

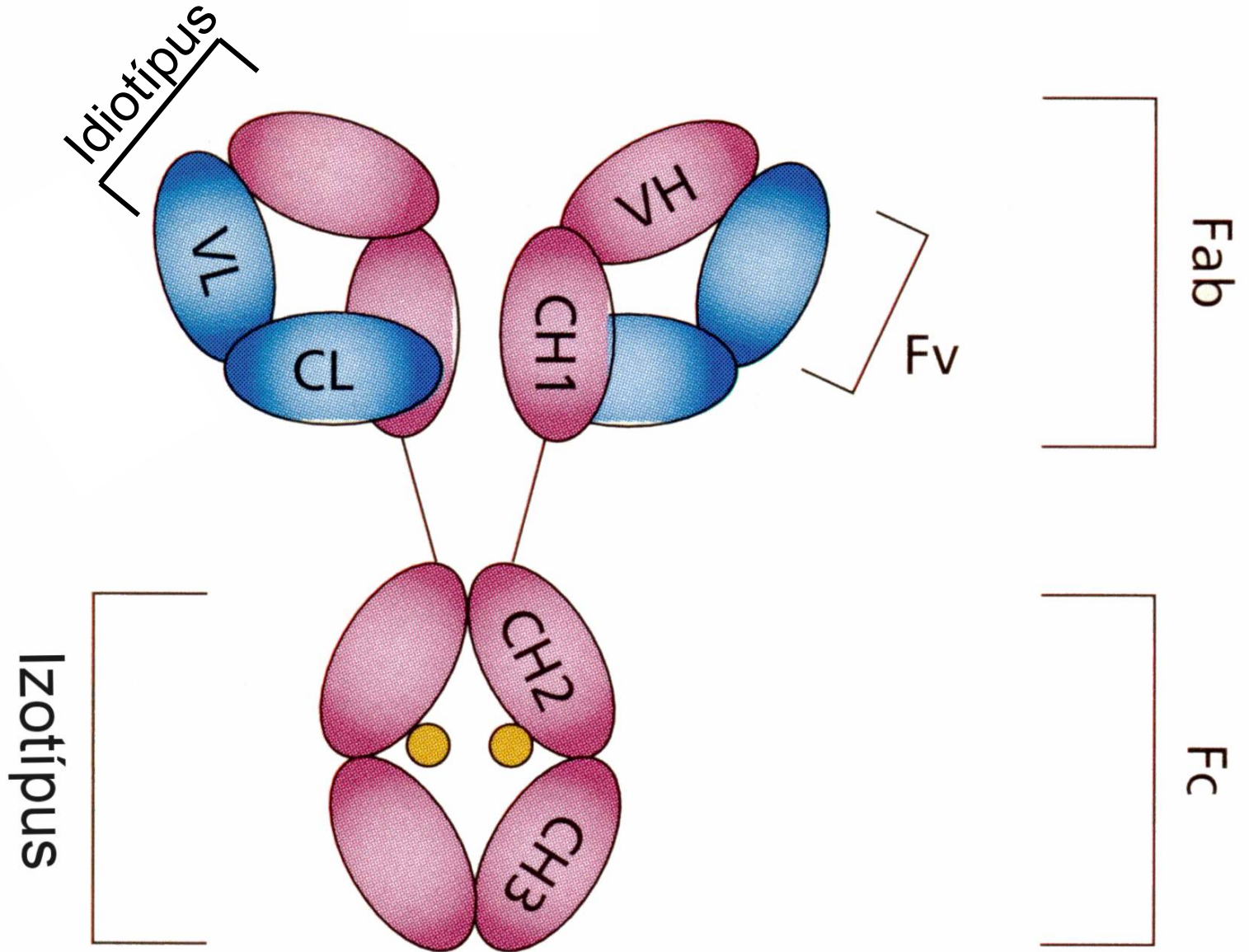
# **Monoklonális antitestek előállítása, jellemzői**

2011. / 3

**Immunológiai és Biotechnológiai Intézet**

**PTE KK**

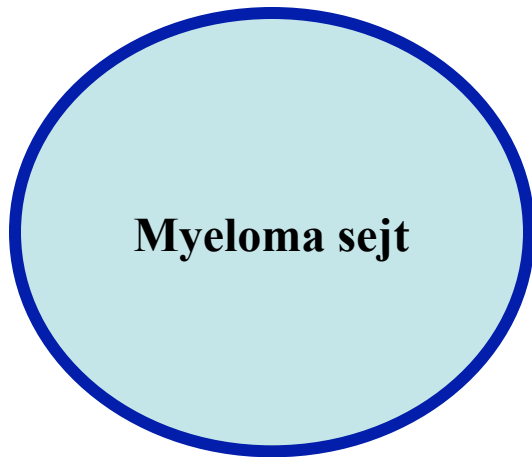
# Antitestek szerkezete



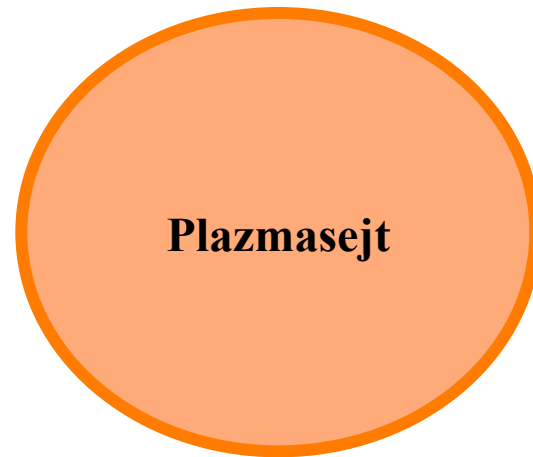
# **Monoklonális ellenanyag előállítás: Hybridoma technika**

**Lehetővé teszi kezdetben korlátozott osztódási képességű, de specifikus immunológiai tulajdonsággal rendelkező sejt korlátlan ideig való *in vitro* fenntartását.**

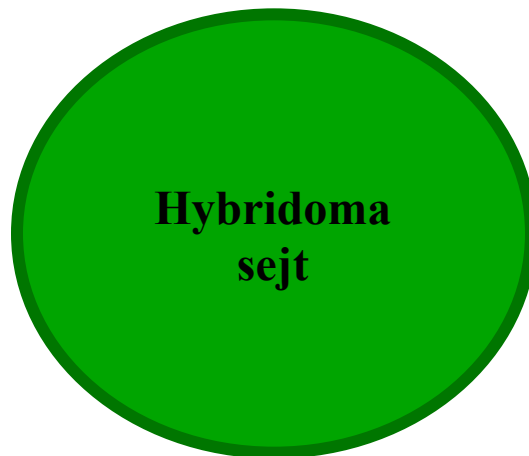
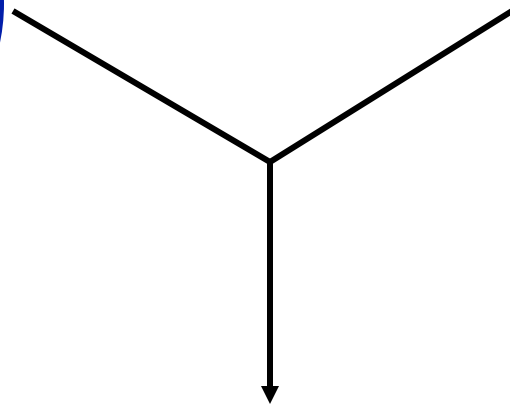
**A módszer alapja, hogy aktivált immunsejteket *in vitro* B-sejt/plazmasejt eredetű tumorsejtekkel fúzionáltatunk.**



**korlátlan osztódás**

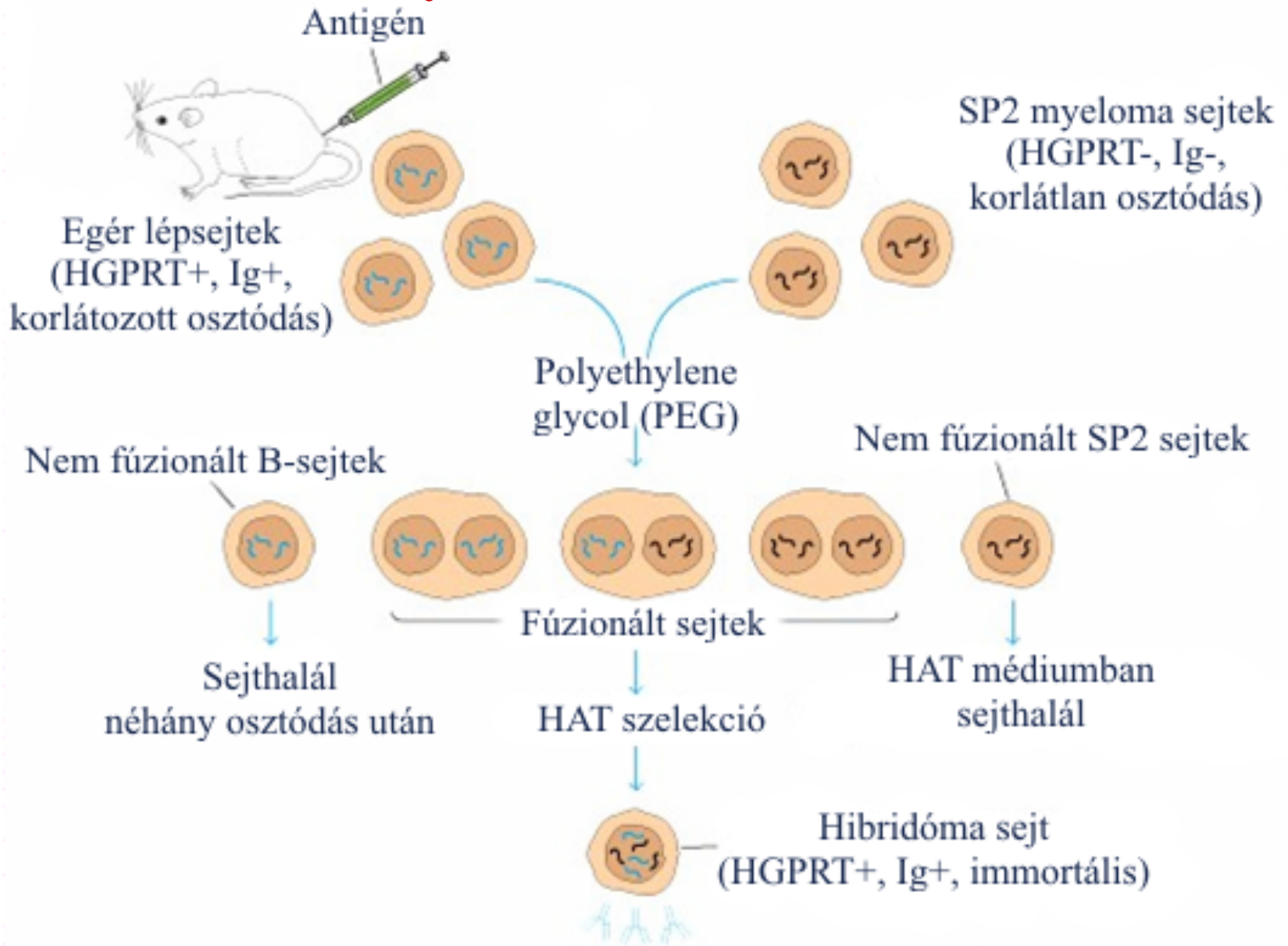


**ellenanyag termelés**



**korlátlan osztódás és  
ellenanyag termelés**

# Hybridoma-technika I.



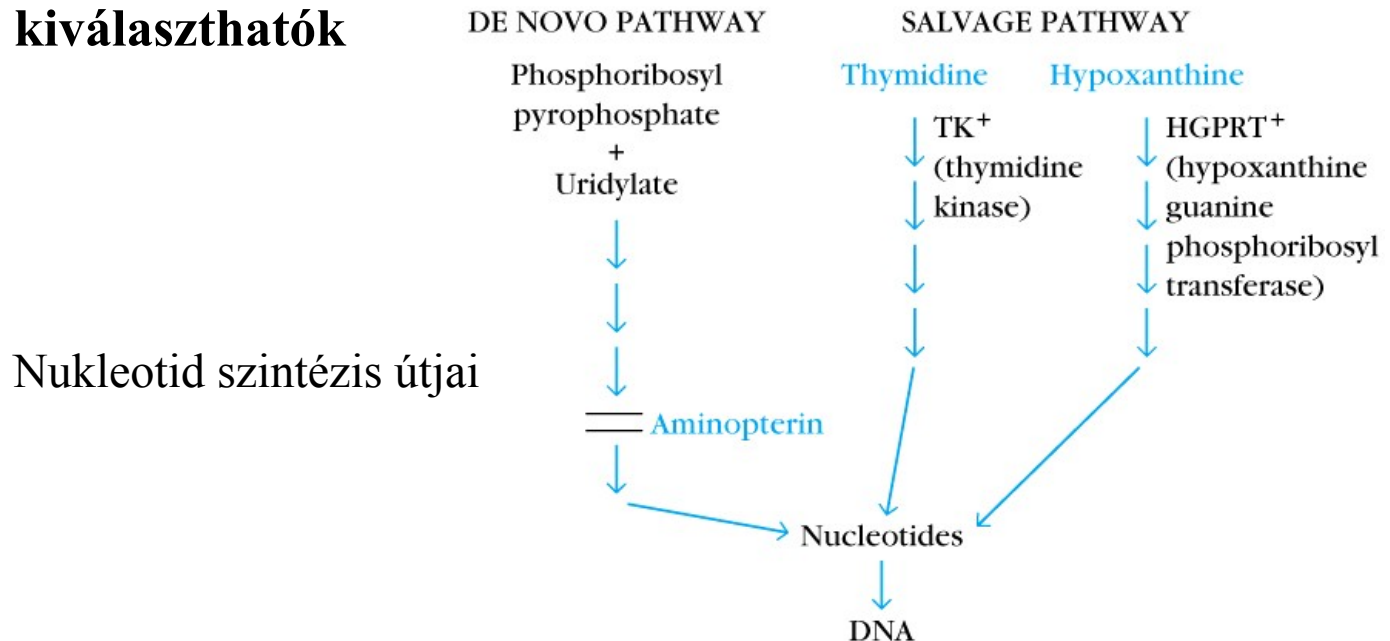
# Hybridoma-technika II.

1. **Sejtfúzió:** lépsejt (immunizált állatból) + nem szekretáló myelómasejt egérből (Sp-2/0-Ag14) + PEG

2. **Szelekció:**

a megfelelő hibridsejtek kiválasztása

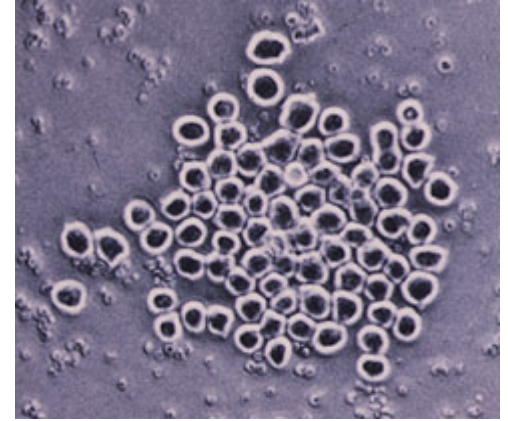
- Sp-2 sejtekből hiányzik a HGPRT- és a TK-enzim (purin- és pirimidinszintézis), a lépsejtek rendelkeznek velük, így szelektív tenyésztőmédiumban (HAT) a lépsejt-Sp2 hibridek kiválaszthatók



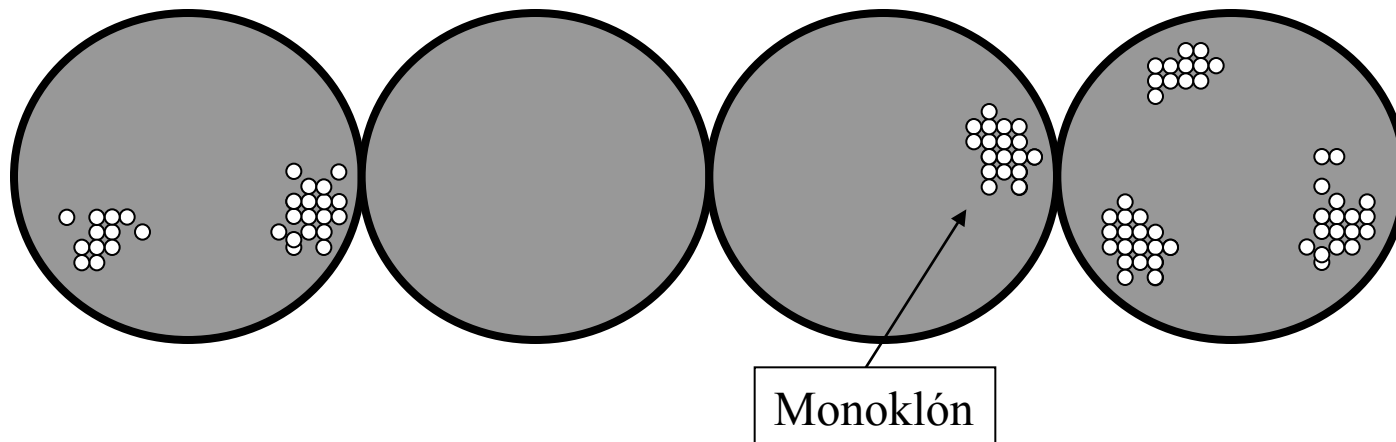
# Hybridóma-technika III.

Megfelelő antitest-termelő hibrid kultúrák kiválasztása

- Tesztelés ELISA-val
- **Klónozás:**  
az antitesttermelő sejtek hígítása  
(96 lyukú lemez minden lyukába átlagosan 1 sejt jusson)



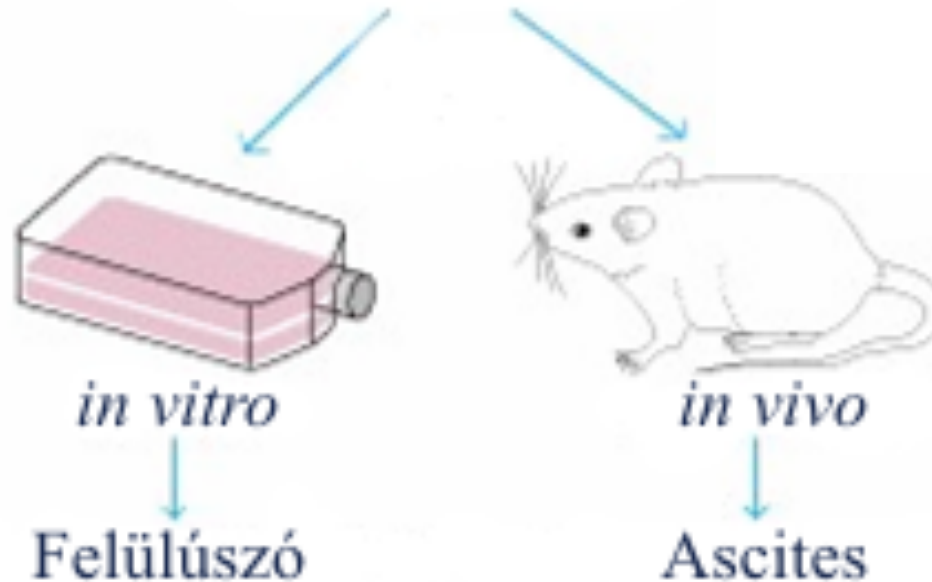
Ismételt ellenanyag-tesztelés



# Hybridoma-technika IV.

## 4. Antitest előállítás nagy mennyiségben:

- (1) felülúszó termeltetése hybridoma-sejtekkel *in vitro*;
- (2) hybridoma-sejtek beadása ip. egérbe (ascites);
- (3) fermentor (műegér).





# Monoklonális antitestek felhasználása

- **Preparatív módszerek**
  - Proteintisztítás
- **Analitikai módszerek (Diagnosztikus célok, kutatás)**
  - Limfocita-alcsoportok és klónok azonosítása, izolálása
  - Morfológiai vizsgálatok (tumorok, gyulladás detektálása)
  - Rutin laboratóriumi vizsgálatok - szerológia
- **Terápiás célok**
  - Daganatok
  - Autoimmun kórképek
  - Gyulladásos betegségek

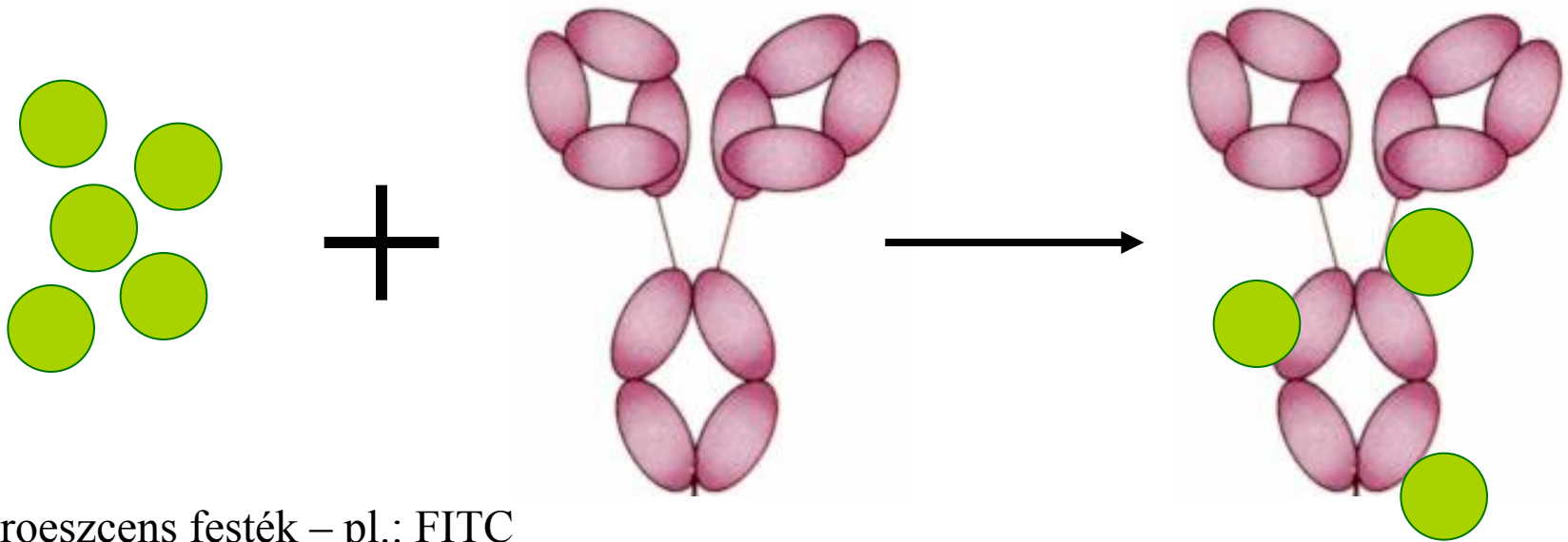


1g arany (színarany) ~ 12.000 Ft

1mg mAb ~ 50.000 Ft

Ha már megvan a monoklón!

# Konjugálás



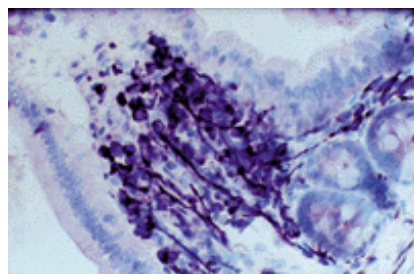
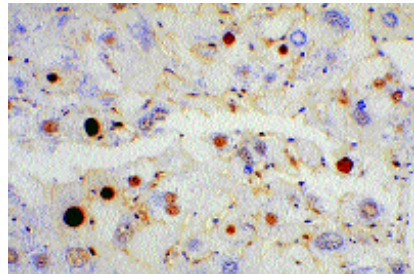
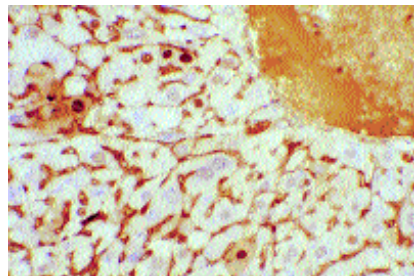
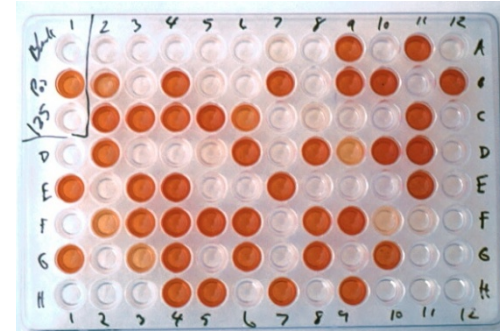
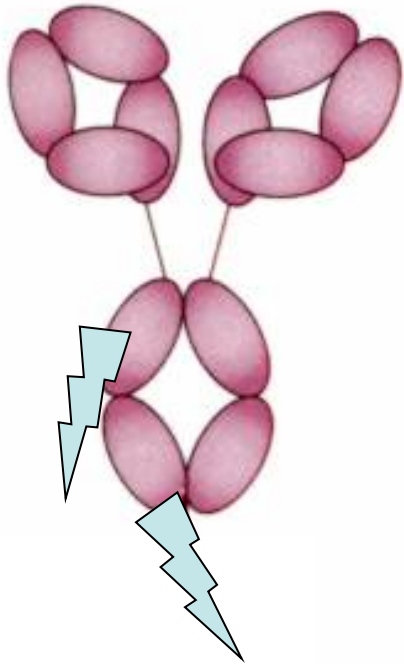
Fluoreszcens festék – pl.: FITC

Enzim – pl.: HRPO

Biotin

# Enzim konjugátumok

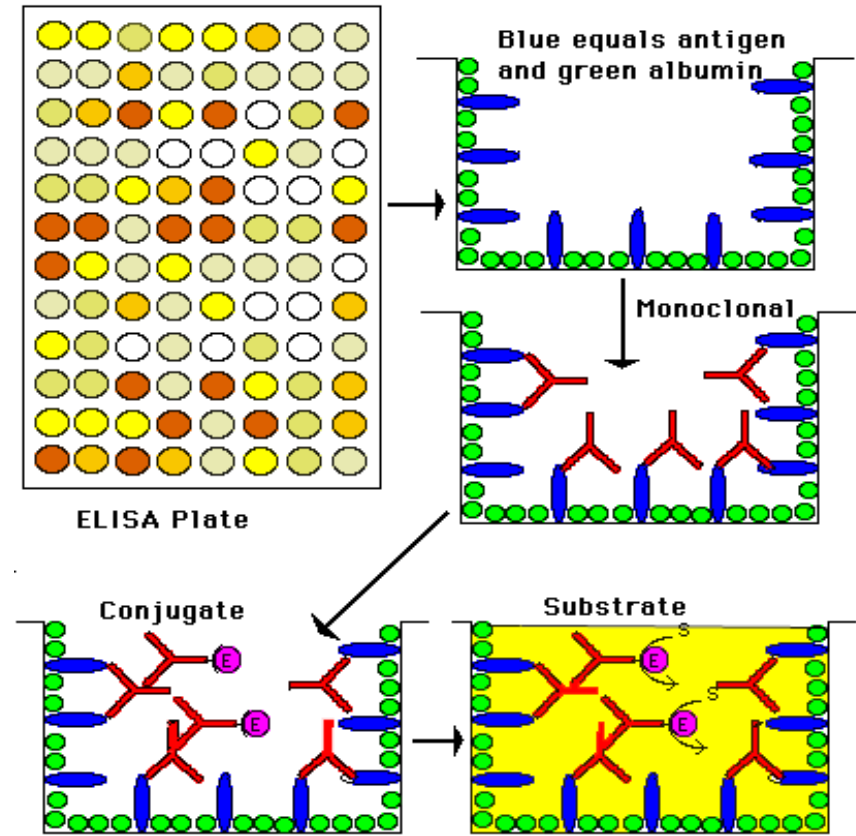
Az enzim szubsztrátot alakít át, amely általában színreakcióval jár.



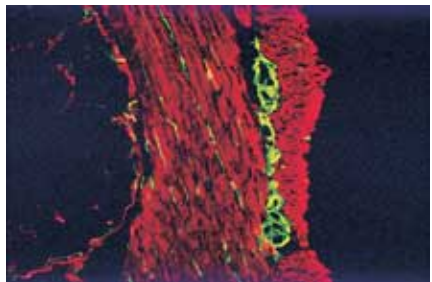
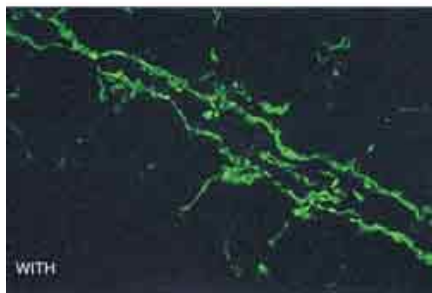
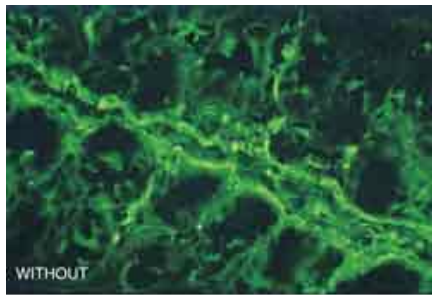
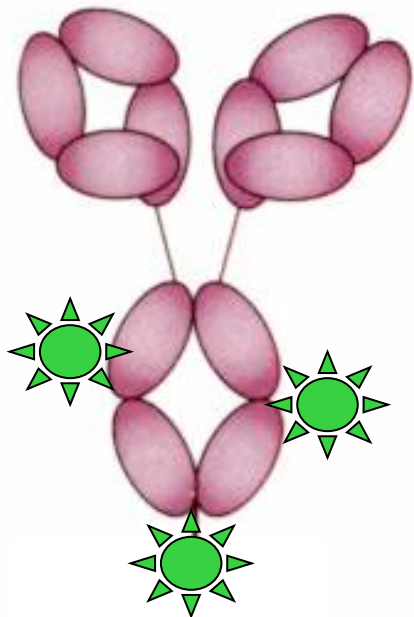
Immunohisztokémiai metszetek

HRPO,  
ALP

## Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)



# Fluoreszcens festék konjugátumok



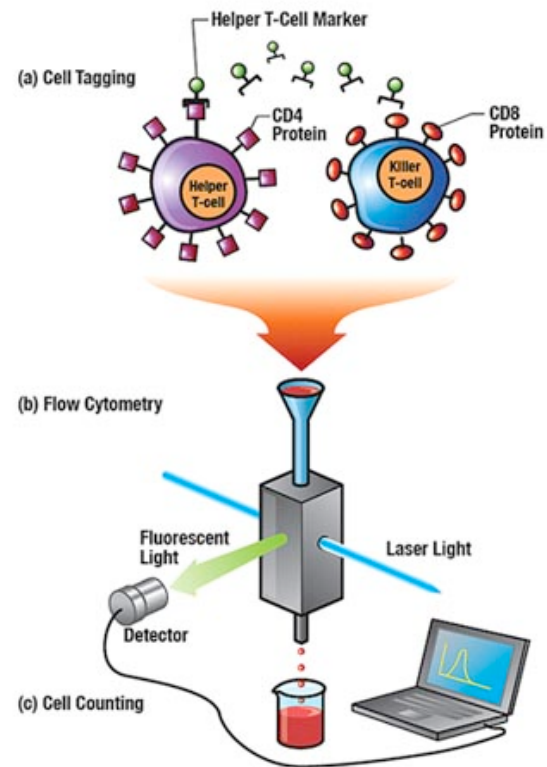
FITC

FITC

PE

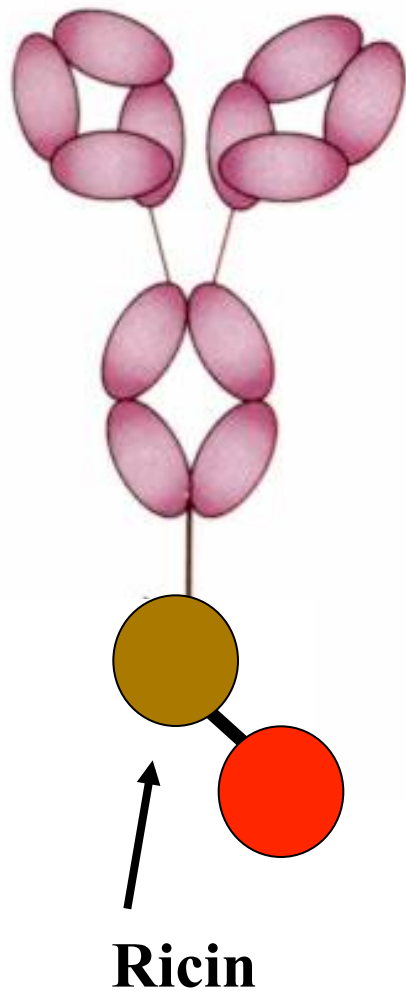
FITC,  
PE

Immunfluoreszcens festés



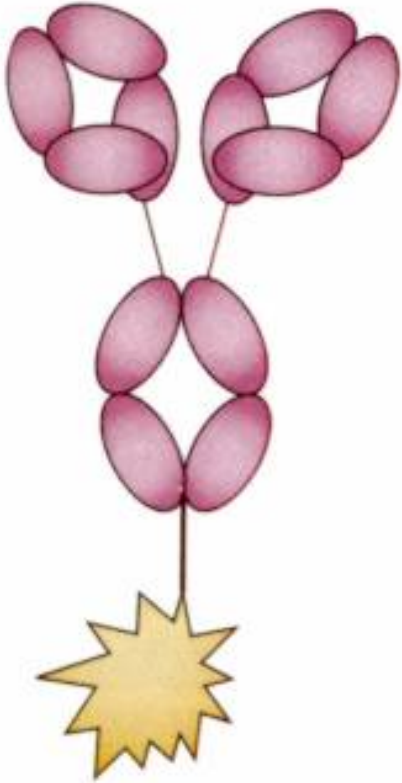
Áramlási citometria

## Toxin konjugátumok



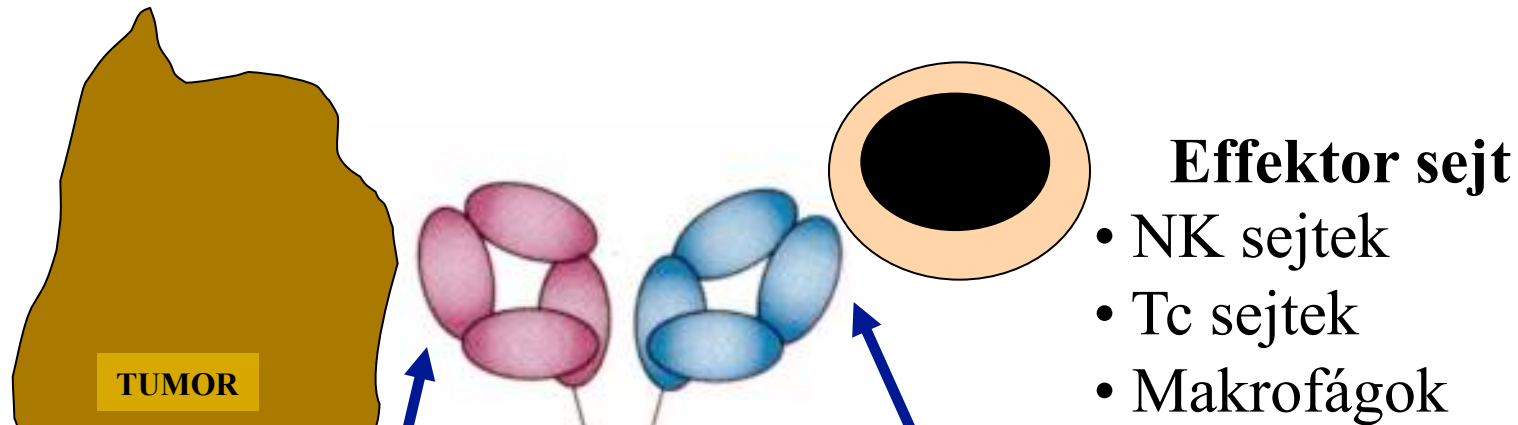
A célsejt felületéhez kötődő Ig-hoz toxint (pl. ricint) konjugálhatunk, amely célsejt által internalizált Ig-al együtt a sejt citoplazmájába jut. Itt leválik az Ig-ról és kifejti toxikus hatását (pl. megállítja a sejt fehérjeszintézisét).

## Radioizotóp konjugátumok



- **$\gamma$  sugárzó, alacsony dózisban**  
Diagnosztikum – radioaktív imaging  
Tumorok és mikrometasztázisok  
felkutatása, amelyeket más módszerrel  
nem lehet kimutatni
- **$\alpha$ ,  $\beta$  sugárzó magas dózisban**  
Terapeutikum – tumorok kezelése

# Bispecifikus antitestek



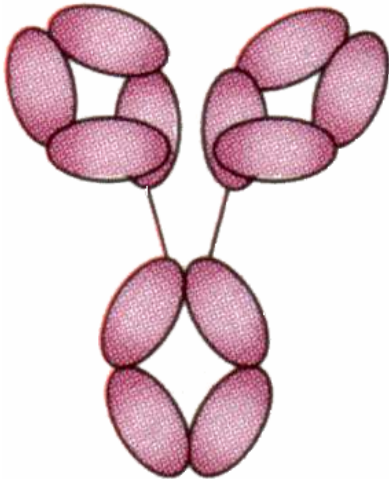
A bispecifikus antitesteket két különböző Ig Fab fragmentumának proteolízisével majd a két különböző fragmentum kémiai keresztkötésével nyerik.

Tumor specifikus  
sejtfelszíni molekula ellen

Antigénként jól használható effektor sejt molekulák:

- CD3 T sejt
- CD64 (Fc $\gamma$ R1) nagy affinitású Fc $\gamma$ R; M $\phi$
- CD89 Fc $\alpha$ R; M $\phi$  , granulociták

# Rágcsáló antitestek



A monoklonális antitestekkel történő első terápiás próbálkozásokkor rágcsáló antitesteket használtak.

Az első emberben használt antitest az OKT3 (anti-CD3) volt.

A kezelés hatásos volt számos esetben, ismételt alkalmazáskor azonban súlyos immunreakciók léptek fel.

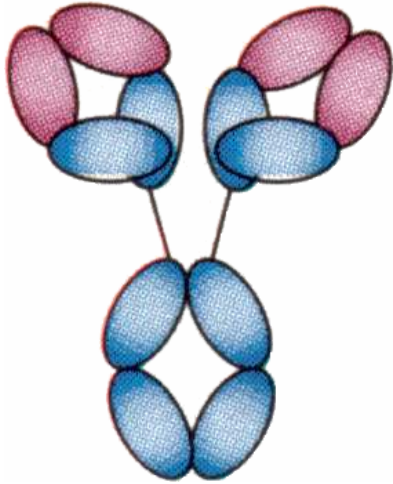
**PROBLÉMA: HAMA (human anti-mouse-antibodies)**

Noha konzervált az Ig-ok konstans része, mégis számos különbség van az emberi és a rágcsáló Ig-k között.

HAMA-t 8-12 nappal a kezelés után tudnak kimutatni, a csúcskoncentráció 25-30 nap után van.



# Kiméra antitestek



A kiválasztott rágsáló monoklonális antitest Fv régióját kódoló géneket hozzákapcsolják egy humán antitest Fc részét kódoló génjeihez.

A kiméra antitestek kb. 75%-a humán.

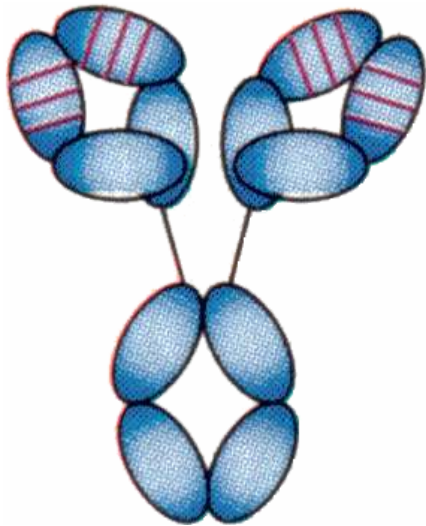
Az antigén specificitása megegyezik az eredeti rágsáló antitestével azonosak.

Az *in vivo* féléletideje és az effektor funkciói az eredeti humán antitestével azonosak.

**PROBLÉMA:**            **HACA (human anti-chimeric-antibodies)**

Kevésbé immunogének, de még mindig szignifikáns antitest választ váltanak ki.

# Humanizált antitestek



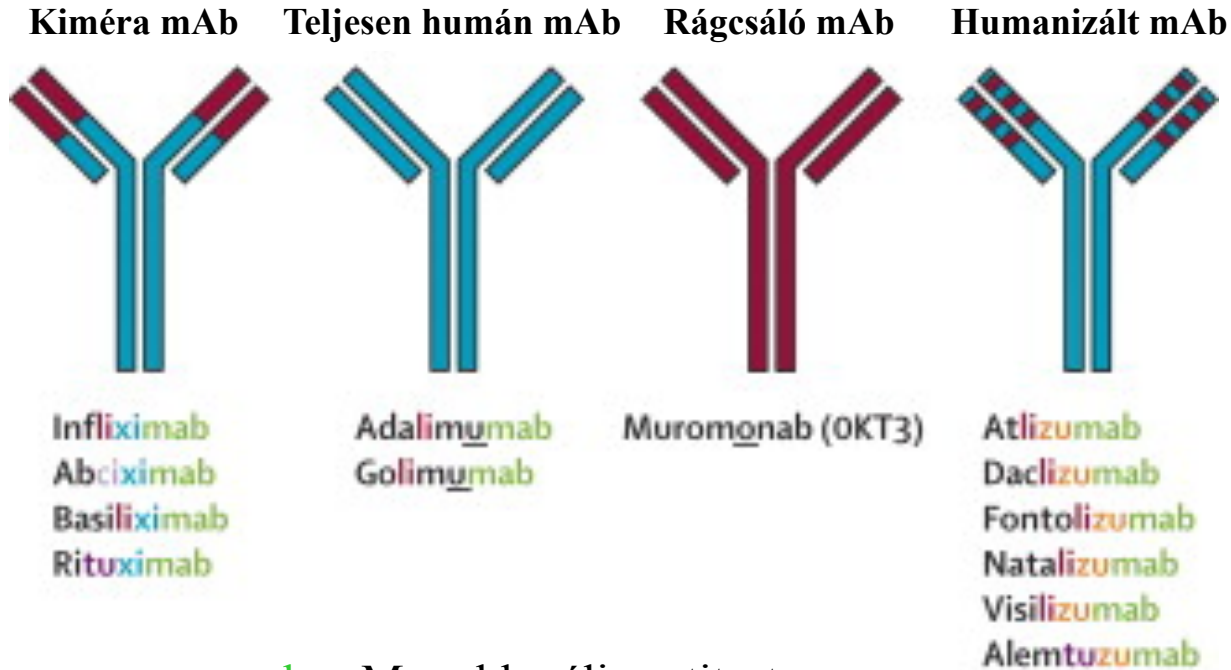
**Ha a kiválasztott rágsáló monoklonális antitestjének csupán a CDR részeit ültetik át egy humán antitestbe humanizált antitesteket kapnak.**

**A humanizált antitestek > 90%-a humán.**

**Az antigén specificitása megegyezik az eredeti rágsáló antitestével azonosak.**

**Az in vivo féléletideje és az effektor funkciói az eredeti humán antitestével azonosak.**

# US Food and Drug Administration nevezéktana a Terápiás monoklonális antitestekre



- mab Monoklonális antitest
- xi Kiméra antitest
- zu Humanizált antitest
- li Immunomoduláns antitest
- tu Tumor ellenes antitest
- ci Kardiovaszkuláris betegségben használható antitest
- u Humán
- o Rágcsáló

# FDA által bejegyzett terápiás monoklonális antitestek

Termék neve	Specificitása	Típusa	Alkalmazási terület	Év
<b>Orthoclone OKT3</b>	CD3	egér	Transzplantátum rejekció	1986
<b>ReoPro</b>	GpIIb/gpIIa	kiméra Fab	Kardiovaszkuláris betegségek	1994
<b>Rituxan (mabthera)</b>	CD20	kiméra	Non-Hodgkin lymphoma	1997
<b>Zenapax</b>	CD25	humanizált	Transzplantátum rejekció	1997
<b>Remicade</b>	TNF $\alpha$	kiméra	Crohn betegség, rheumatoid arthritis	1998
<b>Simulect</b>	CD25	kiméra	Transzplantátum rejekció	1998
<b>Synagis</b>	RSV	humanizált	Respiratorikus syncytium vírusfertőzés	1998
<b>Herceptin</b>	Her-2	humanizált	Metasztatikus emlőrák	1998
<b>Mylotarg</b>	CD33	humanizált	Akut myeloid leukémia (AML)	2000
<b>Campath</b>	CD52	huamnizált	B sejtes krónikus limfoid leukémia (B-CLL)	2001
<b>Zevalin</b>	CD20	egér	B sejtes non-Hodgkin-lymphoma	2002
<b>Erbitux</b>	EGFR	kiméra	Colorectális carcinoma (EGFR+ tumorok?)	2004
<b>Avastin</b>	VEGF	humanizált	Colorectális carcinoma	2004
<b>Tysabri</b>	$\alpha 4\beta 1/7$ integrin	humanizált	Sclerosis multiplex	2004