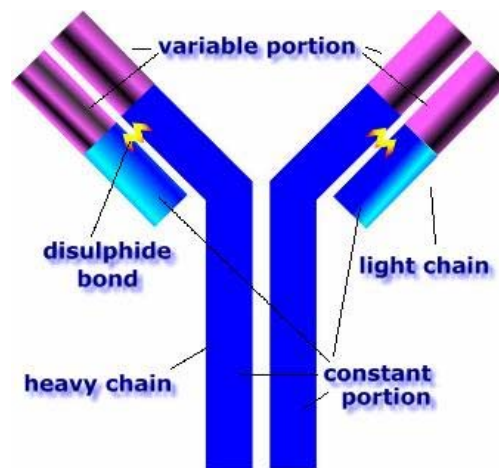


Monoklonális ellenanyagok

1. Bevezetés, antitest, ellenanyag:

Az ellenanyag molekulák nagy része az úgynevezett immunglobulin (IgG) fehérjecsalád tagjai. Feladatuk, hogy specifikusan az adott antigénhez kapcsolódva, olyan folyamatokat indítsanak el ami antigén inaktiválásához vezet. Az antitest kötődése szempontjából az antigén két részre osztható: főtömege a passzív hordozó, amelynek felületén található a felismerhető kötőhelyek, az epitópok. A szervezet ellenanyagdiverzitása hatalmas, 10^7 - 10^9 nagyságrendű különböző epitóppal reagáló antitest előállítására képes. Gyakorlatilag minden egy fehér vérsajt eltérő antitestet szintetizál.



1. ábra: antitest vázlatos képe

Ahhoz, hogy megértsük a monoklonális ellenanyagok szerepét először le kell fektetnünk pár alapdefiníciót, amelyeknek a segítségével, sokkal könnyebben megértjük ezt az anyagrészt.

Epitóp: Az antigén-molekula azon része, melyhez az antitest kötődik.

Antigén: Azokat az anyagokat nevezzük antigénnek, melyek a gerincesek szervezetében antitestek (ellenanyagok) termelését, illetve immunválaszt indítanak el. Az elnevezést Detre László magyar mikrobiológustól származik, vélhetőleg az anti(testet) generál szavakból. Mára ismertté vált, hogy az immunrendszer nem csak antitestekből áll. A modern definíció szerint minden olyan anyag antigén, amit az adaptív immunrendszer felismer. Szorosabb értelemben, immunogén az az anyag, ami választ képes kiváltani az immunrendszerből, míg az antigének olyan anyagok, amik specifikus antitestekhez kötődnek. Nem minden antigén vált ki immunogén választ, de minden immunogén egyben antigén is. Az immunogén választ kiváltó antigént komplett vagy teljes antigénnek nevezzük.

Az antigének általában fehérjék vagy poliszacharidok, ezek a baktériumok, vírusok és más mikroorganizmusok testét felépítő anyagok, vagy toxinok is lehetnek. A nem mikrobiális külső eredetű (exogén) antigének közé tartozhatnak a pollen, idegen (pl. tej-, tojás-) fehérje,

átültetett szövetek vagy szervek fehérjéi, beleértve a vérátömlesztéskor bejutott vörsejtek felszínén található glikoproteineket is.

Az önállóan nem immunogén antigéneket, amelyek csak hordozó (carrier) fehérjéhez kapcsolódva immunogénekként, **inkomplett antigénnek** (félantigénnek vagy hapténnek) nevezük. A félhaptének vagy haptidok pedig hordozóhoz kötve immunogénekként, de ellenanyaggal nem adnak látható reakciót. Az ellenanyaghoz specifikusan kapcsolódva képesek gátolni annak a teljes antigénnel való reakcióját, ezért hívják ezeket blokkoló antigénnek is.

Ellenanyag: Az ellenanyagok olyan fehérjemolekulák, amelyeket az immunrendszer termel annak érdekében, hogy felismerje és semlegesítse a szervezetbe került idegen anyagokat, mint például a baktériumokat vagy vírusokat. Minden egyes ellenanyag egy idegen molekula egyedi részét (epitóp) ismeri fel és kötődik hozzá. Az ellenanyagok az immunrendszer humorális immunválasza során keletkeznek. Az immunglobulinok olyan glikoproteinek az immunglobulin szupercsaládban, amelyek ellenanyagként funkcionálnak. Az ellenanyag és immunglobulin elnevezéseket gyakran egymás helyettesítésére használják. Előfordulnak a vérben és a szöveti folyadékban, csakúgy, mint számos váladékban. Szerkezetüket tekintve globulinok (a vérfehérje elektroforézis γ -régiójában található). Az ellenanyagokat az immunrendszer B sejtjeiből származó plazmasejtek termelik és választják ki. A folyamat során a B sejtek a nekik megfelelő antigént megkötik, aktiválódnak és plazmasejtté differenciálódnak. Az aktiválódáshoz rendszerint a T helper sejtek támogatása is szükséges.

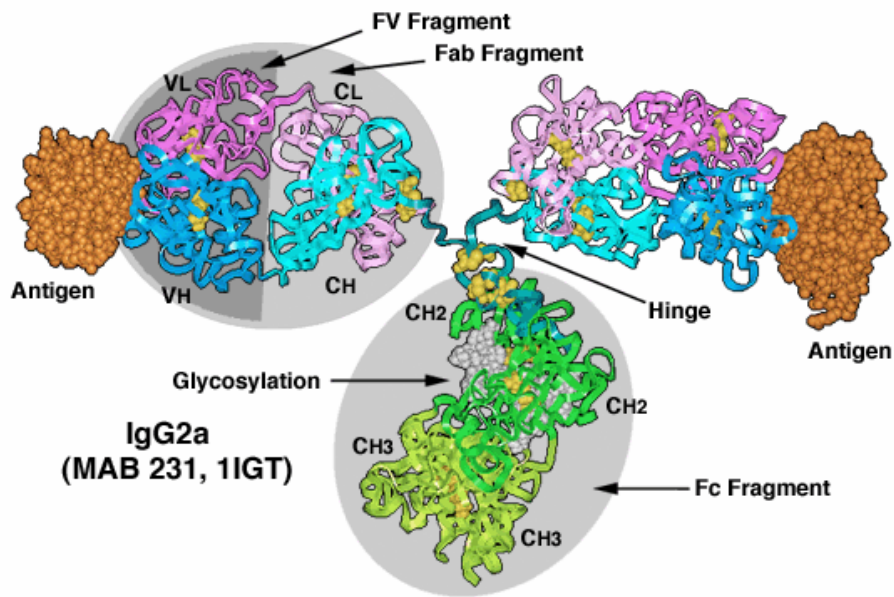
Az immunglobulinok nagy molekulaméretű plazmafehérjék, melyekhez gyakran cukorláncok kapcsolódnak (lásd glikoziláció) az N-terminális (mindegyik ellenanyag) és elvéve az O-terminális (IgA1 és IgD) aminosav-oldalláncokhoz. Az ellenanyagok alapváza egy monomer, de az ellenanyagok lehetnek monomer, dimer, trimer, tetramer, pentamer formában is. A monomer egy "Y"-alakú molekula, amely két egyforma **nehéz láncból** és két egyforma **könnyű láncból** áll. Az egyes láncokat egymással diszulfid-hidak kötik össze.

Emlősök esetén a nehézláncnak öt típusa van: γ , δ , α , μ és ϵ . Ezek az immunglobulinok osztályát határozzák meg. Az α és γ nehézláncok kb. 450 aminosavból, míg a μ és ϵ kb. 550 aminosavból állnak. Minden nehézláncnak egy konstans régiója van, amelyik azonos az adott osztályba tartozó immunglobulinok esetén, és egy variábilis régiója, amely eltérő az egyes B sejtek immunglobulinja esetén, de azonos az adott B sejt által termelt immunglobulinok vonatkozásában. A γ , α és δ nehézláncok konstans régiója három **doménből** és egy **kapocs régióból (hinge)** áll; a μ és ϵ nehézlánc 4 doménből áll. A variábilis domént – minden nehézlánc esetén – egy domén alkotja. Ezek a domének kb. 110 aminosav hosszúak.

A könnyűláncok csupán két típusát ismerjük: λ és κ . Emberben ezek hasonlóak egymáshoz, de minden egyes immunglobulinban csak egyikük fordul elő. Minden könnyűlánc két doménből áll, egy konstans és egy variábilis domén alkotja. A könnyűláncok hozzávetőlegesen 211-217 aminosavból állnak.

Az "Y"-alakú monomer két nehéz- és két könnyű láncból áll. Ez összesen hat-nyolc konstans domént és négy variábilis domént jelent. Az "Y" ágainak végeit Fab fragmensnek hívják, ami a nehéz- és a könnyű-lánc egy-egy variábilis és konstans doménjéből áll és együttesen alkotja az antigén kötő helyet a monomer N-terminális végén. A két variábilis domén a nekik megfelelő antigént köti.

A papain (enzim) a monomert két Fab (fragment antigen binding) fragmensre és egy Fc (fragment crystallizable) fragmensre hasítja. Egy másik endopeptidáz, a pepszin a kapocsrégió alatt hasítja a molekulát, így egy F(ab)₂ fragmens és egy Fc fragmens keletkezik.



2. ábra: IgG domének

Összefoglalva, a szervezetben található immunglobulinok az antigének rendkívül széles körét tudják megkötni. Ezt a diverzitást az ún. szomatikus rekombináció hozza létre. Ebben a folyamatban bizonyos gének (variábilis (V), diverzitás (D) és kapcsoló (joining; J) a nehézlánc, ill. csak V és J gének a könnyűlánc esetén) szinte végtelen kombináció révén kapcsolódnak. Ezzel a folyamattal a V, D, és J régiók kapcsolódása a variábilis régiót diverzitását biztosítja, ami magyarázza, hogyan generál immunglobulint a B sejt szinte végtelen számú eltérő antigénnel szemben.

Az Fc fragmens, ami az "Y" alapját adja, két nehézláncból áll, és két, ill. három doménből áll (attól függően, hogy milyen izotípusról van szó). Az Fc rész a különböző sejtek receptoraihoz és a komplement proteinekhez kapcsolódik. A kapcsolódás következtében az ellenanyag különböző hatásokat vált ki, mint például opszonizáció (lefedés), sejtlyzisz, degranuláció (hízósejt, basofil- és eozinofil-granulociták) és egyéb folyamatokat. A nehéz- és könnyűlánc variábilis régióját mesterségesen egymáshoz lehet kapcsolni és így meg lehet alkotni az ún. egyláncú variábilis fragmenst (**single chain variable fragment; scFv**), amely az eredeti immunglobulin antigénkötő képességét mutatja.

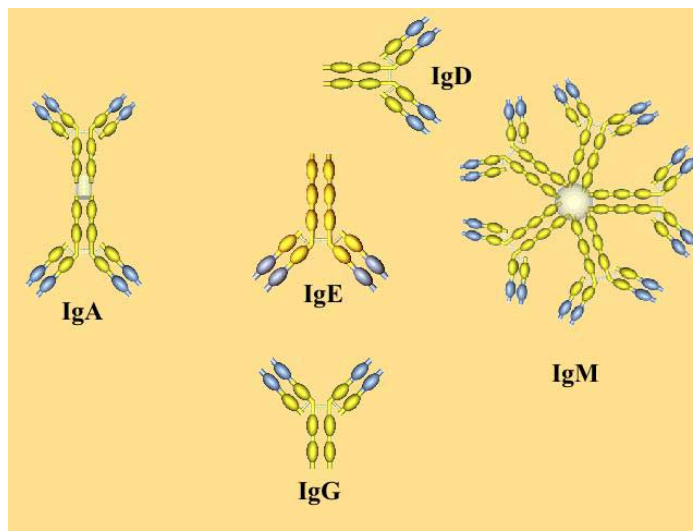
Az immunglobulin koncentráció megközelítő mennyiségi meghatározását a vérfehérjék elektroforézisével végzik. Ezzel a módszerrel a vérplazma fehérjét albuminra, alfa-globulinokra (1 és 2), béta-globulinokra (1 és 2) valamint gamma-globulinokra választják szét, töltésüknek és méretüknek megfelelően. Az immunglobulinok a gamma régióban vannak. Mieloma és néhány más betegség esetén egy adott immunglobulin rendkívül nagy koncentrációban van jelen, ami monoklonálisnak tekinthető, és elektroforézissel egy éles sávot ad.

1.1 Izotípusok

Az immunglobulinokat a nehézlánc konstans doménjai alapján **öt osztályba**, vagy izotípusba sorolhatjuk: IgG, IgA, IgM, IgD, és IgE. (A könnyű láncnak is vannak izotípusai – lambda és kappa –, de ezek nem módosítják az immunglobulinok osztályba sorolását, ezért gyakran figyelmen kívül hagyják őket). Az immunsejtek egy része ezekkel az immunglobulinokkal annak alapján tud kapcsolódni, hogy milyen, az IgG, IgA, IgM, IgD, és IgE konstans részéhez kapcsolódó receptort fejez ki a sejt felszínén. Egy B limfocita által termelt ellena-

anyagok a nehézlánc vonatkozásában különbözhetnek egymástól, illetve előfordul, hogy ugyanakkor több osztályba tartozó immunglobulint is termel a sejt.

Mindazonáltal ezek az immunglobulinok megegyeznek az antigénkötő képességük szempontjából, amit a variábilis régió kódol. Ahhoz, hogy az óriási számú különböző specificitású ellenanyag megjelenjen a szervezetben és védje azt a számtalan idegen anyaggal szemben, szervezetünk sok millió, egymástól eltérő B limfocitát állít elő. Fontos tisztázni, hogy amennyiben egy olyan rendszer biztosítaná ezt a sokszínűséget, amelyben minden egyes eltérő variábilis szakaszt egy önálló gén kódolna, akkor a teljes genom sem lenne elég erre a célra. Ezzel szemben, amint azt Susumu Tonegawa 1976-ban kimutatta, a B limfocák genomjának egyes részeiben olyan szerkezeti változások (gén-rekombinációs folyamatok) zajlanak le, amelyek az immunglobulinok változékonyságát biztosítják. Tonegawa ezért a felfedezéséért orvosi Nobel-díjat kapott 1987-ben.



3. ábra: Izotípusok

IgM

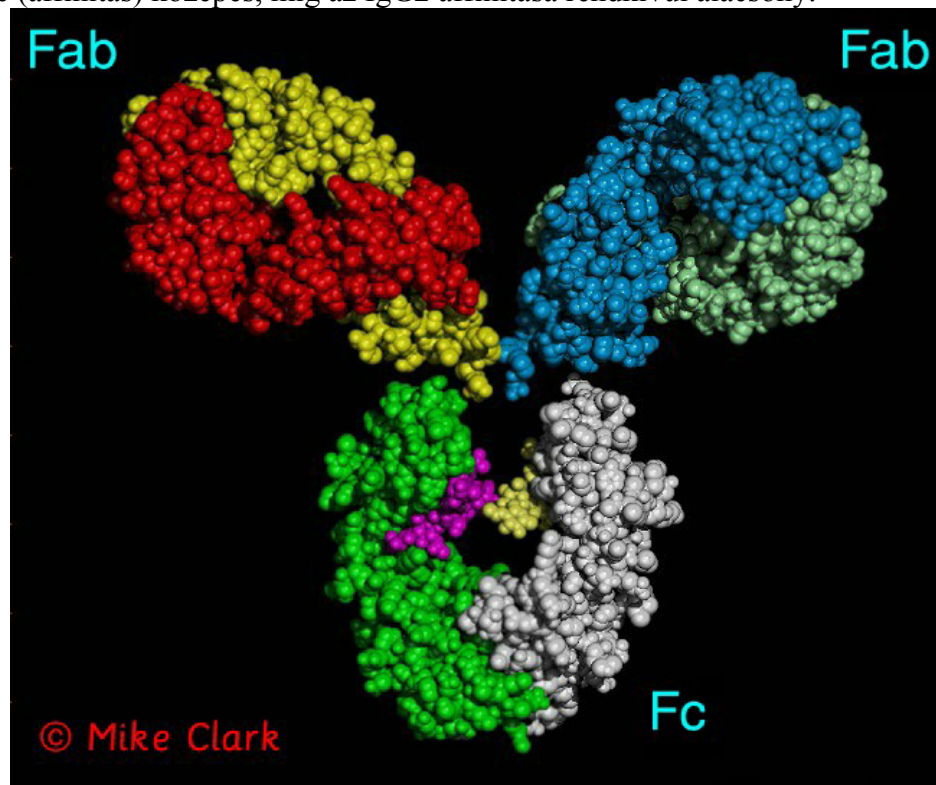
Az IgM olyan polimer szerkezetű molekula, amelyben több monomer immunglobulin kovalens kötéssel, diszulfid-híd révén kapcsolódik egymással, általában pentamert, ritkán hexamert képezve. A polimer szerkezet miatt a molekula igen nagy méretű, molekulatömege eléri a 900 kD-t (pentamer forma). A pentamerhez a legtöbb esetben egy ún. J lánc is kapcsolódik, míg a hexamerben térszerkezeti okok miatt J lánc nem található. Tekintettel arra, hogy minden egyes monomer két antigént képes megkötni, egy pentamer IgM molekula elméletileg 10 antigén megkötésére képes, bár a valóságban ez az állapot az antigének térbeli gátlása miatt nem következik be. Nagy mérete miatt nehezen kerül ki a véráramból, és ezért a szövetközi térben kis koncentrációban van jelen. Az IgM elsődlegesen a vészerumban található, bár a hozzá kapcsolódó J lánc miatt a nyálkahártyák felületére is szekretálódik. Polimer szerkezete miatt nagy aviditással (= több ponton kapcsolódó molekulák esetén az eredő kötési erősség, az egyes kötések affinitásának összege) köti az antigéneket, és ugyancsak hatékony a komplement rendszer aktiválásában is. Az őssejtek genomjában az IgM nehézlánc konstans régióját kódoló génszakasz (μ) közvetlenül a variábilisért felelős gének után helyeződik el, és ezért a B limfociták érése során bekövetkező rekombinációs mechanizmusok eredményeképpen az IgM lesz az első immunglobulin, amelyet a sejt kifejez.

IgD

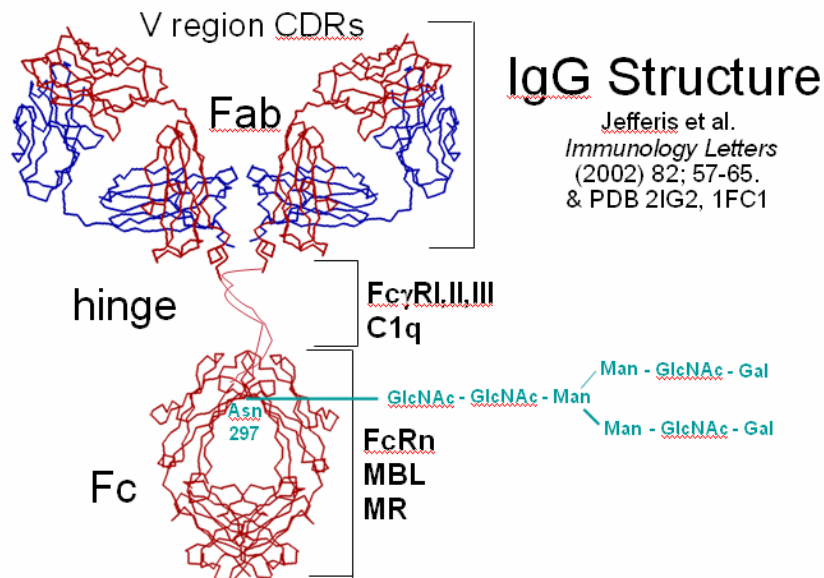
Az IgD a legkisebb mennyiségben termelődő immunglobulin. Az érett, de még antigénnel nem találkozott (naiv) B limfociták sejtmembránjában a fehérjék 1%-át alkotja (és az IgM-el együttesen fejeződik ki), ill. a szérumban is igen kis mennyiségben van jelen. Az IgD szerkezetileg monomer immunglobulin, és a δ nehézlánc alkotja. Szerepe egyelőre nem ismert, sőt azok a kísérleti egerek, amelyek nem termelik ezt az immunglobulint teljesen egészséges immunrendszerrel rendelkeznek.

IgG

Az IgG egy olyan monomer immunglobulin, amely két nehéz- és két könnyű-láncból áll. Minden molekula két antigént képes megkötni. Ez a legnagyobb mennyiségben előforduló immunglobulin, amely mintegy felerészben a vérben, illetve a szövetek közti folyadékban található. Az immunglobulinok közül csak ez az izotípus képes a méhlepényen (placentán) keresztül a magzatba jutni. Ez a folyamat – amit anyai immunitásnak is nevezünk – biztosítja, hogy az élet első néhány hetében az immunológiai értelemben is éretlen újszülött legyőzze a környezetében jelenlévő kórokozókat. (Az első heteket követően a csecsemő saját maga termeli az ellenanyag-molekulákat, amelyekkel képes a saját szervezetének védelmére.) Az IgG számos patogénhez kapcsolódik, így vírusokat, baktériumokat és gombákat köt, és velük szemben megvédi a szervezetet egyrészt a komplement rendszer aktiválásával (klasszikus út), másrészt a kórokozók opszonizációját (fagocitózis) és toxinjaik semlegesítését okozza. Emberben 4 alosztálya található: IgG1 (66%), IgG2 (23%), IgG3 (7%) and IgG4 (4%). -az IgG1, IgG3 és IgG4 könnyen keresztüljut a placentán. Az IgG3 a leghatékonyabb komplement-aktiváló, ezt követi ebből a szempontból az IgG1 és IgG2. Az IgG4 nem aktiválja a komplement rendszert. - az IgG1 és az IgG3 erősen kötődik a fagocita sejtek Fc receptorához. Az IgG4 kötési képessége (affinitás) közepes, míg az IgG2 affinitása rendkívül alacsony.



4. ábra: IgG izotípus szerkezete



5. ábra: IgG izotípus részletes szerkezete

IgA

Az IgA a vér immunglobulinjainak 15-20%-át képviseli, bár alapvetően a különböző nyálkahártyák (légzőrendszer, gyomor- és bélcsatorna, nemi utak) felszínére szekretálódik. Szintén előfordul az anyatejben, könnyben és a nyálban. Ez az immunglobulin a testfelszínre jutott, lenyelt vagy belégzett patogénekkal szemben fejt ki védő tevékenységét. Az IgA nem aktiválja a komplement rendszert és csak kismértékben opszonizál (fagocitózis elősegítése). A vérben keringő IgA jelentős része monomer, de dimer szerkezet is található belőle. A nehézláncot az α génszakasz kódolja a genomban. Ember esetén két alosztálya fordul elő, az IgA1 (90%) és az IgA2 (10%) amelyek a konstans régió összetételében különböznek. Az IgA1 a többi immunglobulinhoz hasonlít, míg az IgA2 molekulában a nehéz- és könnyű-láncok nem a kovalens diszulfid-hiddal, hanem nem-kovalens kötésekkel kapcsolódnak. Bár az IgA2 számában alacsonyabb mennyiségben van jelen, a szekréciókban dominál.

A szekréciókban található IgA dimerként van jelen. A két monomer IgA molekula mellett további két peptidlánc is megtalálható benne: ezek egyike a J lánc ("join"; kapcsoló), amely a két monomer IgA-t összeköti. A másik peptidláncot szekretoros komponensnek hívják, melyet a nyálkahártya epitél sejtje termel és akkor kapcsolódik a dimer IgA-ra, amikor az egy sajátos mechanizmus révén a sejten keresztül a nyálkahártya felszínére kerül. Számos esetben nemcsak dimer, de trimer és tetramer IgA-t is ki lehet mutatni.

IgE

Az IgE egy olyan monomer immunglobulin molekula, amelynek nehézláncát az ϵ génszakasz kódolja. Jelentős mértékben glikozilálódik, molekulamérete: 190 kD. Az IgE molekula olyan erősen kötődik a basofil granulociták és a szöveti hízósejtek felszínén lévő receptorokhoz, hogy a termelését követően szinte csak ott lehet kimutatni, a vérbeli koncentrációja rendkívül alacsony. Az IgE alapvető szereppel bír az azonnali túlérzékenységi reakcióban és a paraziták (férgek) elleni immunitásban. Nem aktiválja a komplement rendszert, hőre érzékeny.

2. Monoklonális antitestek:

2.1 Bevezetés

Monoklonitásról akkor beszélhetünk, ha az ellenanyag molekulák egyetlen B-limfocita klón termékei. Homogének (antigénspecifitás, affinitás, izotípus) szempontjából. Nagy előnyük, hogy igen nagy mértékben kiszámítható hatással és kevés mellékhatással rendelkeznek. Előnye a poliklonális ellenanyaggal szemben, hogy a meghatározott specificitású és izotípusú ellenanyagok nagy mennyiségben és azonos minőségben („pharmacology-grade”) állíthatók elő. Jelentős szerepük a biokémia, a molekuláris genetika, és a gyógyászat területein van.

A monoklonális antitestek (MAb vagy Moab) a monospecifikus antitestek, amelyek azonosak, hiszen egyféle immunrendszerbeli sejt klónok termékei, egyetlen sejtöstől származnak.

2.2 Felfedezések:

Először a Paul Ehrlich a 20. század elején feltételezte, hogy ha lenne egy „ügynök”, aki szelektíven megtudná célozni a szervezetben a betegséget okozó toxint, az nagyban segítené a szelektív gyógyítást.

Az 1970-es években, a B-sejtes többszörös melanóma (rákos megbetegedés) már ismert volt. Azt már akkor sikerült megállapítani, hogy ezek a rákos B-sejtek egységes típusú ellenanyag termékei (paraprotein). Ezt használták nagyon sokáig tanulmányozásra, de ekkor még nem volt lehetséges a konkrét antigénhez megfelelő antitestet találni.

1973 Jerrold Schwaber ember-egér hibrid monoklonális antitest előállítási eljárást írt le.

1975 Georges Köhler, César Milstein, és Niels Kaj Jerne (hibridóma technológia, 1984-ben Nobel díjat kaptak)

1988 Greg Winter úttörő munkája a monoklonális antitestek humanizálásával kapcsolatban

2.3 Hibridóma sejtermelés története:

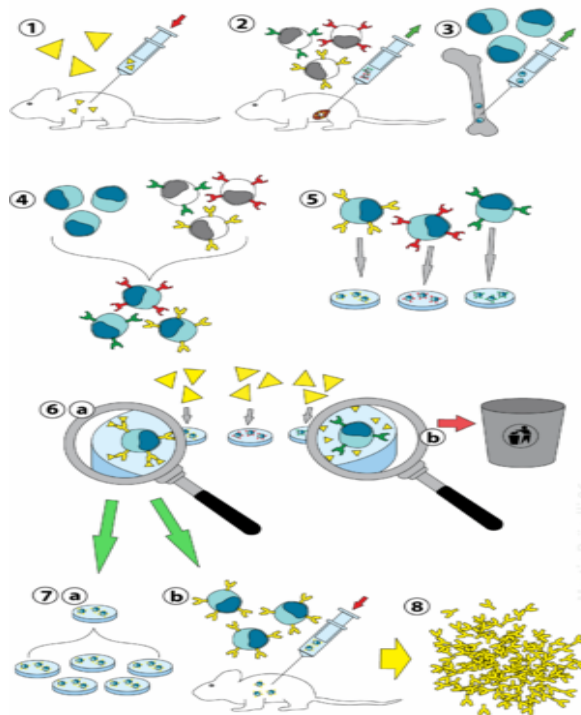
1975-ben a César Milstein, Georges Köhler és Niels Jerne tette először közzé a monoklonális antitestek létrehozásának az elvét. 1984-ben orvosi Nobel-díjat kaptak. Az eljárás alapja a fúzió alapult, miszerint megpróbálták egy ellenanyagot termelő B-sejtet, sejteket egy myeloma sejtvonallal egyesíteni (hibridóma technológia). A fúzió célja a kétféle sejt tulajdonságainak egyesítése volt. Az adott tulajdonságú antitestet termelő B-sejtet hiába izoláljuk, sejttenyészetben nem osztódik. A mielóma sejtek viszont korlátlanul osztódnak (immortality). Egyesítésükkel tehát egy bizonyos antitestet termelő és korlátlanul szaporítható sejtvonalat kaphatunk.

A monoklonális antitestek termelése során egy specifikus antigénnel kezelnek egy egeret (lásd a 6. ábra 1. része). Ez az egerben immunválasz kialakulásához vezet és elkezdenek a B-limfociták, az ellenanyagok termelődni, amelyek reagálnak az antigénnel. Több lépcsős immunizálással a kívánt antitestet termelő B-sejtek száma nagymértékben növelhető. Ezek feldúsulási helye a lépben és a nyirokcsomókban van. Az kivett lépből (6. ábra 2. rész), a B-limfocita sejteket elkülönítik és kivonják, majd fuzionáltatják egy úgynevezett plazma sejttel, amelyeket egy myeloma (plasmacytoma)-származék sejtvonalból

származtattak (3 és 4 rész a 6. ábrán) és ezután kapják az úgynevezett hibridóma sejtvonalatokat (5 rész).

Ezután a monoklonális antitestek kinyeréséhez, kiválasztják azokat a hibridóma sejtvonalatokat, amelyek a legjobban kötődnek az antigénhez (6. rész). Az életben maradt sejtvonalatokat tárolják, és a sejt felülűszót rendszeresen leveszik, ha szükséges (7. rész).

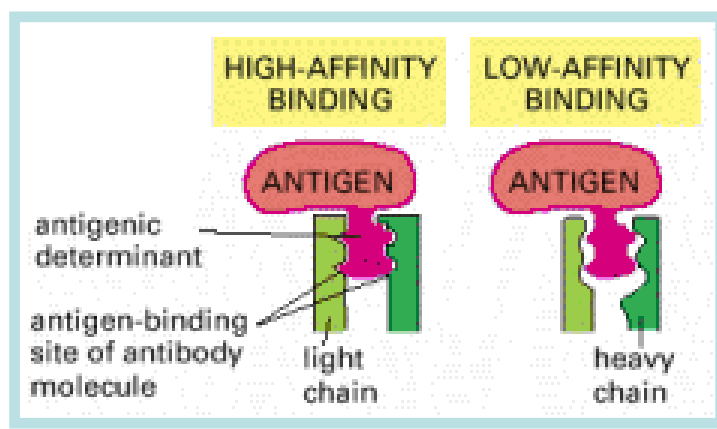
Hybridom - Technik



6. ábra: Monoklonális antitest termelés hibridóma eljárással

A poliklonális és monoklonális ellenanyagok jellemzői

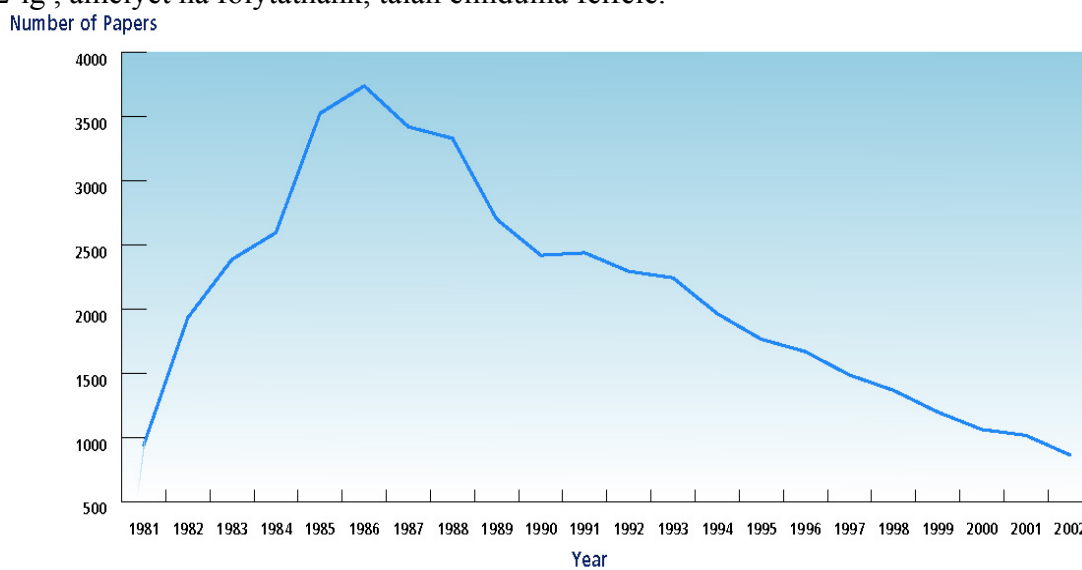
	Poliklonális ellenanyag	Kis affinitású monoklonális ea.	Nagy affinitású monoklonális ea.
Felismert antigén determinánsok száma	Több (gyakori keresztreakciók)	Egy (de gyakori keresztreakciók)	Legtöbbször egy
Specifitás	polispecifikus	gyakran polispecifikus	monospecifikus
Affinitás	Változó (többféle ellenanyag)	kicsi	nagy
Nem-specifikus immunglobulinok koncentrációja	magas	alacsony	alacsony
Hozam	magas	alacsony	alacsony
Előállítási költség	alacsony	magas	magas
Standardizálhatóság	nem, ill. nehézkes	egyszerű	egyszerű
Mennyiség	limitált	korlátlan	korlátlan
Gyakorlati felhasználhatóság	módszer függő	gyenge	kiváló



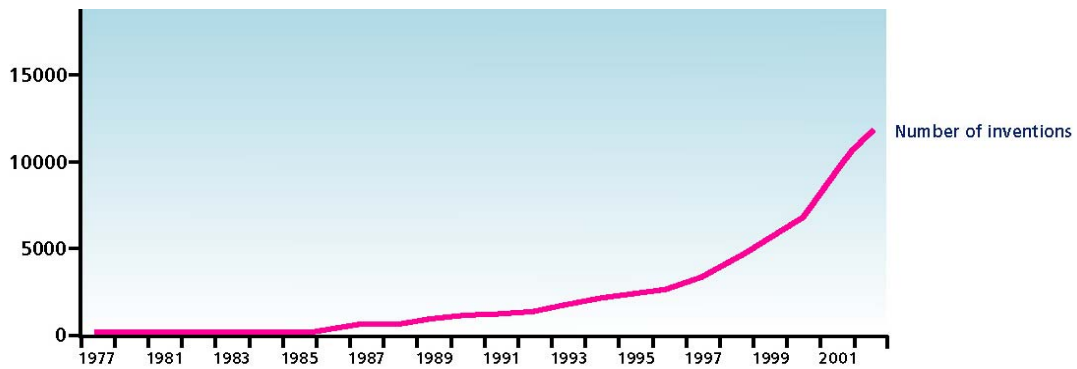
7. ábra: Nagy és kis affinitású monoklonáli ellenanyag

2.3.1 Statisztikák, monoklonális antitestekre vonatkozóan:

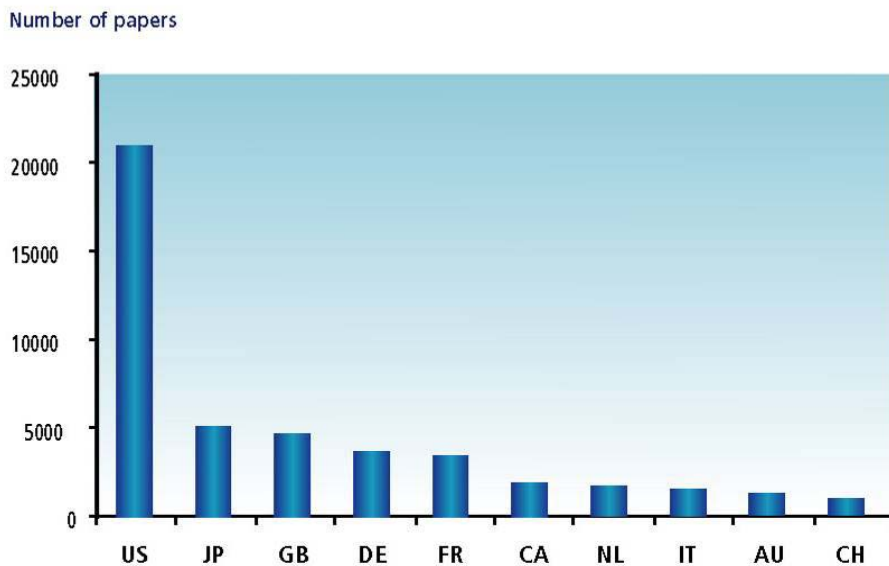
Alábbi ábrán láthatjuk, hogy az 1986-1987 évekig milyen növekvő tendenciával jelentek meg az ezzel kapcsolatos cikkek, folyóiratok. Ezután folyamatos csökkenés állt be 2002-ig, amelyet ha folytatnánk, talán elindulna felfelé.



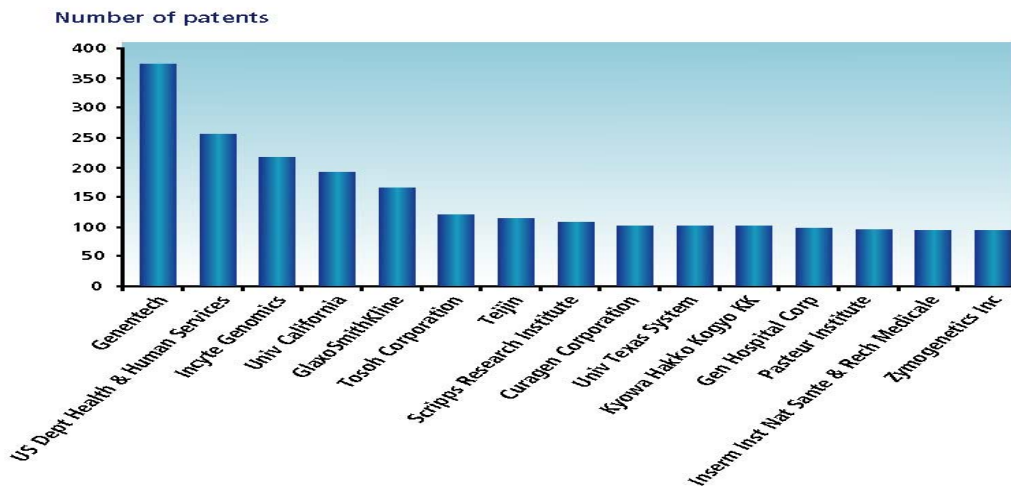
A szabadalmak számának alakulása ennek függvényében:



A szakcikkek nemzetek közötti megoszlása:



A szabadalmak eloszlása:



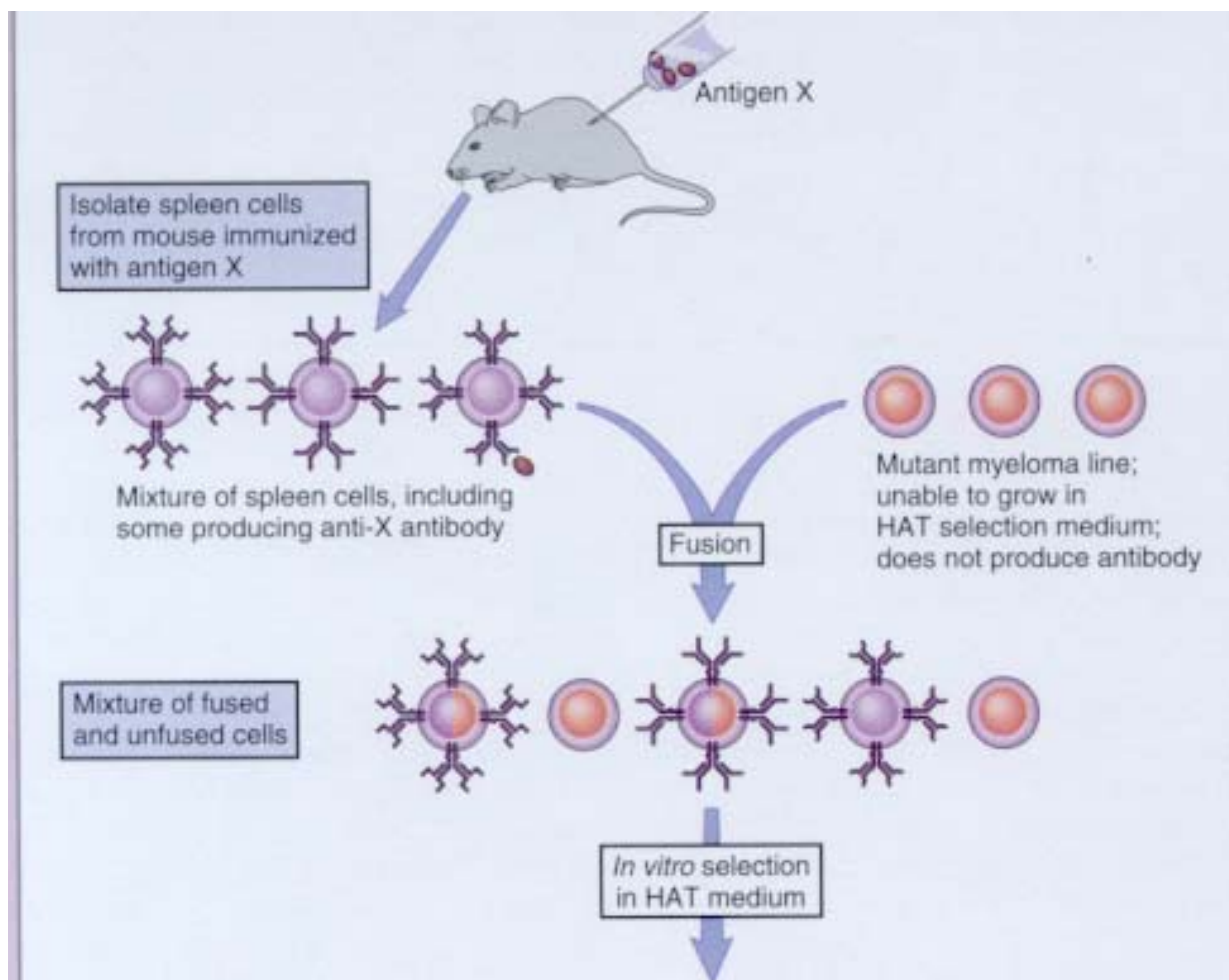
Organisation	Number of Monoclonal Antibody inventions	Total number of inventions all subjects	%ge Monoclonal Antibody patents
Curagen Corporation	100	288	34,7%
Genentech	370	1156	32,0%
Protein Design Labs	9	33	27,3%
Incyte Genomics	215	1054	20,4%
Zymogenetics Inc	92	501	18,4%

2.4 A monoklonális ellenanyag termelése (részletesen):

A molekulákat felismerő monoklonális ellenanyagot termelő hybridóma sejtvonalakat az adott anyagra immunizált egerek lépéből származó B limfocitáinak és halhatatlan, korlátlanul szaporodó (tumor) mielóma sejtek fúziójával nyerik. A fúziót többféle hatással, ezek kombinációjával hozzák létre:

- nyomással (centrifugálás során a több száz g hatására a sejtek összepréselődnek)
- elektromos/elektromágneses tér hatására a sejtek összetapadnak és egyesülnek
- kémiai anyagok (poli-etilén-glikol, ionok) segítségével

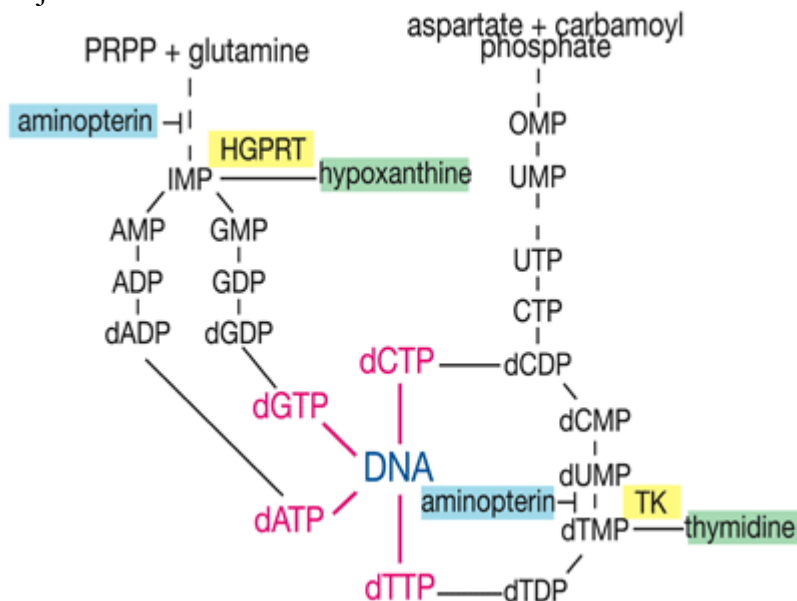
A továbbiakban a hibrideket elkülönítik a jelen lévő nem-fuzionált sejtektől. A termelő plazmasejtek jelenléte nem zavaró, mert ezek nem osztódnak, így néhány nap alatt kipusztul-



8. ábra: Monoklonális antitest termelés hybridóma eljárással

nak. Az osztódó mielóma sejtek viszont túlnőhetik a hibridómákat, ezért eliminálásukra egy nukleotid anyagcsere-markert dolgoztak ki.

Az emlős sejtek DNS bázisainak bioszintézise két ponton is gátolható aminopterinnel (vagy metotrexáttal). Ez az inhibitor gátolja mindkét purinvázis bázis bioszintézisét, és a timin létrejöttét is. Az inhibíció megkerülhető, ha a tápoldatba hipoxantint, illetve timidint adunk, mivel ezek egy-egy enzimes reakcióban átalakulva pótolhatják az inhibíció miatt hiányzó molekulákat. A szelekció azon alapul, hogy a fúzióhoz olyan mielóma sejteket használnak, amelyekben ezt a két enzimaktivitást (HGPRT és TK) indukált mutációval eliminálták. Ezeknél tehát hiába van jelen a tápoldatban hipoxantin és timidin, a kisegítő DNS bázis-termelési utak nem működnek. A közeget a három tápoldat komponens (hipoxantin, aminopterin, timidin) nevéből HAT-médiumnak nevezik, a szelekciós eljárást pedig HAT trick-nek. Ebben a tápoldatban csak azok a sejtek szaporodnak, amelyek a fúzió révén tartalmazzák az antitest-termelő sejtek sértetlen HGPRT és TK enzimeit.



9. ábra: a HAT-trick anyagcsereútjai

Az izolált hibrideket szövettenyésztő 96 vagy 24 lyukú tálcákon limitáló hígítás módszerével klónozzák (minden tenyésztő lyukba egyetlen, egyféle genetikai tulajdonsággal rendelkező sejt kerül). A mikrobiológiai gyakorlatban hosszúnak számító két-három héten belül a mikrokultúrák már elegendő számú sejtet tartalmaznak, ahhoz, hogy kellő mennyiségű ellenanyagot termeljenek a rögzült sejtek felülúszóiból történő kimutatáshoz. A kimutatás történhet ELISA, RIA vagy FACS speciális immunanalitikai módszerekkel egyaránt. Ettől fogva a megfelelő monoklonális antitest termelő klónokból léptéknövelési kísérletek keretében lombikos, forgópalackos és/vagy fermentoros tenyészeteket állítanak elő, majd az ezekből kapott nagy mennyiségű felülúszókat az antitesteket tisztított és koncentrált formában kinyerik.

A tenyésztés során a konkrét sejtvonal 10-75 cm²-es lombikokban tenyésztett sejtjeivel rollertenyészeteket oltanak 40-60 ml induló térfogattal 1-2x10⁵ sejt/ml kezdeti sejtszámmal. A sejttenyészetekhez naponta friss médiumot adva 4 nap alatt 300-1000 ml végtérfogatig lehet tenyészteni, a sejtszám a maximálisan 10⁶ sejt/ml. A sejtek életképességét nem a mikrobiológiában megszokott szélesztéssel, hanem mikroszkóppal, tripánkéssel megfestett tenyészetekben, Bürker kamrás számlálással vizsgálják (a halott sejtek citoplazmája festődik, az élő, ép sejthártyájuk nem) és a viabilitási százalék megállapításával jellemzik.

A fermentorban a sejteket oxigénigénye messze elmarad a baktériumok és gombák igényeitől. A sejtek membránját a fellépő nyírófeszültségek könnyen károsítják, ezért csak a legalacsonyabb, a sejtek kiülepedését még éppen megakadályozó alacsony fordulatszámon kell kevertetni (20-50 fordulat/perc). A pH-t a vérre jellemző 7,0 - 7,4 tartományban tartja az automatika és kis mennyiségű gázbeáramlás mellett (0,01 - 0,05 vvm, a fermentor vezérlő egysége az OD-nak és a pH-nak megfelelően adagolja szükség szerint a levegőt, amit néha szén-dioxiddal egészítenek ki) tenyészthetünk. A fermentáció során a pH csökkenne a sejtek laktát-termelése miatt, de ezt a puffer-rendszerek ellensúlyozzák (elsősorban a NaHCO_3), egyébként a sejtek jobban tolerálják a pH csökkenést, mint a pH növekedést.



10. ábra: Sejtfermentor

Az emlőssejt-fermentorok legnagyobb mérete nem haladja meg a néhány ezer litert, az emlőssejtek nagy érzékenysége miatt. A monoklonális antitestek termelését az immunológiai gyakorlatban már rutinszerűen alkalmazott módszerekkel (pl. ELISA) lehet nyomon követni. Így akár spektrofotometriásan is mérhető az antitestek koncentrációja.

A sejtenyészetek felülúszói ideális esetben is csak 10-20 µg/ml koncentrációban tartalmazzák a termelt antitesteket, így sokszor protein A/protein G affinitás-kromatográfiás tisztításuk és koncentrációjuk is szükségessé válik.

A hibridóma technológia hátránya, hogy alkalmazásához elengedhetetlen az állatok immunizálása, azaz szervezetükben az immunválasz kiváltása a megfelelő antigénnel szemben. A különféle kombinatorikus technológiák felhasználásával azonban ez kiküszöbölhető: a kutatás céljaira legmegfelelőbb antitest kiválasztására irányuló módszerek in vitro - azaz élő szervezet bevonása nélkül - fejleszthetők. Főleg a gyógyszerkutatásban és fejlesztésben nagy jelentőségűek.

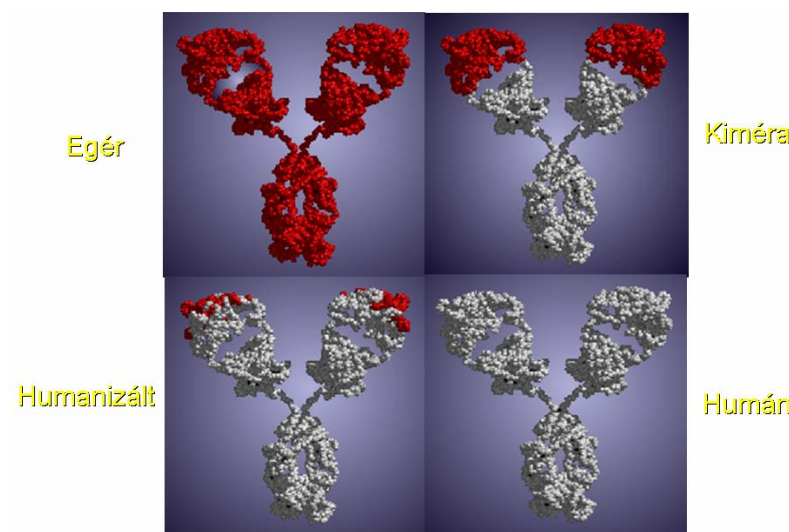
2.5 Monoklonális antitestek, mint gyógyszerek?

A monoklonális antitesteket sokféle célra alkalmazzák,

- Biokémiai kutatások
- Immun-analitikai eljárások
- Feldolgozási műveletekben (pl. affin-kromatográfia)
- Diagnosztikában (pl. Proscint)
- Terápiában (elsősorban tumorok ellen)

E felsorolásban az utóbbi két esetben a monoklonális antitesteket a páciens szervezetében, in vivo kell alkalmazni. Felhasználásuk igen nagy specifitást tesz lehetővé, mivel rendkívüli szelektivitással kizárólag egyetlen epitóphoz kötődnek → magic bullet = varázsgolyó, amely mindig célba talál. A MAB készítmények nem elsősorban a kórokozók ellen készültek, hanem az emberi szervezet saját, nem kívánatos működésű sejtjei ellen. Az első négy terápiás monoklonális antitest például: Simulect (Basiliximab), és Zenapax (Daclizumab) immunszuppresszánsok; a Reopro (Abciximab): percutan coronária intervencióhoz társuló cardiális ischaemiás szövődményekre, a Herceptin (Trastuzumab): HER2 pozitív emlőrák ellen.

Ugyanakkor az emberi szervezetbe bevitt MAB problémákat is okoz. Az emberi antigénnel immunizált egérben termelt antitestek az egérre specifikus aminosav-szekvenciákkal bíró glikoproteinek, tehát emberbe adva fajidegen fehérjeként immunválaszt indukálnak. A probléma elkerülhető az monoklonális ellenanyagok továbbfejlesztésével.



11. ábra: A monoklonális antitestek fejlődése

Murine (=rágcsáló) típusú antitestek:

A kezdeti terápiás antitestek murine antitestek voltak és a gyógyításban kudarchoz vezettek. Kudarc okai: rövid in vivo felezési idő, limitált bejutás a tumor sejtbe, elégtelen funkció visszaállítás. A fő probléma mégis az, hogy kicsi volt citotoxikus stimuláló hatása, valamint az anyaga az ismételt beadás után gyakran erős allergiás rohamot, rosszabb esetben anafilaxiás sokkot okozott. Ezért modern rekombináns DNS technológiákkal tovább fejlesztették: Hibridóma → *E. coli* → emlős sejt.

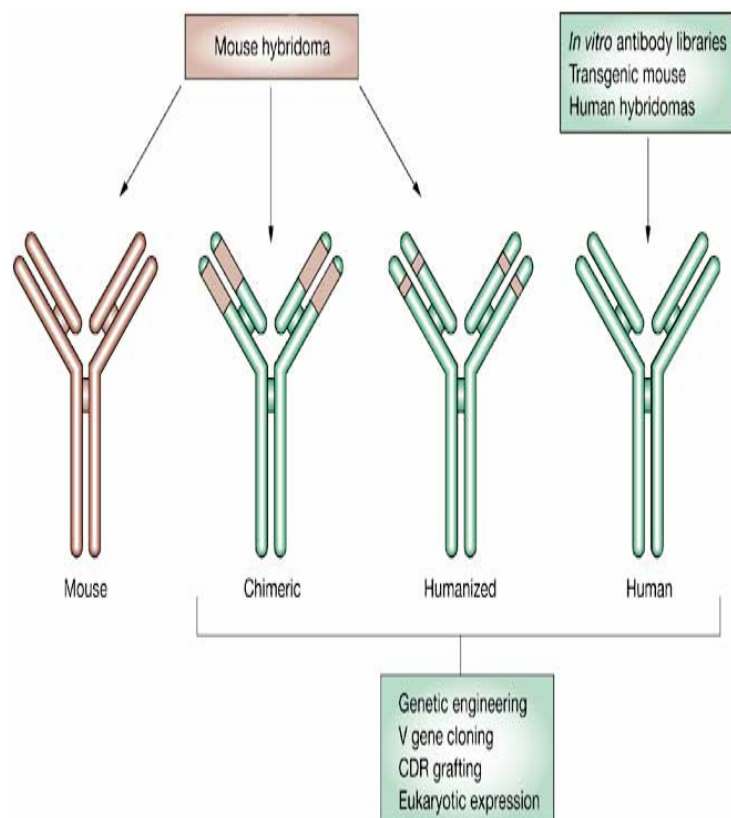
Kiméra és humanizált monoklonális antitestek:

A kiméra antitestek murine antitest variábilis régióját egyesítették a humán konstans régióval. Az eredmény 65%-ban humán antitest (kappa könnyűlánc, nehézlánc). Humanizált antitesthez akkor jutunk a murine antitestből "átvisszük" a hipervariábilis domént a humán antitestbe. Ez már 95%-ban humán eredetű, de valamiért a kötődés az antigénnel gyengébb, valamint az affinitása is kisebb, mint a kiindulási murine antitestnek. A kötődést erősítésére mutációkat hoztak létre a CDR régióban.

Humán monoklonális antitestek:

Előállítására transzgenikus egeret, vagy fág display könyvtárakat használnak:

12. ábra: A monoklonális antitestek fejlődése



A transzgenikus állat egy vagy több bejuttatott idegen gént hordoz a genomjában. Az idegen gén beviteléhez rekombináns DNS technikákat alkalmaznak. A struktúrgénen kívül a beültetett DNS más, a működéshez szükséges szekvenciákat is tartalmazhat, amelyek biztosítják, hogy az idegen gén beépüljön a gazda DNS-be, hogy helyesen fejlődjen ki a gazda sejtjeiben.

Kétféle transzgenikus állat előállítási módszer ismeretes:

1. Embriónális őssejtek (ES) transzformációja, a transzformált őssejtek hólyagcsíra állapotú embrióba juttatása, majd az embrió visszaültetése az anyába.

2. A transzgenének a megtermékenyített petesejtbe injektálása.

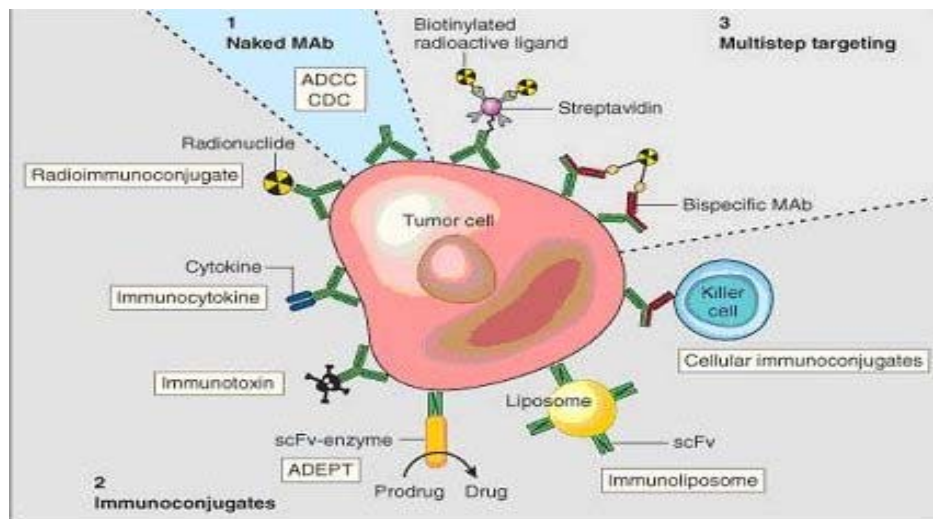
A rekombináns DNS technológiával módosított sejtvonalakból nyert humán monoklonális antitesteknek a rekombináns DNS technológiával előállított termékek különböző minőségi-tisztasági követelményeinek kell megfelelniük. Ezek az előírások

jelentősen különböznek aszerint, hogy a termékek humán in vivo felhasználásra kerülnek (terápia, megelőzés és in vivo diagnosztika), avagy a lista első három helyén felsorolt in vitro alkalmazásra.

2.6 A monoklonális antitest terápia

Monoklonális antitestek a tumor-terápiában

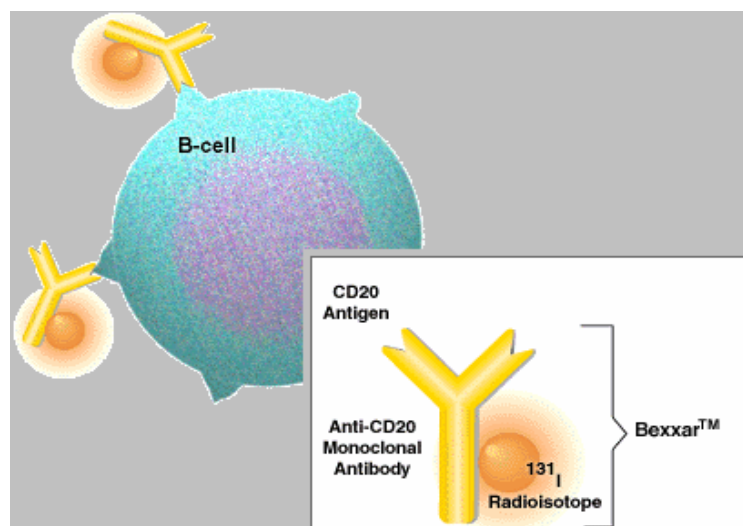
A tumorsejtek felszínén sajátos fehérje markerek, úgynevezett epitópok találhatók. A monoklonális antitesteket laboratóriumban állítják elő, oly módon, hogy felismerjék ezeket az antigéneket a rákos sejtek felszínén. A monoklonális antitestek ezután „rátapadnak” ezekre a fehérjékre. Ettől a sejt vagy elpusztul, vagy beindulnak azok az immunmechanizmusok, amelyek a tumorsejt pusztulását okozzák. A terápiában kihasználhatják a MAB eredeti, immunrendszerben betöltött funkcióját (naked MAB), vagy felhasználhatják „hordozóeszközként” különböző sejtkárosító ágensek célba juttatására.



13. ábra: A MAB tumor-terápia mechanizmusai

Radio-immunterápia:

A monoklonális antitest terápia hatásosságának fokozása volt a célja a monoklonális antitesthez konjugált radioizóp kezelés kifejlesztésének. A módszer alapja: a lymphoid daganatok sugárzásérzékenyek, így a monoklonális antitesthez kötött radioizotóp CÉLZOTT sugárterápiát tesz lehetővé. Emellett a MAB és a radioizotóp B-sejt károsító hatása összeadódik. Manapság két radioaktív izotóppal konjugált anti-CD20 készítmény áll rendelkezésre: A tositumomab (Bexxar) monoklonális anti-



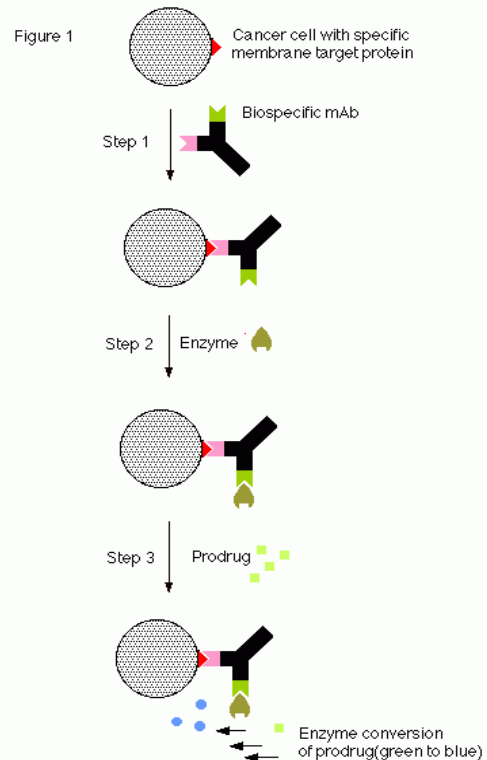
CD20 antitest és ^{131}I konjugátum (75-80 % remisszió). A másik készítmény az ibritumomab (Zevalin), ami monoklonális anti-CD20 antitest és ^{90}Y konjugátum (67% remisszió).

Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT):

Az antitesthez enzimet kötnek, amely a később szisztémásan bevitt, ártalmatlan prodrug vegyületet lokálisan alakítja át citotoxikus, hatékony metabolittá.

Immuno-liposzómák:

Az immuno-liposzóma antitest és liposzóma összekapcsolását jelenti. A liposzómák képesek gyógyszerek vagy egyéb terápiás nukleotidok bezárására és szállítására. A MAB kötőhelyével célzottan kötődnek a tumorsejtekre és felbomlásukkal lokálisan károsítják azokat. Ez a technológia még gyerekcipőben jár, de már sikeresen alkalmazták in vivo körülmények között is tumorsejtek növekedésének gátlására.



2.6.1 Esettanulmány: MAB a non-Hodgkin limfóma kezelésében

A monoklonális antitest a gyógyszerek aránylag új osztályába tartozó szer és kifejlesztése áttörést hozott a non-Hodgkin limfómás betegek ellátásában. A monoklonális antitest kezelés a non-Hodgkin limfómák gyakori formáiban használatos. Általában kemoterápiával kombinálják, de bizonyos esetekben önmagában is adható. A monoklonális antitest kezelés fokozza más kezelések (általában a kemoterápia) hatékonyságát. Indolens non-Hodgkin limfómában növeli a remisszió hosszát. Bebizonyosodott, hogy agresszív non-Hodgkin limfómában a monoklonális antitest kezelés a standard kemoterápia mellett növeli a beteg esélyét a gyógyulásra és javítja a túlélést az önmagában végzett kemoterápiához képest.

Az infúzióban adott monoklonális antitest kezelés mellékhatása az első alkalmazáskor jelentkezik, majd a későbbi adagok során csökken és kemoterápiával való együttes alkalmazása nem növeli jelentősen a kemoterápia mellékhatásait. A néhány óránál tovább tartó mellékhatás ritka és nincs klinikai jelentősége.

Hatásmód:

A kemo- és sugárterápiától eltérően, melyek kevésbé specifikusan hatnak, a monoklonális antitest célzottan pusztítja a non-Hodgkin limfómás sejteket, a többi sejtet pedig nem károsítja. A non-Hodgkin limfóma kezelésében használt, monoklonális antitest például felismeri a CD20 antigént. A CD20 a kóros B-sejteken található, melyek a non-Hodgkin limfómák leggyakoribb formáira jellemzők. Amikor az anti-CD20 monoklonális antitest hozzákapcsolódik

a CD20-hoz egy B-sejt felszínén, a kapcsolódás vagy közvetlenül elpusztítja a sejtet, vagy riasztja a szervezet természetes védekező mechanizmusait. A monoklonális antitest jó hatásfokkal találja meg a limfóma sejteket, amelyeket azután a szervezet immunrendszere elpusztít.

Adagolás és alkalmazás:

A non-Hodgkin limfómában használt monoklonális antitest kezelést intravénásan alkalmazzák, infúzióban, amelyet rendszerint egy kari vénába vezetnek be. Ha a kemoterápiát monoklonális antitesttel kombinálják, a monoklonális antitestet a kemoterápia előtt adják be, az egyes kezelési ciklusok elején.

Ha a gyógyszer adása közben jelentkezik mellékhatás, az infúziót le lehet lassítani, sőt le is lehet állítani, amíg a mellékhatás elmúlik. Az első kezelésnél a betegek éjszakára a kórházban maradnak, vagy az egész napot ott töltik. A rákövetkező kezeléseket már gyorsabbak és kevés mellékhatást okoznak. A későbbi kezeléseket a betegek járóbetegként kapják, és még aznap hazamehetnek.

2.7. Passzív immunizálás:

A passzív immunizálás lényege, hogy más élőlény által létrehozott antitesteket viszünk be a megvédendő szervezetbe (lásd a vakcina-gyártás fejezetet). Monoklonális antitesteket is adhatunk oltóanyagként, ha a kórokozó jól definiált, egyetlen immuntípushoz tartozó törzs, amit egyféle ellenanyaggal leküzdhetünk (pl. Synagis, az RSV = Respiratory Syncytial Virus ellen).

Regisztrált molekulárisan targetelt szerek

Név	Típus	Támadás-pont	Indikáció
<u>Alemtuzumab</u> (Mabcampath)	<u>Monoclonal antibody, humanized</u>	CD52	CLL, CML
<u>Daclizumab</u> (Zenapax)	<u>Monoclonal IgG1, chimeric</u>	IL-2 R	rák, <u>leukemia</u>
<u>Basiliximab</u> (Simulect)	<u>Monoclonal IgG1, chimeric</u>	IL-2 R	
<u>Rituximab</u> (Rituxan/Mabthera)	<u>Monoclonal IgG1, chimeric</u>	CD20	rák, <u>lymphoma</u>
<u>Trastuzumab</u> (Herceptin)	<u>Monoclonal IgG1, humanized</u>	HER2/ <u>neu</u>	emlő-, <u>prostatarák</u> , NSCLC
<u>Gemtuzumab</u>	<u>Monoclonal IgG4, humanized</u> <u>Calicheamicin</u> nel konjugált	CD33	rák, <u>leukemia</u>
<u>Ibritumomab</u> (γ^{90})	<u>Monoclonal IgG1, murine</u>	CD20	rák, <u>lymphoma</u>
<u>Edrecolomab</u>	<u>Monoclonal IgG2, murine</u>	<u>EpCAM</u>	CRC

2.8. A monoklonális antitestek nevezéktana:

Prefix	Target		Source		Suffix
variable	-o(s)-	bone	-u-	human	- <i>mab</i>
	-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	-oxo-	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				

Az előtag nem hordoz semmiféle információt, 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, amiről tudjuk, hogy monoklonális antitestről van szó. (monoclonal antibody)

2.9 Gazdaság, ipar, piaci állás:

A terápiás monoklonális antitestek piaca körülbelül 24 milliárd USD (15,2 milliárd €, 2007-ben) forgalmat üt meg. A becslések szerint a növekedési potenciál igen nagy, a 2012-re várható érték eléri a 47 milliárd dollárt (29,8 milliárd €). Jelenleg 21 antitest termék van forgalomban, ezek közül öt uralja a piacot (Avastin [Genentech], Herceptin [Genentech], Humira [Abbott Laboratories], Remicade [Centocor Pharmaceuticals] és a Rituxan [Genentech]). Ezek együttesen körülbelül a forgalom 80%-át adják. Jelentős stratégiai fejlesztési lépésnek bizonyult, hogy integrálódott a piacra az egyik legnagyobb felvásárló is, a Cambridge Antibody Technology (CAT).

A megnövekedett kereslet a terápiás antitest termékek után azzal jár, hogy új, vegyipari és biotechnológiai szereplők lépnek be a piacra. Szükség lesz továbbá a bioreaktor kapacitások nagyléptékű fejlesztésére is.

A terápiás célú rekombináns fehérjék piaci rangsora:

Product Class	2003 (\$ Millions)	Annual Growth Rate %
EPO-s	7 763	6.1
<i>Monoclonal Antibodies</i>	<i>6 721</i>	<i>31.4</i>
Insulin and Insulin Analogues	5 487	17.9
Interferons	3 935	5.8
Hormones (inc. GH)	3 317	8.3
Blood Factors	2 354	5.5
Enzyme Replacement Therapies	1 057	14.6
Interleukins	219	3.2
Others	121	N/A

2.10 Antitest és hozzá tartozó gyógyszerek gyártása, validálása, előállítás feltételei és előírásai

Ez a fejezet gyógyszerkönyvi részleteket tartalmaz, nyelvezete és megközelítése idegen a biomérnökök számára – NEM VIZSGAANYAG!

2.8.1 Előállítás – általános előírások:

Az előállítás alapja egy manipulált sejtvonalt tartalmazó letéti sejtbankból (master cell bank) és a gyártást közvetlenül szolgáló szaporító-sejtbankból (working cell bank) álló rendszer. Az előállítási módszert a fejlesztés során validálni kell abból a célból, hogy a Anticorpora monoclonalia ad usum humanum Ph.Hg.VIII. – Ph.Eur.6.0 – 2 által leírt „kórokozók átvitele a késztermék által” elkerülhető legyen. Az előállítás során használt biológiai anyagokat és sejteket jellemezni kell, és ezen anyagoknak, ill. sejteknek meg kell felelniük az „Az állati eredetű fertőző szivacsos agyvelőbetegség-kórokozók ember- és állatgyógyászati készítmények útján történő átviteli kockázatának minimálisra csökkentése” című általános fejezet követelményeinek. Különösen, ha az embergyógyászati célra szánt monoklonális antitesteket emberi és állati eredetű anyagokból állítják elő.

Amennyiben immunogén anyagot alkalmaznak, úgy azt jellemezni kell, az immunizációs módszert pedig dokumentálni kell.

A fejlesztés során az előállítási módszert a következő szempontok szerint validálni kell:

- az előállítási folyamat (beleértve a fermentációs, a tisztítási és – adott esetben – a fragmentálási eljárást is) állandósága;
- a kórokozók eltávolítása vagy inaktiválása;
- a termékből, illetve az előállítási folyamatból származó szennyezők (például gazdasejt eredetű fehérje és DNS, az A-protein, antibiotikumok, sejttenyészet-komponensek);
- a monoklonális antitest specificitása és fajlagos aktivitása;

- nem endotoxin jellegű pirogének;
- a tisztítási eljárás eszközeinek (pl. az oszlop anyaga) ismételt felhasználhatósága; a követelményeket vagy elfogadási határokat a validálás függvényében állapítják meg;
- adott esetben a konjugálásnál alkalmazott módszert.

A termék jellemzése. A terméket a megfelelő információk [szerkezet integritása, izotípus, aminosavsorrend, másodlagos szerkezet, szénhidrát-rész, diszulfidhidak, konformáció, specificitás, affinitás, fajlagos biológiai aktivitás és heterogenitás (izoformák jellemzése)] megszerzése érdekében jellemezni kell. Alkalmos analitikai technikák sorozatát alkalmazzák, kémiai, fizikai, immunkémiai és biológiai vizsgálatokat beleértve (pl. peptid térkép-vizsgálat, N- és C-terminális aminosavsorrend meghatározás, tömegspektrometria, kromatográfiás, elektroforézis és spektroszkópiás technikák). Az emberi szövetekkel szembeni keresztreakcióval kapcsolatos információk nyerése érdekében is vizsgálatokat kell végezni.

A fragmentálással vagy konjugálással módosított termékek esetében az alkalmazott módszerek antitestre kifejtett hatását is jellemezni kell.

Amennyiben a gyártási köztitermékek tárolásra kerülnek, úgy mindegyik köztitermék-re a stabilitási adatokkal alátámasztott lejárati vagy eltarthatósági időt kell megállapítani.

Anticorpora monoclonalia ad usum humanum Ph.Hg.VIII. – Ph.Eur.6.0 – 3 előírásai:

Biológiai értékmérés: A biológiai értékmérést a monoklonális antitest tervezett hatásmechanizmusával mutatott korrelációja alapján kell kiválasztani.

Referenciakészítmény: Az azonosítás, a vizsgálatok és a tartalmi meghatározás referenciakészítményeként olyan gyártási tételek alkalmazhatók, amelyek bizonyítottan stabilak és a klinikai vizsgálatok során megfelelőnek bizonyultak, illetve ilyen gyártási tételt reprezentálnak. A referenciakészítményt „A termék jellemzése” pontban megadottak szerint kell jellemezni, kivéve, hogy a keresztreakciót nem szükséges minden egyes referenciakészítmény tételnél vizsgálni.

2.8.2 Forrássejtek:

A forrássejtek fúziós partnerek, limfociták, mielómasejtek, falósejtek és a rekombináns monoklonális antitest expressziójáért felelős gazdasejtek lehetnek. Az anyasejt eredetét és sajátságait dokumentálni kell, amely információkat tartalmaz a donor egészségi állapotáról és arról, hogy milyen fúziós partnereket használtak (pl. mielóma sejtvonal, humán limfoblastoid B-sejtvonal). Amikor csak lehetséges, a forrássejteket idegen és endogén kórokozókra irányuló szűrővizsgálatnak kell alávetni. A vizsgálatokhoz használt vírusokat a származási fajtól és szövetről függően kell kiválasztani.

A monoklonális antitesteket termelő sejtvonal alkalmasságát a következőképpen kell igazolni:

- a sejtvonal történetének dokumentálása, beleértve a sejtfúziót, az immortalizációt vagy transzfekciót és a klónozási eljárást;
- a sejtvonal jellemzése (pl. fenotípus, izoenzim-analízis, immunkémiai és citogenetikai markerek);
- az antitest lényeges sajátságainak jellemzése;
- az antitest-elválasztás stabilitása, figyelembe véve az antitest sajátságait és az expresszió és a glikoziláció mértékét a populáció-kétszereződési szint vagy a rutinszerű termeléshez alkalmazott generációs szám eléréséig, illetve ezeken a szinteken túlmenően;

- rekombináns DNS-termékek esetén a gazdasejt/vektor genetikai és fenotípusos sajátságainak stabilitása, a populáció-kétszereződési szint vagy a rutinszerű termeléshez alkalmazott számú generációs szám, illetve ezeken a szinteken túlmenően.

2.8.3 Sejtbankok:

Anticorpora monoclonalia ad usum humanum Ph.Hg.VIII. – Ph.Eur.6.0 – 4. előírásai:

A törzs-sejtbank a monoklonális antitesteket termelő sejtvonal homogén szuszpenziója, amelynek egyenlő térfogatrészeit eltartás céljából egyszeri művelettel egyedi tartályokba osztják szét. A szaporító sejtbank a törzs-sejtbankból, véges átolással nyert sejtek szuszpenziója, amelynek egyenlő térfogatrészeit eltartás céljából egyszeri művelettel egyedi tartályokba osztják szét. A termelés utáni sejtek (post-production cells) előállítása populáció-kétszereződési szint vagy a rutinszerű termeléshez alkalmazott generációs szám eléréséig, illetve ezeken a szinteken túlmenően történik.

A törzs-sejtbankon következő vizsgálatokat szükséges elvégezni: életképesség, azonosítás, sterilitás (baktériumok, gombák, mikoplazmák), a termelt antitestek sajátságainak jellemzése. A nem endogén eredetű vírusszennyezést alkalmas *in vivo* és *in vitro* módszerekkel vizsgáljuk. A retrovírus- és más endogén vírustartalmat alkalmas *in vitro* módszerekkel vizsgáljuk. A szaporító sejtbankon a következő vizsgálatokat kell elvégezni: életképesség, azonosítás, sterilitás (baktériumok, gombák, mikoplazmák). A vírusszennyezettséget alkalmas *in vivo* és *in vitro* módszerekkel vizsgálják. Az első szaporító sejtbank esetében ezeket a vizsgálatokat a belőle származó termelés utáni sejteken végezzük el. Az első szaporító sejtbankot követő szaporító sejtbankok esetében egyszeri *in vivo* vagy *in vitro* vizsgálat végezhető közvetlenül a szaporító sejtbankon vagy a termelés utáni sejteken.

Amennyiben a sejtbankok előállítása során potenciálisan fertőzött biológiai anyagot használnak, úgy mind a törzs-sejtbankon, mind a szaporító sejtbankon külön vizsgálatot kell elvégezni bizonyos egyedi vírusokra, figyelembe véve, hogy az adott anyag milyen fajból származik. Ha a kérdéses anyagot validált eljárással inaktiválták, akkor ezeket a vizsgálatokat nem szükséges elvégezni. A termelés utáni sejteken a következő vizsgálatokat kell elvégezni: sterilitás (baktériumok, gombák, mikoplazmák). A vírusvizsgálatok elvégezhetők a sejteken vagy a sejtenyészet felülűsóján. Ehhez a nem endogén eredetű vírusszennyezést alkalmas *in vivo* és *in vitro* módszerekkel vizsgáljuk. A retrovírus- és más endogén vírus-tartalmat alkalmas *in vitro* módszerekkel vizsgáljuk.

2.8.4 Tenyésztés és „aratás”:

Korlátozott számú átolással végzett előállítás (egyszeri aratás – mi biomérnökök ezt szakaszos fermentációnak, az „aratást” lefejtésnek nevezzük). A sejteket egy meghatározott átolásszám vagy populáció-kétszereződési szint eléréséig tenyésztik (a sejtvonal stabilitásával összhangban). Az aratás egyetlen lépésben történik. Folyamatos tenyésztéssel végzett előállítás (többszöri aratás - mi biomérnökök ezt félfolynos vagy folytonos fermentációnak nevezzük). A sejteket meghatározott ideig folyamatosan tenyésztik (a rendszer stabilitásával és a termelés állandóságával összhangban).

Monitorozásra a tenyészet teljes élettartama alatt szükség van; a monitorozás kívánt gyakoriságát és típusát az előállítási rendszer természete szabja meg.

Az Anticorpora monoclonalia ad usum humanum Ph.Hg.VIII. – Ph.Eur.6.0 – 5. előírásai: Minden egyes aratásnál vizsgálatot kell végezni az antitesttartalomra, a mikrobiológiai szennyezettségre, valamint az endotoxinok és a mikoplazmák jelenlétére. A rutinszerűen végzett általános vagy egyedi vírusvizsgálatokat az előállítás megfelelő stádiumában kell elvégezni, a gyártási eljárástól és a felhasznált anyagoktól függően. A korlátozott számú átolással végzett

előállítás folyamatok esetén legalább 3 aratásnál kell egyedi vírusvizsgálatot végezni megfelelő számú *in vitro* módszerrel. A további feldolgozásra szánt aratások elfogadási követelményeit pontosan definiálni kell, az alkalmazott monitorozási eljárással összefüggésben. Ha a vizsgálat vírusszennyezést mutat ki, akkor az előállítás folyamatot körültekintően felül kell vizsgálni abból a célból, hogy a szennyeződés oka megállapítható legyen. Az aratás ilyenkor nem bocsátható további feldolgozásra. Azok az aratások, amelyekben endogén vírus mutatható ki, nem használhatók fel a tisztításnál, hacsak nincs megfelelő intézkedési terv arra nézve, hogy megakadályozzák a kórokozók átvitelét a késztermék által.

2.8.5 Tisztítás:

Az aratások a további feldolgozást megelőzően egyesíthetők. A tisztítási folyamatnak olyan lépéseket kell tartalmaznia, amelyek eltávolítják és/vagy inaktíválják a peplonnal rendelkező vagy nem rendelkező vírusokat. Olyan validált tisztítási eljárást kell alkalmazni, amely igazoltan képes eltávolítani és/vagy inaktíválni a kórokozókat, továbbá bizonyítottan eltávolítja a termékből és az előállításból eredő szennyezőket. Az eljárás lépéseinek pontos meghatározása állandó minőségű és biológiai aktivitású tisztított antitestet eredményez. A tisztított antitest vizsgálati programja az eljárás validálásától, az állandóság bizonyításától és a termékből és előállításból eredő szennyezők várható szintjétől függ. A tisztított monoklonális antitesteket alkalmas analitikai módszerekkel vizsgálni kell mikrobiológiai szennyezettségre és bakteriális endotoxinokra, továbbá vizsgálni kell a termék tisztaságát, integritását és hatóértékét. Szükség esetén összehasonlítás céljából referenciaanyagot kell alkalmazni.

Ha a köztitermékek tárolására is igény van, úgy megfelelően vizsgálni kell az ilyen készítmények stabilitását, továbbá fel kell mérni a késztermék lejáratí idejére gyakorolt hatást is.

2.8.6 Letöltés előtti késztermék:

A letöltés előtti késztermék a tisztított monoklonális antitest egy vagy több gyártási tételéből készül. A készítés során a letöltés előtti késztermékhez stabilizátorok és más segédanyagok adhatók. Csak olyan letöltés előtti késztermék használható a kész gyártási tétel készítéséhez, amely megfelel az alábbi követelményeknek.

Sterilitás: a vizsgálatához minden táptalaj esetében 10 ml-t használunk.

Az Anticorpora monoclonalia ad usum humanum Ph.Hg.VIII. – Ph.Eur.6.0 – 6 előírásai: **Bakteriális endotoxinok:** A termék feleljen meg a jóváhagyott határértéknek.

Előállításból származó szennyezők: A gazdasejt eredetű fehérjék, a gazdasejt és vektor eredetű DNS és más előállításból származó szennyezők meghatározására alkalmas vizsgálatokat megfelelő számú kész gyártási tételen vagy a tisztított monoklonális antitest megfelelő számú gyártási tételén végezzük. A letöltés előtti készterméknek meg kell felelnie az adott termékre jóváhagyott követelményeknek. Ha a tisztítási eljárás állandóságát igazolták, a vizsgálatok a továbbiakban elhagyhatók.

2.8.7 Kész gyártási tétel:

A letöltés előtti készterméket aszeptikus körülmények között steril tartályokba osztják szét, amelyeket ezután a szennyeződés megakadályozására lezárnak.

2.8.8 Sajátosságok - Tulajdonságok:

Küllem: A folyékony készítmények tiszta vagy enyhén opálos, színtelen vagy enyhén sárga folyadékok. Látható részecskéket nem tartalmaznak.

Oldékonyság: A fagyasztva szárított készítmények az oldásra szánt folyadékban meghatározott időtartamon belül maradéktalanul oldódnak; oldatuk tiszta vagy enyhén opálos, és látható részecskéket nem tartalmaz.

pH: A készítmény feleljen meg a jóváhagyott követelményeknek.

Ozmolalitás: legalább 240 mosmol/kg, adott esetben a használat céljából hígított készítményre.

Kivehető térfogat: A készítmény feleljen meg a vizsgálat követelményeinek.

Összes fehérje: A készítmény feleljen meg a jóváhagyott követelményeknek.

Molekulaméret-eloszlás: A molekulaméret-eloszlást alkalmas módszerrel, például méretkizárásos kromatográfiával határozzuk meg. A készítmény feleljen meg a jóváhagyott követelményeknek.

A molekula azonossága és szerkezeti integritása: A molekula azonosságának és a szerkezeti integritásának megerősítésére a monoklonális antitest természetétől, mikroheterogenitásától és izoformáitól függően számos különböző vizsgálat végezhető, mint például peptidterkép-vizsgálat, izoelektromos fókuszálás, ioncserés kromatográfia, hidrofób interakciós kromatográfia, oligoszacharid-terképezés, monoszacharid-tartalom és tömegspektrometria.

Az Anticorpora monoclonalia ad usum humanum Ph.Hg.VIII. – Ph.Eur.6.0 – 7. előírásai:

Tisztaság: Alkalmas validált módszerrel vizsgáljuk, mint például SDS poliakrilamid gélelektroforézissel nem redukáló és redukáló körülmények között vagy kapilláris elektroforézissel. Az előállításból és a termékből eredő szennyezők kimutatására alkalmas vizsgálatokat végzünk.

Stabilizátor: Adott esetben a készítmény feleljen meg a jóváhagyott követelményeknek.

Víztartalom: A fagyasztva szárított készítmény feleljen meg a jóváhagyott követelményeknek.

Sterilitás: A készítmény feleljen meg a sterilitási vizsgálat követelményeinek.

Bakteriális endotoxinok: A készítmény feleljen meg a jóváhagyott követelményeknek.

Módosított antitesteknél alkalmazott vizsgálatok: A módosítás típusától függően elvégezzük a megfelelő vizsgálatokat.

Tartalmi meghatározás:

A referenciakészítményt alkalmazva, megfelelő tartalmi meghatározást végzünk. A tartalmi meghatározást és az eredmények kiszámítását a szokásos elveknek megfelelően kell megtervezni.

Eltartás: A termék feliratának megfelelően.

Lejárat idő:

A lejárat időt a steril szűrés, a letöltés (folyékony készítményeknél) vagy (adott esetben) a fagyasztva szárítás időpontja alapján kell meghatározni.

Felirat:

A feliraton fel kell tüntetni:

- adott esetben a Nemzetközi Egységek számát;
- tartályonként a fehérjemennyiséget;
- tartályonként a monoklonális antitest mennyiségét;
- folyékony készítmény esetén a tartályban lévő készítmény térfogatát;
- fagyasztva szárított készítmény esetén:
- a feloldásra használt folyadék nevét és térfogatát;

Anticorpora monoclonalia ad usum humanum Ph.Hg.VIII. – Ph.Eur.6.0 - 8

- hogy a monoklonális antitest a feloldást követően mennyi ideig használható;
- adott esetben, hogy használat előtt milyen hígítást kell készíteni.