

Ellenanyag alapú biológiai  
therapiák 2.  
Monoklonális antitestek 1.

Gyógyszerészeti Biotechnológia  
2010.11. 24.



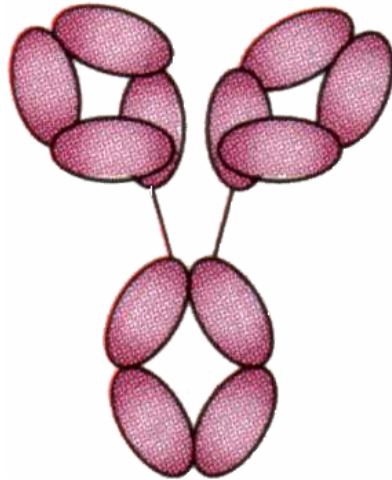
# Monoklonális antitestek, mint terápiás anyagok fejlesztése

1. Rágcsáló antitestek
2. Kiméra antitestek
3. Humanizált antitestek
4. Humán antitestek

**Tulajdonságai miatt IgG molekulákat használnak a terápiában.**

- Hosszú biológiai féléletidő (~21 nap)
- ADCC, CDC kiváltására is alkalmas

# Rágcsáló antitestek



A monoklonális antitestekkel történő első terápiás próbálkozásokkor rágcsáló antitesteket használtak.

Az első emberben használt antitest az OKT3 (anti-CD3) volt.

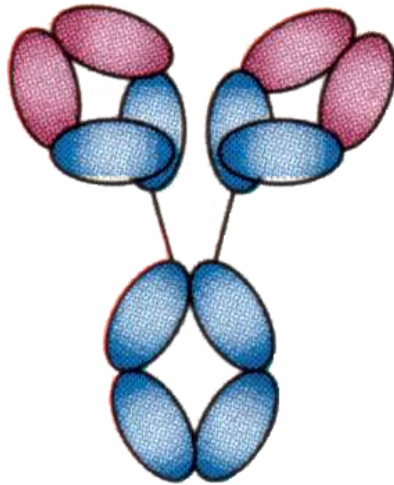
A kezelés hatásos volt számos esetben, ismételt alkalmazáskor azonban súlyos immunreakciók léptek fel.

**PROBLÉMA: HAMA (human anti-mouse-antibodies)**

Noha konzervált az Ig-ok konstans része, mégis számos különbség van az emberi és a rágcsáló Ig-k között.

HAMA-t 8-12 nappal a kezelés után tudnak kimutatni, a csúcskoncentráció 25-30 nap után van.

# Kiméra antitestek



A kiválasztott rágcsáló monoklonális antitest Fv régióját kódoló géneket hozzákapsolják egy humán antitest Fc részét kódoló génjeihez.

A kiméra antitestek kb. 75%-a humán.

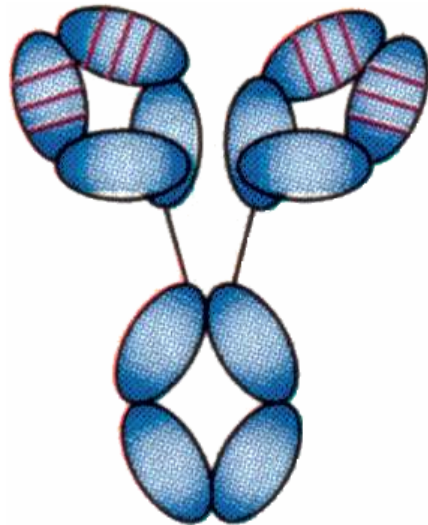
Az antigén specificitása megegyezik az eredeti rágcsáló antitestével azonosak.

Az in vivo féléletideje és az effektor funkciói az eredeti humán antitestével azonosak.

**PROBLÉMA: HACA (human anti-chimeric-antibodies)**

Kevésbé immunogének, de még mindig szignifikáns antitest választ váltanak ki.

# Humanizált antitestek



**Ha a kiválasztott rágcsáló monoklonális antitestjének csupán a CDR részeit ültetik át egy humán antitestbe humanizált antitesteket kapnak.**

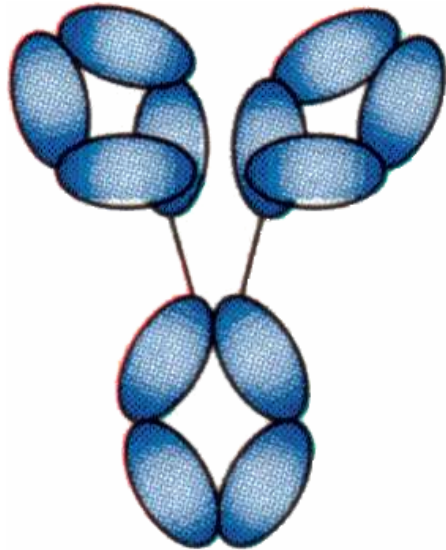
**A humanizált antitestek > 90%-a humán.**

**Az antigén specificitása megegyezik az eredeti rágcsáló antitestével azonosak.**

**Az in vivo féléletideje és az effektor funkciói az eredeti humán antitestével azonosak.**

**Már több humanizált antitest is kapható a kereskedelemben, a humanizált antitestek immunogenitása azonban még nem teljesen ismert.**

# Humán antitestek



**A végső cél, hogy a terápiában teljesen biokompatibilis monoklonális antitesteket használjanak.**

**Humán B-sejt hibridómák előállítása számos akadályba ütközik.**

**Pl. az antigének gyakran „saját” proteinek, amelyeket felismerő B-sejtek kisselektálódnak.**

**A következő két módszerrel azonban lehetséges humán monoklonális antitestek előállítása:**

- **Phage display**
- **genetikailag módosított egerek**

### Hagyományos mAb

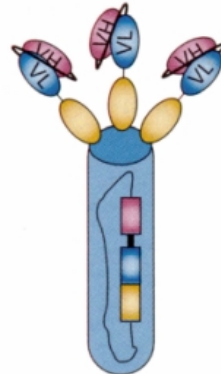


immunizálás  
a cél Ag-nel

hibridóma  
technika

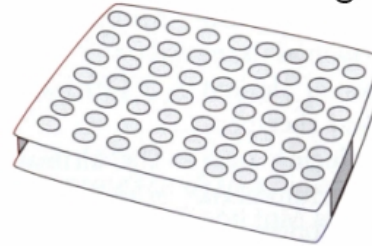


### Fág display



Fág Ab könyvtár

szelektálás a  
cél Ag-en



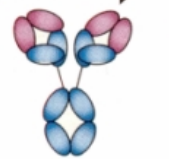
screening  
(szűrés)

legjobb mAb  
kiválasztása



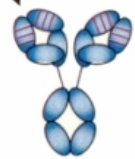
**egér mAb**

Kimeri-  
záció



**kiméra mAb**

CDR graft



**humanizált  
mAb**

### Humán antitest egér



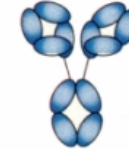
immunizálás  
a cél Ag-nel

hibridóma  
technika



screening  
(szűrés)

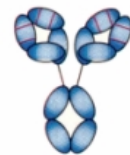
legjobb mAb  
kiválasztása



**humán mAb**

szelekció a cél Ag-nen  
re-Screening

a legjobb VH és VL  
konstrukt kiválasztása



**humán mAb**

# Phage display

## Nehéz lánc



- 1)  $V_H$  (~65),  $D_H$  (27) és  $J_H$  (6) gének amplifikációja PCR-ral
- 2) Ligáció (~ 10.000 féle variáció)



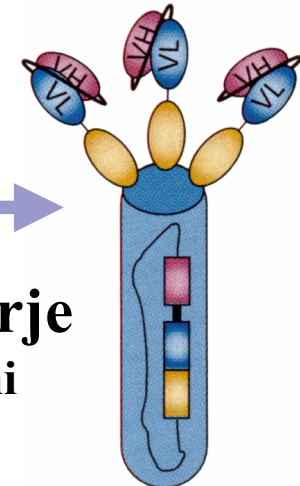
## Linker

lehetővé teszi a könnyű és nehéz lánc CDR-ek megfelelő orientációját

Fág genomba klónozás

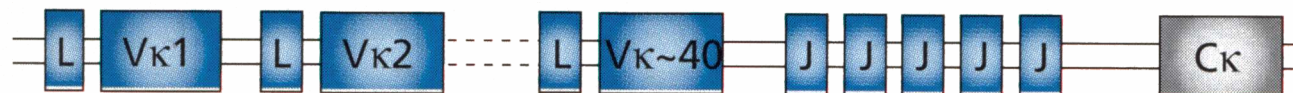
## Bakteriofág kapszid fehérje

Segítségével expresszálódik a mini antitest a bakteriofág felszínén



- 2) Ligáció (~ 200 féle variáció)

- 1)  $V_κ$  (~40) és  $J_κ$  (5) gének amplifikációja PCR-ral



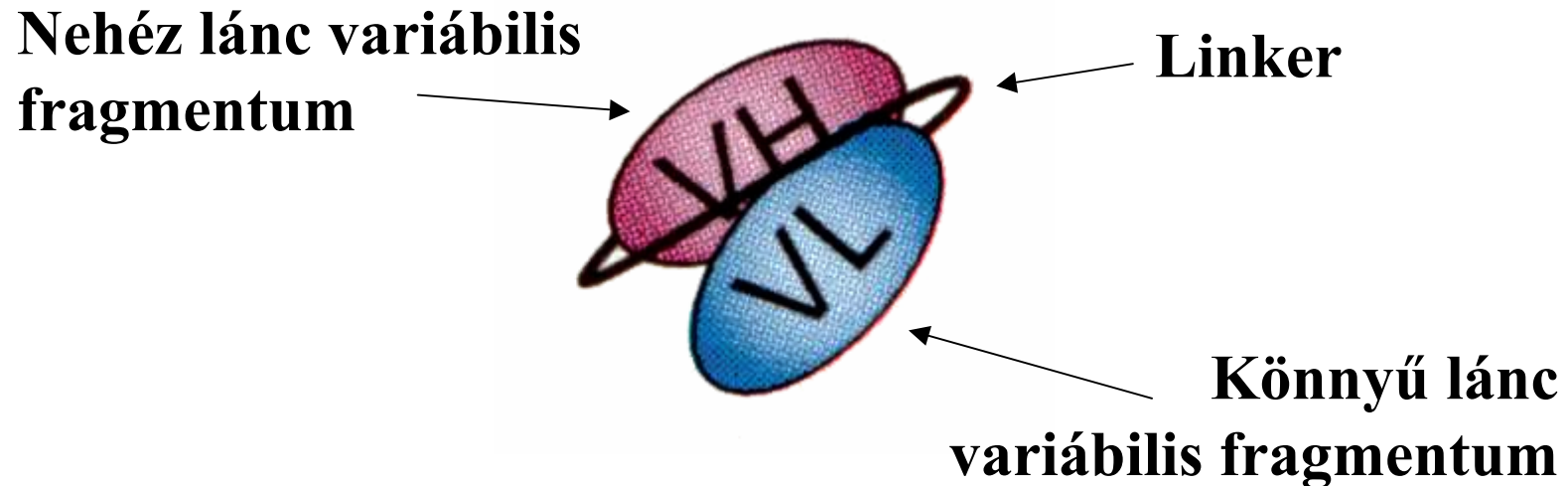
## Könnyű lánc



# ScFv

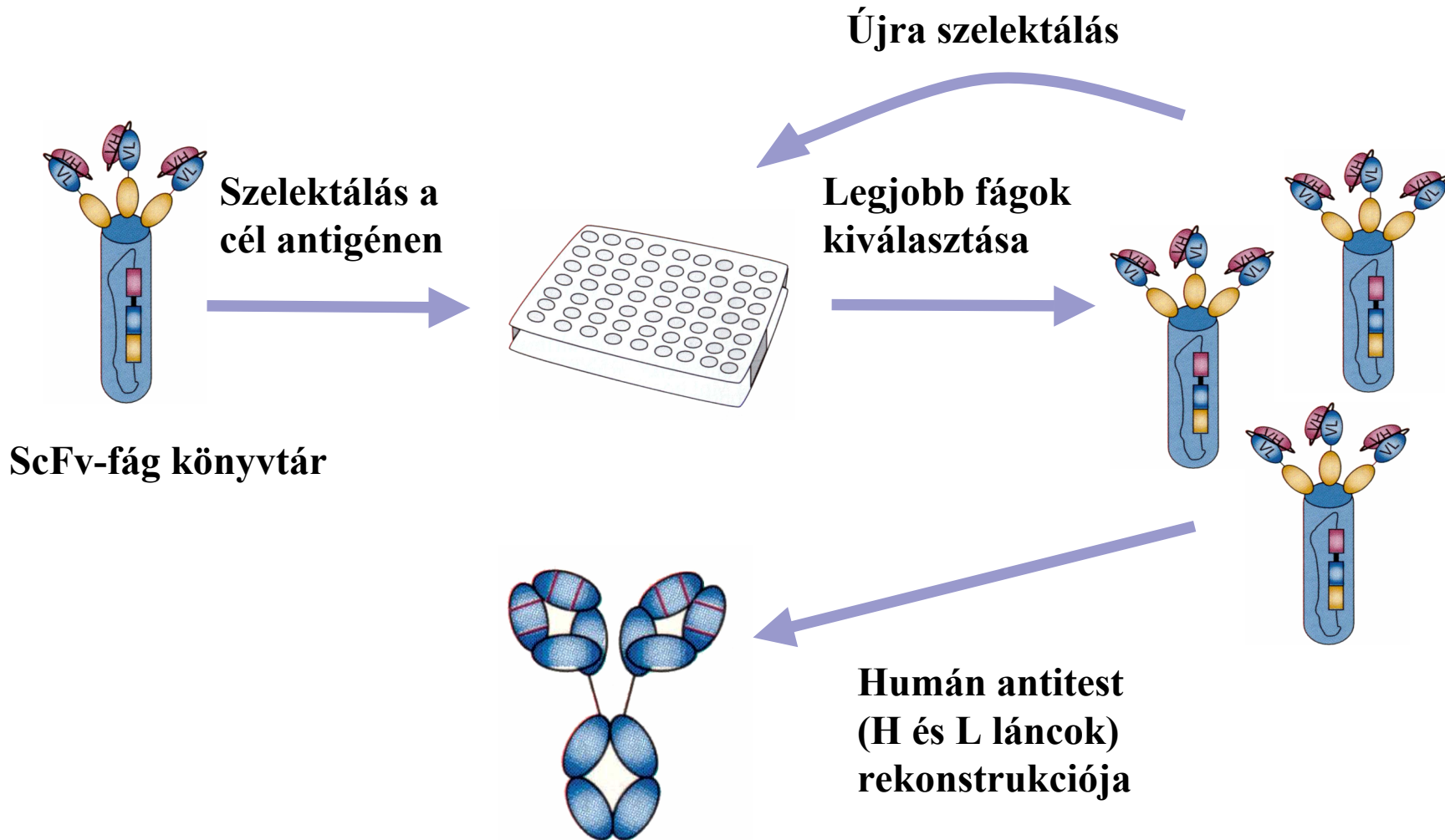
Single chain variable fragments

Egyetlen láncú variábilis fragmentumok



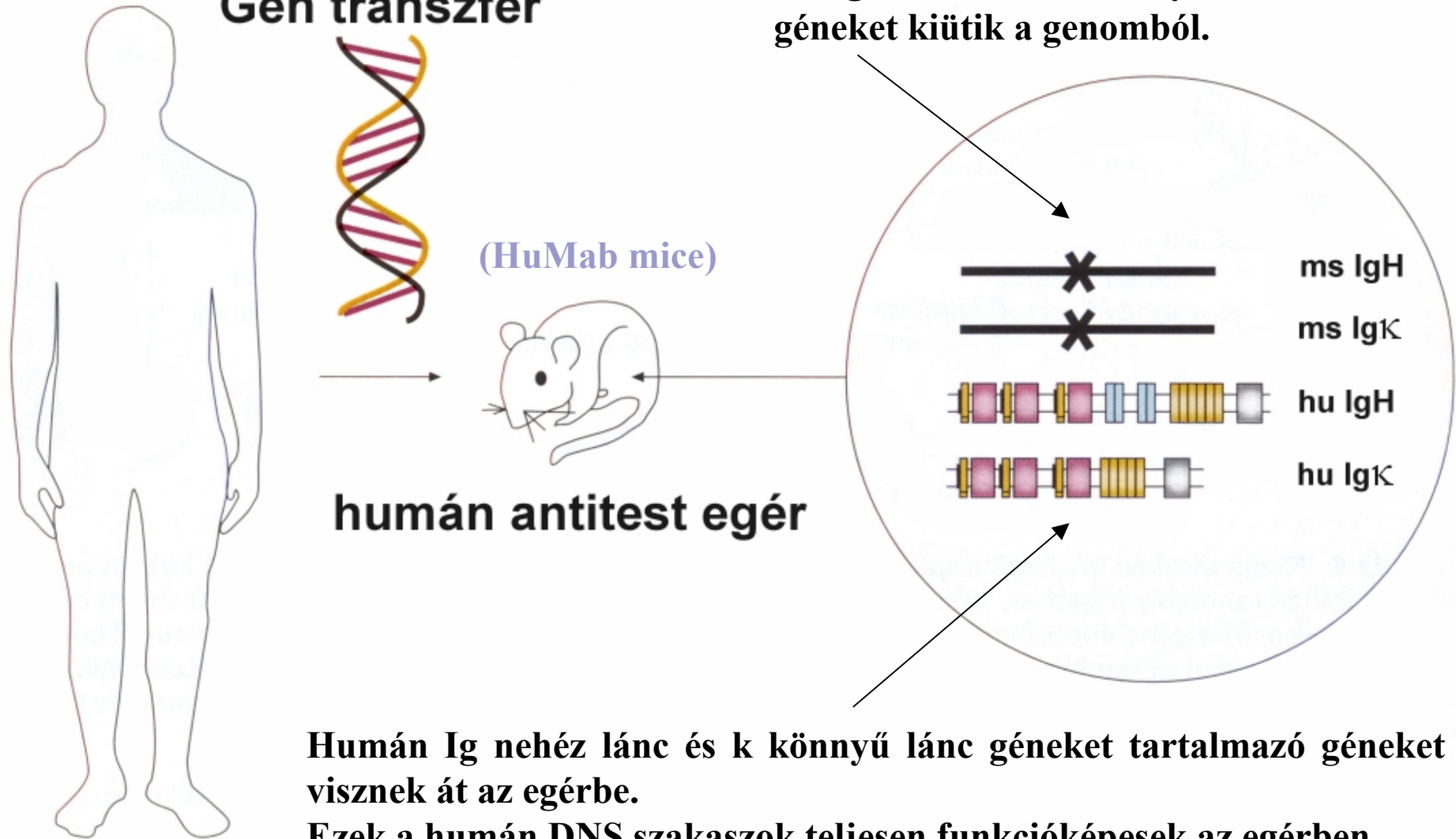
**Ez a „mini antitest”  
egyetlen polipeptidláncba kapcsolva is  
képes az antigén kötésre.**

# ScFv-fág könyvtár tesztelése



# Genetikailag módosított egerek

## Gén transzfer



Az egér nehéz és  $\kappa$  könnyű láncát kódoló géneket kiütik a genomból.

Humán Ig nehéz lánc és  $\kappa$  könnyű lánc géneket tartalmazó géneket visznek át az egérbe.

Ezek a humán DNS szakaszok teljesen funkcióképesek az egérben.

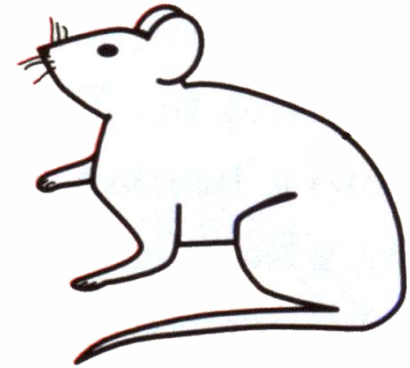
# Transz-kromoszómális egér

A 21 kromoszómapárja mellett az ilyen egér minden sejtje még egy „humán mini-kromoszómát” is tartalmaz,

melyet a humán 14-es (nehéz lánc) és 2-es (k könnyű lánc) kromoszómákból alakítottak ki.

A mini kromoszóma hordozza a teljes germ line nehéz és k könnyű lánc gén klasztereket.

Az egerek segítségével szinte tökéletesen lehet utánózni az emberi antitest választ egerekben.





# Nevezéktan

**A monoklonális antitestek generikus elnevezésére nemzetközileg elfogadott ajánlások:**

**1. A *-mab* végződést kell alkalmazni a monoklonális antitesteknél és a fragmentumoknál**

**2. Az antitest forrását jelölni kell a névben:**

- a = patkány
- e = hörcsög
- i = főemlős
- o = egér
- u = humán
- xi = kiméra
- zu = humanizált



### 3. A cél betegségcsoportra utaló szótagot is tartalmaznia kell a generikus elnevezésnek

- *-vir-* = virális betegségek
- *-bac-* = bakteriális fertőzések
- *-lim-* = immunmodulátor
- *-les-* = infekciós léziók
- *-col-* = colon tumorok
- *-mel-* = melanoma
- *-mar-* = mamma tumorok
- *-got-* = testis tumorok
- *-gov-* = ovariális tumorok
- *-pr(o)-* = prosztata tumorok
- *-tum-* = egyéb tumorok
- *-cir-* = cardiovascularis betegségek



**4. Egy határozott, megfelelő előtagot kell választani, hogy egyedi nevet kapjon a monoklonális antitest.**

**5. A név különböző kulcs elemeinek sorrendje kötött:**

**1) Egyedi előtag**

**2) Betegségcsoportra utaló szótag**

**3) Antitest forrására utalás**

**4) *-mab* végződés**

**6. Ha a termékhez konjugálva van valamilyen kémiai vagy radioaktív anyag, egy második szó hozzáillesztésével utalnak erre a generikus elnevezésben.**

(US Adopted Name (USAN) Tanács ajánlása)



# Készítmények előállítása

A kereskedelemben kapható monoklonális antitest készítményeket emlős sejtekben termelik.

- rágcsáló antitestek - közvetlenül az eredeti hibridómából
  - kiméra
  - humanizált
  - fág display
- } a rekombináns géneket vissza kell juttatni  
- emlős sejtekbe a megfelelő folding és glikoziláció eléréséhez

Az alternatív előállítási lehetőségekkel még nincs sok tapasztalat

- élesztőben
- bakteriális kultúrában
- növényekben





# Cost / benefit

**Monoklonális antitest termelés emlős sejt kultúrában nagyon dárta.**

**Akkor gazdaságos, ha  $>100 \mu\text{g/ml}$ -nél többet tud előállítani.**

**Általában a kezelés (pl. tumoros betegeknél) ismételten több száz mg antitest beadását igényli.**

**Bár hatásos, ez nagyon megnöveli a kezelés költségeit.**

**Olyan transzgenikus állatok (tehén, kecske) előállítása oldhatja meg ezt a problémát, melyeknek pl. tejükből tudjuk kinyerni a monoklonális antitesteket.**

# Diagnosztikus monoklonális antitestek

<b>Generikus név</b>	<b>Gyári név</b>	<b>Indikáció</b>
<b>Technécium-99m-acitumomab</b>	CEA-scan	Metasztatikus kolorektális karcinóma
<b>Imicromab penetrate</b>	MyoScint	Myocardiális infarktus
<b>Satumomab pendetide</b>	OncoScint CR/OV	Colorectális és ovariális rák
<b>Capromab</b>	ProstataScint	Prostata adenokarcinoma
<b>Nofetumomab</b>	Verluma	Kissejtes tüdőrák

## FDA által bejegyzett terápiás monoklonális antitestek

Termék neve	Specificitása	Típusa	Alkalmazási terület	Év
<b>Orthoclone OKT3</b>	CD3	egér	Transzplantátum rejekció	1986
<b>ReoPro</b>	GpIIb/gpIIa	kiméra Fab	Kardiovaszkuláris betegségek	1994
<b>Rituxan (mabthera)</b>	CD20	kiméra	Non-Hodgkin lymphoma, rheumatoid arthritis	1997
<b>Zenapax</b>	CD25	humanizált	Transzplantátum rejekció	1997
<b>Remicade</b>	TNF $\alpha$	kiméra	Crohn betegség, rheumatoid arthritis	1998
<b>Simulect</b>	CD25	kiméra	Transzplantátum rejekció	1998
<b>Synagis</b>	RSV	humanizált	Respiratorikus syncytium vírusfertőzés	1998
<b>Herceptin</b>	Her-2	humanizált	Metasztatikus emlőrák	1998
<b>Mylotarg</b>	CD33	humanizált	Akut myeloid leukémia (AML)	2000
<b>Campath</b>	CD52	huamnizált	B sejtes krónikus limfoid leukémia (B-CLL)	2001
<b>Zevalin</b>	CD20	egér	B sejtes non-Hodgkin-lymphoma	2002
<b>Erbitux</b>	EGFR	kiméra	Colorectális carcinoma (EGFR+ tumorok?)	2004
<b>Avastin</b>	VEGF	humanizált	Colorectális carcinoma	2004
<b>Tysabri</b>	$\alpha 4\beta 1/7$ integrin	humanizált	Sclerosis multiplex	2004



# Fő betegségcsoportok

- Immunológiai (autoimmun, immunszuppresszió)
- Tumorok



# Immunszuppresszió szervtranszplantáció után

- **OKT-3** (anti-CD3) T-sejt depletáló hatás
  
- **daclizumab (Zenapax):**
  - Egér myeloma sejtvonalban előállított, humanizált IgG1 monoklonális antitest
  - IL-2 receptor alfa alegység (CD25):
    - Nagy affinitású receptor, aktivált T-sejteken
  - Celluláris immunválasz gátlás
  
- **basiliximab (Simulect)**
  - Egér myeloma sejtvonalban előállított kiméra antitest
  - CD25



## Autoimmun, gyulladásoos betegségek kezelése - TNF $\alpha$ blokkolók

### ■ **adalimumab (Humira)**

- CHO sejtvonalonban előállított humán monoklonális antitest
- TNF-hez kötődik és gátolja a p55 és p75 TNF receptorokhoz való kötődést
- Terápiás javallatok:
  - RA, polyartikuláris juvenilis idiopáthiás arthritis, arthritis psoriatica, spondylitis ankylopoetica, Crohn-betegség, Psoriasis



# Autoimmun, gyulladássos betegségek kezelése - TNF $\alpha$ blokkolók

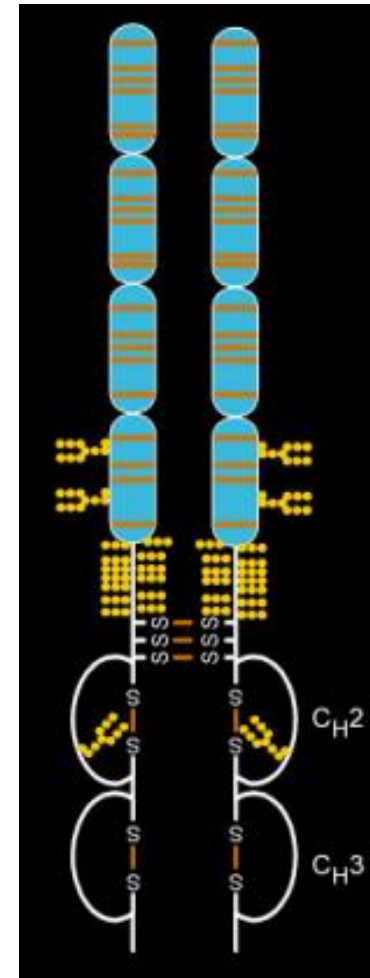
## ■ **infiximab (Remicade)**

- Emlős sejtvonalban előállított, kiméra antitest
- TNF-alfa szolubilis és membránkötött formája
- Terápiás javallatok:
  - RA, polyartikuláris juvenilis idiopáthiás arthritis, arthritis psoriatica, spondylitis ankylopoetica, Crohn-betegség, Colitis ulcerosa, Psoriasis

# Autoimmun, gyulladásos betegségek kezelése - TNF $\alpha$ blokkolók

## ■ Etanercept (Enbrel)

- TNFR2 és IgG1 hehézlánc fúziós fehérje.
- A természetesen is előforduló szolubilis TNFR-k hatását utánozza.








# TNF $\alpha$ blokkolók mellékhatásai

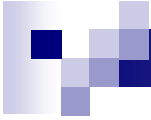
- TBC iránti fogékonyságot növeli
- Antifoszfolipid szindróma-szerű tünetek
- Szívelégtelenséget rontja
- Bakteriális fertőzések esélyét növeli
- Malignus tumorok száma nő (?)



# Autoimmun, gyulladásoos betegségek kezelése

## ■ efalizumab (Raptiva)

- CHO, humanizált
- Leukocita funkcionális antigén 1 (LFA-1)
  - LFA-1 ICAM-1 interakció gátlása
- Psoriasis



# Autoimmun, gyulladássos betegségek kezelése

## ■ rituximab (Mabthera)

- CHO sejtvonalba előállított, kiméra
- CD20
- B-sejt depléció
  - CDC
  - ADCC
  - Apoptózis indukció CD20-on keresztül

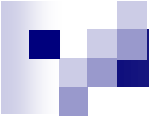
## ■ Terápiás javallat: RA + NHL



# Rheumatoid arthritis - “biológiai terapiák”

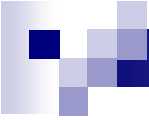
- Anti-TNF (Humira, Remicade, Enbrel)
- Rekombináns IL-1R antagonistá (Anakinra)
- Anti-CD20 (Rituximab)
- Ig-CTLA-4 fúziós fehérje (Abatacept)

A hagyományos szerekkel kombinálva illetve azok kiváltására.



## Daganatos betegségekben alkalmazott ellenanyag készítmények: EGFR

- Epidermális növekedési faktor receptor
  - Transzmembráb glikoprotein, I-es típusú tirozin kináz
  - EGFR (HER1, c-Erb-B-1), HER2, HER3, HER4
  - Sejtproliferáció a hám eredetű szövetekben
  - Fokozott expresszió számos daganatban



## Daganatos betegségekben alkalmazott ellenanyag készítmények: EGFR

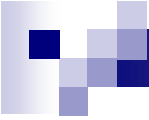
### ■ **panitumumab (Vectibix)**

- CHO sejtvonalba előállított, humán antitest
- EGFR (HER1)
- Gátolja az összes ligand által kiváltott receptor autofoszforilációt
- Receptor-antitest komplex internalizációja
- Apoptózis indukció, VEGF, IL-8 termelés csökkenés



## Daganatos betegségekben alkalmazott ellenanyag készítmények: panitumumab

- Terápiás javallat (monoterápiás):
    - Áttétes kolorektális karcinóma, ha vad típusú KRas-t expresszál
- ÉS
- A korábban alkalmazott kemoterápiás protokollok sikertelenek voltak




## Daganatos betegségekben alkalmazott ellenanyag készítmények: EGFR

### ■ **cetuximab (Erbitux)**

- SP2/0 sejtvonalba előállított, kiméra
- EGFR (HER1)
- Panitumumab-al lényegében megegyező hatásmechanizmus és indikáció
- +ADCC





# Daganatos betegségekben alkalmazott ellenanyag készítmények

## ■ **trastuzumab (Herceptin)**

- CHO sejtvonalba előállított, humanizált
- 2-es típusú epidermális növekedési faktor receptor (HER2)
- Primer emlőkarcinóma 20-30%-a fokozott expresszió
- HER2 extracelluláris domén leválhat a sejtfelszínről (p105), szérumból kimutatható
- Fokozott HER2 expresszió igazolása: ICH, FISH, CISH, (real-time PCR)
- ADCC



## Daganatos betegségekben alkalmazott ellenanyag készítmények: trastuzumab

### ■ Terápiás javallatok:

#### □ Metasztatikus emlőkarcinóma:

##### ■ Monoterápia

- Korábban már 2 kemoterápiás ciklust kapott

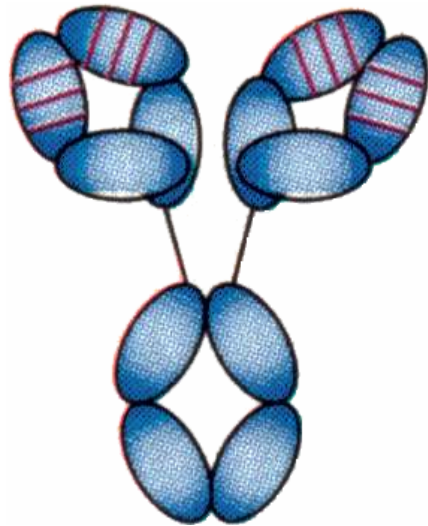
##### ■ Kombinációban

- Taxánokkal kombinálva
- Aromatáz inhibitorral kombinálva

#### □ Korai emlőkarcinóma

- Műtét, kemoterápia, sugárkezelés után

# Trastuzumab / Herceptin



Rekombináns humanizált monoklonális antitest, amely nagy affinitással kötődik a HER2 receptor extracelluláris doménjéhez.

A rekombináns antitestet úgy állították elő, hogy a rágcsáló muMAb 4D5 antitest CDR-it egy humán IgG1 antitestbe ültették át.

**Indikáció:** metasztatikus emlő karcinoma, amely overexpresszálja a HER2 onkogént.

**Hatás:** *in vivo* és *in vitro* citosztatikus és citoxikus számos HER2-t overexpresszáló tumor sejtvonalon.

**Hatásmód:** ADCC



**Adagolás: 4 mg/ttkg telítő dózis, majd**

**hetente 2 mg/ttkg fenntartó dózisok.**

**Átlagos féléletideje 5,8 nap.**

**16-32 hétig adagolva ezzel a sémával 79-123 µg/ml átlagos szérumszintű steady state állapotot lehet elérni.**

**Klinikai felhasználhatóság:**

- **kombinációban kemoterápiával (469 beteg)**

**pacitaxel vagy antracyclin, cyclophosphamid kombinációval**

**79% vs 68% 1 éves túlélés**

- **monoterápiában (222 beteg)**

**HER2-t overexpresszáló metasztatikus emlőrákos betegek, akik relapsusba kerültek 1-2 kemoterápiás kúra után**

**14%-ban volt teljes vagy részleges hatás**



## **Biztonsági megfontolások:**

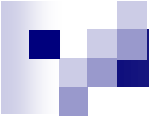
- **súlyos hiperszenzitív reakció**
- **anafilaxia**

**leggyakrabban az első infúzió során.**

**Megelőzés: premedikáció antihisztaminokkal és/vagy kortikoszteroidokkal.**

## **Egyéb mellékhatások:**

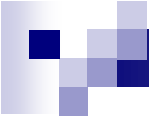
- **dyspnoe**
- **non-cardiogen pulmonaris oedema**
- **acut respiratory distress syndrome**
- **súlyos infúziós reakciók.**



# Daganatos betegségekben alkalmazott ellenanyag készítmények: VEGF


## ■ **bevacizumab (Avastin)**

- CHO sejtvonalba előállított, humanizált
- Vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF) angiogenezis fő stimulátora
- Az antitest a VEGF-hez kötődik, gátolja a VEGFR-1 és VEGFR-2-höz való kötődést az endothel sejtek felszínén
- Tumor érrendszer normalizációja, angiogenezis gátlása



## Daganatos betegségekben alkalmazott ellenanyag készítmények: bevacizumab

- Terápiás javallatok (kombinációban):
  - Metasztatikus vastagbél, és végbél karcinóma
  - Metasztatikus emlőkarcinóma
  - Nem kissejtes tüdőkarcinóma
  - Vese karcinóma



# Daganatos betegségekben alkalmazott ellenanyag készítmények

- **rituximab (Mabthera)**

- NHL

- **alemtuzumab (Mabcampath)**

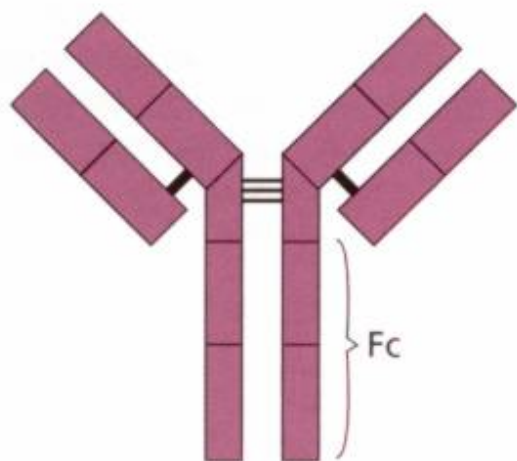
- B-CLL

- CD52

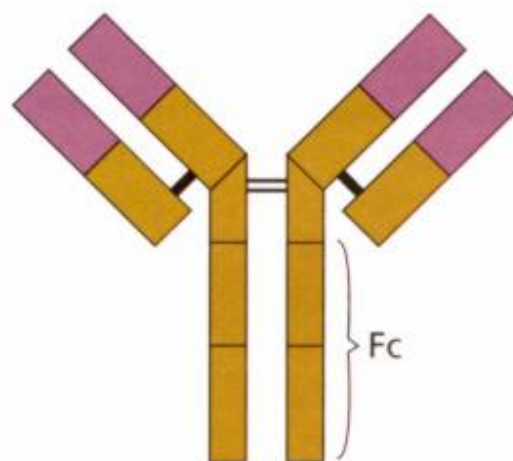


# Abciximab / Reopro

Fab fragmentuma a 7E3 humán/rágcsáló kimera monoklonális antitestnek.



rágcsáló 7E3 IgG



kiméra 7E3 IgG



kiméra 7E3 Fab  
abciximab  
ReoPro



## Hatásmechanizmus:

**A thrombociták GPIIb/IIIa receptorához kötődik.**

**Ez egy az integrinek családjába tartozó adhéziós molekula, melynek nagy szerepe van a TCT-k aggragációjában.**

**Abciximab meggátolja a fibrinogénnek, a von Willenbrand faktornak és más adhéziós molekuláknak az aktivált TCT-k felszínén található GPIIb/IIIa receptrohoz.**

## Klinikai felhasználás:

**Megelőzi a kardiális ischaemiás komplikációkat a percutan coronaria intervenció során. (EPIC, EPILOG, EPISTENT study-k)**

**Konvencionális terápiára nem reagáló instabil angina pectoris kezelése (CAPTURE study)**



# Fertőzéssel szembeni védelem

## ■ palivizumab (Synagis)

- Humanizált
- RSV A és B altípus
- A célsejttel történő fúzióért felelős fehérje ellen
- Terápiás javallatok:
  - RSV járvány kezdetén a 35.-ik gesztációs héten vagy korábban született, 6 hónapnál fiatalabb csecsemőknek
  - 2 évesnél fiatalabb gyermekeknek, akik az utóbbi hat hónapon belül bronchopulmonális dysplasia miatt kezelést igényeltek.
  - 2 évesnél fiatalabb, haemodinamikailag jelentős veleszületett szívbetegségben szenvedő gyermekeknek.



# Klinikai vizsgálatok

- Monoklonális antitestek:
  - 1500 folyamatban lévő vizsgálat
- TNF-gátlás:
  - 500 folyamatban lévő vizsgálat
- Sejt alapú terápiák (beleértve az őssejt és tissue engineering technikákat)
  - 10000-nél több folyamatban lévő vizsgálat