

Biotermék technológia 2

Msc. Biomérnök hallgatók részére

Rekombináns fehérjetermékek előállítása

2. Rész



Ballagi András, PhD.
BME Címzetes Egyetemi Tanár

2023 nov.-dec.



Tartalom

A rekombináns biotechnológia területei

A gyógyszeripari biotechnológia sajátosságai

Gazdaszervezetek

Műveletek baktériumokkal

Klónozás

Sejtbankok

Fehérjemolekulák előállítása

Refolding

Példa GCSF és Peg-GCSF előállító technológia

Műveletek emlős sejtekkel

Klónozás

Sejtbankok

Tenyésztések

Tenyésztési módszerek

Reaktorok (labor, ipari, egyszerhasználatos)

1. Rész



Tartalom folyt.

Monoklonális antitestek

Monoklonális antitestek gyártási technológiája

Biosimiláris gyógyszerek

A véralvadás diagnosztika rekombináns fehérjéi és mérési módszerei



Antitestek

Az ellenanyag molekulák nagy része az úgynevezett immunoglobulin (Ig) fehérjecsalád tagja.

Magát a folyamatot az antigén (vírus, baktérium, rákos sejt, idegen test, parazita) megjelenése határozza meg.

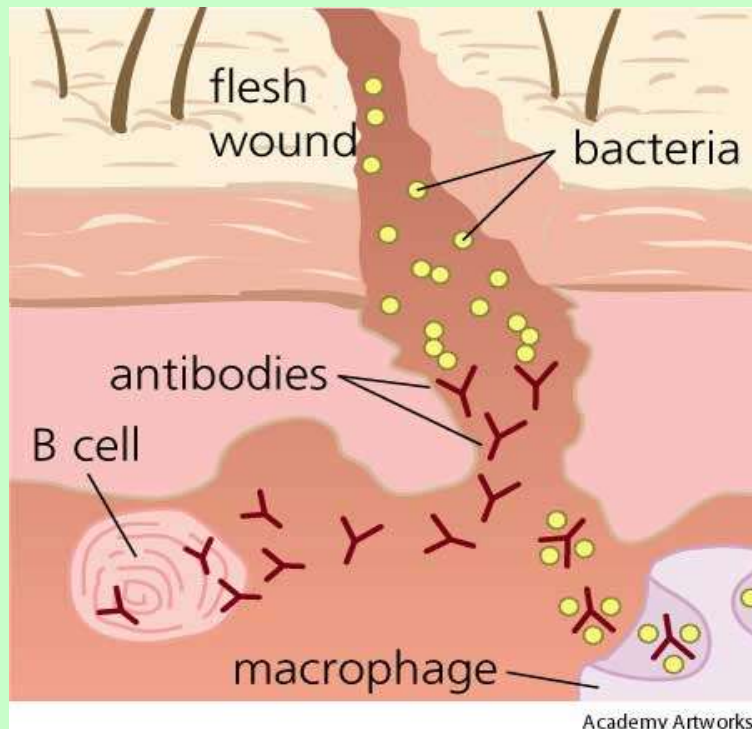
Feladatuk, hogy specifikusan az adott antigénhez kapcsolódva olyan folyamatokat indítsanak el ami az antigén hatástalanításához vezet:

- **vírusinaktiválás**
- **baktériumok agglutinálása**
- **megjelölés fagocitózisra**

Az antigén felületén a kapcsolódási rész: az epitóp



Az antitestek fiziológias szerepe



Az antitestek nagyon specifikusak, minden antitest egy specifikus antigént ismer fel.

Az antitestek a B limfociták felületén keletkeznek és így kerülnek a vérbe.

Amikor pl. egy baktérium bekerül a sebbe, a B limfociták kieresztik az antitesteket, amelyek hatástalanítják a baktériumokat és bejuttatják őket a faló sejtekbe.

A természetes antitestek poliklonálisak, mert több fajta B sejtből származnak, több epitóp ellen.



Antitestek - IgM

Szerkezet: pentamer

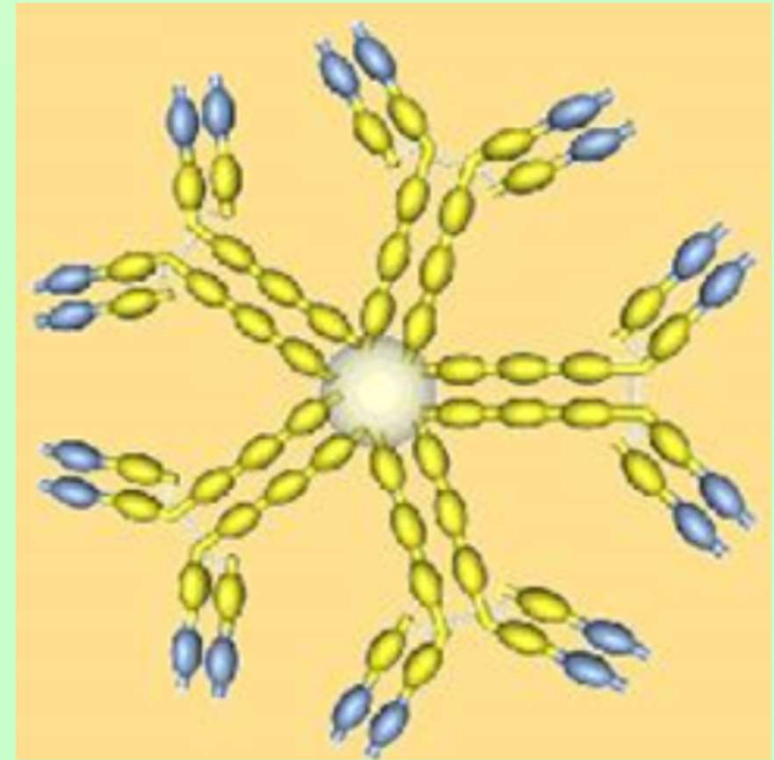
Aránya az antitestek között: 5-10%

**Előfordulása a szervezetben: vér nyirok,
B-sejtek felületén (monomer)**

Féléletideje a szérumban: 5 nap

Átlép-e a méhlepényen: nem

**Szerepe: az első antitest közvetlenül a
fertőzés után**



Antitestek IgA

Szerkezet: dimer

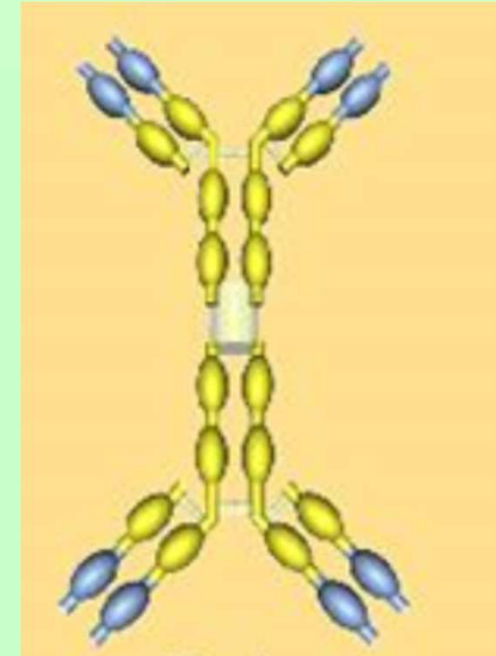
Aránya az antitestek között: 10-15%

**Előfordulása a szervezetben: vér, nyirok,
testnedvek (könny, nyál, bél, tej)**

Féléletideje a szérumban: 6 nap

Átlép-e a méhlepényen: nem

**Szerepe: helyi védelem a nyálkahártyáknak,
immunitást biztosít a csecsemő béltraktusának.**



Antitestek - IgD

Szerkezet: monomer

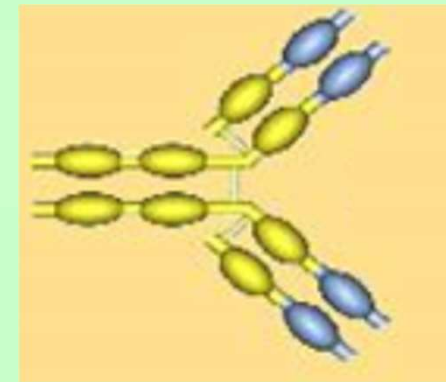
Aránya az antitestek között: 0,2%

Előfordulása a szervezetben: vér, nyirok, B sejtek felülete

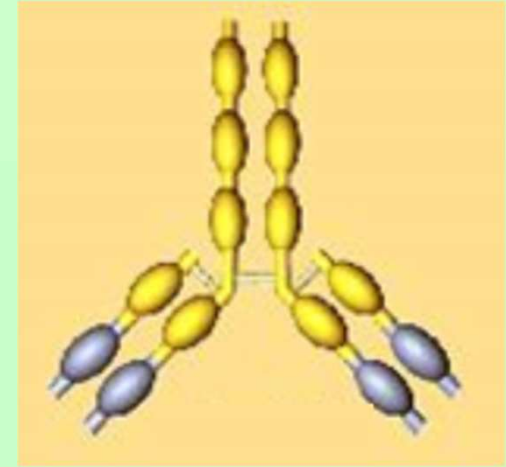
Féléletideje a szérumban: 3 nap

Átlép-e a méhlepényen: nem

Szerepe: indítja az immunválaszt



Antitestek - IgE



Szerkezet: monomer

Aránya az antitestek között: 0,002%

Előfordulása a szervezetben: vér, hízósejtek (masztociták) felületéhez kapcsolódva az egész testben

Féléletideje a szérumban: 2 nap

Átlép-e a méhlepényen: nem

Szerepe: allergiás reakciókért felel, allergia-tesztekben a célmolekula



Antitestek IgG

Szerkezet: monomer

Aránya az antitestek között: 80%

Előfordulása a szervezetben: vér nyirok, bél

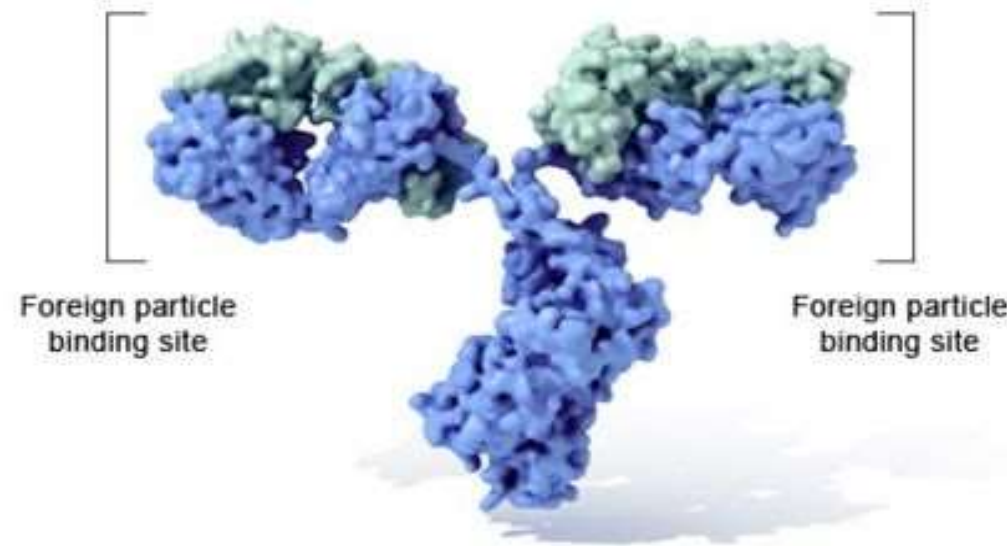
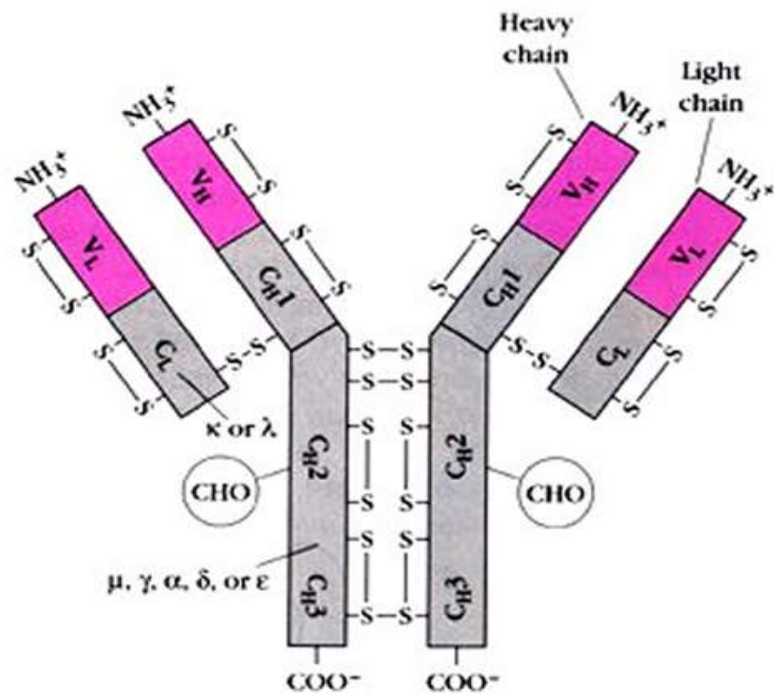
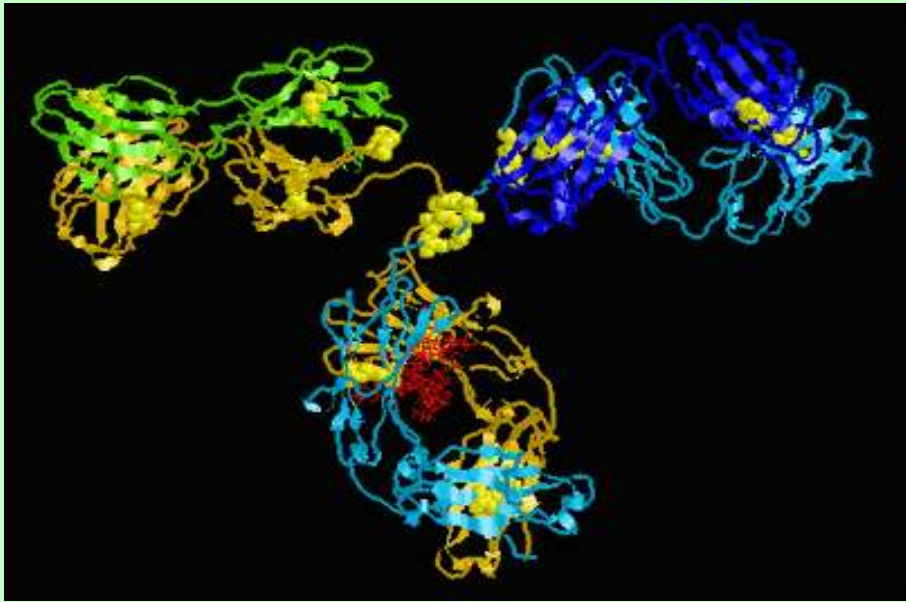
Félélettideje a szérumban: 23 nap

Átlép-e a méhlepényen: igen

**Szerepe: előidéz fagocitózist, semlegesít toxinokat és vírusokat,
védi a magzatot ill. az újszülöttet.
gyógyászati, terápiás alkalmazás,
diagnosztikai komponens,
elválasztástechnikai komponens (affinitás-kromatográfia).**

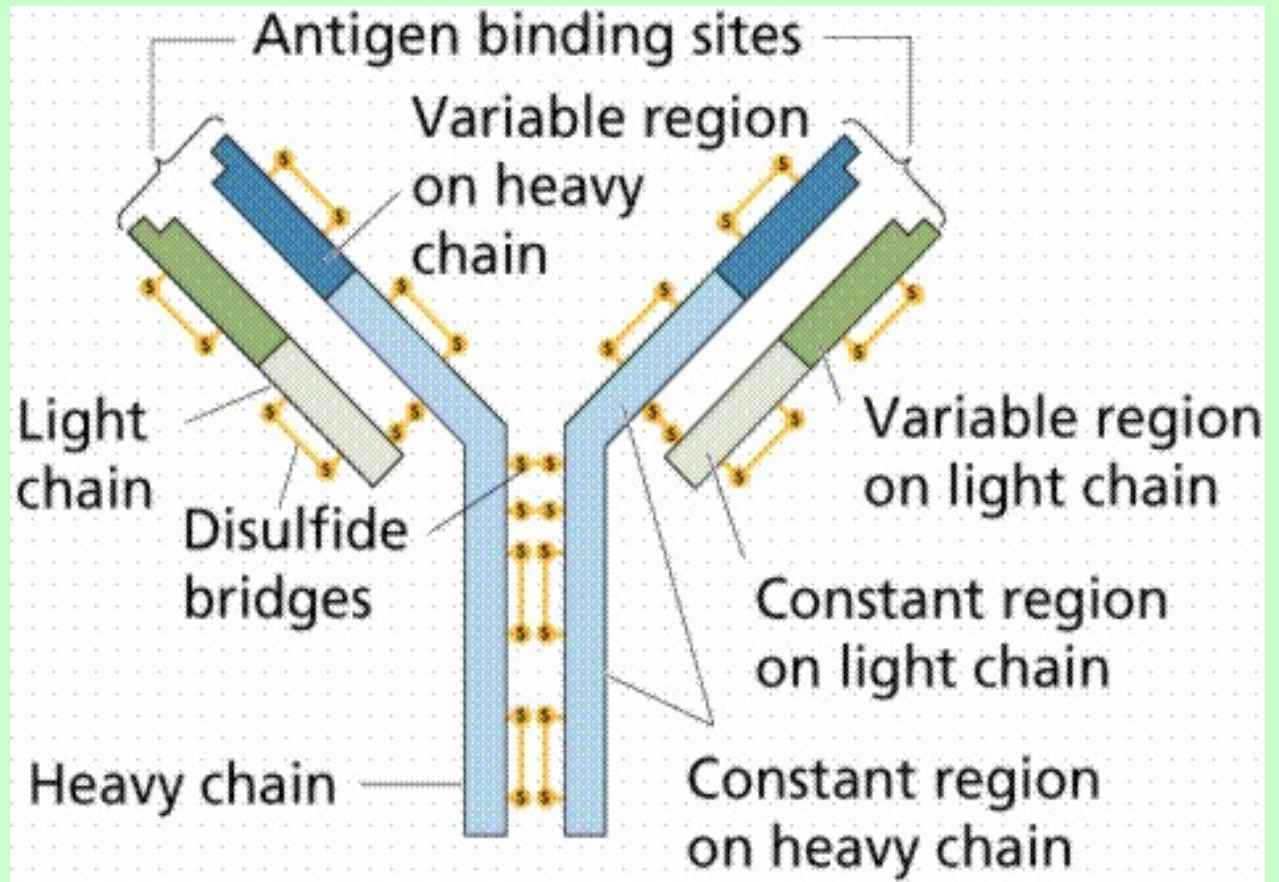


Az IgG antitestek szerkezetének ábrázolásai



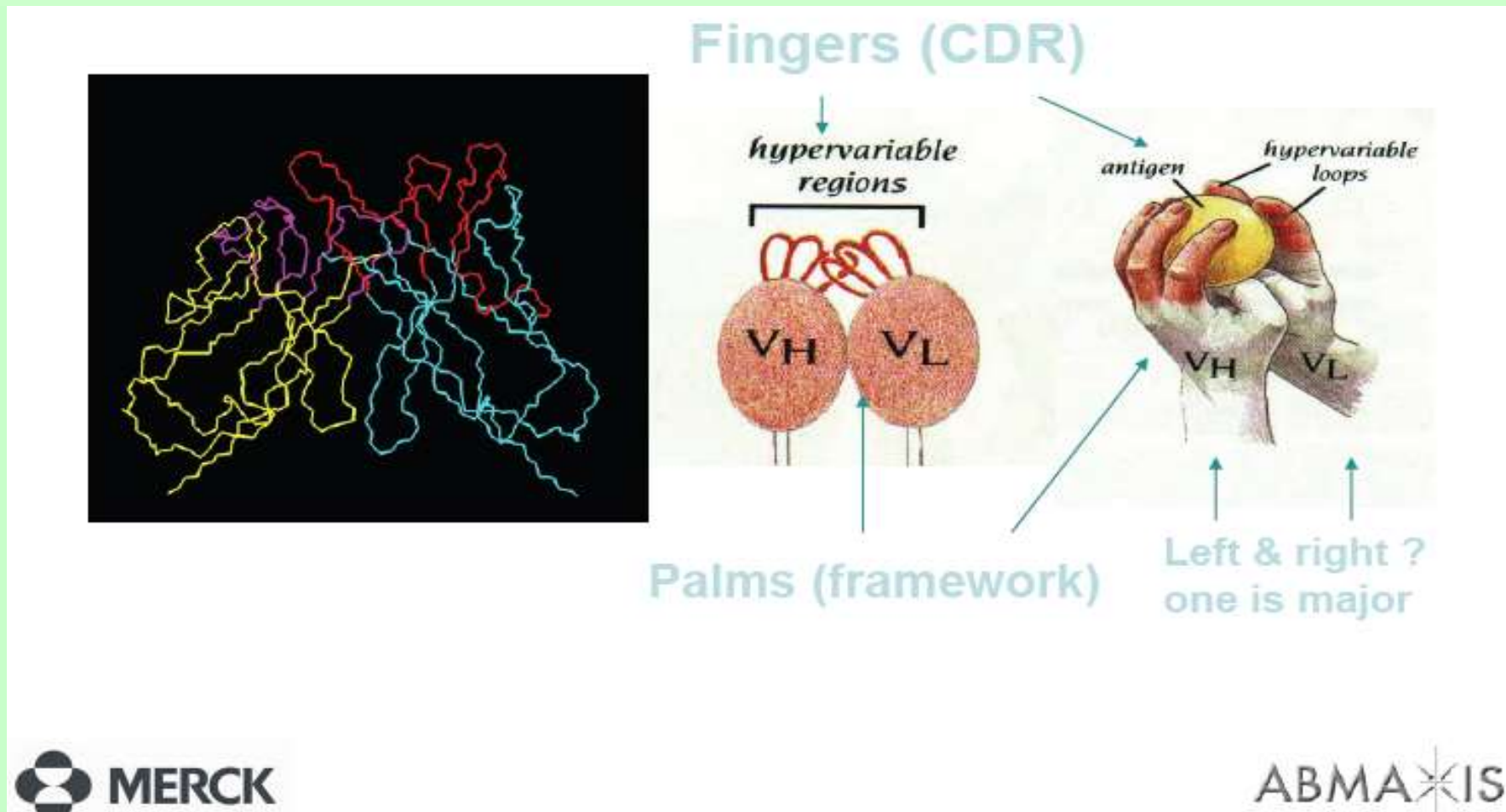
Az antitestek szerkezete

- **Fehérje**
 - 2 nehéz lánc
 - 2 könnyű lánc
 - Diszulfid hidak
- **Variábilis régió**
 - Antigén felismerő
- **Konstans régió**
 - Effektor funkciók
 - Osztály és alosztály



Complementarity determining regions (CDR)

Az antitestek működésének ereje a CDR régióknak köszönhetően.
Mindegyik CDR hurok (loop) 5-7 AA hosszú.



Antitestek

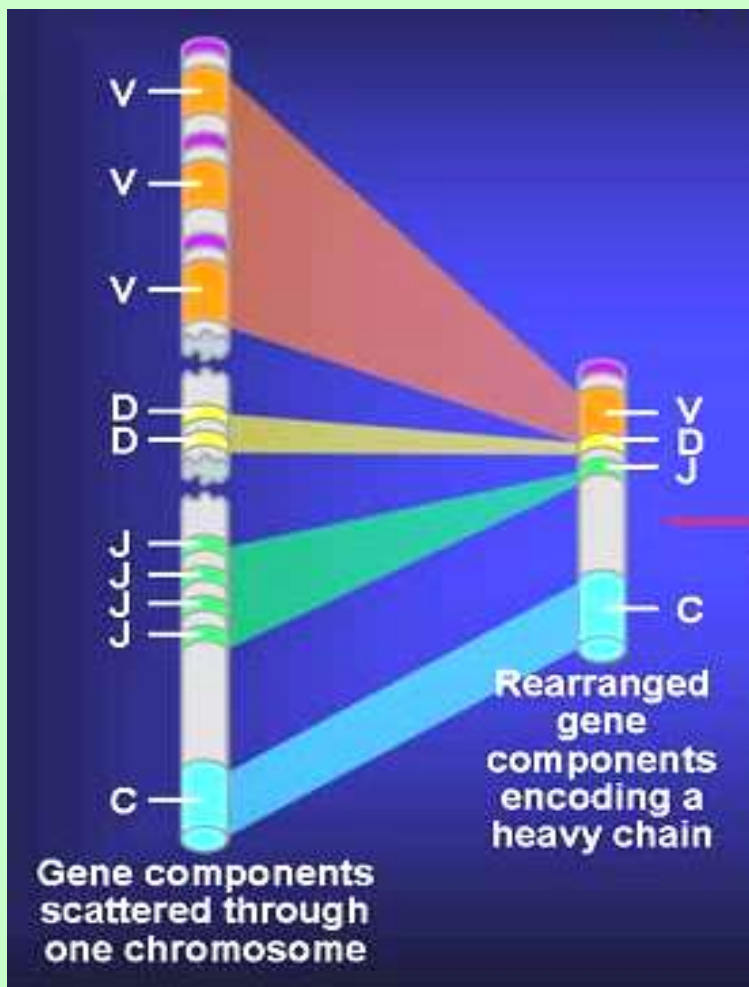
A szervezet kb. 3×10^{11} féle különböző antitest előállítására képes.

Ennek alapja, hogy antitest doménjei sok változatban tárolódnak a génállományban, és a kiírás során ezek random módon kombinálódhatnak.

Könnyű lánchoz: 250 V-szegmens, 4 J-szegmens, 3 különböző kapcsolódási lehetőség
Ez összesen $250 \times 4 \times 3 = 3000$ különböző könnyű lánc variáns.

Nehéz lánchoz: 44 V-szegmens, 27 D-szegmens, 6 J-szegmens, 3 különböző kapcsolódási lehetőség.
Ez összesen $44 \times 27 \times 6 \times 3 = 21\,384$ különböző nehéz lánc variáns. A két fajta konstans régió miatt ez összesen 42 768

A hipervariábilis régiók által biztosított változatokkal beszorozva 3×10^{11} (~30 milliárd) változat lehetséges.



V – variable

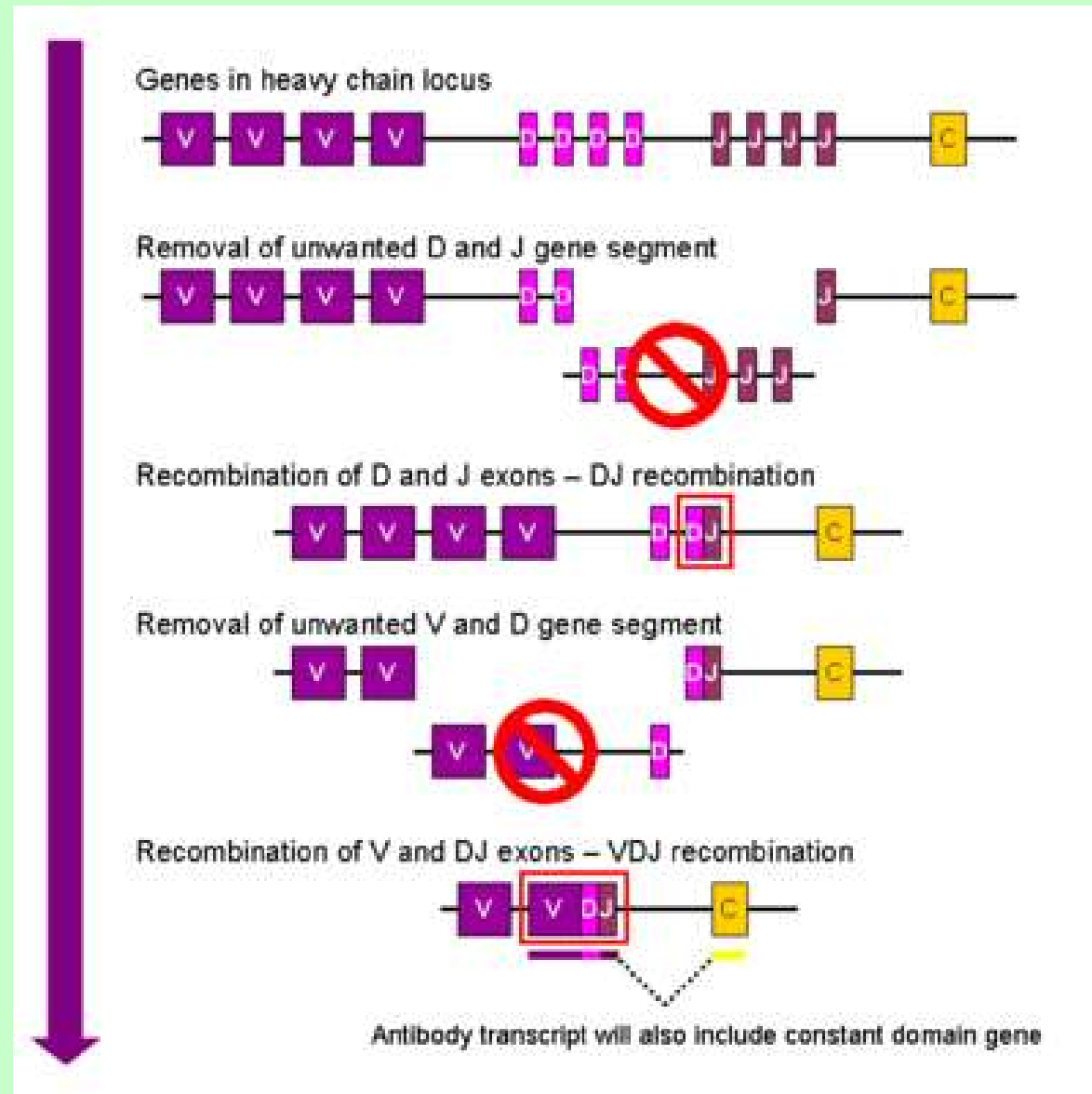
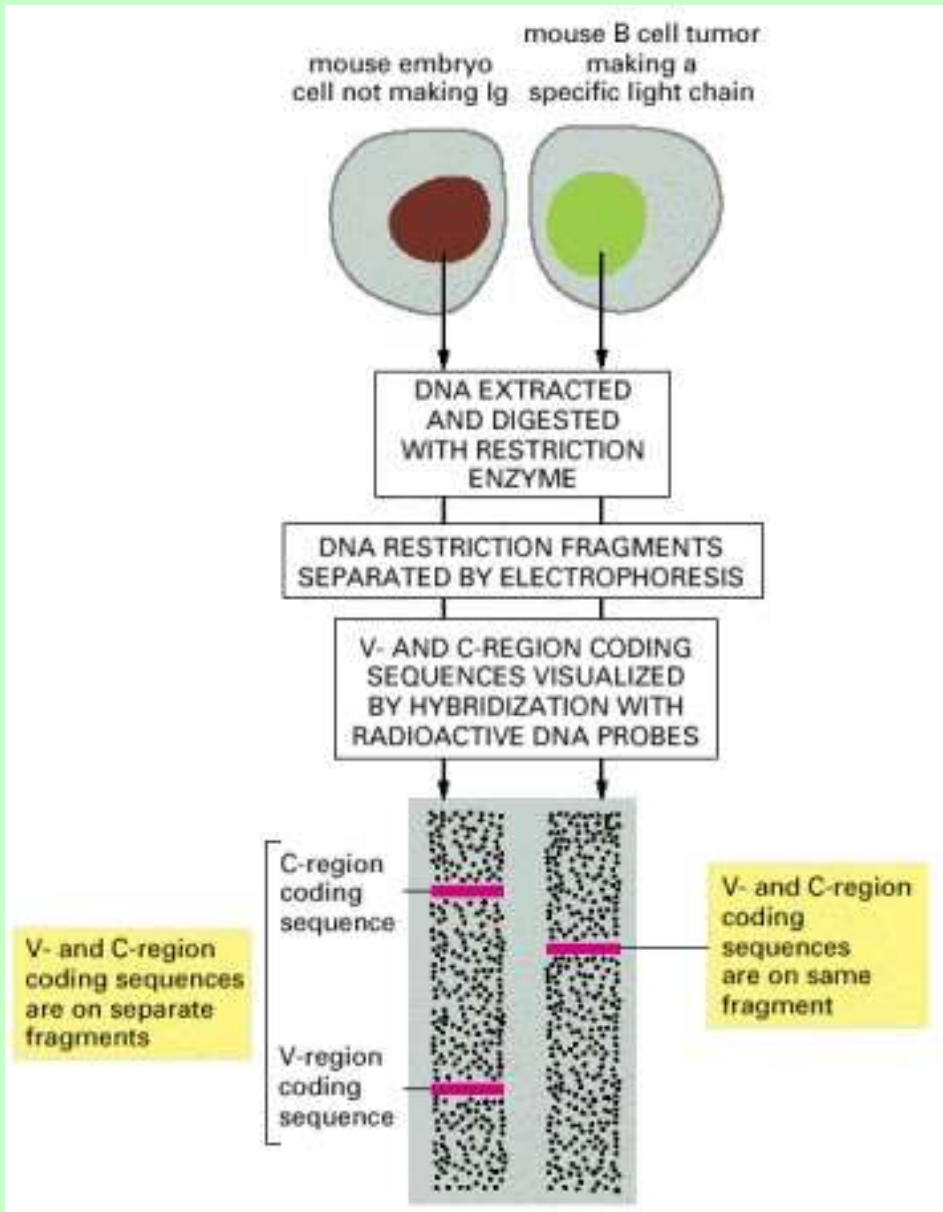
J – joining

D – diversity

C - constant



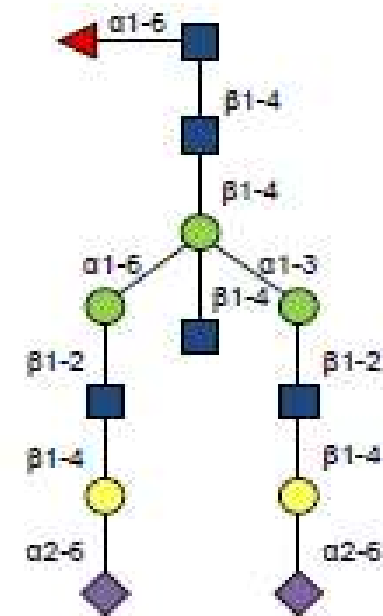
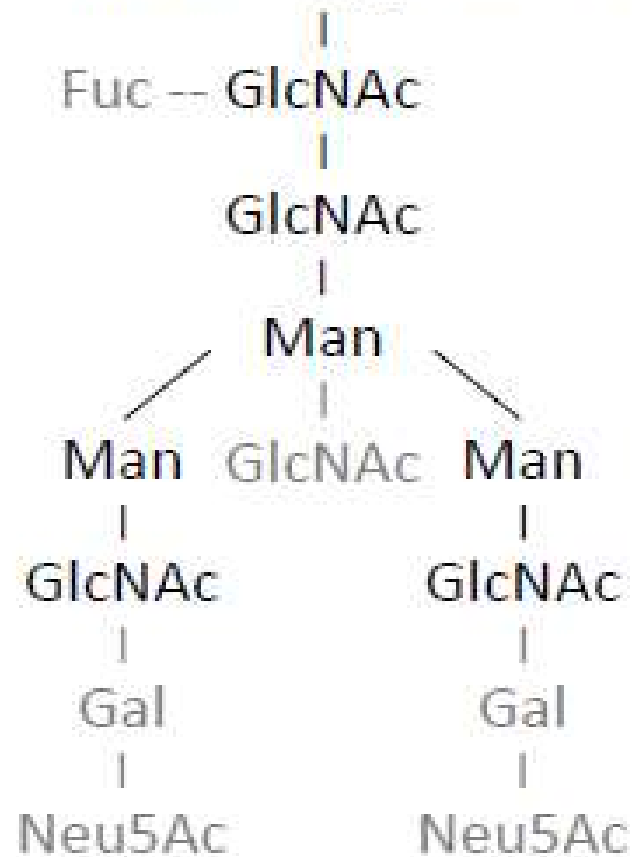
Antitestek – DNS fragment átrendeződés a B-sejt fejlődése során



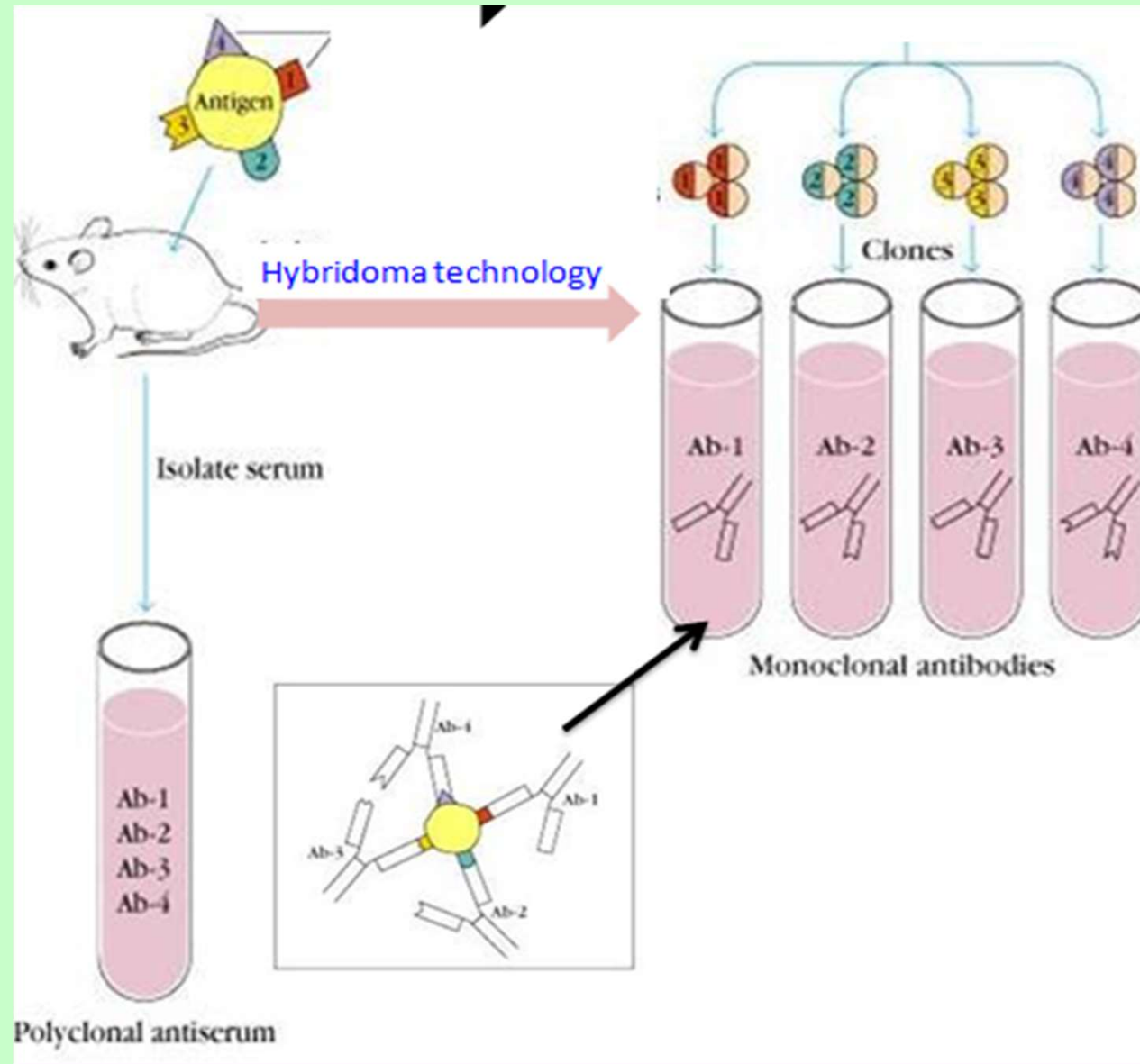
Az antitestek glikozilálása

A nehéz láncokon egy-egy N-glikozilálási hely van (Asn-297).

-Gln-Tyr-Asn₂₉₇-Ser-Thr-Tyr-Arg-



Poliklonális és monoklonális antitestek keletkezése

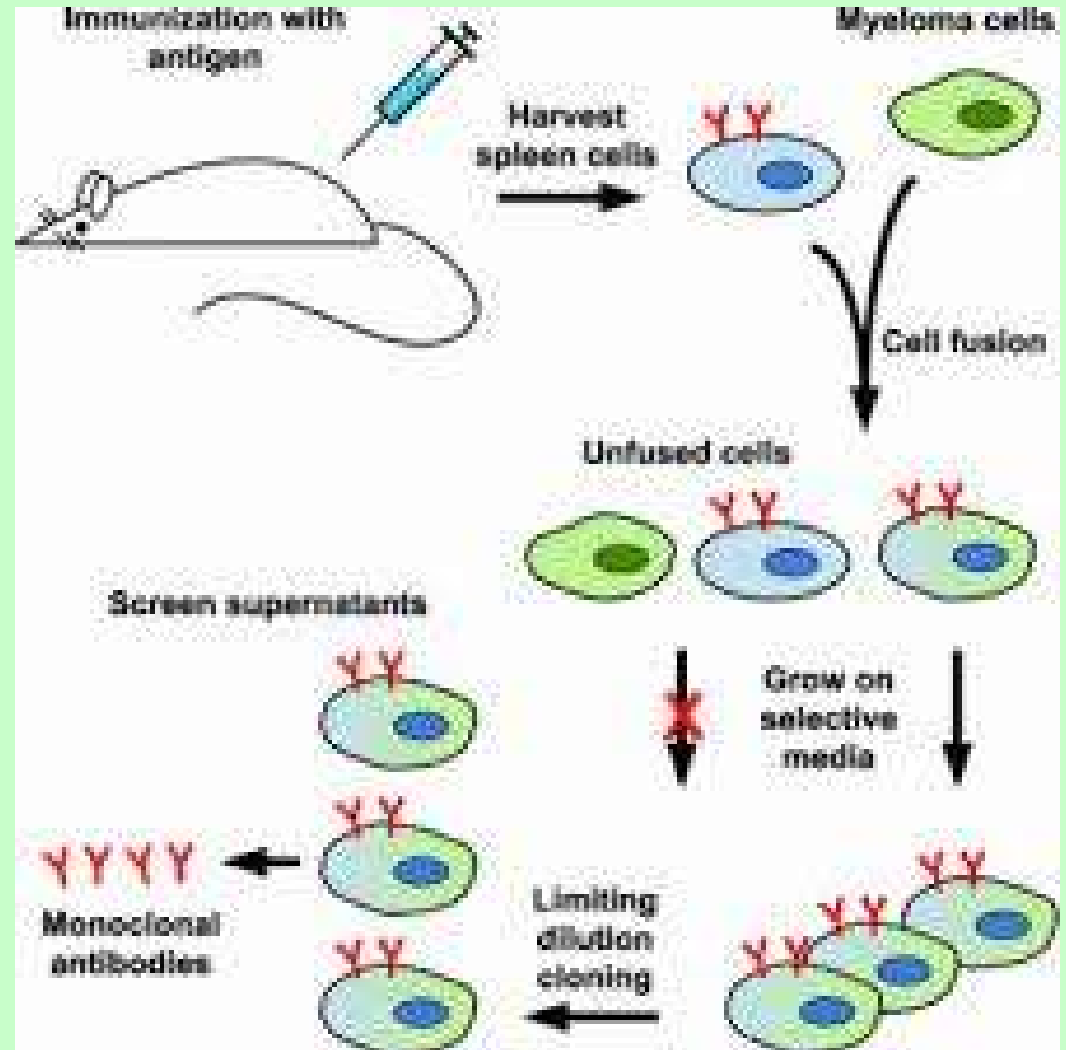


A Mab-ok előállítása hibridóma technikával

A monoklonális antitestek egyformák, mert egyfajta immunsejtből keletkeztek, amely immunsejtek egyetlen sejtől származnak.

A kívánt monoklonális antitestet termelő sejt egyetlen, a megfelelő antitestet termelő B sejtéből és egy tumor sejtéből (myeloma sejt) keletkezik fúzióval. Ezeket hibridómáknak nevezzük.

A monoklonális antitestek azonos antigén kötő hellyel rendelkeznek, így ugyanahhoz az antitest osztályhoz tartoznak, és ugyanahhoz az epitóphoz kapcsolódnak.



Monoklonális ellenanyag előállítás menete

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



Miért hibridoma?

- **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 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



Hibridóma szelekció, a “HAT Trick”

A fúzió után többféle sejt van jelen:

- **fuzionálatlan plazmasejtek**
- **fuzionálatlan tumorsejtek**
- **hibridómák**

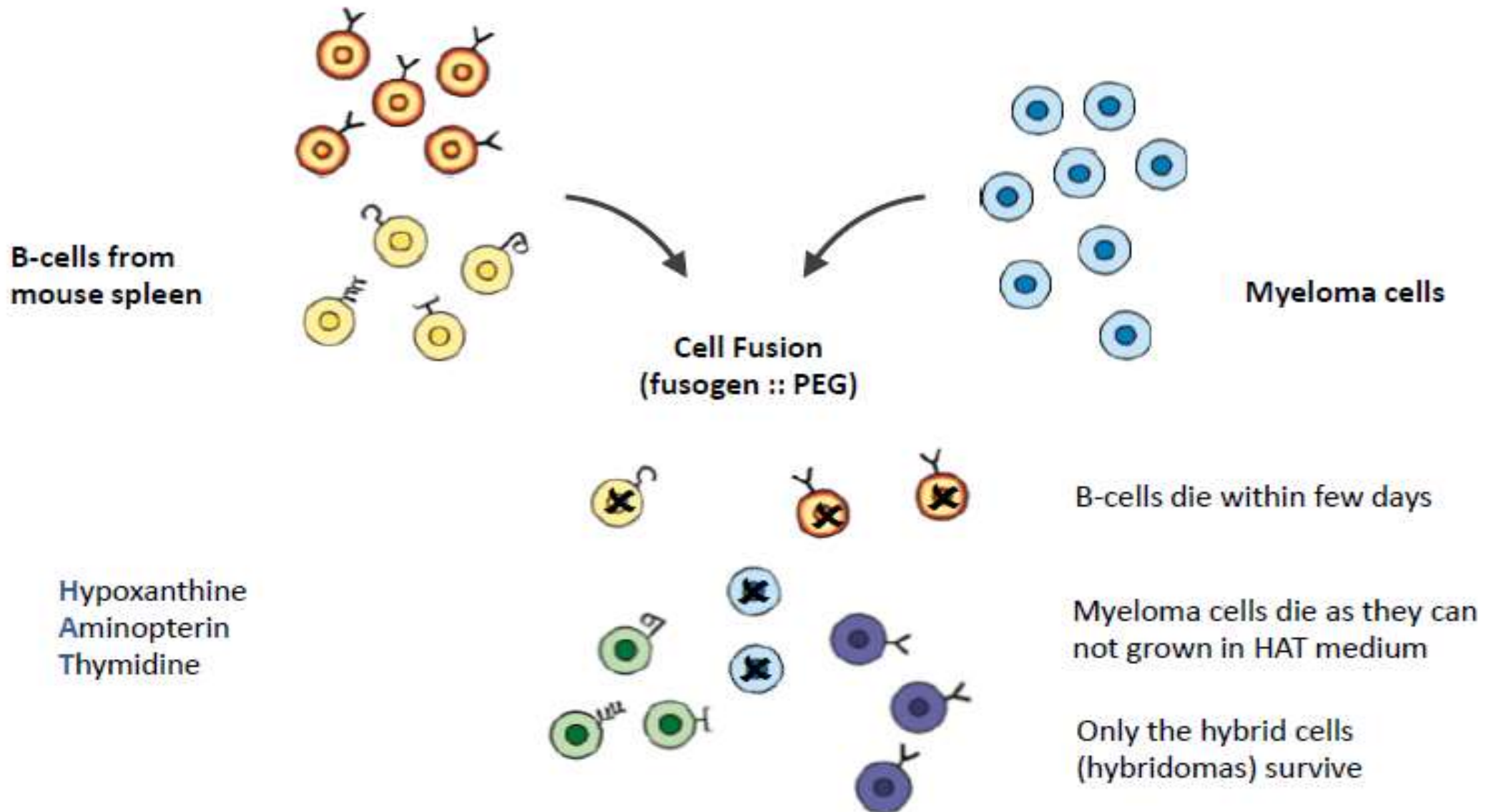
ezek közül kell izolálni a hibridómákat.

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. →

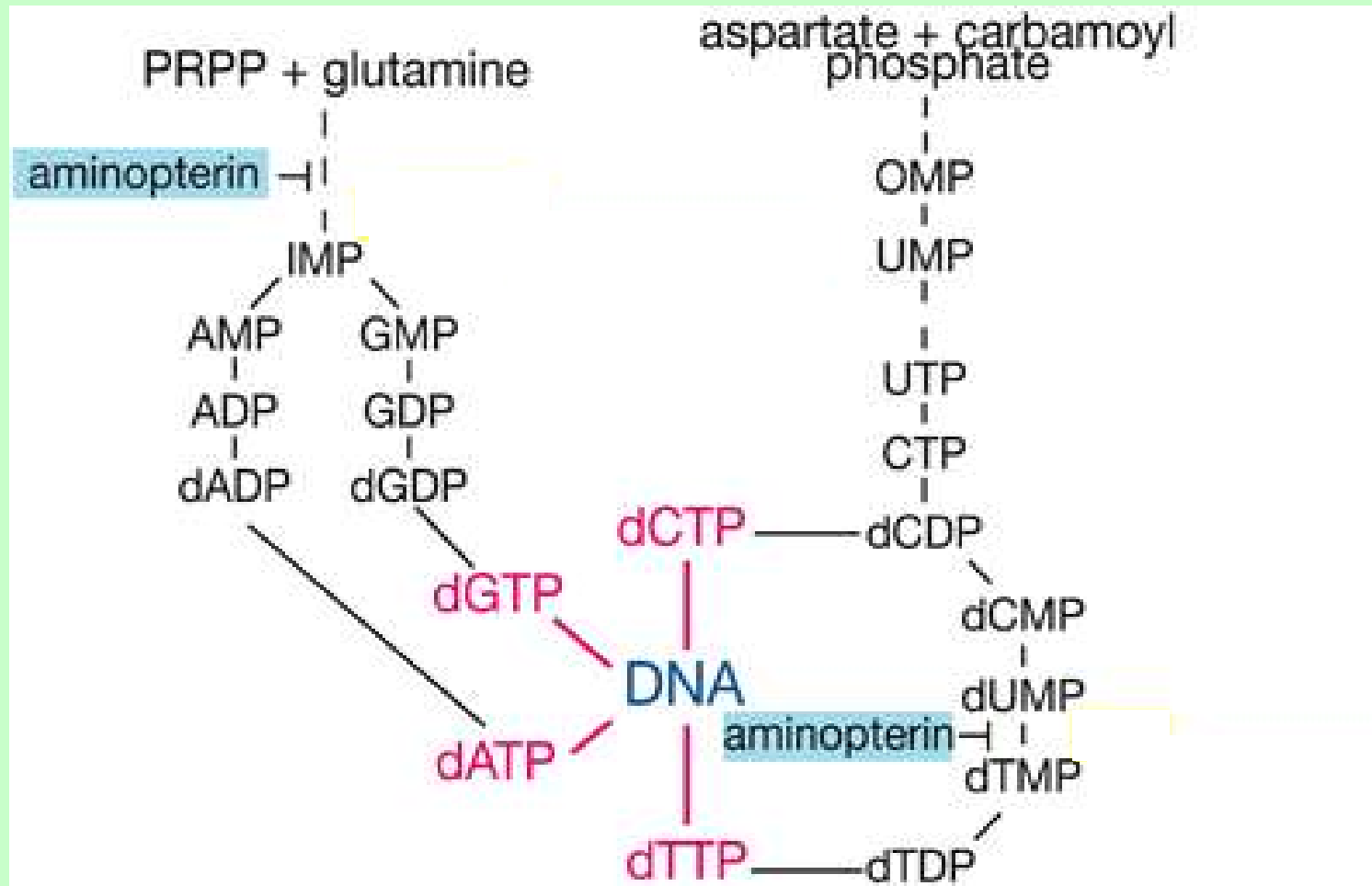


Hibridóma szelekció, a “HAT Trick”



Hibridóma szelekció, a “HAT Trick”

DNS szintézis gátlás = sejthalál

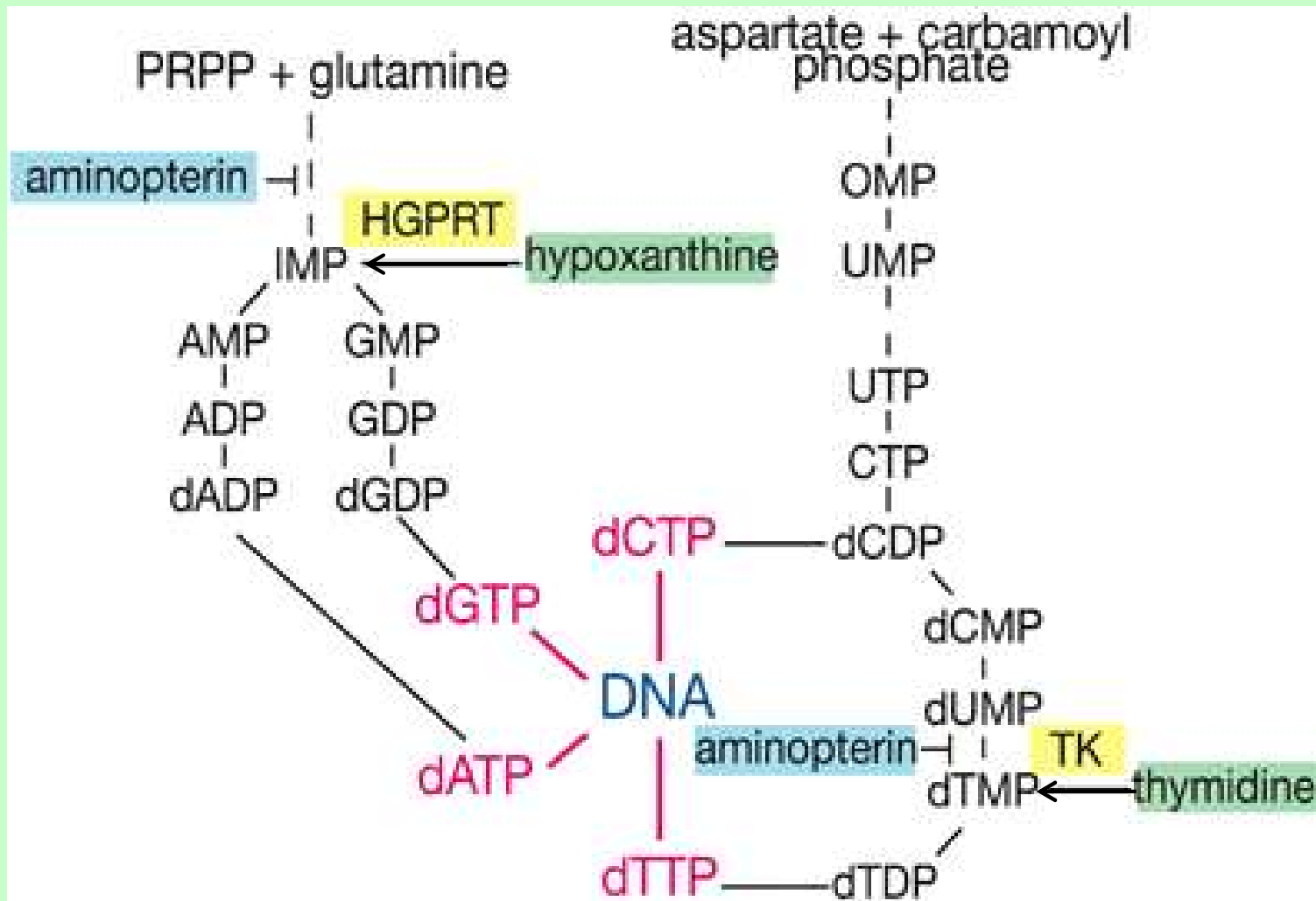


PRPP: phosphoribosylpyrophosphate,



Hibridóma szelekció, a “HAT Trick”

Kerülő út: hypoxantin és timidin adagolással = szaporodás



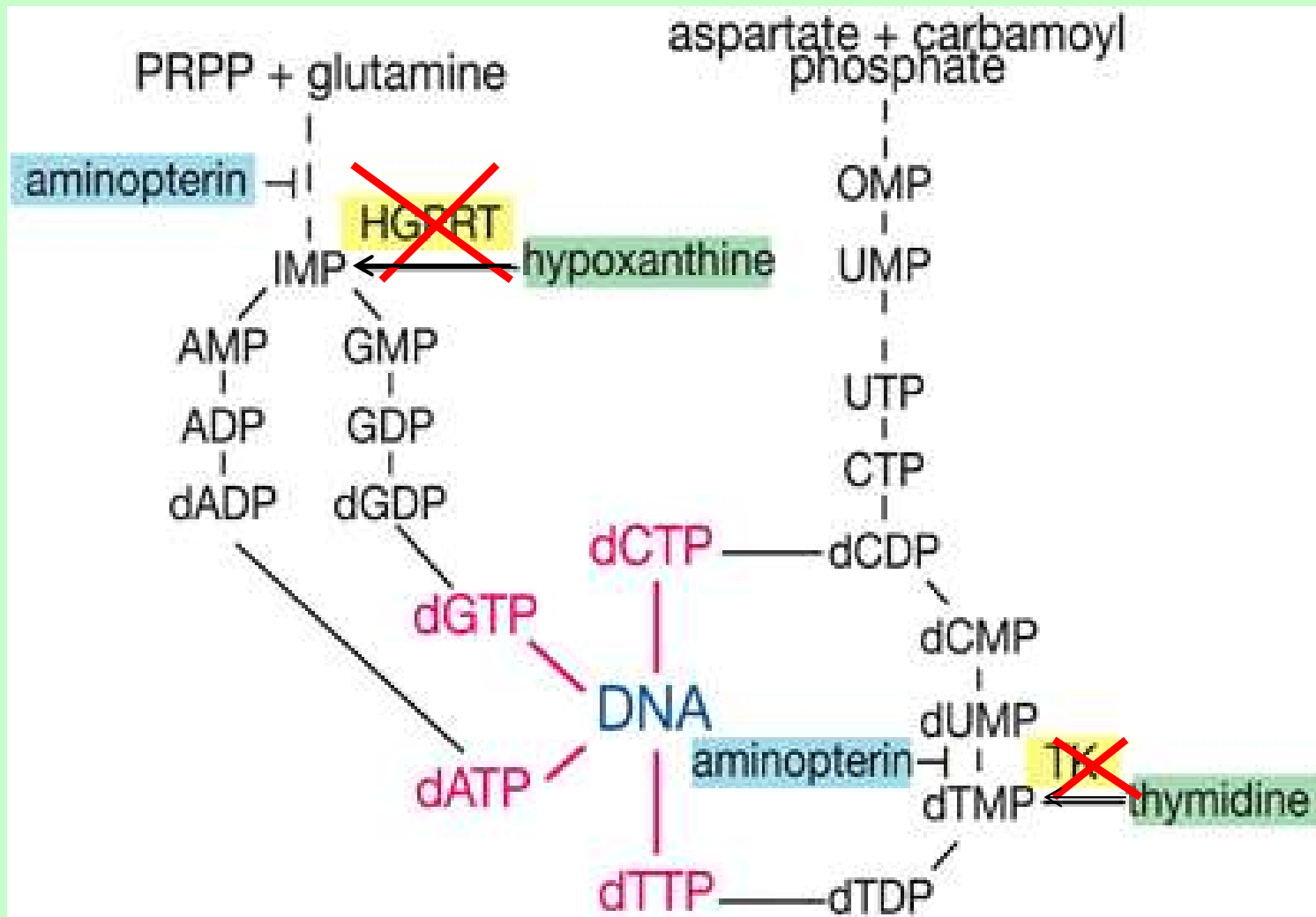
PRPP: phosphoribosylpyrophosphate,

HGPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, TK: thymidine kinase



Hibridóma szelekció, a “HAT Trick”

HGPRT és TK hiányos mutánsok hiába kapnak segítséget = sejthalál



**Túlélés a
mieloma sejtek
számára
csak a
B sejtől kapott
HGPRT és TK
enzimekkel
lehetséges**

PRPP: phosphoribosylpyrophosphate,

HGPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, TK: thymidine kinase



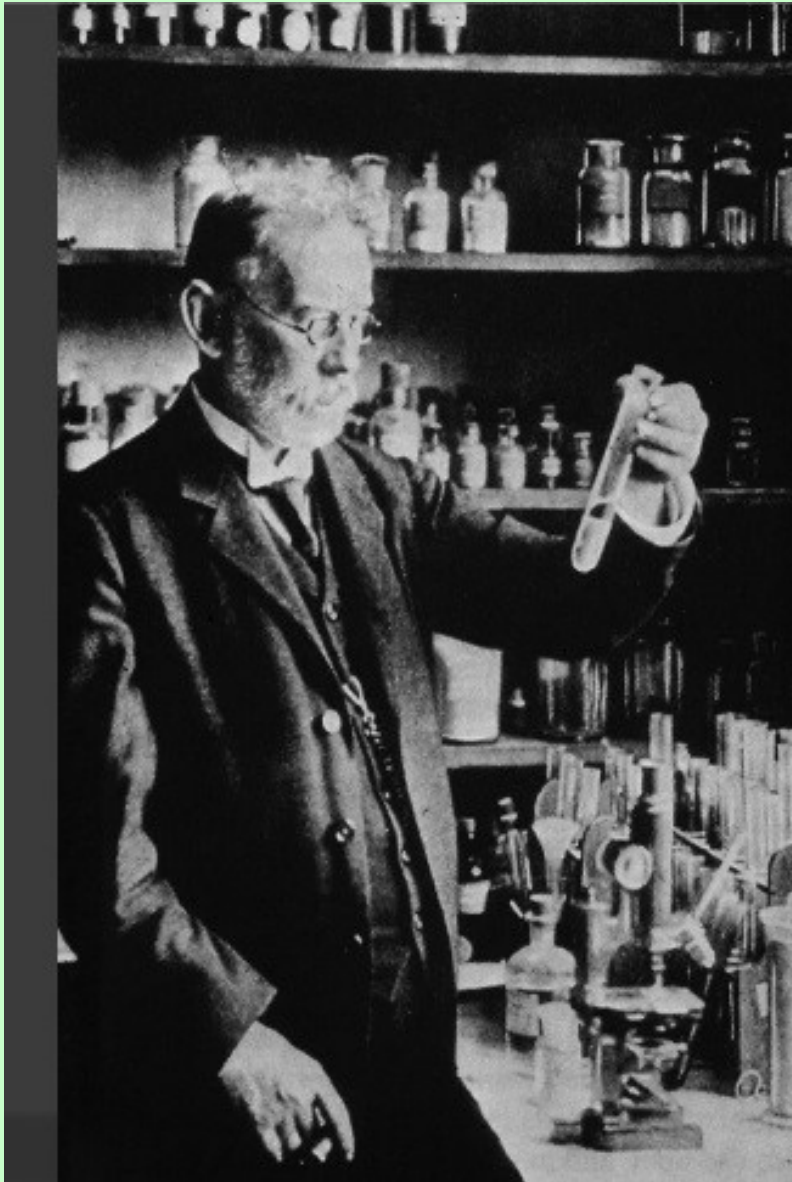
A monoklonális antitestek felhasználása

Terápiás eljárások		
Közvetlen hatás	Fertőzés	Vírus, baktérium elpusztítása AIDS
	Rák	
	Immunszuppresszió	Szervátültetés után a kilökődés ellen Autoimmun betegségek ellen
Célirányt biztosító	Rák	Rádioaktivitás szállítása
	Mélyvénás trombózis	Plazmin szállítása
	Fertőzés	Antibiotikum szállítása



Nem terápiás eljárások

Biokémiai kutatások	RIA, ELISA, SPR,	Bio-layer interferometry
Immun analitikai eljárások	Terhesség	
	Hormonok	
	Fertőzés	
	Rák	Vérből biomarker fehérjék meghat.
	Érrendszeri	Elhalt szívizom termékeinek meghat.
	Mélyvénás trombózis	Ddimer meghat.
Immuno-scintigráfia	Rák	ProstaScint (in-situ)
	Mélyvénás trombózis	Fibrin specifikus Mab (in-situ)
	Érelmeszesedés	Mab aktivált-vérlemezkék ellen (in-situ)
	Fertőzés	Mab gyulladáscsökkentő leukociták ellen
Feldolgozási műveletek	Rek. Fehérje gyártás	Affinkromatográfia
Egyéb funkciók	Katalitikus Mab-ok	Abzymes, Catmab



Paul Erlich álma a Magic Bullet-ről megvalósult.

A monoklonális antitestek jelenleg a legfontosabb, legígéretesebb és leggyorsabban fejlődő területe a rák elleni küzdelemnek.

*Paul Ehrlich
(1854-1915)*



A Mab-okkal kapcsolatos Nobel-díjak

History

1975 :

Hybridoma Technology

George Kohler and **Cesar Milstein** devised a method to obtain large amounts of a mAb

1988 :

The Nobel Prize for Medicine

- In 1988, **Greg Winter** et al pioneered the techniques to humanize monoclonal antibodies



Érvek a Mab-ok használatával kapcsolatban

Ellene

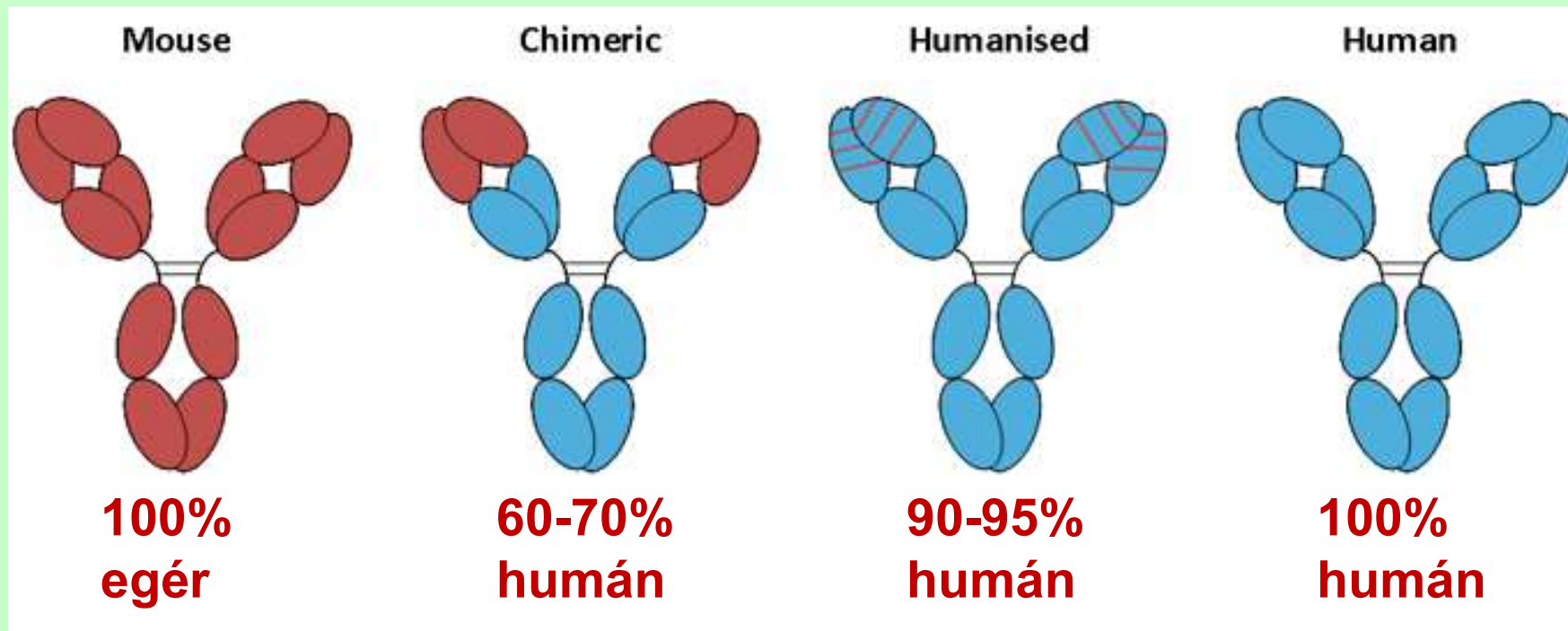
- Szájon át nem adható
- Magas szükséges dózis
- Immunogenicitás
- Gyenge behatolás szilárd tumorokba
- Lehetséges keresztreakciók más szövetekkel
- COG
- Lehetséges vírus fertőzés
- Nehézségek a nagyléptékű termelésben

Mellette

- Biztonságosság
- Magas szelektivitás
- Erős hatás
- A lehetséges célmolekulák széles választéka
- Egyéb gyógyszer hiánya, vagy meglévő gyógyszer gyenge hatása



A Mab-ok fejlődése

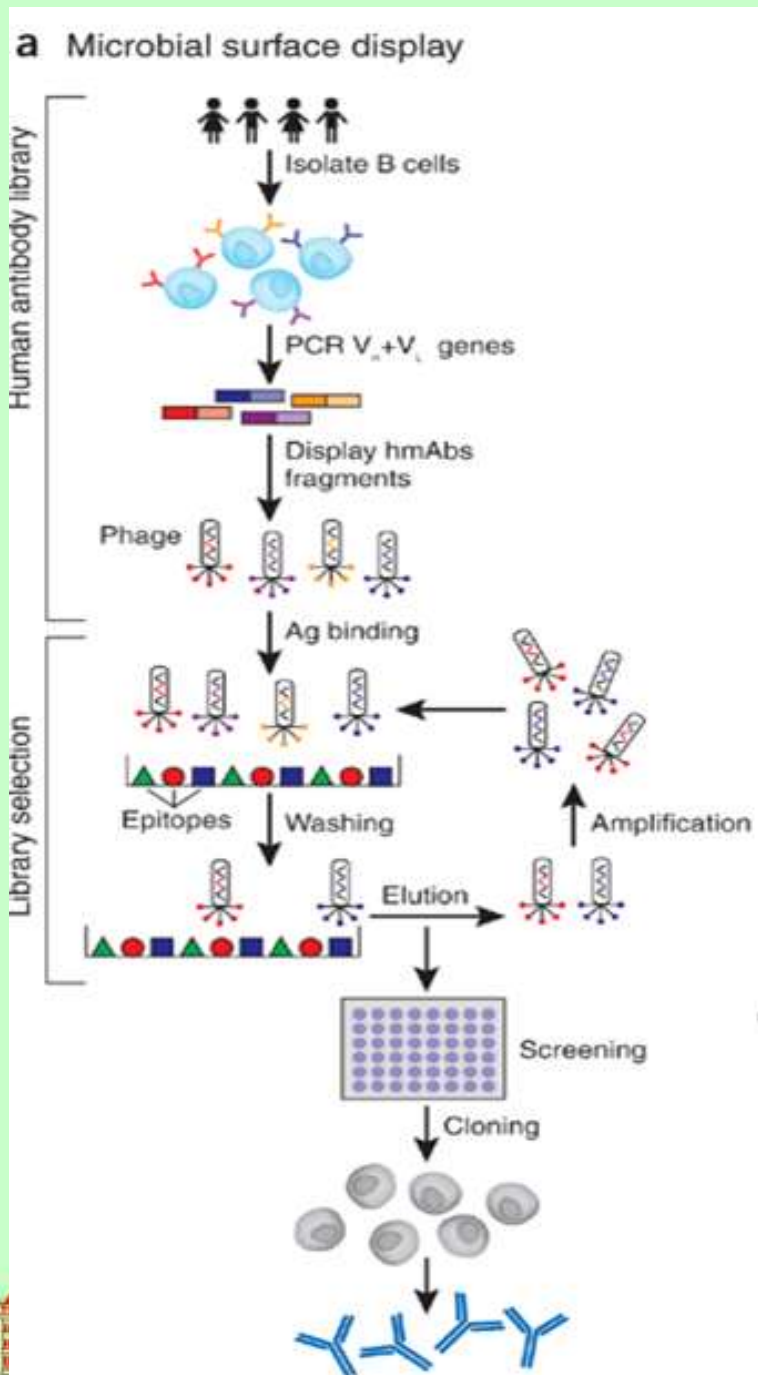


Rágcsáló eredetű Mab humán felhasználását korlátozó tényezők

- Rövid féléletidő a vérben
- A rágcsáló IgG sajátként való felismerése (elismerése) korlátozott
- HAMA v. HACA válasz (de van HAHA válasz is!)
- Alacsony fokú hatásosság



Humán Mab-ok létrehozásának módszerei – phage display



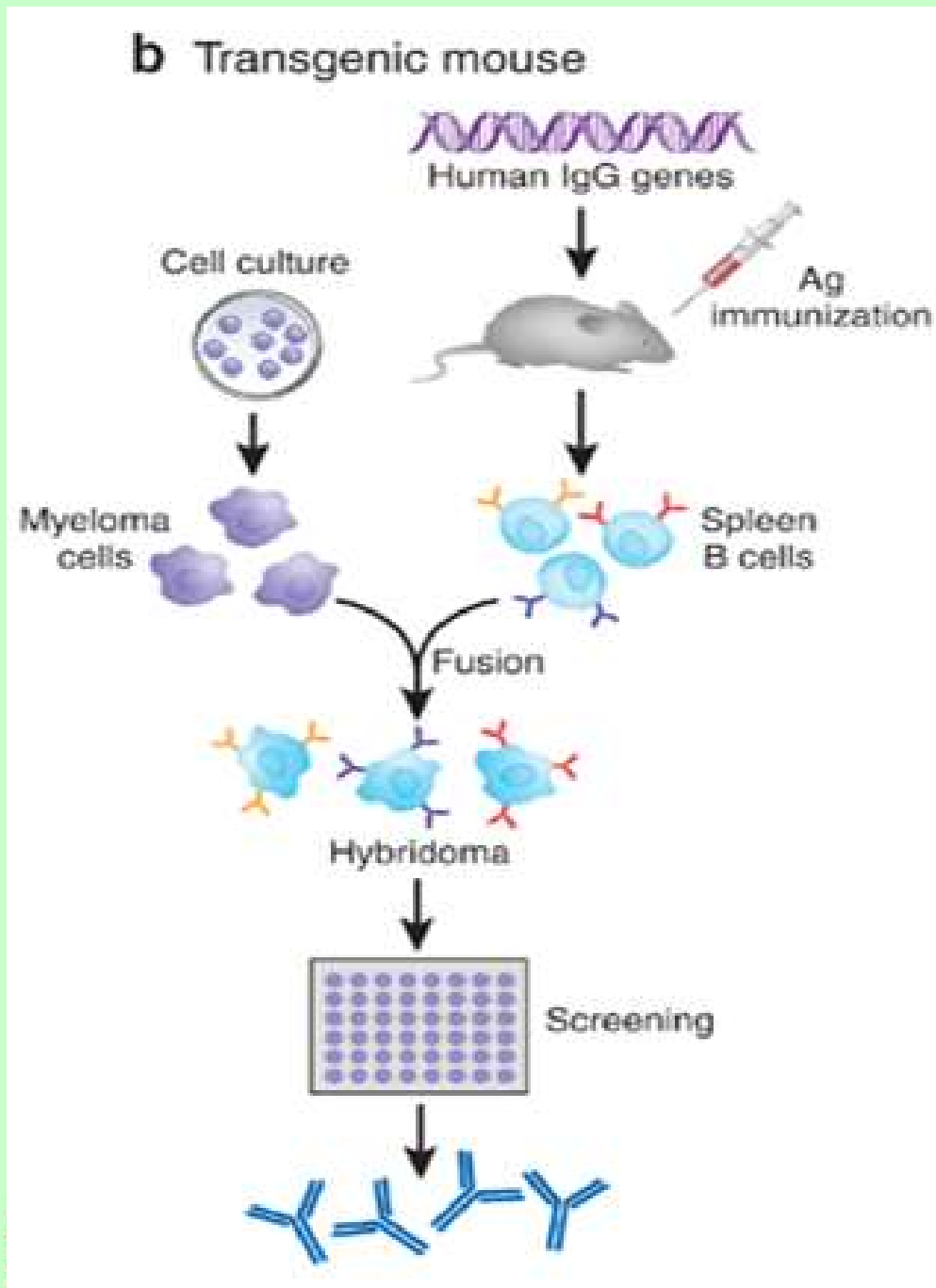
Az antigénnel fertőzött humán páciensek B sejtjeinek DNS-én olyan PCR-t hajtanak végre, amely a variábilis régiókat kódoló génszakaszokat sokszorosítja.

Ezeket a DNS darabokat random módon bakteriofágok kapszidjukba pakolják, majd a belőlük keletkezett fehérje a felszínen megjelenik.

Szilárd felülethez kötött antigének csak azokat a fágokat fogják megkötni, amelyeknek a felszínén a hozzájuk kapcsolódni képes fehérje darabkák vannak. Ezek a fehérje darabkák a megfelelő variábilis régiókból származnak.

A feldúsult fágokban lévő DNS megszekvenálható és beklónozható ipari termelő emlős sejtvonalba.

Humán Mab-ok létrehozásának módszerei – transzgenikus egér

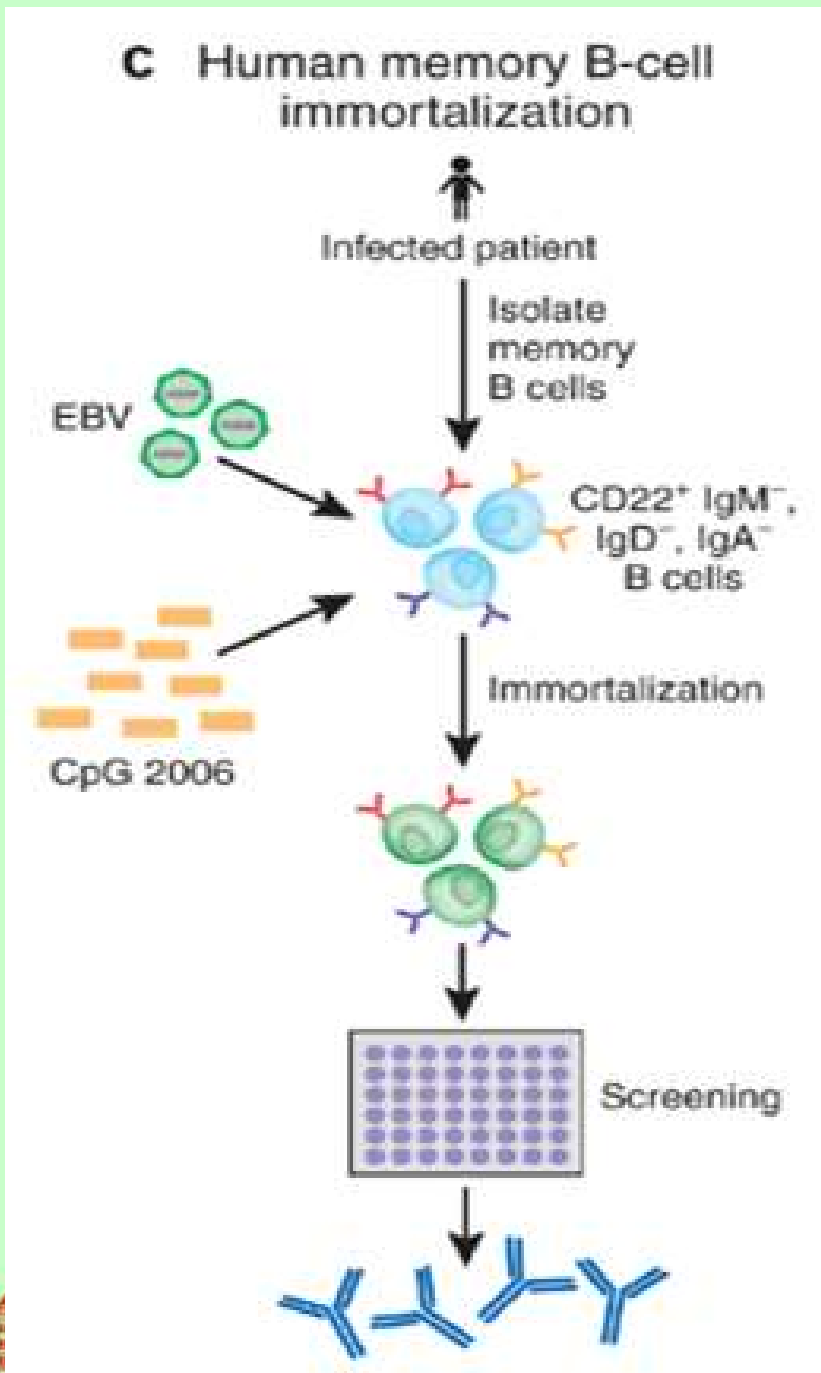


A technika ugyanaz, mint amikor a humán B sejtekből és myeloma sejtekből hybridoma sejteket állítanak elő.

A különbség itt annyi, hogy ez egy különleges egér, mert már eleve csak humán szerkezetű antitesteket tud termelni.

Megfertőzve őt a megfelelő antigénnel, ezen antigén ellen humán jellegű antitesteket fog előállítani.

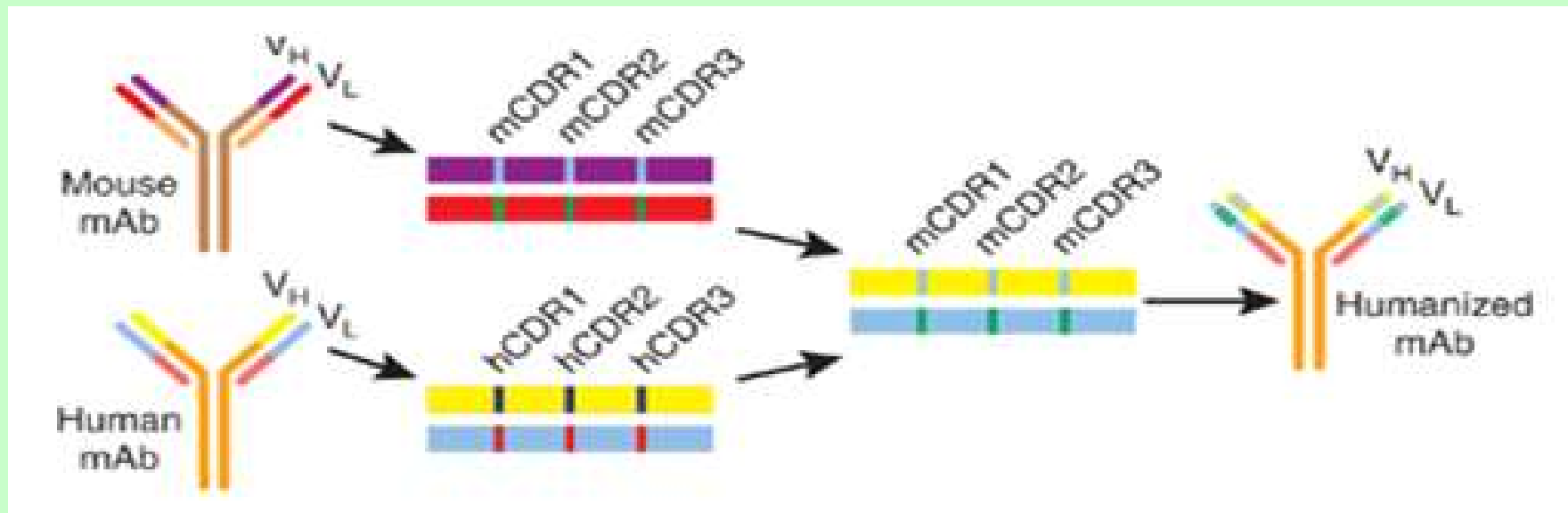
Humán Mab-ok létrehozásának módszerei – B sejt immortalizáció



A B sejtek keverékét megfertőzik Epstein-Barr vírussal és a szaporodásukat elősegítő faktort adnak hozzá. Ezáltal a B sejtek folyamatos osztódásra lesznek képesek, mint a hybridoma sejtek.

A nagy számban elszaporodott sejtekből kiszűrhető a célként kitűzött Mab-ot termelő immortalizált B-sejt. A kiszűrt sejtvonal használható kis léptékű cél-Mab termelésére, vagy a könnyű és a nehéz lánc szekvenálása után ipari léptékben alkalmazható emlős sejtbe klónozható.

Humanizált Mab-ok létrehozásának módszere



Az alap a humán Mab, de a Complementarity Determining Régiókat (CDR) tartalmazó gén szakaszokat (szekvenálás után) kicserélik az egér által kialakított CDR régiókban lévő aminosavakra.



Monoklonális antitestek elnevezésének rendszere

Egyedi előtag	Cél	Forrás	Utótag
	-o(s)- bone	-u- human	-mab
Pali	-vi(r)- viral	-o- mouse	
	-ba(c)- bacterial	-a- rat	
Ada	-li(m)- immune	-e- hamster	
	-le(s)- infectious lesions	-i- primate	
Beva	-ci(r)- cardiovascular	-xi- chimeric	
	-mu(l)- musculoskeletal	-zu- humanized	
Cana	-ki(n)- interleukin as target	-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		
Tras	-tu(m)- miscellaneous tumor		
	-neu(r)- nervous system		
	-tox(a)- toxin as target		
	-fu(ng)- fungal		

Abciximab

megakadályozza a vörös vértestek aggregátumainak kialakulását.

A szó felbontható:
ab- + -ci(r)- + -xi- + -mab.

Amiből látható, hogy egy olyan kiméráról van szó, amely érrendszeri kezelést tesz lehetővé.



Mab-ok a jelenben

Ballagi András dr. - x FDA Approves Eli Lilly


www.wsj.com/articles/fda-approves-eli-lillys-lung-cancer-drug-1448386768

Alkalmazások Az IE alkalmazá... Yahoo Az Outlook We... Google altitude-magyar... Fizikai kislexiko... További könyvjelzők

THE WALL STREET JOURNAL

Subscribe Now | Sign In

Home World U.S. Politics Economy **Business** Tech Markets Opinion Arts Life Real Estate Search



The U.S. FDA approved Eli Lilly's Portrazza to treat a form of the most common type of lung cancer. PHOTO: KRIS TRIPPLAAR/SIPA USA

By ANNE STEELE
Nov. 24, 2015 12:39 p.m. ET

7 COMMENTS

The U.S. Food and Drug Administration on Tuesday said it approved [Eli Lilly](#)'s drug to treat a form of the most common type of lung cancer.

Portrazza can be used in combination with two forms of chemotherapy to treat patients with advanced squamous non-small cell lung cancer who haven't previously received medication specifically for treating their advanced lung cancer. Portrazza, or necitumumab, is a monoclonal antibody that blocks activity of EGFR, a protein commonly found on squamous NSCLC tumors.

www.wsj.com/articles/kerry-warns-violence-in-mideast-could-spin-out-of-control-1448494388?mod=trending_now_4

Minister's Bank Accounts

5. Malaysia's IMDB Decoded: Growing Scandal

Most Popular Articles

1. U.S. Blacklists Network Linked to Syria Oil Deals With ISIS
2. Opinion: The Miracle of Squanto's Path to Plymouth
3. Lake Como Rises Again
4. Kerry Says Mideast Violence Could 'Spin Out of Control'
5. Opinion: Turkey Shoots Down a

Windows taskbar: FDA Appro... Skype Rekombiná... Rekombiná... HU 10:06

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Intézetek

Mab-ok a jövőben

Zanolimumab : Cutaneous T cell lymphoma

Tremelimumab : Advanced melanoma

Ruplizumab : Lupus nephritis

Efungumab : Invasive Candida Infection

Panobacumab : Pseudomonas Infection

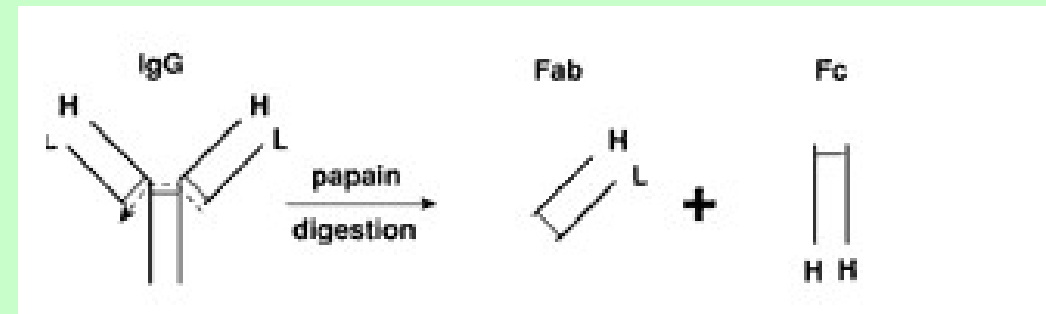
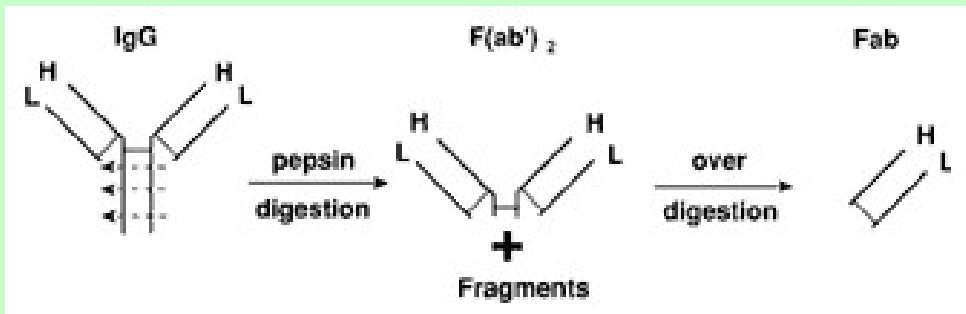
Solanezumab : Alzheimer's Disease



Érdekes alternatívák: Mab fragmentumok

Kis antitest fragmentumok (Fv vagy Fab) szintén alkalmasak citokinek blokkolására

Előnyük: jobban behatolnak a szövetekbe



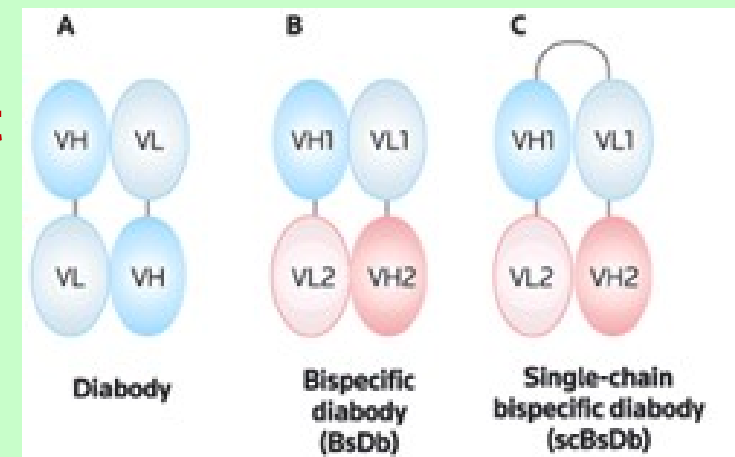
Antitest fragmentumok összekapcsolása dimerekké v. tetramerekké.

Előnyük: megnövekedett hatás

Mesterséges Diabodies (bispecifikus Mabok)

Két különböző antigén specifitású antitest kapcsolása (egyik a célfehérjét, a másik az effektor kapcsolja)

Összekapcsol effektor sejteket



Érdekes alternatívák: Nanobody

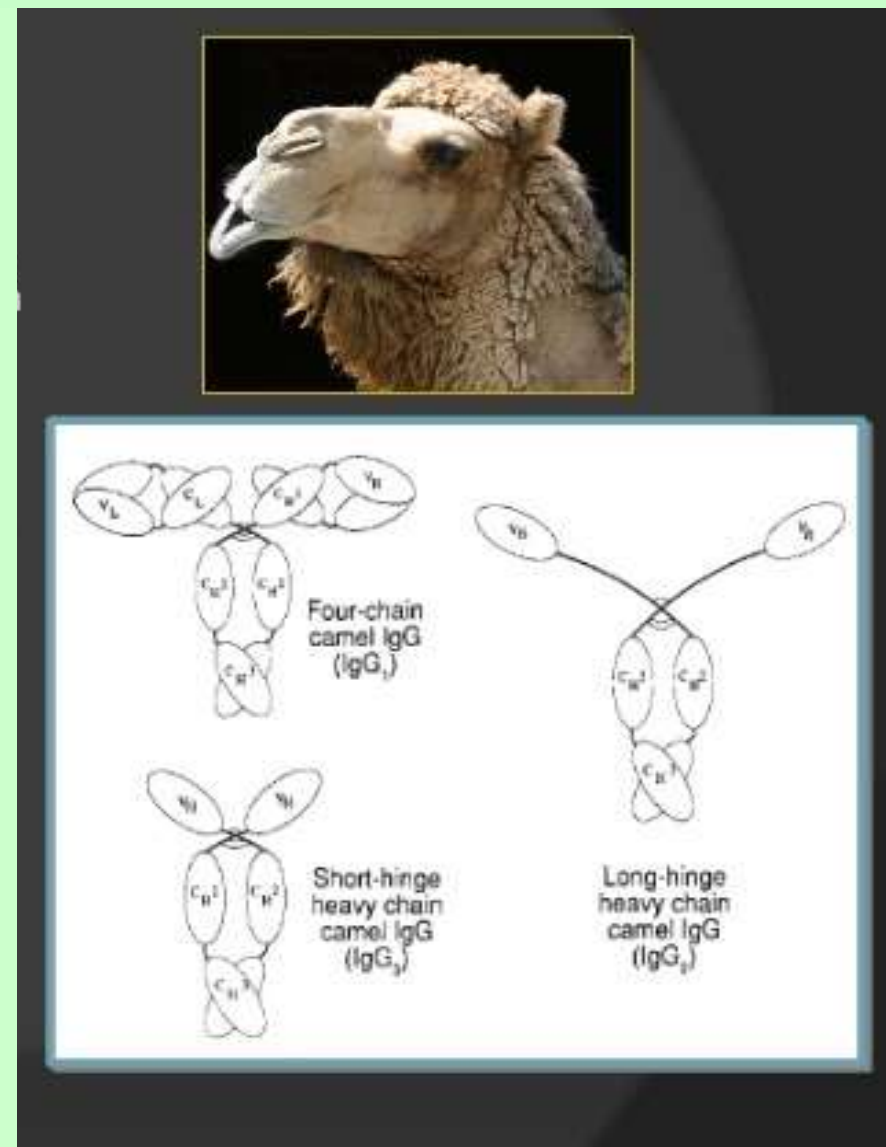
A Nanobody kb. 110 aminosavból álló polipeptid lánc egy nehézláncú variábilis doménnel.

1989 Raymond Hamers fedezte fel tevé vérben.

A könnyű lánc hiányzik, de ugyanaz az antigén kötődés, mint a normál Mabnál.

A szerkezet ellenállóvá teszi hővel és alacsony pH-val szemben. => Fejlesztések nanobody orális készítmények irányába.

Bélbetegségek, pl. malacok *E.coli* okozta hasmenése ellen már van.
Egyéb fertőzések, bélrák ellen fejlesztés.



A Mab-okkal kapcsolatos mellékhatások

- **Allergén reakciók, pl. viszketés**
- **Influenza szerű szimptómák: levertség, láz, izomfájdalom, rossz közérzet**
- **Hasmenés**
- **Hányinger**
- **Kiütések**
- **Súlyos esetben anafilaxiás sokk**



Tartalom folyt.

Monoklonális antitestek

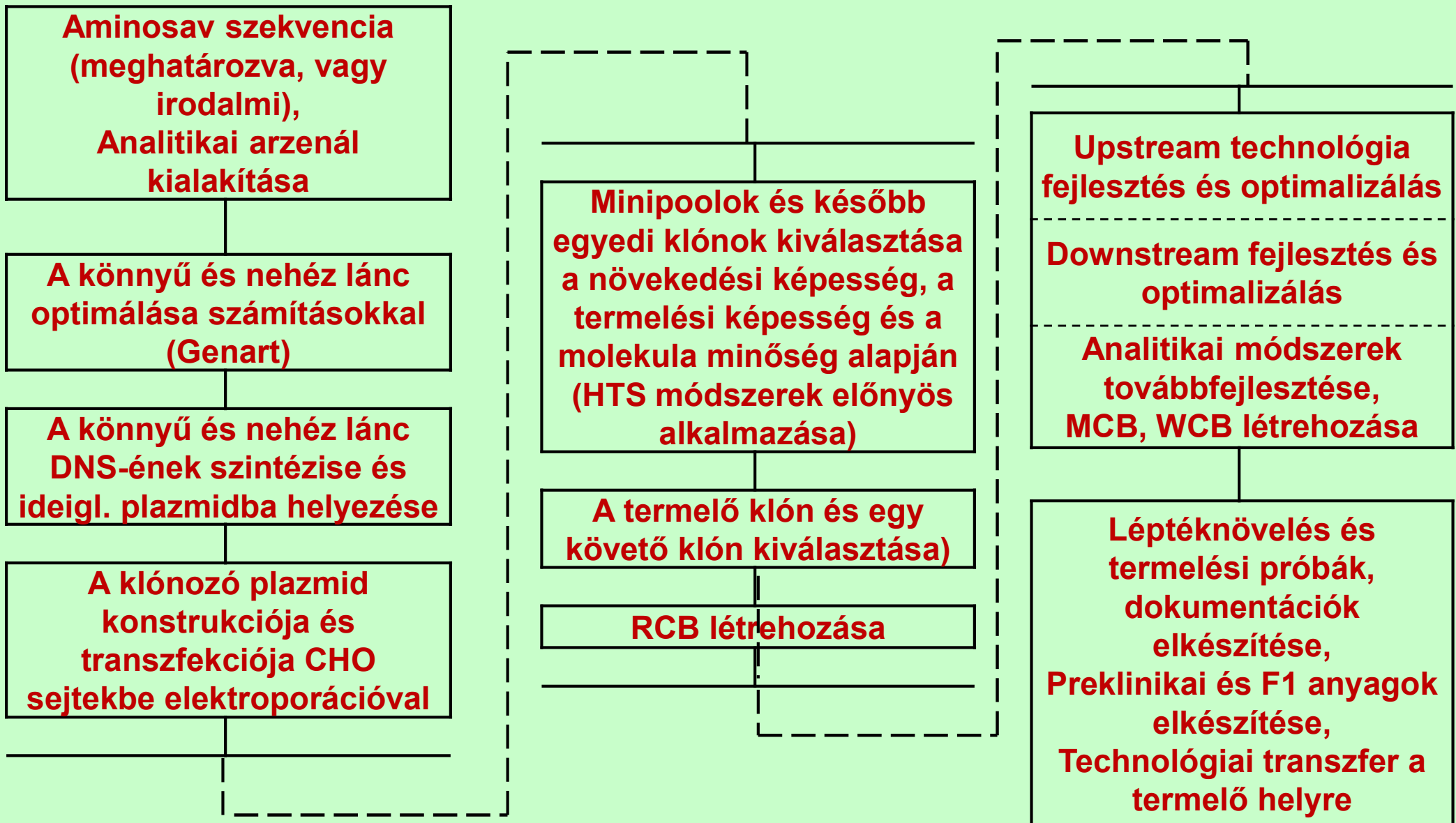
Monoklonális antitestek gyártási technológiája

Biosimiláris gyógyszerek

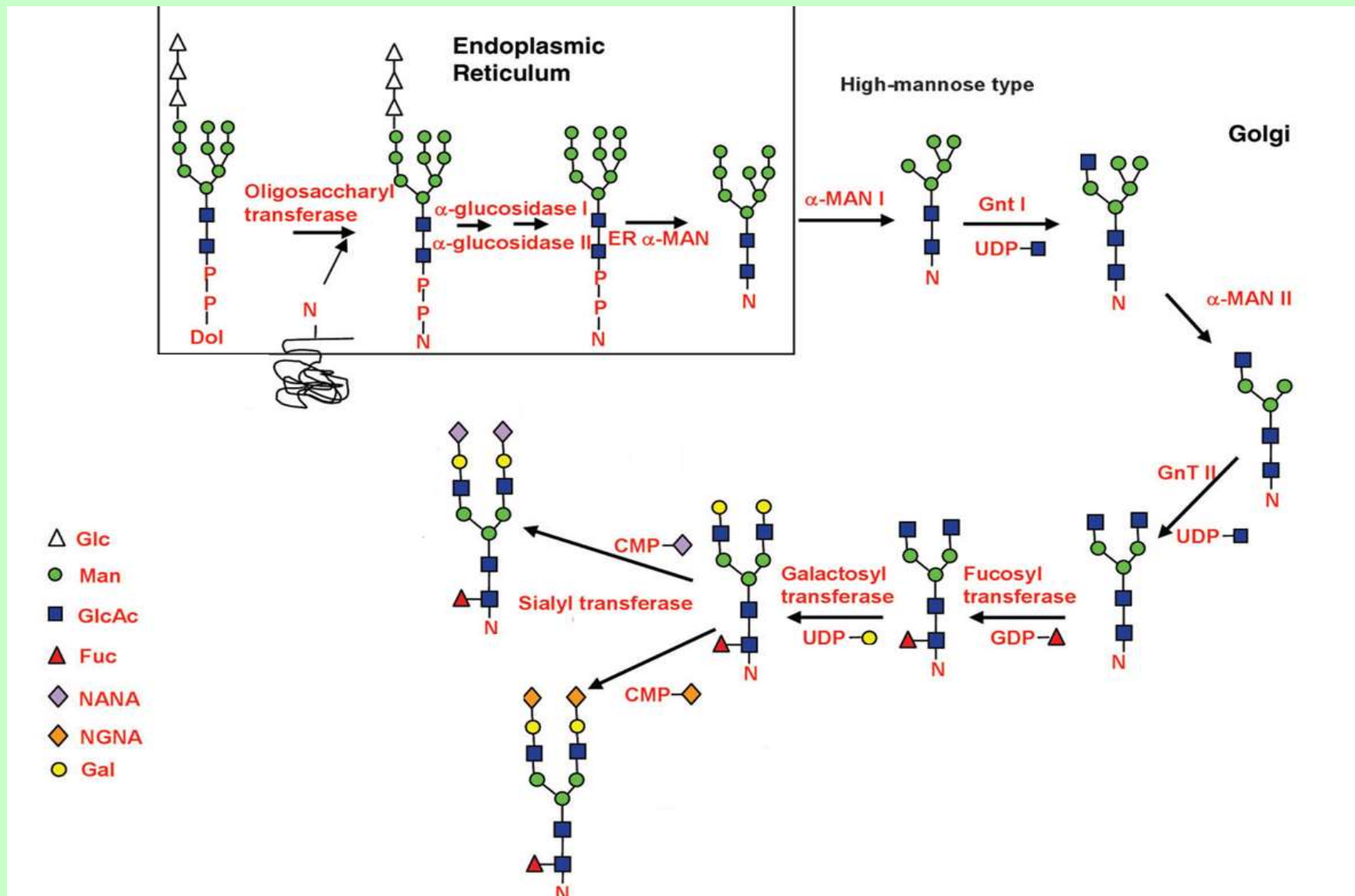
A véralvadás diagnosztika rekombináns fehérjéi és mérési módszerei



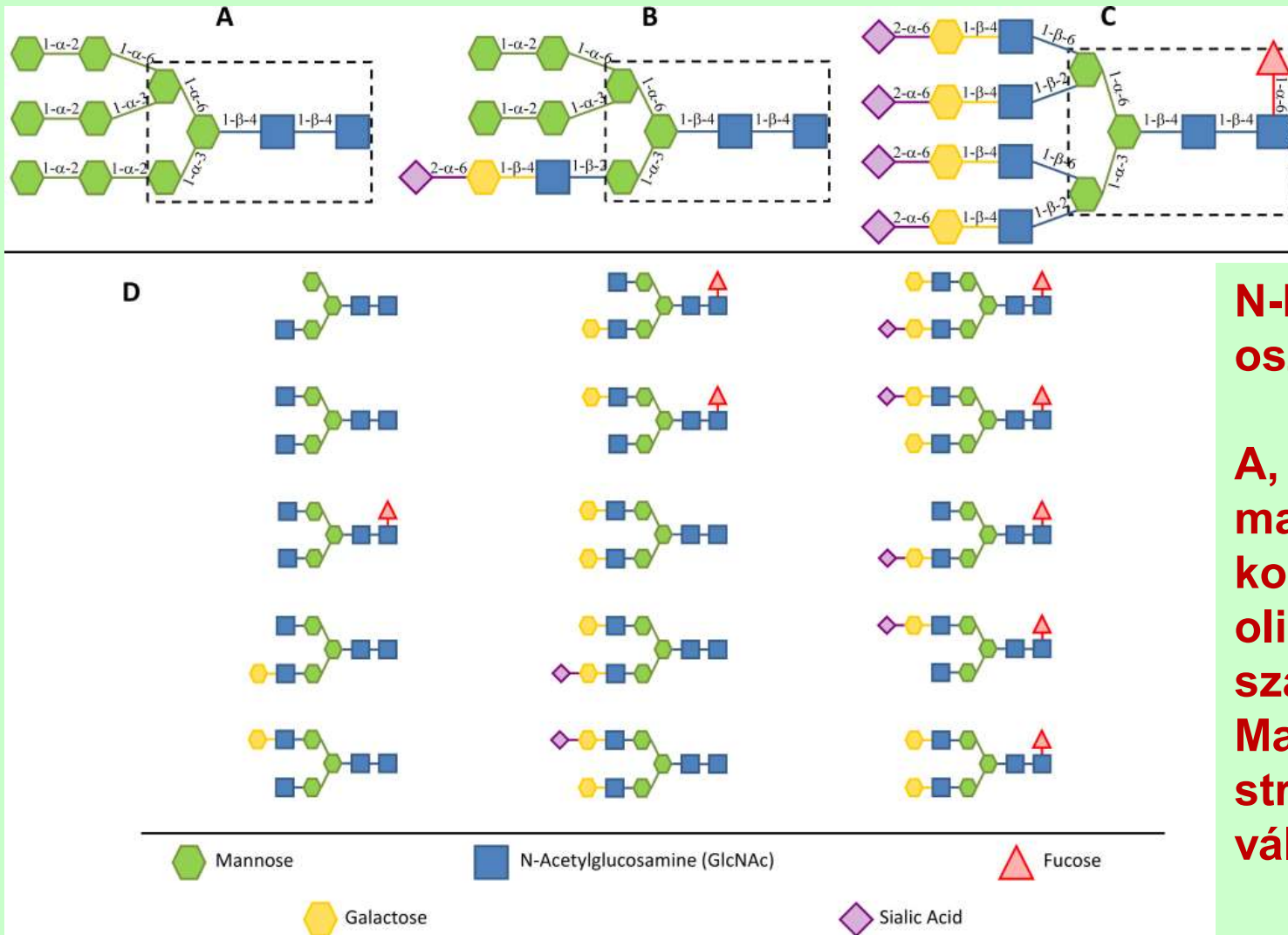
A fejlesztési folyamat



A Mab glikozilációja



A Mab glikozilációja



N-kapcsolt oligoszacharidok osztályozása

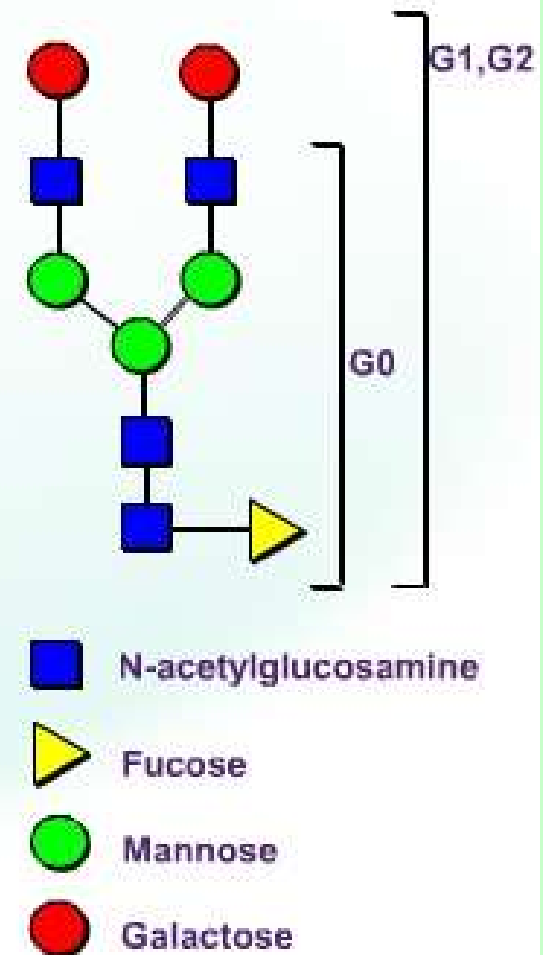
A, B és C paneleken a „high-mannose”, a hibrid és a komplex négyantennás oligoszacharid látható. A szaggatott doboz Man3GlcNAc2 alap struktúra, amely minden változatban megtalálható.

A D panel a Mab-ok Fc régiójában található leggyakoribb glikánokat mutatja.

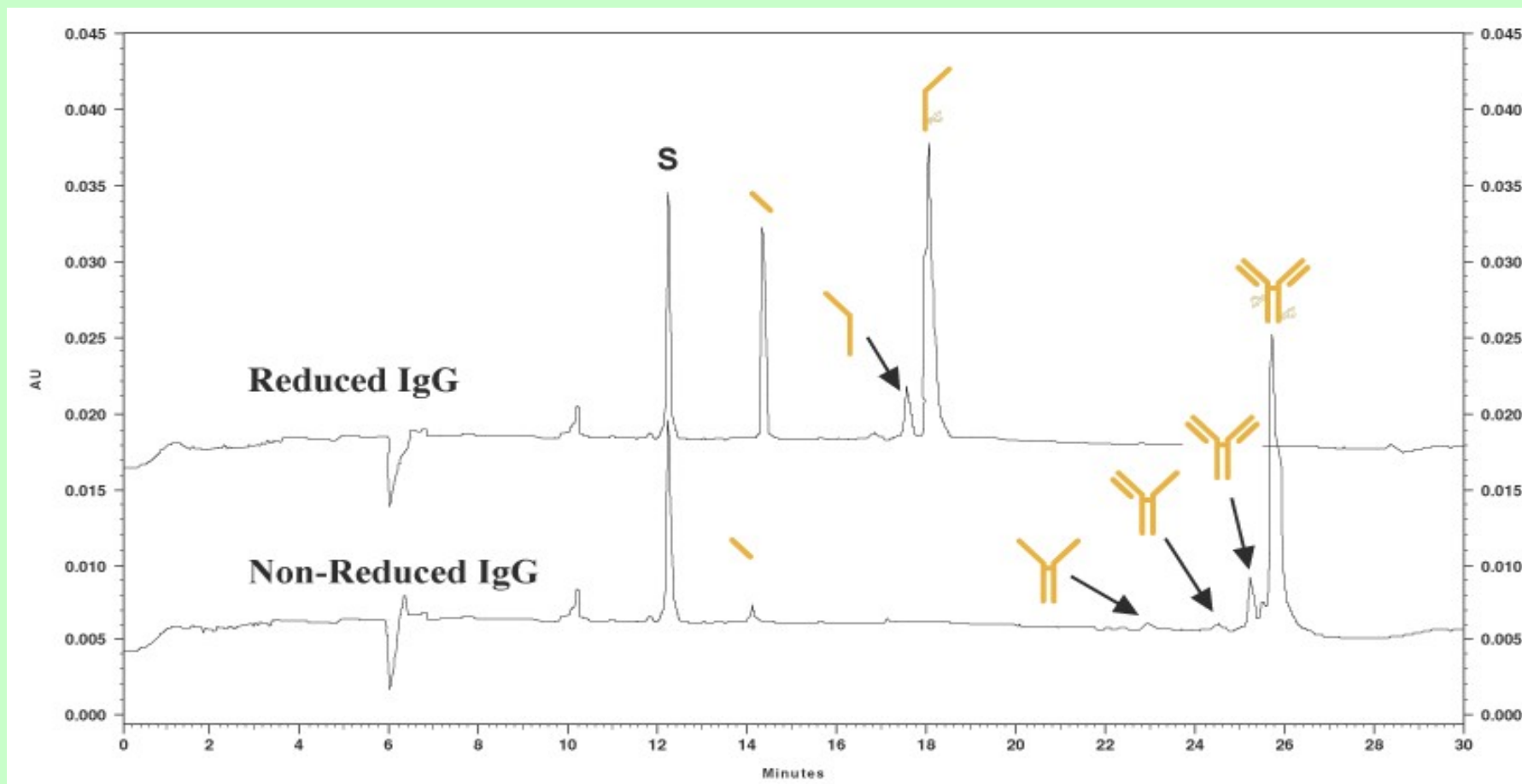


Glikozilációs mintázat optimálása a tápoldat összetételével

Media	Normalized Titer	G0 Difference from Reference Product (%)
Control	1.0	24.7
A	1.2	4.6
B	1.2	-2.0
C	1.2	-4.2
D	1.1	-6.5



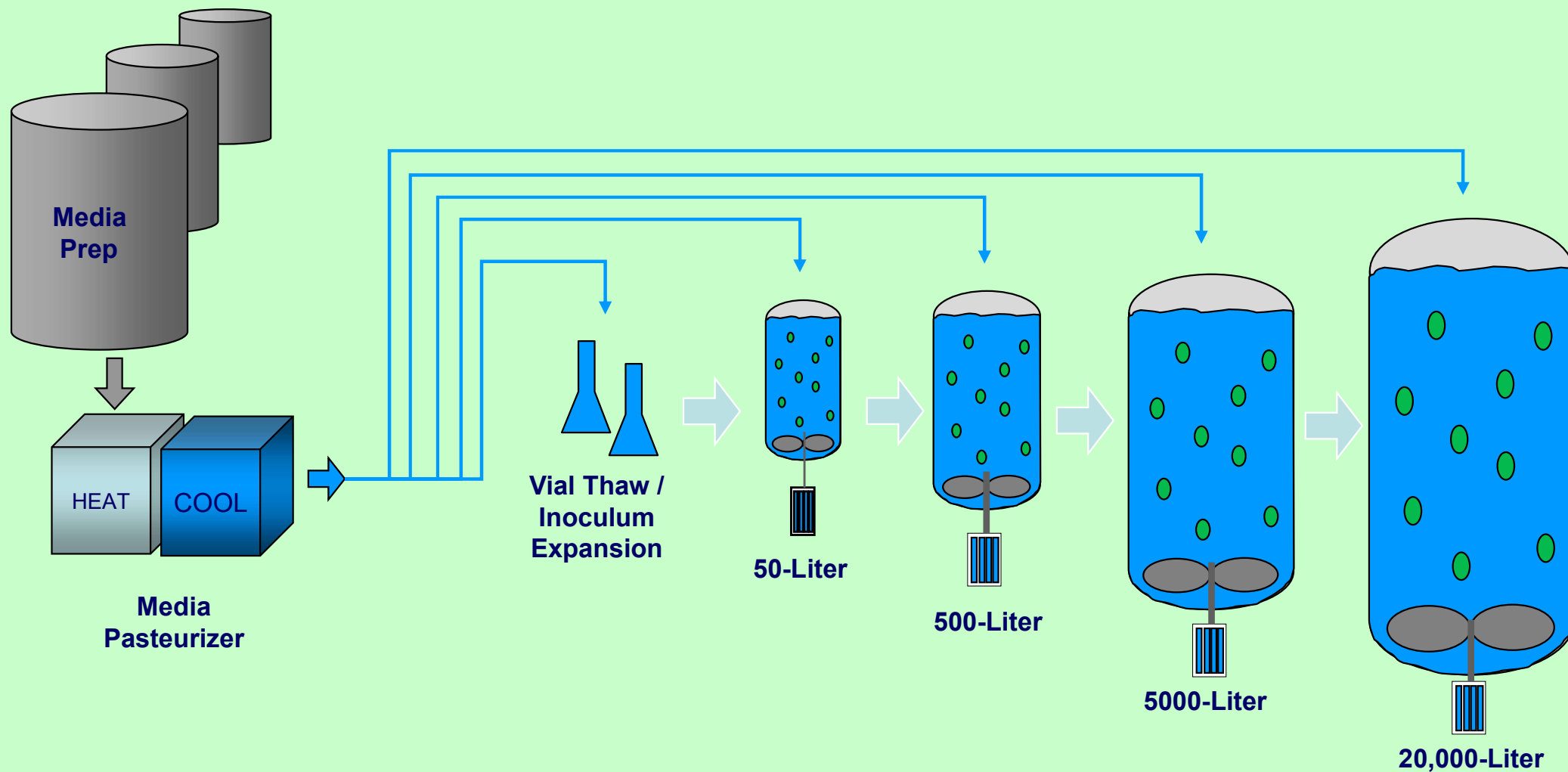
Milyen hibás termékek keletkezhetnek?



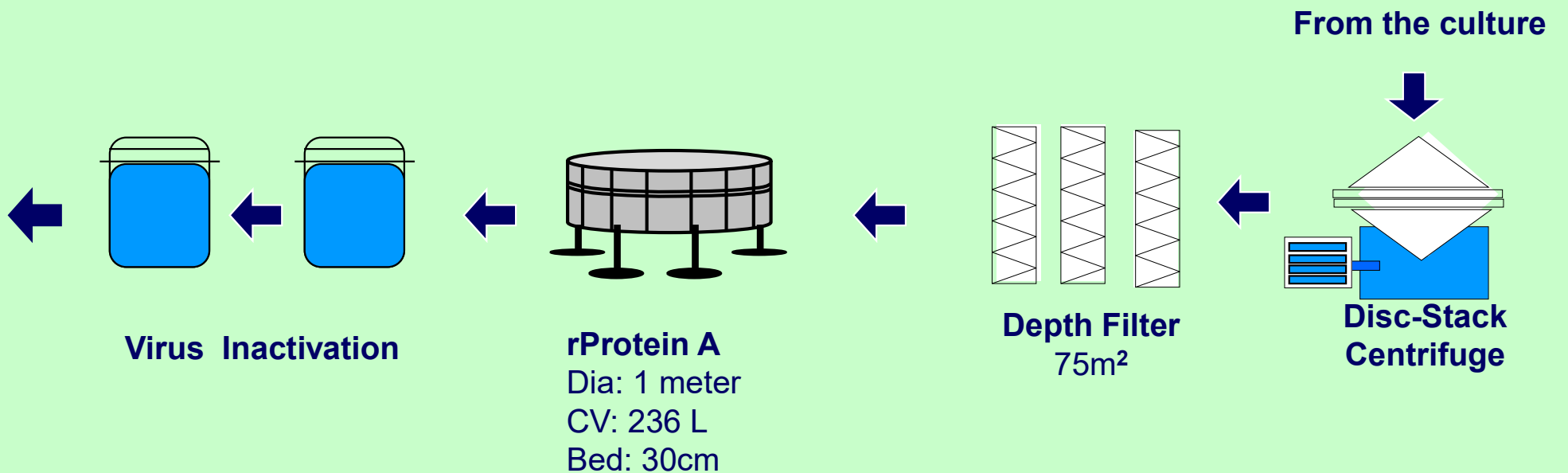
**ProteomeLab™ SDS-Gel Resolving Power
IgG Purity and Heterogeneity Assay by CE**



Mab termelő eljárás emlős sejttel – tenyésztési sor



Mab termelő eljárás emlős sejttel – Downstream 1.



A potenciálisan
előforduló
burkos vírusok
eltávolítása

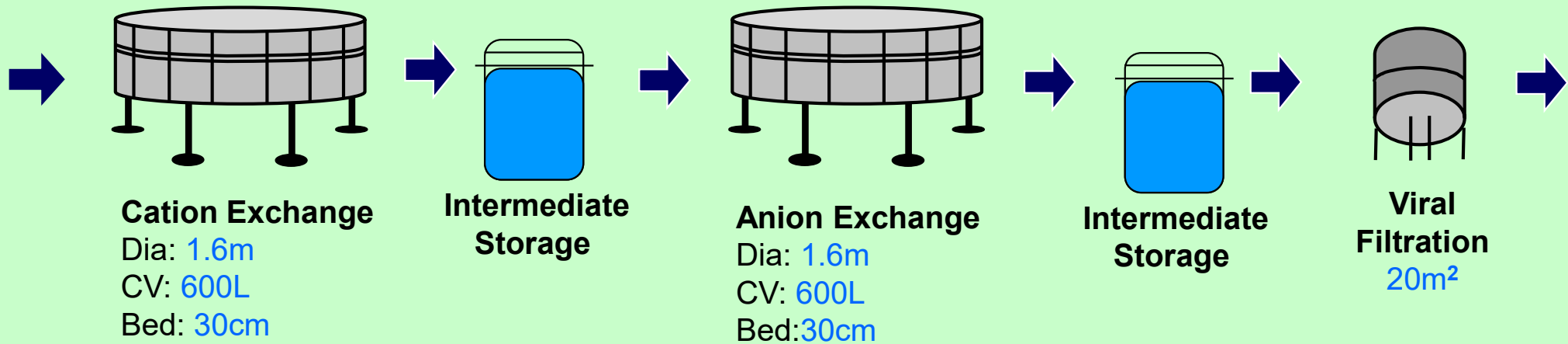
A Mab molekulák
befogása affinitás
elven, a HCP, a
HCDNA és
más szennyezők
eltávolítása,
és a Mab
bekoncentrációja

Sejttörmelék
eltávolítása

Sejtek
eltávolítása



Mab termelő eljárás emlős sejttel – Downstream 2.



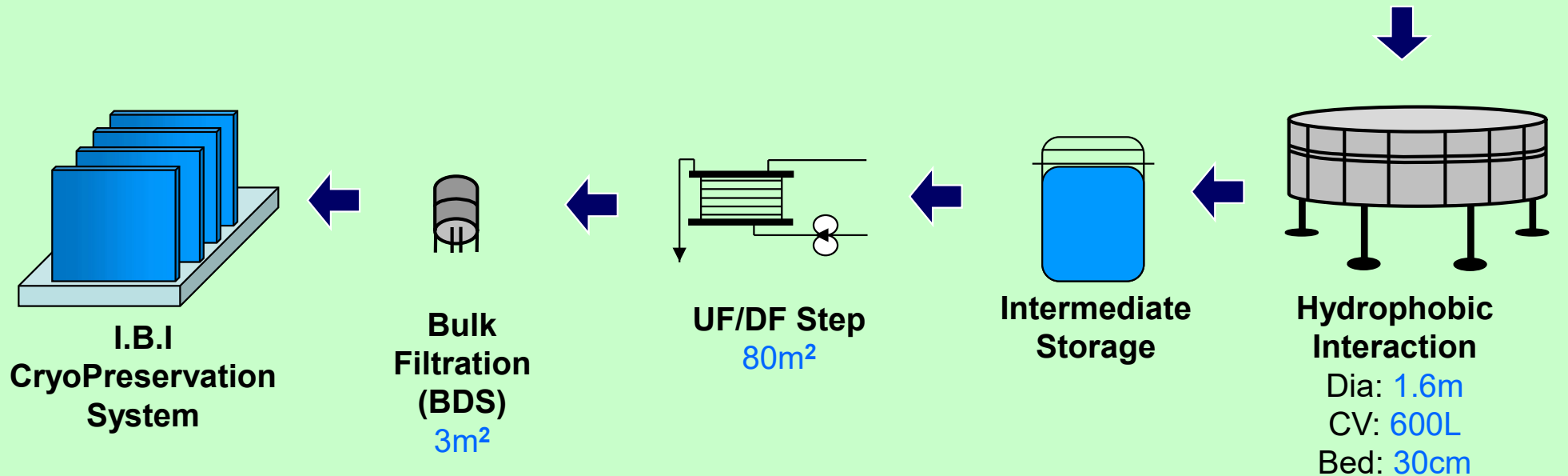
**Savas töltésű
variánsok és
HCP
eltávolítása**

**Aggregátumok,
vírusok, HCP és
HCDNA
eltávolítása**

**További
(gyakorlatilag
az összes)
potenciális
vírusok
eltávolítása**



Mab termelő eljárás emlős sejttel – Downstream 3.



Hosszú idejű tárolás

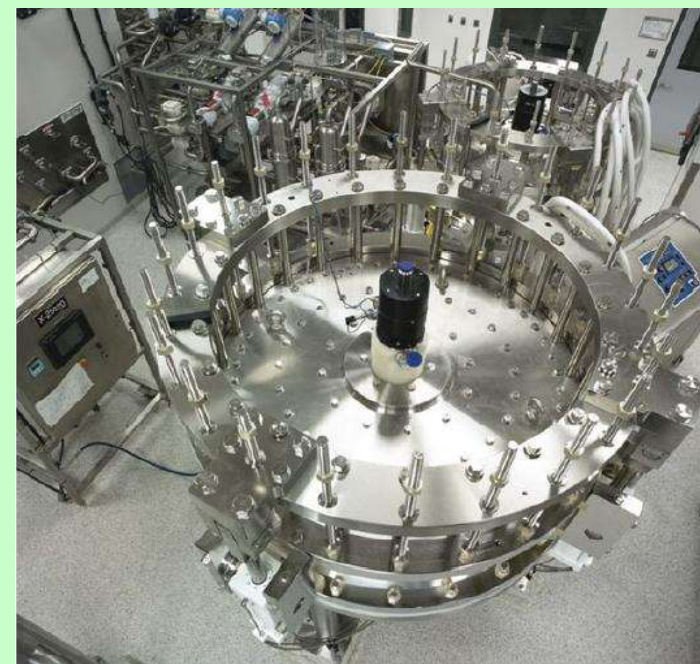
A potenciálisan előforduló mikrobiális szennyezők eltávolítása, 0,2 μm szűrő (low bioburden)

Puffercsere a végleges tároló pufferre és a Mab koncentráció beállítása

További aggregátumok és HCP eltávolítása



Kromatográfiás oszlopok léptéknövelése



Protein A kromatográfia

**Gyanta
élettartam:**

Table 4.12 Protein A Resin Lifetime Study

Reuse Cycle Number	Yield (%)	HCP (ng/mg)	Acidic Variants	Aggregate %
6	97	8,100	9	2.2
20	97	7,900	10	2.4
70	97	6,500	11	2.0
130	94	9,500	11	1.9
170	94	8,800	8	2.5
204	91	8,300	9	2.1
250	90	7,900	9	2.2

Élettartam: legalább 250 ciklus

Kismértékű kitermelés csökkenés, de a minőségi paraméterek nem változtak.



Vírus inaktiválás

- pH beállítása 3,5-re ecetsavval
- 30-50 perc állás szobahőmérsékleten
- pH beállítása 5,0-re
- szűrés

Table 4.13 Low pH Viral Inactivation Step Linkages

Input: Eluate from Protein A Affinity Chromatography	Output to Cation Exchange Chromatography
Protein concentration ≤ 20 g/L	Protein concentration ≤ 20 g/L
pH > 4.0	pH = 5.0 ± 0.2
Aggregate $< 3.1\%$	Aggregate $< 3.1\%$
Acidic variants $\sim 10\%$	Acidic variants $\sim 10\%$
HCP typically 7200 ng/mg	Same as input

Note: Precipitation of HCP often occurs during low pH inactivation and is removed during subsequent depth filtration. However, the clearance is not predictable and for the purposes of this case study HCP clearance will not be claimed in this step. Therefore, the HCP output level of the Protein A chromatography step will be assumed to carry through low pH inactivation to serve as the input for cation exchange chromatography.



Vírus inaktiválás

Table 4.16 Product quality results for worst-case scenario Studies

Process Hold Time (minutes)	Aggregate (%)	Acidic Species (%)
0	1.8 ± 0.2	10.7 ± 0.8
30	1.8 ± 0.3	10.6 ± 1.0
60	2.0 ± 0.2	10.9 ± 0.9
90	2.1 ± 0.2	10.9 ± 1.2
120	2.3 ± 0.3	11.1 ± 1.3
150	2.2 ± 0.3	11.0 ± 1.1
180	2.5 ± 0.2	11.3 ± 1.0
240	2.7 ± 0.5	12.0 ± 0.9

A maximális időt a kationcserés kromatográfia aggregátum eltávolító képessége határozza meg (180 perc, +3 σ felső határ – 3,1%). Ezt a CEX képes 1%-ra csökkenteni.



Vírus inaktiválás

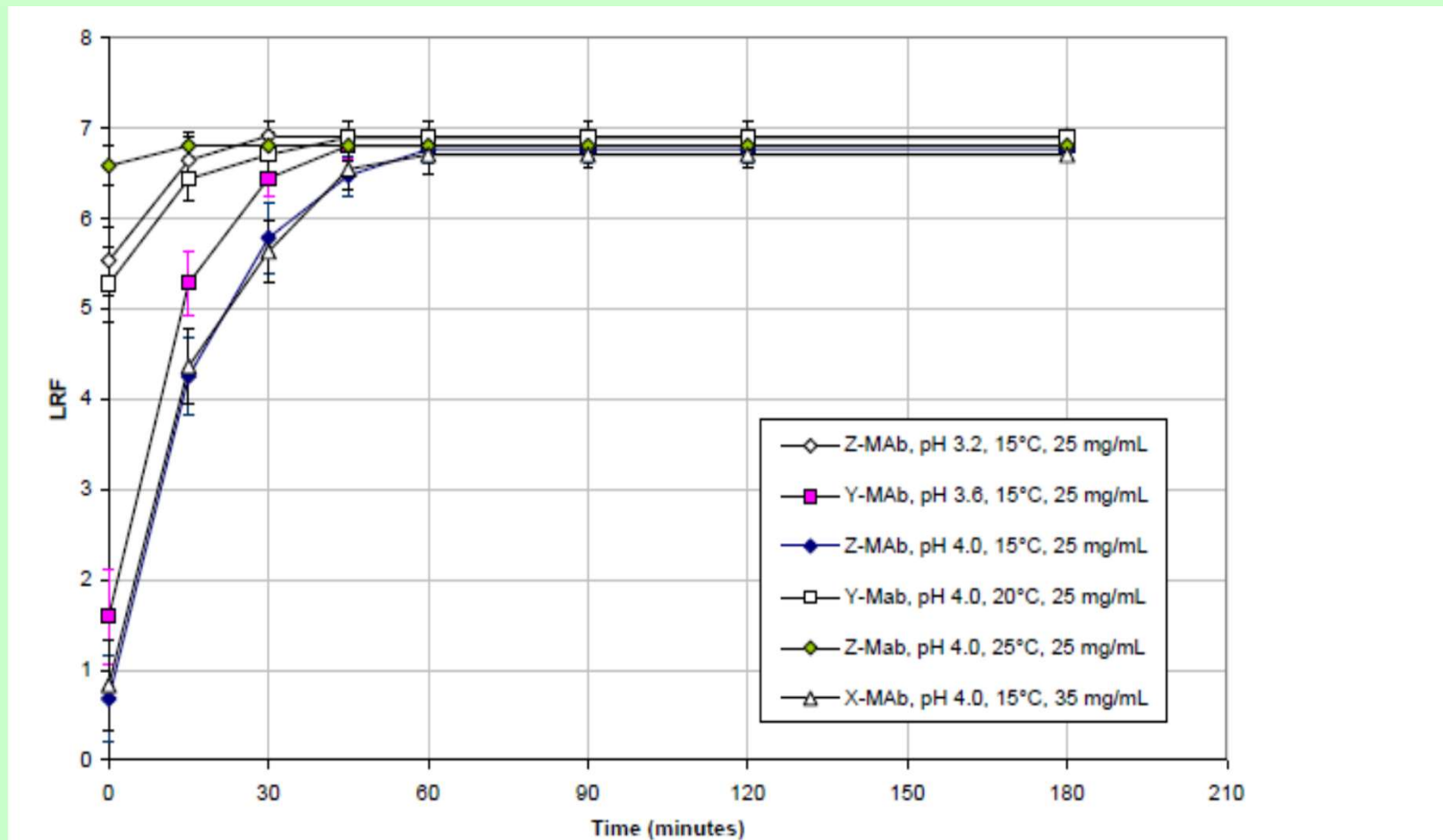


Figure 4.3 Kinetics of XMuLV Inactivation for X-Mab, Y-Mab and Z-Mab.

Note: LRF values exceeding 6.5 in Figure 4.3 represent "greater than" values because residual virus levels for those time points were below the limit of detection.

LRF: logaritmyic reducing factor



Vírus inaktiválás

Következtetés:

- pH 3,2 – 4,0 között, 60 perc alatt a logaritmikus redukciós faktor 6,6-nél nagyobb.
- Alacsonyabb hőmérsékleten és magasabb pH-n az inaktiválódás lassabban játszódott le.
- A fehérjekoncentráció alig befolyásolta az inaktiválódás sebességét.
- A folyamatnak nem volt hatása a termék minőségi jellemzőire.



Kationcserés kromatográfia

Cél: Mab megkötése, elválasztása a DNS-től, HCP-ktől, a leszakadt Protein A-tól és az aggregátumoktól. A glikozilációt és a deamidálódást nem befolyásolja. A víruseltávolításhoz viszont hozzájárul.

5,0 ± 0,2 pH-jú acetát pufferes oldat kerül a 20 ± 3 cm magasságú oszlopra szobahőmérsékleten. Az elúció fokozatosan növekvő koncentrációjú és pH-jú acetát pufferrel történik.

Table 4.19 Cation Exchange Chromatography Step Linkages

Input from Protein A/Low pH Viral Inactivation	Output to Anion Exchange Chromatography
Protein concentration ≤ 20 g/L	Protein concentration ~ 10 g/L
pH = 5.0 ± 0.2	pH = ~ 6.0
Aggregate $< 3.1\%$	Aggregate $< 0.8\%$
Acidic variants $\sim 10\%$	Acidic variants $\sim 10\%$
HCP $\sim 7,200$ ppm but may range from 3,000 to 12,000 ppm	~ 100 ppm but may range up to 170 ppm



Kationcserés kromatográfia

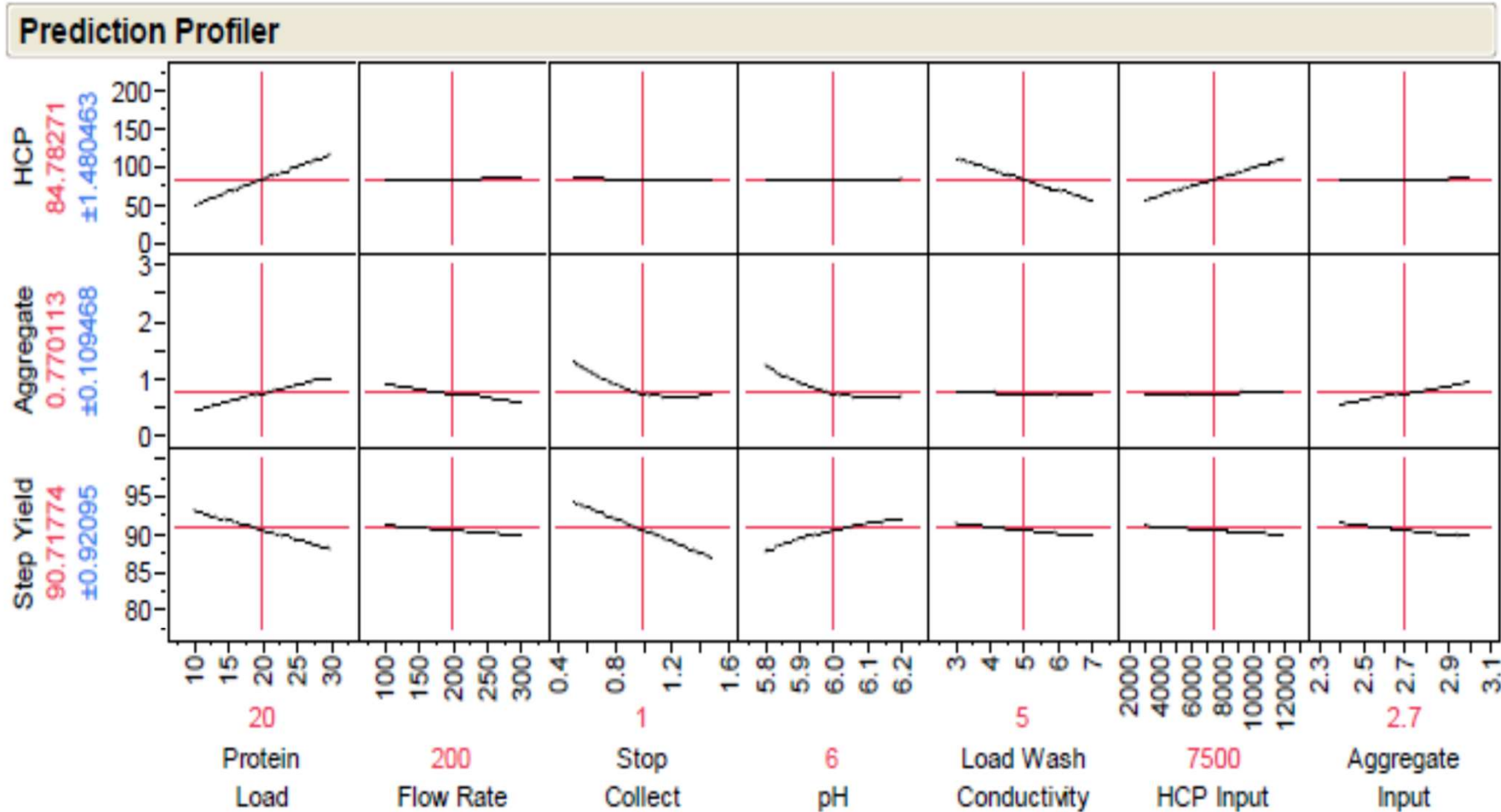


Figure 4.5 Process Characterization (DOE) Results for CEX Step: Prediction Profile based on Statistical Models



Anioncserés kromatográfia

Table 4.24 Anion Exchange Chromatography Step Linkages

Input from Cation Exchange Chromatography	Output to Small Virus Retentive Filtration
Protein concentration ~ 10 g/L	Protein concentration 7 - 8 g/L
pH ~6.0	pH 7.4-7.6
Aggregate < 0.8%	Aggregate < 0.8%
Acidic variants ~10%	Acidic variants ~ 10%
HCP ~ 100 ng/mg	HCP <12 ng/mg

- Átfolyó üzemmódban a szennyezések (HCP, DNA, endotoxins) megkötése
- Hozzájárulhat a vírusmentesítéshez
- Oszlopmagasság: 20 cm
- Kromatografálás előtt pH és vezetőképesség beállítás
- Ekvilibrálás, feltöltés, mosás az ekvilibráló pufferrel



A Mab termék jellemzése

Tests	Acceptance criteria	Methods
Physical tests		
Characters	Clear or slightly opaque, colourless or yellowish solution.	Visual
pH	6.5 ± 0.2	In-house
Osmolality	360 ± 30 mOsm/kg	Ph. Eur.
Identifications		
Chip electrophoresis (non-reducing)	The bands in the electropherogram obtained with the test solution are similar in position to the bands in the electropherogram obtained with the reference solution (±10%).	Chip electrophoresis (non-reducing)/ In-house
RP-HPLC	Retention time of the main peak in the test solution should correspond to that of the reference solution.	RP-HPLC/ In-house
Isoelectric focusing	Isoelectric point of the test solution is similar to that of the reference solution (± 0.1 pl).	Capillary IEF/ In-house
Peptide map	Chromatogram of the test solution prepared from the digested sample should correspond to that obtained with the reference solution prepared from the digested reference material.	RP-HPLC/ In-house



A Mab termék jellemzése

Tests	Acceptance criteria		Methods	
Tests for purity				
Glycan pattern	G0	37-52	corrected area%	CE-LIF/ In-house
	G1	30-38	corrected area%	
	G1'	9-12	corrected area%	
	G2	5-12	corrected area%	
Impurities with molecular masses differing from that of the product Mab	Main peak:		at least 99%	SEC-HPLC/ In-house
	Heavy chain + light chain altogether		at least 97%	Chip electrophoresis (reducing)/ In-house
Mab charge variants and impurities	Main peak:		at least 45%	Ion-exchange HPLC/ In-house
	Sum of (acidic) impurities before the main peak:		n.m.t. 15%	
	Peak pertaining to the first lysine variant:		n.m.t. 40%	
	Sum of other (basic) impurities:		n.m.t. 8%	
Bacterial endotoxins	≤ 3.0 EU/ml		Kinetic turbidimetry (harmonized Ph. Eur./USP)	



A Mab termék jellemzése

Tests	Acceptance criteria	Methods										
Tests for purity												
CHO Host cell protein	Not more than 4 ng/mg protein.	ELISA/ In-house										
CHO Host cell DNA impurity	< 1000 pg / 1000 mg protein	qRT-PCR/ In-house										
Microbiological purity	<table border="0"> <tr> <td>Total aerobic microbial count (TAMC):</td> <td>≤ 10 CFU/ml</td> </tr> <tr> <td>Total combined yeasts/moulds count (TYMC):</td> <td>≤ 10 CFU/ml</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Absence of bile-tolerant Gram-negative bacteria (1 ml).</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 ml).</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 ml).</td> </tr> </table>	Total aerobic microbial count (TAMC):	≤ 10 CFU/ml	Total combined yeasts/moulds count (TYMC):	≤ 10 CFU/ml	Absence of bile-tolerant Gram-negative bacteria (1 ml).		Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 ml).		Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 ml).		Harmonized Ph.Eur./USP
Total aerobic microbial count (TAMC):	≤ 10 CFU/ml											
Total combined yeasts/moulds count (TYMC):	≤ 10 CFU/ml											
Absence of bile-tolerant Gram-negative bacteria (1 ml).												
Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 ml).												
Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 ml).												



A Mab termék jellemzése

Tests	Acceptance criteria	Methods
Contents		
Active substance		
Active substance	10 mg/ml ± 1 mg/ml	RP-HPLC/ In-house
Biological activity	Between 80% and 125% of the reference materia	CDC assay/ In-house
	$K_D: 1.57 \cdot 10^{-7} - 4.72 \cdot 10^{-7} \text{ M}$	CD16a assay/ In-house
Sialic acid	N-Acetylneuraminic acid (NANA):	n.m.t. 0.4 µg/mg protein
	N-Glycolylneuraminic acid (NGNA):	n..m.t. 0.01 µg/mg protein
		RP-HPLC-FL/ In-house



Tartalom folyt.

Monoklonális antitestek

Monoklonális antitestek gyártási technológiája

Biosimiláris gyógyszerek

A véralvadás diagnosztika rekombináns fehérjéi és mérési módszerei



Az egészségügyi költségek növekedése az USA-ban

Egészségügyi biztosítók kifizetéseinek és a tagok befizetéseinek növekedése az infláció és az alkalmazottak fizetésének tükrében az USA-ban.



SOURCE: Kaiser/HRET Survey of Employer-Sponsored Health Benefits, 1999-2017, Bureau of Labor Statistics, Consumer Price Index, U.S. City Average of Annual Inflation (April to April), 1999-2017; Bureau of Labor Statistics, Seasonally Adjusted Data from the Current Employment Statistics Survey, 1999-2017 (April to April).

Kismolekulás és biotechnológiai gyógyszeres kezelések összehasonlítása költségek szempontjából

The costs of treating metastatic colon cancer compared by drug treatment era. Data adapted from Schrag D. NEJM. 2004;351:317–319

Treatment era	Drug regimens	Range of cost for 8 weeks treatment in US Dollars
1 st generation	Mayo clinic regimen of 5-fluorouracil and leucovorin	\$63
2 nd generation	Regimens containing irinotecan or oxaliplatin	\$9,497 to \$11,899
3 rd generation	Regimens containing biologic drugs: bevacizumab or cetuximab	\$21,339 to \$30,790

Delta: > 20 000 USD

Due to the high cost of infliximab, the mean total drug cost was

higher in the **infliximab €19 215**
than the **conventional treatment group €4710;**

Ann Rheum Dis doi:10.1136/annrheumdis-2013-205060

Delta: > 14 000 EUR



Originális biotech blockbusterek

Top 8 blockbuster biologicals 2013

Brand name	Active ingredient	Type	Class	Treatment	Company	2013 global sales (US\$ billion)	Patent expiry EU/US [2]
Humira	adalimumab	Antibody	TNF inhibitor	Arthritis	Abbott/Eisai	10.7	Apr 2018, Dec 2016
Remicade	infliximab	Antibody	TNF inhibitor	Arthritis	Merck/Mitsubishi	8.9	Aug 2014, Sep 2018
Rituxan/MabThera	rituximab	Antibody	Anti-CD20	Arthritis NHL	Roche/Biogen-Idex	8.6	Nov 2013, Dec 2018
Enbrel	etanercept	Antibody	TNF inhibitor	Arthritis	Amgen/Pfizer/Takeda	8.3	Feb 2015, Nov 2028
Lantus	insulin glargine	Protein	Insulin receptor	Diabetes	Sanofi	7.8	2014/201
Avastin	bevacizumab	Antibody	Anti-angiogenesis	Cancer	Roche	7.0	Jan 2022, Jul 2019
Herceptin	trastuzumab	Antibody	Anti-HER2	Breast cancer	Roche	6.8	Jul 2014, Jun 2019
Neulasta	pegfilgrastim	Protein	G-CSF	Neutropenia	Amgen	4.4	Aug 2017, Oct 2015

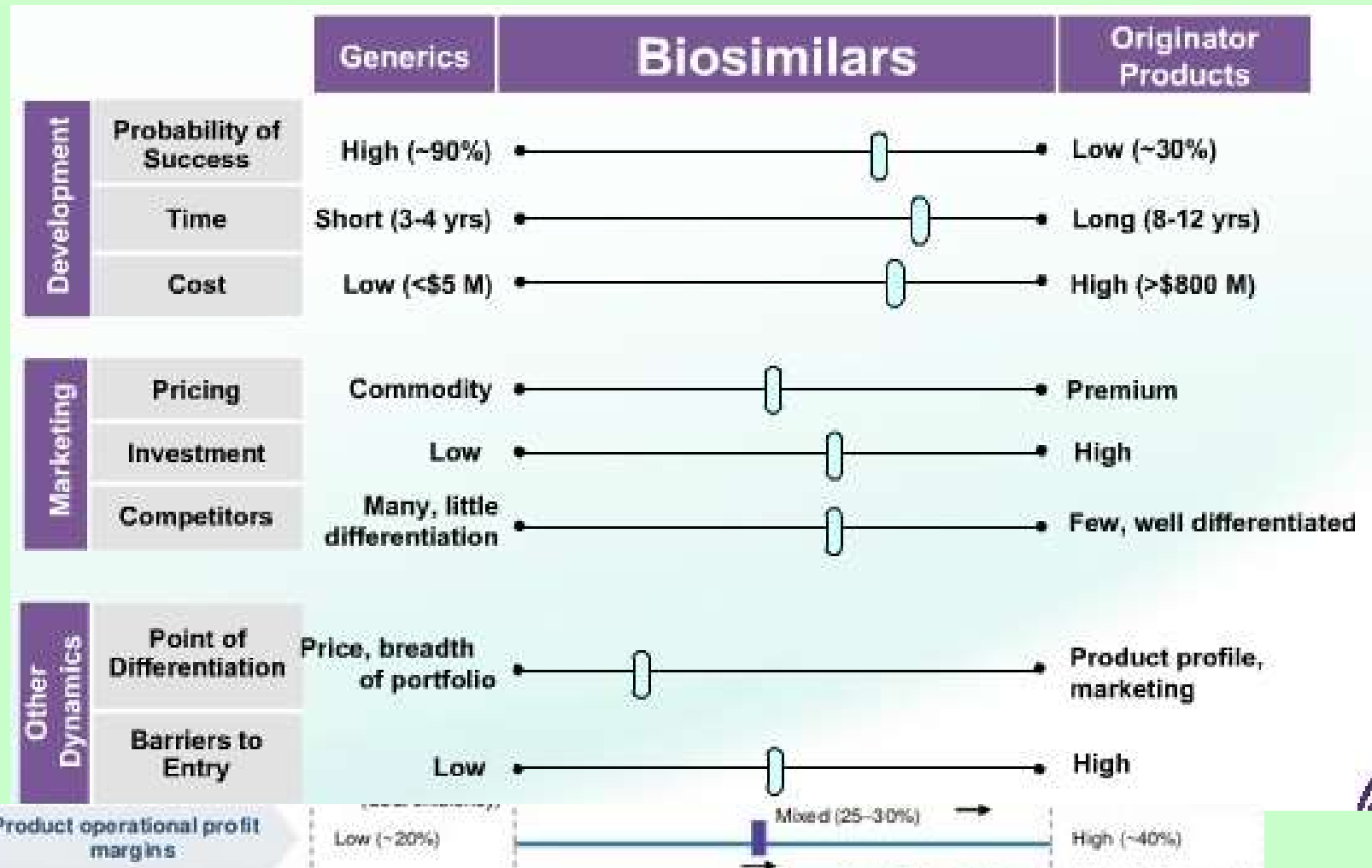
NHL = Non-Hodgkin's lymphoma



Bioszimiláris gyógyszerek – összehasonlítás kis molekulás termékekkel

	Generikus	Bioszimiláris
Termék jellemzői	Kis molekula, Általában stabil, Egyszerű bevitel	Nagy összetett molekula, Stabilitás csak speciális szabályok mellett, Általában injekciós bevitel
Termelés	Kémiai szintézis	Élő organizmusokkal készül, Speciális termelő üzemben, Érzékeny a techn. változtatásokra, Magas COG
Fejlesztés	Kevés klinikai vizsgálat, (gyakran F1, PK/PD vizsgálat)	Jelentős K+F költség, Kiterjedt klin. vizsg., F1, F3
Szabályozás	Rövidített törzskönyvezés Európában és USA-ban	Törzskönyvezési eljárás Európában megvan, Hiányzik az USA-ban
Marketing	Korlátozott részletezés az orvosok felé, Gyógyszerész által eldönthető helyettesíthetőség, Nagy árcsökkenés az originálishoz képest.	A részletek megadása fontos az orvosok felé, Speciális elosztó lánc kell, Általában klinikai alkalmazás, Az ár az originális ár 50-70%-a

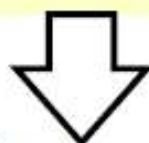
A bioszimilárisok egy külön szektort képeznek a gyógyszeriparon belül



Bioszimiláris gyógyszerek – vita az elnevezésről

A fehérjemolekulák összetettsége és változékonysága miatt, nem valószínű, hogy a legtöbb fehérje esetében a bioszimiláris gyártója bizonyítani tudja, hogy a terméke azonos (identical) egy már engedélyezett termékkel.

Janet Woodcock, FOPP, Congressional Testimony



EU

Biological products that are similar to approved reference medicinal products but different in raw materials or manufacturing process

- ◆ **Similar Biological Medicinal Products**
- ◆ **Biosimilar Product**

US

Protein and peptide products that are intended to be sufficiently similar to a product already approved or licensed

- ◆ **Follow-on Protein Products**
- ◆ **Follow-on Biologics**

Others

Essentially similar to an originator

- ◆ **Biogenerics**
- ◆ **Generic Biologics**
- ◆ **Subsequent Biologics**

Bioszimiláris gyógyszerek:

Piacot befolyásoló körülmények

Piac-segítő körülmények

- Páciensek számának bővülése **POZ.**
- E.ü. kiadások csökkentésének kényszere
- További molekulák szabadalmának lejáratata
- Bővülő tudományos-technikai ismeretek

Piac-fékező körülmények

- Időigényes törzskönyvezési eljárások **NEG.**
lassítják a piacra kerülést
- Elégtelen tudás a termelő eljárásról
befolyásolja a hosszú távú termékminőséget
- Bizonytalan, vonakodó kezelőorvosi
hozzáállás a bioszimilárisokhoz



Bioszimiláris gyógyszerek:

Termelőket befolyásoló körülmények

- A cégek hozzáférnek a modern termelő technológiákhoz.
alacsonyabb COG
stabilabb technológia
alacsonyabb ingatlan beruházási költségek

POZ.

- Az originátorok technológia-változtatási lehetőségei korlátozottak

- A jövőbeni versenykörülmények bizonytalanok,
- A világ egészségügyi hatóságainak és klinikusainak korlátozott tapasztalatai vannak a bioszimiláris termékekről,
- A bioszimilárisok törzskönyvezésének szabályozása az USA-ban nem áll rendelkezésre,
- Nagyon komplikált a gyógyszeripar szabadalmi helyzete,
- A cégeknek korlátozott tudása és tapasztalata van a bioszimilárisok piaci bevezetéséről,

NEG.

Bioszimiláris gyógyszerek:

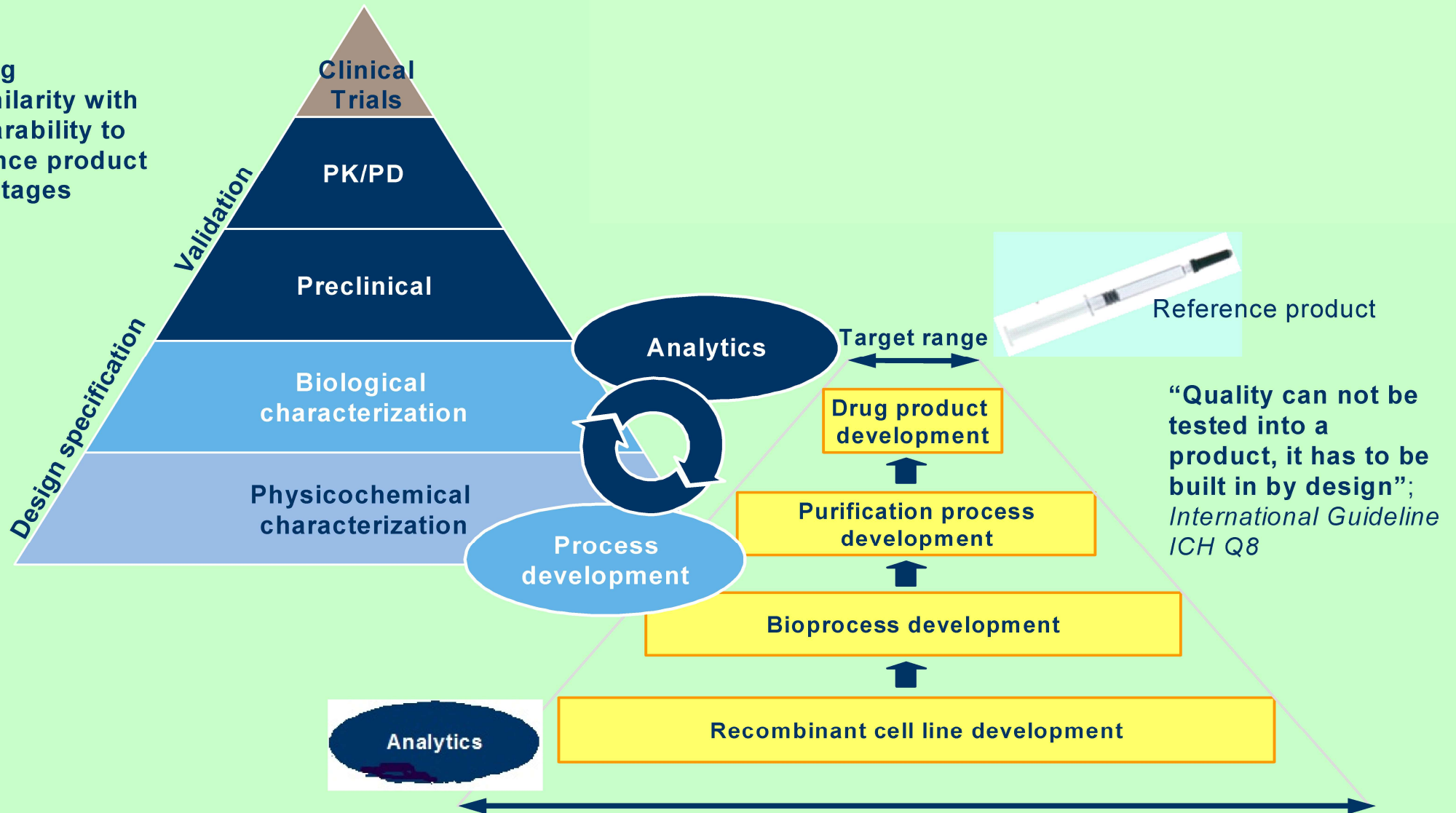
Mit jelentenek ezek egy gyógyszergyárnak?

- A tudományos háttér kritikus a piacra kerülésben,
- A fejlesztési és termelési stratégiáknak flexibiliseknek kell lenniük:
 - A termelő eljárást és az épületet úgy kell megtervezni, hogy könnyen lépték növelhető legyen mindkét irányba
 - Képesség a törzskönyvezés utáni technikai változtatásokra kompetitív előnyt jelent.
(Ehhez QbD, PAT és megalapozott Design Space kell.)
- A bioszimilárisok fejlesztése 7- 8 évig is eltart és 60 - 200 M EUR kerülhet, (szemben a generikusok 2 - 3 év hosszú és 1,6 – 2,4 M EUR költségű fejlesztésével.



A bioszimilárisok fejlesztésének lépései

Proving biosimilarity with comparability to reference product at all stages



A bioszimilárisok fejlesztésének lépései

**Végső koncentrációk
(hatóanyag, adalékanyagok),
állásidők, stabilitásvizsgálatok,
SOP-k, GMP dok.**

Drug product
development

Purification process
development

Bioprocess development

Recombinant cell line development

**Kromatográfiás lépések, sebességek,
ciklusok száma, mosások száma,
erőssége, állásidők, stabilitásvizsgálatok
– DoE. SOP-k, GMP dok.**

**Inokulum sor optimálás, fermentáció fejl.
(pH, ToC, idők, média komp., stb. - DoE),
léptéknövelés legalább preklinikai anyag
gyártáshoz. Sejtleválasztás optimálás,
centrifugálás, szűrések. SOP-k, GMP dok.**

**Analitika,
(fizikokémiai,
bioassay)**

**Gén kiválasztás, szekvencia megállapítás, génbevitel,
elsődleges és másodlagos szelekció, RCB, MCB, WCB
készítése, Genetikai stabilitás tesztelése (80-100 gen.)
Biosafety tesztelése (vírusmentes, prionmentes, stb.)**



A bioszimilitás bizonyítása

A hasonlóság bizonyítása a technológiai fejlesztés során

(CMC – chemical-manufacturing-control)

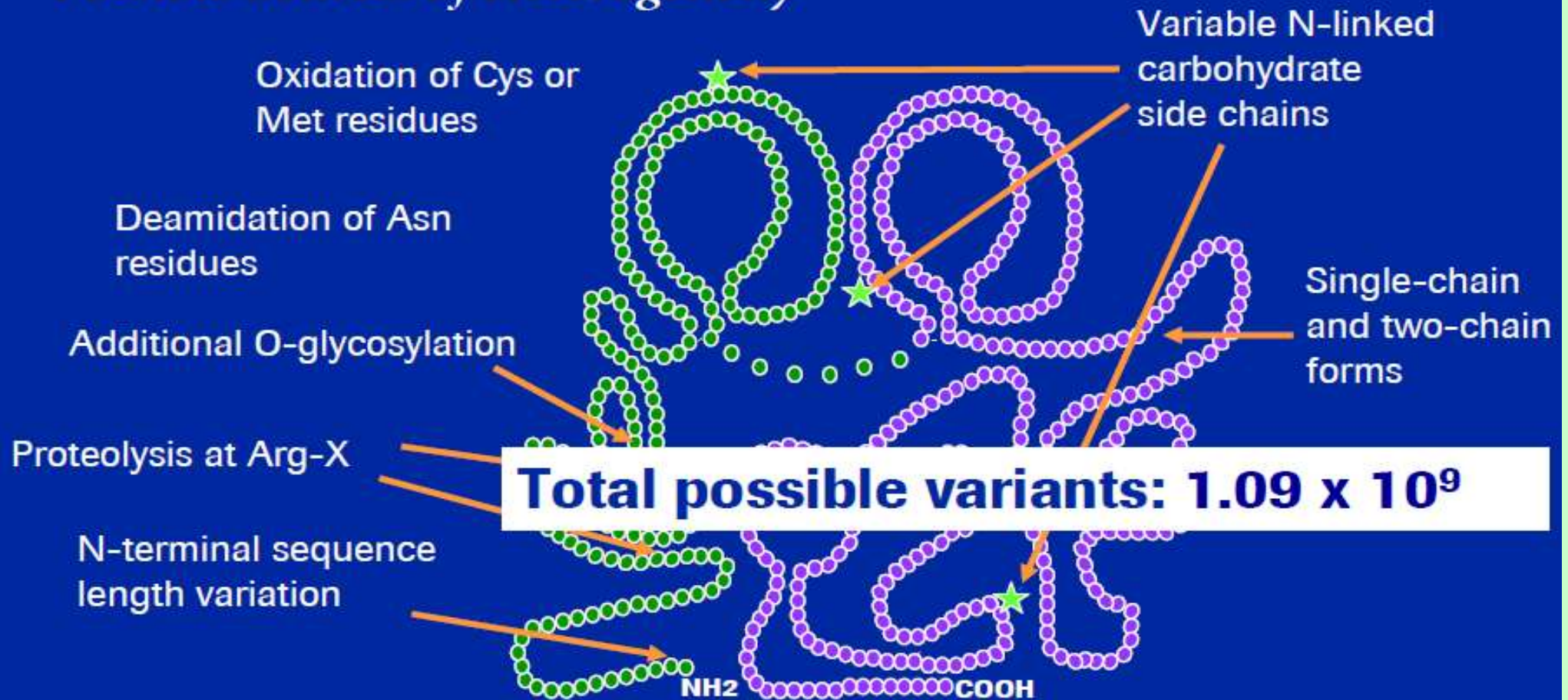
- A termelés során jelentkező szennyezések és bomlástermékek meghatározása (process related impurities & degradation products)
- A referencia termék sarzsonkénti változásainak ismerete (batch-to-batch variability)
- A molekulaszervezet és a minőséget befolyásoló tulajdonságok összehasonlítása (Critical Quality Attributes)
- Az esetleges kismértékű eltérések hatásának ismerete a hatásosságra és a biztonságra (efficacy & safety)
- Annak bizonyítása, hogy szisztematikus fejlesztés történt a hasonlósági követelmények teljesítésére (pl. ferm. idők és tápoldatkomponensek a megfelelő cukormintázat érdekében.)



Lehetséges variációk egy molekulán belül

Microheterogeneity: the t-PA Example

Possible Sources of Heterogeneity



Tissue Plasminogen Activator (t-PA): A 527-amino acid protein with 17 S-S bridges and 3 glycosylation sites

Az originátorok támadása



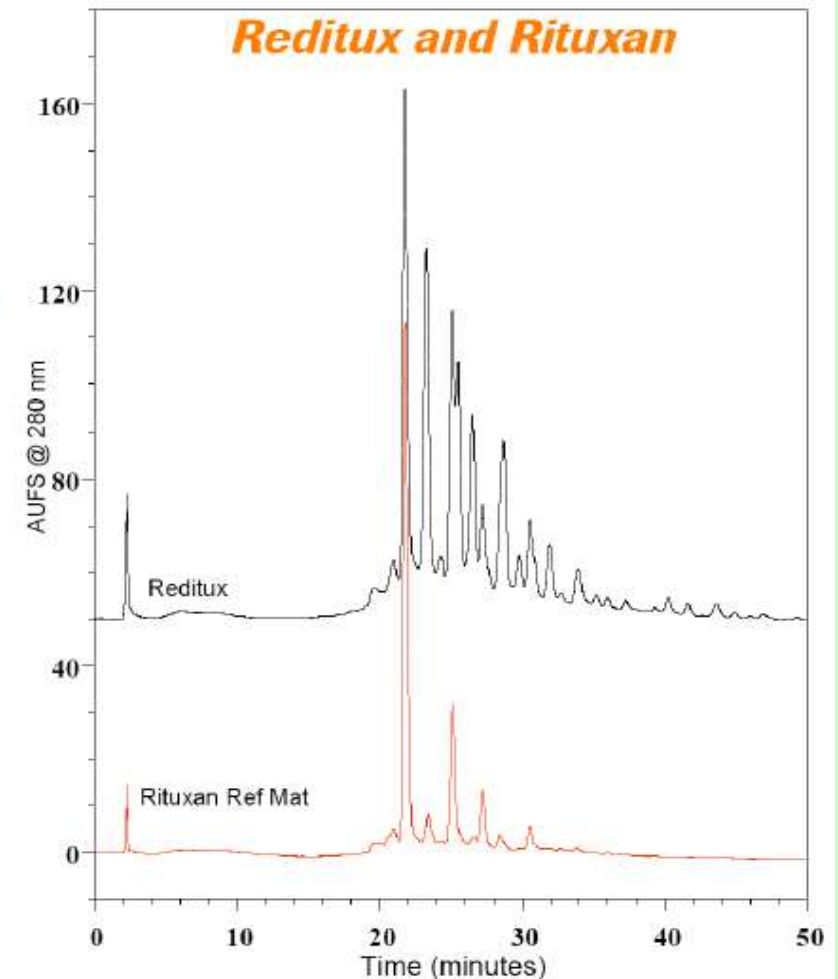
Different process = different product

Exhibited differences when compared to branded product

- Same amino acid sequence
- Host cell protein content much higher
- Content of aggregates not comparable
- Glycosylation not comparable
- Effector function not comparable
- Charge distribution not comparable
- Clinical (PK/PD) published data - 17 patients



Reditux and Rituxan



Comparison by Cation Exchange Chromatography

Different manufacturing means:

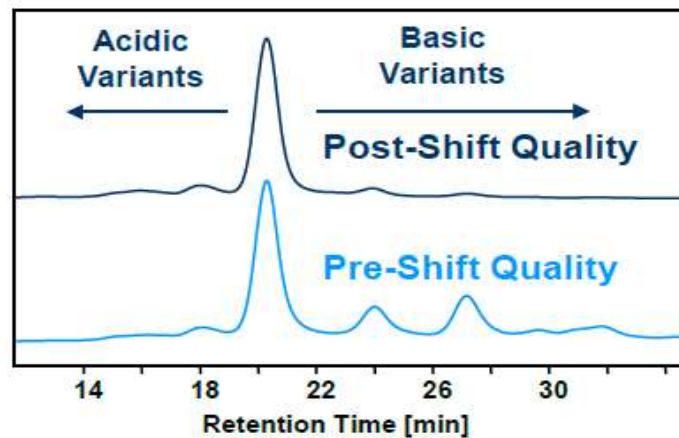
- **Different drug**
- **Different safety/efficacy profile?**



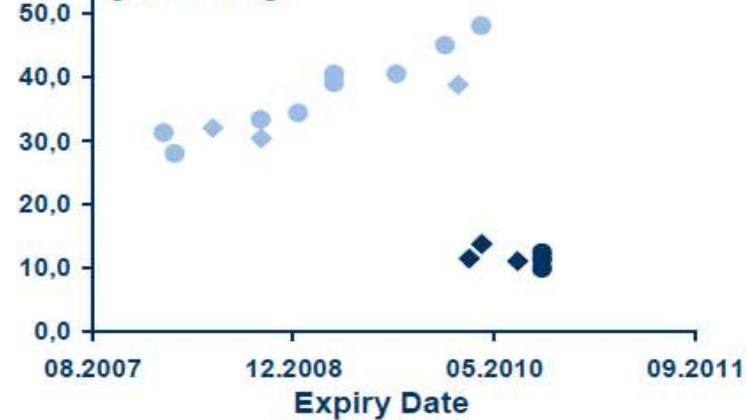
A bioszimiláris gyártók ellentámadása, az originátorok változtatásainak felhasználásával

Analytical Data on Rituxan® (Rituximab): *Quality Shift, selected parameters*

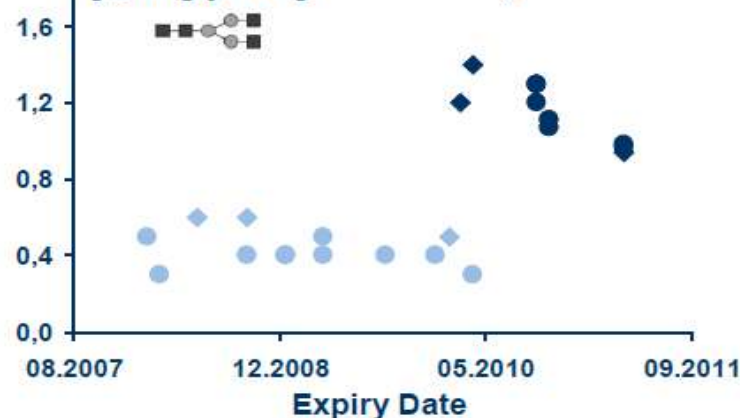
Cation Exchange Chromatogram



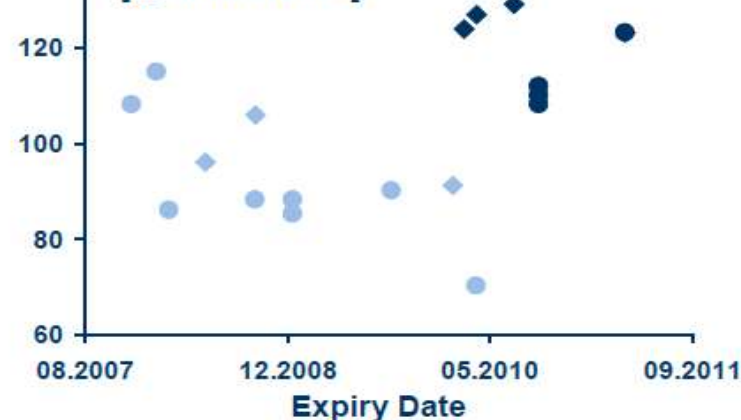
Basic Variants [% of total]



Unfucosylated G0 [% of glycans]



ADCC Potency [% of reference]



Összefoglaló megállapítások 1.

- Szerkezeti bonyolultság miatt nincs generikus lehetőség,
- A fejlesztés nehéz és fejlett tudományos és technológiai felkészültséget kíván
- A fejlesztés idő és forrásigényesebb, mint a generikusoknál,
- Mivel az azonosság nem megállapítható, hasonlóságot kell definiálni, a törzskönyvező hatóság felé,
- Ennek szabályozásában az EU vezető szereppel bír, de továbbra is elég bizonytalan a későbbi megítélése a jelölt molekulának,
- Azok a cégek lesznek sikeresek, akik ezeket a bizonytalanságokat jól tudják kezelni tudományosan, technikailag, és kereskedelmileg,
- Fiziko-kémiai hasonlóság, biztonságossági hasonlóság, és terápiás ekvivalencia kell a referencia termékhez viszonyítva,
- Fázis I. és III. vizsgálatok kellene,



Összefoglaló megállapítások 2.

- **Időtáv: NBE és bioszimiláris között (4-6 év),**
- **Költsége: NBE és bioszimiláris között (200M-800M EUR),**
- **Árkülönbség a piacon: NBE és generikus között (10%-50%),**
- **Nem szabad hatékonyabbnak lennie => ha hatékonyabb akkor „stand alone” fejlesztés szerint kell eljárni, és eltérő piaci magatartás is szükséges**
- **Minél több, az originátortól származó *in vivo* kimerítő jellemzése elengedhetetlen a „bioszimilitás” bizonyításához.**
- **A piacra lépés után is kell folytatni a technológia fejlesztést, a minél jobb és olcsóbb előállítás érdekében, de figyelembe kell venni a változtatásokkal járó technikai és hatósági kockázatokat,**
- **A klinikai vizsgálatok komplikáltak és változatos eredményt szolgáltathatnak**
- **A piacra lépés után alapos piackövetésre van szükség**



Tartalom folyt.

Monoklonális antitestek

Monoklonális antitestek gyártási technológiája

Biosimiláris gyógyszerek

A véralvadás diagnosztika rekombináns fehérjéi és mérési módszerei

2. Rész



A véralvadás (hemosztázis, más néven koaguláció) definíciója

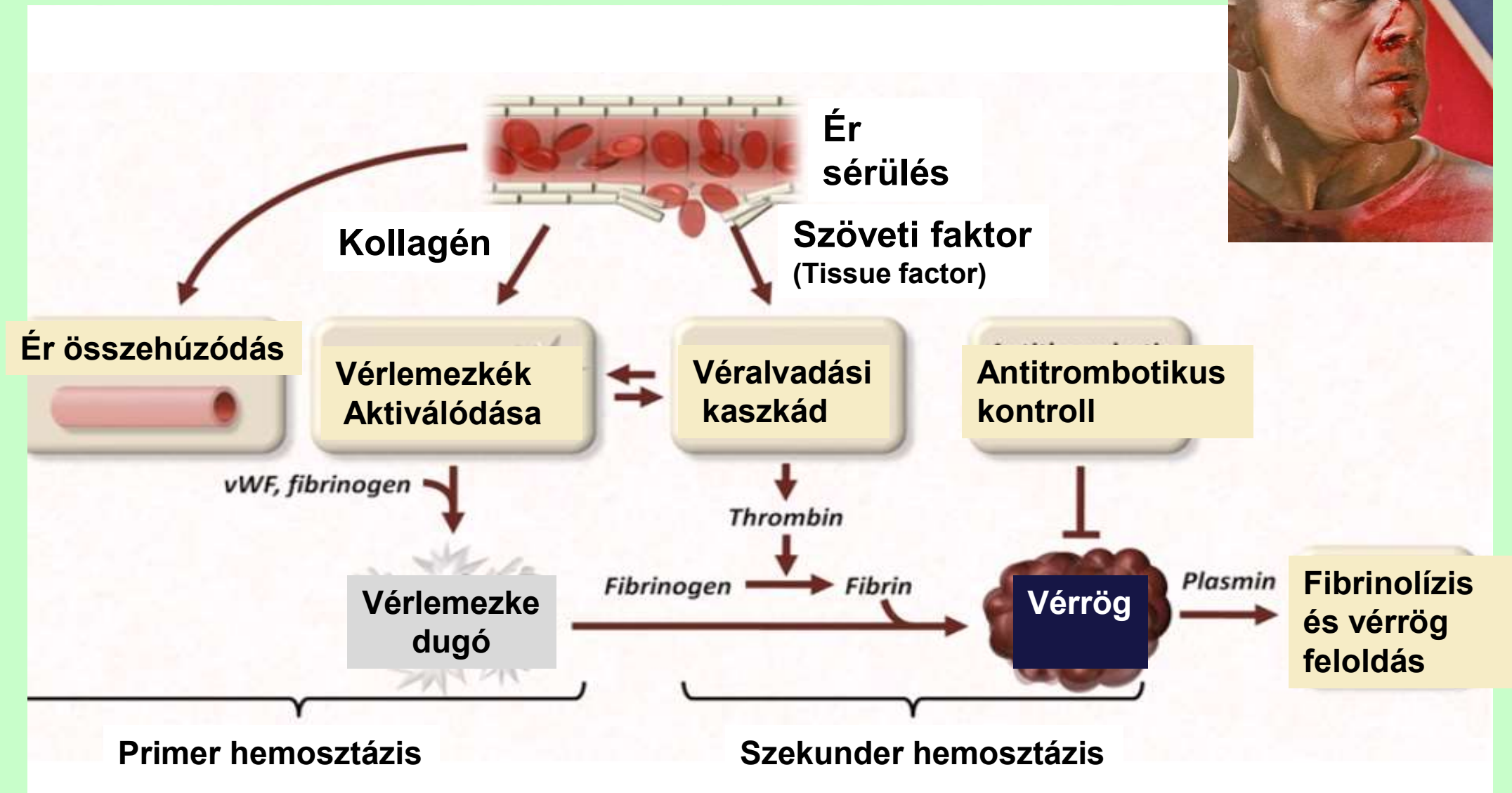
- A vérzés megállítása az érfal kijavításával.
- Egyensúly fenntartása a koaguláció és a fibrinolízis között.

Az egyensúly hibája:

- **Vérzékenység (hypokoaguláció):** folyamatos vérzés (örökölt vagy szerzett)
- **Trombózis (hyperkoaguláció),** a véralvadás szükségszerűtlen aktiválódása és fenntartása.

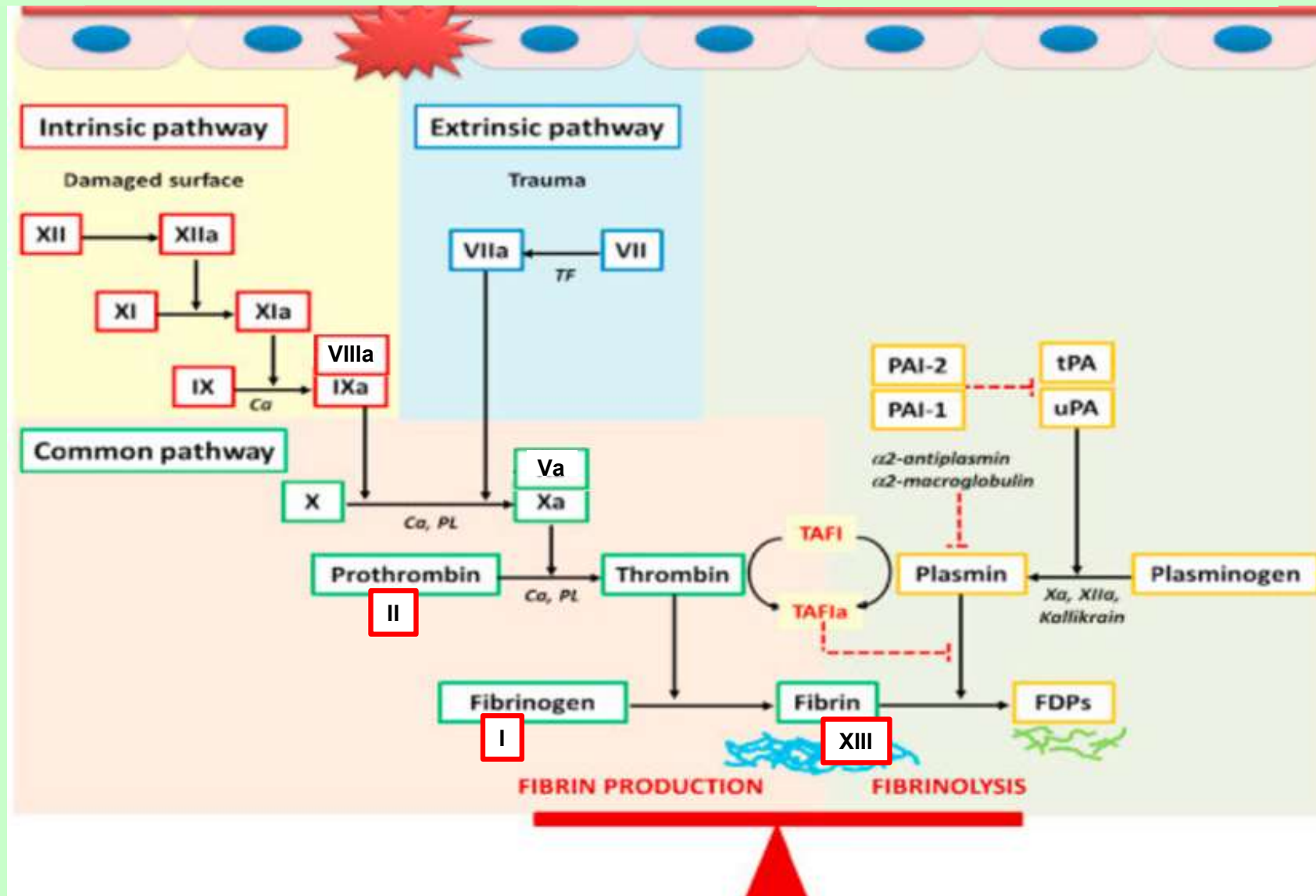


A véralvadás fő folyamatai és elemei



Koagulációs kaszkád

Fibrinolízis kaszkád

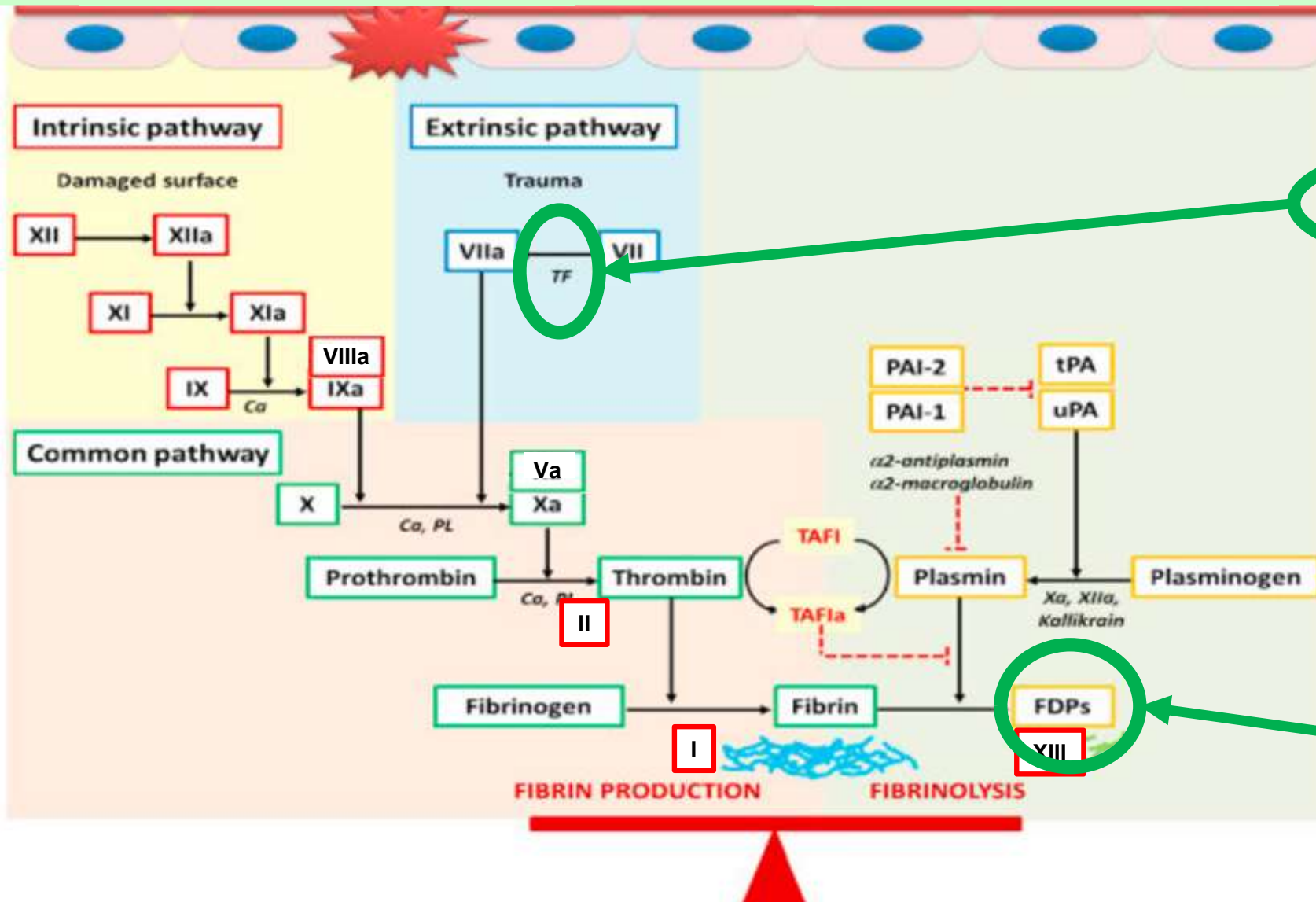


TF – tissue factor
PL – phospholipid

tPA – tissue plasminogen activator
uPA – urokinase plasminogen activator
PAI – plasminogen activator inhibitors
TAFI – trombin activatable fibrinolysis inhibitor
FDP - fibrin degradation product

Koagulációs kaszkád

Fibrinolízis kaszkád



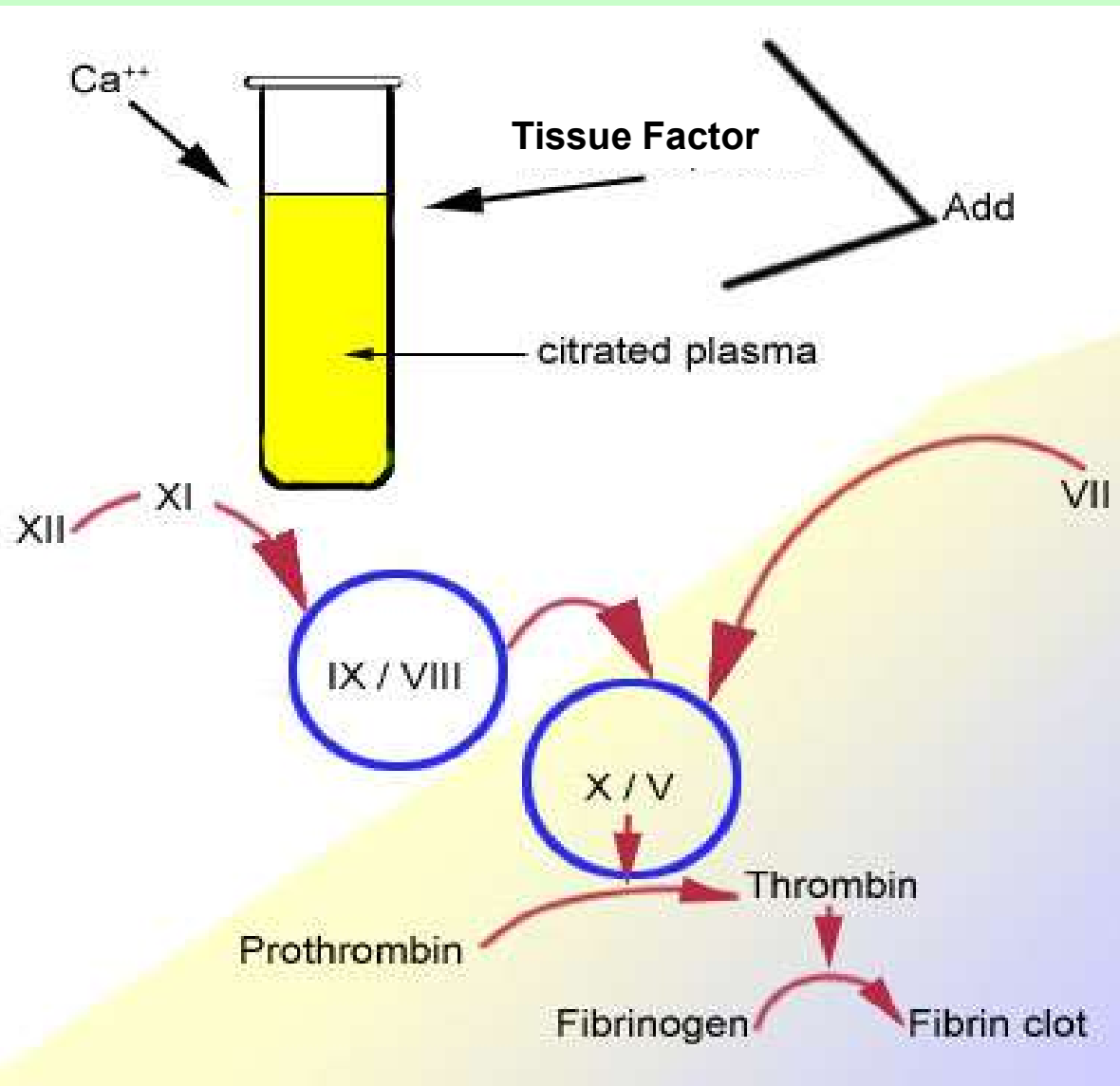
Rekombináns TF

Anti Ddimer antitest

TF – tissue factor
PL – phospholipid

tPA – tissue plasminogen activator
uPA – urokinase plasminogen activator
PAI – plasminogen activator inhibitors
TAFI – trombin activatable fibrinolysis inhibitor
FDP - fibrin degradation product

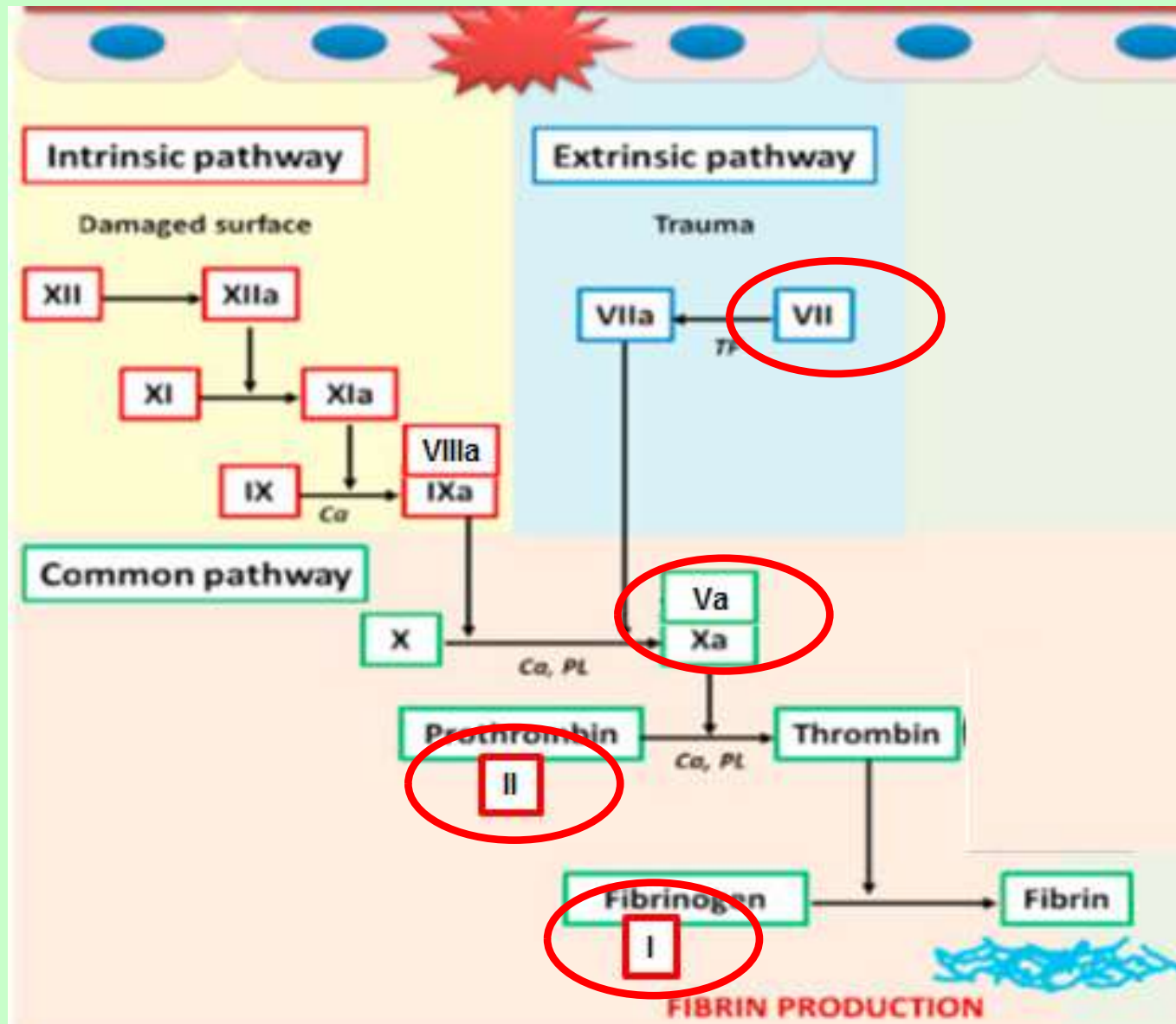
„Protrombin idő” teszt, az extrinsic út tesztje



- A minta: vénából vett vér.
- Alvadását Ca^{2+} kötővel (citrát vagy oxalát képzés) akadályozzák meg.
- Alakos elemeket centrifugálással eltávolítják.
- Méréskor Szöveti faktort (Tissue Factor) adnak hozzá, amiket nyúl agyból nyernek, vagy rekombinánsan állítanak elő.
- Az összes többi faktor a plazma mintából jön és a teszt alanyai.
- Végül feleslegben Ca^{2+} iont adnak, ami az alvadási idő számlálását indítja.



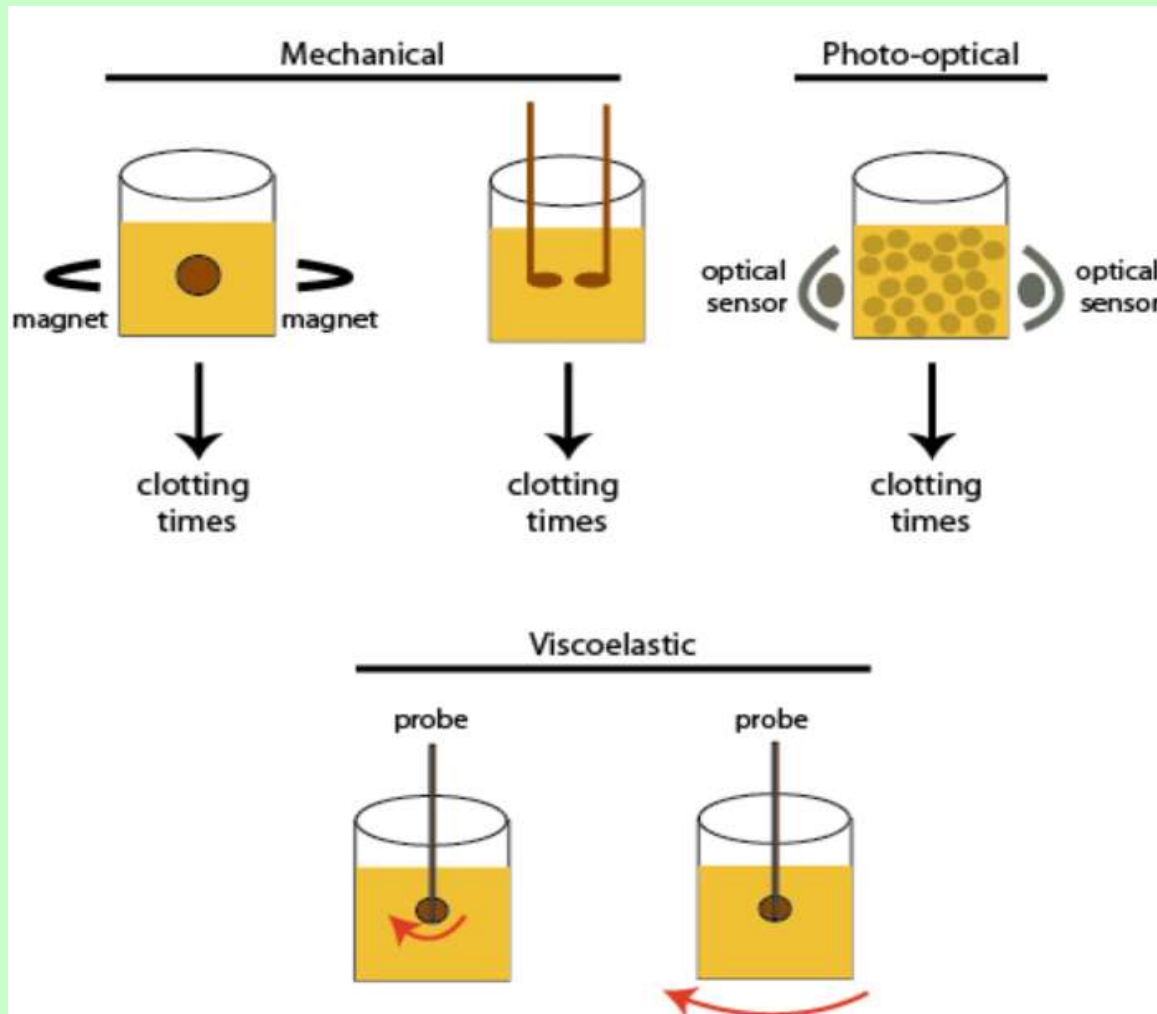
„Protrombin idő” teszt, az extrinsic út tesztje



- A PT méri az I, II, V, VII, X faktorokat.
- Varfarin dózisok ellenőrzésére,
- Máj károsodás ellenőrzésére,
- K vitamin státusz ellenőrzésére használható

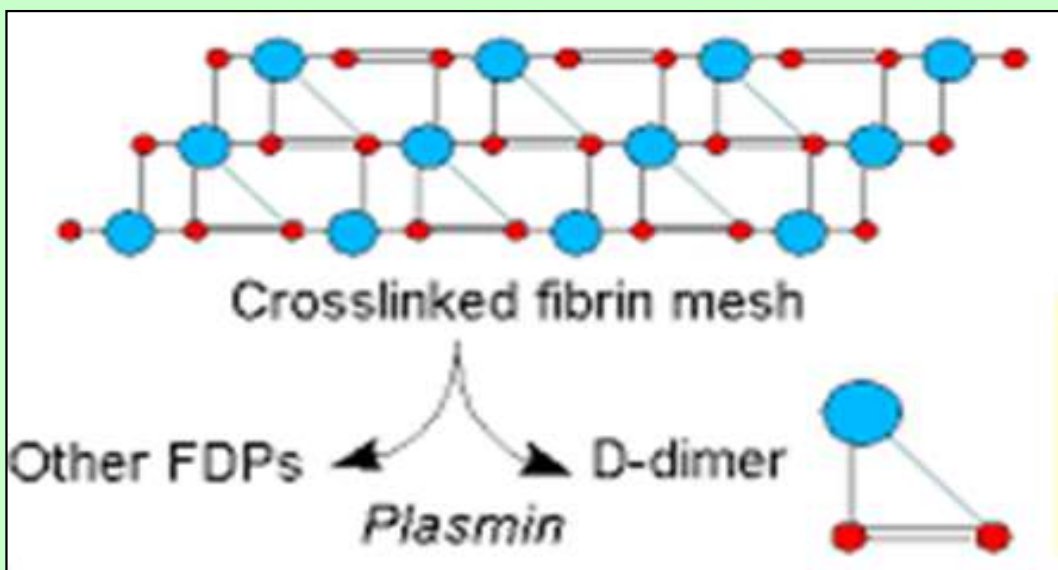


„Protrombin idő” teszt, az extrinsic út tesztje



A fibrin bontási fő termék, a D-dimer meghatározása

- A fibrin degradációs termékek közvetlen mérése.
- Két D domént tartalmaz egymás mellett.
- A D-dimer jelenléte érrendszeren belüli koagulációra utal.
- Normál tartomány < 0,5 mg/dl.

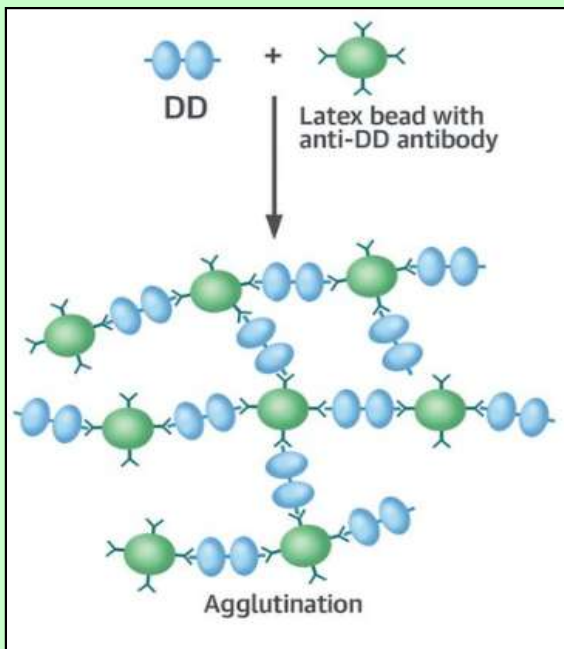


A magas D-dimer koncentráció oka:

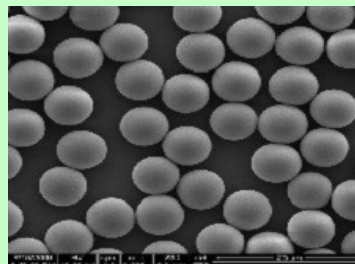
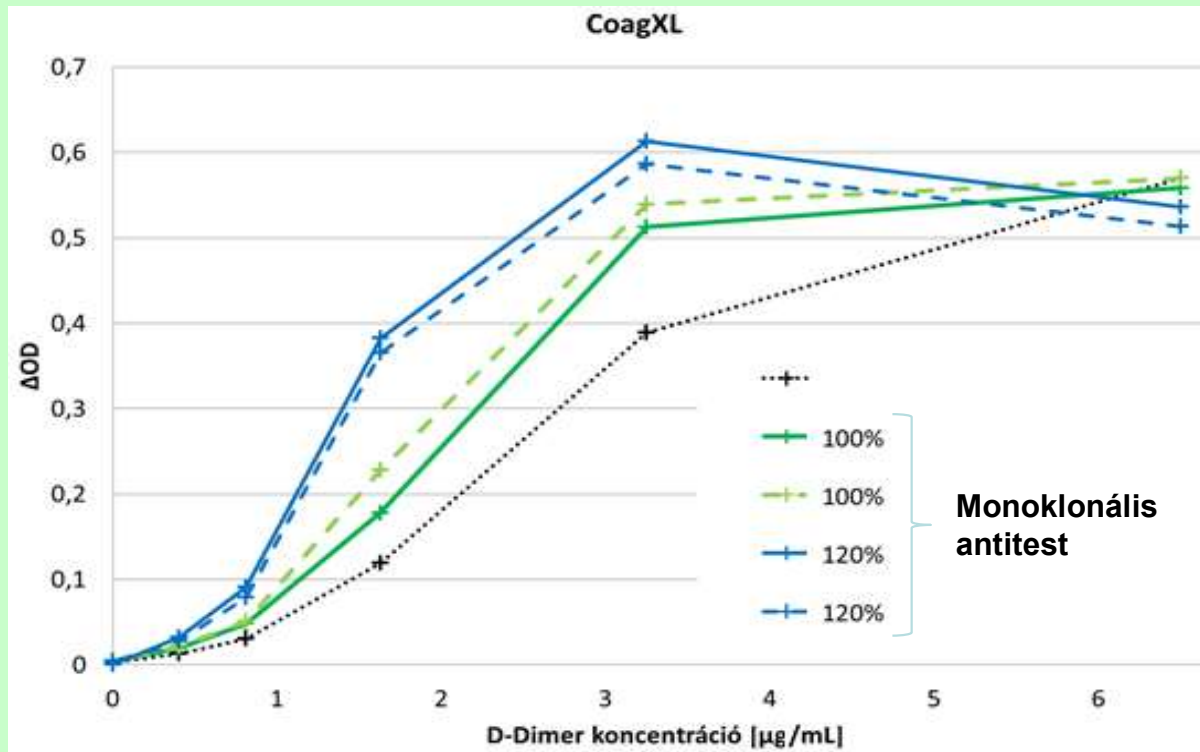
- Mélyvénás trombózis
- Artériás rög jelenléte
- Súlyos szepszis
- Rák
- Nem régi sebészeti beavatkozás vagy trauma
- Májbetegség
- Terhesség
- DIC (disszeminált intravaszkuláris koaguláció)



D-dimer meghatározás



Ha van D-dimer, kialakul az agglutinációs 3D háló, és megváltozik az oldat optikai sűrűsége.





Köszönöm a figyelmet !

