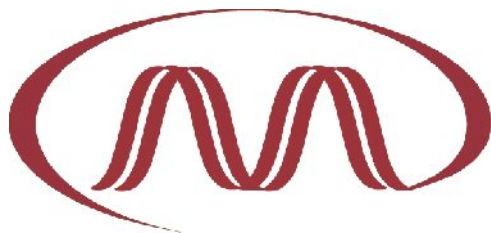


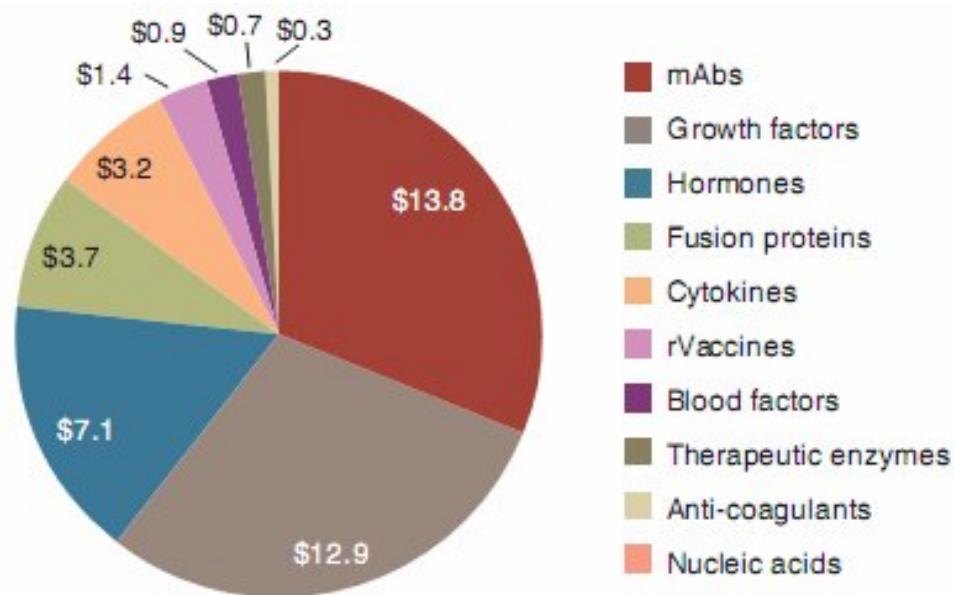
Комбинаторные дисплейные библиотеки - важный источник биологических лекарств будущего

Докладчик: Андрей Улитин



ООО «Мепротек» российская биофармацевтическая компания
Институтская ул. 7, Пущино Московская обл. 142290 Tel: 926-367-5020
www.meprotek.com

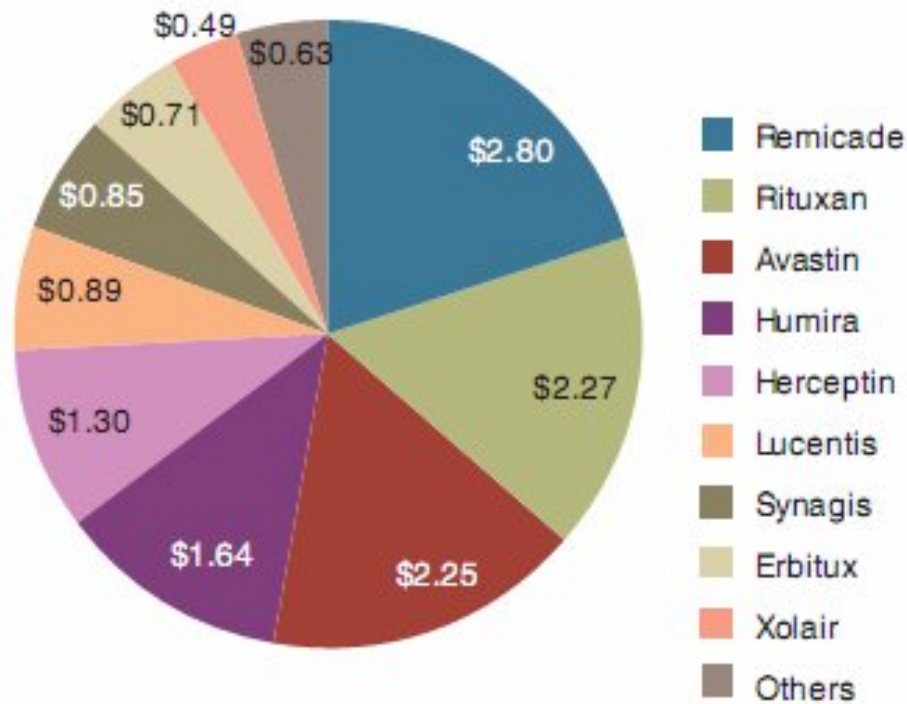
Рынок биологических препаратов в США за 2007 г.



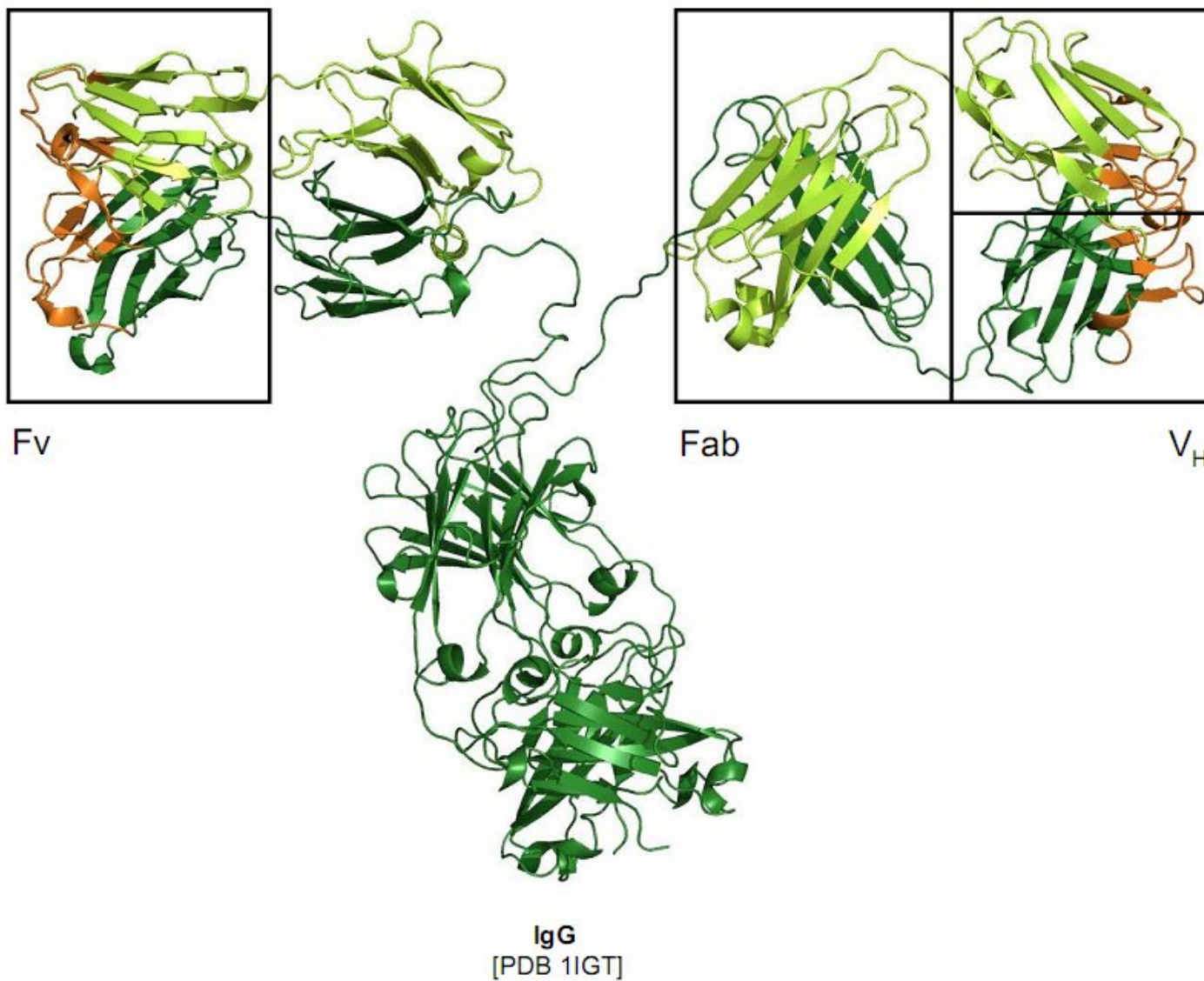
	2006 US sales (\$ billions)	2007 US sales (\$ billions)	2006 growth (%)	2007 growth (%)
mAbs	11.4	13.8	37	22
Growth factors	14.1	12.9	17	-9
Hormones	5.5	7.1	21	30
Fusion proteins	3.2	3.7	15	15
Cytokines	3.3	3.2	7	-3
rVaccines	0.6	1.4	40	154
Blood factors	0.8	0.9	5	15
Therapeutic enzymes	0.8	0.7	31	-14
Anti-coagulants	0.3	0.3	-1	-2
Nucleic acids	0.02	-	-	-



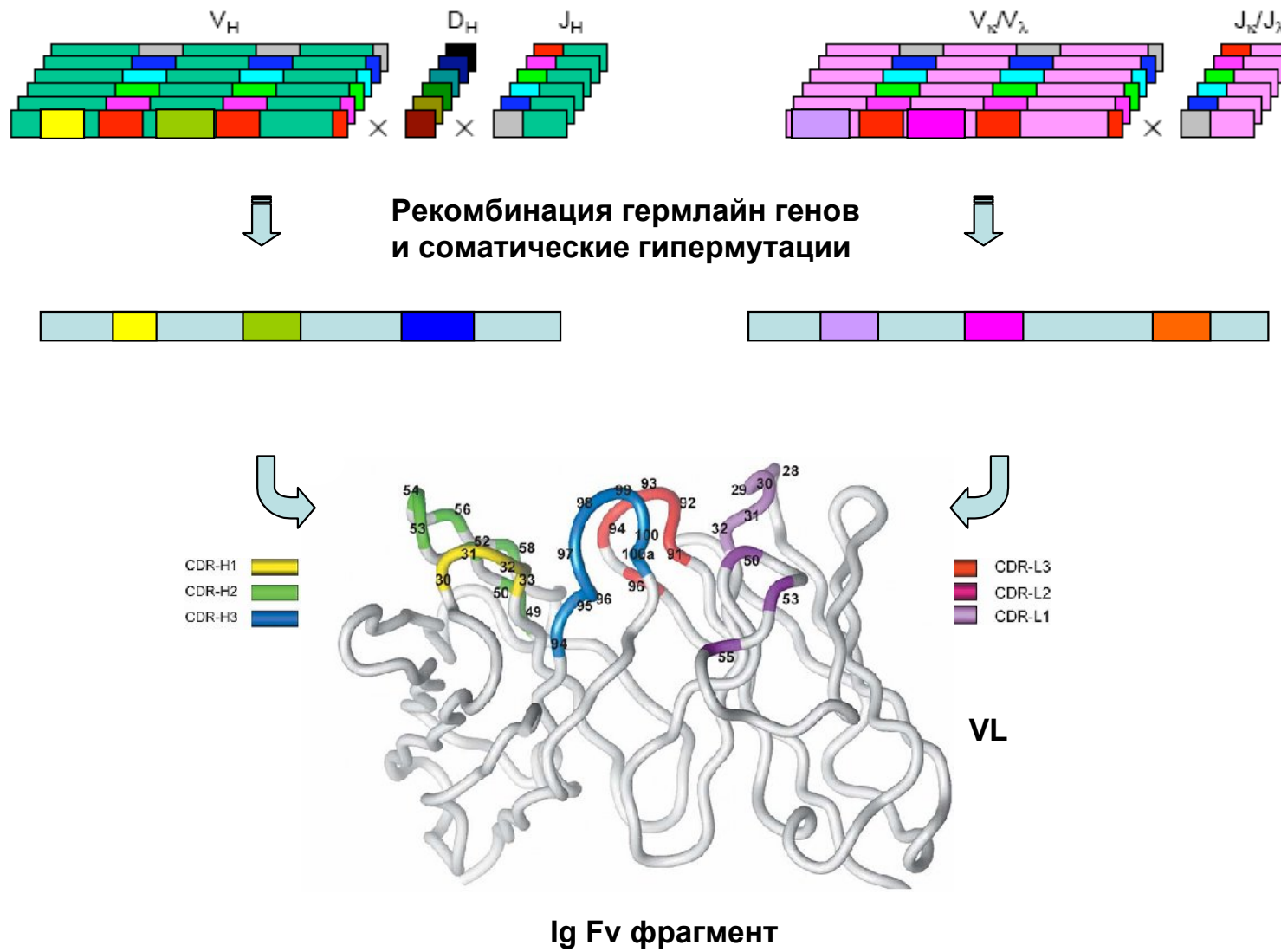
Рынок моноклональных терапевтических антител в США



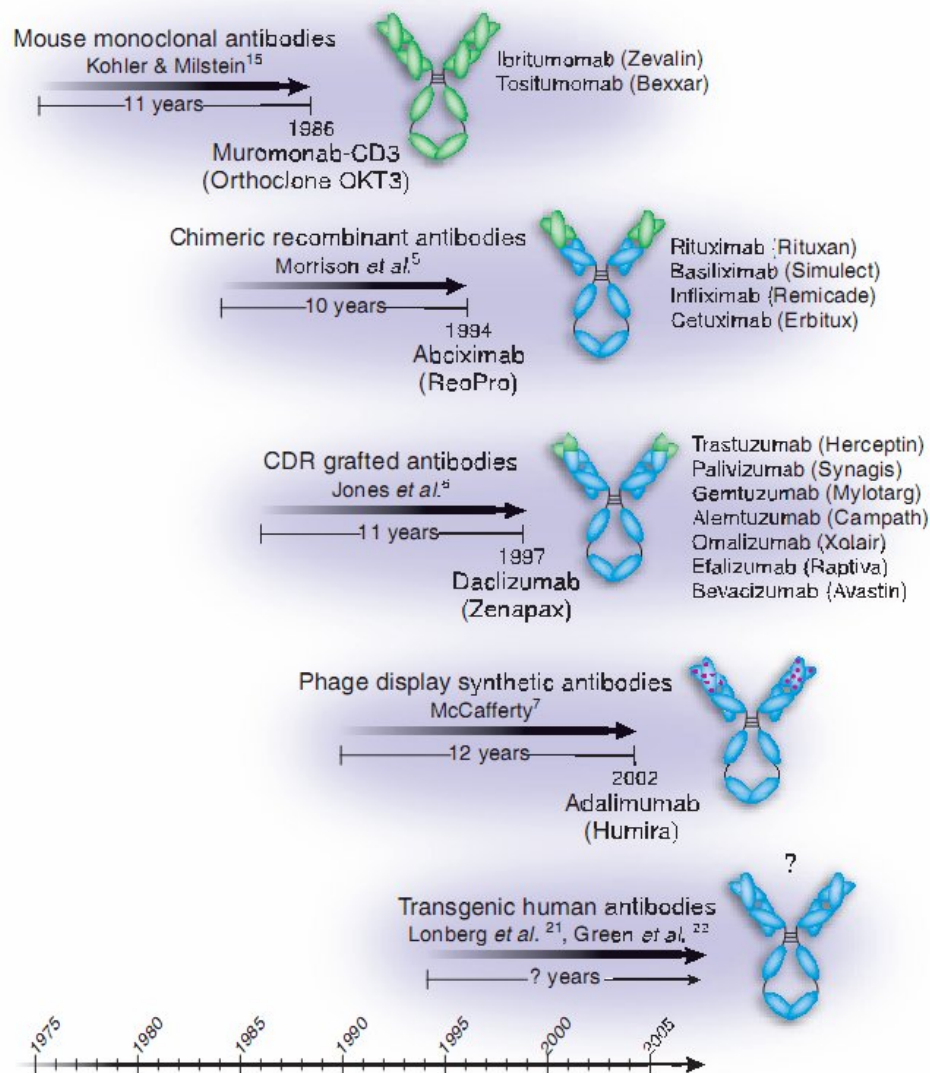
Иммуноглобулин G и его фрагменты



Образование разнообразия структур антител в природе



Человеческие versus очеловеченные моноклональные антитела



- Антитела животных не желательны ввиду образования у пациента антител на препарат моноклонального антитела мыши (НАМА ответ)
- Химерные антитела (chimeric) – переменные домены из антитела животного (30% в структуре антитела) также могут приводить к НАМА, хотя и в меньшей степени нежели антитела животных
- Хуманизированные (humanized) – содержат только CDR регионы и отдельные каркасные позиции из антитела животного (5-10% в структуре антитела) могут иметь небольшую иммуногенность
- Полностью человеческие антитела являются наиболее предпочтительными для терапии.



Создание синтетических и природных библиотек антител

Синтетические библиотеки



Аплификация синтетических генов
варибельных доменов антител
из синтетических олигонуклеотидов

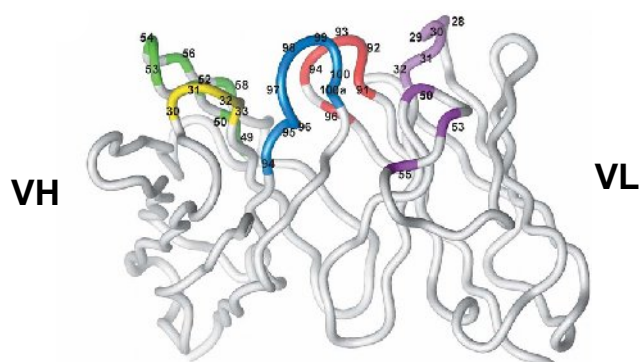
Случайное комбинирование синтетических
генов VH и VL и создание дисплейной
библиотеки антител

Природные библиотеки



Амплификация генов
варибельных доменов антител

Случайное комбинирование природных
генов VH и VL и создание дисплейной
библиотеки антител



Ig Fv фрагмент

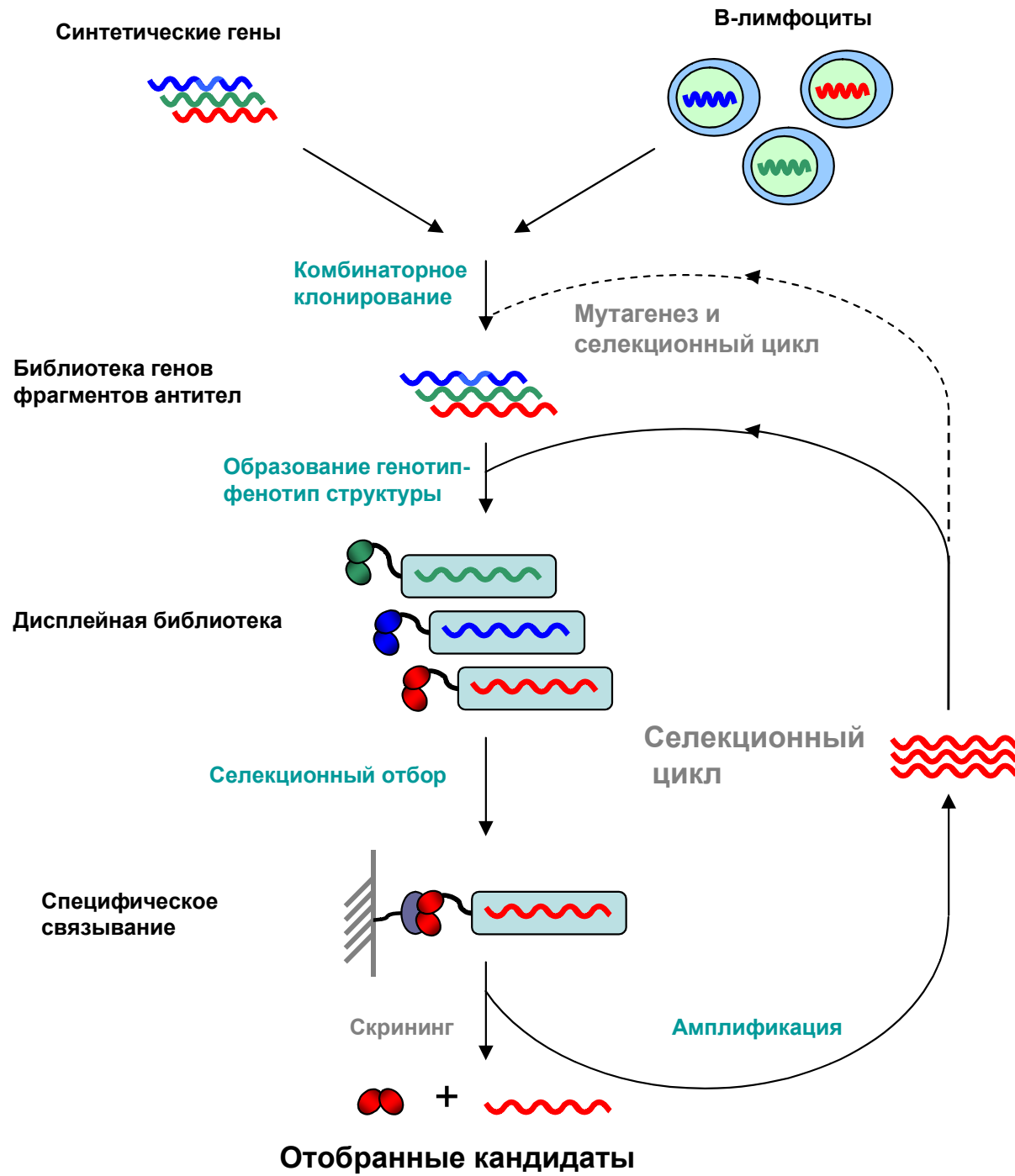


Преимущества и недостатки синтетических и природных библиотек

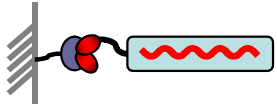
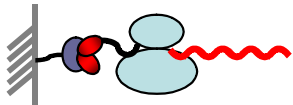
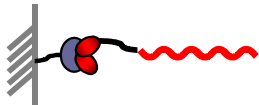
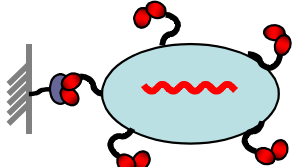
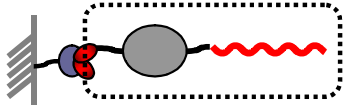
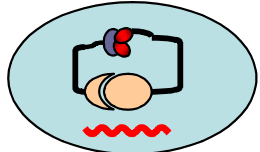
Синтетические	Природные
Доступность материала для конструирования (синтетические праймеры)	Для создания богатого источника антител требуется значительное количество донорского материала (периферическая кровь, костный мозг, селезенка и пр.)
Базируются на одной или нескольких каркасных структурах переменных доменов антител, выбранных на основе оптимальных термодинамических и экспрессионных свойств	Разнообразные по термодинамическим и экспрессионным характеристикам последовательности не позволяют унифицировать работу в бактериях E.coli
Простота манипуляций в белковом дизайне, секвенировании и матурации из-за наличия только одной или нескольких каркасных структур	Огромное структурное разнообразие природных каркасных последовательностей требует индивидуального подхода в различных генноинженерных манипуляциях
Большой процент некорректных последовательностей в библиотеке (до 75%) из-за ошибок в синтезе протяженных праймеров	Высокофункциональные библиотеки и малый процент некорректных последовательностей (менее 10%)
Возможная иммуногенность некоторых синтетических вариантов CDR участков	Природные последовательности имеют малую вероятность иммуногенности CDR участков
-	Возможность использования библиотеки в дизайне humanization антител животных



Работа с библиотеками антител

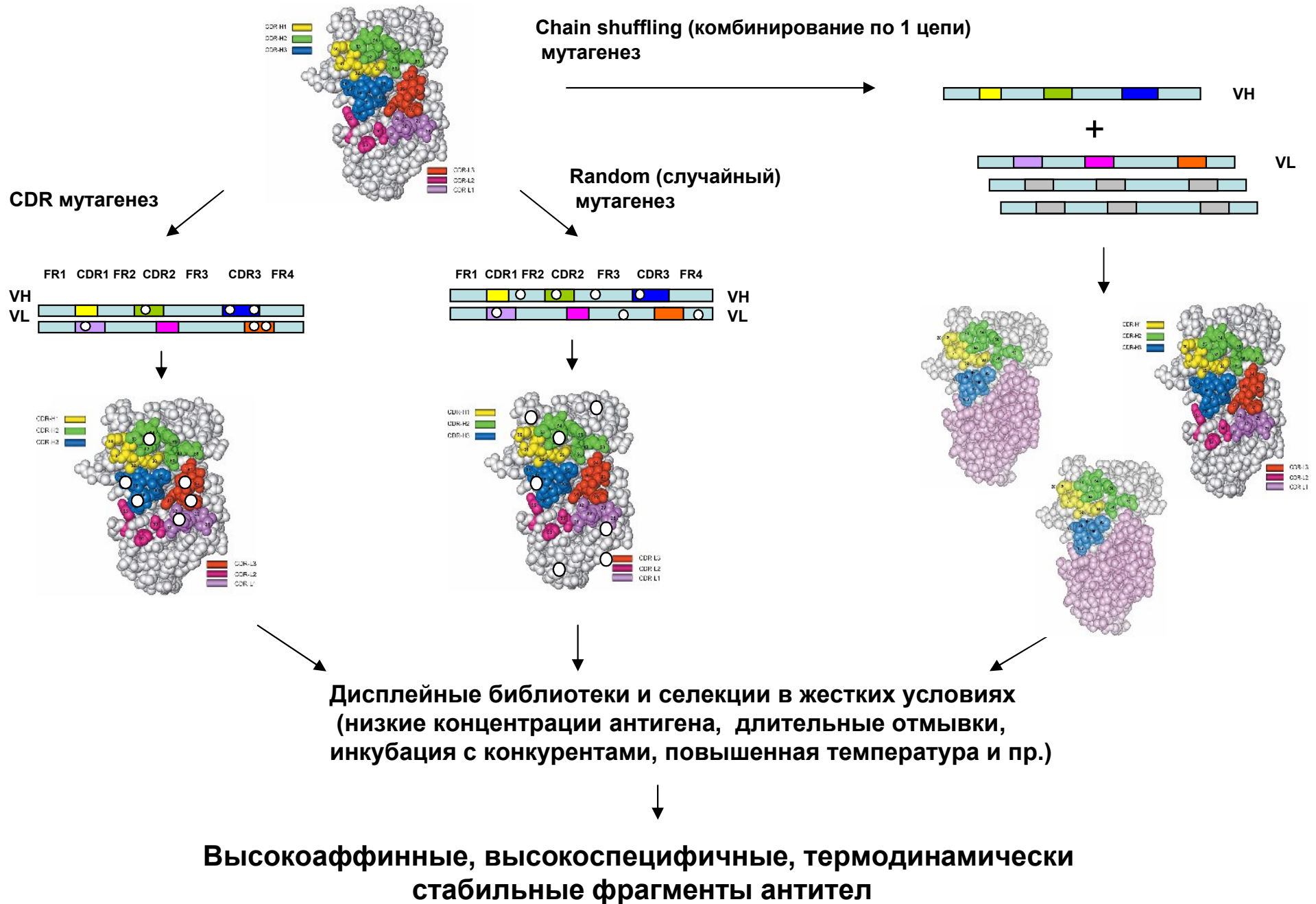


Дисплейные системы

Схематичное представление	Технология	Коммерческое использование
	<p>Фаговый (вирусный) дисплей Репертуар 10^{10}-10^{11}</p>	<p>AstraZeneca (CAT), Morphosis (Novartis), Genentech, Diax, Amgen, GlaxoSmithKline (Domantis), Eli Lilly (ImClone), Merck Serono, Affitech, BioInvent, Creative BioLabs</p>
	<p>Рибосомный дисплей Репертуар 10^{10}-10^{14}</p>	<p>AstraZeneca (CAT), Arana therapeutics</p>
	<p>Молекулярный дисплей (РНК и ДНК опосредованный) Репертуар 10^{10}-10^{14}</p>	<p>Adnexus, Isogenica, Affitech</p>
	<p>Клеточный (дрожжевой, бактериальный, на клетках млекопитающих) Репертуар 10^5-10^{10}</p>	<p>Amgen, MIT, Abbott Laboratories, Codon Device, AdiMAB</p>
	<p>In vitro beads based компартиментализация Репертуар около 10^{10}</p>	<p>MRC</p>
	<p>Комплементация ферментативных фрагментов, 2 гибридные системы, скрининг на репликах, ТАТ-секреционная система Репертуар 10^5-10^9</p>	<p>Vybion, ESBATech, Genentech, Philogen</p>



In vitro матурация антител.



Коммерческие библиотеки антител человека

Фармацевтическая компания	Формат библиотеки	Репертуар	Аффинности первичных кандидатов Kd (M) ^{a)}	Аффинности матурированных кандидатов Kd (M) ^{a)}
Genentech (Hoffman La Rosh)	синтетические, Fab	10 ¹¹	10 ⁻⁸ -10 ⁻¹⁰ [1,2]	10 ⁻¹⁰ -10 ⁻¹¹ [1]
GlaxoSmithKleine (Domantis)	синтетические, VH	более 10 ¹⁰	неизв.	неизв.
AstraZeneca (CAT)	природные, scFv	10 ¹¹	10 ⁻⁷ -10 ⁻⁹	10 ⁻⁹ -10 ⁻¹¹ [3]
Morphosis (Novartis)	синтетическая, Fab	более 10 ¹⁰	10 ⁻⁸ -10 ⁻¹⁰ [4]	10 ⁻¹⁰ -10 ⁻¹² [3]
Dyax	полусинтетическая, Fab	около 10 ¹¹	10 ⁻⁷ -10 ⁻¹⁰ [5]	неизв.
Eli Lilly (ImClone)	природная, Fab	более 10 ¹⁰	10 ⁻⁷ -10 ⁻⁸	10 ⁻⁹ -10 ⁻¹⁰ [6]
BioInvent	полусинтетическая, scFv	более 10 ⁹	10 ⁻⁶ -10 ⁻⁹ [7]	неизв.

1. Lee C. et al J.Mol.Biol. 2004, v.340, p.1073-93.
2. Fellouse F. et al J.Mol.Biol. 2007, v.373, p.924-40
3. Protein Engineering Summit (Boston) May 14-18, 2007
4. Rothe C et al J.Mol.Biol. 2008, v.376, p.1182-200
5. Hoet R. et al Nature Biotech. 2005, v.23, p.344-48
6. Lu D. et al J.Biol.Chem. 2003, v.278, p.43496-507

а) Аффинности моновалентных фрагментов

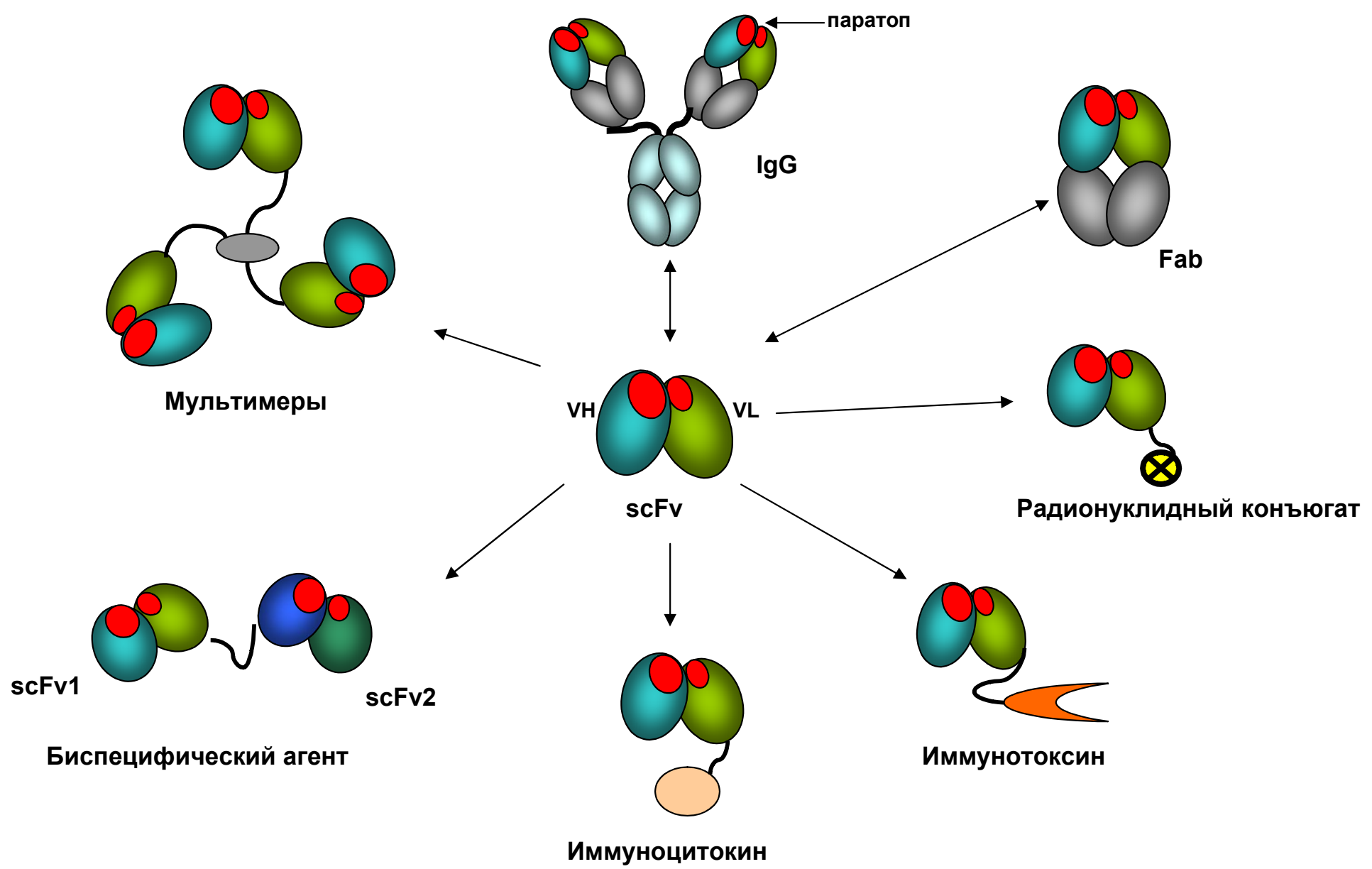


Примеры улучшения аффинности антител с использованием дисплейных библиотек

Antibody/developer	Target	Mutagenesis	Strategy	Increase in affinity/ result ^a
Vitaxin (MEDI-522)/Medarex, Gaithersburg, MD, USA	$\alpha\beta 3$	Focused on CDR	Screening	$\times 80$
Synagis (palivizumab)/MedImmune, Gaithersburg, MD, USA	Respiratory syncytial virus	Focused on CDR	Screening	$\times 100$ off-rate; $\times 5$ on-rate
RFB4/National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA	CD22	Hot-spot mutagenesis	Screening	$\times 15$
b4/12/Scripps Research Institute/ La Jolla, CA, USA	gp120	CDR walking	Selection on phage	$\times 420$ to 15 pM
C6.5/University of California, San Francisco	c-erbB2	CDR3 mutagenesis	Selection on phage	$\times 1,230$ to 13 pM
L19/University of Siena, Italy	Fibronectin	CDR3 mutagenesis	Selection on phage	$\times 1,317$ to 54 pM
G8/University of Maastricht, The Netherlands	MHC peptide	Chain shuffling and CDR3 mutagenesis	Selection on phage	$\times 18$ to 14 nM
Fab-12/Genentech, S. San Francisco, CA, USA	VEGF	CDR3 mutagenesis	Selection on phage	$\times 100$ potency
1121/ImClone System/New York	VEGF receptor	Chain shuffling	Selection on phage	$> \times 30$ to 0.1 nM
Humira (adalimumab)/ Abbott Laboratories, Deerfield, IL, USA	TNF α	Guided selection	Selection on phage	0.3 nM
A4.6.1 ^b /Genentech/ S. San Francisco, CA, USA	VEGF	Framework-region library of mAb	Selection on phage	$\times 125$
H6/University of Zurich/Switzerland	GCN4	Error-prone PCR and DNA shuffling	Selection on ribosomes	$\times 500$ to 5 pM
C11L34/University of Zurich/Switzerland	GCN4	Immune library and error-prone PCR	Selection on ribosomes	$\times 65$ to 40 pM
4M5.3/University of Illinois, Urbana, IL, USA	FITC	Error-prone PCR and DNA shuffling	Sorting using yeast	$\times 1,800$ to 48 fM
smE3/Massachusetts Institute of Technology (MIT), Cambridge	CEA	Error-prone PCR and DNA shuffling	Sorting using yeast	$\times 285$ to 30 pM/expression increases
VL-12.3/MIT	Huntington (htt) protein	Error-prone PCR/homologous recombination	Sorting using yeast	$\times 10$
14B7/University of Texas, Austin, Texas	Anthrax toxin	Error-prone PCR	Sorting using bacteria	$\times 200$ -fold improvement to 21 pM



Варианты терапевтических агентов на основе фрагментов антител



Мепротек

- Разрабатывает лекарства нового поколения на основе человеческих моноклональных антител
- Новейшие собственные и лицензированные от компании MSM технологии
- Два препарата, открытые научными сотрудниками Мепротек, находятся на стадии оптимизации и подготовке к предклиническим испытаниям
- Текущее сотрудничество:
 - ESBA Tech (Цюрих, Швейцария)
 - Гарвардский Университет (Бостон, США)
 - MSM Protein Technologies (Бостон, США)



Базис компании Мепротек



Состав – 10 человек; отобрано еще 12 кандидатов из ~30 перспективных. Большинство научных сотрудников прошло годичную стажировку в MSM в 2007-2008 гг.



Технологии Мепротек включают современные биохимические, генно-инженерные, микробиологические и клеточные методики.

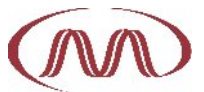
Помещения компании имеют общую площадь около 400 м², что удовлетворяет потребности обеспечения практически всех стадий процесса создания кандидатов лекарств.

Высококвалифицированный научный персонал, обеспеченный современным оборудованием, задействован в текущих программах по новым лекарствам.



Технологическая основа компании Мепротек

- Продукция нативного антигена, включая мембранные белки-мишени, для работы с фаговыми библиотеками
- Обширная практика работы с библиотеками, пройденная на базе компании MSM: команда Мепротек участвовала в разработке 4-х лекарственных антительных препаратов.
- Оригинальные синтетические scFv и Fab фаговые библиотеки, разработанные компанией Мепротек (разнообразие около 10^{11}).
- Мощная технологическая платформа матурации антител: достижение характеристик собственных лучшим разрабатываемым в мире МТА.
- Экспрессионные методы наработки фрагментов антител
- Создание полноразмерных антител человека и их продуцентов в клетках млекопитающих.



Спасибо за внимание

