

Biológiai készítmények és génterápia (alapkoncepciók)

- fehérjék
 - „engineered” fehérjék
 - antitestek
 - nukleinsavak
 - sejtek
-
- biológiai terápia
 - in vitro előállítás → in vivo alkalmazás
 - génterápia
 - élő szomatikus sejtek „átprogramozása”
 - in vivo vagy ex vivo

előállítás nem kémiai szintézissel !

„Biopharmaceuticals”

(Biológiai készítmények)

- nagy komplex molekulák → **farmakokinetika !**
 - fehérjék
 - “engineered”/rekombináns fehérjék
 - pl. antitestek / fehérje hormonok
 - vakcinák
 - vér, vérkészítmények
 - allergének
 - nukleinsavak
 - antiszensz oligonukleotidok
 - “siRNA”
 - *génterápia*
- sejtek, szövetek
 - szomatikus

„Biopharmaceuticals” (Biológiai készítmények)

- **Előállítás?**

- a kémiai szintézissel ellentétben, ahol
 - jól definiált a kémiai szerkezet
 - nagyfokú a tisztaság
 - nincs mikrobiális kontamináció
- **itt: izolálás / biotechnológia / sejtek általi megtermeltetés**
 - nem pontosan meghatározott kémiai szerkezet
 - keverékek
 - mikrobiális szennyeződésre fogékony
- **in vitro előállítás ↔ in vivo felhasználás**

Fehérjék

- pl. inzulin / növekedési hormon
 - kezdetben
 - forrás: állat / ember
 - problémák: kis mennyiség / immunreakciók / infekciók
 - jelenleg
 - forrás: transzfektált expressziós rendszer (sejtek)
 - előny: elegendő mennyiség
 - problémák: endotoxin / glycosylatio / költség

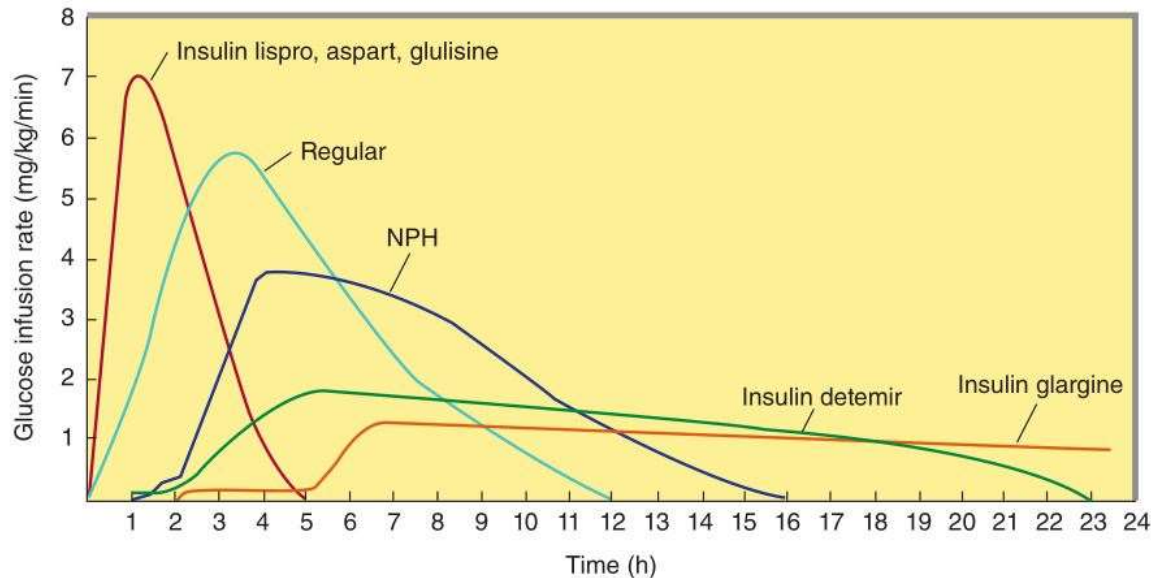
Fehérjék

- endogén fehérjék másolatai (első gen.)
- módosított fehérjék (második gen.)
 - kedvezőbb farmakokinetika
 - „pegylálás” / inzulin
 - fúziós fehérjék – új funkció
 - etanercept / immunotoxinok
 - csökkent immunogenitás (humanizálás)
- megtervezett fehérjék (harmadik gen.)
 - a jövő

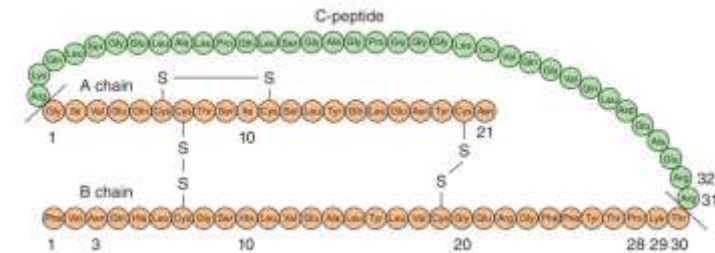
Néhány biológiai készítmény

- hormonok
 - inzulin
 - növekedési hormon
 - pegvisomant
 - GH receptor antagonist – acromegalia kezelésére, mutáns GH polyethylen glycol (PEG) származéka
- növekedési faktorok / citokinek
 - erythropoietin (pl. epoetin alfa / darbepoetin)
 - granulocyte colony stimulating factor (G-CSF, (peg)filgrastim)
 - interferonok (IF- α , IF- β , IF- γ)
 - interleukinok (pl. IL-2)
- antitestek

Insulin preparations

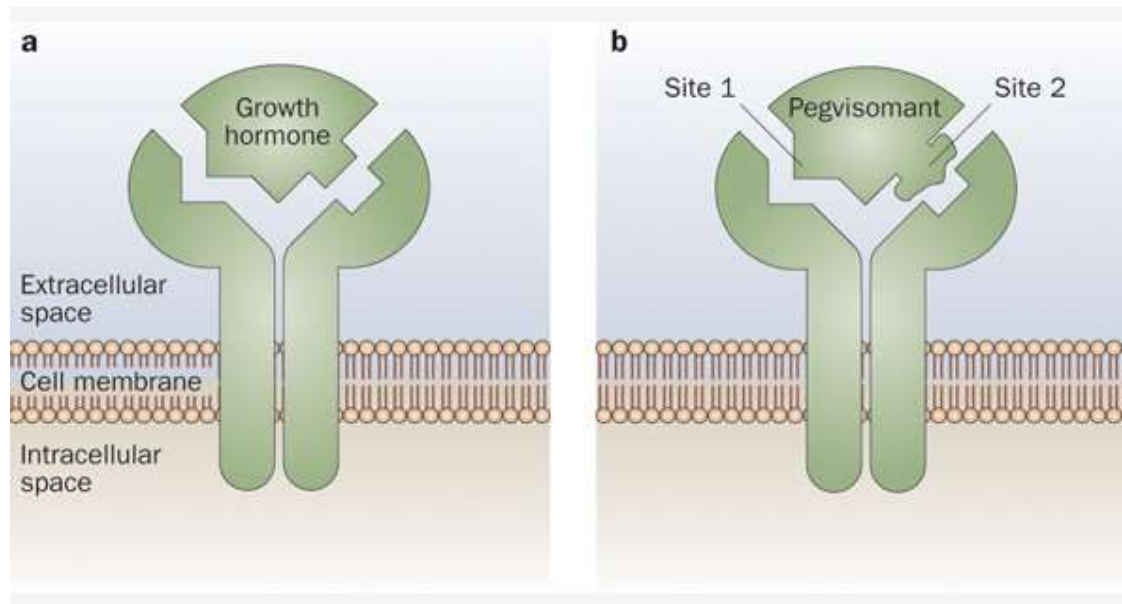


- rapid acting
 - lispro – B28 Pro \leftrightarrow B29 Lys
 - aspart – B28 Pro \rightarrow Asp
 - glulisine – B3 Asn \rightarrow Lys + B29 Lys \rightarrow Glu
- long-acting
 - detemir – terminal Thr \leftrightarrow myristic acid
 - glargine – add 2 Arg to B carboxy + A21 Asn \rightarrow Gly
 - degludec – similar to detemir (Thr \leftrightarrow hexadecanedioic acid)



Pegvisomant

- **PEG** derivative of a mutant GH
- used/effective in acromegaly
- increases circulating GH conc.



Antitestek

- poliklonális antitestek
- monoklonális antitestek – hybridoma
 - egér
 - *kiméra*
 - *humanizált*
 - *humán*

Humanized antibodies

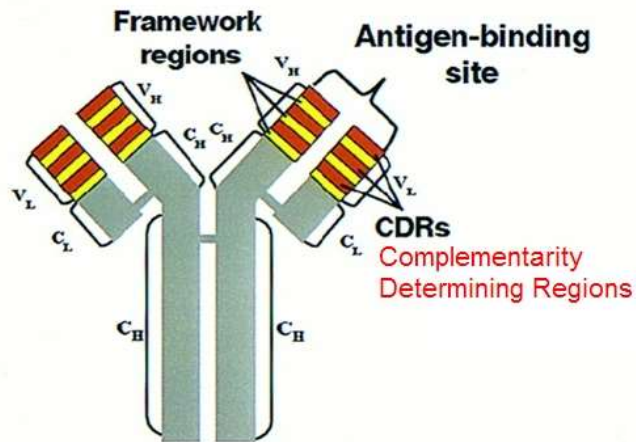
human amino-acid sequences:

chimeric: F_c part

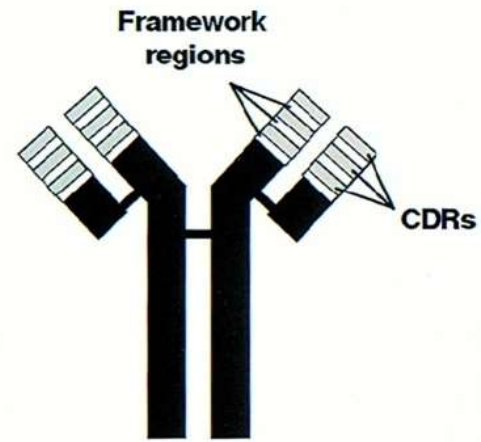
humanized: F_{ab} part also, with the exception of the *complementarity determining region* (CDR)

human: completely human

Mouse Antibody



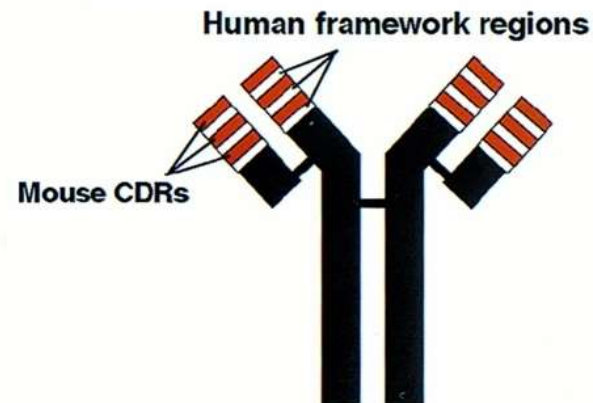
Human Antibody



ximab Chimeric Antibody



zumab Humanized Antibody



CURRENT MONOCLONAL ANTIBODY NOMENCLATURE					
UNIQUE PREFIX	TARGET TISSUE		SOURCE ORGANISM		CONSERVED SUFFIX
variable	-o(s)-	bone	-u-	human	-mab
	-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			
	-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			
Beva	ci	zu			mab
Ri	tu	xi	mab		
Ala	ci	zu	mab		
Glemba	tum	u	mab		

Nomenclature of monoclonal antibodies

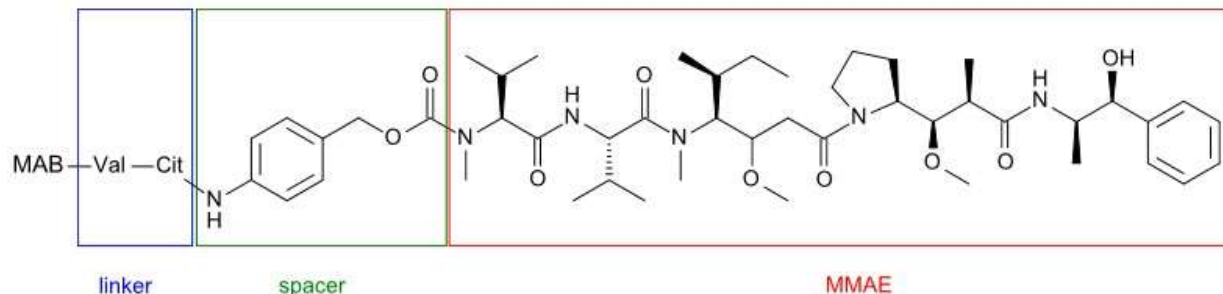
			prefix	substem A and B		suffix: monoclonal antibodies and fragments mab
		name	unique name, distinct syllable	target class, (therapeutic use)	biological origin murine, human	
immune	murine	muromonab-CD3	a name coined before the acceptance of the present rules of nomenclature			
	chimeric	infiximab	inf	lim	xi	mab
		basiliximab	basi	lim	xi	mab
	humanized	daclizumab	dacli	lim	zu	mab
		omalizumab	oma	lim	zu	mab
		efalizumab	efa	lim	zu	mab
		natalizumab	nata	lim	zu	mab
	fully human	adalimumab	ada	lim	u	mab
						mab

A humanizált antitestek előnyei

- hosszabb felezési idő
- csökkent immunogenitás
- a human effektor mechanizmusok hatékonyabb aktiválása
 - ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity)
 - komplement aktiváció

Immunotoxin

- **brentuximab vedotin** (target: CD30)
 - anti-CD30 chimeric IgG1 + MMAE
 - binding → internalization → release of MMAE → blockade of tubulin polymerisation
 - indication (**but only after failure of other therapies**)
 - anaplastic large cell lymphoma
 - Hodgkin's disease
 - risk of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML)

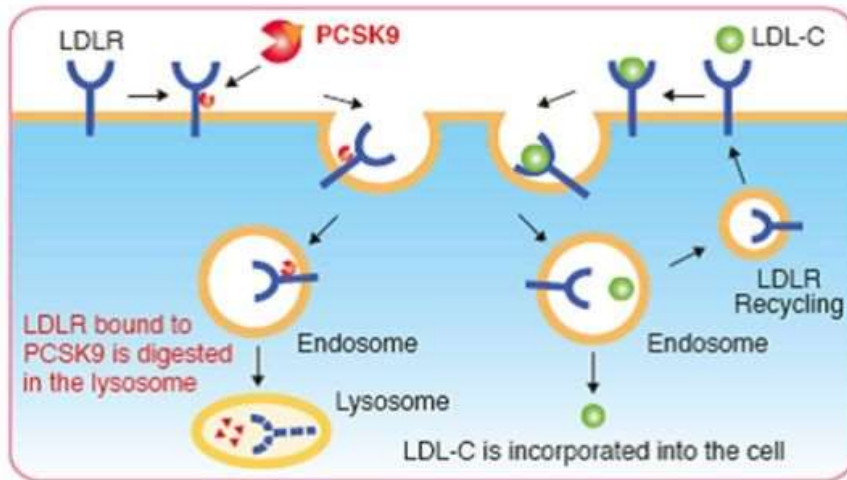


Biologic therapy for hyperlipidemia

PCSK9 inhibitors

(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9)

PCSK9 protease → binds to LDL rec. → ↑ degradation → **↑ LDL**



Expensive – 14100 USD/year (2015)

“On October 26, 2018 Amgen announced a 60% cut in price (5850 USD/year)”

Biologic therapy for hyperlipidemia

PCSK9 inhibitors

(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9)

- PCSK9
 - protease → binds to LDL rec. → ↑ degradation → **↑ LDL**
- **alirocumab / evolocumab**
 - **fully human monoclonal antibodies against PCSK9**
- **SC.** biweekly → up to 70% LDL ↓ + triglycerides, apo B-100 and Lp(a) ↓
- **adjunctive** to diet and maximally tolerated statin and/or ezetimibe
- indications
 - **familial hypercholesterolemia**
 - est. atherosclerotic cardiovascular disease requiring additional LDL lowering
- adverse effects
 - **inj. site reactions**
 - ↑ infection risk (upper resp. / urinary)
 - hypersensitivity (rare)
 - neurocognitive effects ?
 - no ↑ risk of myopathy

Biologikumok fejlesztése

- gyártás
 - minősegbiztosítás
 - aszeptikus technológia
- preklinikai / klinikai fejlesztés
 - „biosimilarity” = biohasonlóság (nem generikus)
 - a gyártási folyamat változásaira fokozottan érzékeny
 - biztonság
 - jelentős specificitás – lásd TGN1412

Biosimilars



Consumer Health Information
www.fda.gov/consumer

Biosimilars: More Treatment Options Are on the Way

- Zarxio: First US FDA approved biosimilar
 - 06.03.2015
 - EU approval: 06.02.2009
- Neupogen (filgrastim) → Zarxio

Biological therapy ≠ targeted therapy

- anticancer molecularly targeted therapy
 - non-biologicals
 - tyrosine kinase inhibitors
 - e.g. imatinib, dasatinib, nilotinib (BCR-ABL kinase, CML)
 - epidermal growth factor receptor inhibitors
 - e.g. lapatinib (HER2+ breast cancer)
 - e.g. erlotinib (metastatic non-small cell lung cancer)
 - biologicals
 - epidermal growth factor receptor inhibitors
 - e.g. trastuzumab (HER2+ breast cancer)
 - e.g. cetuximab (EGFR+ metastatic colorectal cancer)
- DMARDs
 - non-biologicals
 - e.g. methotrexate, hydroxychloroquine, leflunomide
 - biologicals
 - e.g. infliximab, adalimumab, etanercept

Génterápia

- **szomatikus sejtek** genetikai módosítása
 - rekombináns nukleinsavak bejuttatása a célsejtekbe
 - in vivo ↔ ex vivo
- cél
 - megelőzés
 - csillapítás
 - gyógyítás
- **potenciális** alkalmazás
 - monogénés betegségek gyógyítása
 - pl. cisztás fibrosis, hemoglobinopathiak
 - genetikai hátterű (+nem genetikai is) betegségek enyhítése
 - pl. malignus, neurodegeneratív
- **nehézségek**
 - célbajuttatás (kapacitás-hatékonyság-szelektivitás - PK)
 - biztonság
 - perzisztencia
 - klinikai hatékonyság

Requirements of gene delivery systems

- capacity of the system
 - how much DNA it can carry
- transfection efficiency
 - ability to enter and become utilised by cells
- lifetime of the transfected material
 - determined by the lifetime of the targeted cells
- safety
 - especially in the case of viral delivery systems

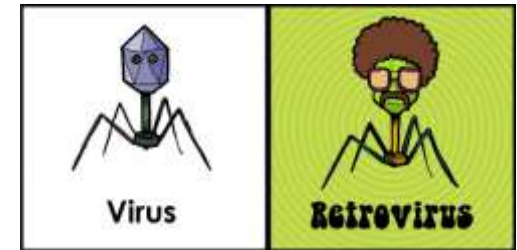
Gene delivery

- in vivo
 - vector is injected into the patient
 - iv. (targeting) or directly into the target tissue
- ex vivo
 - remove cells from the patient
 - treat them with the vector
 - inject the genetically altered cells back

ideal vector: safe, efficient, selective, results in persistent expression

Gene delivery

- **viral vectors** (modified 'replication defective')
 - **retroviruses**
 - incorporated randomly into host DNA
 - only infect dividing cells
 - persistence (if into stem/progenitor cells)
 - little specificity (ex vivo use)
 - **adenovirus**
 - high transgene expression
 - not inserted into the host genome > do not replicate > only temporary effect
 - low dose inefficient while high dose elicit immune response
 - **other viruses**
 - adeno associated virus / herpesvirus / disabled HIV



Gene delivery

- non-viral vectors
 - liposomes
 - positively charged lipids ('lipoplexes')
 - improved delivery into the cell nucleus
 - much less efficient than viruses
 - microspheres
 - made from polyanhydride co-polymers of fumaric and sebacic acids
 - loaded with plasmid DNA
 - possibility of oral gene therapy
 - plasmid DNA
 - much less efficient / cannot be targeted
 - no risk of viral replication and is not usually immunogenic

Gene expression control

- control the activity of gene
 - e.g. hemoglobinopathies - appropriate balance of normal α - and β -globin chain synthesis
- inducible expression system
 - e.g. doxycycline-inducible promoter

Safety

- general
 - related to the nature of vectors
- specific
 - e.g. polycythaemia from overexpression of erythropoietin
- viral vectors
 - acquire virulence
 - immunogenic viral proteins
 - elicit inflammatory response
 - damage host genome and interfere with the cell cycle > provoke malignancy

Example for problem of persistence

- **cystic fibrosis**
 - autosomal recessive
 - airway epithelium malfunction
 - missing membrane Cl^- transporter
 - cystic fibrosis transport regulator (CFTR)
- continuous replacement of epithelial cells
 - periodic need for treatment
 - unless the gene is inserted into progenitor/stem cells

Gene therapy in Parkinson's disease

- three completed **Phase 1** trials in the US
 - vector: adeno associated virus type 2
 - genes
 - glutamic acid decarboxylase – GABA synthesis ↑ into subthalamic nucleus
 - aromatic acid decarboxylase (AADC) – levodopa → dopamine ↑ in putamen
 - neurturin – neurotrophic factor, may ↑ survival of dopaminergic neurons
 - results: safe and **possibly effective**
 - Phase 2 trials are under way

Suicide gene therapy for GvHD

- background
 - in high-risk hematological diseases
 - allo-SCT from HLA-matched donor is potentially curative
 - antileukemic efficacy is determined by
 - conditioning regimen + alloreactivity
- problem
 - alloreactivity → graft-versus-host-disease (GvHD)
- solution
 - suicide gene → donor T cells ex vivo
 - thymidine kinase gene / caspase-9
 - later posttreatment to eliminate T cells
 - ganciclovir / AP1903 (dimerizing drug)
- result
 - **promise** for control GvHD

