

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

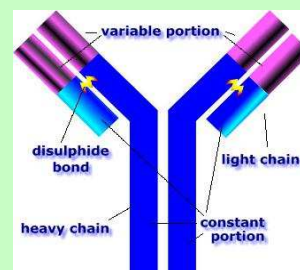
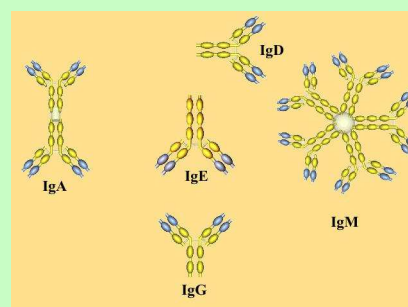
1

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

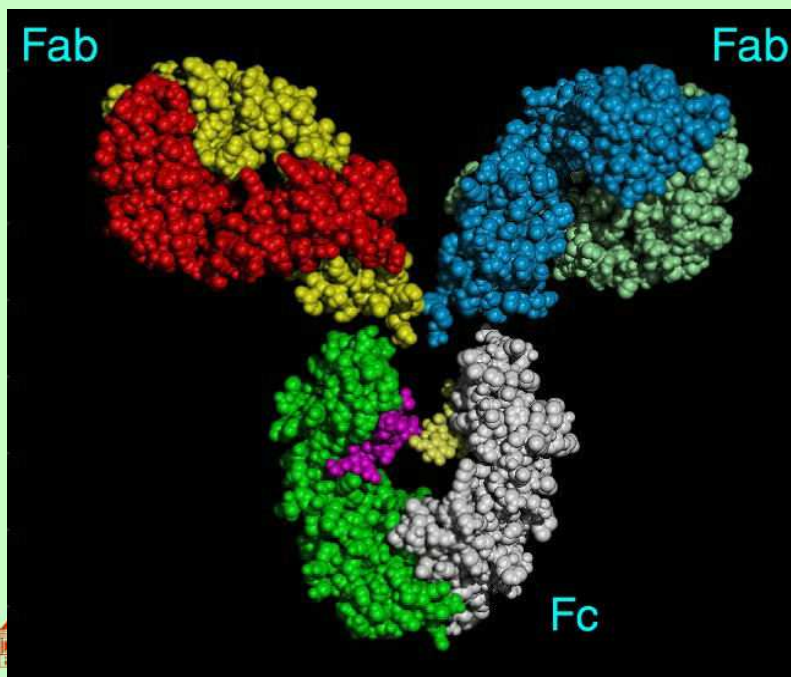
Az antigén felületén a kapcsolódási rész: epitóp



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

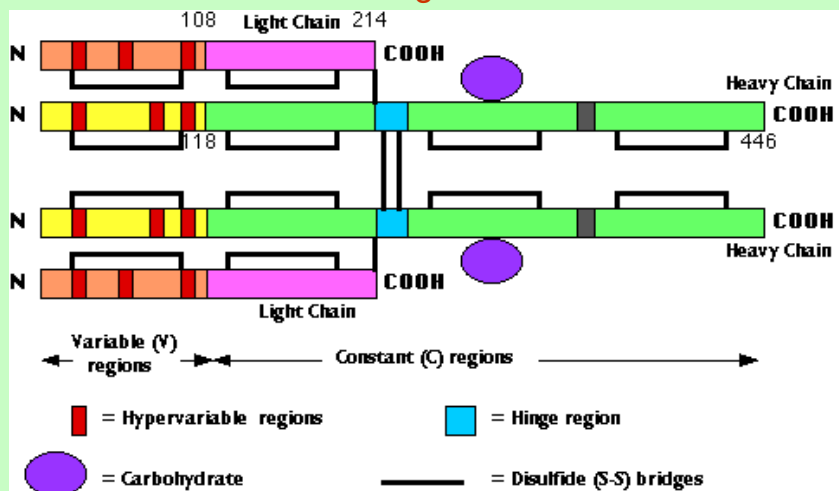
2

Antitestek



Az antitestek fehérjeszerkezete

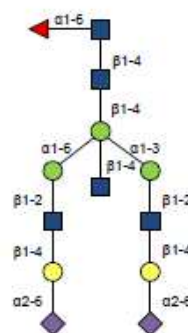
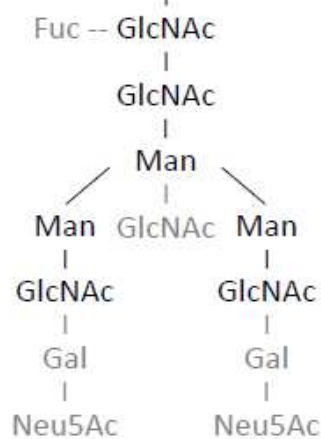
Két-két egyforma könnyű és nehéz láncból állnak, ezen belül állandó és variábilis régiókból.



Az antitestek glikozilálása

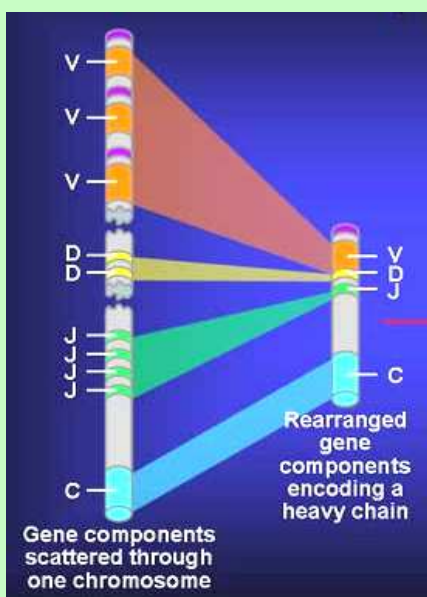
A nehéz láncokon egy-egy N-glikozilálási hely van (Asn-297). A galaktózok és a neuraminsavak száma szerint több izoforma létezik.

-Gln-Tyr-Asn₂₉₇-Ser-Thr-Tyr-Arg-



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.



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			

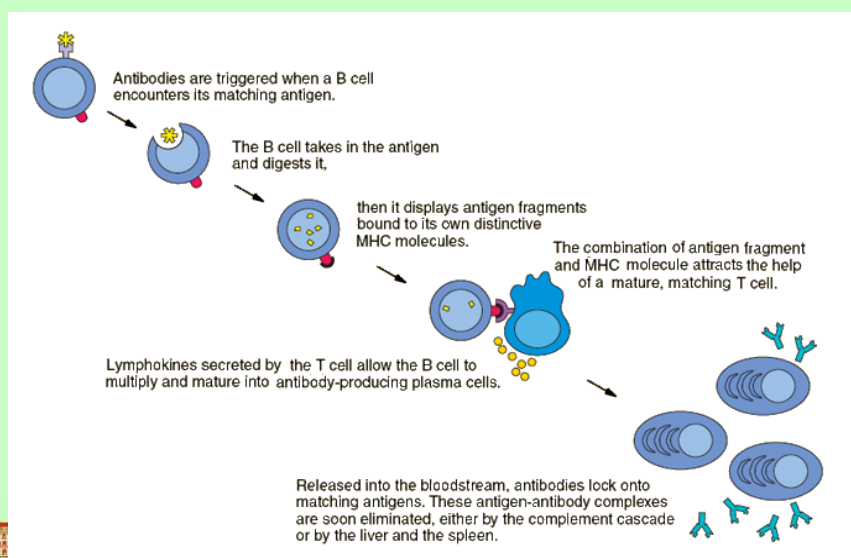


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

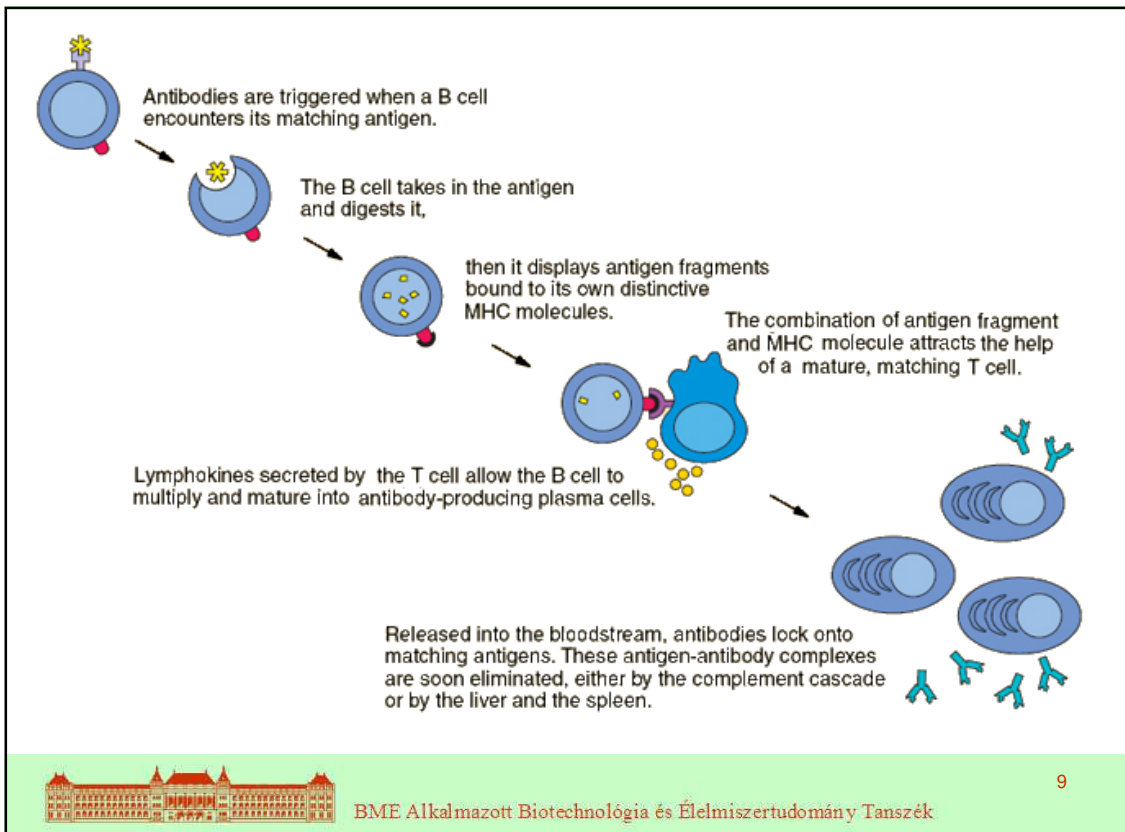
7

Antitestek

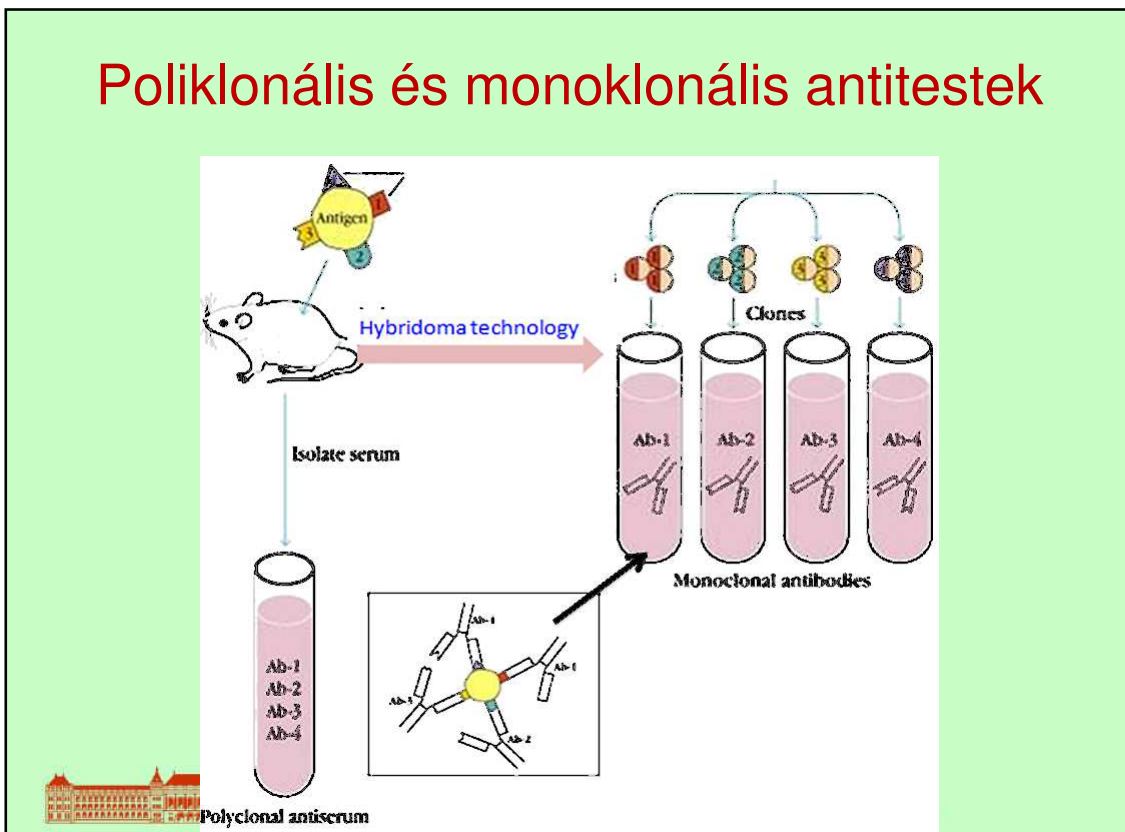
A szervezetben egy adott antitest tömeges termelését a plazmasejtje alakult B sejtek végzik.



8



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 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

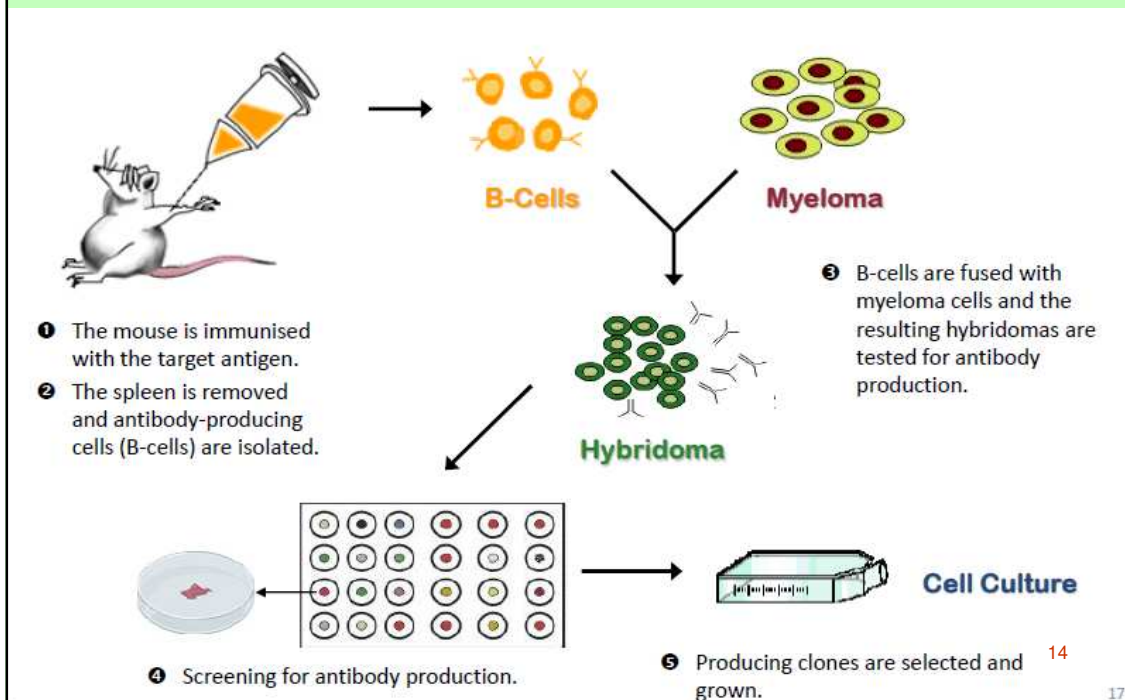
- egér/patkány beoltása antigénnel (több lépcsőben)
- lép vagy nyirokcsomó eltávolítása, homogenizálása
- lépből származó plazmasejtek + egér tumorsejtek (plazmacitóma/mielóma sejtek) fúziója
- Az ellenanyag termelő klónok azonosítása, izolálása
- A termelő hibridómák folyamatosan szaporodnak és ellenanyagot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

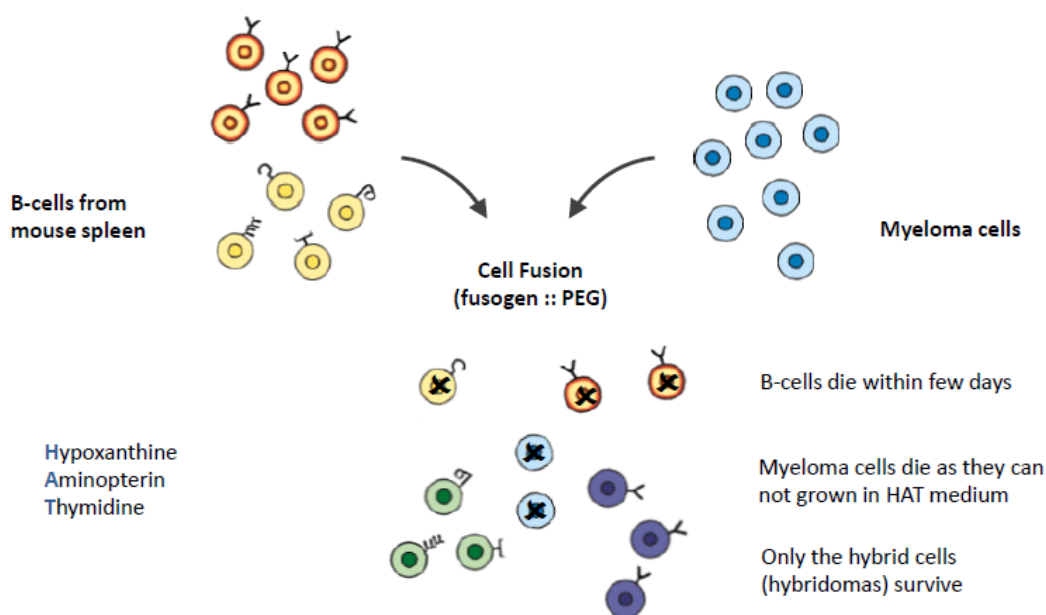
HAT médiumon (hipoxantin, aminopterin, timidin) csak a fuzionált sejtek képesek szaporodni. →



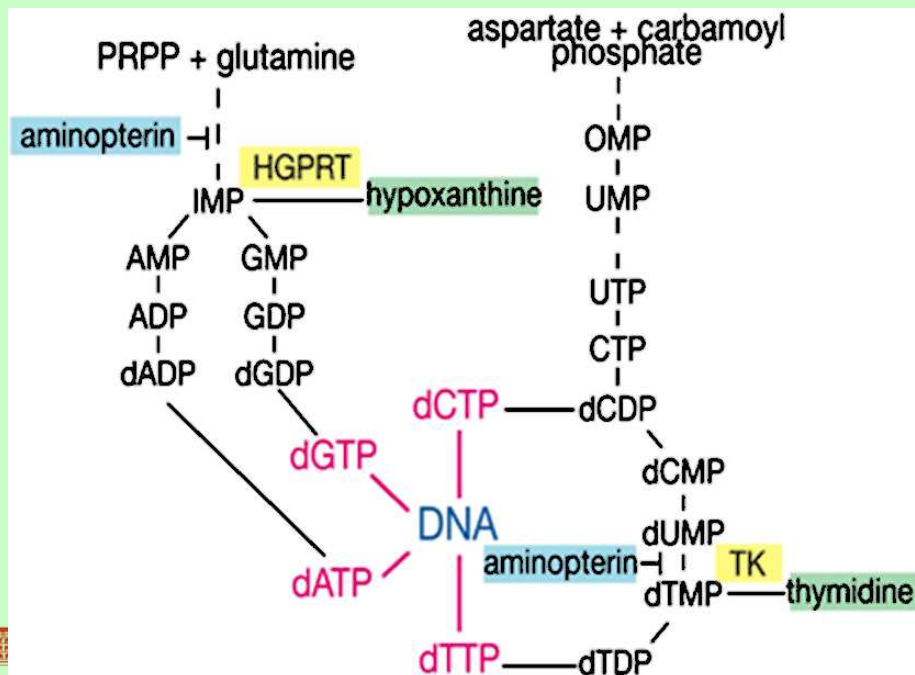
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

Hibridóma szelekció, a “HAT Trick”



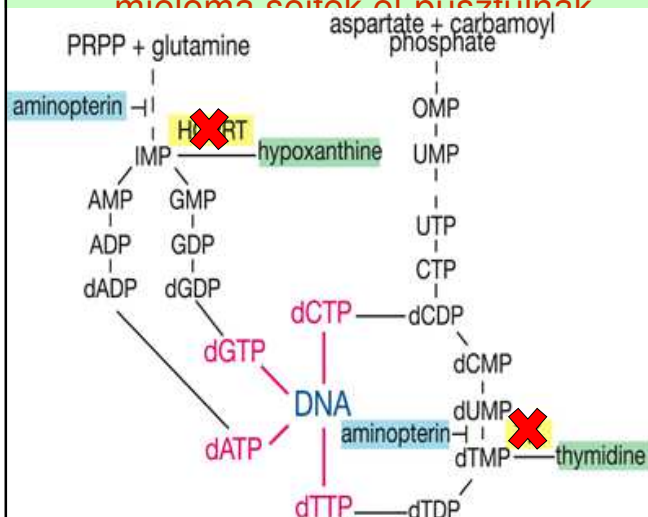
Hibridóma szelekció, a "HAT Trick"



17

Hibridóma szelekció, a "HAT Trick"

HGPRT és TK hiányos mutánsok hiába kapnak segítséget (hipo-xantin, timidin), nincs nukleotid szintézis – a mielőleg sejtük elpusztulnak



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

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

18

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 → **SEJTENYÉSZET**

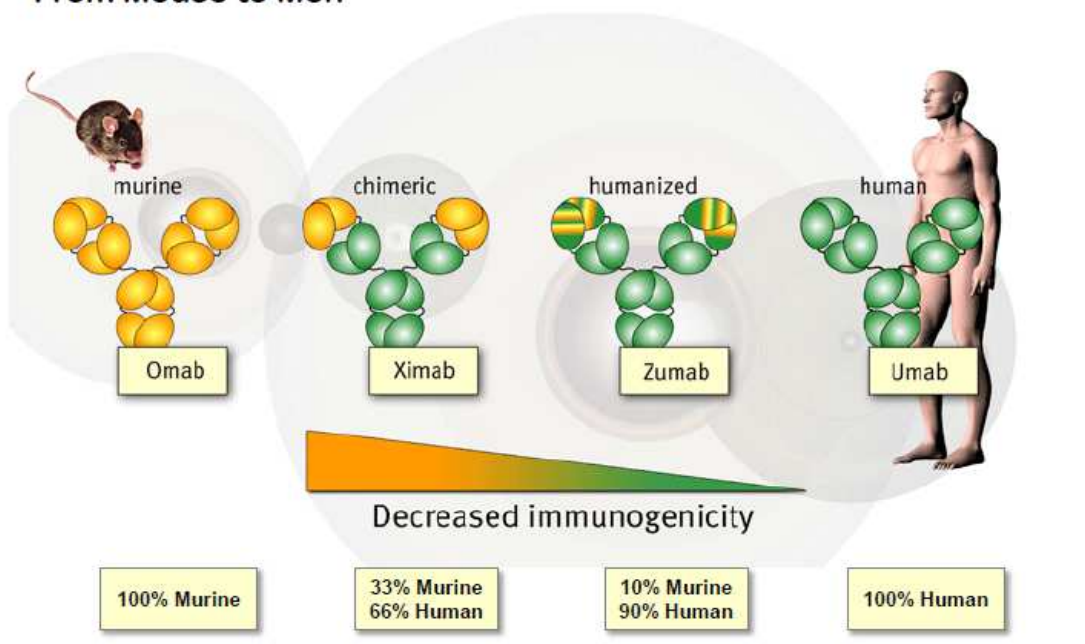


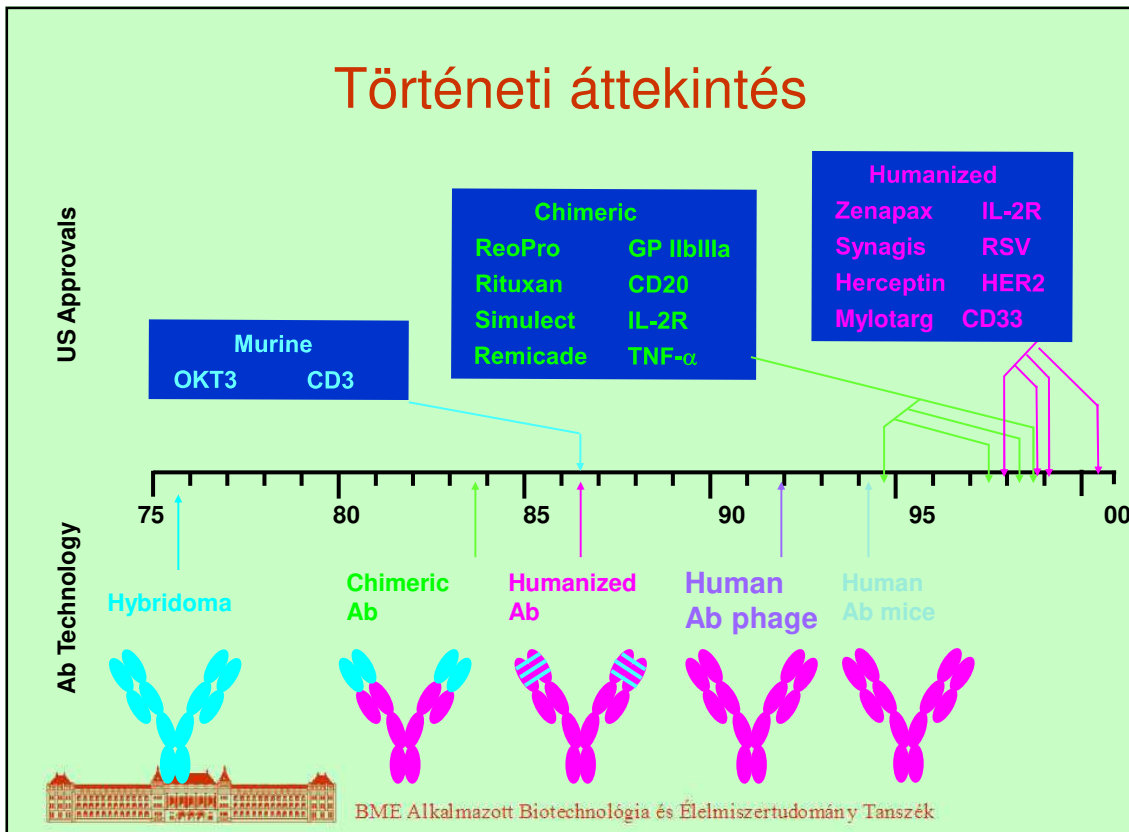
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

A monoklonális antitestek fejlődése

From Mouse to Men



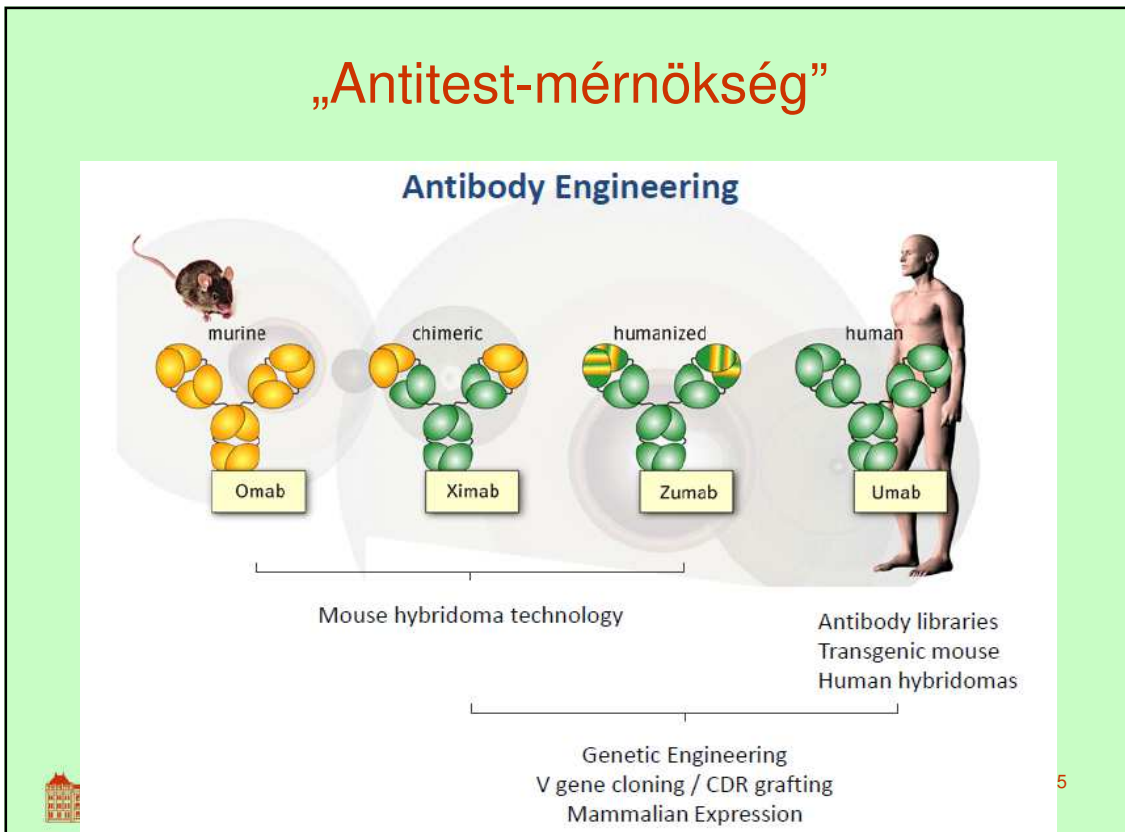


Kiméra és humanizált monoklonális antitestek

- 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

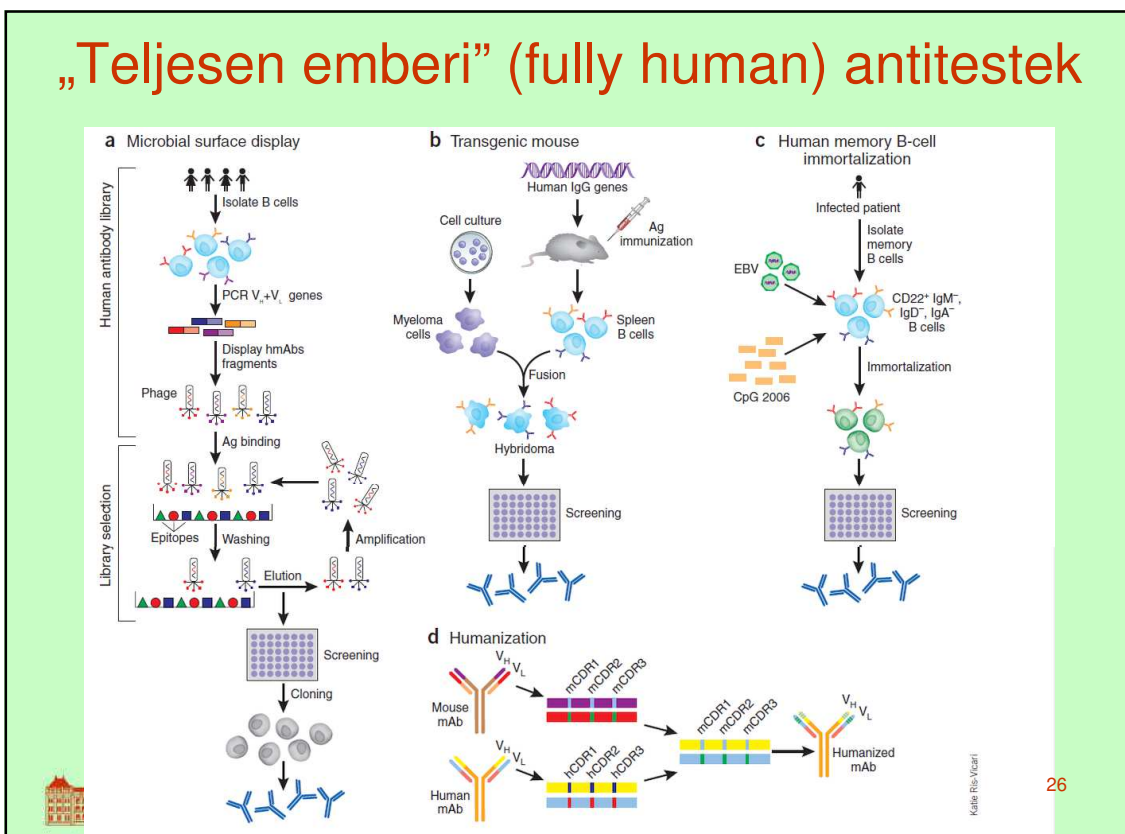


„Antitest-mérnökség”



5

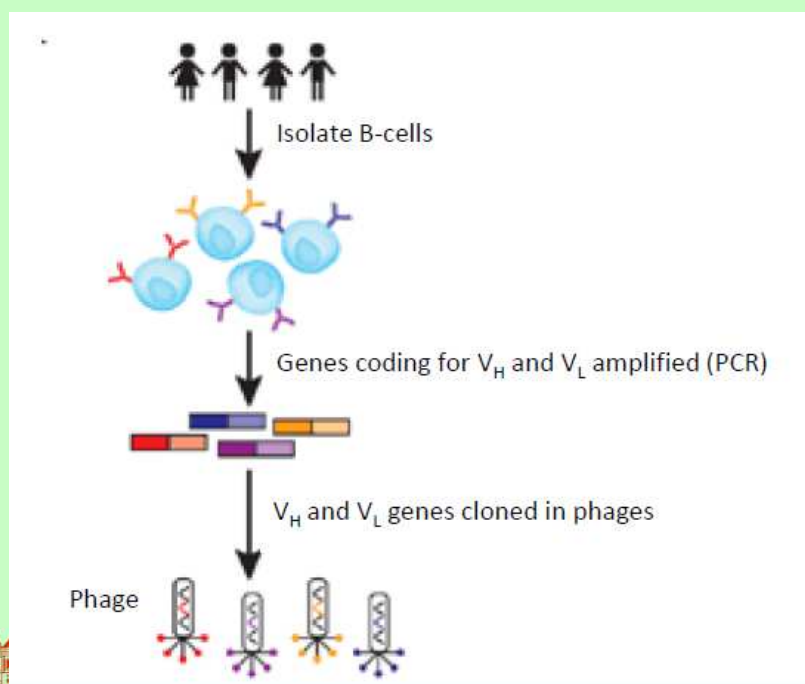
„Teljesen emberi” (fully human) antitestek



Kate Hils-Vicari

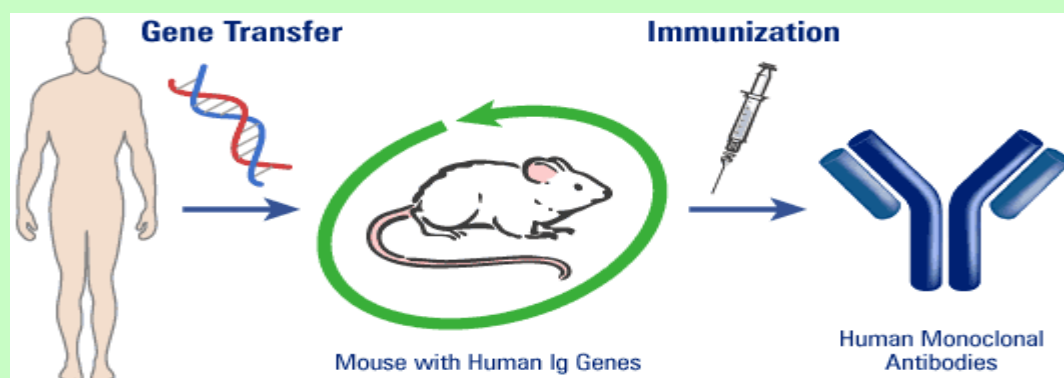
26

Fág-display könyvtár humán antitestekből



27

UltiMAb platform (transzgénikus egér)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

In vitro antitest-kutatás

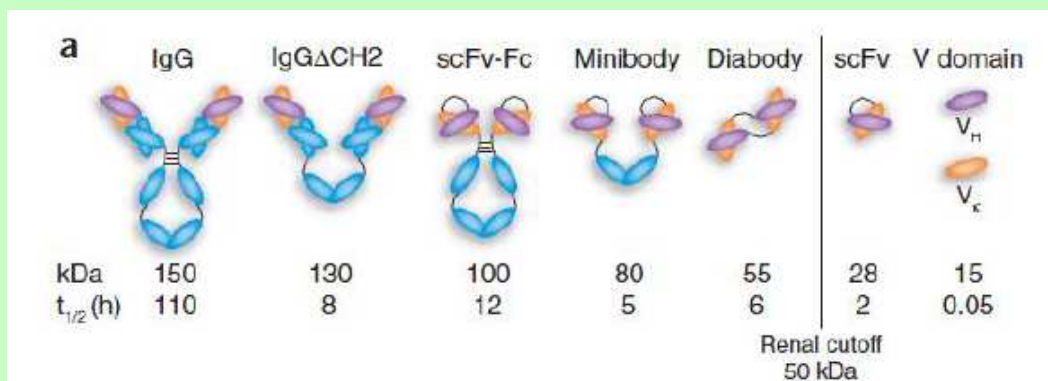
Számítógépes antitest-könyvtárak - fontos az antitest-molekulák részletes szerkezeti és funkcionális ismerete. Típusaik:

- 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.

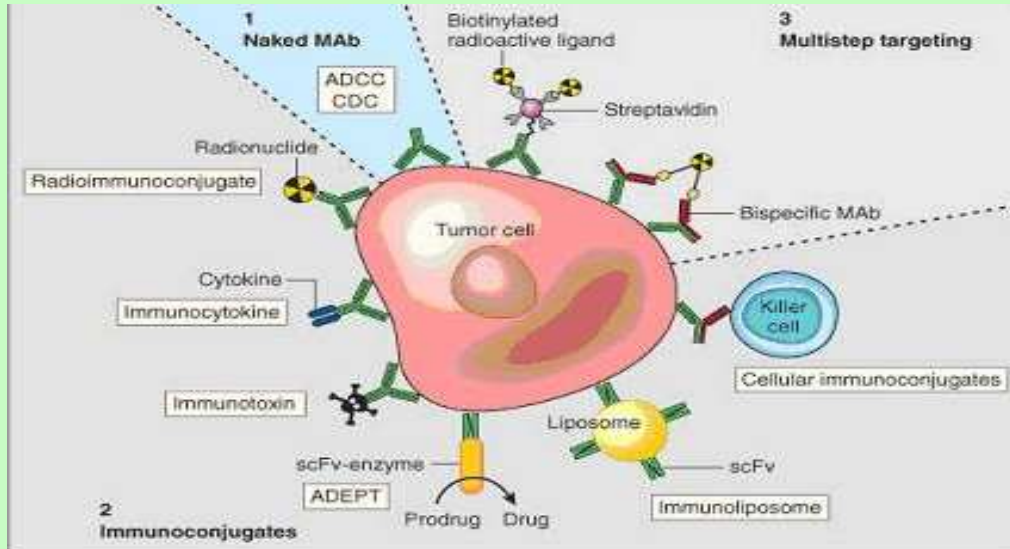


Töredék-antitestek

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



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.

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

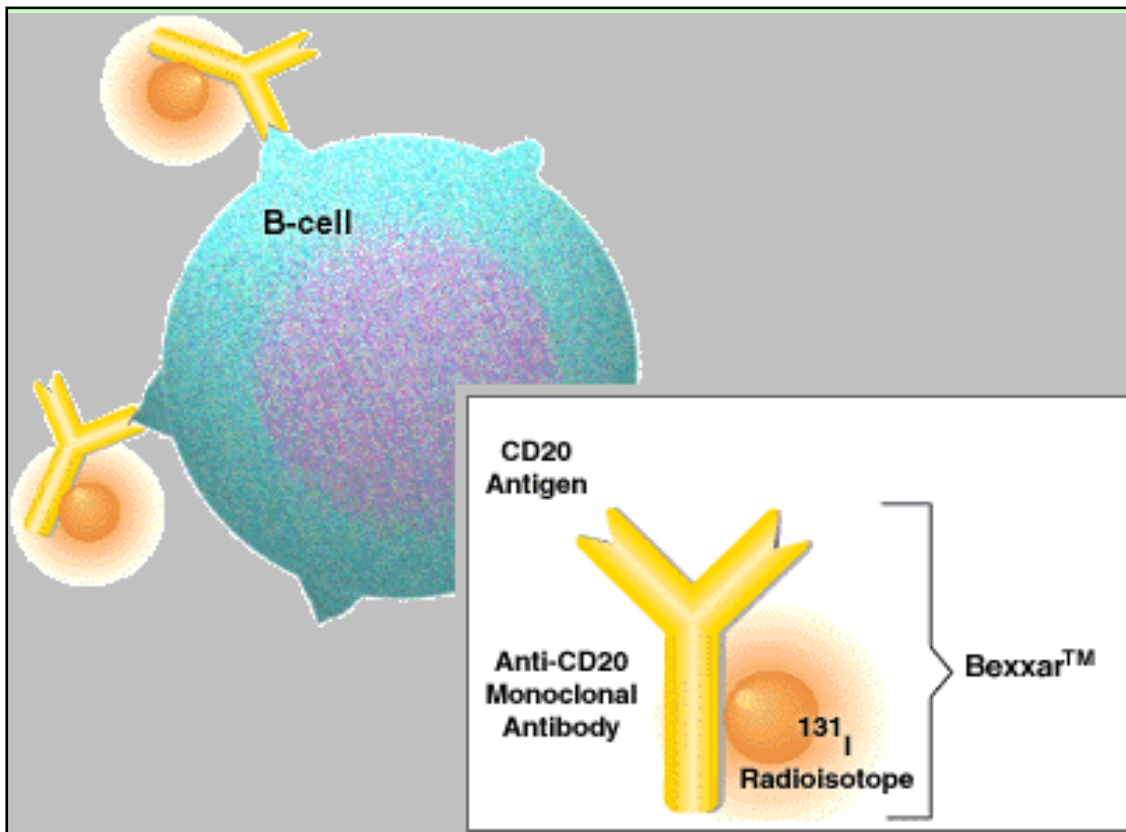
A tositumomab (Bexxar) monoklonális anti-CD-20 antitest és ^{131}J konjugátum (75-80 % remisszió)

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

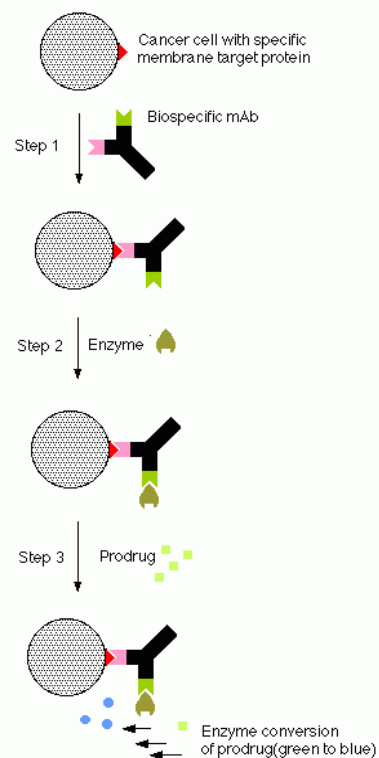
32



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 Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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.

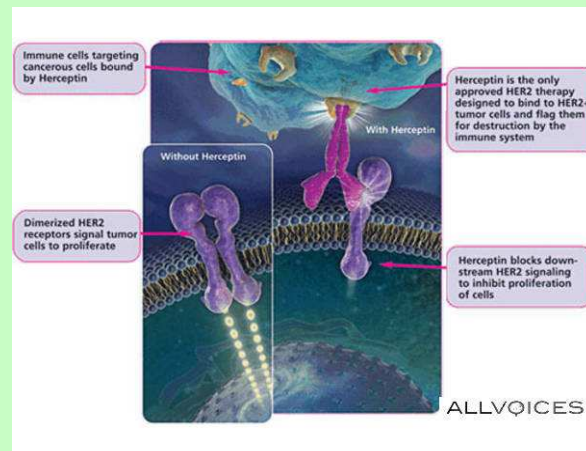
Agytumor és a mellrák kezelésére már használják.

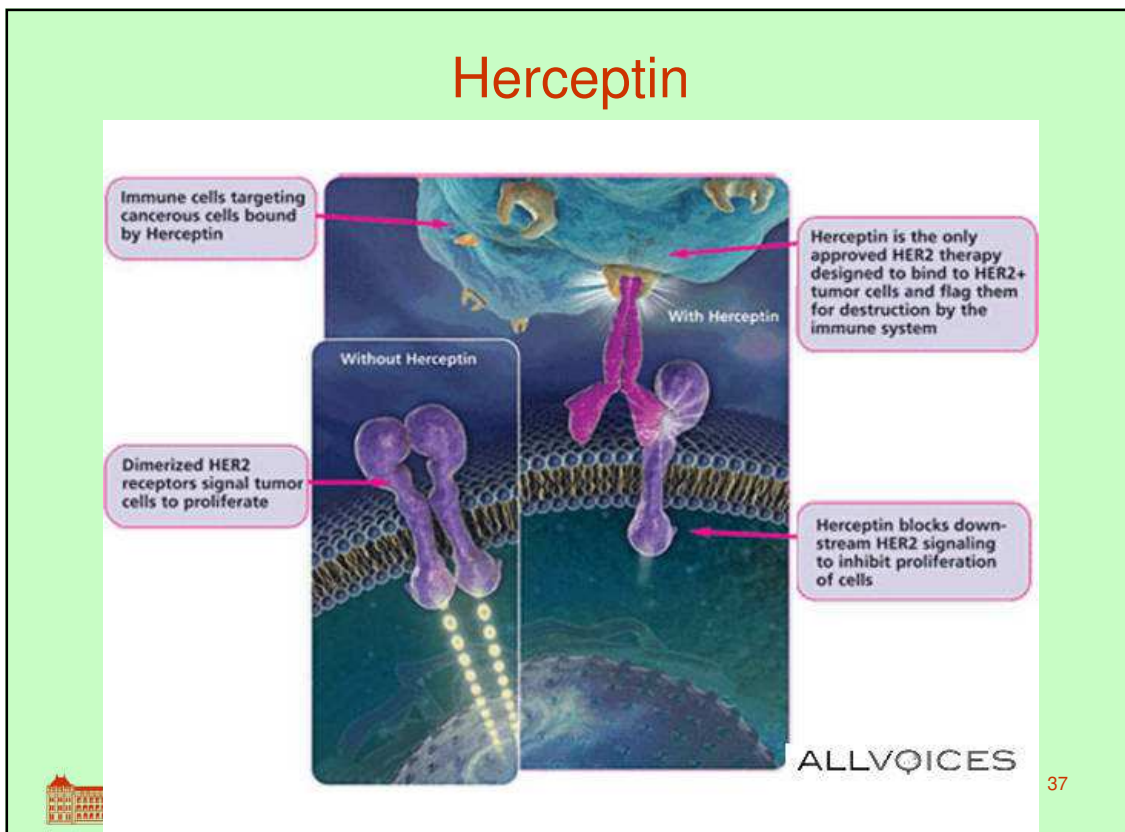


Herceptin

Az antitest hatása kettős:

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



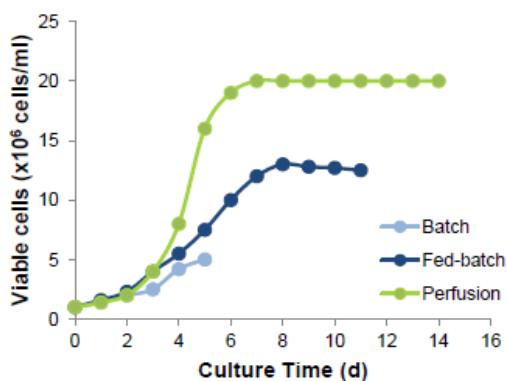


MAb termelési technológiák

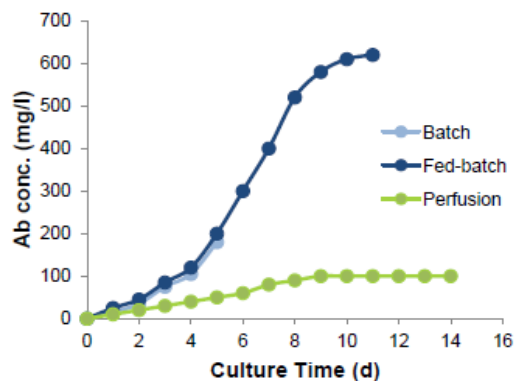
Product	Culture system	Bioreactor Train Scale
ReoPro	Continuous/Perfusion (spin-filter)	10 – 500 L
Zenapax	Fed-batch (stirred tank)	Not disclosed
Simulect	Continuous/Perfusion (membrane)	Not disclosed
Synagis	Fed-batch (stirred tank)	400 – 10000 L
Remicade	Continuous/Perfusion (spin-filter)	10 – 500 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

Number of Viable Cells



Antibody Titre

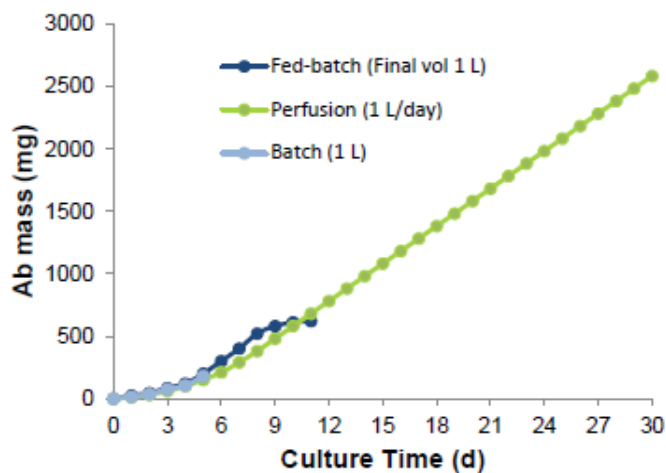


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

39

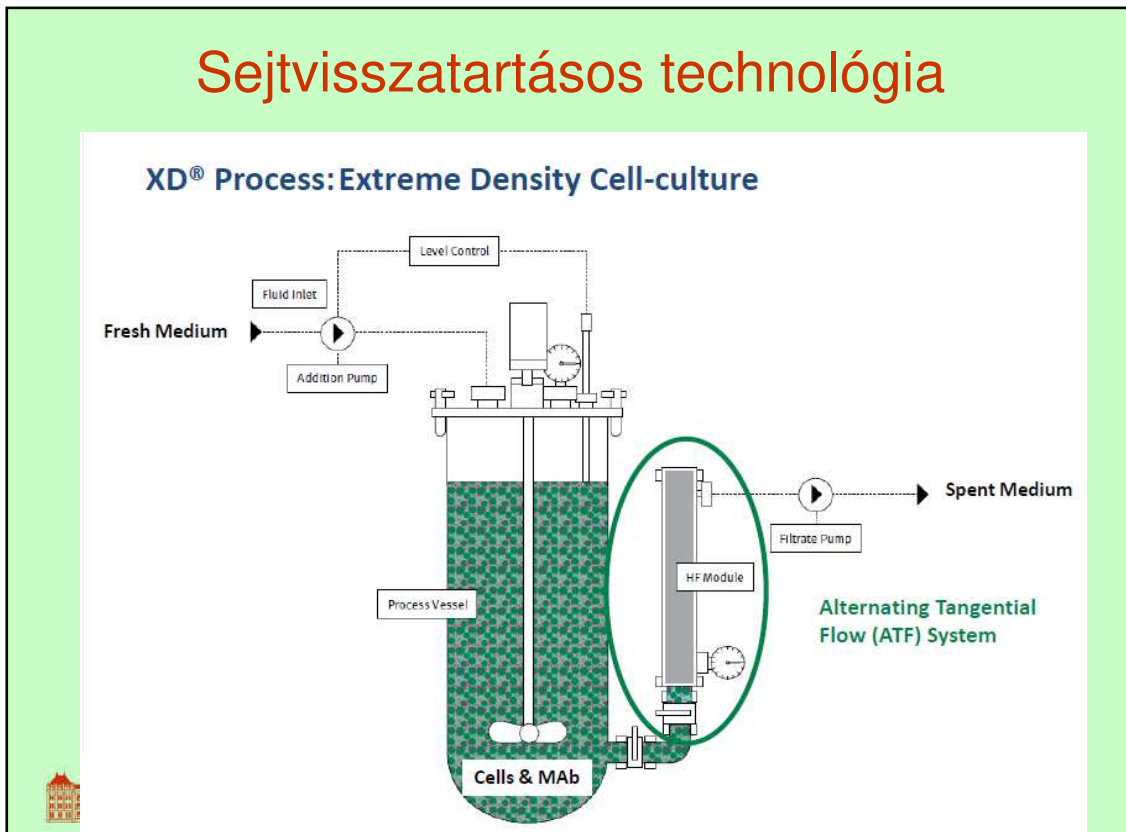
MAb termelési technológiák

Product Mass

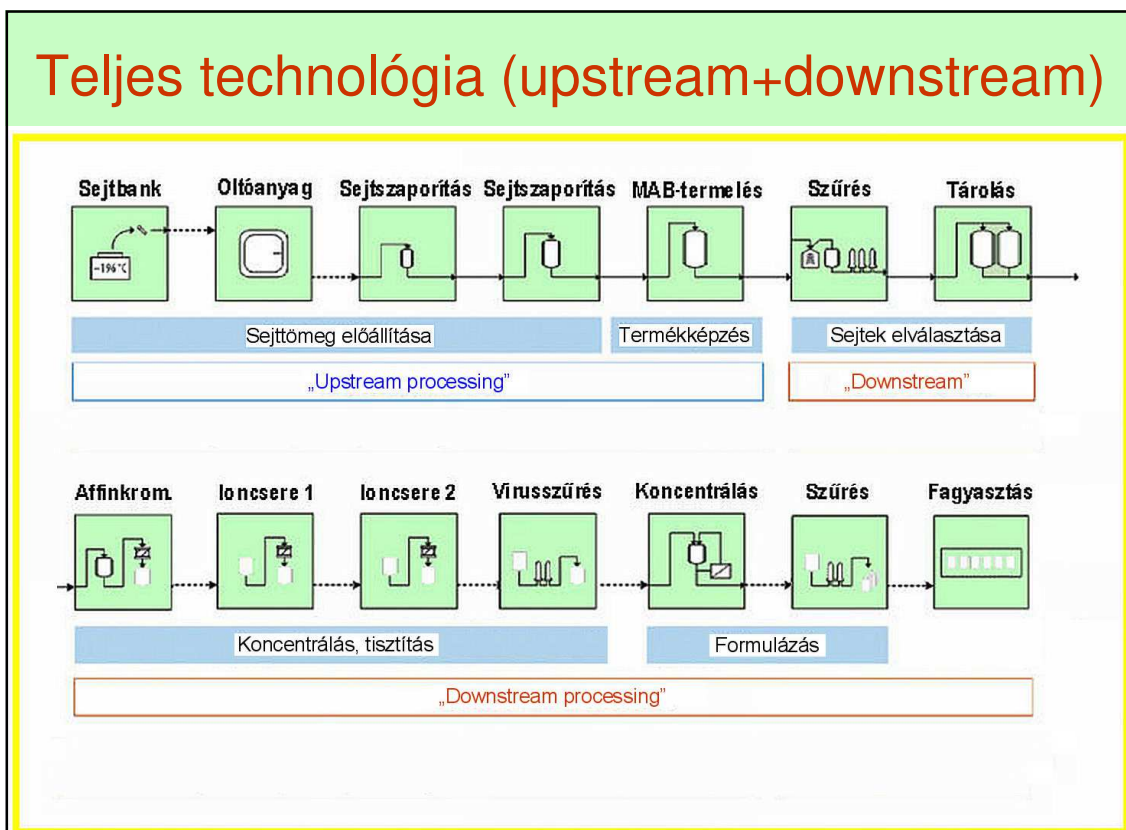


Perfusion : 2600 mg
 Fed-Batch : 620 mg
 Batch : 180 mg

Sejtvisszatartásos technológia



Teljes technológia (upstream+downstream)

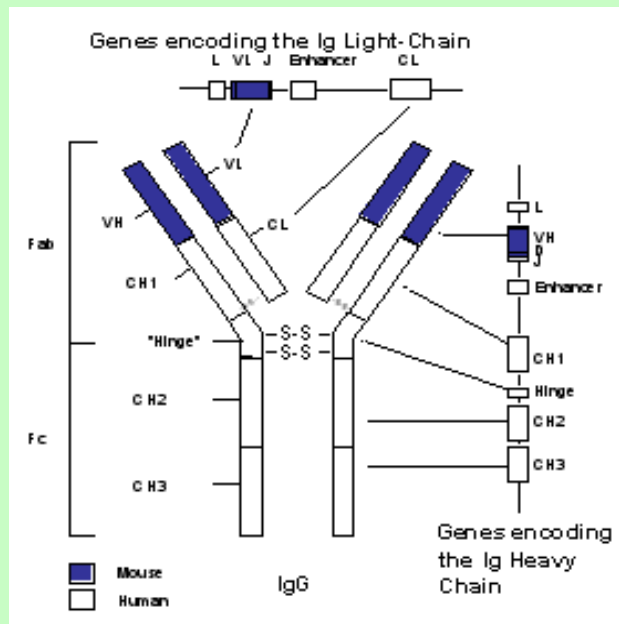


Esettanulmány: Simulect

Immunszupresszáns, szervátültetéseknel a limfocitákat 30-40 napra kiüti.

Humanizált, a génszerelvényt SP2/0 sejtvonalba építették be.

Szuszpenziós tenyészet, folytonos, sejtviisszatartással → nagy sejtsűrűség

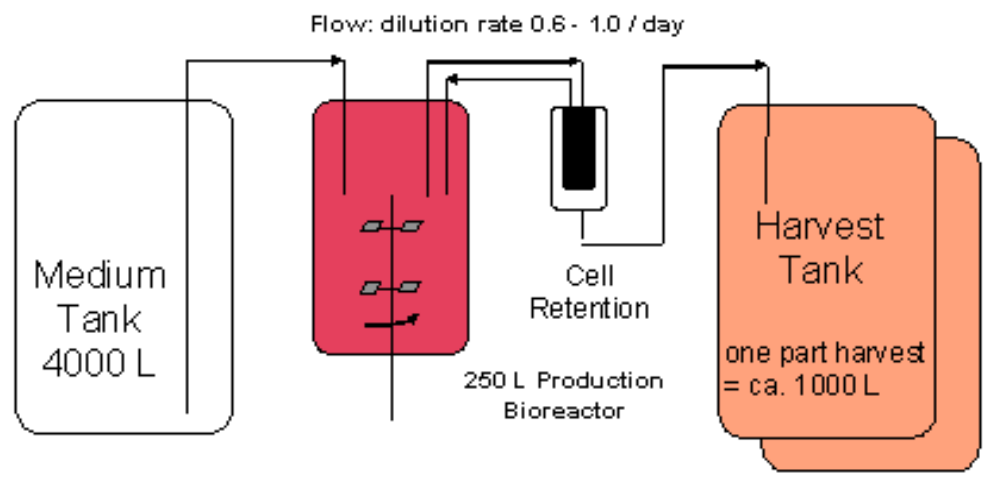


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

43

Esettanulmány: Simulect

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



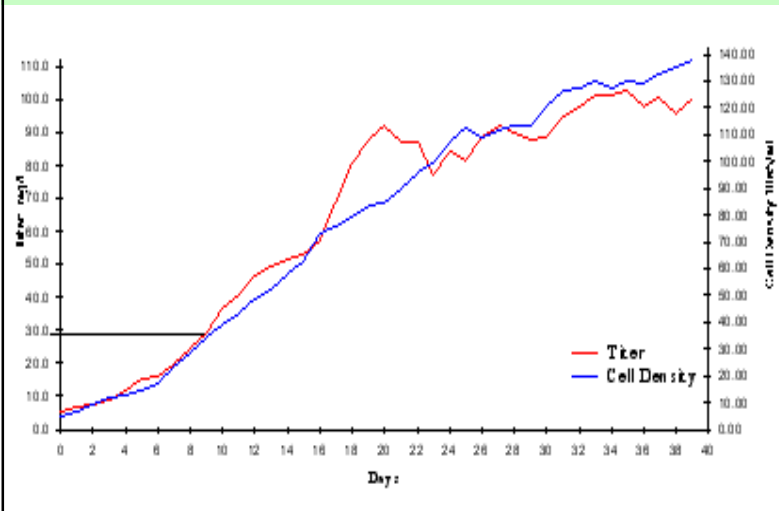
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

44

Esettanulmány: Simulect

A fermentáció lefutása

A forgó szita szűrő



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Monoklonális antitestek nevezéktana

Prefix	Target		Source		Suffix
<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				

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 antibody)

Ellenőrző kérdés:

Melyik gyógyszerről lehet szó, és mit lehet tudni róla?

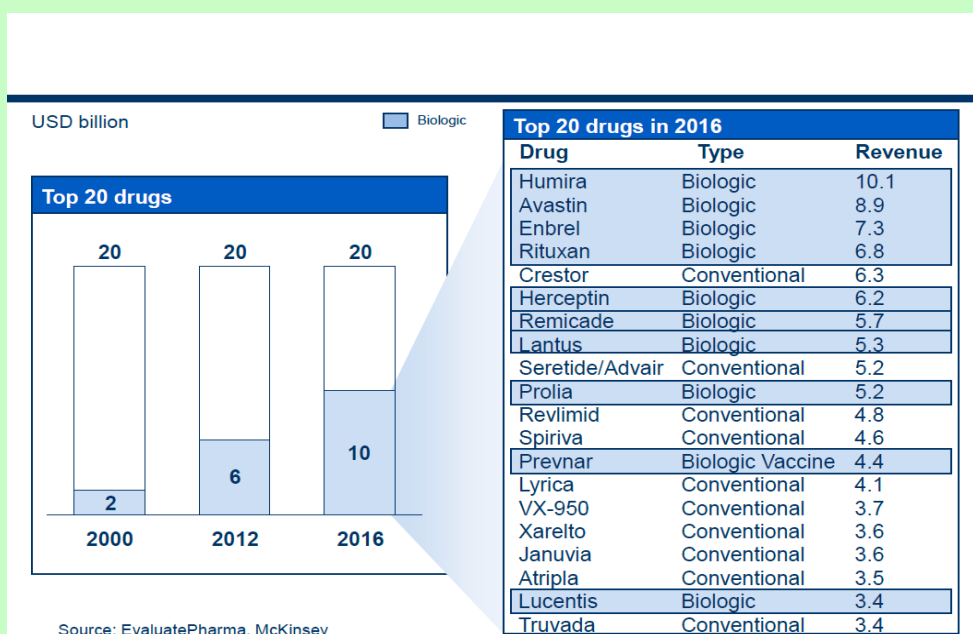
tras- + -tu(m)- + -zu- + -mab.???



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

47

A „top 20” gyógyszerből 10 biotech termék



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

48

A piacvezető biotechnológiai gyógyszerek (2017)

Top 15 pharmaceutical products by sales worldwide

