

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

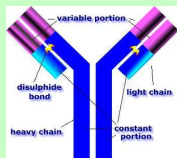
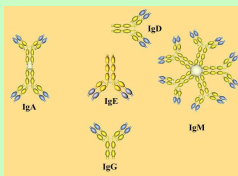
1

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

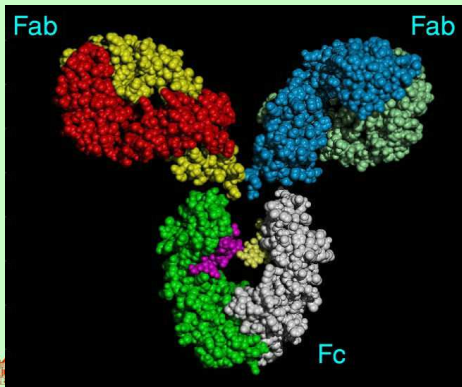
Az antigén felületén a kapcsolódási rész: epitóp



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.

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

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 _K	40	200 féle κ lánc	324 féle könnyű lánc	2.5 x 10 ⁶ féle antitest
	J _K	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			

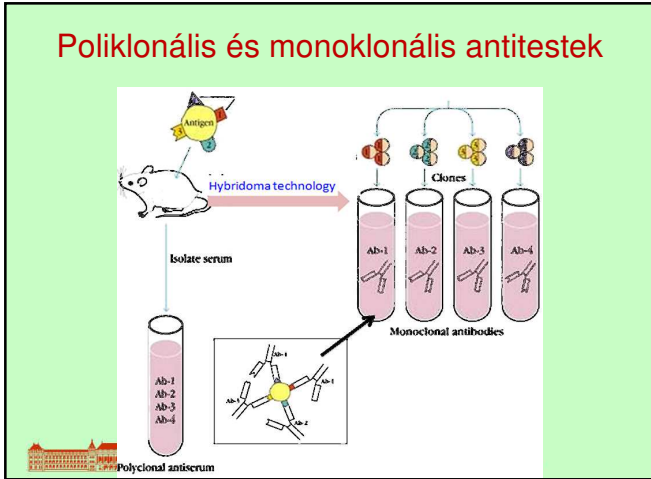
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 7

Antitestek

A szervezetben egy adott antitest tömeges termelését a 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 specifitású és izotípusú ellenanyagok **nagy mennyiségben** és **azonos minőségben** („pharmacology-grade”) állíthatók elő
- jelentős a szerepük a gyógyászat, az immunanalitika, az affinkromatográfia területein

11

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

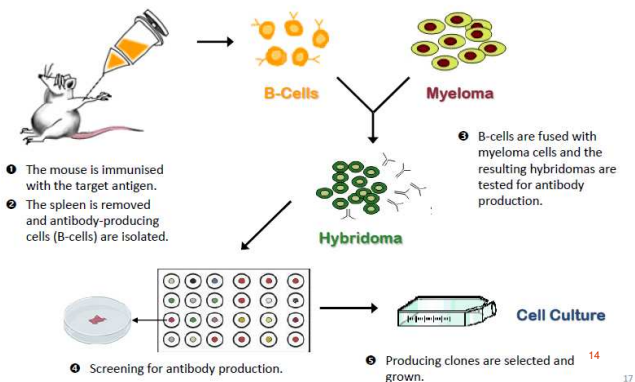
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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



Hibridóma technológia



Screening for antibody production.

Producing clones are selected and grown.

Hibridóma szelekció, a "HAT Trick"

A fúzió után többféle sejt van jelen:

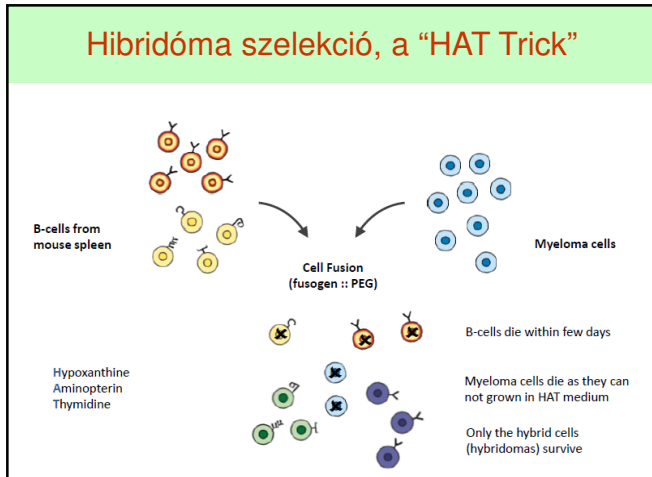
- fuzionálatlan plazmasejtek
- fuzionálatlan tumorsejtek
- hibridómák

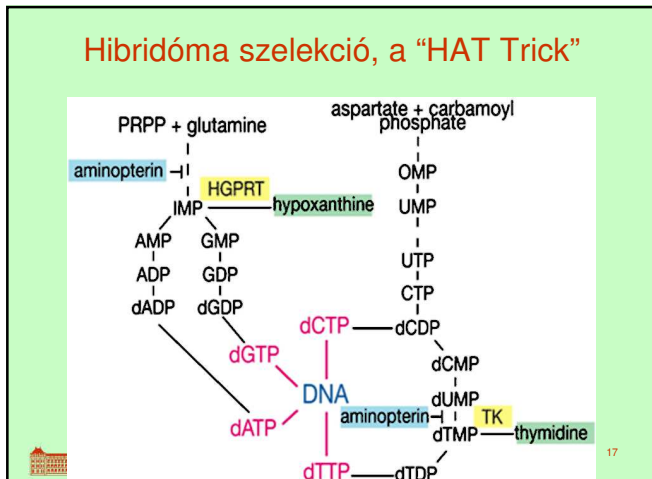
ezek közül kell izolálni a hibridómákat.

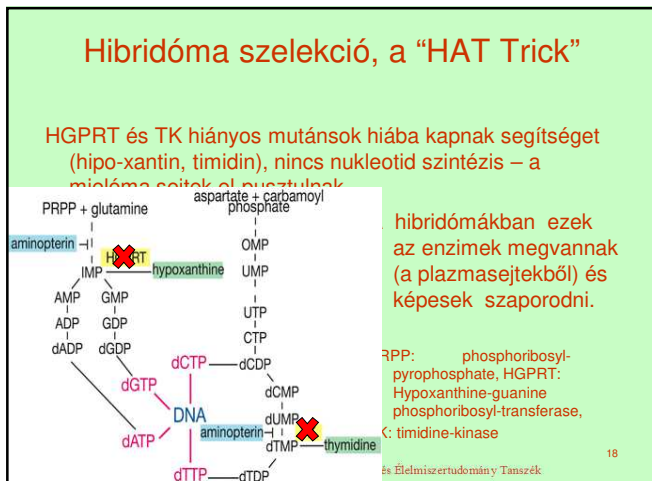
A szelekció azon alapul, hogy a tumorsejtekbe még a fúzió előtt két anyagcsere markert építenek be (két enzim hiánya) →

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









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.

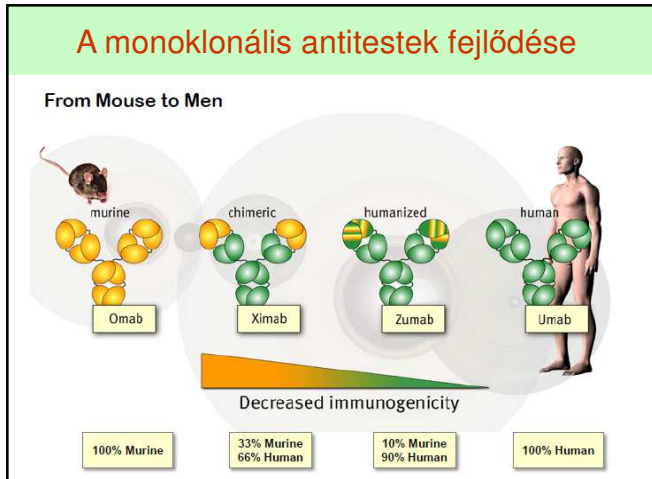
A kudarc okai: rövid felezési idő (*in vivo*), limitált bejutás a tumorba, elégtelen funkció = kicsi a citotoxikus stimuláló hatás

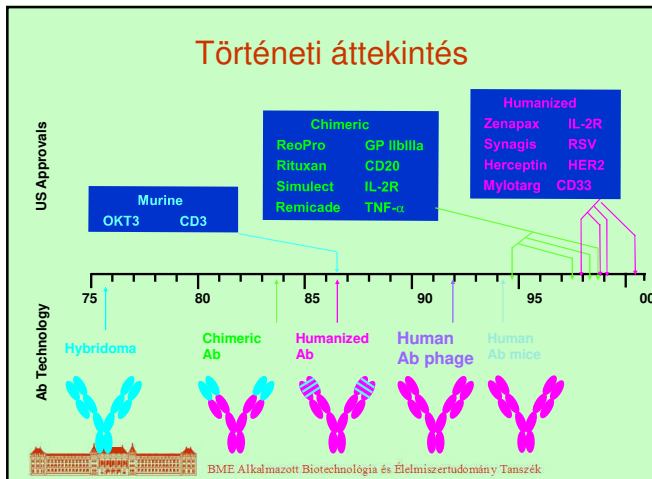
Anyaga az ismételt beadás után gyakran erős allergiás rohagot, rosszabb esetben anafilaxiás sokkot okozott.

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

HIBRIDÓMA → génmanipuláció → SEJTNYÉSZET



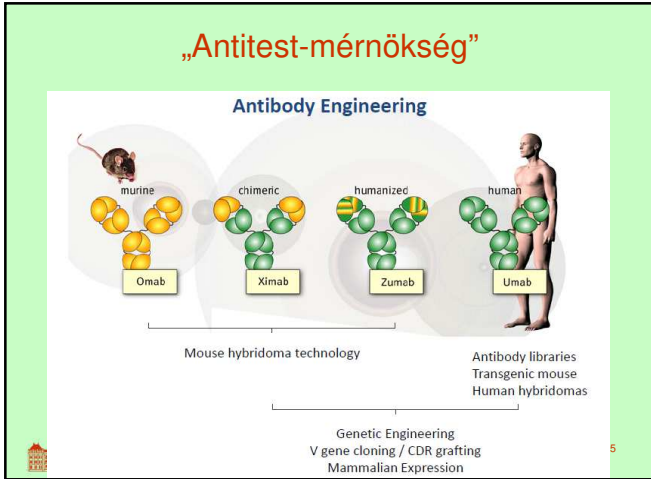


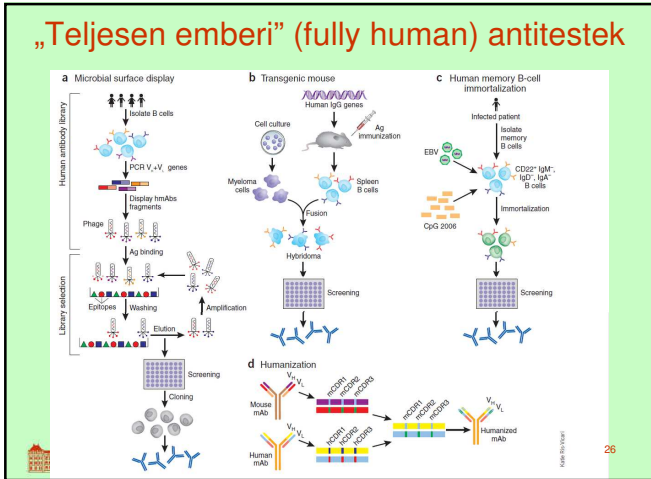


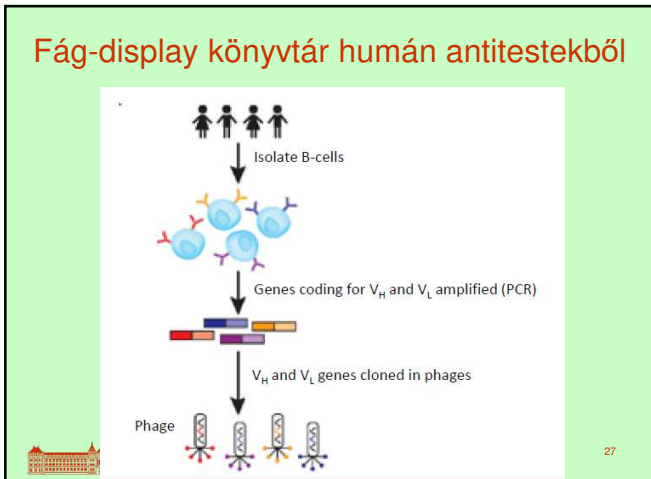
Kiméra és humanizált monoklonális antitestek

- 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







UltiMAb platform (transzgenikus 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 specifikálásában is hihetetlen pontosság érhető el.
- szemi-szintetikus könyvtárak: amelyekben egyes mesterségesen kialakított antigénkötő oldalakat természetesekkel kombinálnak.

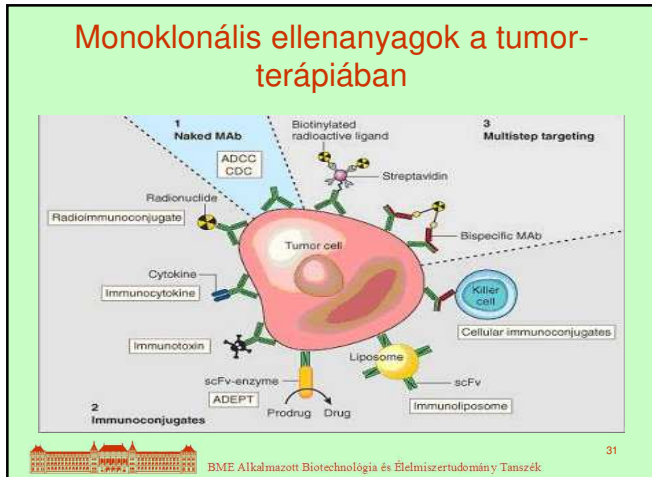
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Töredék-antitestek

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

	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							

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

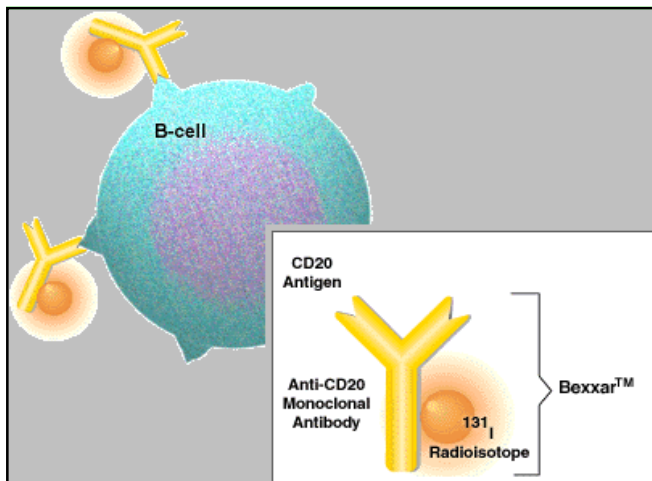
Emelett a MAB és az izotóp B-sejt károsító hatása összeadódik. Ma 2 radioizotóppal konjugált anti CD-20 készítmény áll rendelkezésre.

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

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

32

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)

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

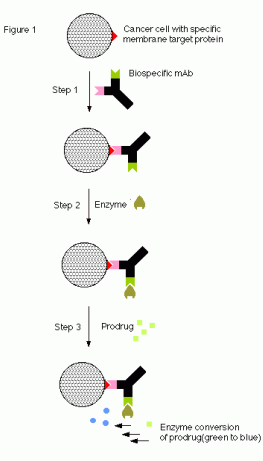


Figure 1
Cancer cell with specific membrane target protein
Step 1 Biospecific mAb
Step 2 Enzyme
Step 3 Prodrug
Enzyme conversion of prodrug (green to blue)

BME Alkalmazott Biotechnológia

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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Herceptin

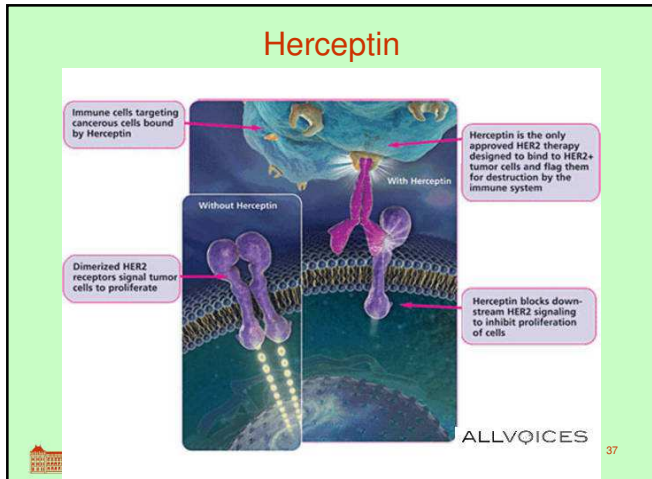
Az antitest hatása kettős:

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



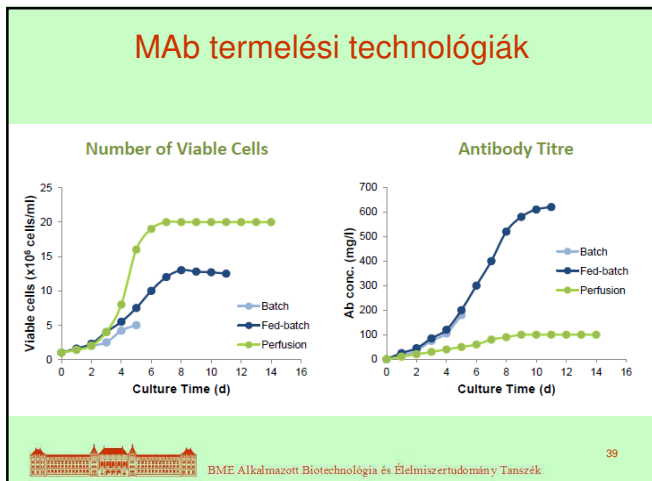
ALLVOICES

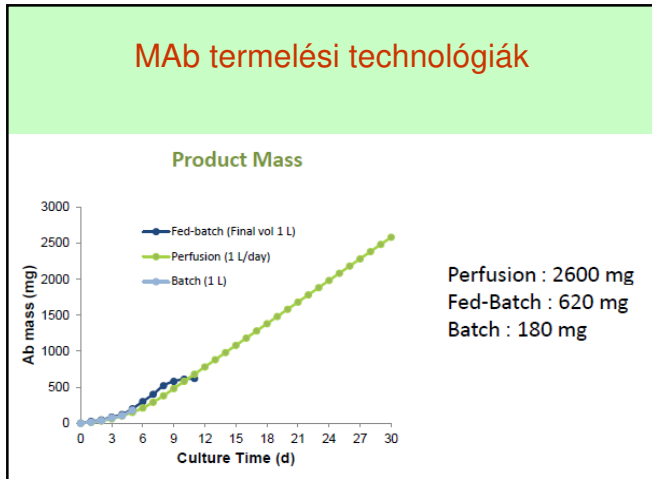
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

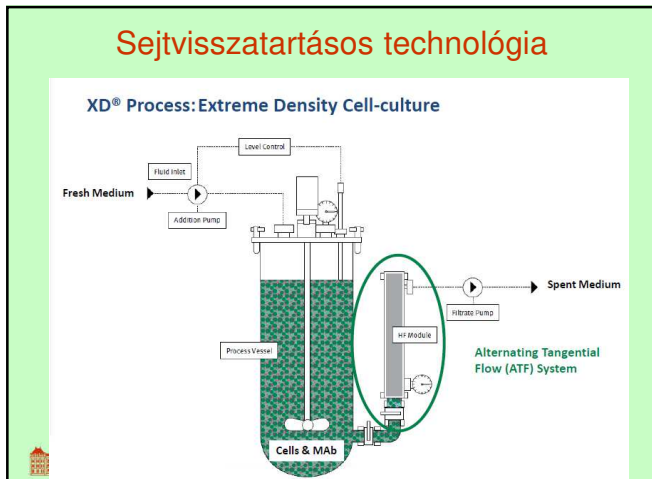


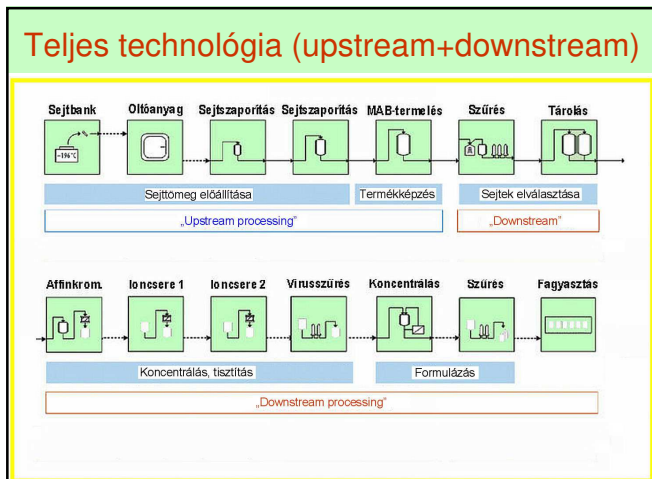
MAb termelési technológiák

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







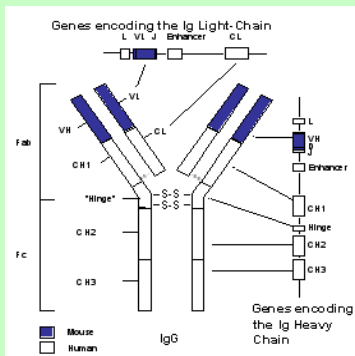


Esettanulmány: Simulect

Immunszuppresszáns, szervátültetéseknel a limfocitákat 30-40 napra kiüti.

Humanizált, a génszerelvényt SP2/0 sejtvonalba építették be.

Szuszpenziós tenyészet, folytonos, sejtviisszatarással → nagy sejtsűrűség

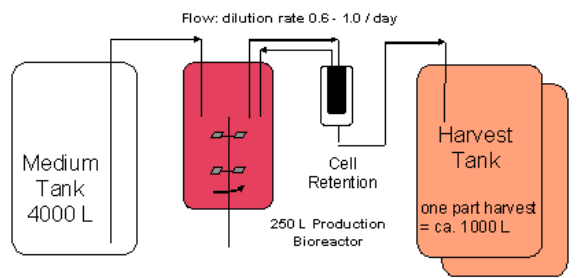


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

43

Esettanulmány: Simulect

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



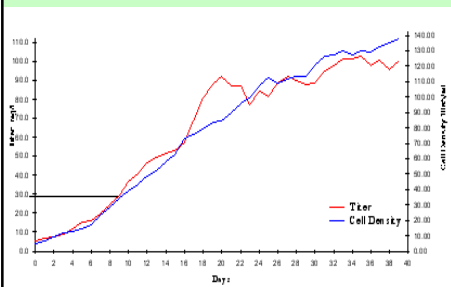
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

44

Esettanulmány: Simulect

A fermentáció lefutása

A forgó szita szűrő



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Monoklonális antitestek nevezéktana

Prefix	Target	Source	Suffix	
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 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.???

A „top 20” gyógyszerből 10 biotech termék

