

| | |
|--|---|
| 8. Esettanulmány-2: Monoklonális antitestek gyártása | 1 |
| 8.1. A monoklonális antitestek(MAB) | 1 |
| 8.2. A monoklonális antitestek gyártása..... | 2 |
| 8.2.1. Upstream processing (1-7 pontok)..... | 2 |
| 8.2.2. Sejtek elválasztása (8. pont) | 3 |
| 8.2.3. Kinyerés Protein A affinkromatográfiával (9. pont)..... | 3 |
| 8.2.4. Tisztítás kationcserélő kromatográfiával (10. pont) | 4 |
| 8.2.5. Tisztítás anioncserélő gyantán (11. pont) | 4 |
| 8.2.6. Vírusmentesítés (12. pont)..... | 4 |
| 8.2.7. Koncentráció ultraszűréssel (13. pont) | 5 |
| 8.2.8. Formulázó anyagok hozzáadása (14. pont)..... | 5 |
| 8.2.9. Mélységi szűrés (15. pont)..... | 5 |
| 8.2.10. Dozírozás, liofilezés (16. pont) | 5 |
| 8.3. Tendenciák a MAB feldolgozási technológiákban..... | 5 |

8. Esettanulmány-2: Monoklonális antitestek gyártása

8.1. A monoklonális antitestek(MAB)

Az antitestek a szervezet molekuláris immunválaszának részei. A szervezetbe behatoló idegen anyagokkal, az antigénekkal lépnek kölcsönhatásba. 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. 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. 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 vérsejtek felszínén található glikoproteineket is.

Az antitestek olyan fehérjemolekulák, amelyeket az immunrendszer termel annak érdekében, hogy felismerje és semlegesítse a szervezetbe került idegen anyagokat, mint például a baktériumokat vagy a 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 vérférfje 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 N-terminális cukorláncok kapcsolódnak az aminosav-oldalláncokhoz. A antitest monomer formában egy "Y"-alakú molekula, amely két egyforma nehéz láncból és két egyforma könnyű láncból áll. Az egyes láncokat egymással diszulfid-hidak kötik össze.

A szervezet ellenanyag-diverzitása hatalmas, gyakorlatilag minden egyes fehér vérséjt eltérő antitestet szintetizál. Így a vérünkben 10^7 - 10^9 nagyságrendű különböző epitóppal reagáló antitest van jelen. Emiatt ezt a természetes együttest poliklonális antitestnek nevezzük. Ezt tartalmazza a Gamma-Globulin injekció is.

Monoklonalitásról akkor beszélhetünk, ha az ellenanyag molekulák egyetlen B-limfocita klón termékei. Homogének (fehérjekémia, antigénspecifitás, affinitás, izotípus) szempontjából. Egyetlen antigén egyetlen epitópjával képesek kötődni, a két molekuláris felület komplementer megfeleltetése nagyon specifikus. Affinitásuk nagy, azaz a reverzibilis kötődési reakció egyensúlya igen erősen a kötés irányába tolódik el. Ez azt is eredményezi, hogy a kötődés igen kis koncentrációk mellett is létrejön. 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. Nagy előnyük, hogy kiszámítható hatással és kevés mellékhatással rendelkeznek.

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

8.2. A monoklonális antitestek gyártása

Az antitestek előállítását állati sejtek tenyésztésével folyik. A megfelelő sejtvonalak létrehozásával, az állati sejtek tenyésztésének kérdéseivel a Biotermék technológia tárgy foglalkozik. Itt csak a technológiára, azon belül is a feldolgozási technológiára koncentrálnak. A folyamat lépései:

1. Kiveszünk egy, a megfelelő sejtvonalat tartalmazó ampullát a Working Cell Bank-ból.
2. Felolvasztás
3. Szaporítás lombikban
4. Szaporítás forgó palackban
5. Oltóanyag szaporítása inokulum fermentorban
6. A termelő fermentor beoltása
7. Sejtszaporítás, MAB termelés (lehet rátáplálásos, félfolytonos, folytonos, sejtviisszatartással)
8. A lefejtett léből a sejtek és törmelékek elválasztása
9. Az antitestek kinyerése Protein A affinkromatográfiával
10. Az antitestek tisztítása kationcserélő kromatográfiával
11. Tisztítás anioncserével
12. Vírusmentesítés
13. Koncentráció ultraszűréssel
14. Formulázó anyagok hozzáadása
15. Szűrés
16. Liofilizálás

A folyamat egészét és részleteit interaktív kép-a-képben animációval szemléltetjük.

1. animáció MAB képképen

A felületeken a piros keretbe foglalt részletekre kattintva szemléltető és magyarázó anyagok nyílnak meg.

8.2.1. Upstream processing (1-7 pontok)

E tananyagban csak a feldolgozási témakörökkel foglalkozunk, ezért a fermentációs folyamatról csak néhány technológiai jellegű adatot foglalunk össze.

Az állati sejtek között kevés olyan van, amelyik a mikrobákhoz hasonlóan, szubmerz, szuszpenziós tenyészetben szaporítható. A tenyésztés előnyei miatt viszont a biotechnológusok erre a

néhány sejttípusra építik szinte valamennyi technológiát. Ezek a fermentációs eljárások azonban jelentősen különböznek a mikrobák világában megszokottaktól.

A sejtek oxigénigénye messze elmarad a baktériumok és gombák igényeitől (0,01 - 0,05 vvm). Ez nem igényel intenzív keverést, ami előnyös, mert a keverésnél fellépő nyírófeszültségek könnyen károsíthatják a sejtfal nélküli állati sejteket, ezért csak a legalacsonyabb, a sejtek kiülepedését még éppen megakadályozó alacsony fordulatszámot alkalmazzák (20-50 fordulat/perc). A pH értéke a vérre jellemző 7,4. A fermentáció során a pH csökken a sejtek savtermelése miatt, de ezt ellensúlyozzák a tápoldat puffer-rendszerei. Sok sejtvonal igényel a tápoldatban vérfehérjéket, ezek viszont körülményessé teszik a feldolgozást. Ezért általános a törekvés, hogy a sejtvonalakat olyan irányba manipulálják, hogy azok legalább a termelő fázisban szérumszűrés nélkül is működőképeseek legyenek.

Fermentációs műveleti szempontból a MAB termelés ritkán szakaszos, sokkal gyakoribb a rátáplálásos technika (ezzel lehet a legnagyobb termék koncentrációkat elérni), a fél folytonos, és folytonos sejtvisszatartásos rendszer. Az állati sejtek igen lassan szaporodnak, így nehéz nagy sejtszámot elérni. Ezért van jelentősége a sejtek visszatartásának a reaktorban. Ez megvalósítható ülepitéssel, szűréssel, speciális leválasztó berendezésekkel.

Az emlőssejt-fermentorok legnagyobb mérete nem haladja meg a néhány ezer litert, részben az emlőssejtek érzékenysége, részben a drága tápoldatok miatt.

A sejttenyészetek felülúszói csak kis koncentrációban tartalmazzák az ellenanyagokat (100-200 µg/ml), bár az elméleti határ a sejtek potenciáljából számolva 6 g/liter lenne. A feldolgozás során sokszoros koncentrációra van szükség.

8.2.2. *Sejtek elválasztása (8. pont)*

A rátáplálásos szakaszos tenyésztésnél a teljes fermentlevet kell feldolgozni a sejtekkel együtt. A sejtvisszatartásos rendszereknél csak kisebb koncentrációban kerülnek át a sejtek az elvett folyadékba. De mindegyiknél figyelembe kell venni, hogy a MAB termelés során nagyon sok sejt elpusztul, és ezek törmelékei, pl. a sejtmembrán, a fehérjék (HCP = host cell protein, a termelő sejt saját fehérjei, leggyakrabban hörcsög fehérjék), a DNS, az RNS és esetleg vírus részecskék mind szennyezik a lefejtett levét. Ezek eltávolítására az ismert szilárd-folyadék elválasztási műveleteket alkalmazzák.

Centrifugálás: a nehezebb részecskék, a sejtek és törmelékeik leülepednek, míg a könnyebb részecskék, pl. a lipidcseppek felszállnak a folyadék felszínére. Az oldott anyagok, így a MAB is a felülúszóban maradnak.

A sejtek leválaszthatók mikroszűréssel is. Az állati sejtek mérete több tíz mikron, így pl. egy 0,65 µm-es pórusméretű szűrővel a sejtek és a szétesett sejtek darabjai jól leválaszthatók. Mélységi (dead-end) szűrés esetén a membrán felületén a sejtekből szűrőlepeny alakulna ki, ezért a lé cirkuláltatásával keresztáramú (cross flow) szűrést alakítanak ki. Ezzel a technikával nem lehet a teljes folyadékmennyiséget kivonni a betöményített sejtes léből, ezért célszerű a hatóanyagot sóoldattal (PBS = phosphate buffered saline = foszfáttal pufferolt sóoldat) kimosni, azaz diaszűrést alkalmazni.

8.2.3. *Kinyerés Protein A affinkromatográfiával (9. pont)*

A szűrt, homogén oldatban az ellenanyagon kívül még sokféle oldott szennyezés van. Az antitestek kivonásának hatékony és szelektív módja, hogy a célterméket olyan affinkromatográfiás tölteten kötik meg, amelynek liganduma a Staphylococcus Protein A fehérje. Ez az antitestek közös, Fc régiójához kapcsolódik, azaz minden antitestet megköt, más fehérjéket viszont nem.

Előnyei:

- Szelektíven és nagy affinitással köti az antitesteket
- Nagy a kapacitása (15 – 30 g MAB/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 20 - 50 kromatográfia végezhető el.)
- Toxikus (megzavarja az immunrendszert)
- A ligandum leválhat, szennyezheti az oldatot
- Az oszlop tisztítása nehézkes (érzékeny a szokásos NaOH koncentrációkra)

A szennyezett oldatot pH=7-en felviszik az affin kolonnára. Az antitestek Fc régiójukkal megkötődnek a Protein A ligandumokon, az egyéb oldott anyagok kimosódnak az oszlopból. A megkötött fehérjéket citrát pufferrel végrehajtott gradiens elúcióval (pH 7-ről → pH 3,8-ra) oldják le a töltetről. A Protein A szelektivitásának köszönhetően az így kapott oldat (fehérje)tisztasága a 98 %-ot is eléri.

8.2.4. Tisztítás kationcserélő kromatográfiával (10. pont)

A kapott oldat még mindig tartalmazhat oldott szennyezéseket. Ezek eredhetnek az állati sejtekből (HCP), lehetnek dezaminálódott, töredezett vagy aggregálódott MAb molekulák, amelyeket az affinkromatográfia nem különített el. Sőt az affinkromatográfia során bekerülhetnek leváló Protein A ligandumok is. Az erős kationcserélő gyantán gyengén savas közegben (pH = 4,5 - 5,0) az ellenanyag megkötődik, a szennyezések kimoshatók az oszlopból. A főtermék leoldását gradiens elúcióval valósítják meg. Egyes eljárásokban pH gradienst (pH 5,0 → 7,4), másokban sógradienst (NaCl 0 → 1,0 M) alkalmaznak.

8.2.5. Tisztítás anioncserélő gyantán (11. pont)

A kationcserével el lehet távolítani a fehérje szennyezések nagy részét, de még mindig maradhatnak savas karakterű molekulák, elsősorban nukleinsavak. Ezek származhatnak a termelő állati sejt kromoszómáiból, illetve esetleges vírusfertőzésből. Ezek eltávolításának jellemző lépése az anioncserélős tisztítás. A gyantán az antitest nem kötődik meg, a nukleinsavak viszont igen. Az adszorpciót semleges közegben (pH ~ 7,0) hajtják végre, elúcióra nincs szükség, a szennyezések a gyanta regenerálásával távoznak.

8.2.6. Vírusmentesítés (12. pont)

A gyártási eljárásokba beépített vírusinaktiváló/eltávolító eljárások lehetnek fizikai, kémiai vagy fotokémiai eljárások. A legrégebbi fizikai módszer a pasztórizálás, számos vírus elpusztítására alkalmas a +60°C-os 10 órás hőkezelés. A totális vírusmentesítés a pusztulási kinetika ismeretében nem lehetséges. Az egyes műveletek hatékonyságát a víruskoncentráció csökkenésével, pontosabban annak logaritmusával jellemzik. Például „6 log” csökkenés egymilliószoros vírusszám csökkenést jelent, azaz $N_0/N_{végső} = 10^6$.

S/D módszer (szolvens/detergens módszer)

Szolvensként leggyakrabban tri-n-butil-foszfátot (TNBP), detergensként Triton X-100-at, vagy Tween készítményeket használnak. Ezekkel elegendő a 4 órás hőkezelés 30 °C-on a vírusok túlnyomó részének inaktiválására. Ezután a bevitt vegyszereket természetesen el kell távolítani, ezt steril növényi olajos extrakcióval célszerű megvalósítani.

Megfelelő körülmények között végrehajtott ultraszűrés is alkalmas lehet a vírusrészecskék eltávolítására.

8.2.7. *Koncentrálás ultraszűréssel (13. pont)*

A fermentorból lefejtett lé 100-200 mg/liter koncentrációban tartalmazza az antitesteket. A diaszűrés során ez a koncentráció csökken, az affinkromatográfia viszont több nagyságrenddel növeli koncentrációt. A kromatográfias és inaktiválási lépések során az oldat újra egyre hígabb lesz, nem éri el a kiszerezési koncentrációt. A felhasználásnál a szokásos dózis 10-50 mg, 1-5 ml térfogatban. Ez azt jelenti, hogy az oldatot be kell töményíteni 10-20 g/l koncentrációra. A betöményítés kíméletes, és egyúttal tisztítással is járó technikája a koncentrálás ultraszűréssel. A MAb molekulatömege 180-190 kDa, ezt visszatartó membránnal töményíthető. Ezen ugyanakkor átmennek az esetleges kis molekulájú szennyező komponensek, például a pirogén toxinok.

8.2.8. *Formulázó anyagok hozzáadása (14. pont)*

A kiszerezett készítmény nem csak a hatóanyagot tartalmazza, hanem az optimális hatás kifejtéséhez szükséges, önmagukban hatástalan komponenseket is. A monoklonális ellenanyag fehérjén kívül célszerű bevenni:

- Puffer rendszert, a pH állandó értéken tartására. Liofilizálás esetén előnyös, ha a puffer nem tartalmaz illékony komponenst, mert annak egy része a vákuumban elveszhet. Stabil például a foszfát puffer.
- Ionerősség beállítására és az ozmolaritás beállítására ásványi sókat, legegyszerűbben NaCl-ot.
- Fagyasztás, vagy liofilezés esetén védő anyagok: pl. szacharóz, mannit, esetleg glicerin
- Töltőanyag gyanánt pl. glicin is adagolnak.

Erre a célra már különösen nagy tisztaságú anyagokat használnak, hiszen a végtisztítás fázisában vagyunk, további tisztítás már nem következik.

8.2.9. *Mélységi szűrés (15. pont)*

A segédanyagok beoldása után még egy utolsó mélységi szűrés következik, amely eltávolítja az esetlegesen bekerült mechanikai szennyezéseket.

8.2.10. *Dozírozás, liofilezés (16. pont)*

A szűrt oldatot ampullákba dozírozzák. Egyes MAB készítményeket oldat formájában dobnak piacra, másokat liofilizálnak, és porampulla formájában szállítják. A fehérjék tárolási stabilitását minden esetben alaposan vizsgálják, és a stabilizáló közeget optimalják.

8.3. *Tendenciák a MAB feldolgozási technológiákban*

A monoklonális ellenanyagok piaca robbanásszerűen bővül, sokféleségében, mennyiségében és árbevételében egyaránt. Ez a növekedés egyfajta feszültséget okozott a technológián belül. Az Upstream technológiák, az ellenanyag előállítás az utóbbi néhány évben körülbelül három nagyságrenddel növekedett, elsősorban a fermentlevek végső titerének emelkedése révén. Ugyanakkor a Downstream processing, a feldolgozás kapacitása csak kb egy nagyságrenddel, a tízszeresére növekedett, ami nehézségeket okoz a gyártás fejlesztésében.