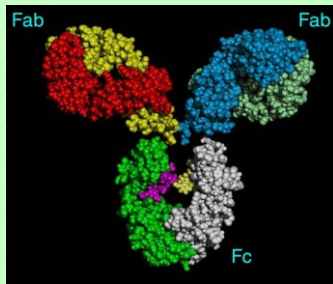
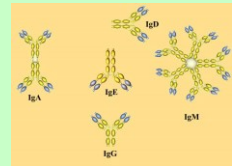


## Monoklonális ellenanyagok

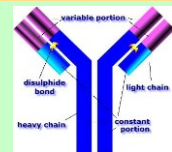


## Antitestek

Az ellenanyag molekulák nagy része az úgynevezett immunoglobulin (Ig) fehérjecsalád tagja. Feladatuk, hogy specifikusan az adott antigénhez kapcsolódva olyan folyamatokat indítsanak el ami az antigén hatástalanításához vezet:



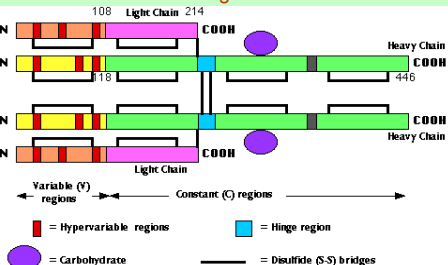
- > vírusinaktiválás
- > baktériumok agglutinálása
- > megjelölés fagocitózisra



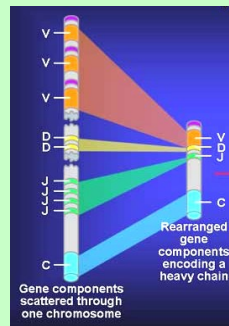
Az antigén felületén a kapcsolódási rész: epitóp

## Az antitestek fehérjeszerkezete

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



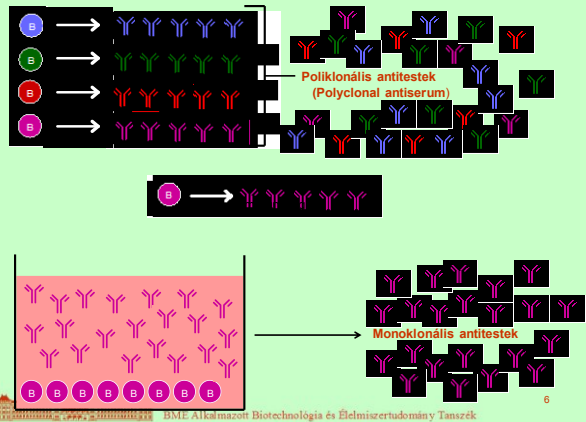
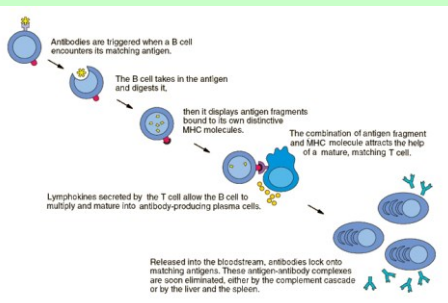
## Antitestek



A szervezet  $\sim 10^7$ - $10^9$  féle különböző antitest előállítására képes. Ennek alapja, hogy antitest doménjei sok változatban tárolódnak a génállományban, és a kiírás során ezek random módon kombinálódhatnak.

## Antitestek

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



## 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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

## Monoklonális ellenanyag előállítás menete

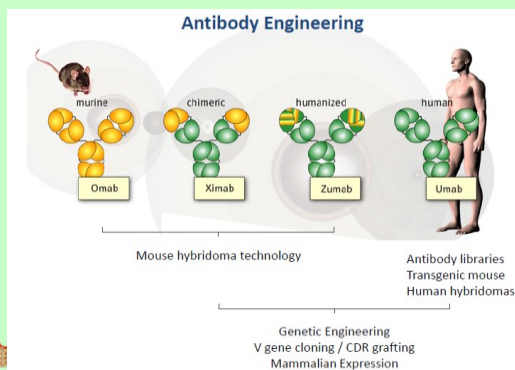
- egér/patkány beoltása antigénnel (több lépcsőben)
- lép vagy nyirokcsomó eltávolítása, homogenizálása
- lépből származó plazmasejtek + egér tumorsejtek (plazmacitoma/mielóma sejtek) fúziója
- Az ellenanyag termelő klónok azonosítása, izolálása
- A termelő hibridómák folyamatosan szaporodnak és ellenanyagot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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

## „Antitest-mérnökség”



9

## A monoklonális antitestek felhasználása

Az antitestek több célra is felhasználhatók:

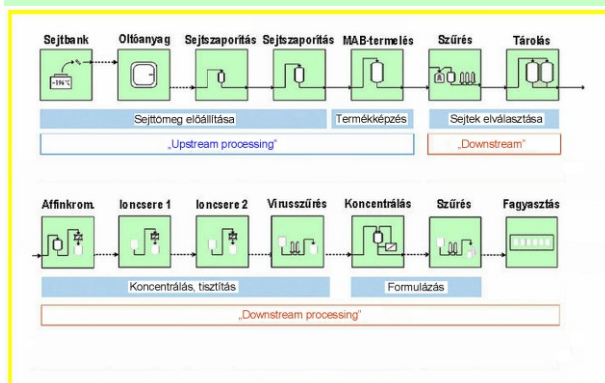
- Nem terápiás antitestek:**
  - Biokémiai kutatások
  - Immun-analitikai eljárások
  - Feldolgozási műveletekben (pl. affinitáskromatográfia)
- Humán (in vivo) felhasználású antitestek:**
  - Diagnosztikában (pl. Proscint)
  - Terápiában (elsősorban tumorok ellen)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

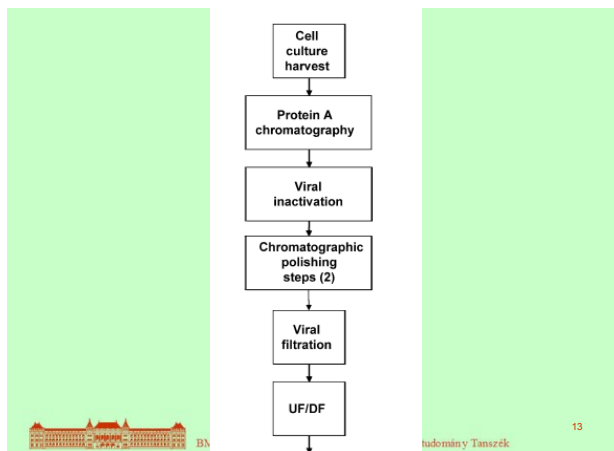
## Teljes technológia (upstream+downstream)



## 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





## Sejtek elválasztása

Centrifugálás (folyamatos, lemezes) – sejtek, nagyobb sejttörmelékek

Mélyégi szűrés – kisebb sejttörmelékek (más oldott szennyezők is adszorbeálhatnak)

Abszolút szűrés (0,45 vagy 0,2 mikron) – szilárd szemcsék, (0,2 mikron esetén baktériumok)

Vagy cross-flow mikroszűrés - az állati sejteket 0,65 µm pórusmértű mikroszűrővel választják el.

Az oldott fehérjéket a sejtek közül sóoldattal (PBS = phosphate buffered saline, foszfáttal pufferolt só-oldat) mossák ki. (diszűrés)

## Protein A-affinkromatográfia

Staphylococcus Protein-A, Fc régióhoz, elúció pH gradienssel (7→3,8, citrát), 98% tisztaság.

Előnyei:

- Szelektíven köti az antitesteket
- Nagy a kapacitása (15–30 g/liter töltet)

Hátrányai:

- Drága: 8000–10 000 USD/liter (300 l-es oszlop esetén 10 000 USD/l-rel számolva egy töltet ára 3 millió \$, amivel csak 15-20 tisztítási művelet végezhető el.)
- Toxikus, Továbbjuthat, szennyezhet az elválasztás során
- Az oszlop tisztítása nehézkes

## Kromatográfias polishing

Maradó szennyezések: Termelő sejt fehérjéi (HCP), töredezett, aggregálódott MAB, Protein-A ligand.  
Kation és anioncserélő, HIC.

KATIONCSERÉLŐ: erős kationcserélő,

Cél: a főtermék megkötése, a szennyező anyagok kimosása, azután a MAB elúciója.

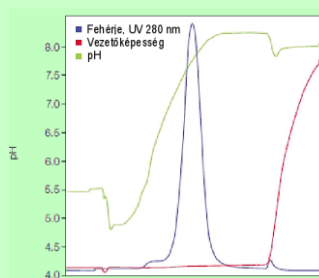
pH = 4,5-5, Mosás

Eluálás: pH-gradiens: pH 5,4→8,0 (vagy sógradiens NaCl)

A kolonna regenerálása: cc sóoldattal

## Kromatográfias polishing

MAB kromatogramja kationcserélőn



## Kromatográfias polishing

ANIONCSERÉLŐ:

Cél: a szennyező anyagok megkötése, a főtermék kötődés nélkül átmege az oszlopon. Főleg nukleinsavak.

Elúció: pH= 7,0 (75 mM foszfát)

A kolonna regenerálása: sóoldattal (0,5 M foszfát)

Modes of chromatography employed as polishing steps in mAb processes for clearing specific kinds of contaminants

Impurity	Mode of chromatography
High molecular weight aggregate	HIC, CEX
Host cell protein impurities	AEX, HIC, CEX
Leached Protein A	Hydroxyapatite, HIC, CEX
Viral clearance	AEX, CEX, HIC, HA

## Vírusmentesítés

Fizikai módszerek	
<b>Inaktiválás hőkezeléssel</b> <input type="checkbox"/> Pasztórizálás <input type="checkbox"/> Száraz hőkezelés <input type="checkbox"/> Gőzölés	<b>Eltávolítás</b> <input type="checkbox"/> Nanoszűrés <input type="checkbox"/> Kromatográfiai módszerek <input type="checkbox"/> Kicsapás
Kémiai módszerek	
<input type="checkbox"/> Solvens – Detergens eljárás <input type="checkbox"/> $\beta$ -Propiolakton <input type="checkbox"/> Jód	<b>Fotokémiai módszerek</b> <input type="checkbox"/> Metilénkék <input type="checkbox"/> Psoralen <input type="checkbox"/> Hypericin

Hőkezelés (60°C, 10h), Szolvens/Detergens módszer (30°C 4h)  
 Szűrés: 20-50 nm,



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

## Koncentráció

A fermentált MAB-koncentrációja 100–150 mg/l. A végtermékben 10-20 g/l-re van szükség, a koncentráció legkíméletesebb módja az **ultraszűrés**. A MAB móltömege 180-190 kDa, ez alatti vágású membrán szükséges.  
 (Kisebb szennyezők kimosása, puffer csere, diaszűrés)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

## Formulálás, liofilizálás

Hozzáadják a végső formulázáshoz szükséges anyagokat:

Puffer: nem illékony, pl.  $\text{PO}_4$

Ionerősség beállítása: NaCl

Fagyvédő anyagok: pl. szacharóz, mannit, glicerin

Töltőanyag: pl. glicin

(pirogénmentesek, tiszták)

Még egy mélységi szűrés.

Oldatban vagy liofilizálva kerül piacra.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

## Egy kiszertelt MAB-készítmény összetétele

Ingredient	Amount / vial	Function
Basiliximab protein	20,0 mg	active substance
potassium dihyd. phosphate	7,212 mg	buffering agent
disodium hydrogen phosphate	0,992 mg	buffering agent
sodium chloride	1,608 mg	ionic strength
sucrose pyrogen-free	20,0 mg	lyoprotectant
mannitol pyrogen-free	80,0 mg	bulking agent
glycine pyrogen-free	40,0 mg	bulking agent



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22