

## Rekombináns termékek és technológiák

Az orvosi célú rekombináns fehérjék funkció szerint lehetnek:

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

---

---

---

---

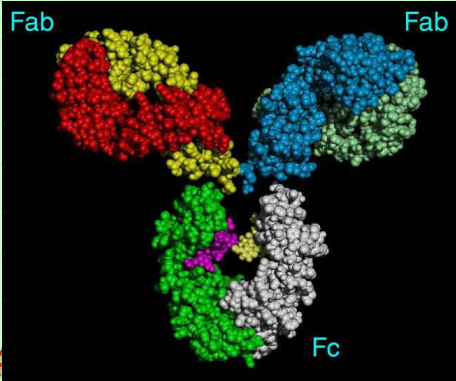
---


---

---

---

## Antitestek





---

---

---

---

---

---

---

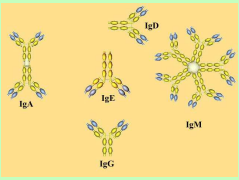
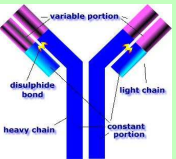
---


## 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

---

---

---

---

---

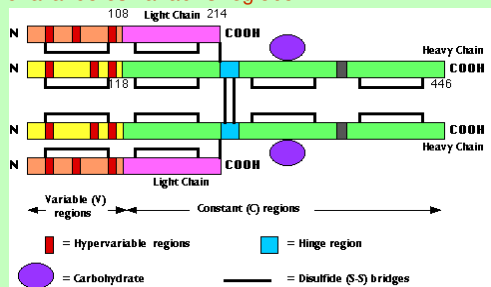
---

---

---

### Az antitestek fehérjeszerkezete

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

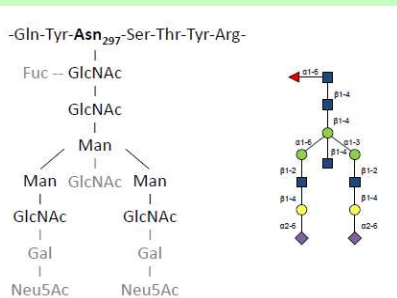
---

---

---

### Az antitestek glikozilálása

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

---

---

---

---

---

---

---

---

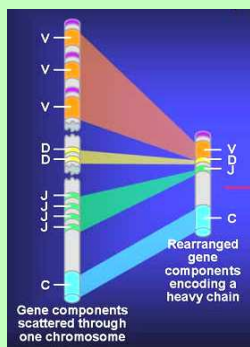
---

---

---

---

### Antitestek



A szervezet ~10<sup>7</sup>-10<sup>9</sup> féle különböző antitest előállítására képes. Ennek alapja, hogy antitest doménjei sok változatban tárolódnak a génállományban, és a kiírás során ezek random módon kombinálódhatnak.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Antitestek

A könnyű lánc kétféle izoformában létezik, ezek mindkét doménje is több változatban létezik, ami további kombinációkat tesz lehetővé:

	Domének	Génváltozatok	Lehetséges kombinációk	Lehetséges kombinációk	Lehetséges kombinációk
Könnyű lánc	V <sub>κ</sub>	40	200 féle κ lánc	324 féle könnyű lánc	2.5 x 10 <sup>6</sup> féle antitest
	J <sub>κ</sub>	5			
	V <sub>λ</sub>	31	124 féle λ lánc		
	J <sub>λ</sub>	4			
Nehéz lánc	V <sub>H</sub>	51	7650 féle nehéz lánc		
	D <sub>H</sub>	25			
	J <sub>H</sub>	6			

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék
7

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Antitestek

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

8

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

9

---

---

---

---

---

---

---

---

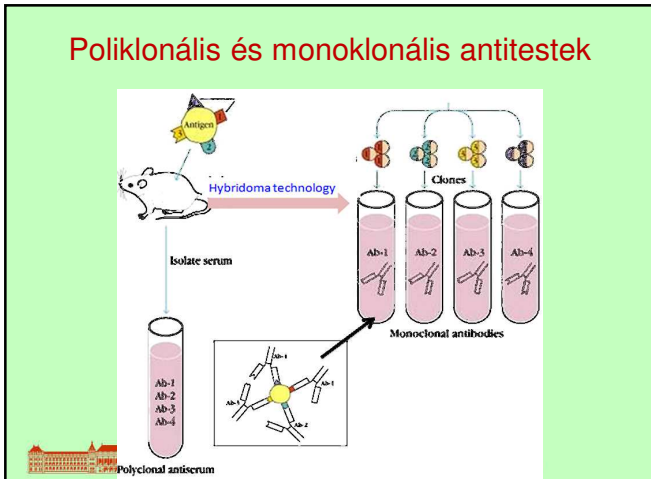
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

### 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




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

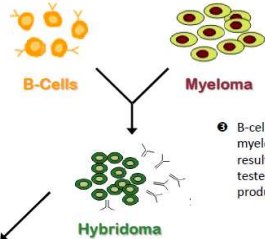
---

---

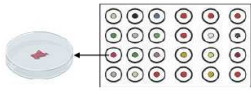
### Hibridóma technológia



- 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.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### 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. →




---

---

---

---

---

---

---

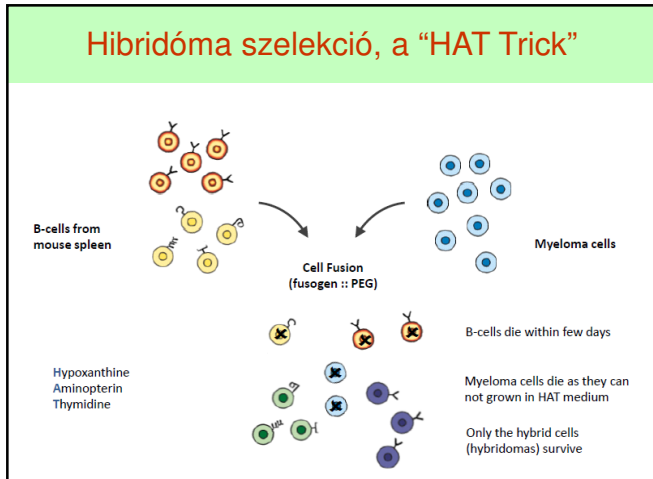
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

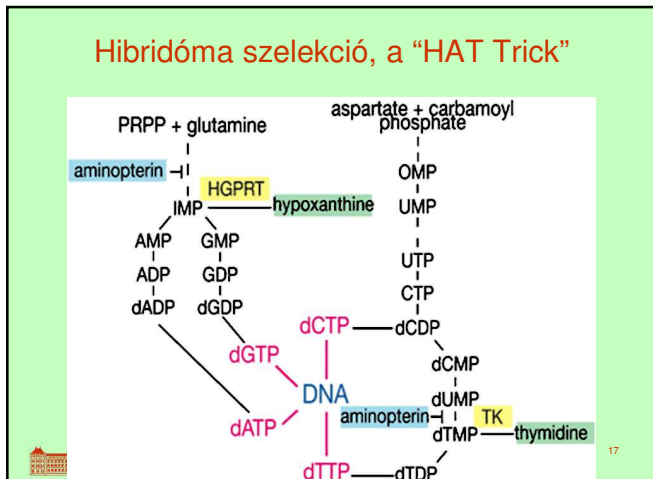
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

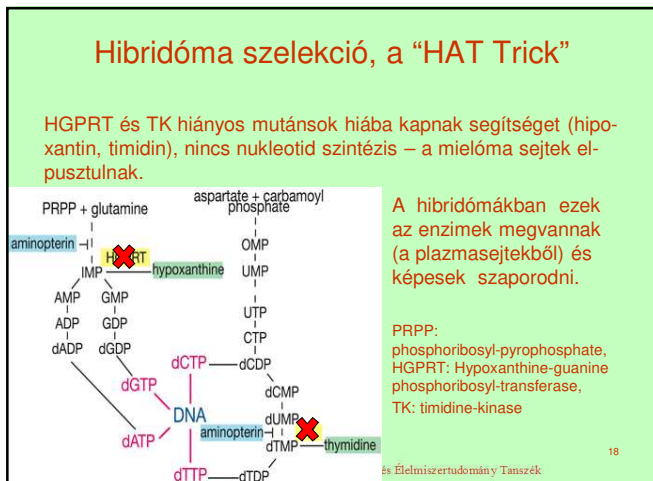
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---


---

---

### 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)



19 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---


### 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



20 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### 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 rohámot, rosszabb esetben anafilaxiás sokkot okozott.

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

**HIBRIDÓMA → génmanipuláció → SEJTENYÉSZET**



21 BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

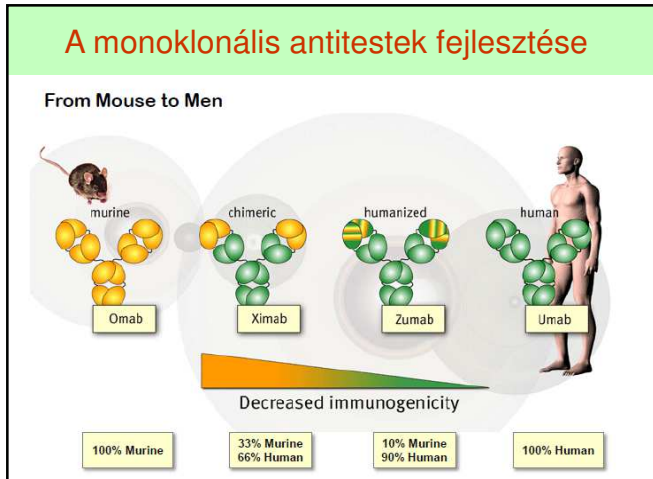
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

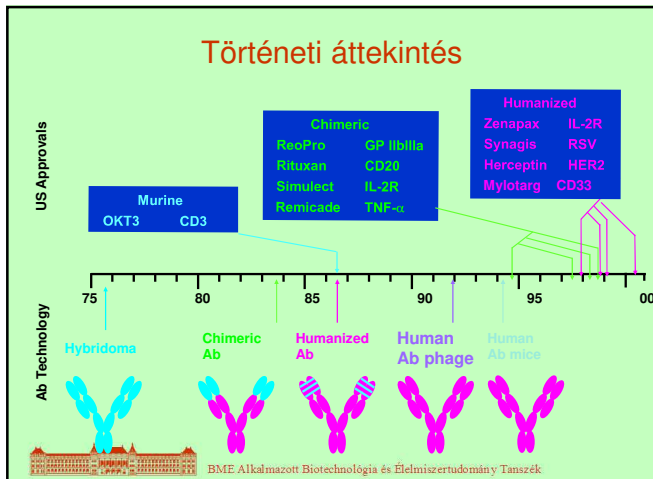
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### 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

24

---

---

---

---

---

---

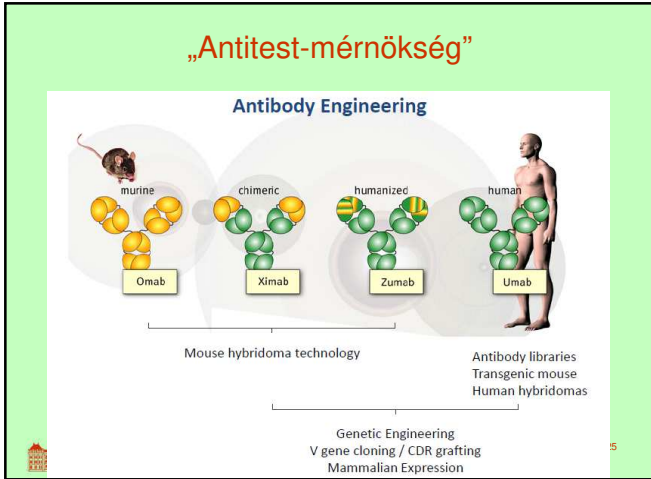
---

---

---

---






---

---

---

---

---

---

---

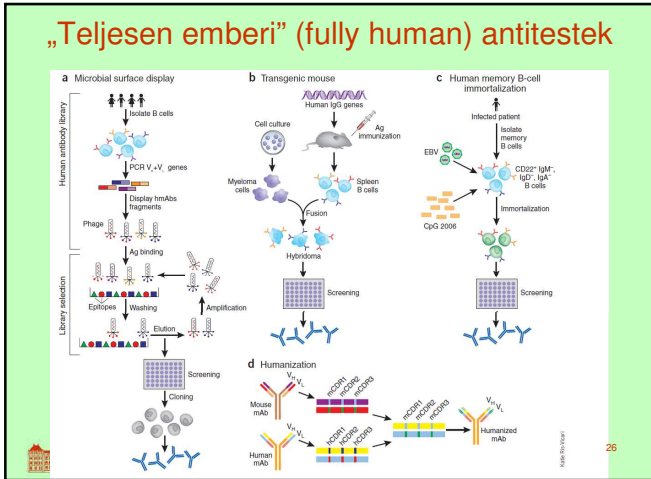
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

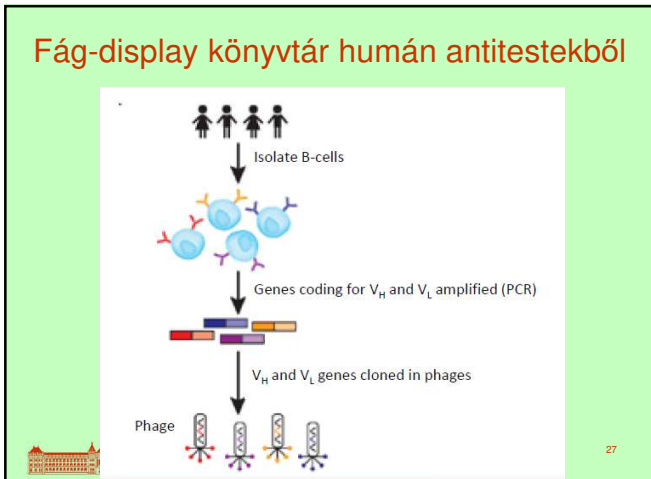
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

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

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

---

---

---

---

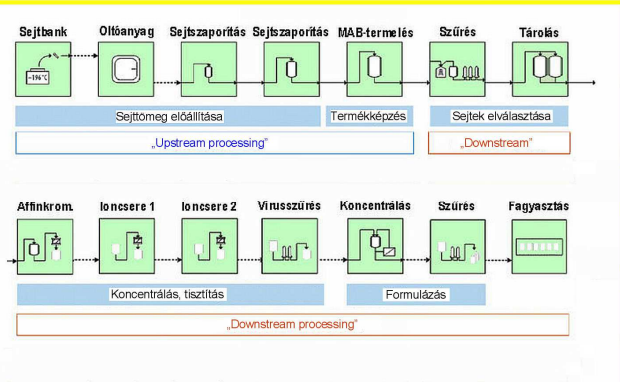
---

---

---

---

### Teljes technológia (upstream+downstream)




---

---

---

---

---

---

---

---

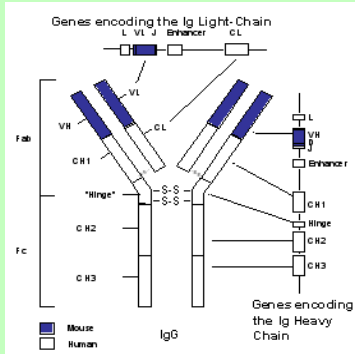
### Esettanulmány: Simulect

Immunszuppresszáns, szervátültetésekénél 30-40 napra kiüti a limfocitákat.

Humanizált, a génszerelvényt SP2/0 sejtvonalba építették be.

Szuszpenziós tenyészet, folytonos, sejtviszartartással → nagy sejtsűrűség

Novartis basiliximab




---

---

---

---

---

---

---

---

### Esettanulmány: Simulect

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

Flow: dilution rate 0.6 - 1.0 / day

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Esettanulmány: Simulect

A fermentáció lefutása

A forgó szita szűrő

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Monoklonális ellenanyagok a tumor-terápiában

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 lymhoid 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

---

---

---

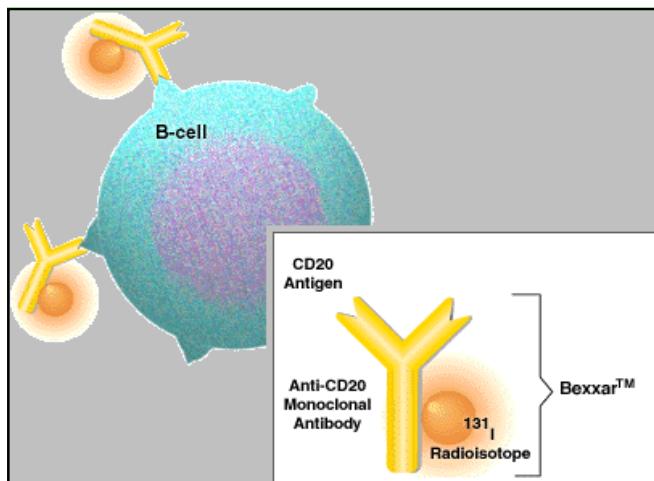
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

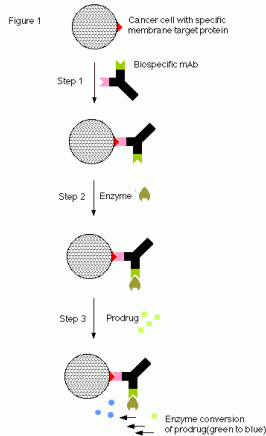
---

---

---

### 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 Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

---

---

---

---

---

---

---

---

### Immuno-liposzómák

Az immuno-liposzómák antitest és liposzóma összekapcsolását jelenti.  
 A liposzómák képesek gyógyszerek vagy terápiás nukleotidszár-  
 mazékok szállítására →  
 így ezek 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.




---

---

---

---

---

---

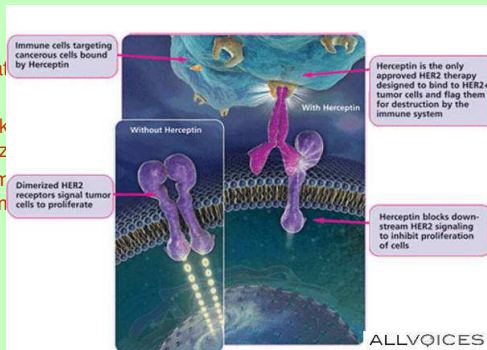
---

---

### Herceptin

Az antitest hat

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




---

---

---

---

---

---

---

---

### 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 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




---

---

---

---

---

---

---

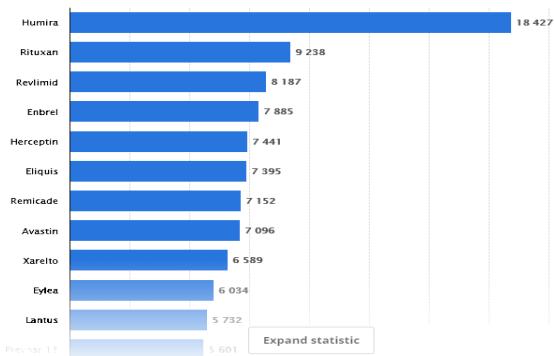
---

---

---

### A piacvezető biotechnológiai gyógyszerek (2017)

Top 15 pharmaceutical products by sales worldwide




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---