

### 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

---

---

---

---

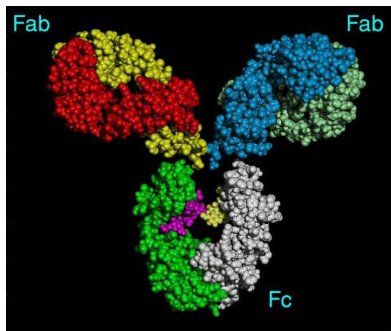
---

---

---

---

### Monoklonális ellenanyagok



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

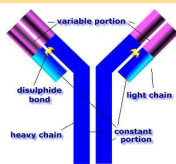
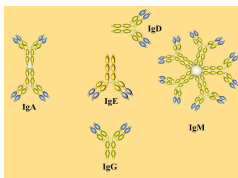
---

### 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.

■ = Hypervariable regions      ■ = Hinge region  
● = Carbohydrate      — = Disulfide (S-S) bridges

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Az antitestek glikozilálása

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

-Gln-Tyr-Asn<sub>297</sub>-Ser-Thr-Tyr-Arg-

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Antitestek

Gene components scattered through one chromosome

Rearranged gene components encoding a heavy chain

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

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### 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>K</sub> | 40            | 200 féle κ lánc        | 324 féle könnyű lánc   | 2.5 x 10 <sup>6</sup> féle antitest |
|             | J <sub>K</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.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
8

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
9

---

---

---

---

---

---

---

---

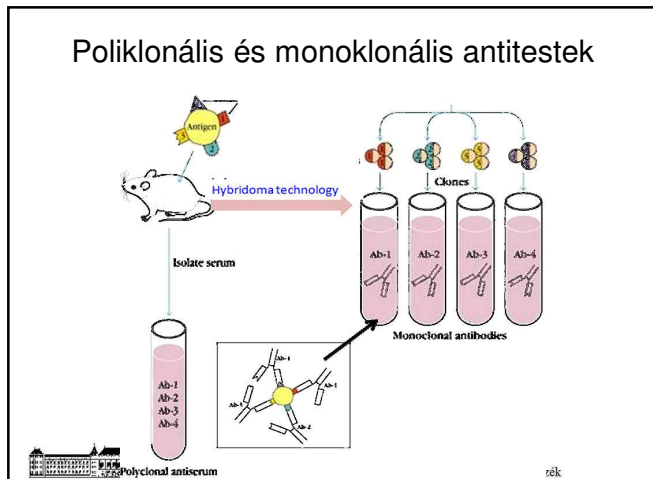
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

### Monoklonális ellenanyagok

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

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

12

---

---

---

---

---

---

---

---

### 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

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

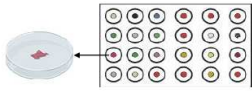
### Hibridóma technológia



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



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



- 4 Screening for antibody production.



- 5 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

---

---

---

---

---

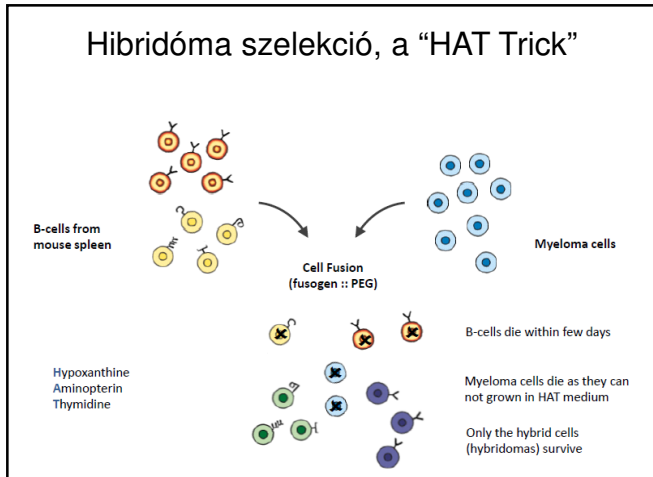
---

---

---

---

---




---

---

---

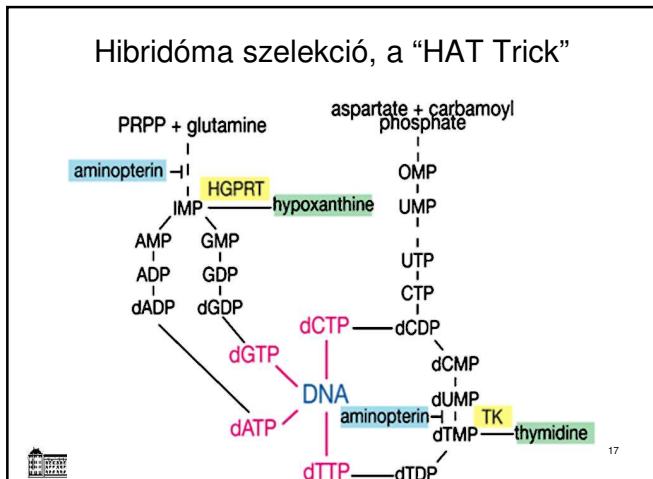
---

---

---

---

---




---

---

---

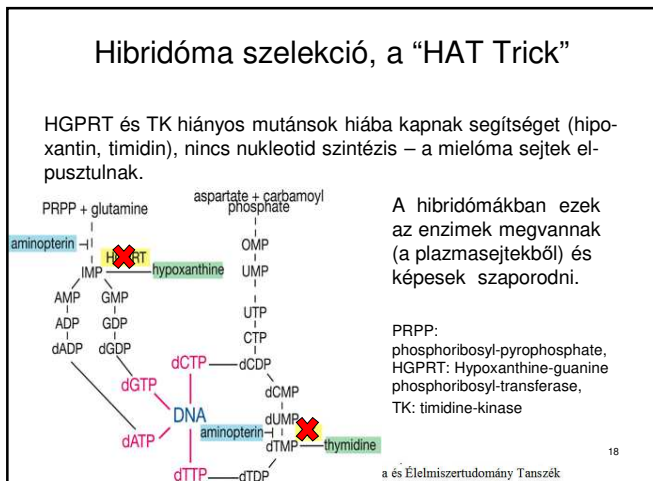
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

## A monoklonális antitestek felhasználása

Az antitestek több célra is felhasználhatók:

### 1. Nem terápiás antitestek:

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

### 2. Humán (in vivo) 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 génszakaszokat emberire.

**HIBRIDÓMA → génmanipuláció → SEJTENYÉSZET**




---

---

---

---

---

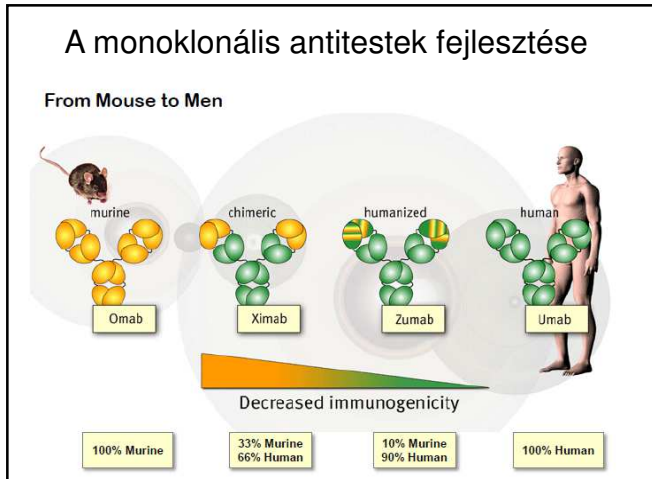
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

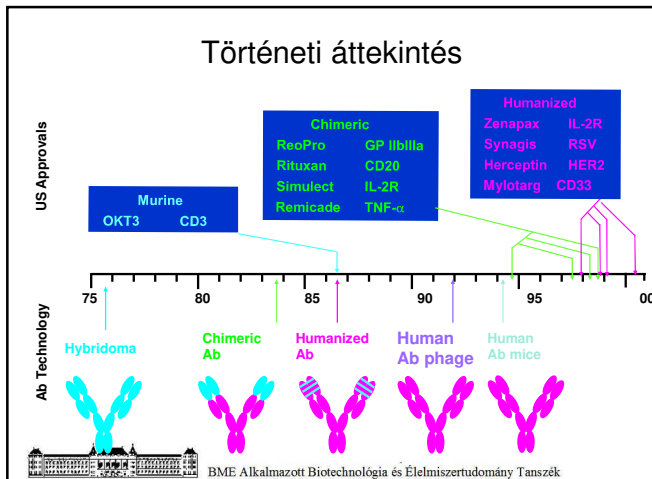
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Kiméra és humanizált monoklonális antitestek

- A kiméra antitestek: murine antitest variábilis régióját egyesítették a humán konstans régióval. Az eredmény 65% humán antitest ( $\kappa$  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

---

---

---

---

---

---

---

---

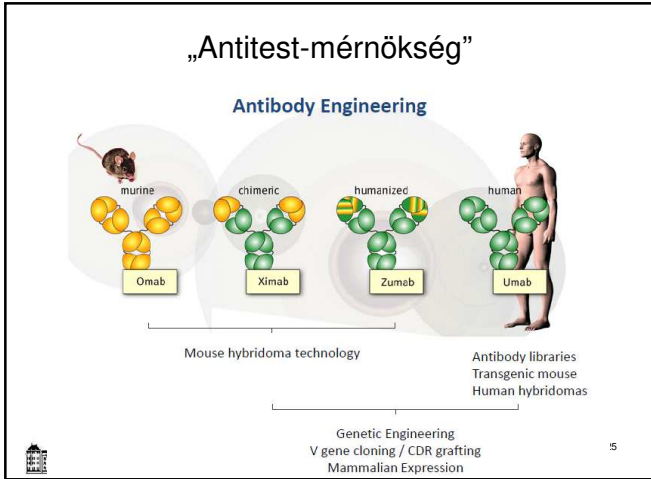
---

---

---

---






---

---

---

---

---

---

---

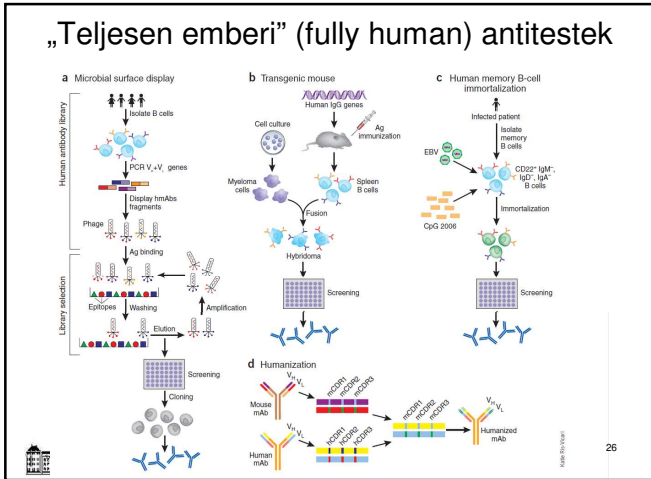
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

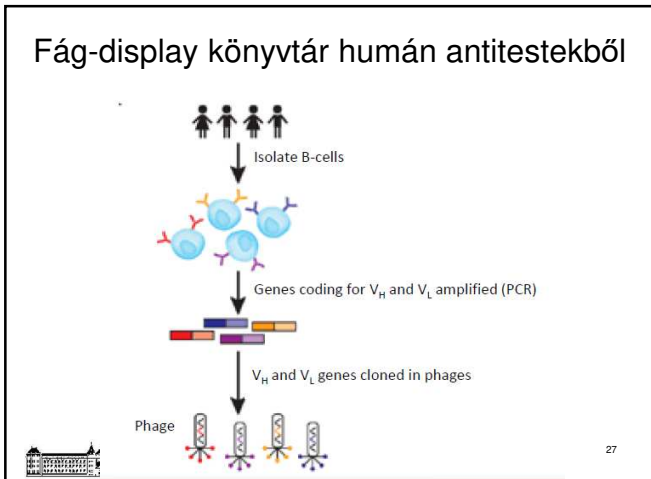
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

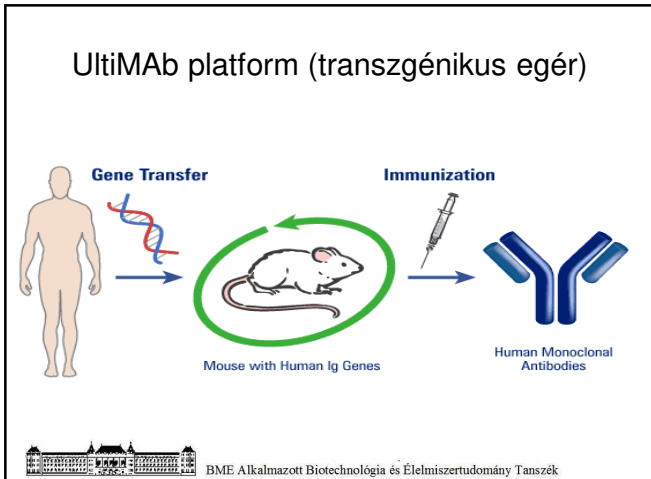
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### 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.

29

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Töredék-antitestek

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

| a                    | 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<br>50 kDa |          |

30

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### 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          |

---

---

---

---

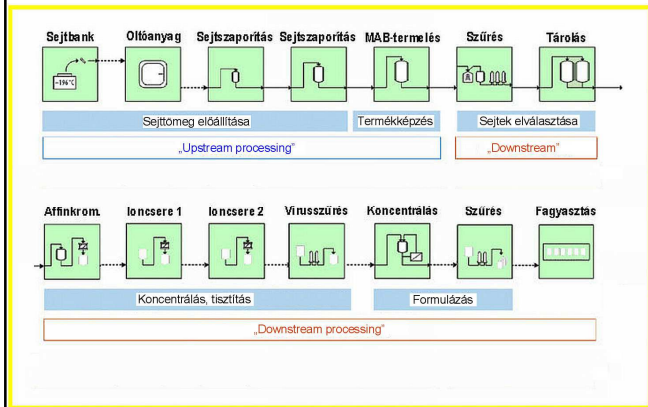
---

---

---

---

### Teljes technológia (upstream+downstream)




---

---

---

---

---

---

---

---

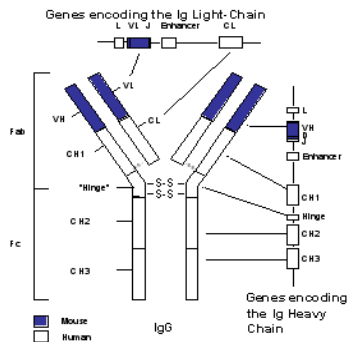
### Esettanulmány: Simulect

Immunszuppresszáns, szervátültetéseknél 30-40 napra kiüti a limfocitákat.

Humanizált, a génszerelvényt SP2/0 sejtvonalba építették be.

Szuszpenziós tenyészet, folytonos, sejtviszartartással → nagy sejtsűrűség

Novartis basiliximab




---

---

---

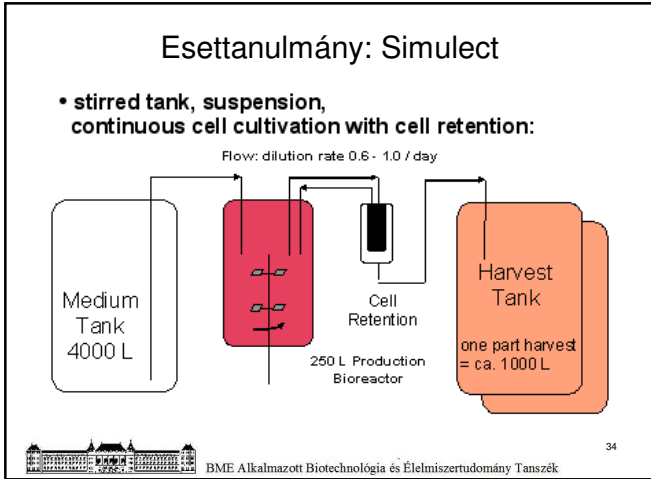
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

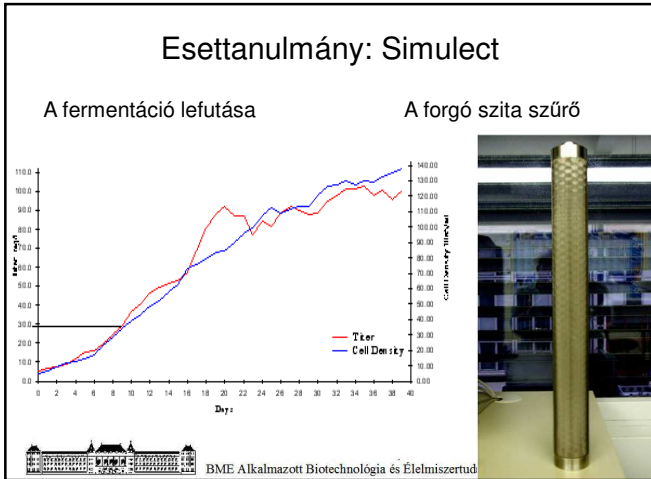
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

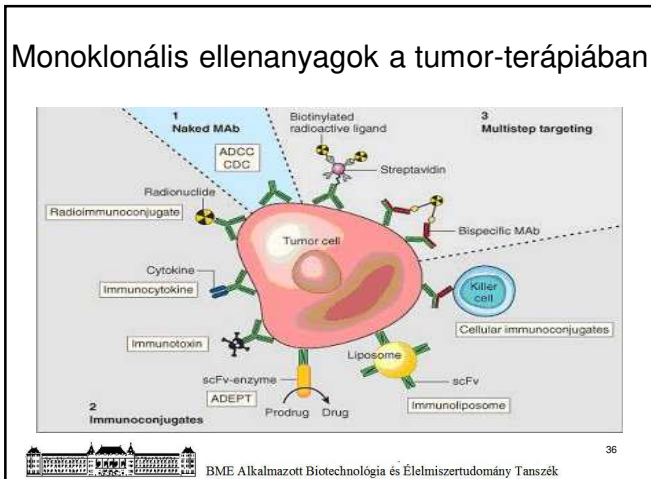
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Radio-immunterápia

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

Módszer alapja: a lymphoid 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 <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)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

37

---

---

---

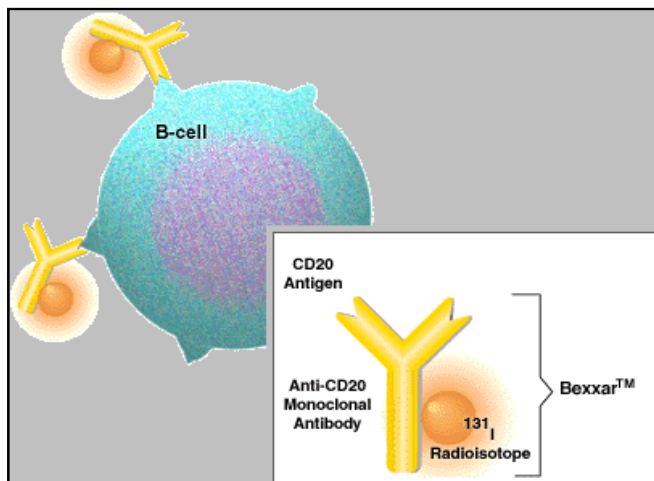
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

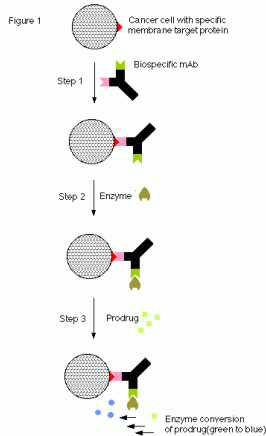
---

---

---

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

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



BME Alkalmazott Biotechn

---

---

---

---

---

---

---

---

### 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

40

---

---

---

---

---

---

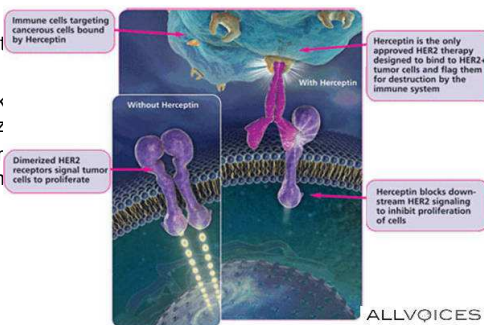
---

---

### Herceptin

Az antitest hat

- egyrészt a tumorsejtet osz
- másrészt a tumorsejtet az immunrendszer számára.



ALLVQICES



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

41

---

---

---

---

---

---

---

---

### 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       |        | -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 információt, 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.???




---

---

---

---

---

---

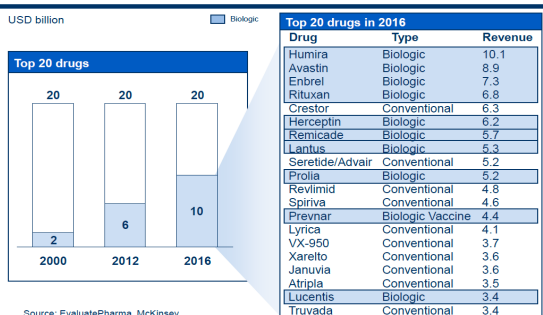
---

---

---

---

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




---

---

---

---

---

---

---

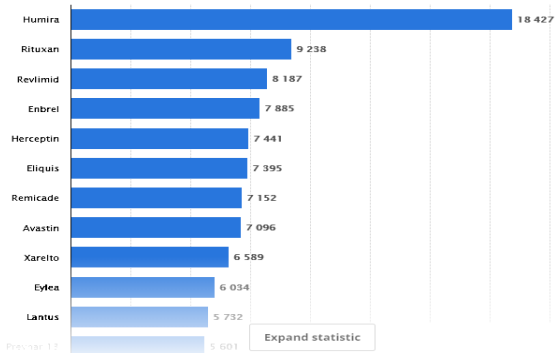
---

---

---

### A piacvezető biotechnológiai gyógyszerek (2017)

Top 15 pharmaceutical products by sales worldwide




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---