

## REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK

Funkció szerint:

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

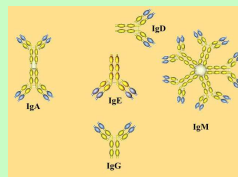


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

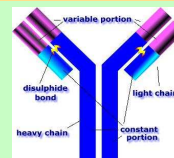
## Antitestek

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



- vírusinaktiválás
- baktériumok agglutinálása
- megjelölés fagocitózisra

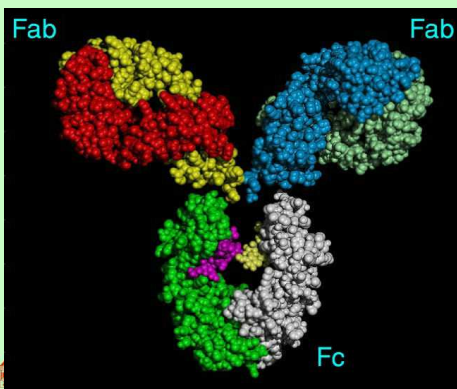
Az antigén felületén a kapcsolódási rész: epitóp



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

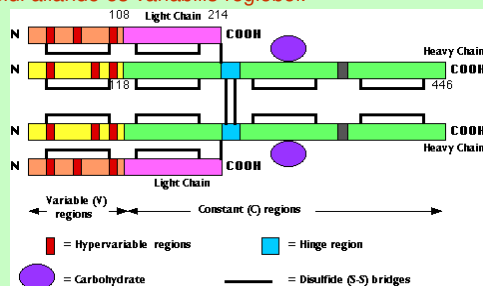
2

## Antitestek



## Az antitestek fehérjeszerkezete

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

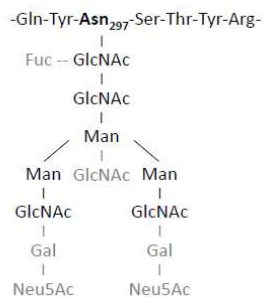


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

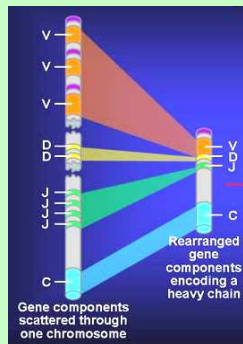
## Az antitestek glikozilálása

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



5

## Antitestek



A szervezet ~10<sup>7</sup>-10<sup>9</sup> 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 <sub>κ</sub>	40	200 féle κ lánc	324 féle könnyű lánc	2.5 x 10 <sup>6</sup> féle antitest
	J <sub>κ</sub>	5			
	V <sub>λ</sub>	31	124 féle λ lánc		
	J <sub>λ</sub>	4			
Nehéz lánc	V <sub>H</sub>	51	7650 féle nehéz lánc		
	D <sub>H</sub>	25			
	J <sub>H</sub>	6			

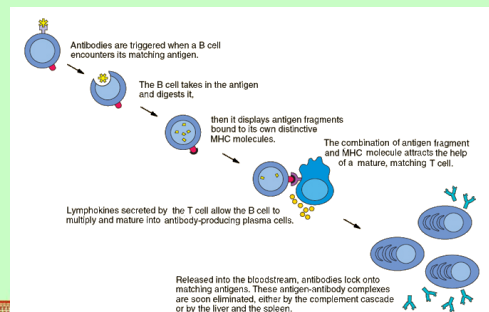


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

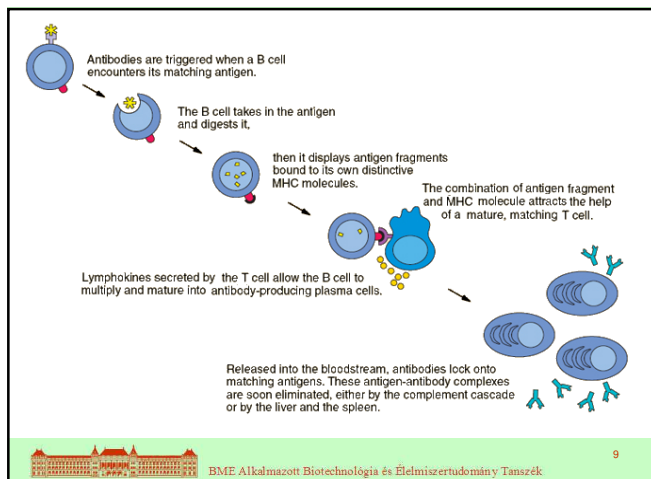
7

## Antitestek

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



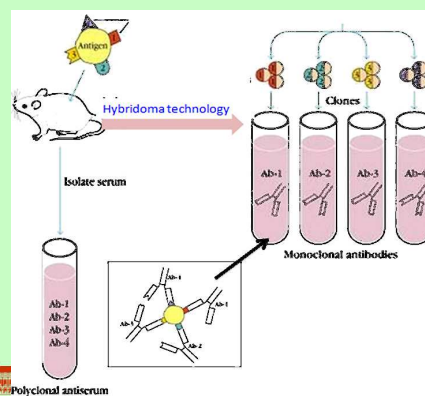
8



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

## 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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

## 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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

### Monoklonális ellenanyag előállítás menete

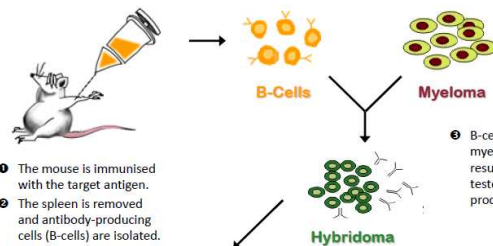
- egér/patkány beoltása antigénnel (több lépcsőben)
- lép vagy nyirokcsomó eltávolítása, homogenizálása
- lépből származó plazmasejtek + egér tumorsejtek (plazmacitoma/mielóma sejtek) fúziója
- Az ellenanyag termelő klónok azonosítása, izolálása
- A termelő hibridómák folyamatosan szaporodnak és ellenanyagot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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

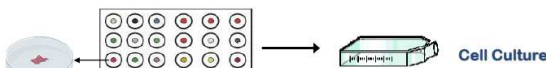
13

### Hibridóma technológia



- The mouse is immunised with the target antigen.
- The spleen is removed and antibody-producing cells (B-cells) are isolated.

B-cells are fused with myeloma cells and the resulting hybridomas are tested for antibody production.



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) →

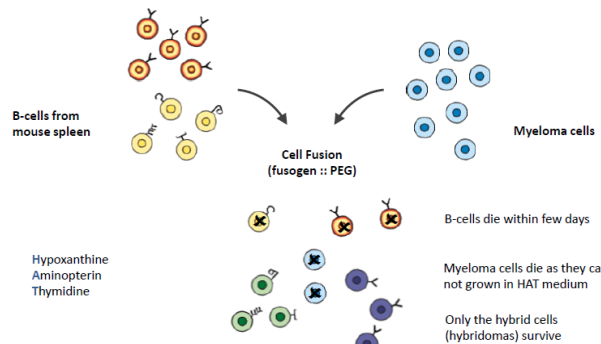
HAT médiumon (hipoxantin, aminopterin, timidin) csak a fuzionált sejtek képesek szaporodni. →



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

### Hibridóma szelekció, a "HAT Trick"



B-cells from mouse spleen

Myeloma cells

Cell Fusion (fused with PEG)

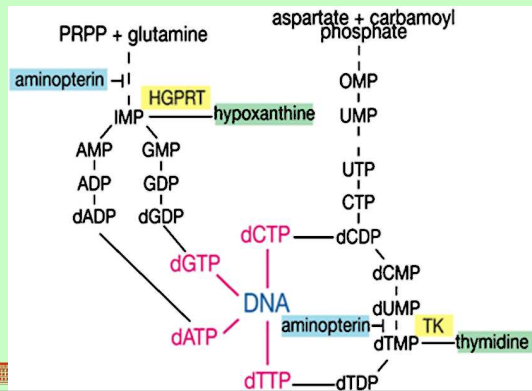
Hypoxanthine  
Aminopterin  
Thymidine

B-cells die within few days

Myeloma cells die as they can not grow in HAT medium

Only the hybrid cells (hibridóma) survive

### Hibridóma szelekció, a "HAT Trick"

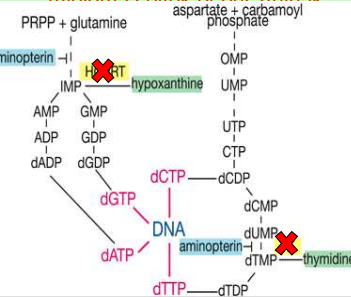


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

### Hibridóma szelekció, a "HAT Trick"

HGPRT és TK hiányos mutánsok hiába kapnak segítséget (hipoxantin, timidin), nincs nukleotid szintézis – a mielőti sejt elpusztulnak



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

PRPP: phosphoribosyl-pyrophosphate, HGPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase, C: timidine-kinase

18

BME Alkalmazott Biotechnológia 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)

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 rohagot, rosszabb esetben anafilaxiás sokkot okozott.

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

**HIBRIDÓMA → génmanipuláció → SEJTTENYÉSZET**

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
21

## A monoklonális antitestek fejlődése

From Mouse to Men

100% Murine

33% Murine  
66% Human

10% Murine  
90% Human

100% Human

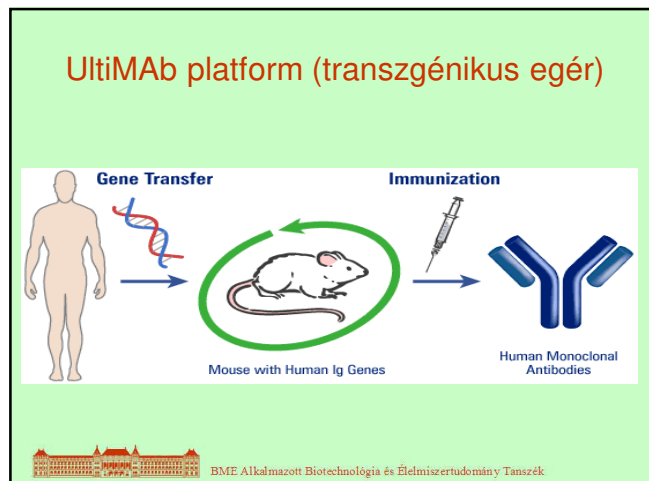
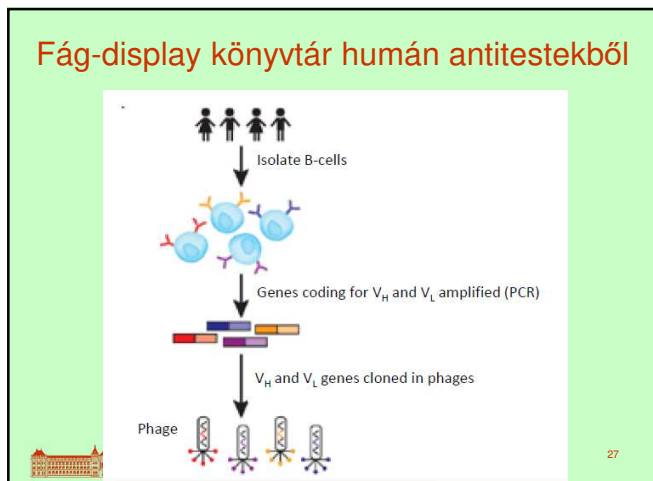
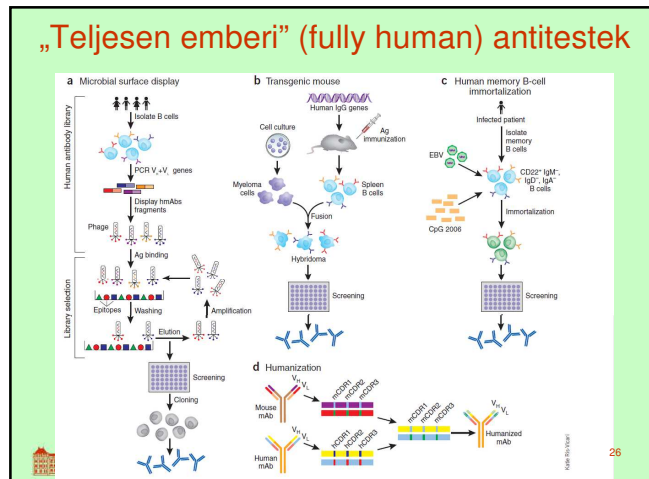
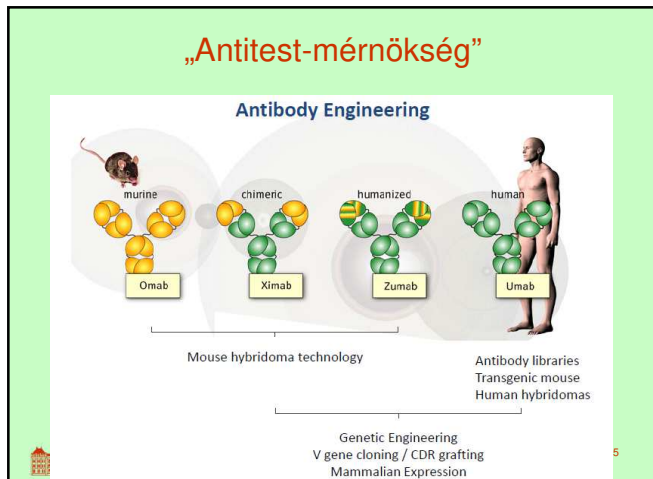
## Történeti áttekintés

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
22

## 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.

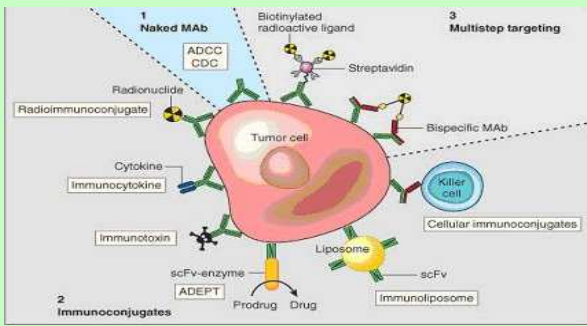
### Töredék-antitestek

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 <sub>1/2</sub> (h)	110	8	12	5	6	2	0.05
Renal cutoff						50 kDa	



### Monoklonális ellenanyagok a tumor-terápiában



### Radio-immunterápia

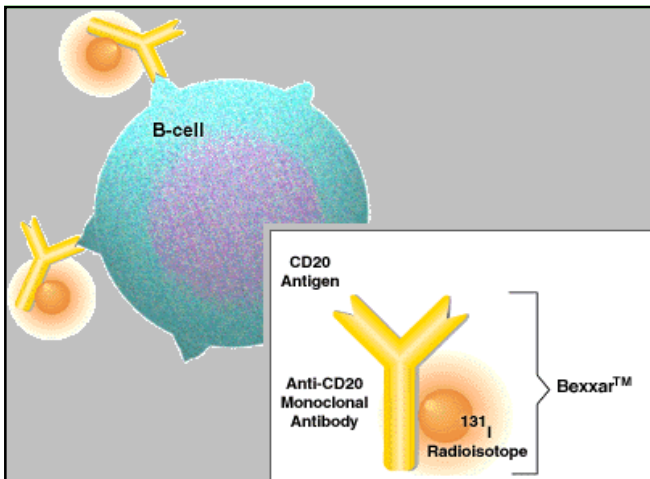
A monoklonális antitest terápia hatásosságának fokozás volt a cél a monoklonális antitesthez konjugált radioizóp kezelés kifejlesztésének

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

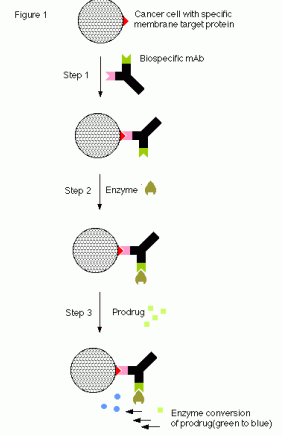
Emellett a MAB és az izotóp B-sejt károsító hatása összeadódik. Ma 2 radioizotóppal konjugált anti CD-20 készítmény áll rendelkezésre.

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

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



### Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)



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

### Immuno-liposzómák

Az immuno-liposzómák antitest és liposzóma összekapcsolását jelenti.

A liposzómák képesek gyógyszerek vagy terápiás nukleotidszármazékok szállítására.

Így a szerek célzottan hatnak a tumorsejtekre.

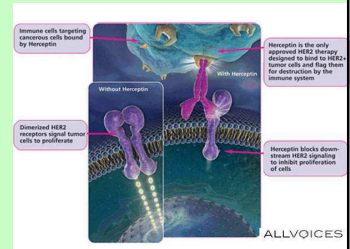
Ez a technológia még gyerekcipőben jár, de már sikeresen alkalmazták in vivo körülmények között tumorsejt növekedés gátlására.

Agytumor és a mellrák kezelésére már használják.

### Herceptin

Az antitest hatása kettős:

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



### Herceptin

Immune cells targeting cancerous cells bound by Herceptin

Without Herceptin

With Herceptin

Dimerized HER2 receptors signal tumor cells to proliferate

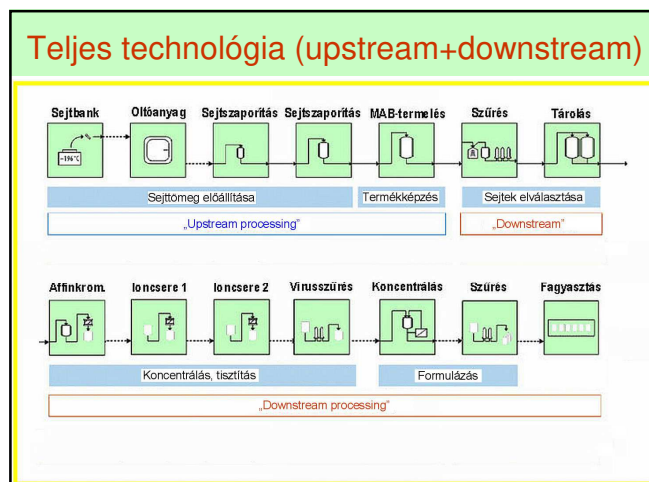
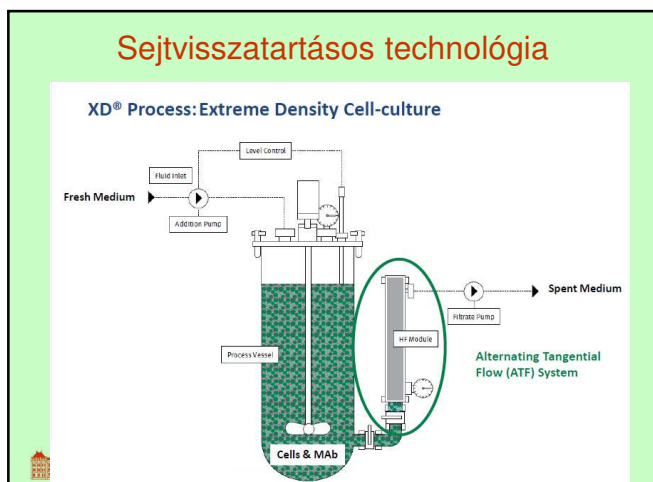
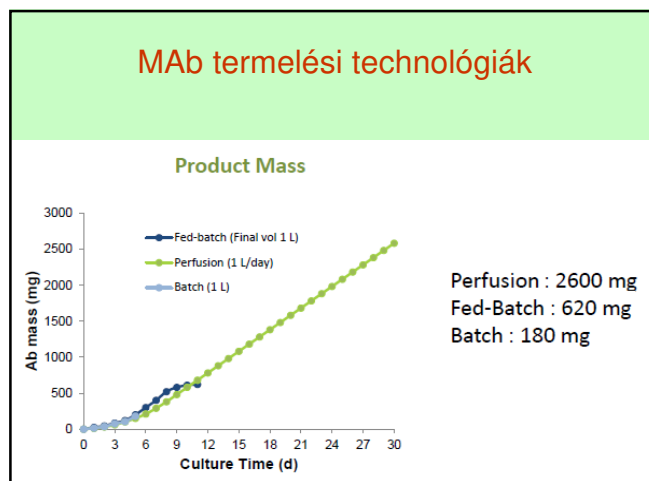
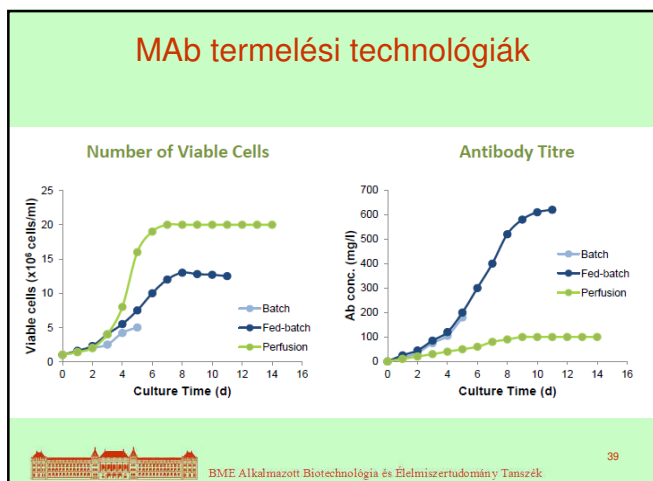
Herceptin blocks downstream HER2 signaling to inhibit proliferation of cells

Herceptin is the only approved HER2 therapy designed to bind to HER2+ tumor cells and flag them for destruction by the immune system

ALLVQICES 37

### 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



### Esettanulmány: Simulect

Immunszuppresszáns, szervátültetésekénél a limfocitákat 30-40 napra kiüti.

Humanizált, a génszerelvényt SP2/0 sejtvonalba építették be.

Szuszpenziós tenyészet, folytonos, sejtviisszatarással → nagy sejtsűrűség

43

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Esettanulmány: Simulect

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

Flow: dilution rate 0.6 - 1.0 / day

44

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Esettanulmány: Simulect

A fermentáció lefutása

A forgó szita szűrő

45

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Monoklonális antitestek nevezéktana

Prefix	Target	Source	Suffix	
variable	-o(s)-	bone	-u-	human
	-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			
			-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 antibody)

Ellenőrző kérdés:  
Melyik gyógyszerről lehet szó, és mit lehet tudni róla?

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

47

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### A „top 20” gyógyszerből 10 biotech termék

Source: EvaluatePharma, McKinsey

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
Spriva	Conventional	4.6
Pevnar	Biologic Vaccine	4.4
Lyrica	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

48

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



