

REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK

Funkció szerint:

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

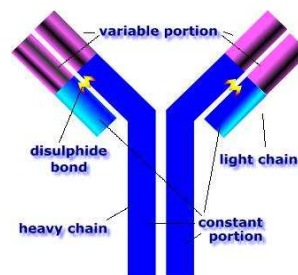
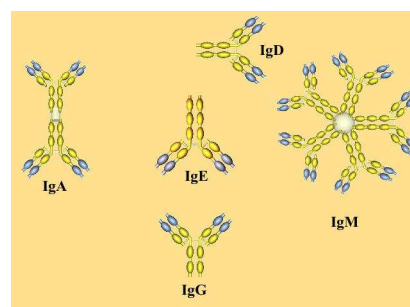
1

Antitestek

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

- vírusinaktiválás
- baktériumok agglutinálása
- megjelölés fagocitózisra

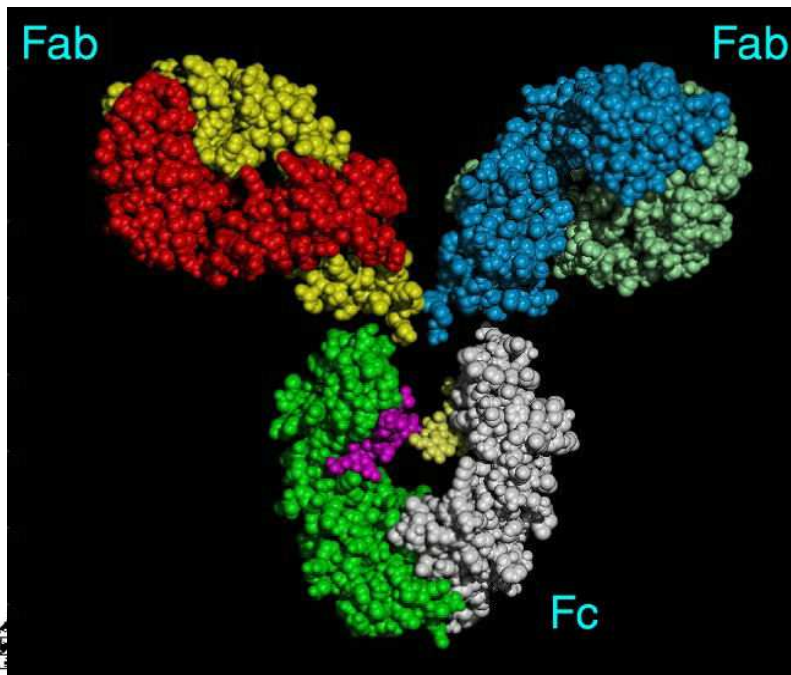
Az antigén felületén a kapcsolódási rész: epitóp



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

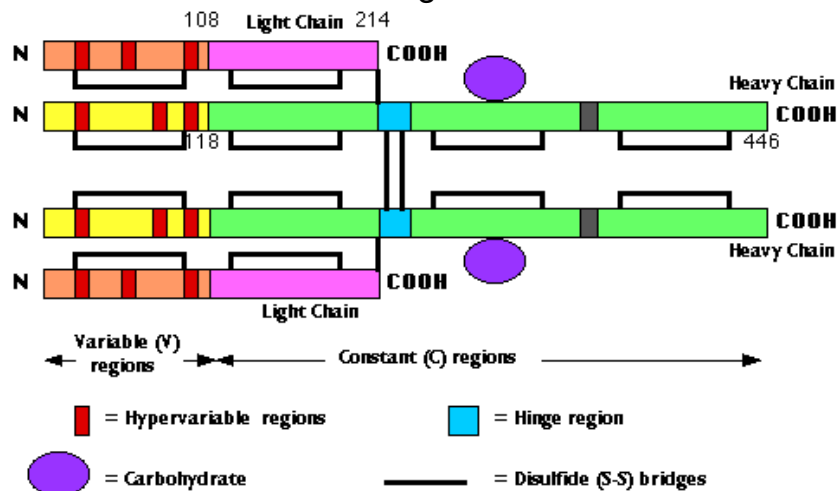
2

Antitestek



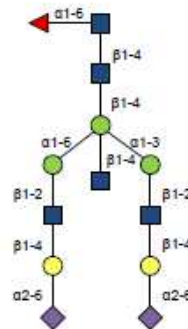
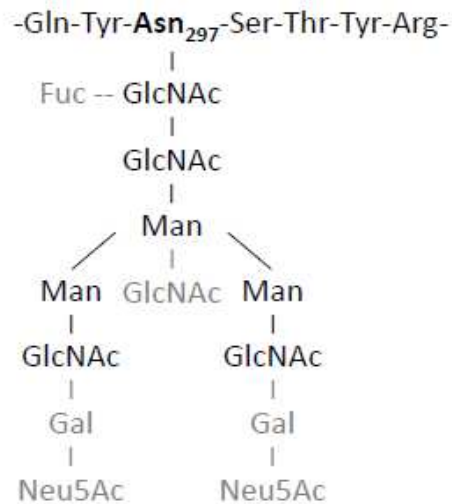
Az antitestek fehérjeszerkezete

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



Az antitestek glikozilálása

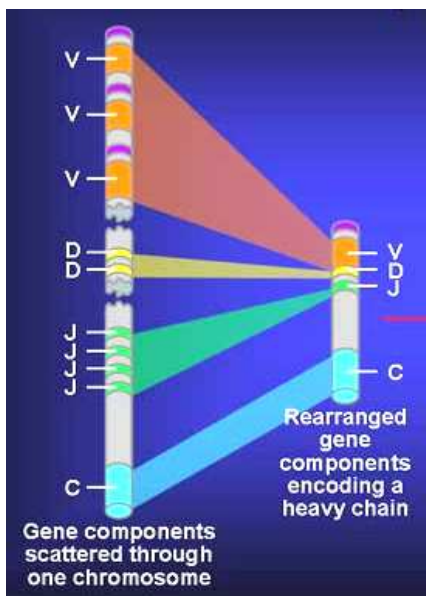
A nehéz láncokon egy-egy N-glikozilálási hely van (Asn-297). A galaktózok és a neuraminsavak száma szerint több izoforma létezik.



5

k

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.



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			

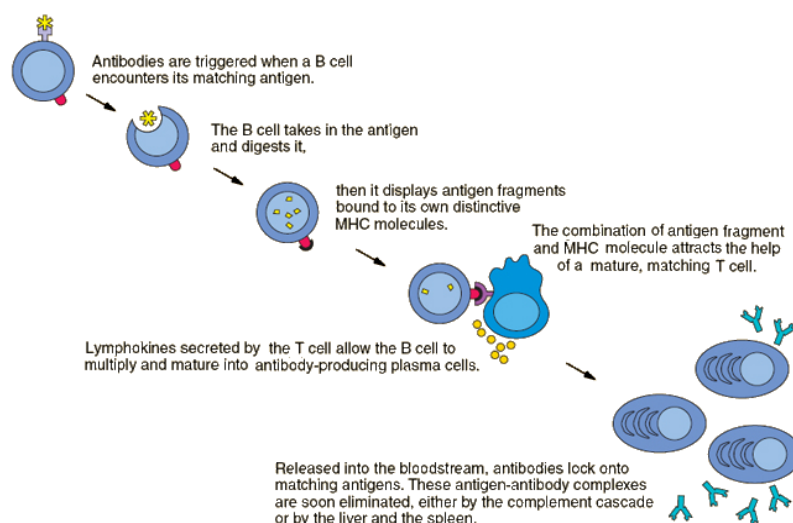


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

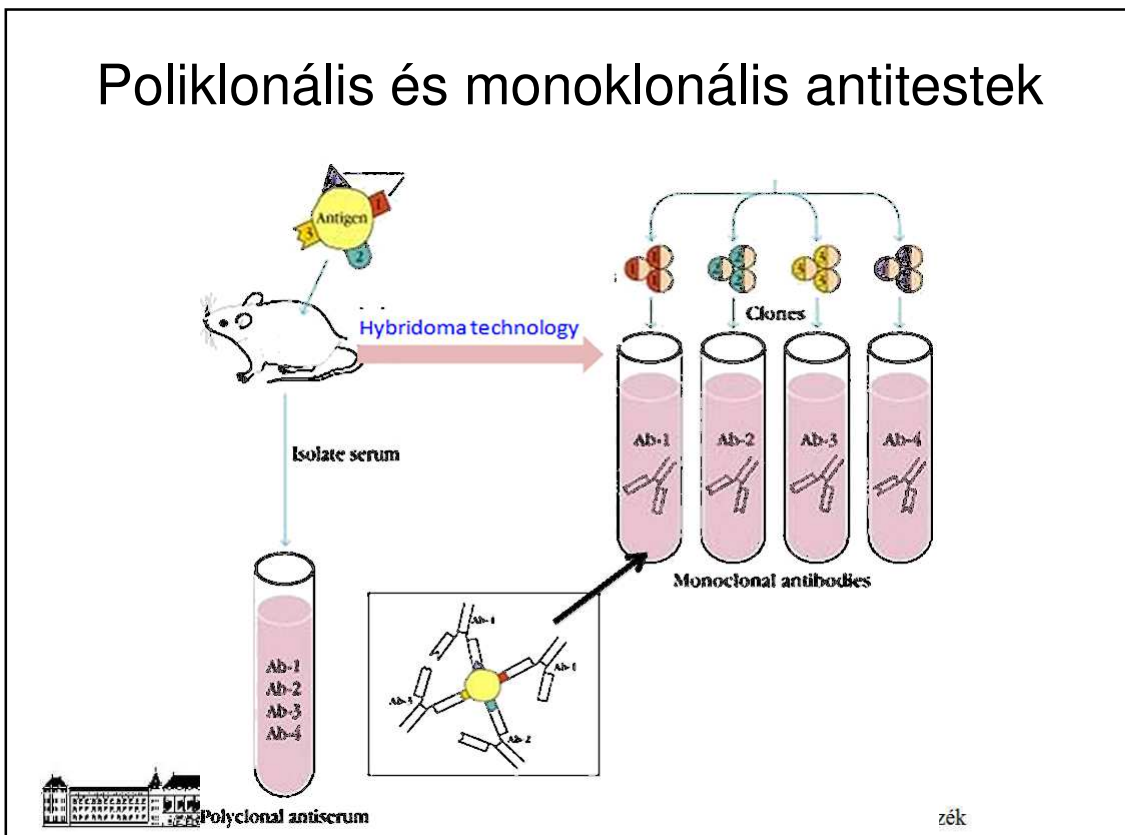
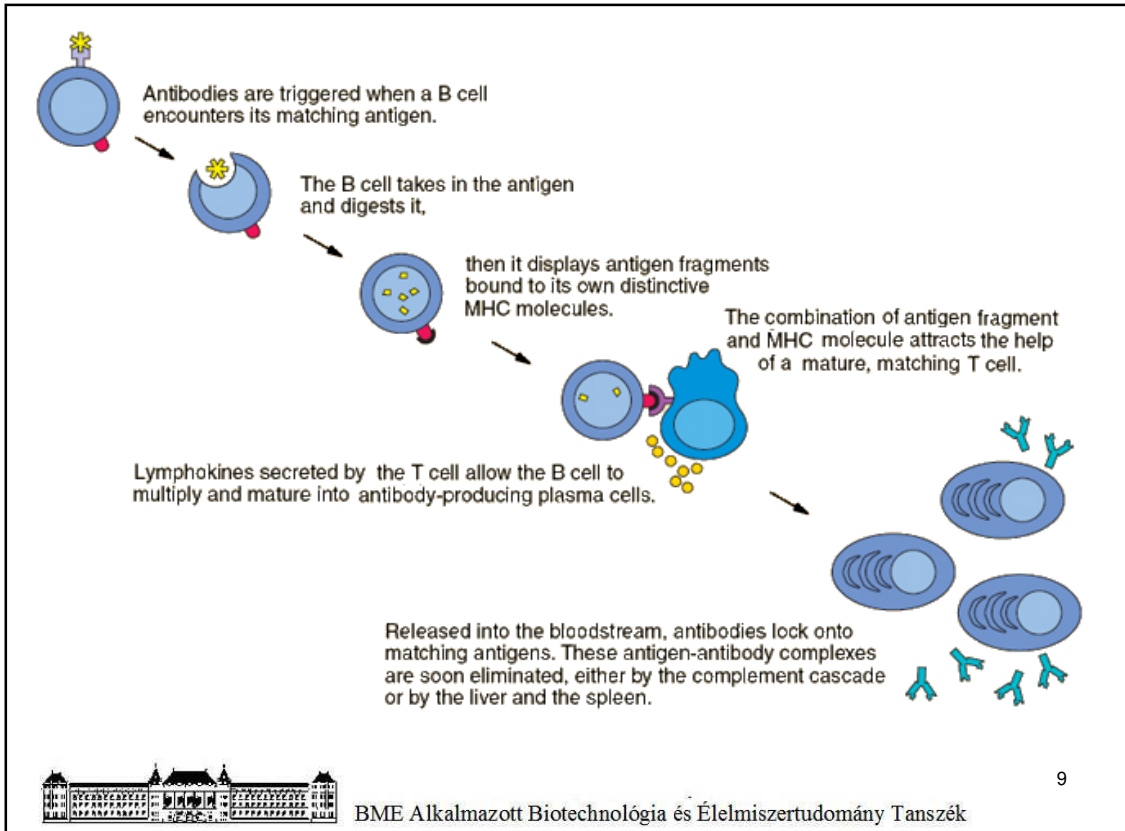
7

Antitestek

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



8



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 plazmasejtek nem képesek osztódni, nem lehet sejtenyészetben szaporítani és termeltetni.

Csak a tumorsejtek képesek korlátlanul osztódni (immortality).

E két tulajdonság egyesítésével kaphatunk olyan sejtvonalat, amely:

- monoklonális antitestet termel
- korlátlanul szaporítható



Monoklonális ellenanyag előállítás menete

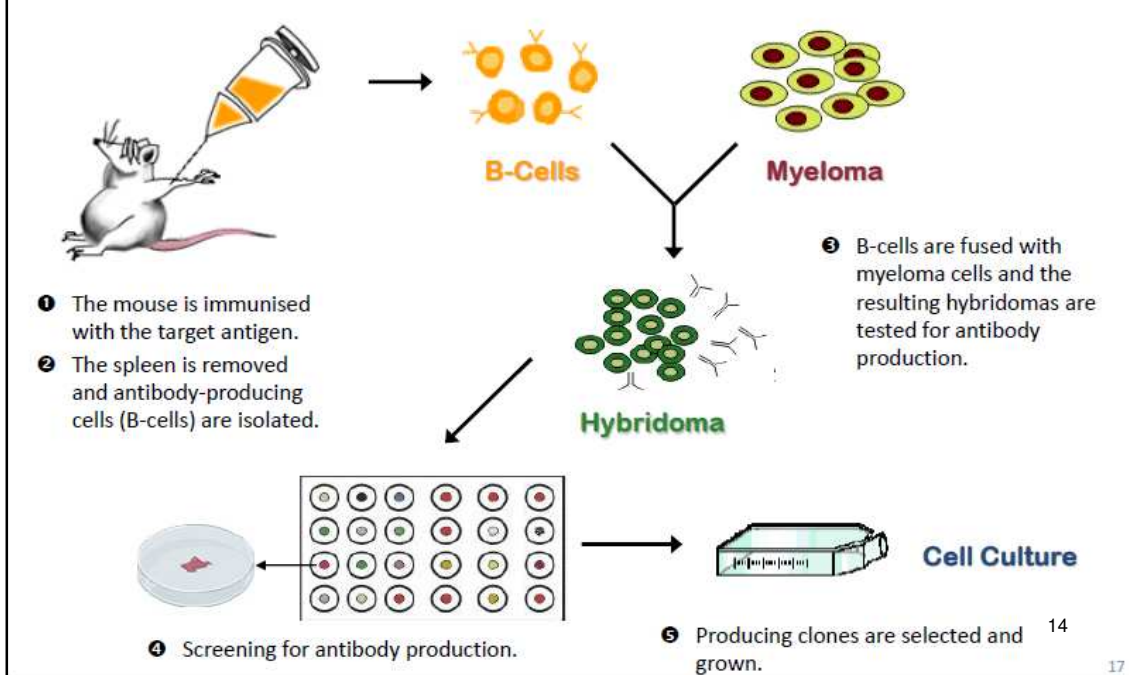
- egér/patkány beoltása antigénnel (több lépcsőben)
- lép vagy nyirokcsomó eltávolítása, homogenizálása
- lépből származó plazmasejtek + egér tumorsejtek (plazmacitóma/mielóma sejtek) fúziója
- Az ellenanyag termelő klónok azonosítása, izolálása
- A termelő hibridómák folyamatosan szaporodnak és ellenanyagot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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

Hibridóma technológia



17

Hibridóma szelekció, a “HAT Trick”

A fúzió után többféle sejt van jelen:

- fuzionálatlan plazmasejtek
- fuzionálatlan tumorsejtek
- hibridómák

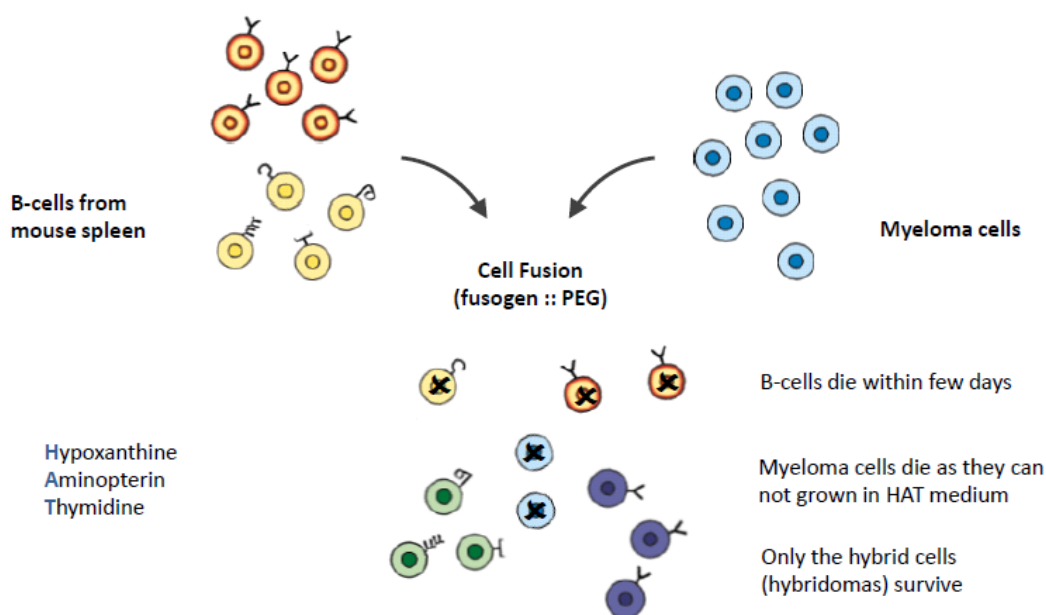
ezek közül kell izolálni a hibridómákat.

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

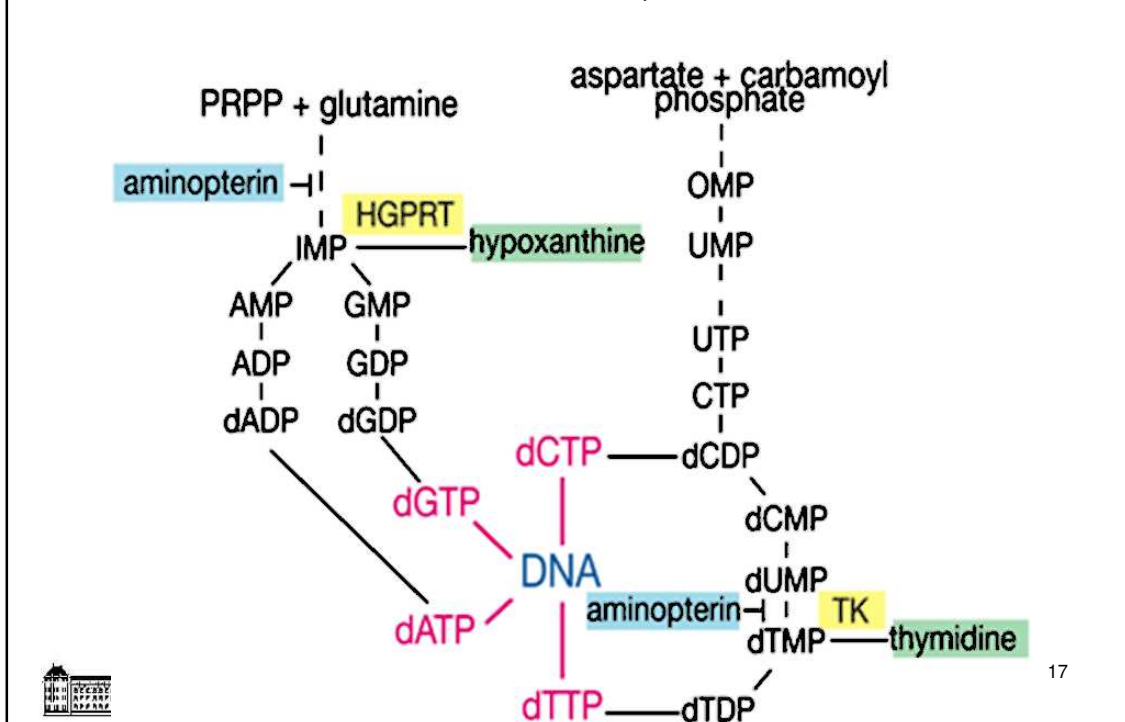
HAT médiumon (hipoxantin, aminopterin, timidin) csak a fuzionált sejtek képesek szaporodni. →



Hibridóma szelekció, a “HAT Trick”

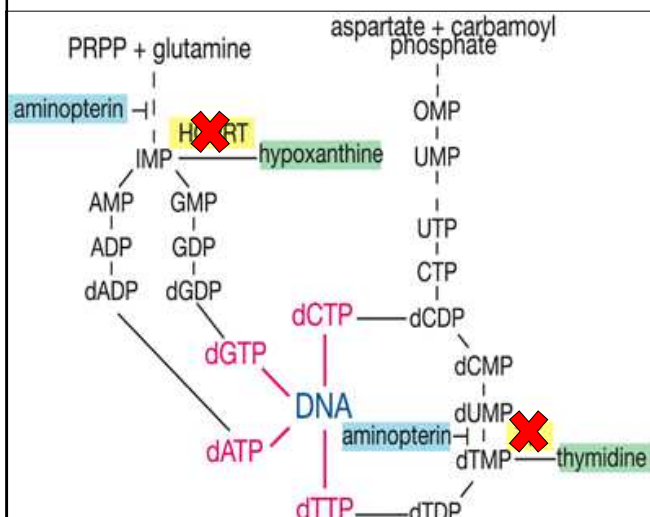


Hibridóma szelekció, a “HAT Trick”



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: timidine-kinase

18

a és Élelmiszertudomány Tanszék

A monoklonális antitestek felhasználása

Az antitestek több célra is felhasználhatók:

1. *In vitro* felhasználás:

- Biokémiai kutatások
- Immun-analitikai eljárások
- Feldolgozási műveletekben (pl. affinkromatográfia)

2. *Humán (parenterális) felhasználású antitestek:*

- Diagnosztikában (pl. Proscint)
- Terápiában (elsősorban tumorok ellen)



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



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 rohamot, rosszabb esetben anafilaxiás sokkot okozott.

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

HIBRIDÓMA → **génmanipuláció** → **SEJTNYÉSZET**

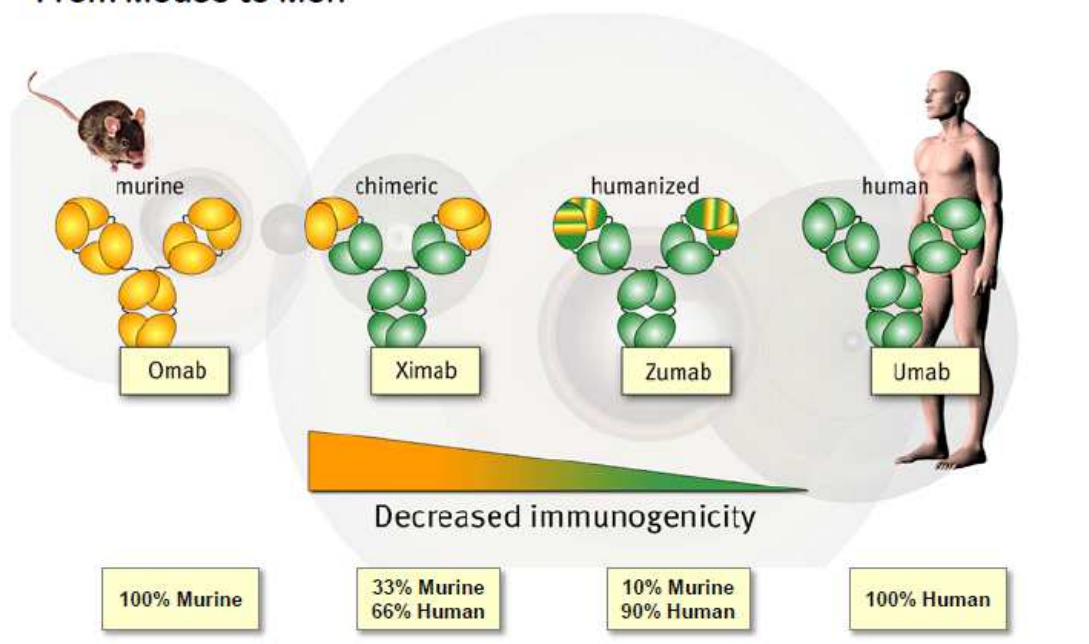


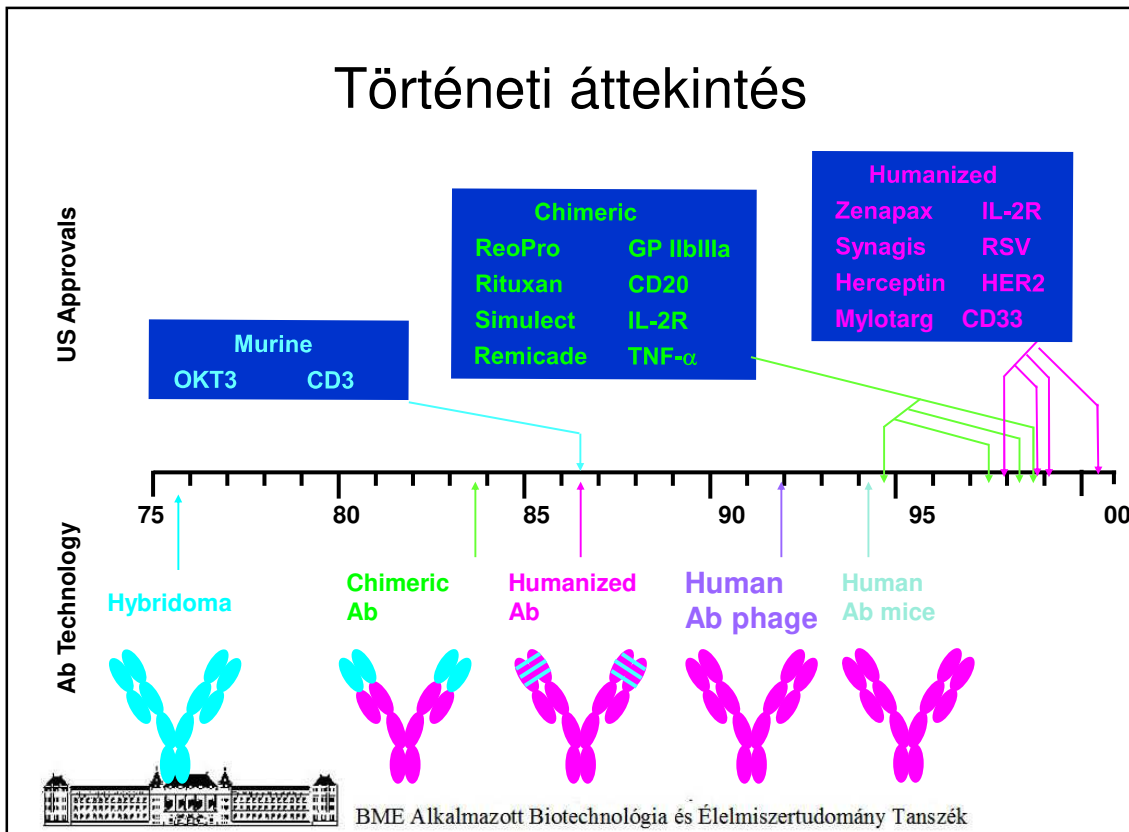
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

A monoklonális antitestek fejlődése

From Mouse to Men

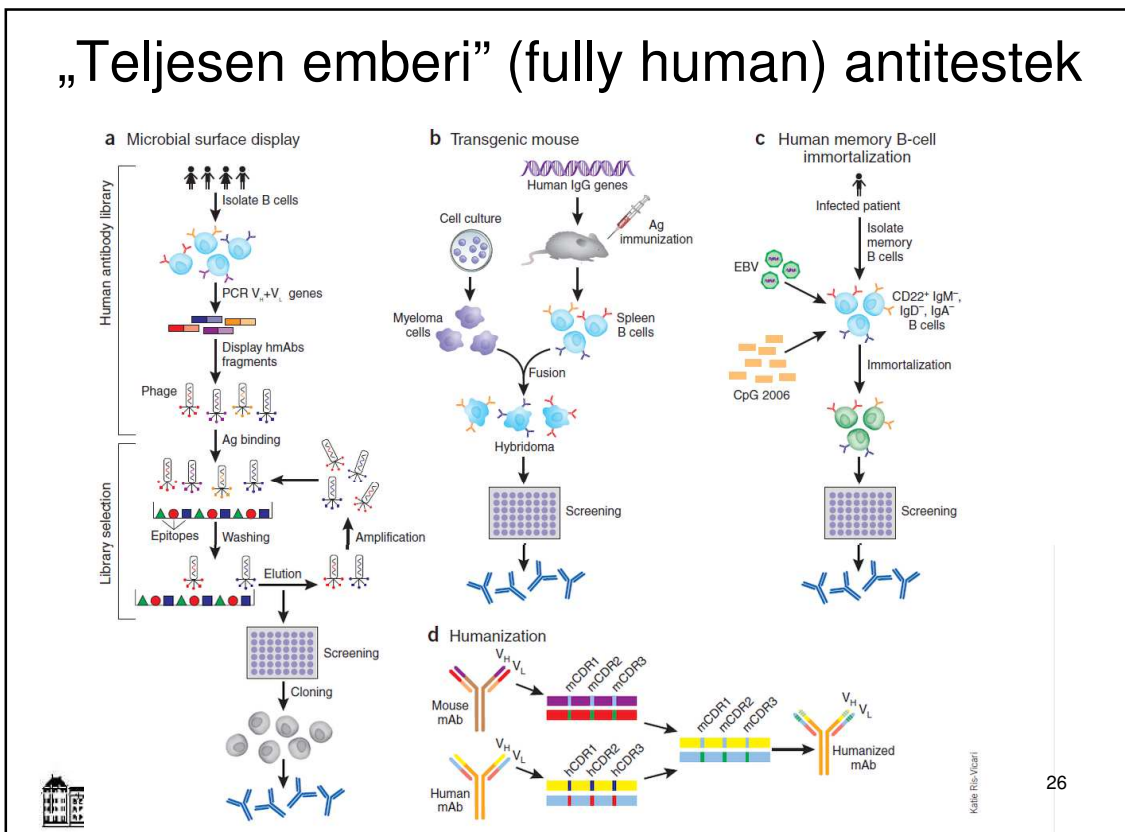
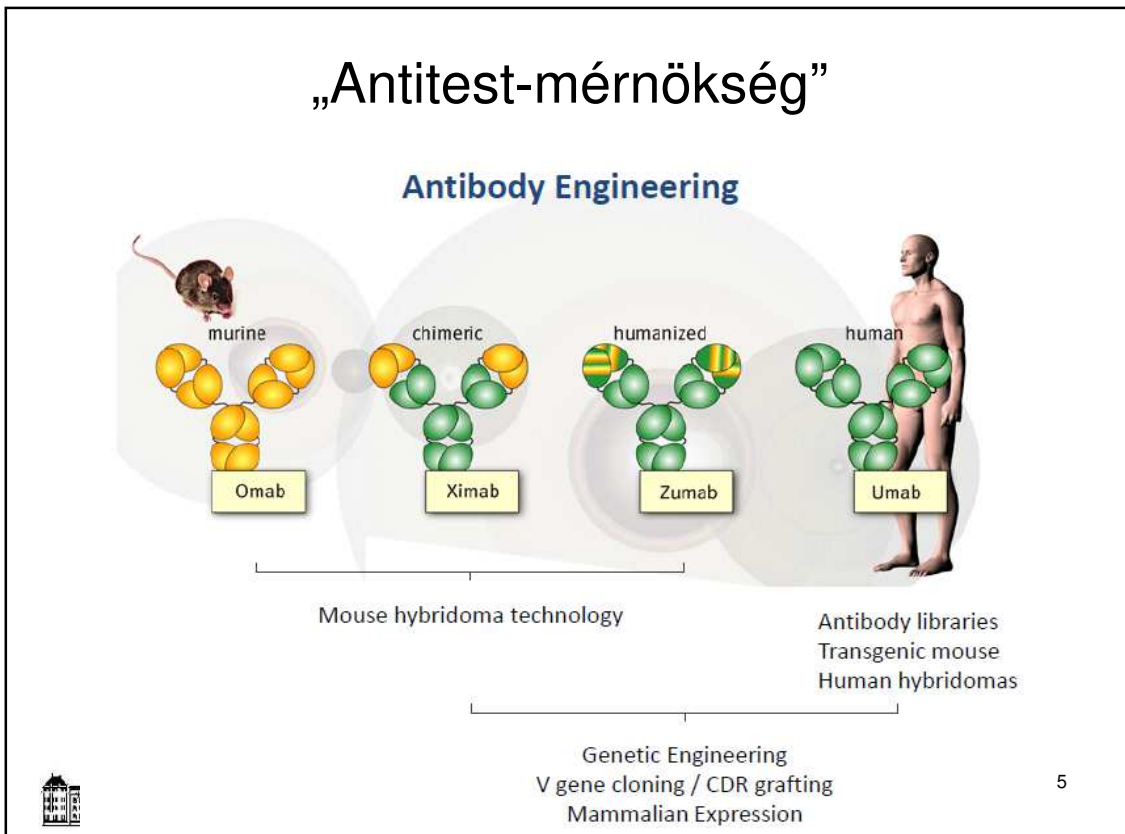




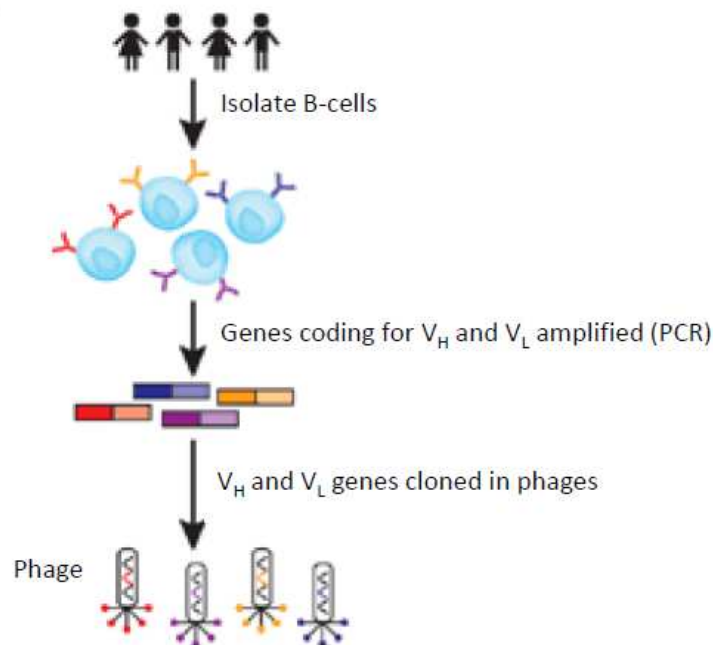
Kiméra és humanizált monoklonális antitestek

- 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



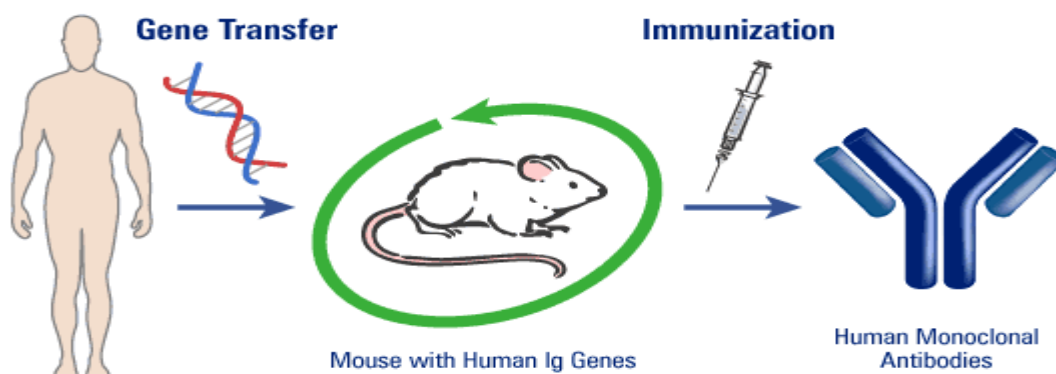


Fág-display könyvtár humán antitestekből



27

UltiMAb platform (transzgénikus egér)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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 specifitásban is hihetetlen pontosság érhető el.
- szemi-szintetikus könyvtárak: amelyekben egyes mesterségesen kialakított antigénkötő oldalakat természetesekkel kombinálnak.

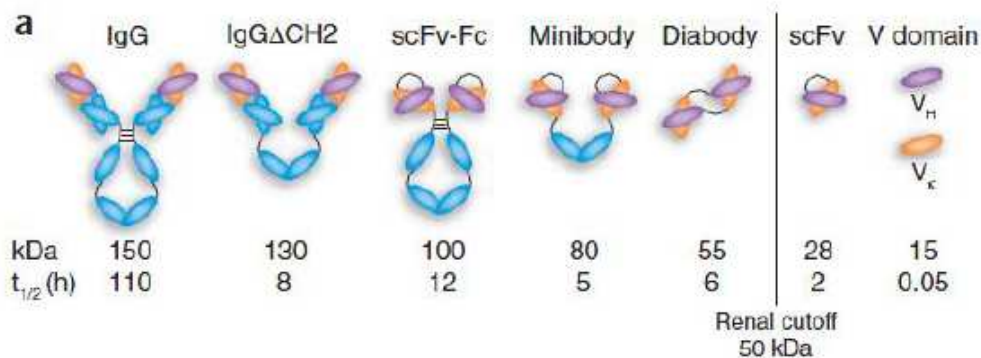


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

Töredék-antitestek

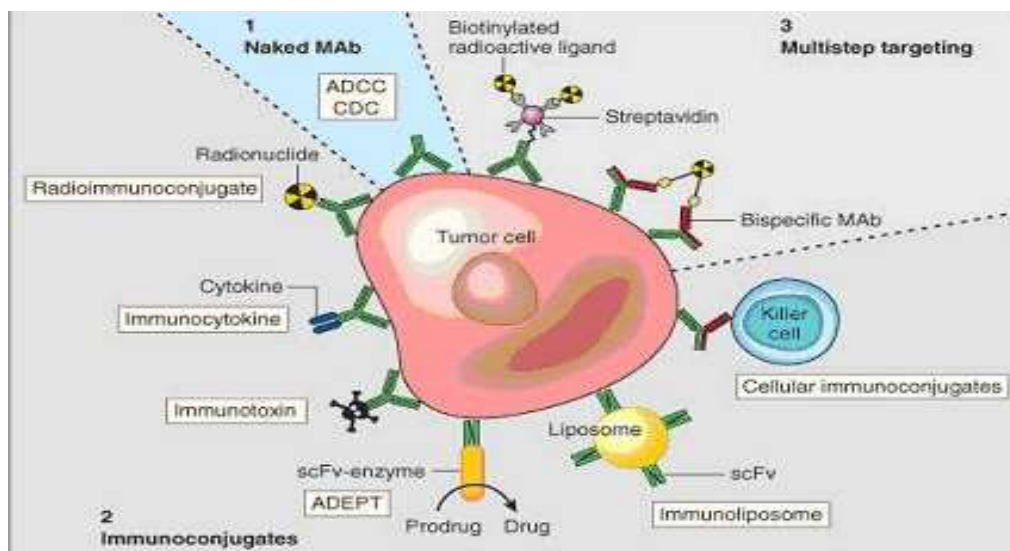
Az epitópok felismerésére elegendő a variábilis régió, nem kell az egész antitest. A kis fragmentumok (Minibody, Diabody) sokkal jobban behatolnak a tumorokba.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

Monoklonális ellenanyagok a tumor-terápiában



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

Radio-immunterápia

A monoklonális antitest terápia hatásosságának fokozás 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.

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

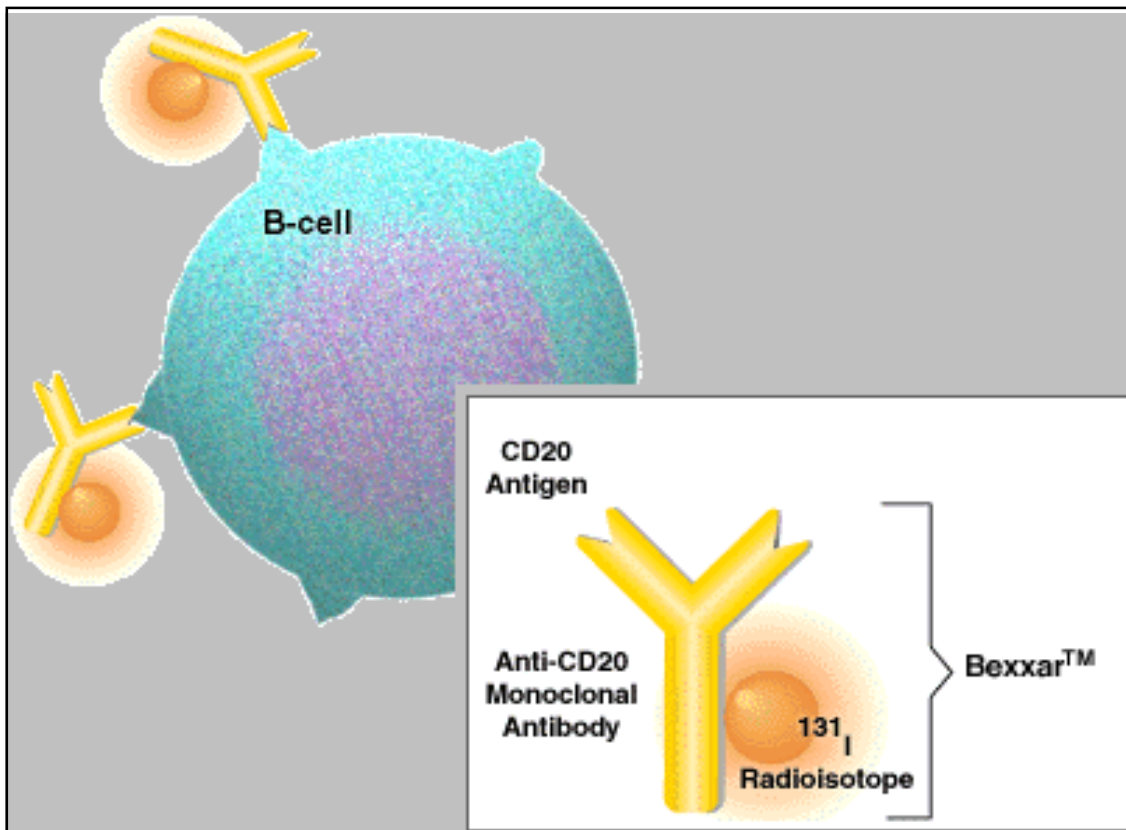
A tositumomab (Bexxar) monoklonális anti-CD-20 antitest és ^{131}I konjugátum (75-80 % remisszió)

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

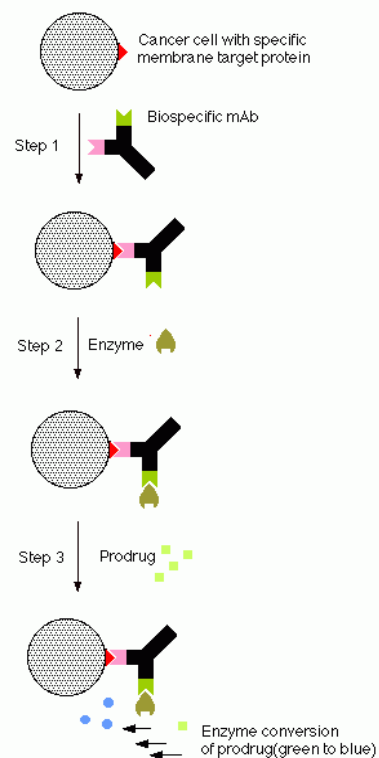
32



Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)

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

Figure 1



BME Alkalmazott Biotechno

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.

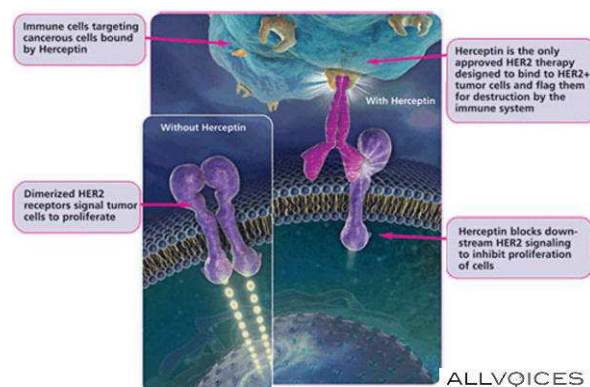
Agytumor és a mellrák kezelésére már használják.

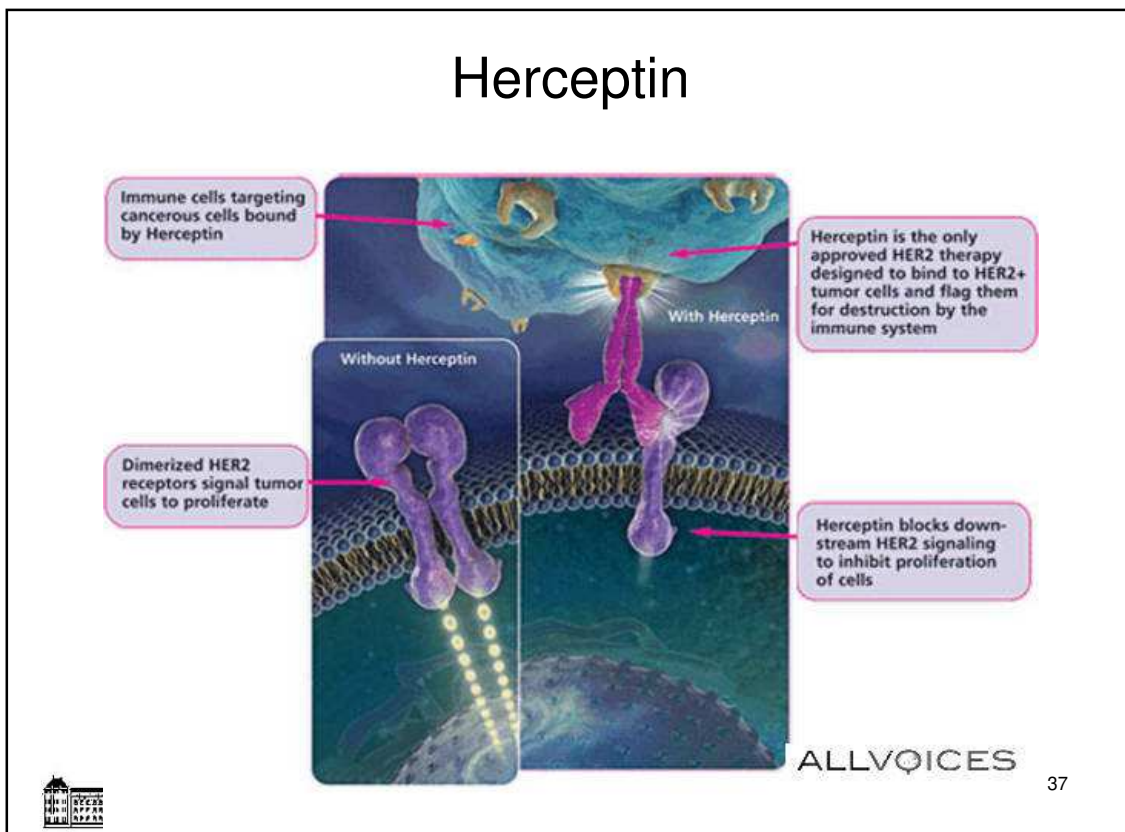


Herceptin

Az antitest hatása kettős:

- egyrészt akadályozza a tumorsejt osztódását (kötődésével megakadályozza a HER2 receptorok dimerizálódását).
- másrészt megjelöli a tumorsejtet az immunrendszer számára.

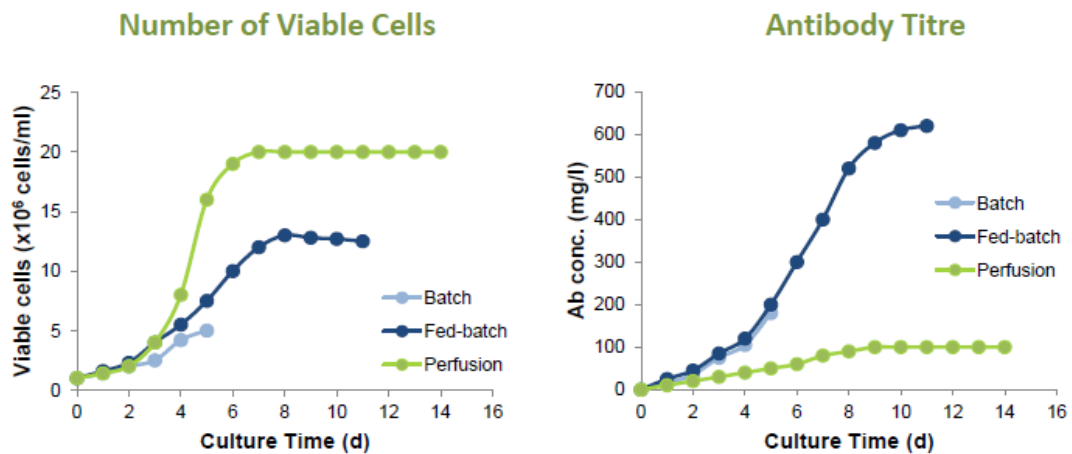




MAb termelési technológiák

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

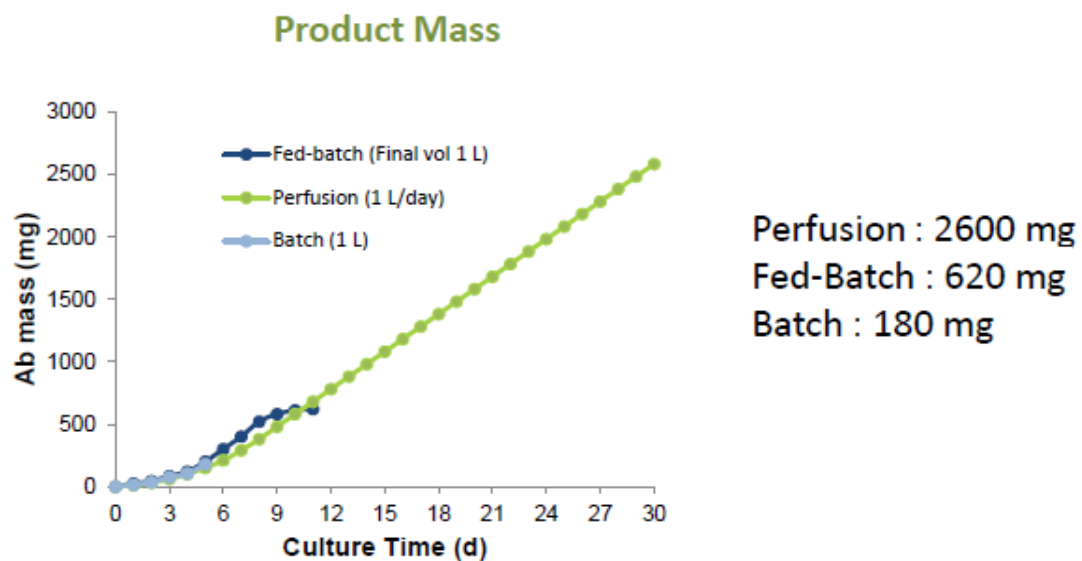
MAb termelési technológiák



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

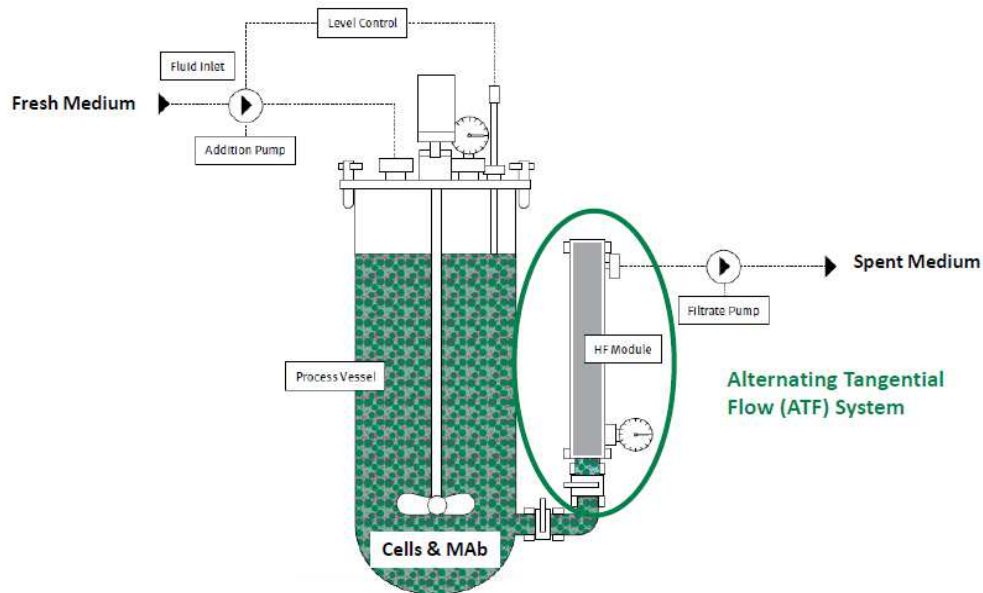
39

MAb termelési technológiák

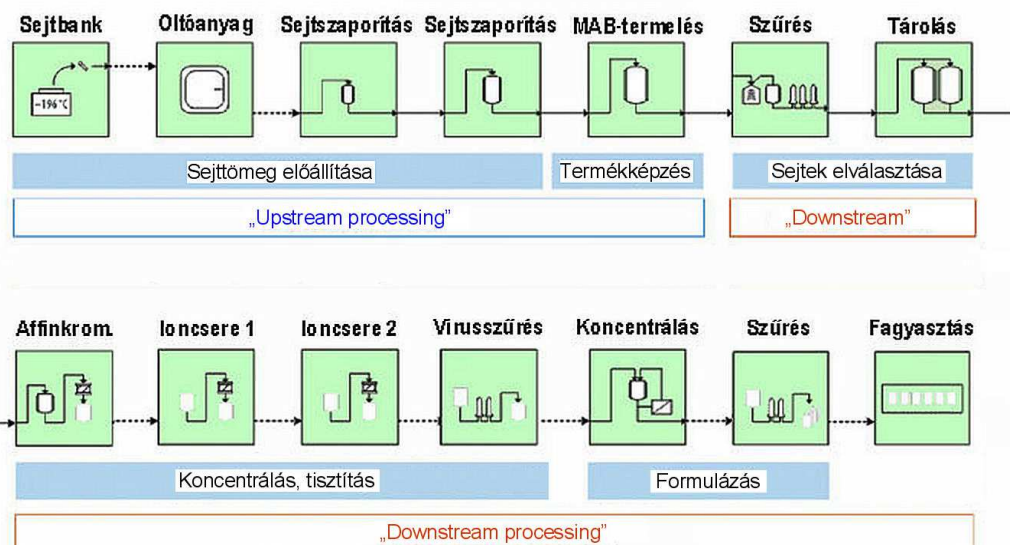


Sejtvisszatartásos technológia

XD® Process: Extreme Density Cell-culture



Teljes technológia (upstream+downstream)

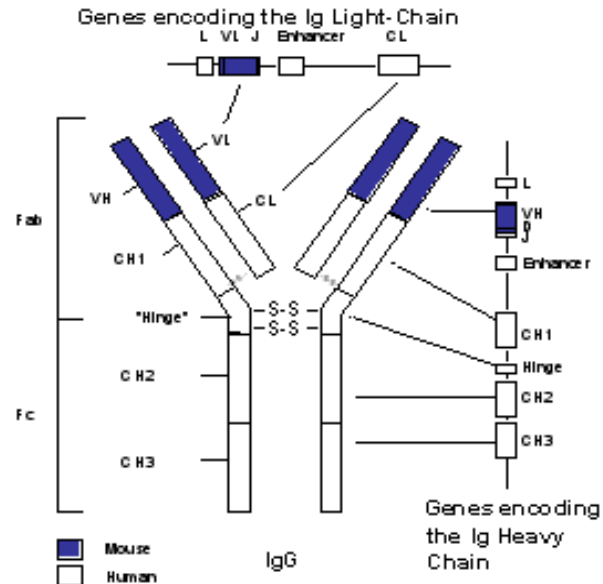


Esettanulmány: Simulect

Immunszupresszáns, szervátültetéseknel a limfocitákat 30-40 napra kiüti.

Humanizált, a génszerelvényt SP2/0 sejtvonalba építették be.

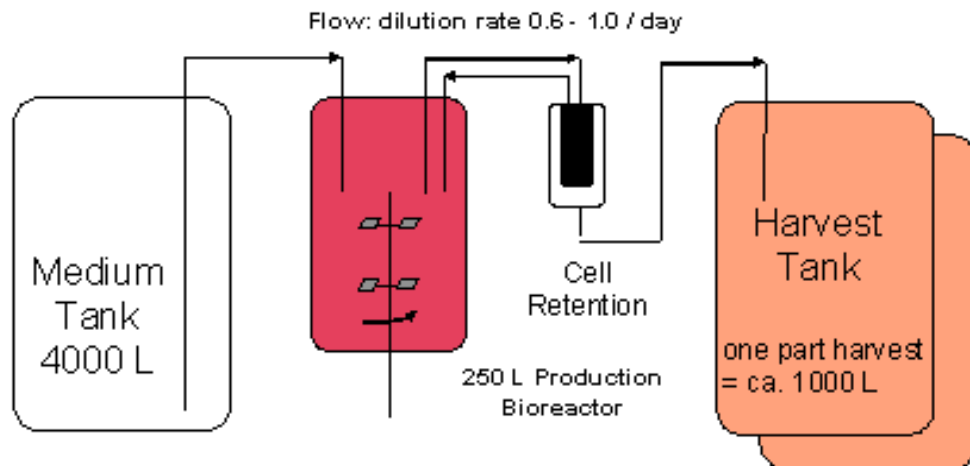
Szuszpenziós tenyészet, folytonos, sejtviisszatartással → nagy sejtsűrűség



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Esettanulmány: Simulect

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



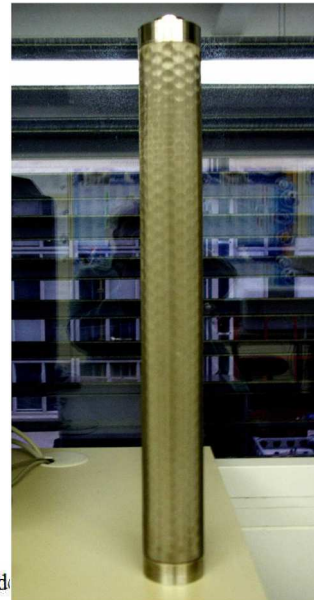
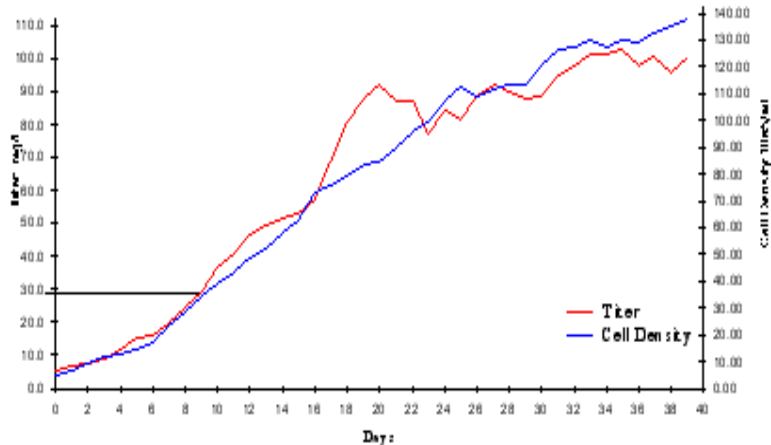
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

44

Esettanulmány: Simulect

A fermentáció lefutása

A forgó szita szűrő



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Monoklonális antitestek nevezéktana

Prefix	Target		Source		Suffix
<i>variable</i>	-o(s)-	bone	-u-	human	-mab
	-vi(r)-	viral	-o-	mouse	
	-ba(e)-	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				



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Monoklonális antitestek nevezéktana

Az előtag nem hordoz semmiféle információt, csak egyedinek kell lennie, általában utalás a gyógyszer nevére

A második tag utalás a gyógyszer célpontjára (pl *-ci(r)-* keringségi 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.???



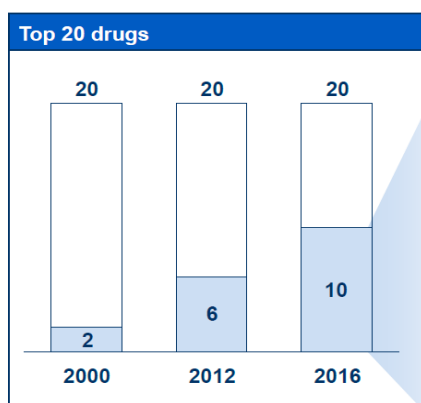
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

47

A „top 20” gyógyszerből 10 biotech termék

USD billion

Biologic



Source: EvaluatePharma, McKinsey

Top 20 drugs in 2016

Drug	Type	Revenue
Humira	Biologic	10.1
Avastin	Biologic	8.9
Enbrel	Biologic	7.3
Rituxan	Biologic	6.8
Crestor	Conventional	6.3
Herceptin	Biologic	6.2
Remicade	Biologic	5.7
Lantus	Biologic	5.3
Seretide/Advair	Conventional	5.2
Prolia	Biologic	5.2
Revlimid	Conventional	4.8
Spiriva	Conventional	4.6
Plevnar	Biologic Vaccine	4.4
Lyrca	Conventional	4.1
VX-950	Conventional	3.7
Xarelto	Conventional	3.6
Januvia	Conventional	3.6
Atripla	Conventional	3.5
Lucentis	Biologic	3.4
Truvada	Conventional	3.4



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

48

