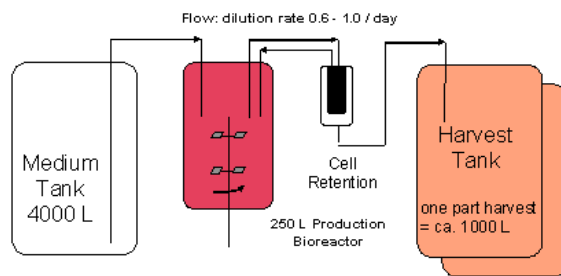
Novartis basiliximab



33

Esettanulmány: Simulect

- stirred tank, suspension, continuous cell cultivation with cell retention:

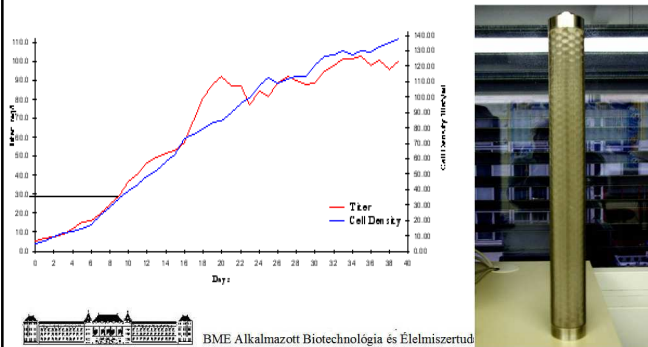


34

Esettanulmány: Simulect

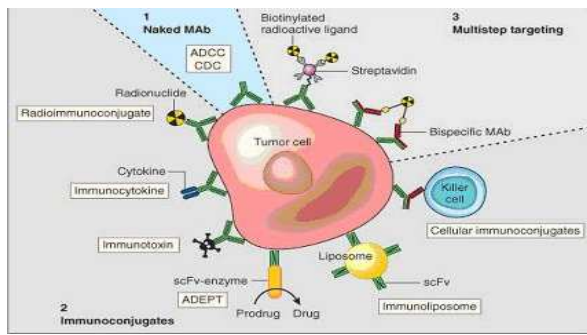
A fermentáció lefutása

A forgó szita szűrő



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Monoklonális ellenanyagok a tumor-terápiában



36

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Radio-immunterápia

A monoklonális antitest terápia hatásosságának fokozás volt a cél a monoklonális antitesthez konjugált radioizóp kezelés kifejlesztésének

Módszer alapja: a lymhoid daganatok sugárzásérzékenyek, így a monoklonális antitesthez kötött radioizotóp CÉLZOTT sugárterápiát tesz lehetővé.

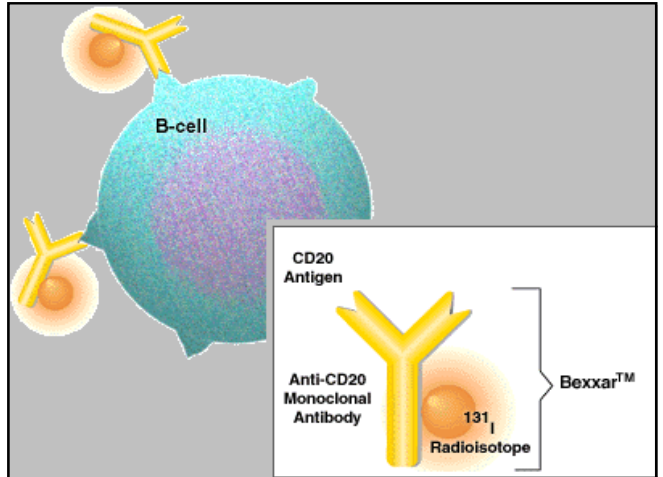
Emelett a MAB és az izotóp B-sejt károsító hatása összeadódik
Ma 2 radioizotóppal konjugált anti CD-20 készítmény áll rendelkezésre.

A tositumomab (Bexxar) monoklonális anti-CD-20 antitest és ¹³¹I konjugátum (75-80 % remisszió)

A másik készítmény az ibritumomab (Zevalin), ami monoklonális anti CD-20 antitest és ⁹⁰Y konjugátum (67% remisszió)



37



Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)

Az antitesthez enzimet kötnek, mely a később szisztémásan bevitt, ártalmatlan prodrug vegyületet lokálisan alakítja a citotoxikus, hatékony metabolitá

BME Alkalmazott Biotechnolgia és Élelmiszertudomány Tanszék

Immuno-liposzómák


Az immuno-liposzómák antitest és liposzóma összekapcsolását jelenti.

A liposzómák képesek gyógyszerek vagy terápiás nukleotid-származékok szállítására.

Így a szerek célzottan hatnak a tumorsejtekre.

Ez a technológia még gyerekcipőben jár, de már sikeresen alkalmazták in vivo körülmények között tumorsejt növekedés gátlására.

Agytumor és a mellrák kezelésére már használják.



40

Herceptin

Az antitest hat

- egyrészt a tumorsejt osz
- másrészt a tumorsejt számát csökkenti.

ALLVQICES

BME Alkalmazott Biotechnolgia és Élelmiszertudomány Tanszék

Monoklonális antitestek nevezéktana

Prefix	Target	Source	Suffix	
variable	-o(s)-	bone	-u-	human
	-vi(r)-	viral	-o-	mouse
	-ba(c)-	bacterial	-a-	rat
	-li(m)-	immune	-e-	hamster
	-le(s)-	infectious lesions	-i-	primate
	-ci(r)-	cardiovascular	-xi-	chimeric
	-mu(l)-	musculoskeletal	-zu-	humanized
	-ki(n)-	interleukin	-axo-	rat/murine hybrid
	-co(l)-	colonic tumor		
	-me(l)-	melanoma		
	-ma(r)-	mammary tumor		
	-go(t)-	testicular tumor		
	-go(v)-	ovarian tumor		
	-pr(o)-	prostate tumor		
-tu(m)-	miscellaneous tumor			
-neu(r)-	nervous system			
-tox(a)-	toxin as target			

-mab

Monoklonális antitestek nevezéktana

Az előtag nem hordoz semmiféle információ, csak egyedinek kell lennie, általában utalás a gyógyszer nevére.
 A második tag utalás a gyógyszer célpontjára (pl -ci(r)- keringési rendszerre ható)
 A következő tag a forrásról, illetve az antitest típusáról nyújt információt
 Végül pedig a -*mab* utótag következik = monoclonal anti-body
 Ellenőrző kérdés:
 Melyik gyógyszerről lehet szó, és mit lehet tudni róla?

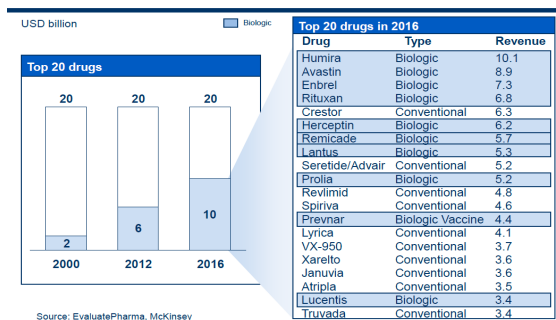
tras- + *-tu(m)-* + *-zu-* + *-mab*.???



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

43

A „top 20” gyógyszerből 10 biotech termék



Source: EvaluatePharma, McKinsey



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

44

A piacvezető biotechnológiai gyógyszerek (2017)

Top 15 pharmaceutical products by sales worldwide

