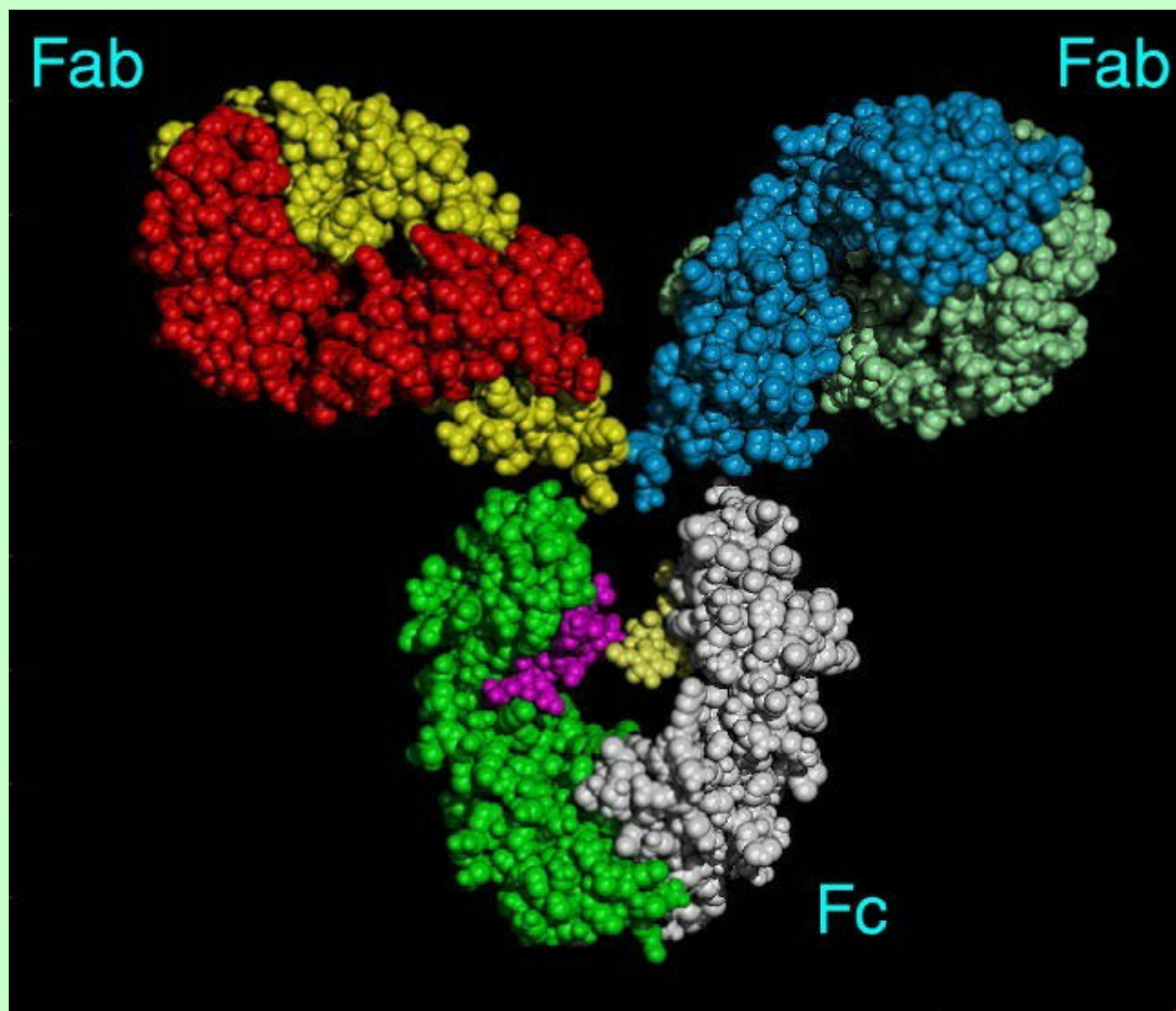


# Monoklonális ellenanyagok

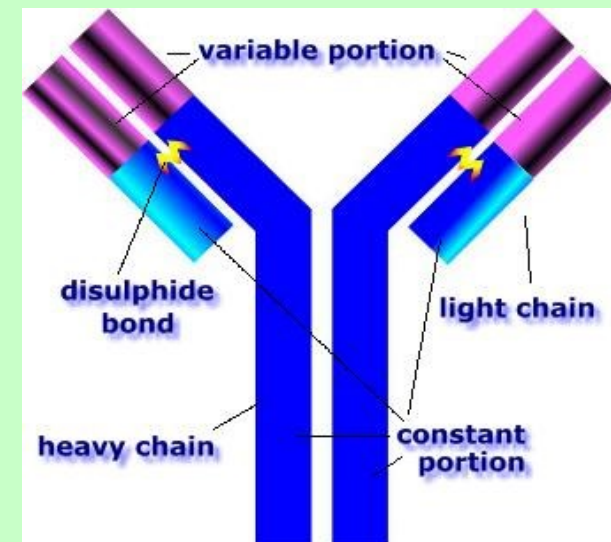
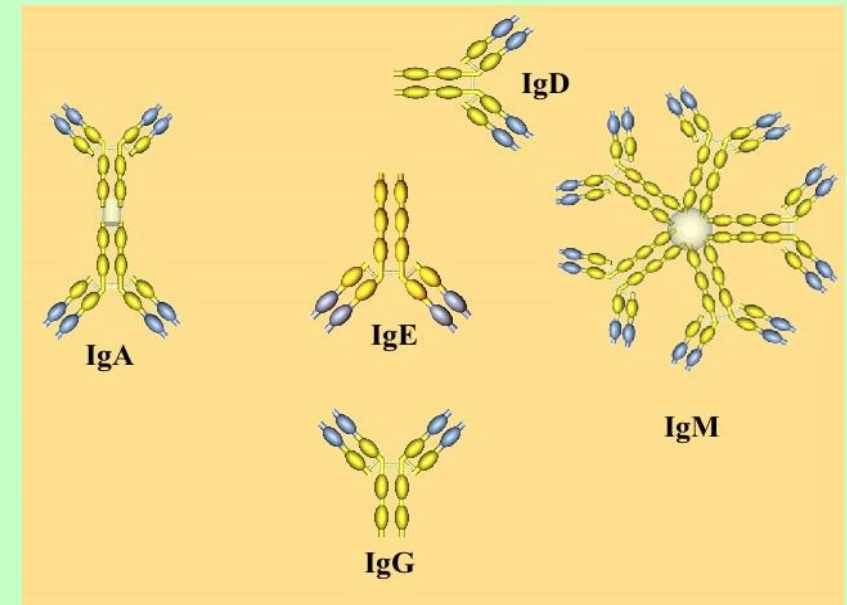


# Antitestek

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:

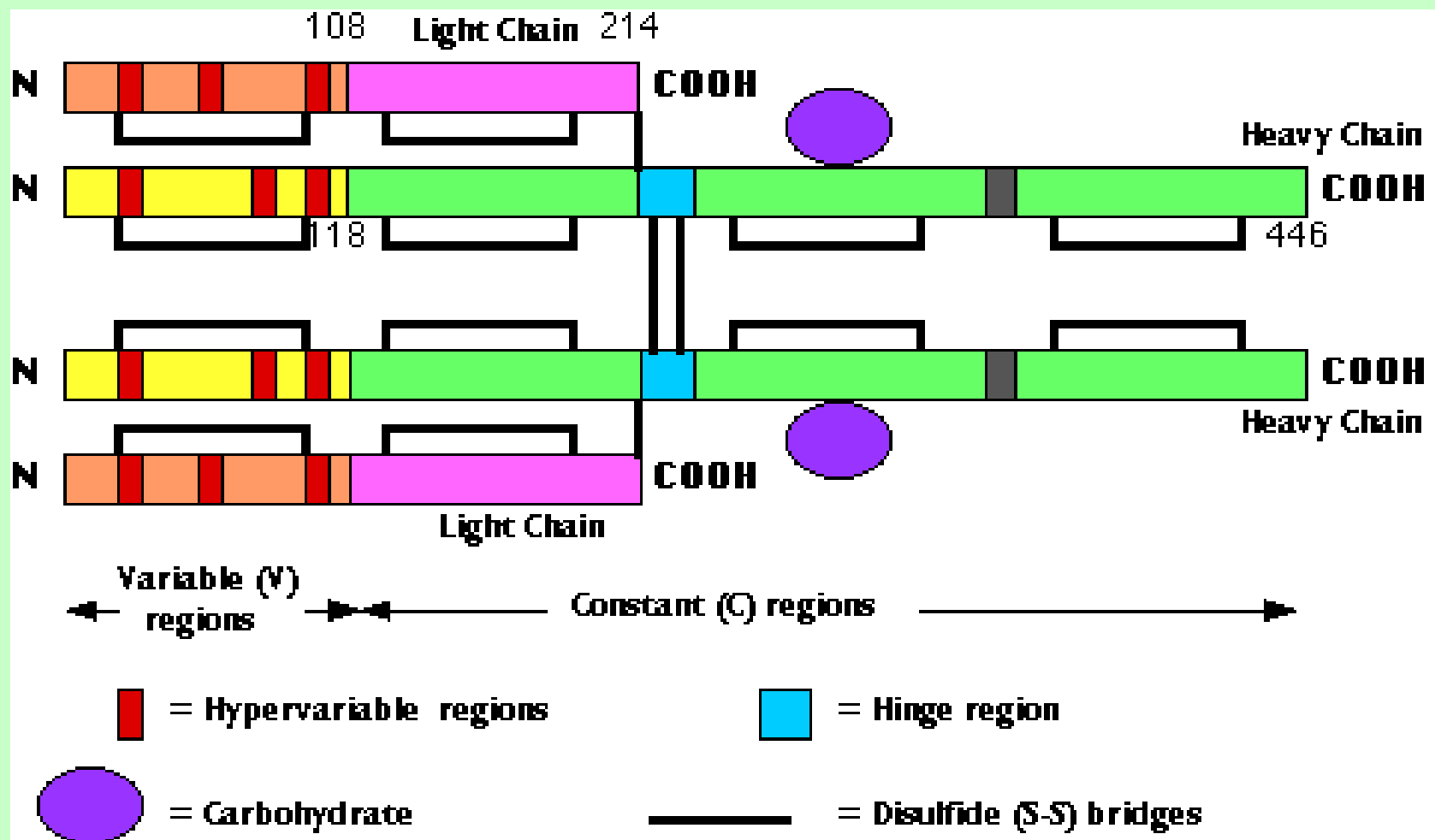
- vírusinaktiválás
- baktériumok agglutinálása
- megjelölés fagocitózisra

Az antigén felületén a kapcsolódási rész: epitóp



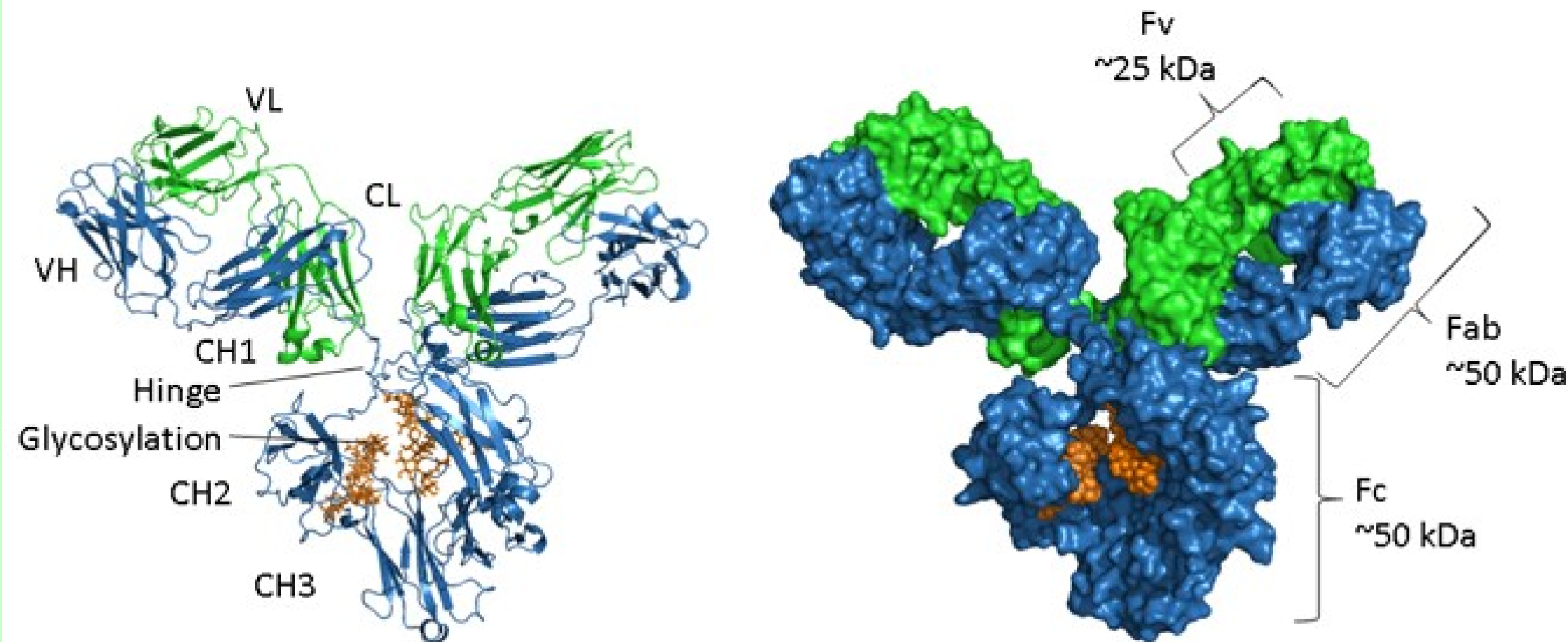
# Az antitestek fehérjeszerkezete

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

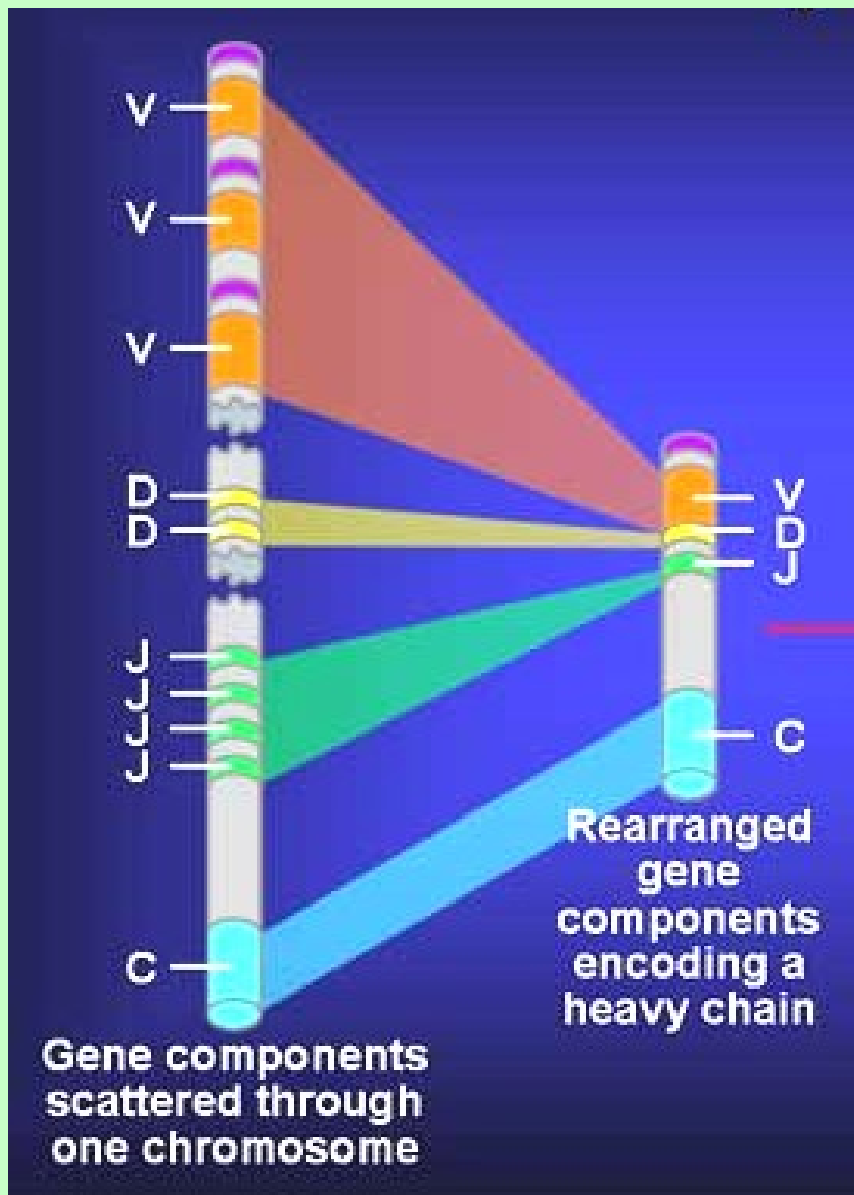


# Az antitestek fehérjeszerkezete

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



# Antitestek

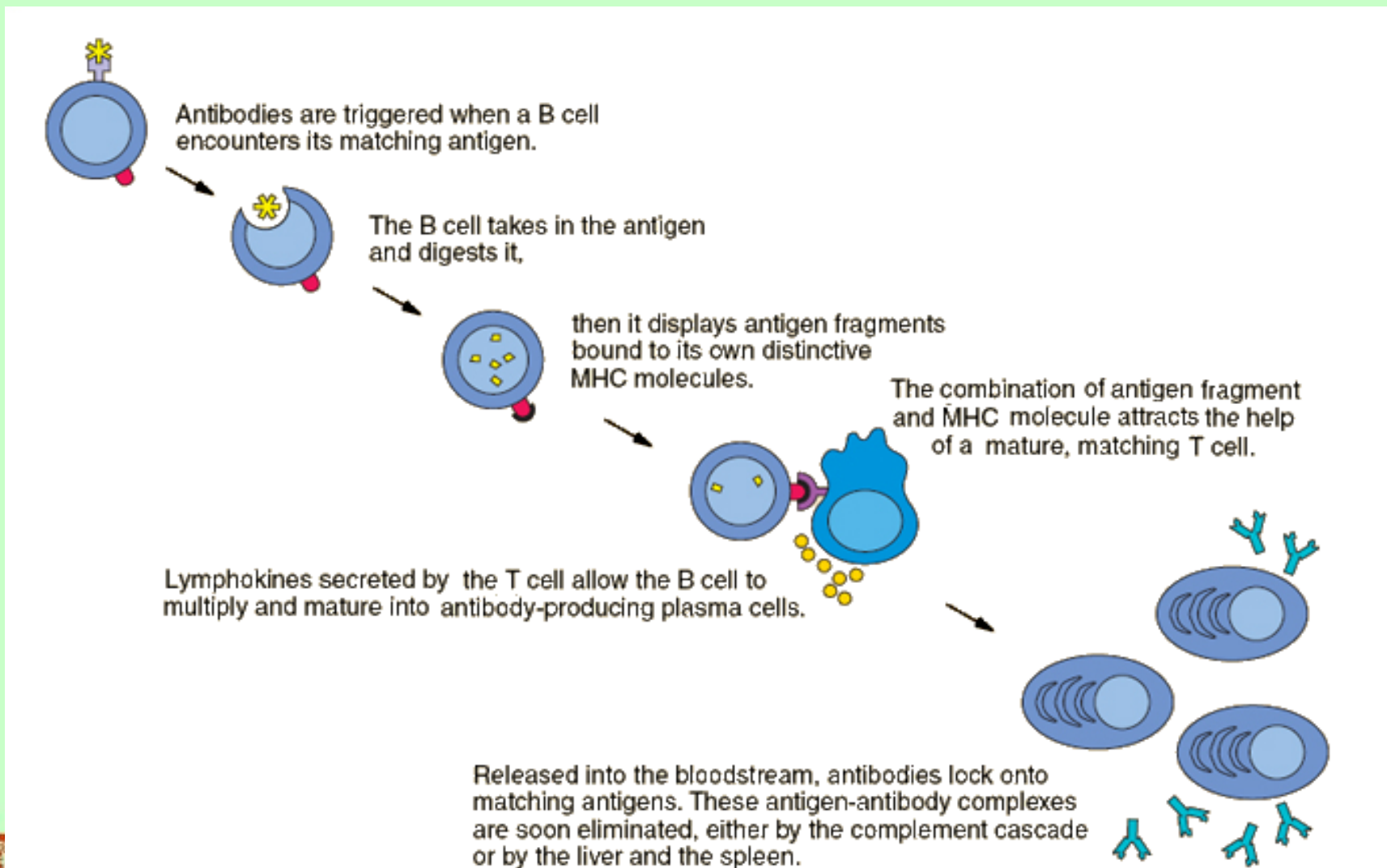


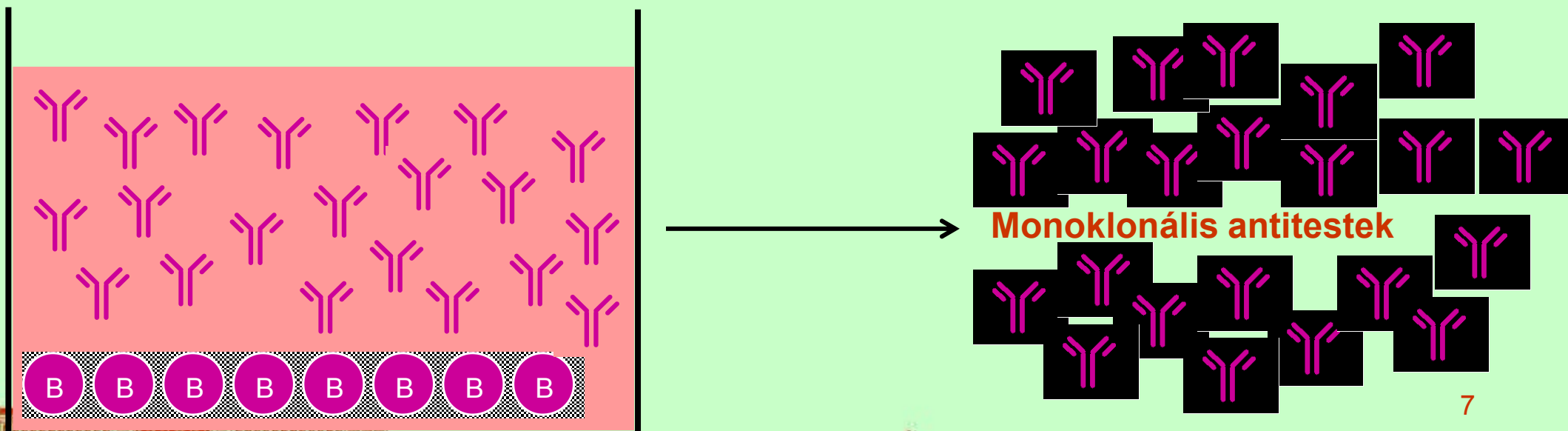
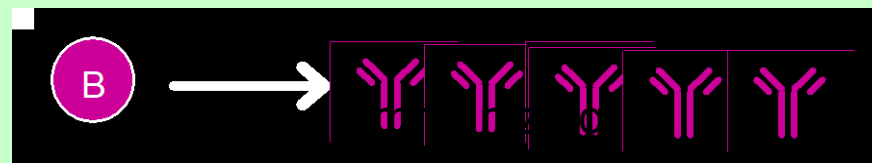
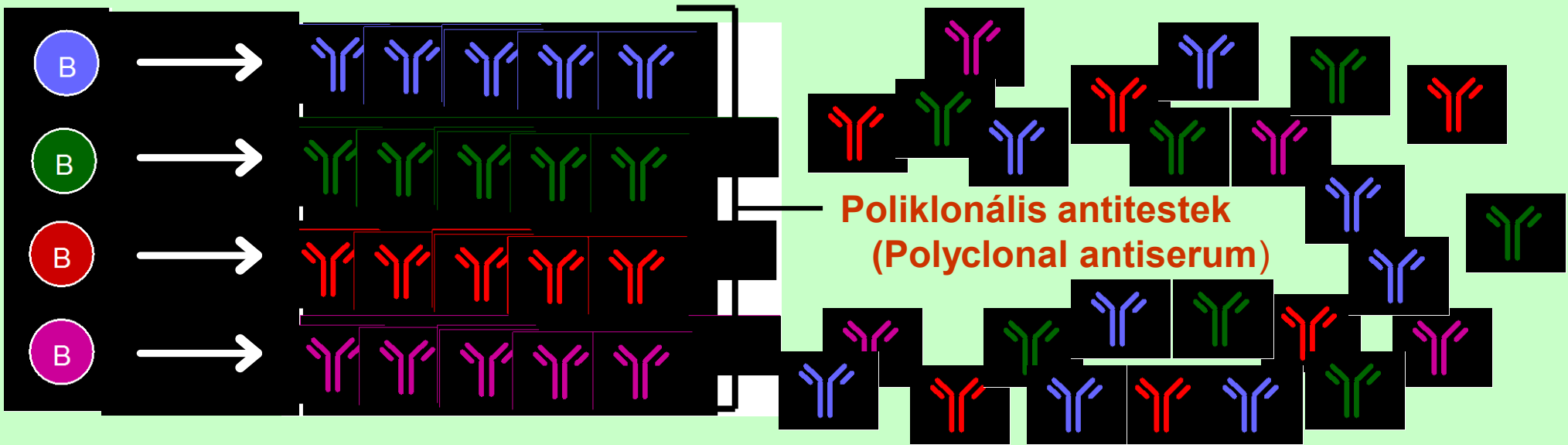
A szervezet  $\sim 10^7$ - $10^9$  féle különböző antitest előállítására képes. Ennek alapja, hogy antitest doménjei sok változatban tárolódnak a génállományban, és a kiírás során ezek random módon kombinálódhatnak.



# Antitestek

A szervezetben egy adott antitest tömeges termelését a plazmasejtté 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





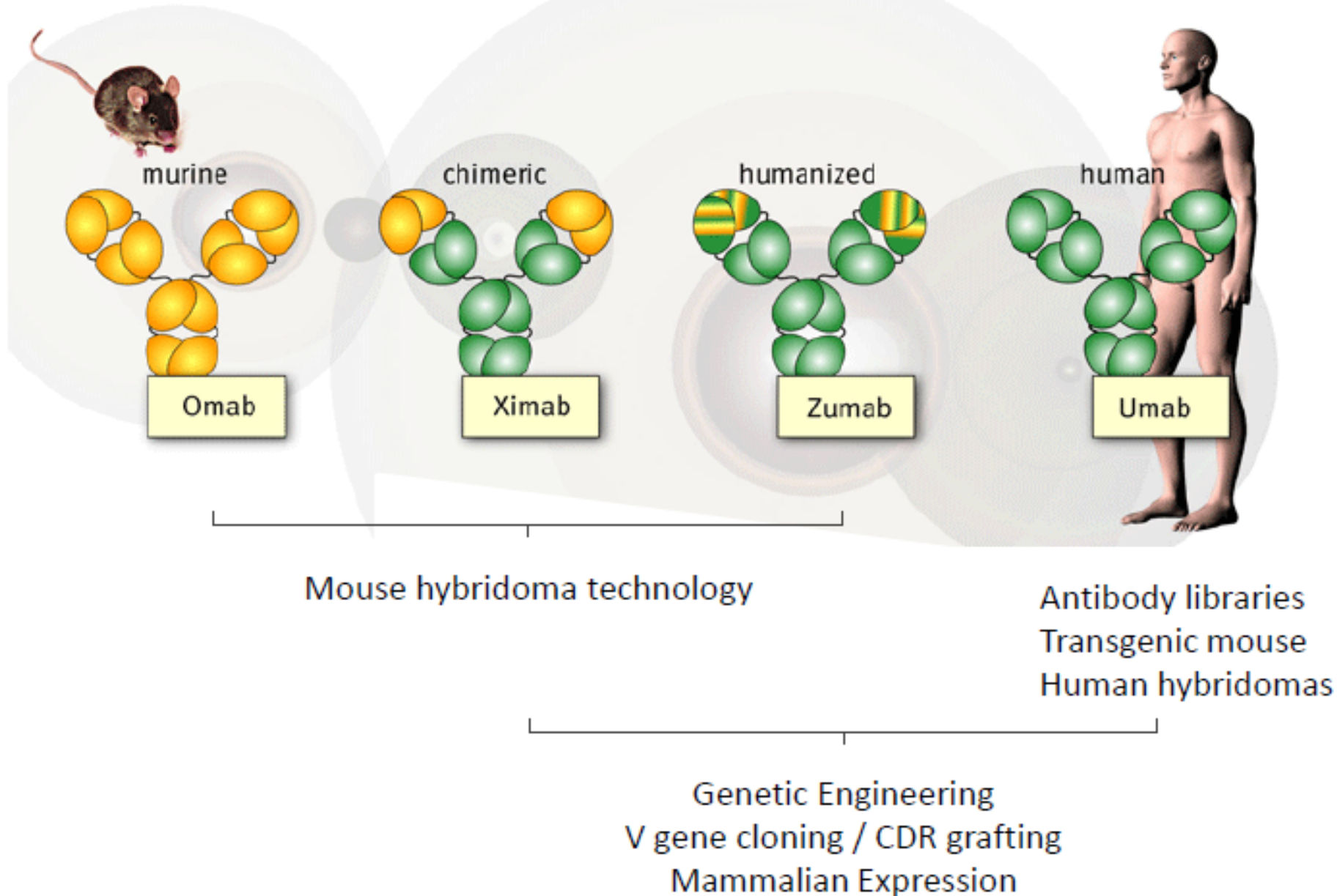
# Monoklonális ellenanyag előállítás menete

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



# „Antitest-mérnökség”

## Antibody Engineering



# A monoklonális antitestek felhasználása

Az antitestek több célra is felhasználhatók:

## 1. Nem terápiás antitestek:

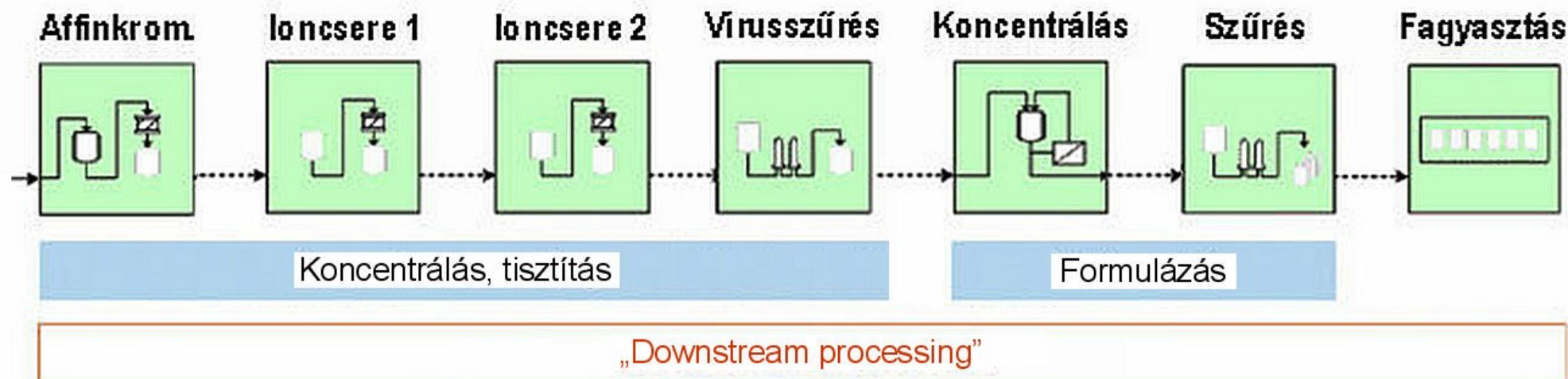
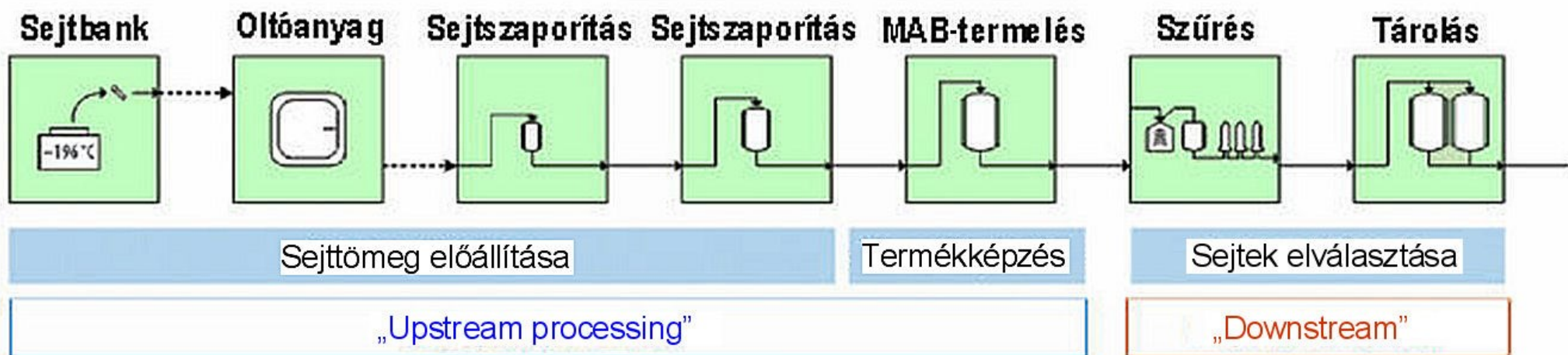
- Biokémiai kutatások
- Immun-analitikai eljárások
- Feldolgozási műveletekben (pl. affinitáskromatográfia)

## 2. Humán (*in vivo*) felhasználású antitestek:

- Diagnosztikában (pl. Proscint)
- Terápiában (elsősorban tumorok ellen)



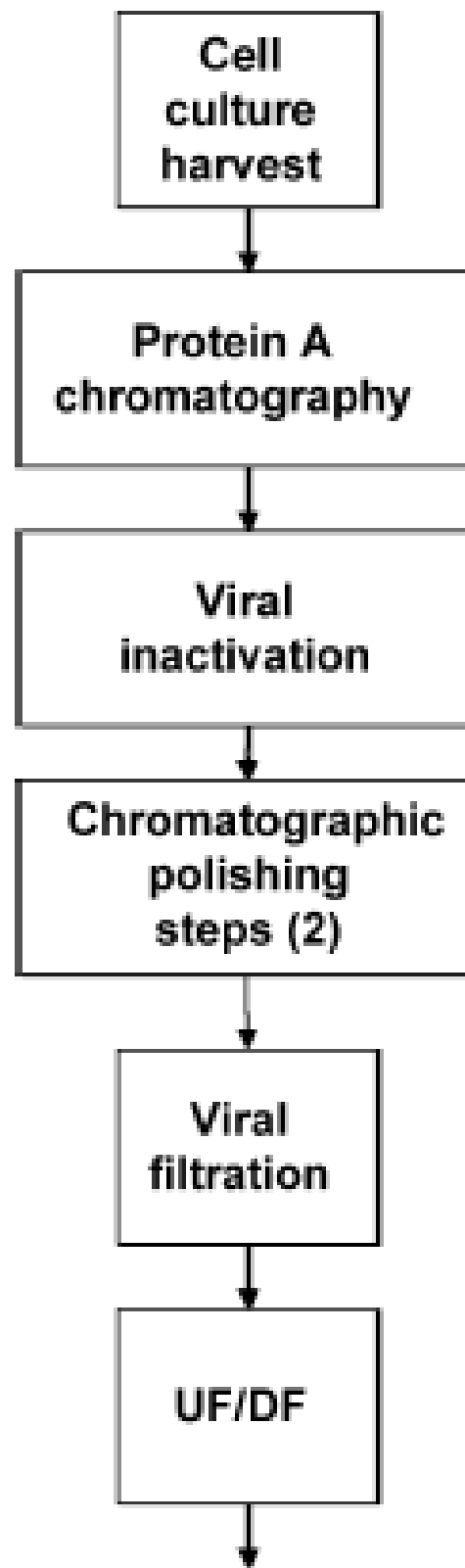
# Teljes technológia (upstream+downstream)



# 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 sejtörmelékek

Mélységi szűrés – kisebb sejtörmelékek (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  $\mu\text{m}$  pórusméretű 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





# Kromatográfiás 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

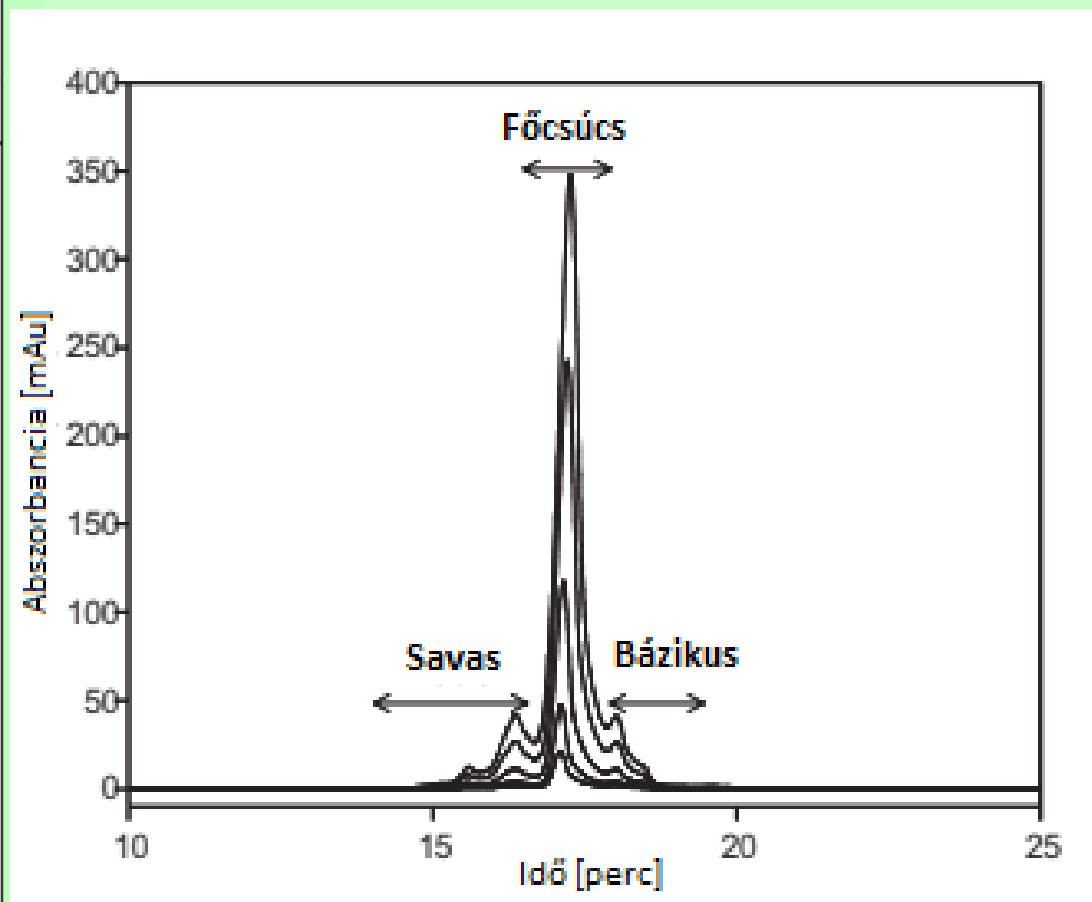
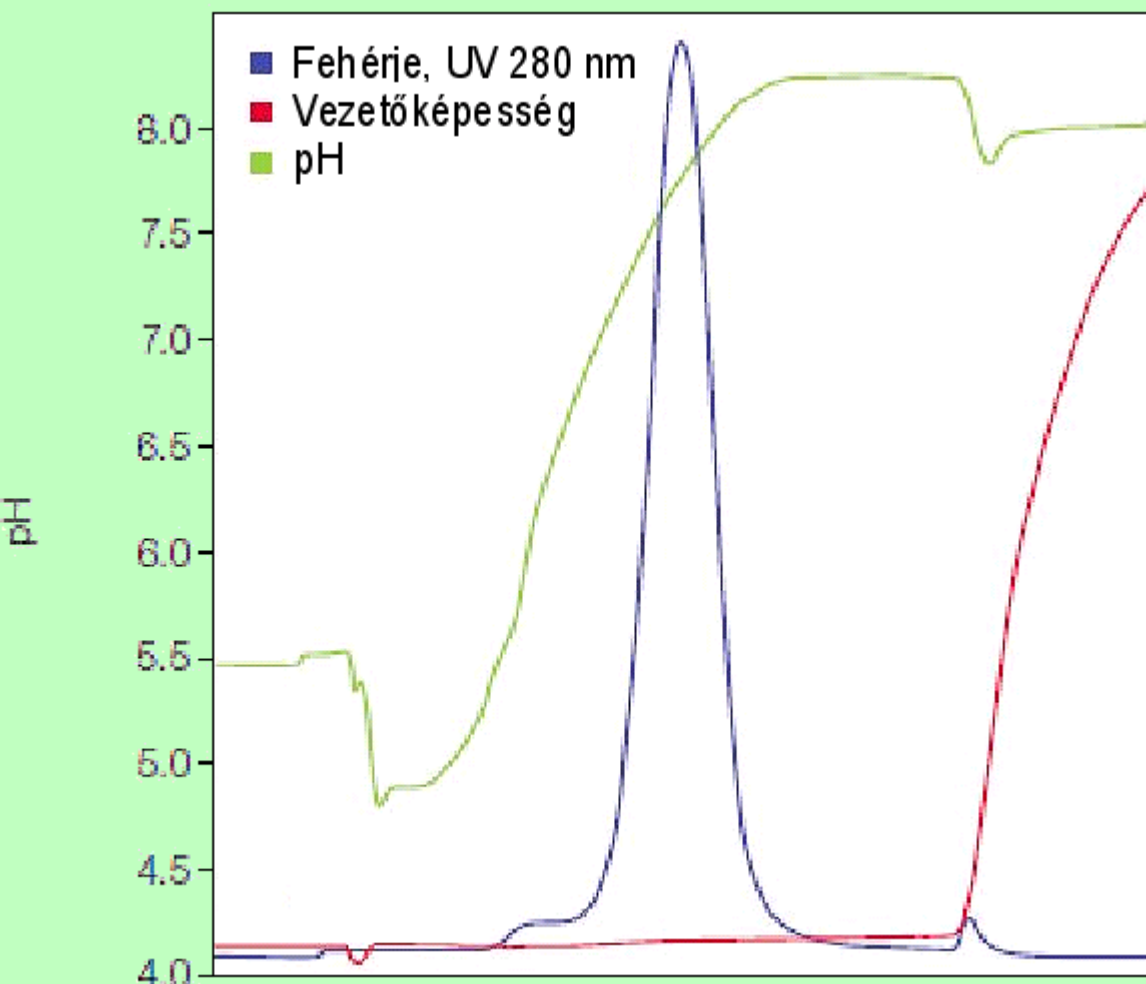
Eluálás: pH-gradiens: pH 5,4→8,0 (vagy sógradiens NaCl)

A kolonna regenerálása: cc sóoldattal



# Kromatográfiás polishing

MAB kromatogramja kationcserélőn



# Kromatográfiás polishing

## ANIONCSERÉLŐ:

Cél: a szennyező anyagok megkötése, a főtermék kötődés nélkül átmegy 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

### Inaktiválás hőkezeléssel

- Pasztörizálás
- Száraz hőkezelés
- Gőzölés

### Eltávolítás

- Nanoszűrés
- Kromatográfiás módszerek
- Kicsapás

## Kémiai módszerek

- Solvens – Detergens eljárás
- $\beta$ -Propiolakton
- Jód

## Fotokémiai módszerek

- Metilénkék
- Psoralen
- Hypericin

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



# Koncentrálás

A fermentlé MAB-koncentrációja 100–150 mg/l. A végtermékben 10-20 g/l-re van szükség, a koncentrálás legkíméletesebb módja az **ultraszűrés**. A MAB móltömege 180-190 kDa, ez alatti vágású membrán szükséges.

(Kisebb szennyezők kimosása, puffer csere, diaszűrés)



# Formulálás, liofilezés

Hozzáadják a végső formulázáshoz szükséges anyagokat:

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

Ionerősség beállítása: NaCl

Fagyvédő anyagok: pl. szaharóz, mannit, glicerin

Töltőanyag: pl. glicin

(pirogénmentesek, tiszták)

Még egy mélységi szűrés.

Oldatban vagy liofilezve kerül piacra.



# Egy kiszerezelt 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

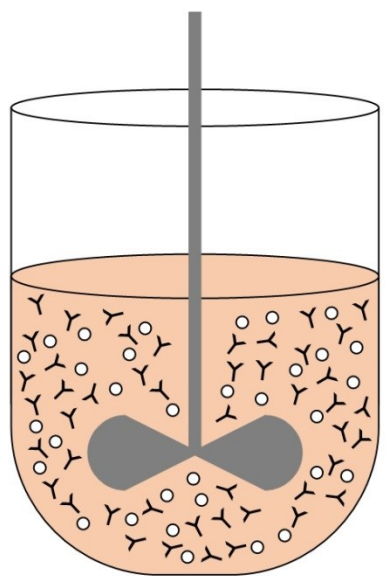


# FERMENTATION

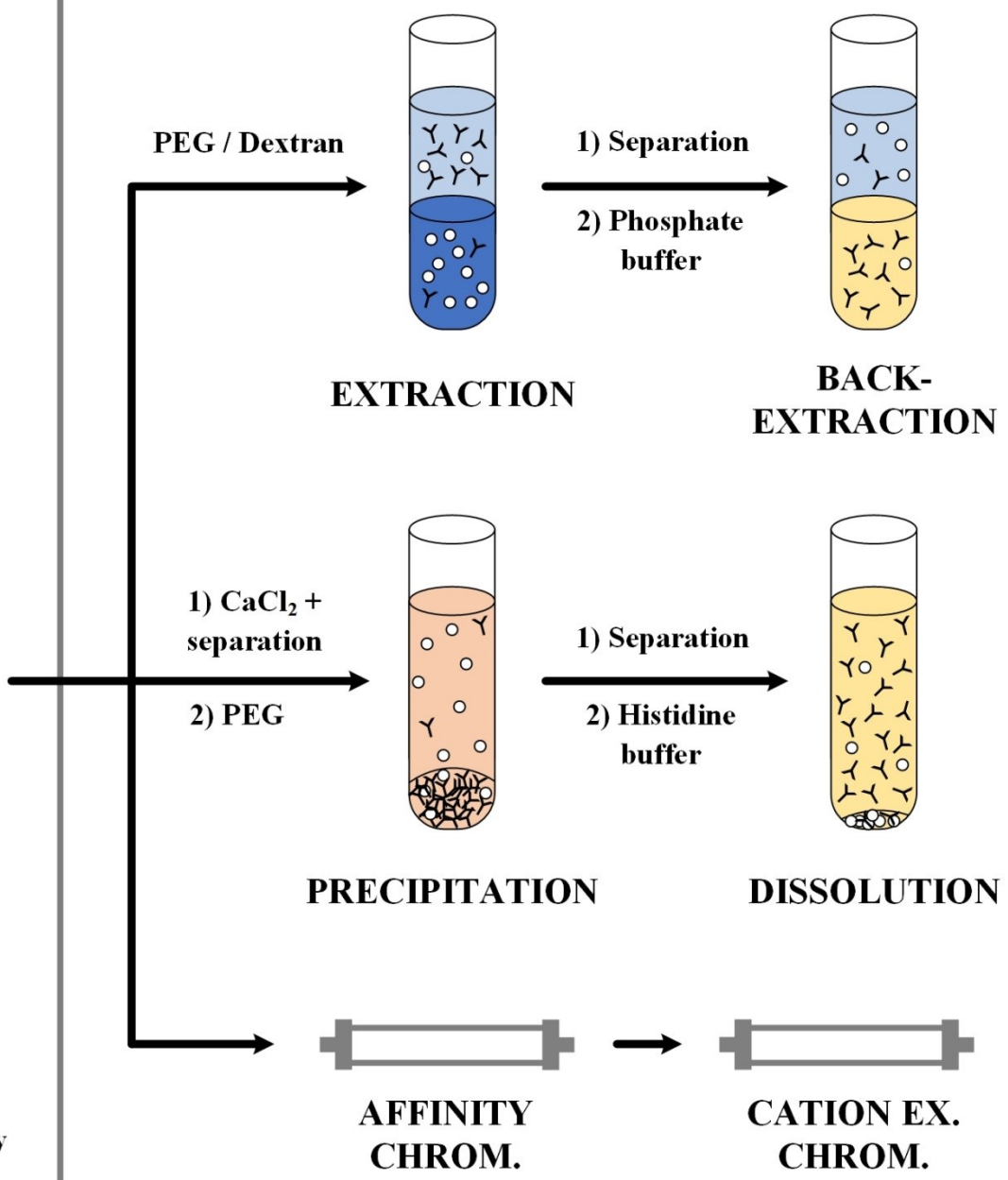
# PURIFICATION

# ANALYTICS

## FERMENTATION BROTE



Y Monoclonal antibody  
○ Impurity



**Adalimumab  
yield**

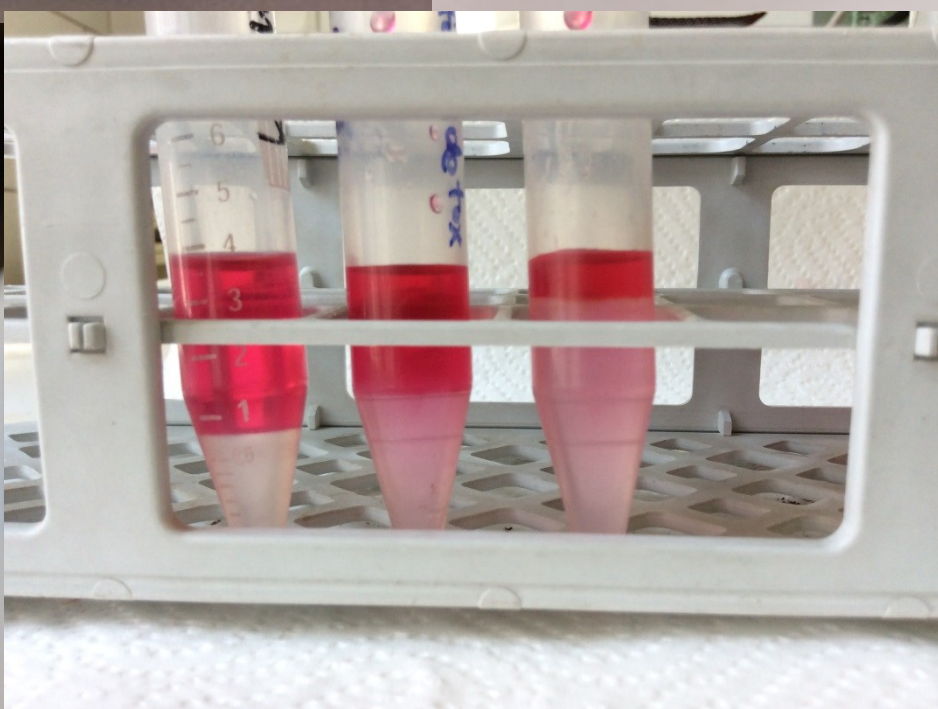
**HCP**

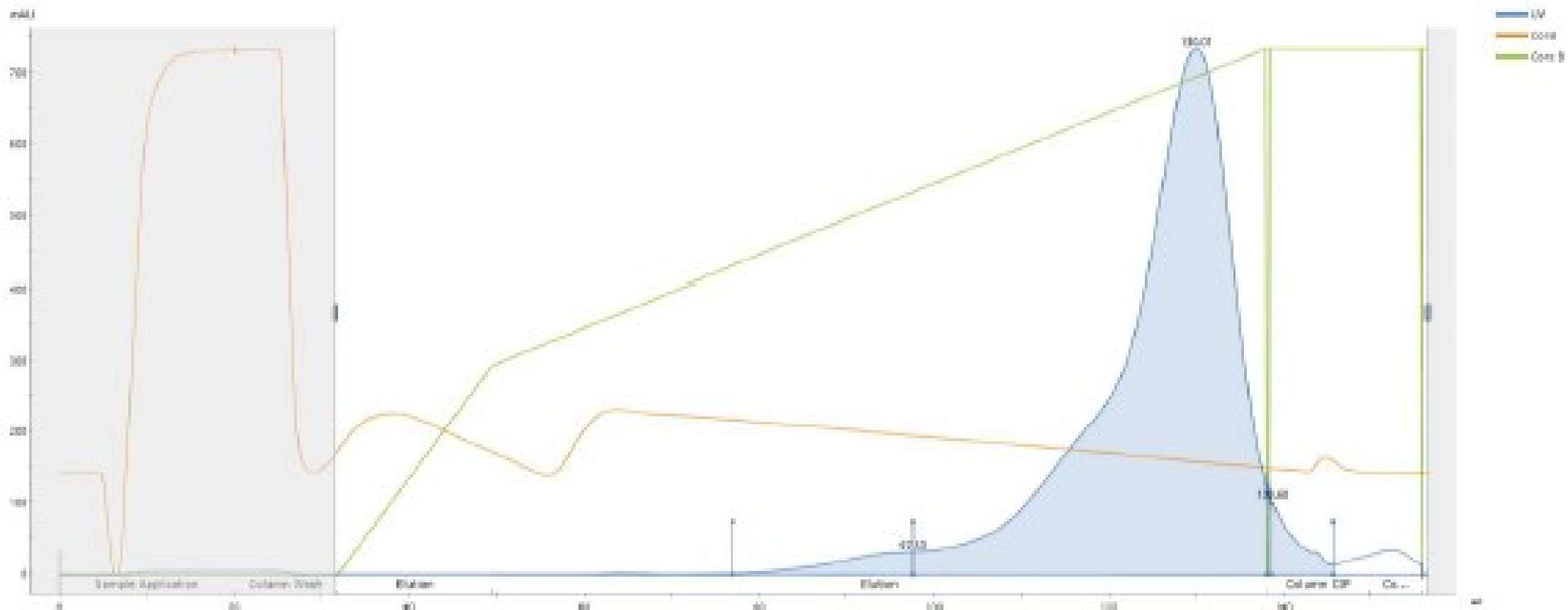
**dsDNA**

**Aggregates**



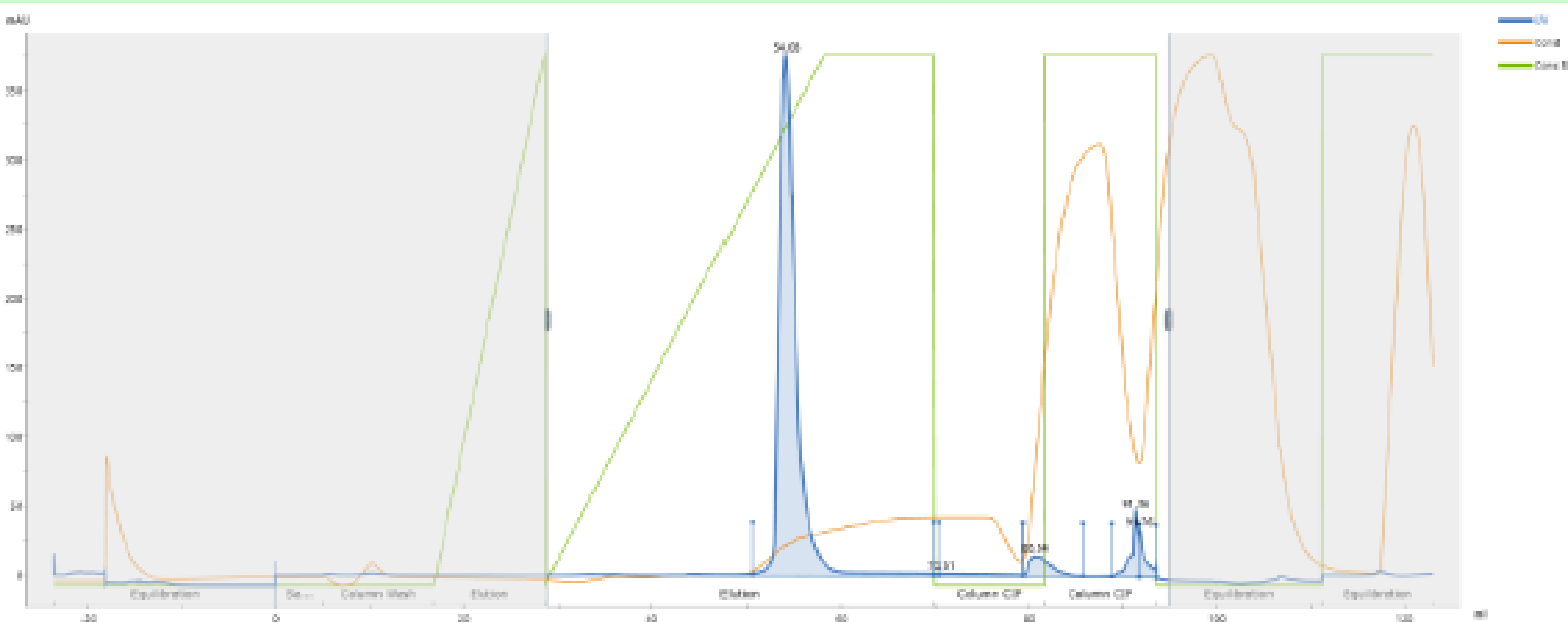






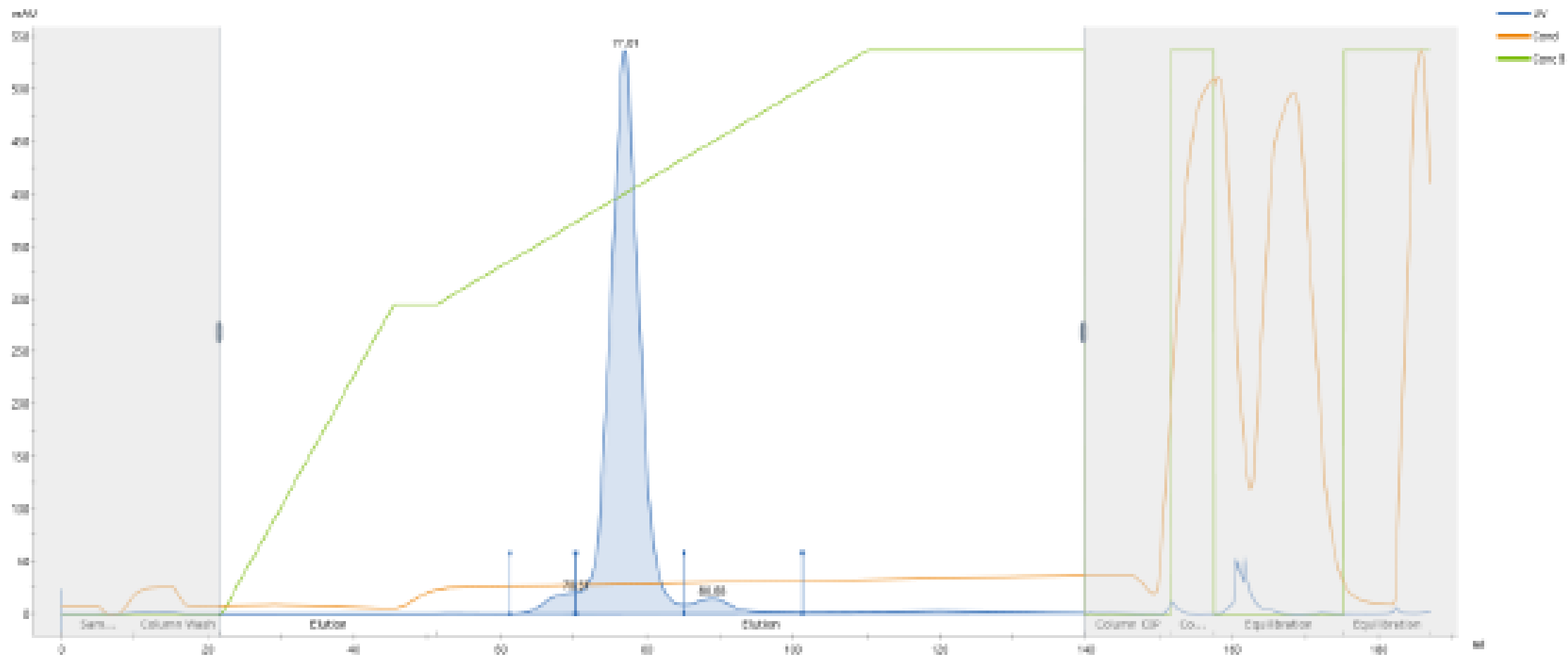
11. ábra: Kromatogram, a pH=5,0-9,1, állandó 20 mM NaCl-t tartalmazó pH-gradiens elúciós kísérletnél.





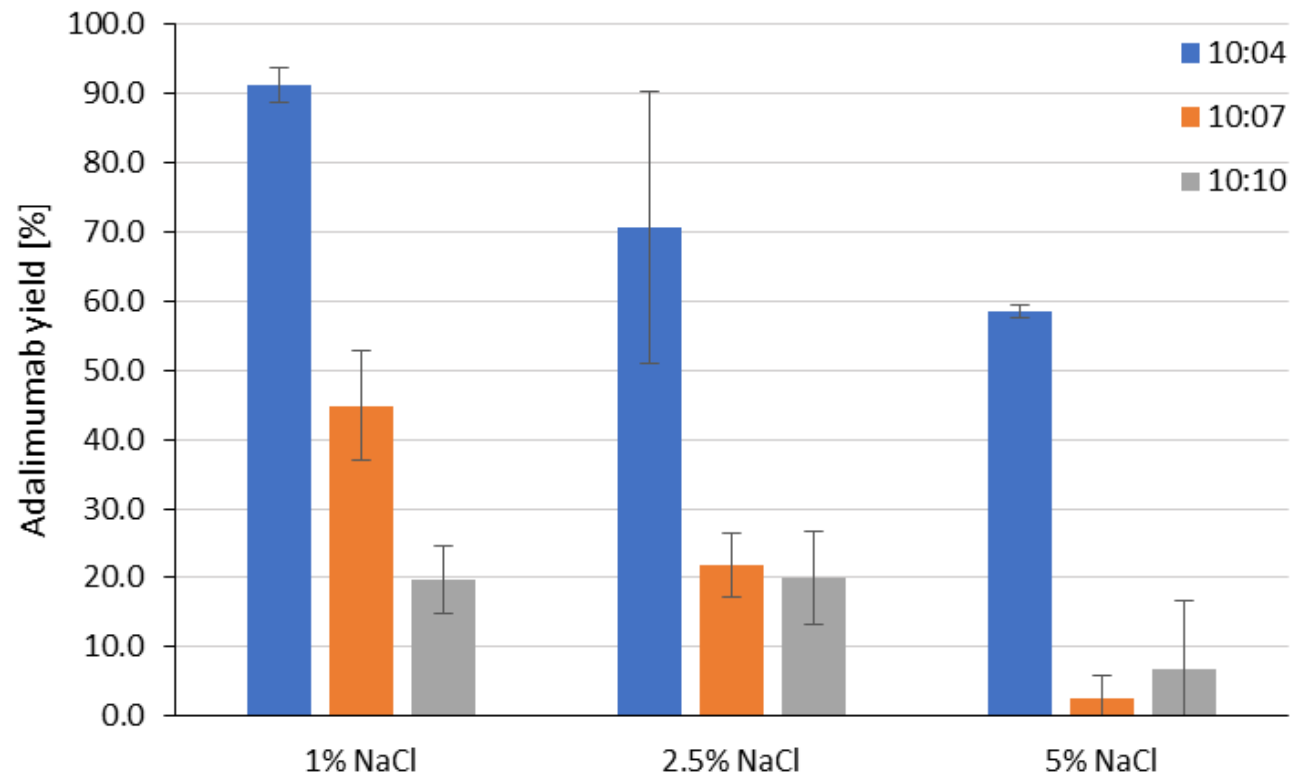
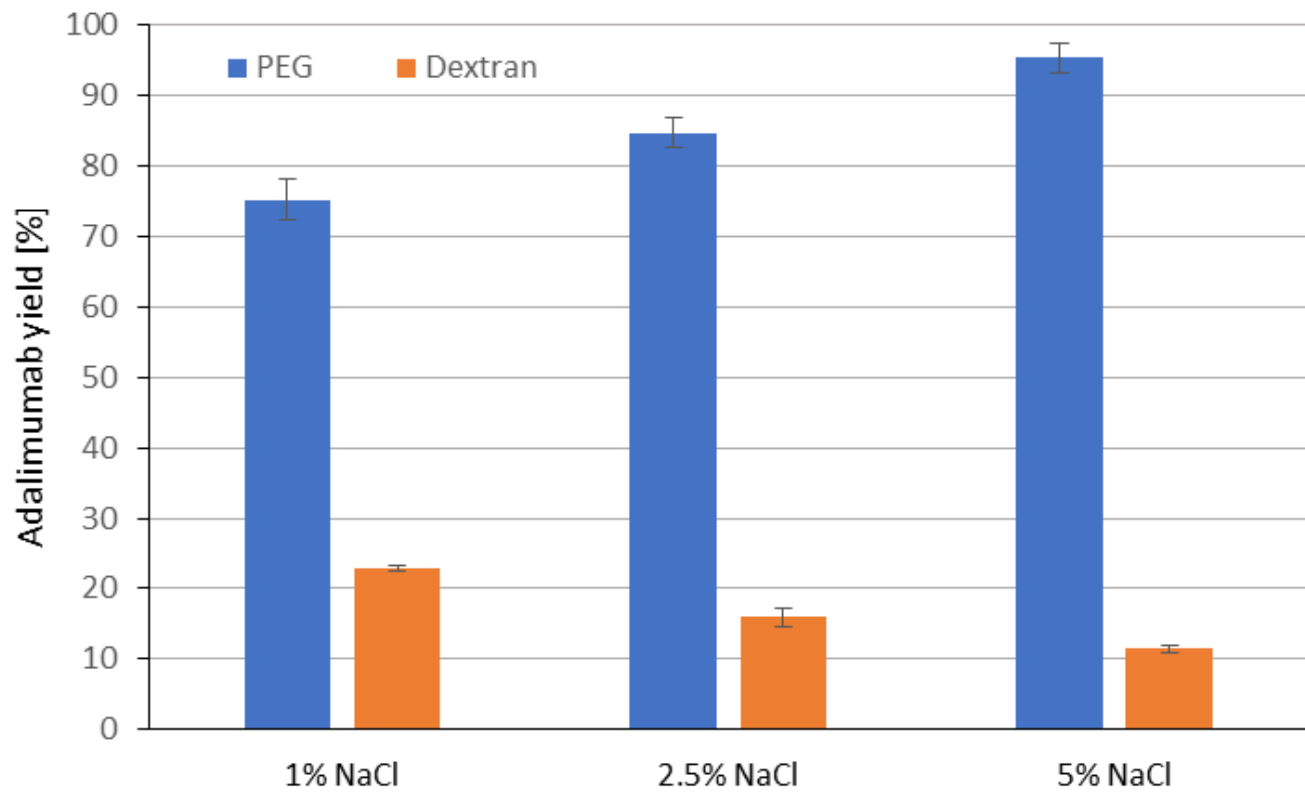
15. ábra: Kromatogram, a 25-200 mM NaCl és állandó pH=8,1-jű sógradiens elúciós kísérletnél.

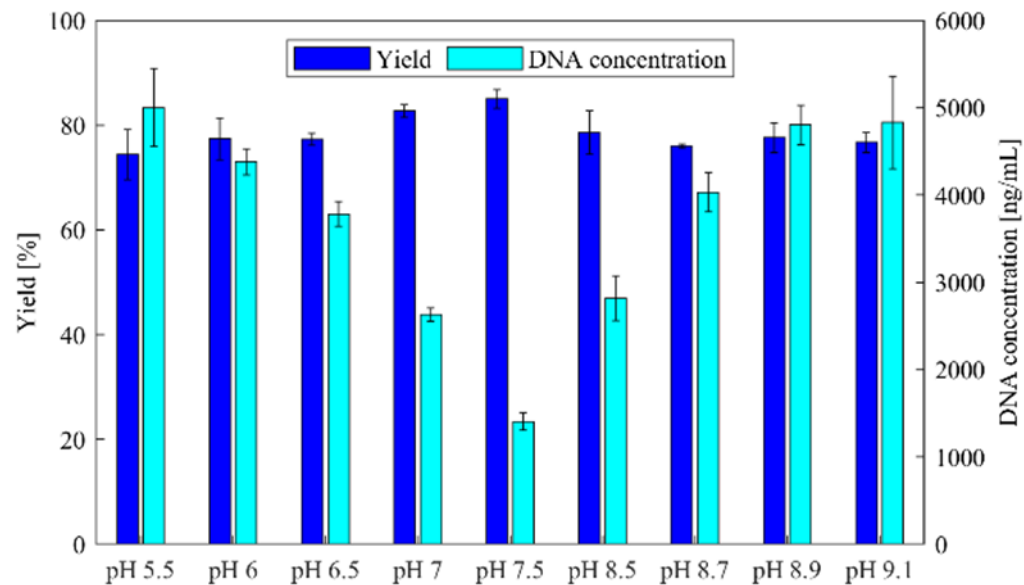
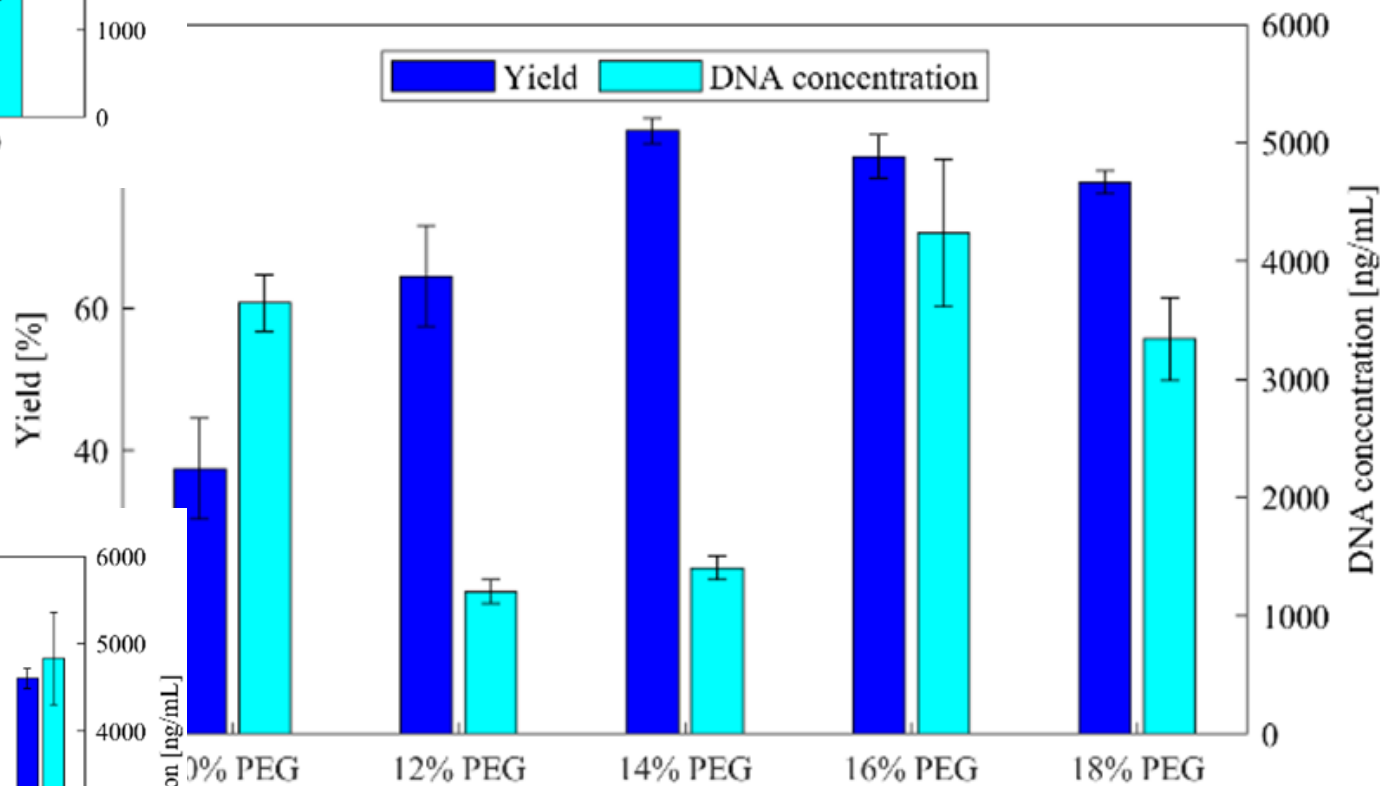
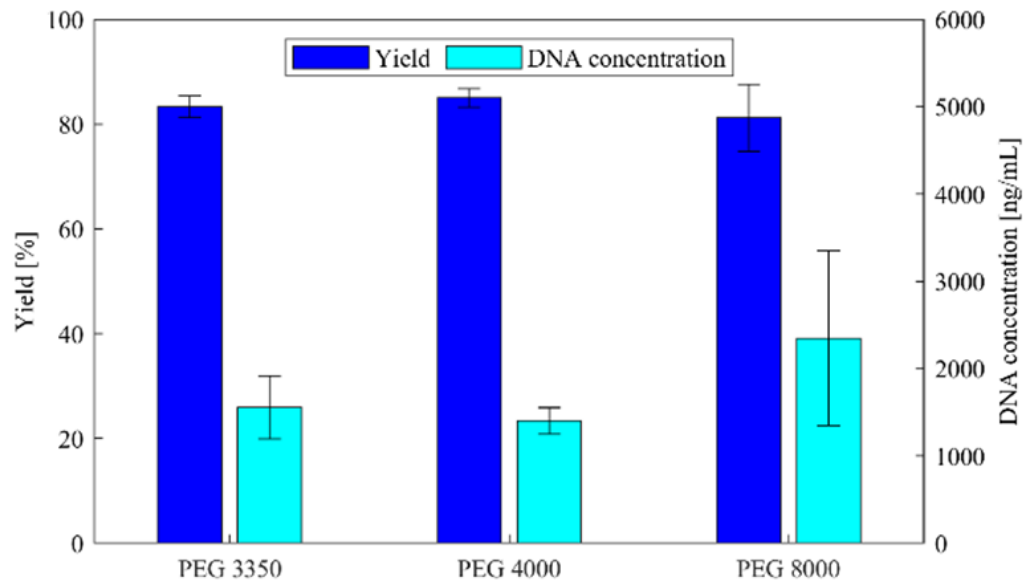




17. ábra: Kromatogram, a pH=5,0-9,1, maximálisan 100 mM NaCl-t elérő gradiens elúciós kísérletnél.







<b>Method</b>	<b>Total yield</b>	<b>HCP [ppm]</b>	<b>DNA [ng/mL]</b>	<b>Aggregation</b>
<b>Fermentation broth</b>	-	5411	520 000	-
<b>Affinity chromatography</b>	91%	6	5	0.65 %
<b>Affinity and Cation exchange chromatography</b>	82%	0.3	0.8	0,36 %
<b>Precipitation</b>	78%	2695	3276	2.27 %
<b>Extraction</b>	76%	2377	1241	4,52 %
<b>Extraction and Back – extraction steps</b>	54%	1332	859	<0.1 %



**KÖSZÖNÖM A FIGYELMET!**

