

Rekombináns termékek és technológiák

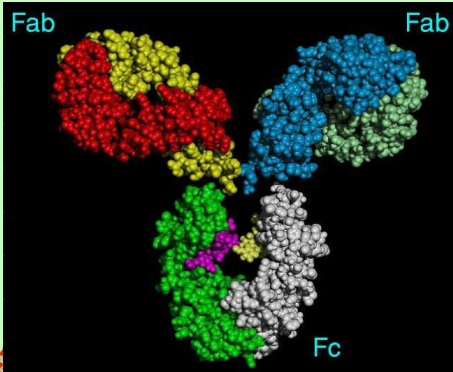
Az orvosi célú rekombináns fehérjék funkció szerint lehetnek:

- Hormonok (inzulin, eritropoietin)
- Hemosztázis fehérjék (VIII faktor, tPA)
- **ANTITESTEK** (parenterális - labor)
- Vakcinák (nem csak a rekombináns)



1

Antitestek



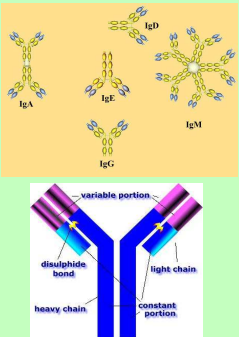

2

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

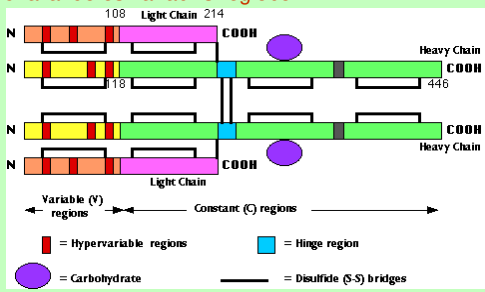
Az antigén felületén a kapcsolódási rész: epitóp

3

Az antitestek fehérjeszerkezete


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



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.

5

Antitestek

A szervezet $\sim 10^7-10^9$ féle különböző antitest előállítására képes. Ennek alapja, hogy antitest doménjei sok változatban tárolódnak a génállományban, és a kiírás során ezek random módon kombinálódhatnak.



6

Antitestek

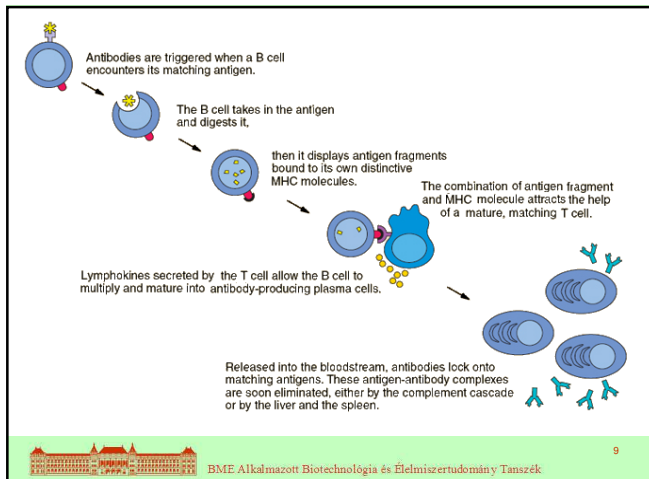
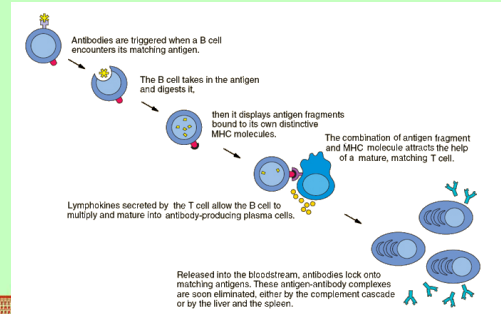
A könnyű lánc kétféle izoformában létezik, ezek mindkét doménje is több változatban létezik, ami további kombinációkat tesz lehetővé:

| | 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 | | | |

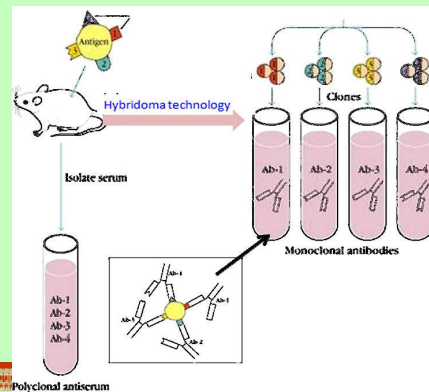


Antitestek

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 a gyógyászat, az immunanalitika, az affinkromatográfia területein



Miért hibridóma?

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

Csak a tumorsejtnek képesek korlátlanul osztódni (immortality).

E két tulajdonság egyesítésével kaphatunk olyan sejtvonalat, amely:

- monoklonális antitestet termel
- korlátlanul szaporítható



Monoklonális ellenanyag előállítás menete

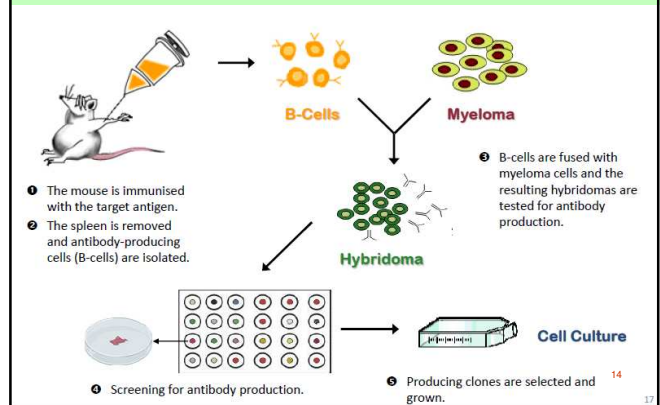
- egér/patkány beoltása antigénnel (több lépcsőben)
- lép vagy nyirokcsomó eltávolítása, homogenizálása
- lépből származó plazmasejtek + egér tumorsejtek (plazmacitoma/mielóma sejtek) fúziója
- Az ellenanyag termelő klónok azonosítása, izolálása
- A termelő hibridómák folyamatosan szaporodnak és ellenanyagot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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

Hibridóma technológia



Screening for antibody production.

Producing clones are selected and grown.

14

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) →

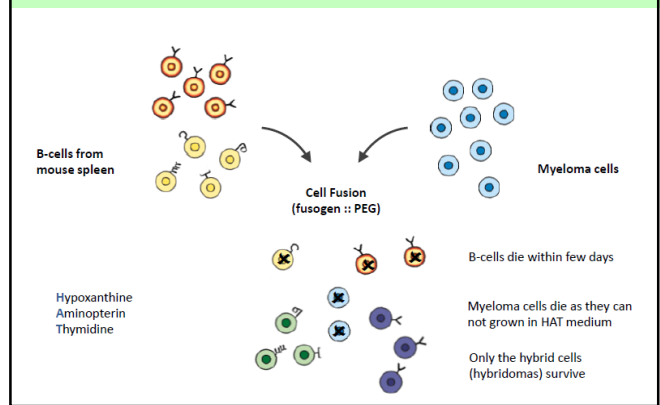
HAT médiumon (hipoxantin, aminopterin, timidin) csak a fuzionált sejtek képesek szaporodni. →



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

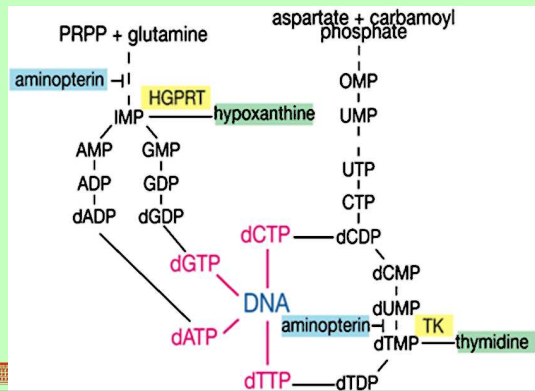
Hibridóma szelekció, a "HAT Trick"



Hypoxanthine
Aminopterin
Thymidine

B-cells die within few days
Myeloma cells die as they can not grow in HAT medium
Only the hybrid cells (hybridomas) survive

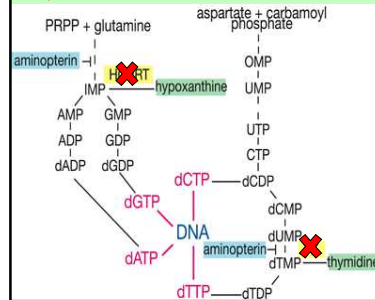
Hibridóma szelekció, a "HAT Trick"



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


Élelmiszertudomány Tanszék

18

A monoklonális antitestek felhasználása

Az antitestek több célra is felhasználhatók:

- In vitro felhasználás:**
 - Biokémiai kutatások
 - Immun-analitikai eljárások
 - Feldolgozási műveletekben (pl. affinkromatográfia)
- Humán (parenterális) 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 rohámot, rosszabb esetben anafilaxiás sokkot okozott.

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

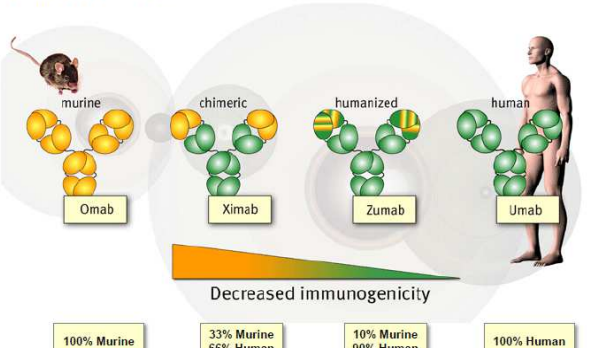
HIBRIDÓMA → génmanipuláció → SEJTNYÉSZET



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 21

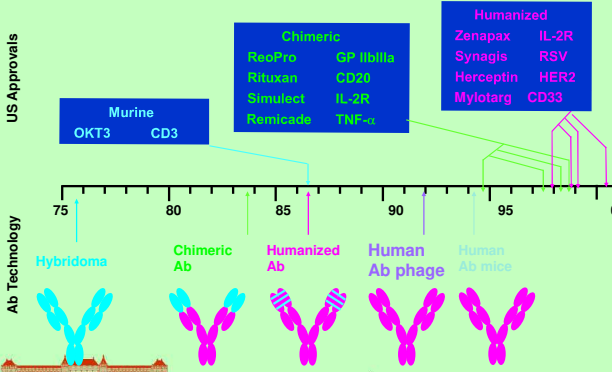
A monoklonális antitestek fejlesztése

From Mouse to Men



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



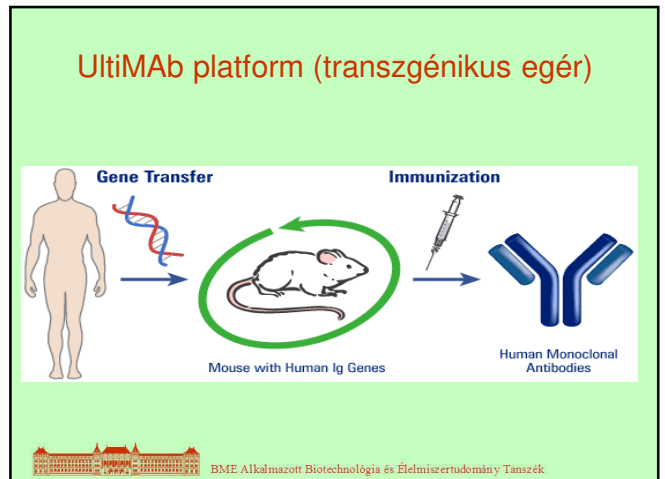
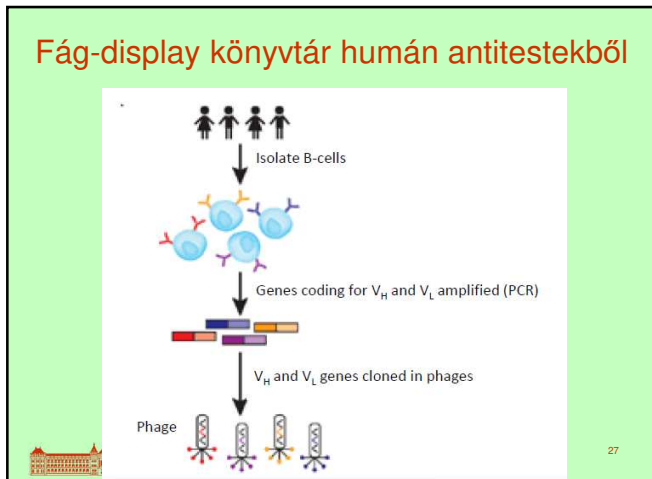
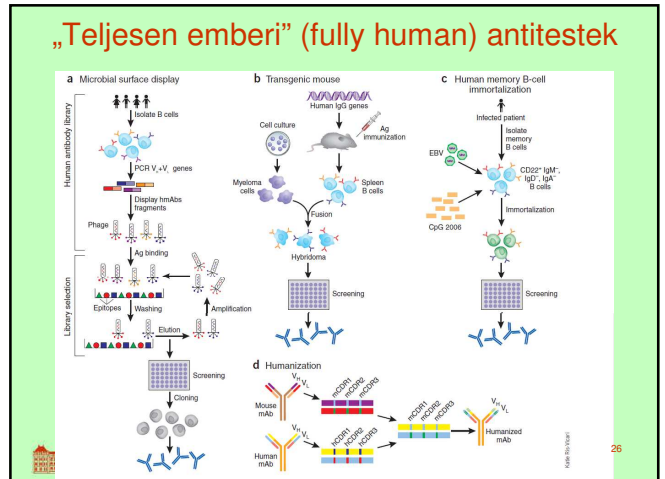
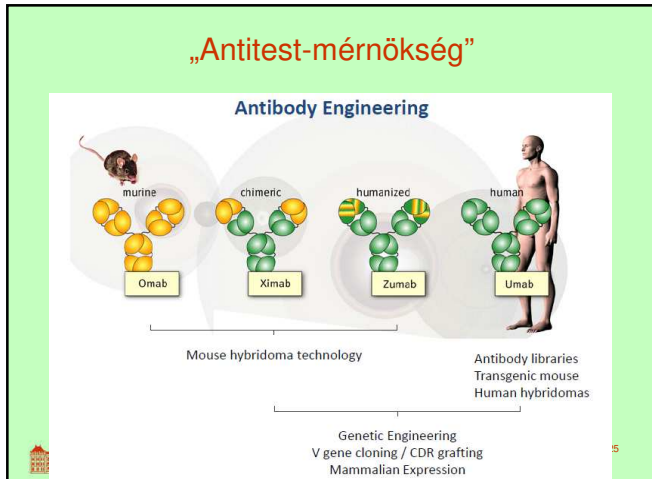
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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 valamilyen 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.

Töredék-antitestek

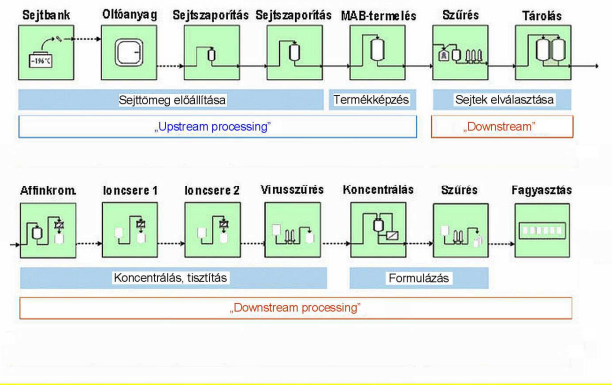
Az epitópok felismerésére elegendő a variábilis régió, nem kell az egész antitest. A kis fragmentumok (Minibody, Diabody) sokkal jobban behatolnak a tumorokba.

| | IgG | IgGΔCH2 | scFv-Fc | Minibody | Diabody | scFv | V domain |
|----------------------|-----|---------|---------|----------|---------|--------|----------|
| kDa | 150 | 130 | 100 | 80 | 55 | 28 | 15 |
| t _{1/2} (h) | 110 | 8 | 12 | 5 | 6 | 2 | 0.05 |
| Renal cutoff | | | | | | 50 kDa | |

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 |

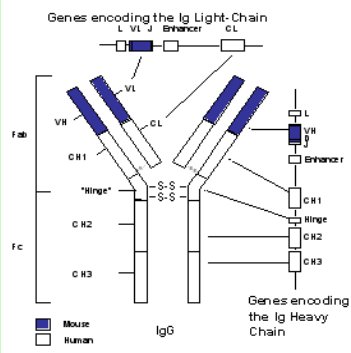
Teljes technológia (upstream+downstream)



Esettanulmány: Simulect

Immunszuppresszáns, szervátültetésekénél 30-40 napra kiüti a limfocitákat. Humanizált, a génszerelvényt SP2/0 sejtvonalba építették be. Szuszpenziós tenyészet, folytonos, sejtviisszatartással → nagy sejtsűrűség

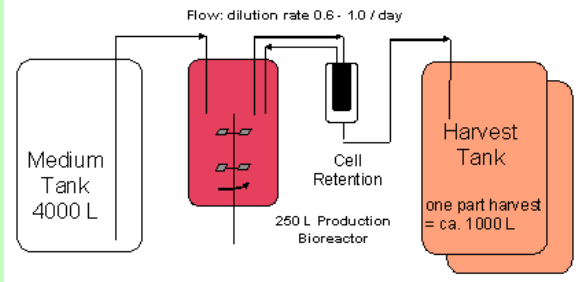
Novartis basiliximab



33

Esettanulmány: Simulect

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

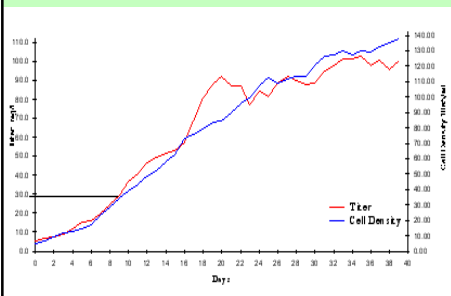


34

Esettanulmány: Simulect

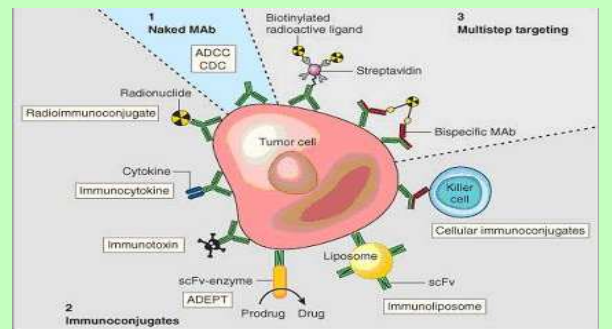
A fermentáció lefutása

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 fokozása volt a cél a monoklonális antitesthez konjugált radioizóp kezelés kifejlesztésének

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

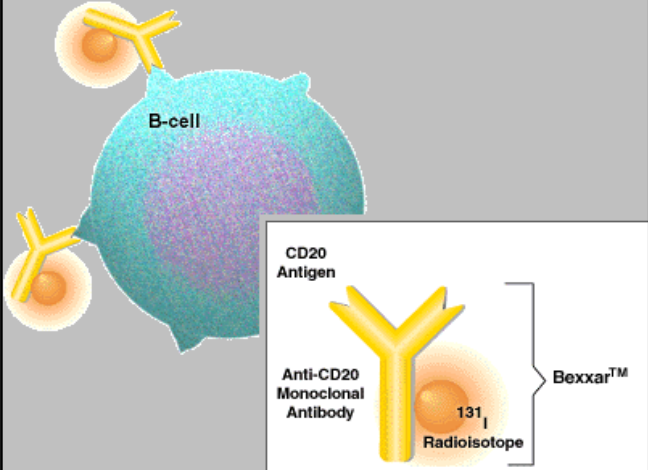
Emellett a MAB és az izotóp B-sejt károsító hatása összeadódik. Ma 2 radioizotóppal konjugált anti CD-20 készítmény áll rendelkezésre.

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)

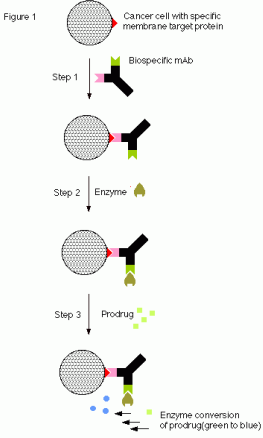



37



Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)

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

38


Immuno-liposzómák

Az immuno-liposzómák antitest és liposzóma összekapcsolását jelenti.

A liposzómák képesek gyógyszerek vagy terápiás nukleotidszázamázékok szállítására → így ezek a szerek célzottan hatnak a tumorsejtekre.

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

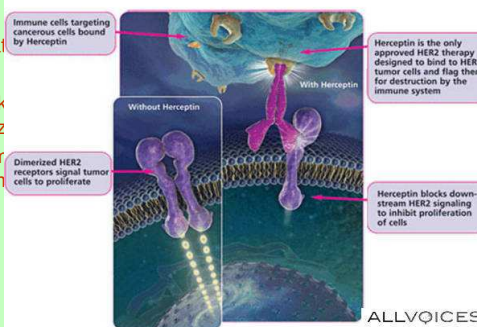
Agytumor és a mellrák kezelésére már használják.




40

Herceptin

Az antitest hatása: egyrészt a tumorsejt szaporodását gátolja, másrészt megakadályozza az immunrendszer számára.



ALLVQICES



41

Monoklonális antitestek nevezéktana

| Prefix | Target | Source | Suffix |
|----------|-----------------------------|-------------------------|--------|
| | -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 | |
| variable | -co(l)- colonic tumor | | -mab |
| | -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 | | |



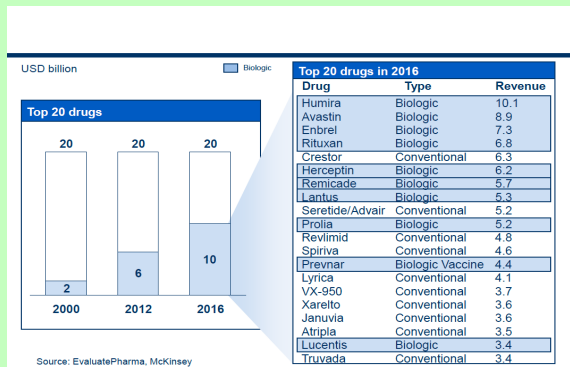
Monoklonális antitestek nevezéktana

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.???



A „top 20” gyógyszerből 10 biotech termék



A piacvezető biotechnológiai gyógyszerek (2017)

Top 15 pharmaceutical products by sales worldwide

