



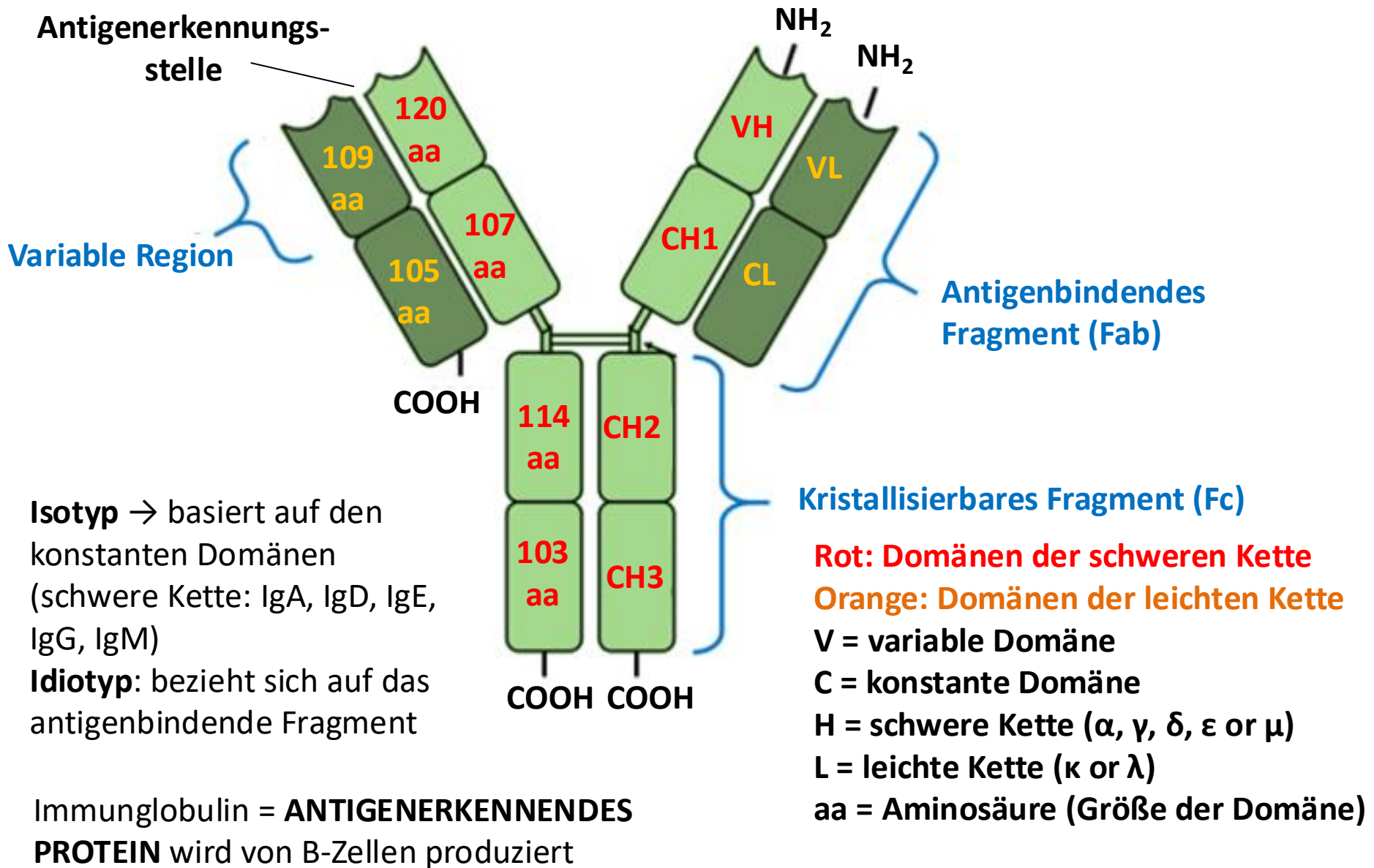
IMMUNOLÓGIAI ÉS
BIOTECHNOLÓGIAI
INTÉZET



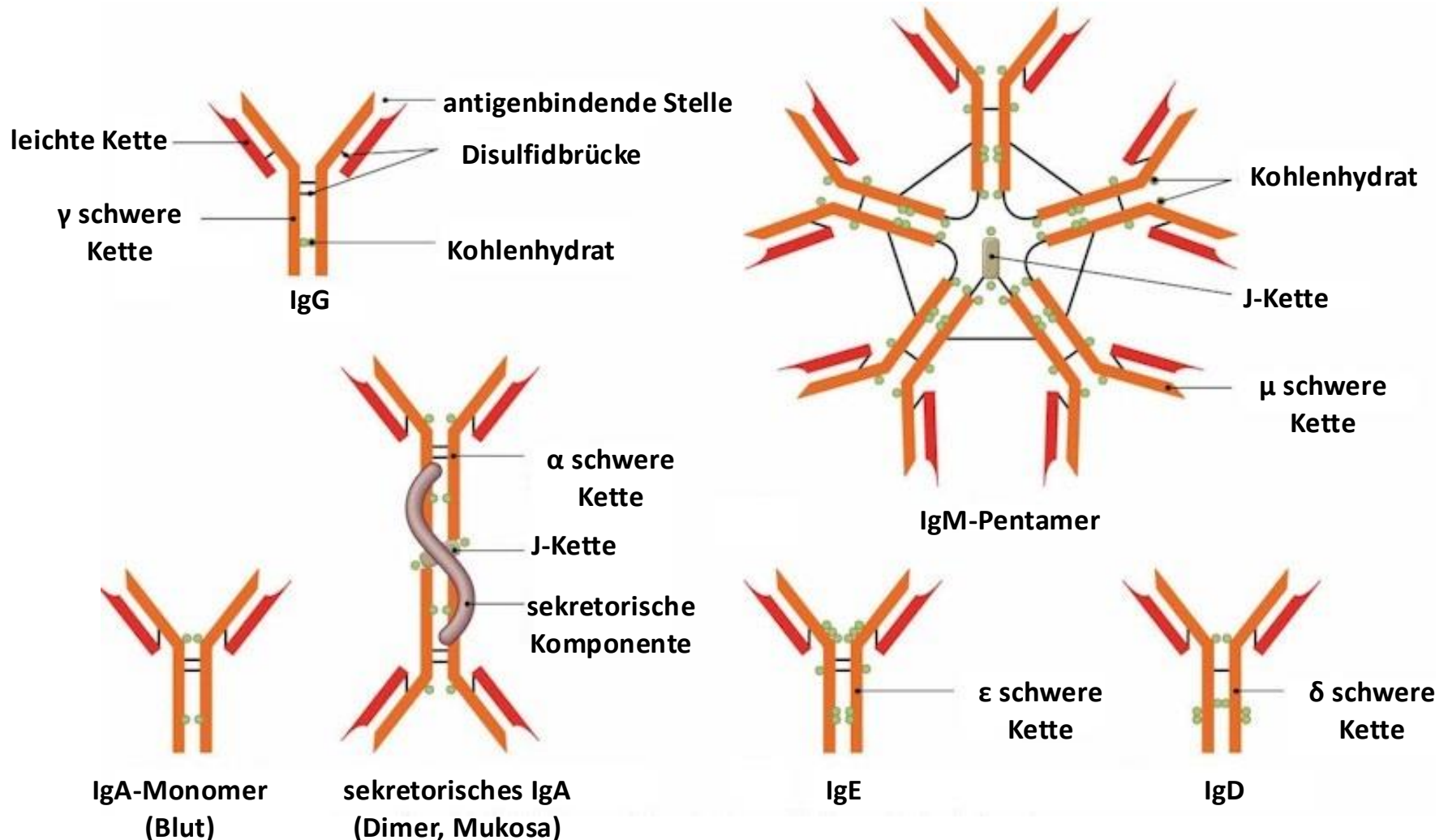
4. Praktikum: Antikörper-Herstellung für Diagnostik und Therapie. Monoklonale- und polyklonale Antikörper, Hybridom- Technologie Grundlagen der Immunologie

Universität Pécs, Klinisches Zentrum
Institut für Immunologie und Biotechnologie
Pécs, 2026.

Struktur des Immunglobulin-G's

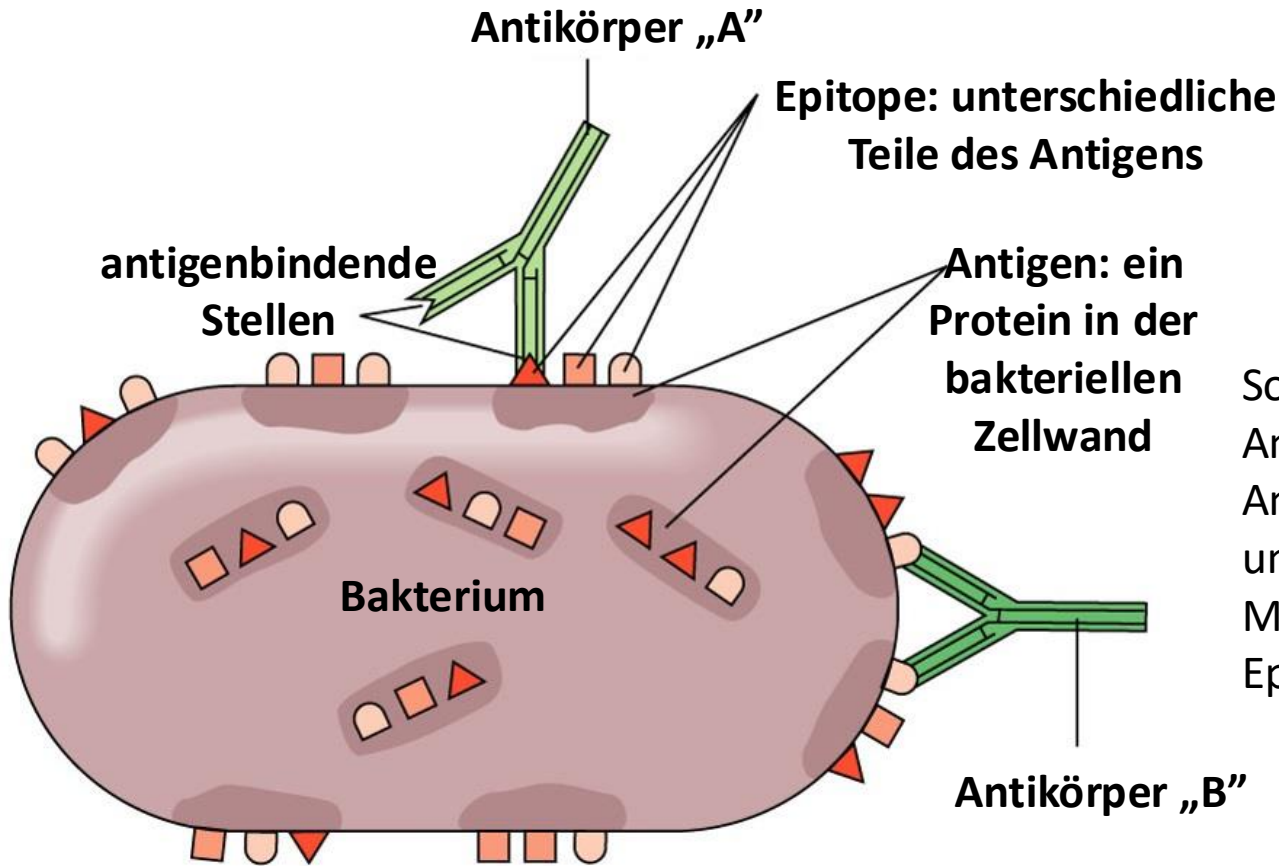


Immunglobulin-Klassen



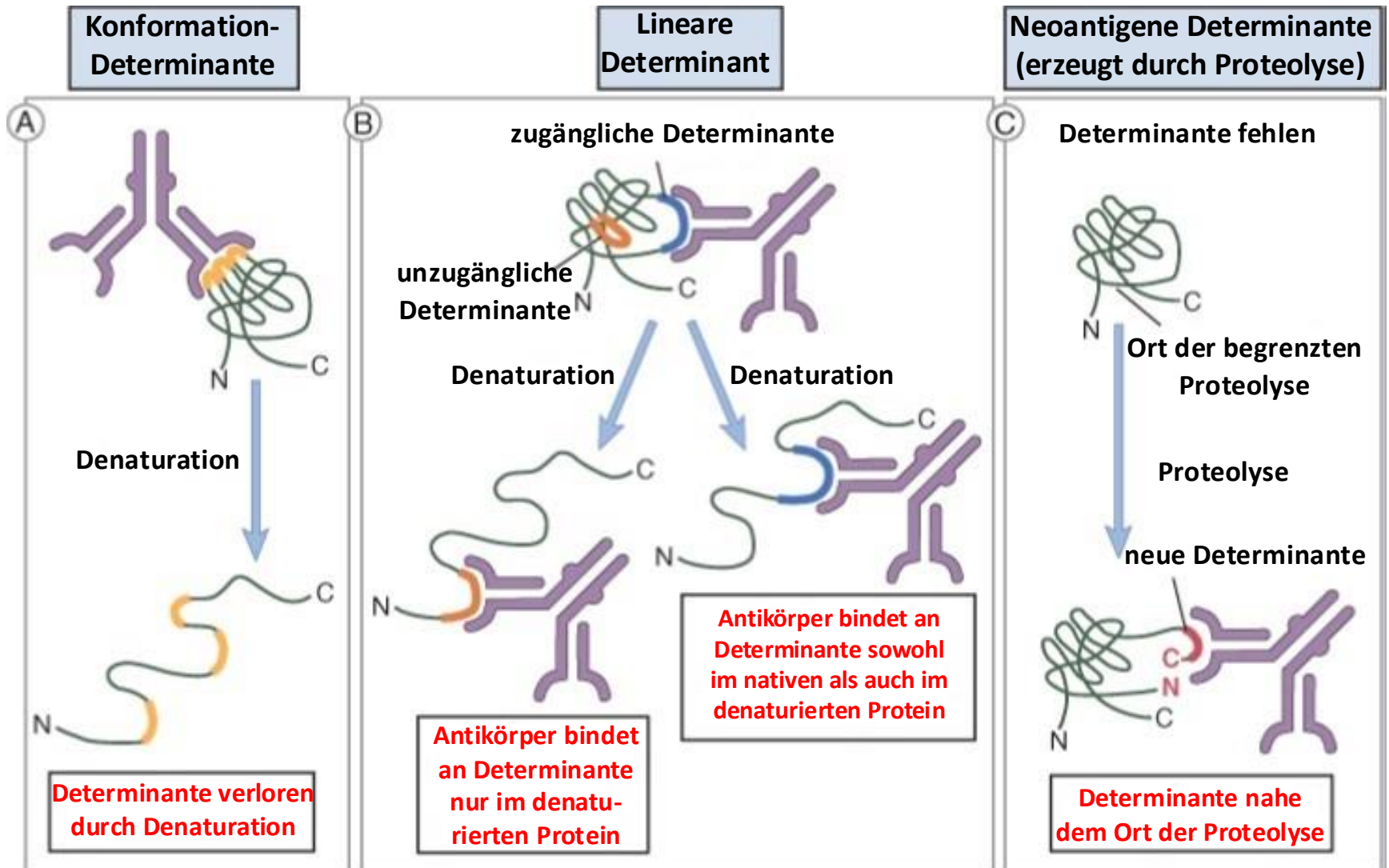
ACHTUNG! Klassen werden anhand des Typs der konstanten Domäne bestimmt! (IgM ist nicht IgM, weil es ein Pentamer ist, sondern weil es eine konstante μ -Domäne hat.)

Unterschied zwischen Antigen und Epitop

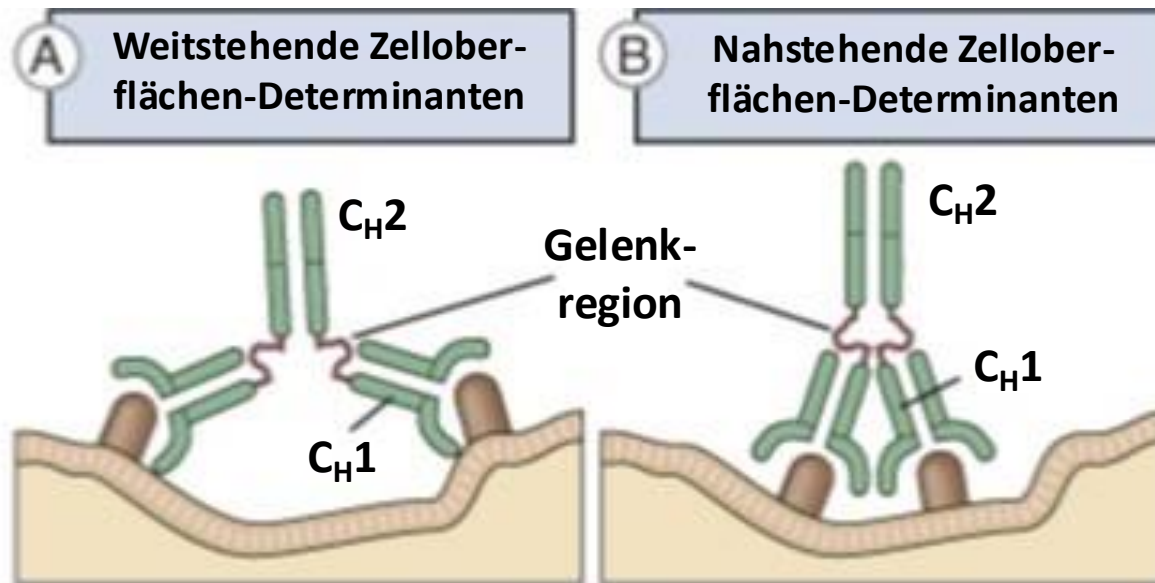


Sowohl Antikörper „A“ als auch Antikörper „B“ binden dasselbe Antigen, aber sie erkennen unterschiedliche Teile des Moleküls, die so genannten Epitope.

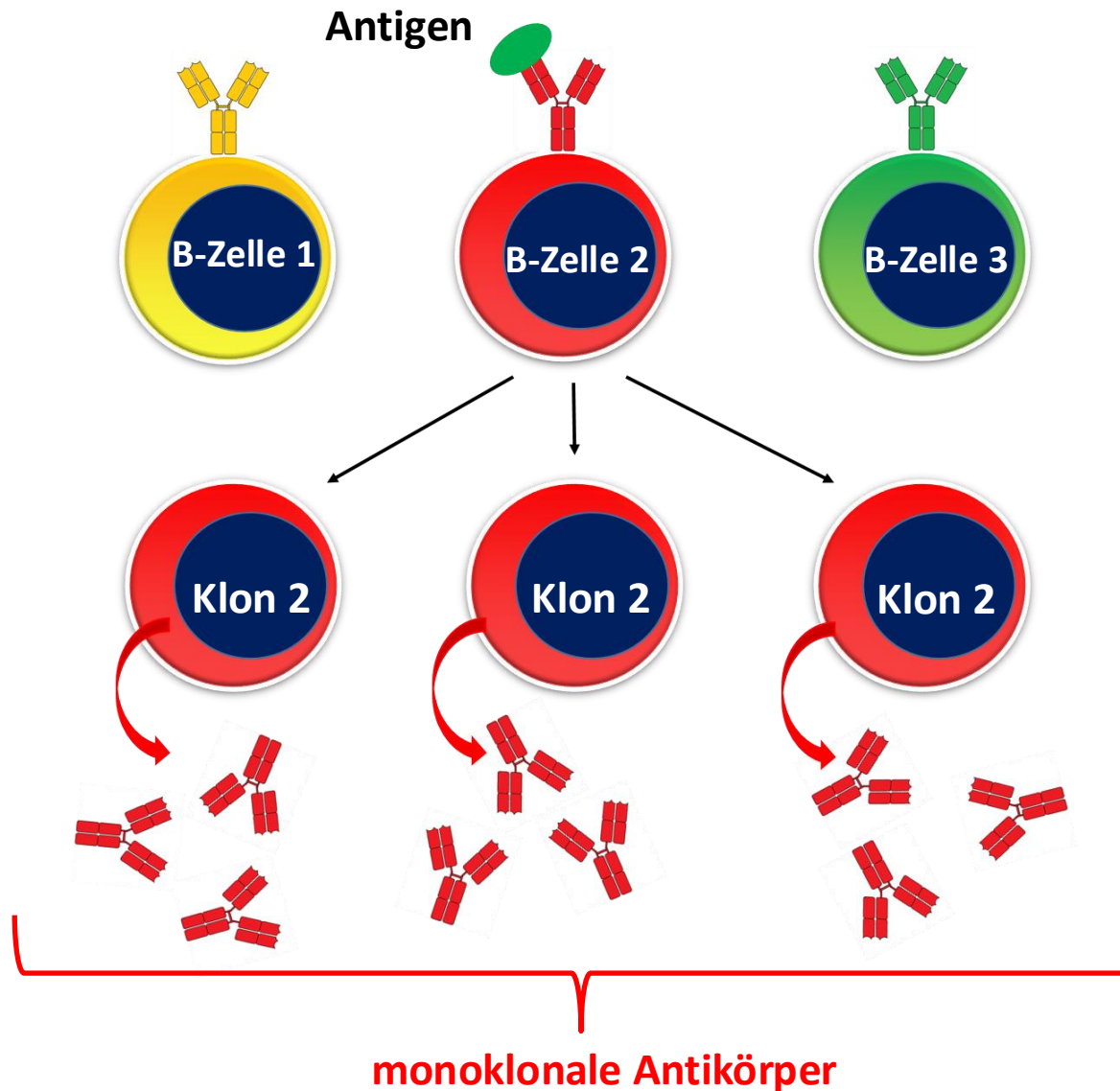
Typen von Antigen-Determinanten



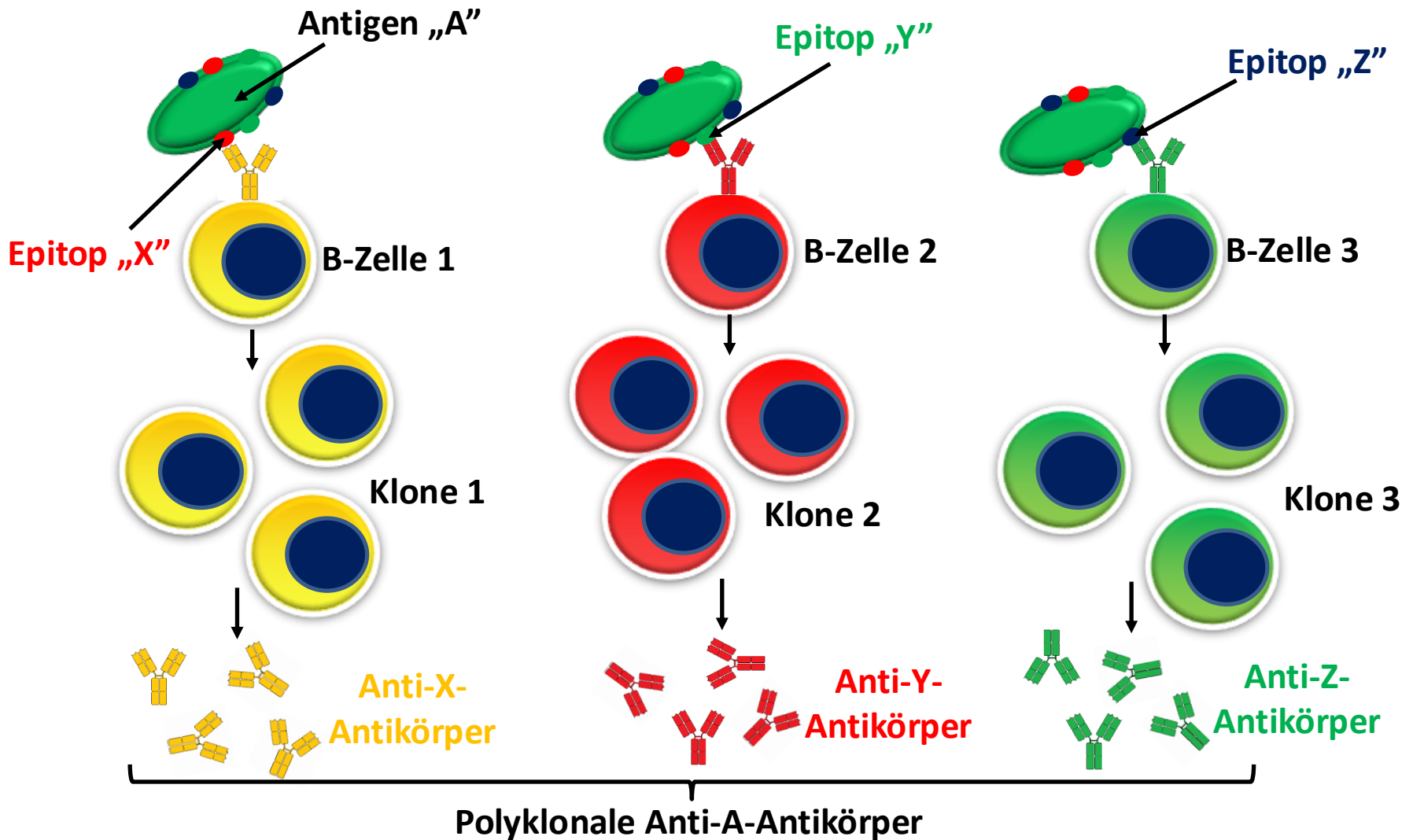
Funktion der Gelenkregion



Monoklonale Antikörper



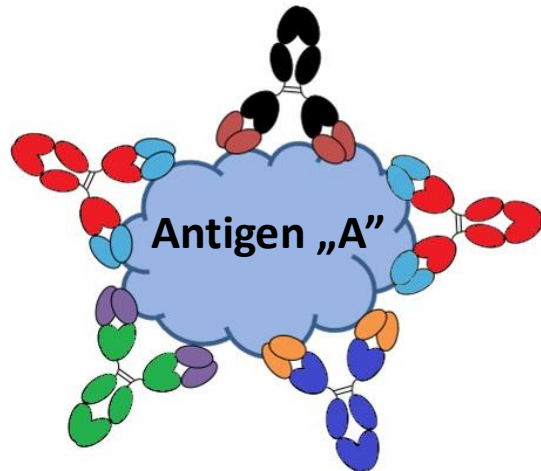
Polyklonale Antikörper



Antigene verursachen eine **polyklonale Zellaktivierung** in lebenden Organismen, die während einer **Immunantwort** immer zur Produktion von polyklonalen Antikörpern führt!

Vergleich von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern

Polyklonale Anti-"A"-Antikörper



Polyklonal:

- Produkt **mehrerer B-Zell-Klone**
- Erkennt **verschiedene Epitope** des Zielantigens
- **Variable Spezifität** und **Affinität**
- (Betrachtet sie als verschiedene monoklonale Antikörper)

Monoklonale Anti-"A"-Antikörper



Monoklonal:

- Produkt eines **einzigen B-Zell-Klons**
- Erkennt ein **einziges, spezifisches Epitop** des Antigens
- Antikörper haben die **selbe Spezifität** und **Affinität**

Immunisierung

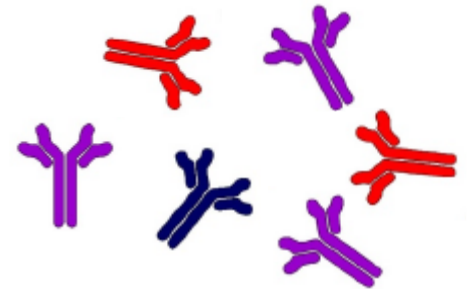
- **Immunisierung:** ein Antigen wird in einen lebenden Organismus verabreicht, damit der Organismus eine Immunantwort entwickeln und Antikörper gegen das Antigen produzieren kann. [2.]
- Immunisierung zur Prävention von infektiösen Krankheiten = Vakzination/Impfung
- Produktion polyklonaler Antikörper:
 - Immunisierung eines Tiers mit dem Antigen
 - **Polyklonale Antikörper**, die **das Antigen erkennen**, können **vom Blutserum** des immunisierten Tiers nach einer Immunantwort isoliert und gereinigt werden. [1.]
- Problem: Monoklonale Antikörper können so nicht produziert werden.
- Lösung: Hybridom-Technologie (siehe später) z.B.: Polyklonale Hasen Anti-A-IgG



1. Verabreichung
des Antigens „A“



2. Blutserum des immunisierten Tiers
mit polyklonalen Antikörpern



3. Reinigung und
Isolierung der Antikörper

Für Immunisierung genutzte Tiere

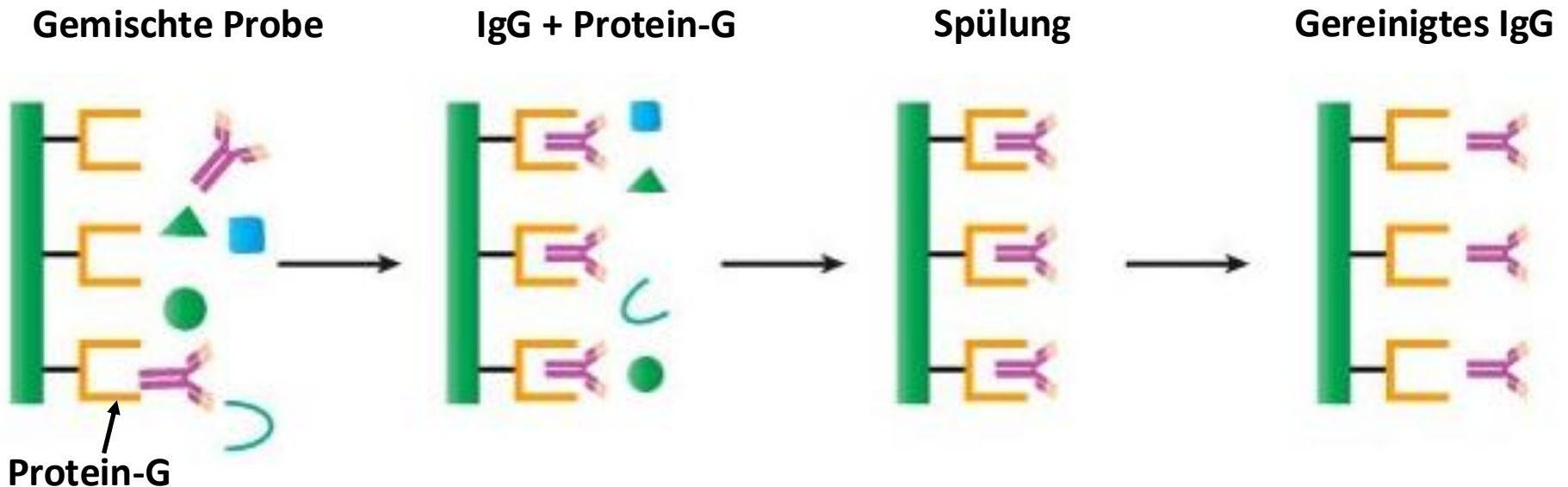


Adjuvantien

- Substanzen, die eine **Immunantwort** gegen ein verabreichtes Antigen **verzögern und verstärken** und in einer verstärkten Antikörperproduktion resultieren.
- Adjuvantien werden auch in menschlichen Impfungen verwendet. (siehe später)^[3,4.]
- Wirkmechanismen u.a.:
 - Sie erhöhen die Antigenaufnahme
 - Sie aktivieren die angeborenen Immunzellen (z.B. Makrophagen) via Mustererkennungsrezeptoren (PRRs)
 - Sie verbessern die Antigenpräsentation durch MHC-II
- Einige Beispiele:
 - **Aluminiumsalze** (z.B. Aluminium-Phosphat, Aluminium-Hydroxid-Oxid, dies sind die häufigsten Adjuvantien in menschlichen Impfungen)
 - Lipid-A-Analoga (z.B. Cervarix[®] = HPV-Vakzine)
 - **Freund-Adjuvans**: Das Antigen ist in Mineralöl emulgiert
 - Komplettes (CFA): enthält abgetötete *Mycobacterium* Bakterien (z.B. *M. tuberculosis*)^[5.]
 - Inkomplettes (IFA): enthält kein *Mycobacterium*
 - **Liposomen** enthalten virale Proteine^[6.]

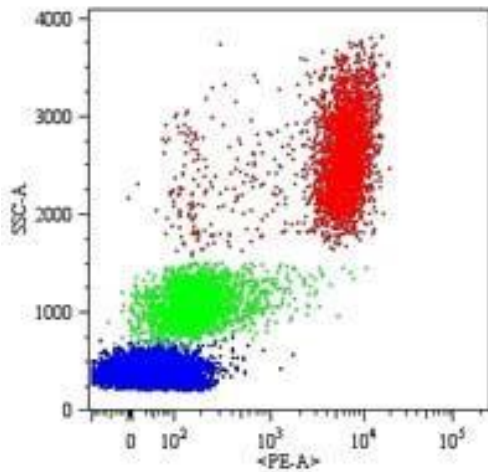
Reinigung von Antikörpern

- Antikörper werden von den **Blutsera** immunisierter Tiere gewonnen.
- Es existieren verschiedene Methoden zur Reinigung der verschiedenen Antikörper-Isotypen
- IgG^[7.]
 - Präzipitation (z.B. durch die Nutzung von Ammonium-Sulfat)
 - **Chromatographie**, vor allem Affinitätschromatographie unter Benutzung von **Protein-A** (*Staphylococcus*) oder **Protein-G** (*Streptococcus*) oder Ionenaustauschchromatographie

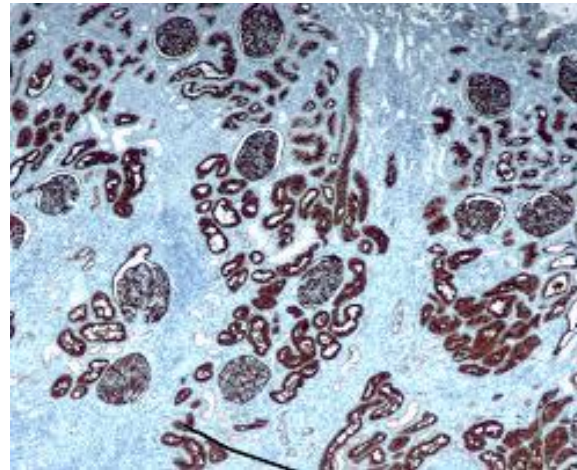


Antikörper-Tests

- Die Spezifität und der Titer (Quantität) des gereinigten Antikörpers müssen mit dem Antigen in dem gleichen System getestet werden, in dem der Antikörper später genutzt wird. Beispiele (werden später im Detail erörtert):
 - Durchflusszytometrie
 - ELISA
 - Immunhistochemie



Punktdiagramm
(Durchflusszytometrie)



Immunhistochemie
(CD10-Färbung in einer
gesunden menschlichen Niere)



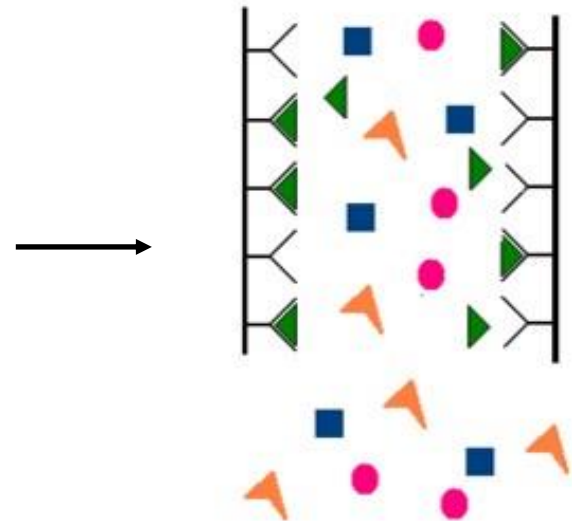
ELISA-Platte

Signifikanz monoklonaler Antikörper

- **Polyklonale** Antikörper haben eine **variable Spezifität** und **Affinität**, was die Anwendungsmöglichkeiten begrenzt. (z.B. Kreuz-Reagibilität, ein anderes Antikörperset kann aus einem immunisierten Tier gewonnen werden)
- Die Fähigkeit, **monoklonale** Antikörper zu produzieren, die ein **einziges spezifisches Epitop** mit **konstanter Spezifität und Affinität** erkennen, ist von großer Bedeutung.

ANWENDUNGEN MONOKLONALER ANTIKÖRPER

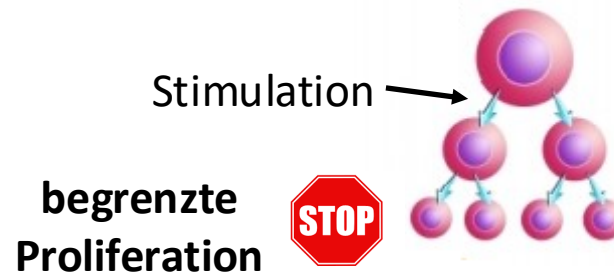
- Präparative Methoden:
 - **Spezifische Reinigung von Proteinen** (z.B. Immunaффinitätschromatographie)
- **Analytische** (Diagnostik und Forschung):
 - **Serologische Tests** (siehe später)
 - **Identifikation und Isolation unterschiedlicher Zellpopulationen** (z.B. Identifikation von CD-Markern)
- **Therapeutische Anwendungen:**
 - Hemmung oder Verstärkung bestimmter Zielmoleküle oder –zellen (siehe später)



Die Proteine, die aus einer gemischten Probe isoliert werden sollen, **werden die Immunglobuline** in der Säule binden und können dann eluiert werden.

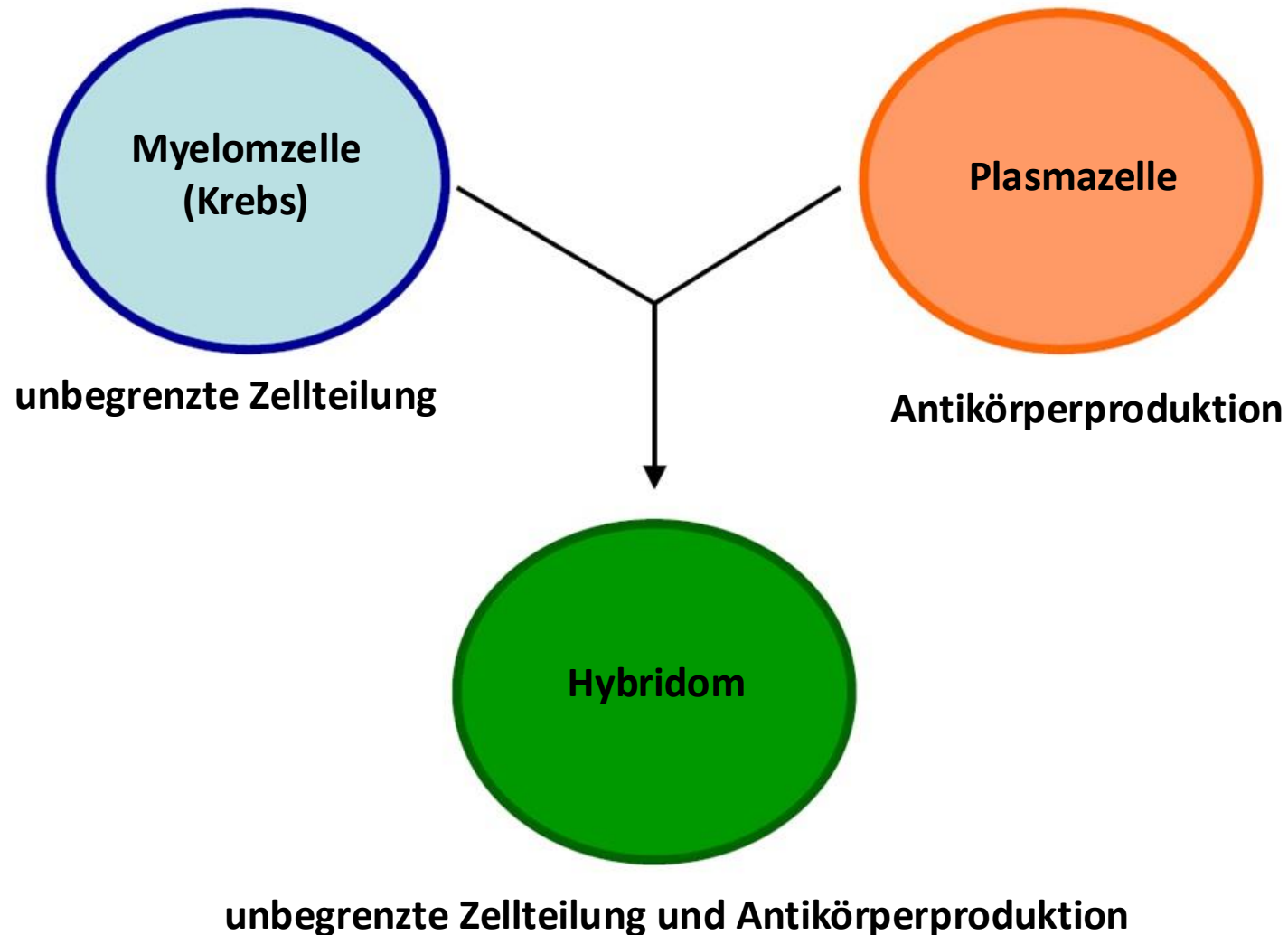
Produktion monoklonaler Antikörper

- Was ist das Problem?
 - Es müssen Antikörper produziert werden, die aus einem einzigen B-Zell-Klon stammen. → Selbst wenn man den Klon isoliert und stimuliert, wird die **Zellteilung irgendwann aufhören** und die **Zellen werden absterben**.

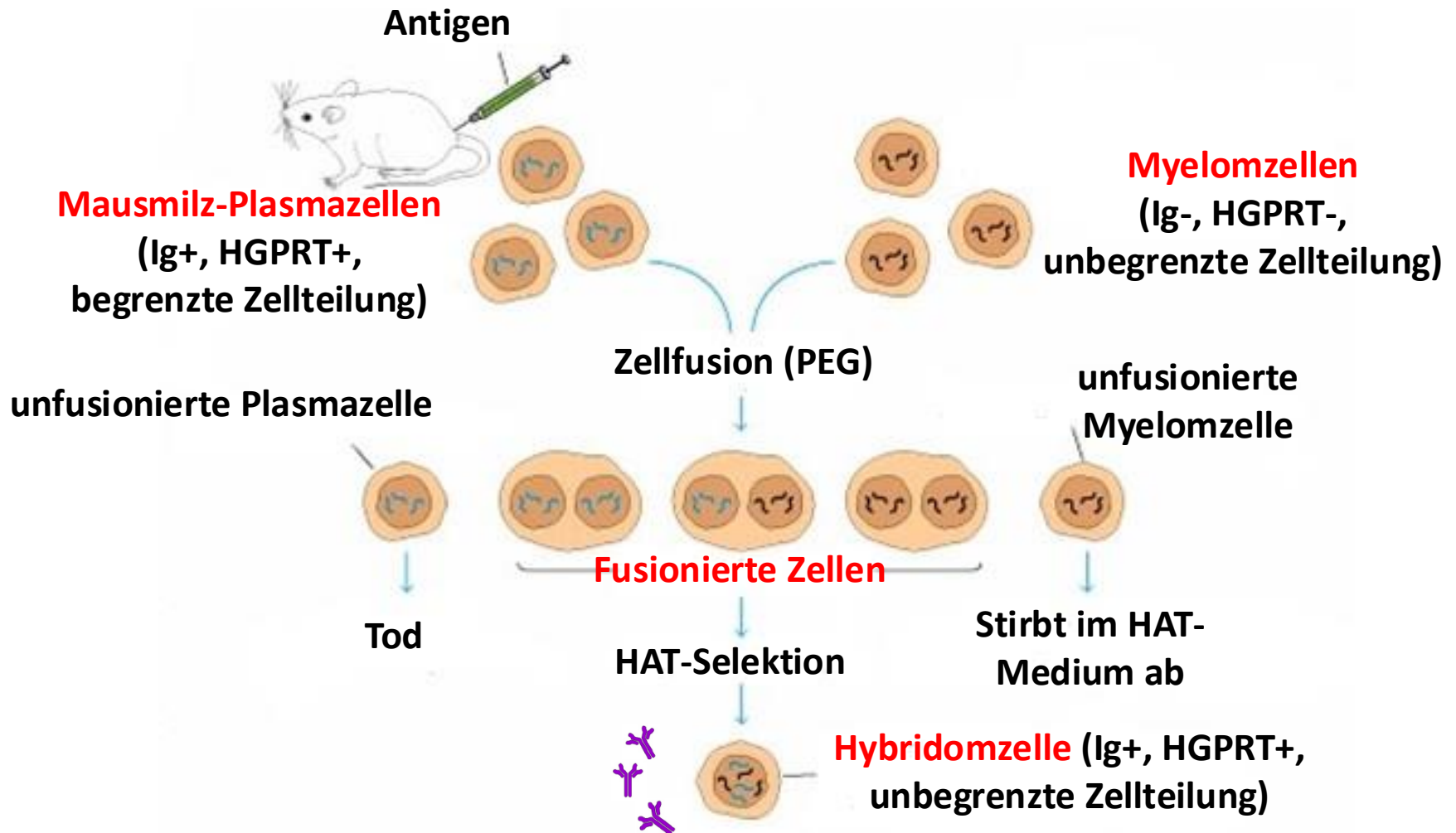


- Lösung: **Immortalisierung von Plasmazellen**
 - Wie? → Sie werden mit Krebszellen fusioniert
 - Warum? → Krebszellen sind unsterblich und haben ein unbegrenztes Teilungspotential.
- Ergebnis: **Hybridom-Technologie**^[8,9.]
 - die künstliche in-Vitro-Fusion der **Plasmazellen und Krebszellen**
 - Daraus resultierende **Hybridzellen** (=Hybridom) haben vorteilhafte Eigenschaften beider Zelltypen: Sie produzieren Antikörper, die mit den Antikörpern der ursprünglichen B-Zelle identisch sind und sie können unbegrenzt proliferieren.

Das zugrundeliegende Prinzip



Hybridom-Technologie 1.



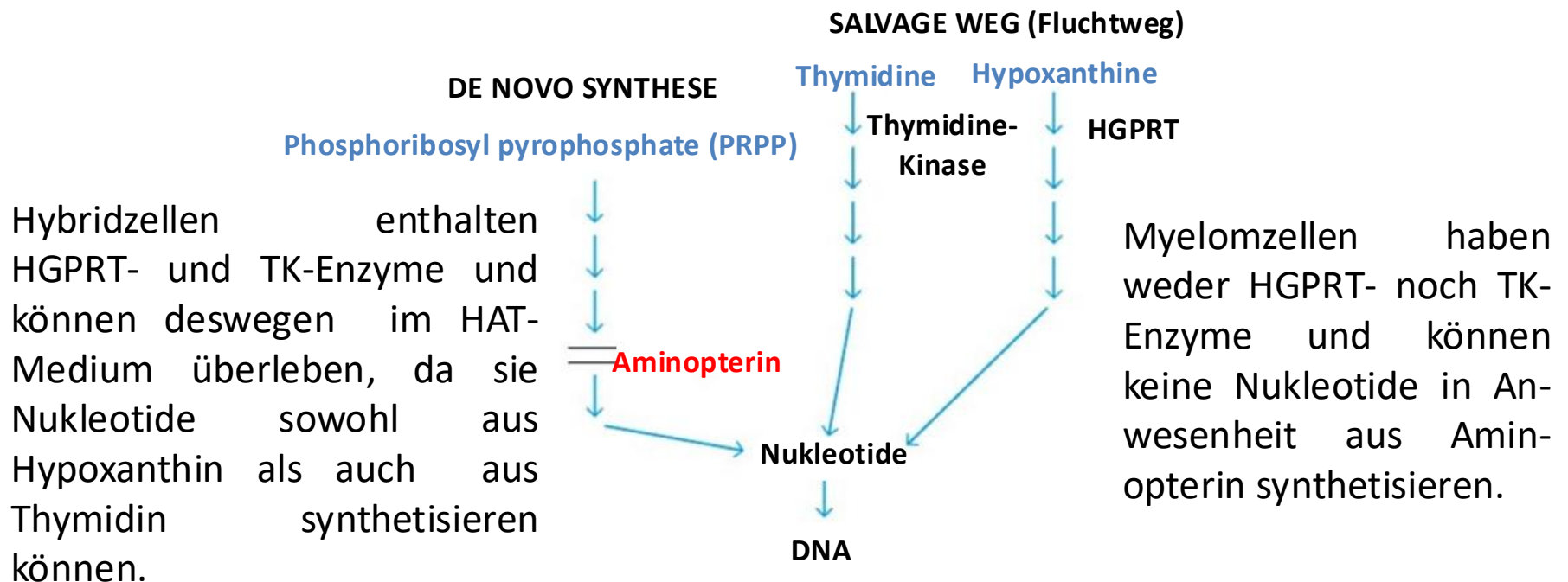
HGPRT: Hypoxanthine-Guanine-Phosphoribosyltransferase (Siehe nächste Folie)

PEG: Polyethylene-Glycol

HAT: Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine Medium (Siehe nächste Folie)

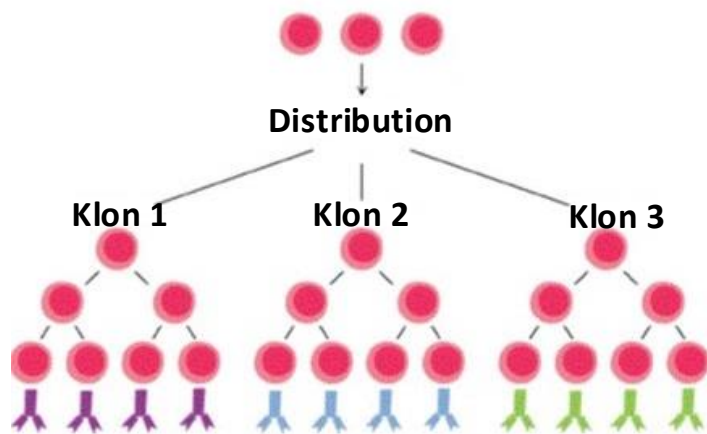
Hybridom-Technologie 2.

1. **Immunisierung** von Tieren (normalerweise Mäuse oder Ratten)
2. **Isolation von Plasmazellen** aus der Milz
3. **Zellfusion**: Plasmazelle einer Maus/Ratte + **nicht-sekretorische Myelomzelle** (kanzeröse Myelom-Zelllinien, z.B. Sp2): Mit der Nutzung von **Polyethylenglykol** (PEG) oder von **elektrischem Strom** (Elektrofusion)
4. **Selektion**: Gewünschte Plasmazell-Myelom-Hybride werden durch die Nutzung des **HAT-Mediums** (enthält Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin) ausgewählt. Unfusionierte Zellen oder fusionierte Krebszellen werden absterben.

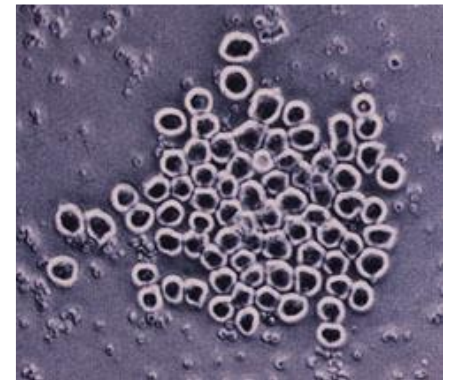


Hybridom-Technologie 3.

- **Selektion der Monoklone:** Die Zellen, die die HAT-Selektion überleben, werden auf eine **96-Well (Loch) Mikrotiterplatte transferiert**, jeder “Well” enthält **eine einzige Zelle**. Zellen in den *Wells* werden proliferieren und damit Klone schaffen die alle den selben Antikörper produzieren. → Monoklonale Antikörperproduktion
- **Tests** der produzierten Antikörper werden mit dem original Antigen durchgeführt.
- Selektion des besten Klon.



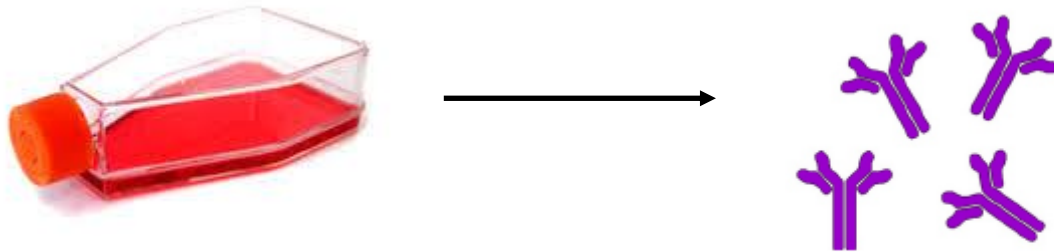
96-well Mikrotiterplatte



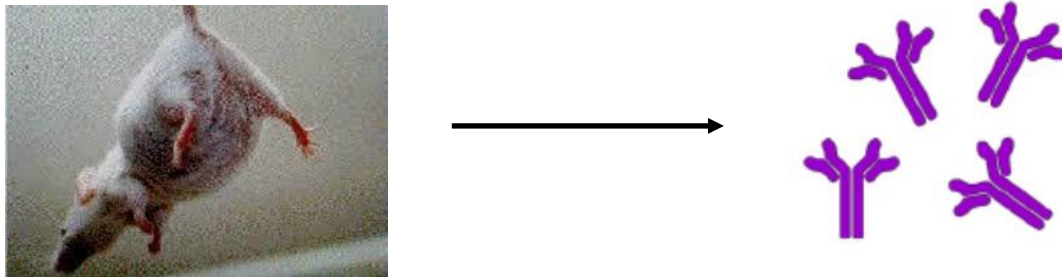
Hybridomzellen in einem Zellkulturmedium

Kontinuierliche Antikörperproduktion

- Hybridomzellen sekretieren die Antikörper in das Medium. → Sie können aus dem **Überstand** des Zellkulturmediums gewonnen werden.



- Hybridomzellen können in die Peritonealhöhle injiziert werden wo sie überleben, proliferieren und Antikörper sekretieren. → Die Antikörper können aus der **Aszitesflüssigkeit** gewonnen werden. (**Dieses Protokoll ist nicht mehr zulässig!**)

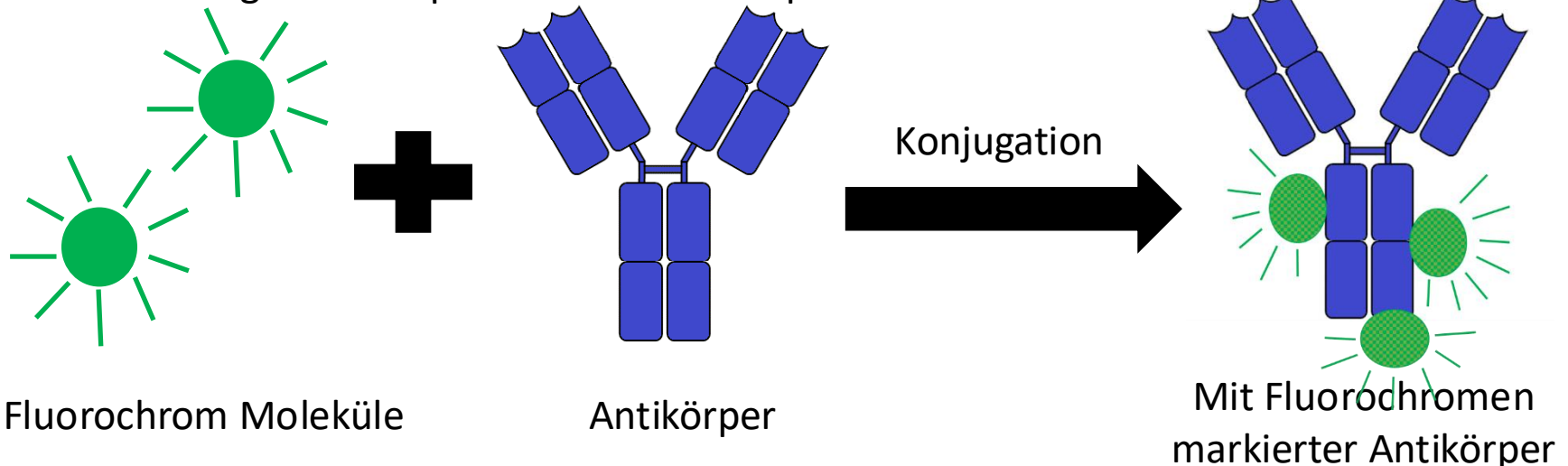


- Industrielle Produktion: Nutzt **Fermentationskessel**.
(„künstliche Maus“)



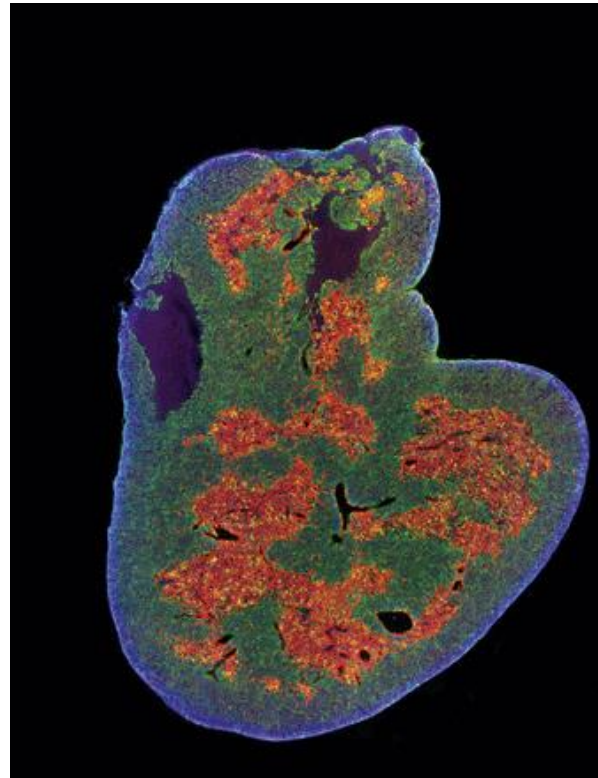
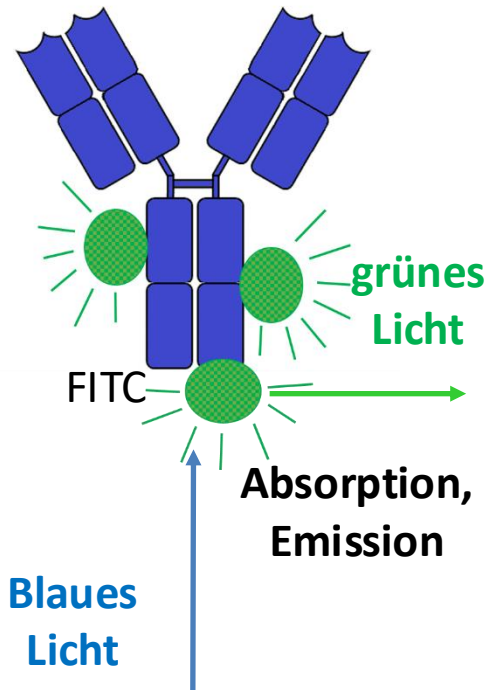
Konjugation

- Die Antigen-Antikörper Reaktion kann allein nicht detektiert werden, aber wenn der genutzte Antikörper mit einem Kennzeichnungsmolekül konjugiert wird, dann kann sie unter Verwendung verschiedener Methoden, abhängig vom Konjugat, beobachtet werden.
- Konjugate:
 - **Fluoreszente Moleküle** (Fluorophore oder Fluorochrome, sind Synonyme), z.B. FITC, PE, usw. (siehe später) → **Durchflusszytometrie, Fluoreszenzmikroskopie**
 - **Enzyme** (Sie konvertieren Chromogen zu Färbemittel in Anwesenheit eines Substrats), z.B. HRP, ALP (siehe später) → **Immunhistochemie, ELISA, Western-blot**
 - **Radioaktive Isotope:**
 - Diagnostik → γ -emittierende Isotope



Fluoreszente Konjugate

Fluoreszenzmikroskopie



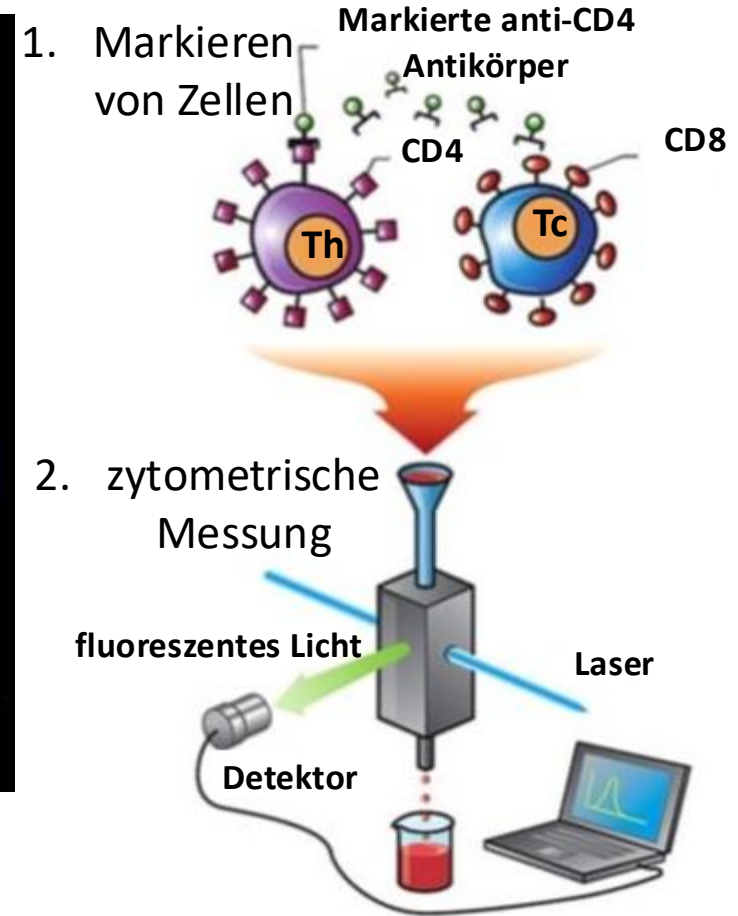
Maus-Thymus IF^[10.]:

Rot: medulläre Epithelzellen

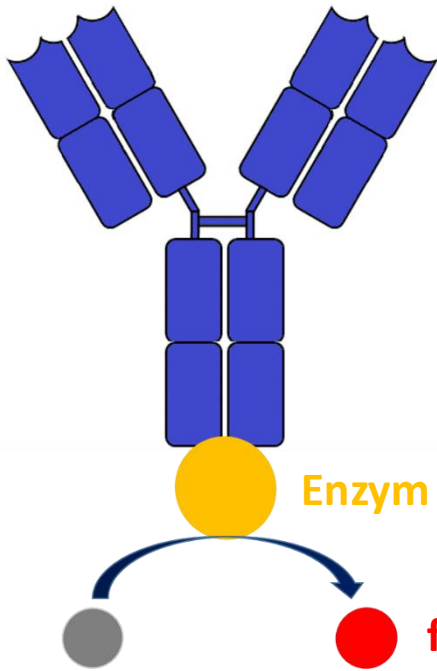
Grüne: kortikale Epithelzellen

Blau (DAPI): Zellnuklei

Durchflusszytometrie



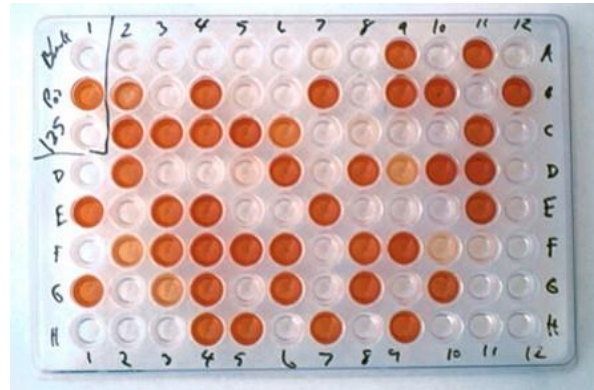
Enzymkonjugate



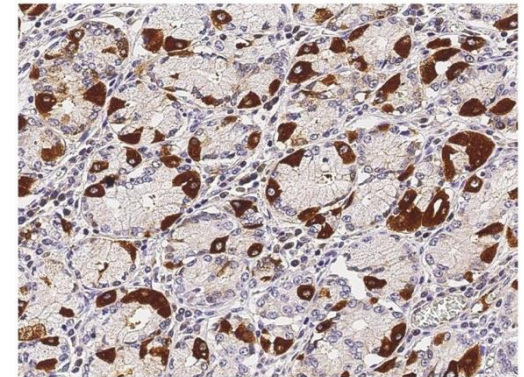
Enzym konjugiert mit dem Antikörper
+ Chromogen und Substrate

Farbreaktion

ELISA

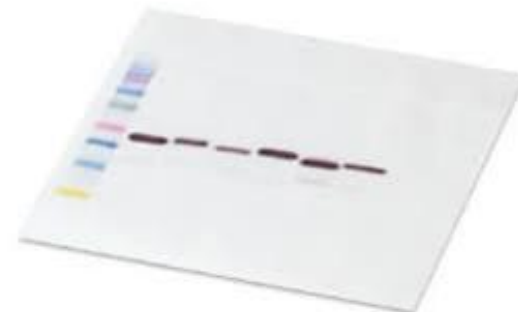


Immunohistochemie



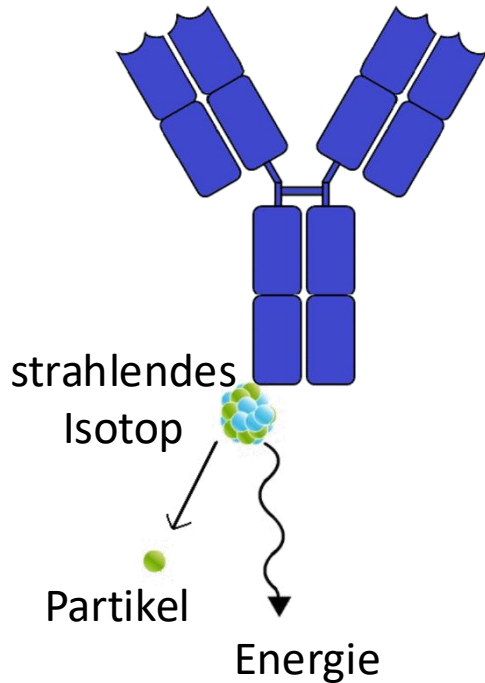
(Bestimmung des Intrinsic-Factors
im menschlichen Magen)

Western-blot

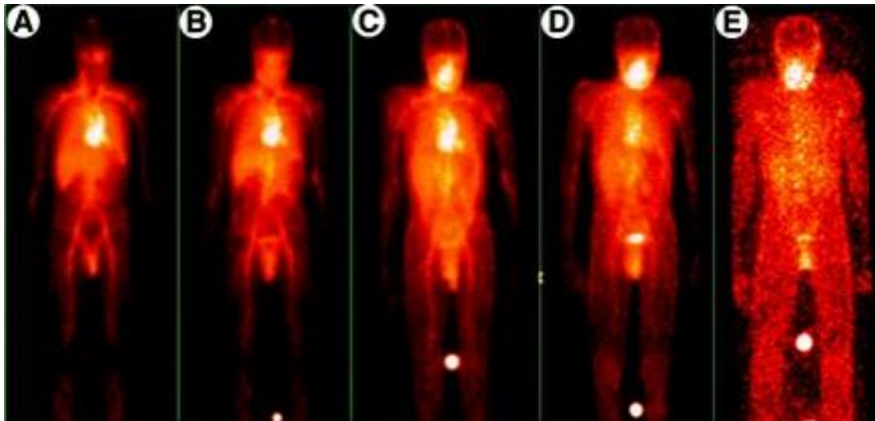


Häufig genutzte Enzyme: **HRP** (horseradish Peroxidase), **ALP** (Alkalische-Phosphatase)

Radioaktive-Konjugate



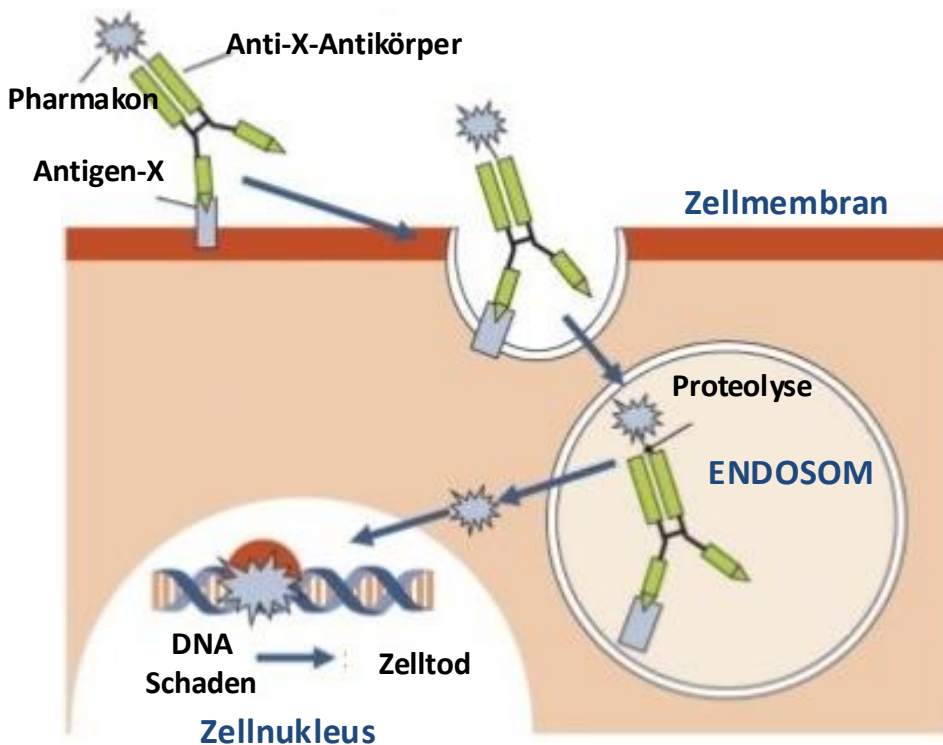
- **Diagnostischer Nutzen** (Radioimmun Imaging):^[13.]
 - γ -emittierende Isotope oder Positronen-emittierende Isotope sind an Antikörper gebunden
 - Antikörper wird die Zielzelle binden (z.B. Krebszelle)
 - Das Signal kann mit Gammakameras oder PET (Positronen-Emissions-Tomographie) detektiert werden, die sogar in der Lage sind Mikrometastasen zu erkennen.
- **Therapeutischer Nutzen:**
 - α - oder β -emittierende Isotope genutzt → Der Tumor erhält lokal große Strahlungsdosen.



Immun-PET Bilder eines Patienten mit Oropharyngealkrebs. Die Bilder wurden nach 1 (A), 24 (B), 72 (C), 144 (D) und 312 Stunden (E) nach Gabe der markierten Antikörper gemacht.^[14.]

ADC (Antikörper-Drug-Konjugat)

- Der Antikörper liefert **selektiv** das Medikament an die Zielzellen, wo sowohl Antikörper als auch Medikament in das Zytoplasma internalisiert werden. Diese therapeutische Methode wird vor allem gegen **Krebs** verwendet, vor allem mit Chemotherapeutika die an Antikörper gebunden sind. ^[11.]



Einige Beispiele für Antikörper-Wirkstoff-Konjugate

Medikament	Zielmolekül	Krankheit
Brentuximab vedotin	CD30	Hodgkin-Lymphom
Gemtuzumab ozogamicin*	CD33	akute myeloische Leukämie
Trastuzumab emtansine	HER2	Mamma-CA

*Von Pfizer® im Jahr 2010 vom Markt genommen. ^[12.]

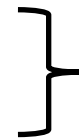
Der Wirkmechanismus von ADCs gegen Krebskrankheiten

Andere Modifikationen

- **Bispezifische Antikörper:**^[15.]
 - Rekombinante Antikörper, die in der Lage sind 2 unterschiedliche Antigene gleichzeitig zu binden.
 - Anwendung: Sie werden zur Behandlung von **Krebs** durch Kreuzbindung von Immunzellen und kanzerösen Zellen genutzt.

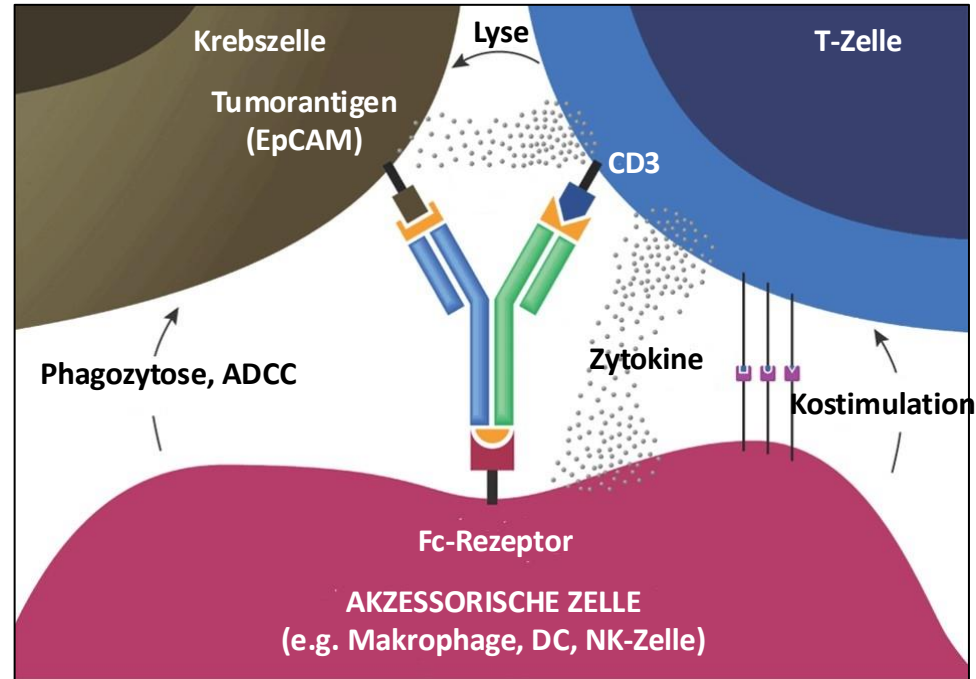
- **Fusionsproteine:**^[17.]
 - Rekombinante Proteine, die normalerweise an das Fc-Fragment von IgG gebunden sind. Einige Beispiele (siehe später):

- Abatacept (CTLA-4 + IgG1)
- Etanercept (TNF α R + IgG1)
- Romiplostim (TPO + IgG1)



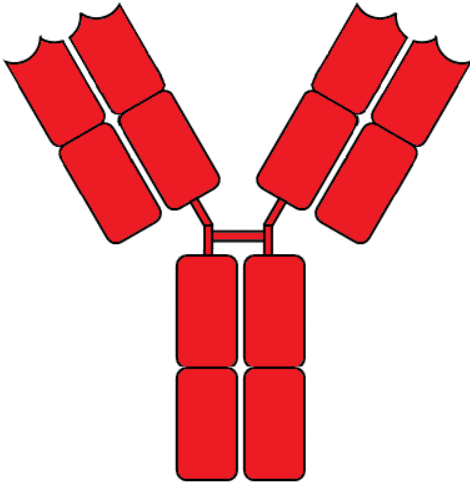
Rheumatoide-Arthritis (RA)

Immunthrombozytopenie (ITP)



Wirkmechanismus eines bispezifischen Antikörpers (catumaxomab)^[16.]

Murine Antikörper



- Der erste therapeutische monoklonale Antikörper (muromonab) war ein Maus Immunglobulin.
- Es wurde nach Organtransplantationen zur Prävention und Behandlung von Abstoßungsreaktionen genutzt. (siehe Später)
- **Nachteil:** Es ist ein **fremdes Protein** für das menschliche Immunsystem!

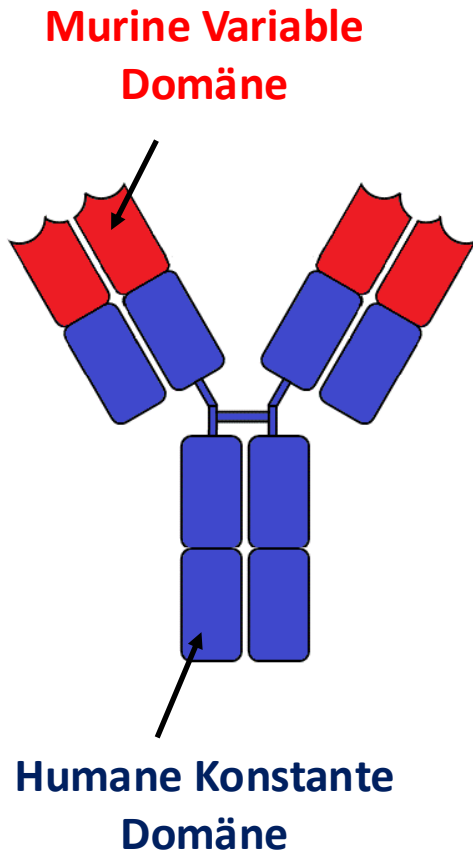


Viele Patienten produzieren Antikörper gegen das Medikament und einige entwickelten eine schwere Anaphylaxie (siehe später):^[18.]

HAMA (Humaner Anti-Maus Antikörper)

Obwohl die konstanten Domänen evolutionär konservierte Strukturen sind, sind sie in verschiedenen Spezies dennoch nicht identisch. Muromonab ist der einzige therapeutische monoklonale Maus-Antikörper. Er wird noch heute bei ansonsten nicht behandelbaren akuten Abstoßungsreaktionen eingesetzt, jedoch nicht mehr zur Prophylaxe.^{19.]}

Chimäre Antikörper



- Das Gensegment das die variable Region (Fv) des gewählten Maus-Antikörpers kodiert wird mit dem Segment fusioniert dass die menschliche konstante Region (Fc) kodiert.
- Das daraus resultierende chimäre Immunoglobulin wird die **gleiche Spezifität** wie der ursprüngliche Maus-Antikörper haben, aber die konstante Region ist identisch zu dem menschlichen Immunglobulin.

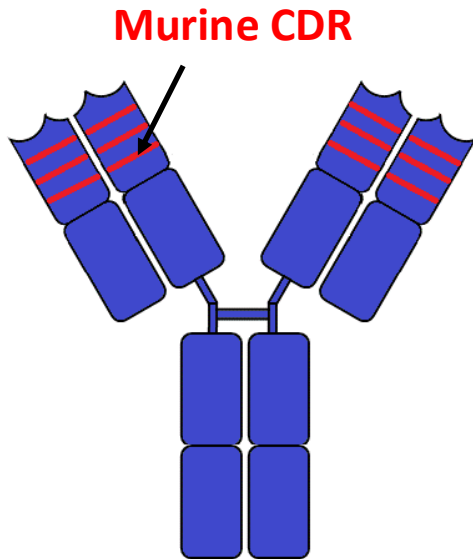
Ca. 75% des Moleküls ist menschlichen Ursprungs.

Vorteil gegenüber Maus-Antikörpern: Enthält weniger sequenzen murinen Ursprungs und hat deswegen ein **niedrigeres Risiko** vom menschlichen Immunsystem **als Fremd erkannt zu werden**. Die menschliche Fc Region erhöht auch die **Halbwertszeit** und verfügt über **Effektorfunktionen**.

Nachteil: Einige Patienten produzieren Antikörper gegen diese Medikamente.^[20.] → **HACA: Humane Anti-Chimäre Antikörper**

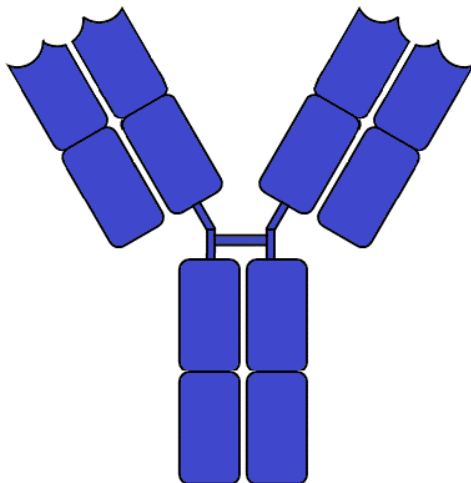
- Chimäre Antikörper werden noch weitgehen genutzt um Krankheiten zu behandeln (siehe Tabelle am Ende der Präsentation)

Humanisierte und humane Antikörper



HUMANISIERT:

- Die Gensegmente die die Hypervariable Regionen (CDRs) des Mausantikörpers kodieren werden in die Gene von menschlichen Immunoglobulinen implantiert.
- > 90 % des Moleküls ist menschlichen Ursprungs.
- Die Spezifität des Antikörpers ähnelt der des ursprünglichen Maus-Antikörpers während Halbwertszeit und Effektorfunktionen menschlichen Immunglobulin ähneln.



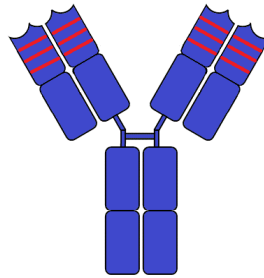
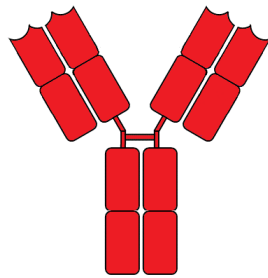
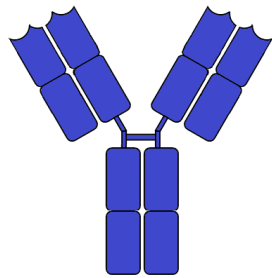
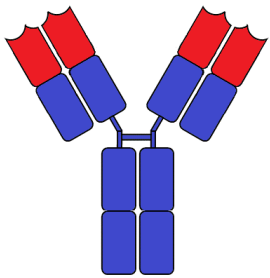
HUMAN:

- Gene des menschlichen Immunoglobulin werden in Mäuse inseriert, dann entstehen, nach Immunisierung, Hybridome die menschliches Immunoglobulin produzieren. [21.]



Vollständig humanes Immunglobulin

Nomenklatur



Infl**ixi**mab
Rit**uxi**mab
Ab**ci**ximab

Adal**imu**mab
Ipil**imu**mab

Muromonab

Dacl**izu**mab
Trast**uzu**mab

mab = monoklonale Antikörper

xi = chimäre Antikörper

zu = humanisierte Antikörper

mu = vollständig humane Antikörper

li = hat immunmodulatorischen Effekt

tu = Antitumor Effekt

ci = kann zur Behandlung kardiovaskulärer Krankheiten verwendet werden

Die WHO hat eine **standardisierte Nomenklatur** für monoklonale therapeutische Antikörper.^[22.]

Muromonab ist eine Ausnahme, da es der erste therapeutische monoklonale Antikörper war.

Mur – o – mon – ab



murin



monoklonal



Antikörper

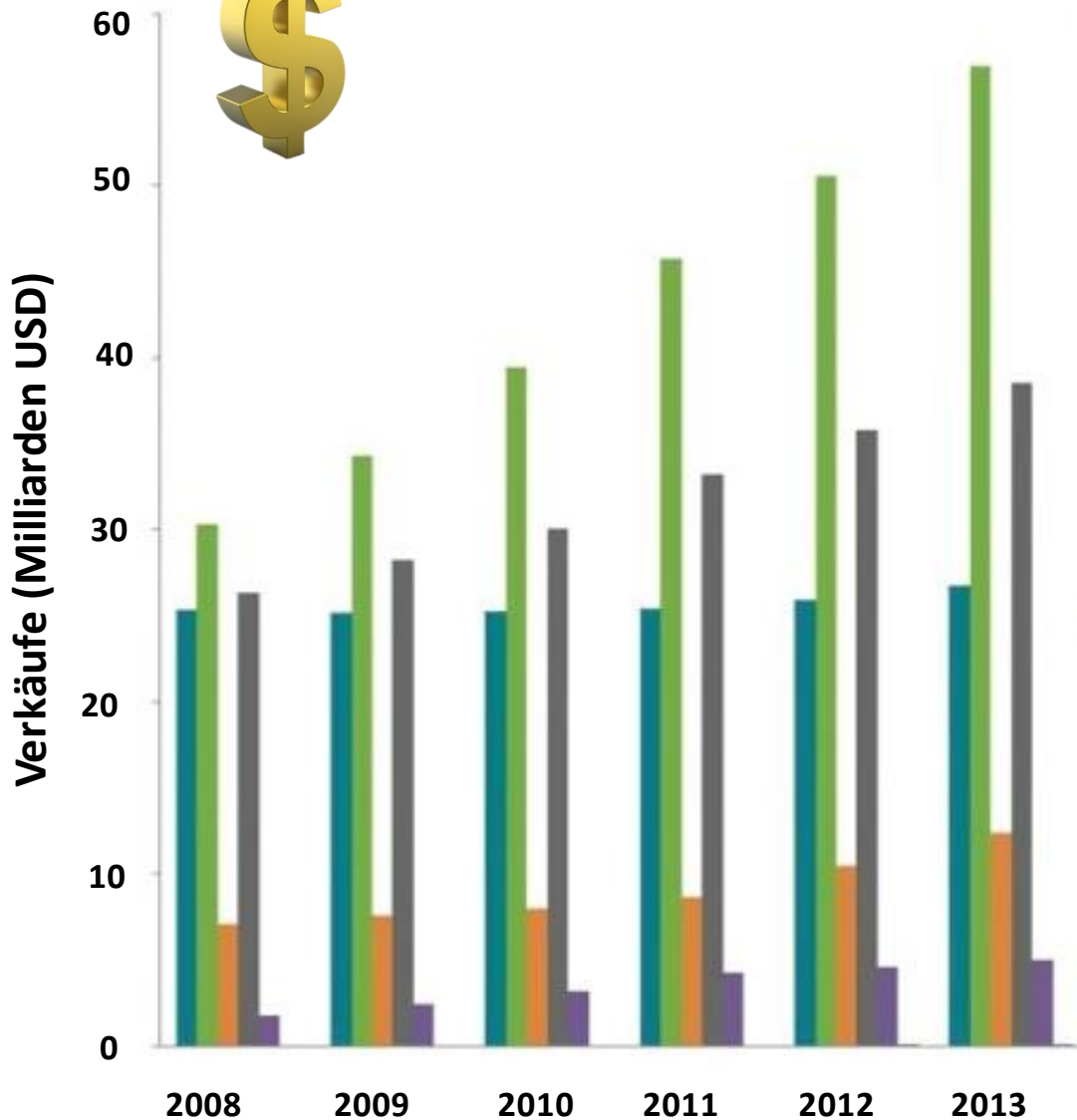
Einige Antikörper mit FDA-Zulassung 1.

Year	Drug	Type	Trade name	Target	Application
1986	muromonab	murin	Orthoclone-OKT-3	CD3	Abstoßungsreaktion
1994	abciximab	chimär	ReoPro	Gp IIb/IIIa	PCI
1997	daclizumab	humanisiert	Zenapax	CD25	Abstoßungsreaktion
1997	rituximab	chimär	Rituxan, Mabthera	CD20	B-Zell-NHL
1998	infliximab	chimär	Remicade	TNF α	RA, Morbus Crohn, Psoriasis
1998	trastuzumab	humanisiert	Herceptin	HER2	Mamma-CA
1998	basiliximab	chimär	Simulect	CD25	Abstoßung
2001	alemtuzumab	humanisiert	Campath	CD52	CLL
2002	adalimumab	human	Humira	TNF α	RA
2004	bevacizumab	humanisiert	Avastin	VEGF-A	Kolorektal-CA

Einige Antikörper mit FDA-Zulassung 2.

Year	Drug	Type	Trade name	Target	Application
2004	cetuximab	chimär	Erbitux	EGF-R	Kolorektal-CA
2006	natalizumab	humanisiert	Tysabri	α 4 integrin	SM, Morbus Crohn
2006	panitumumab	human	Vectibix	EGF-R	Kolorektal-CA
2006	ranibizumab	humanisiert	Lucentis	VEGF-A	Makula-degeneration
2009	golimumab	human	Simponi	TNF α	RA
2010	denosumab	human	Amgen	RANK-L	Osteoporose
2010	tocilizumab	humanisiert	Actemra	IL-6 R	RA
2011	ipilimumab	human	Yervoy	CTLA-4	Melanom
2014	nivolumab	human	Opdivo	PD-1	Melanom, nicht-kleinzelliges Lungen-CA
2015	secukinumab	human	Cosentyx	IL-17A	Psoriasis

Markt der therapeutischen Antikörper^[23.]



1 g Gold

39.84 \$



vs 100 mg Infliximab

1025 \$ (USA)

(2016.02.13.)

- Rekombinante Proteine in Säugetierzellkulturen produziert (133 Kg in 2013)
- **Monoklonale Antikörper** in Säugetierzellkulturen produziert (8182 Kg in 2013)
- **Monoklonale Antikörper** Fragmente, Konjugate oder Fusionsproteine in Säugetierzellkulturen produziert (1677 Kg in 2013)
- Rekombinante Proteine (inkl. Insulin) durch Mikrobenfermentation (8497 Kg in 2013)
- **Monoklonale Antikörper** durch Mikrobenfermentation produziert (102 Kg in 2013)
- Produkte von Pflanzenzellkulturen (189 g in 2013)

Danke für Ihre Aufmerksamkeit!



Gerald M. Edelman Rodney R. Porter



Erhielten 1972 den Nobelpreis für
Physiologie und Medizin:
„Für die Entdeckung der chemischen
Struktur von Antikörpern“.^[24.]



Niels K. Jerne Georges J.F. Köhler César Milstein



Erhielten 1984 den Nobelpreis für
Physiologie oder Medizin:
„Für Theorien bezüglich der Spezifität in der
Entwicklung und Kontrolle des Immun-
systems und des Prinzips der monoklonalen
Antikörperproduktion.“^[25.]

Quellen 1.

1. Cooper HM¹, Paterson Y: **Production of polyclonal antisera.** *Curr Protoc Neurosci.* 2009 Jul;Chapter 5:Unit 5.5. doi: 10.1002/0471142301.ns0505s48.
2. Leenaars M¹, Hendriksen CF: **Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations.** *ILAR J.* 2005;46(3):269-79.
3. Reed SG¹, Orr MT, Fox CB: **Key roles of adjuvants in modern vaccines.** *Nat Med.* 2013 Dec;19(12):1597-608. doi: 10.1038/nm.3409. Epub 2013 Dec 5.
4. Olafsdottir T¹, Lindqvist M¹, Harandi AM²: **Molecular signatures of vaccine adjuvants.** *Vaccine.* 2015 May 16. pii: S0264-410X(15)00596-4. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.04.099.
5. Stills HF Jr¹: **Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants.** *ILAR J.* 2005;46(3):280-93.
6. Glück R¹, Burri KG, Metcalfe I: **Adjuvant and antigen delivery properties of virosomes.** *Curr Drug Deliv.* 2005 Oct;2(4):395-400.
7. Andrew SM¹, Titus JA: **Purification of immunoglobulin G.** *Curr Protoc Immunol.* 2001 May;Chapter 2:Unit 2.7. doi: 10.1002/0471142735.im0207s21.
8. Köhler G, Milstein C: **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.** *Nature.* 1975 Aug 7;256(5517):495-7.
9. Tomita M¹, Tsumoto K: **Hybridoma technologies for antibody production.** *Immunotherapy.* 2011 Mar;3(3):371-80. doi: 10.2217/imt.11.4.
10. Irla M¹, et al.: **Three-dimensional visualization of the mouse thymus organization in health and immunodeficiency.** *J Immunol.* 2013 Jan 15;190(2):586-96. doi: 10.4049/jimmunol.1200119. Epub 2012 Dec 17.
11. Freise AC¹, Wu AM²: **In vivo imaging with antibodies and engineered fragments.** *Mol Immunol.* 2015 Apr 28. pii: S0161-5890(15)00360-0. doi: 10.1016/j.molimm.2015.04.001.
12. van Dongen GA¹, Visser GW, Lub-de Hooge MN, de Vries EG, Perk LR: **Immuno-PET: a navigator in monoclonal antibody development and applications.** *Oncologist.* 2007 Dec;12(12):1379-89. doi: 10.1634/theoncologist.12-12-1379.

Quellen 2.

13. Mack F¹, Ritchie M¹, Sapra P²: **The next generation of antibody drug conjugates.** *Semin Oncol.* 2014 Oct;41(5):637-52. doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.08.001. Epub 2014 Aug 12.
14. FDA: **Pfizer Voluntarily Withdraws Cancer Treatment Mylotarg from U.S. Market** (<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm216448.htm>)
15. Kontermann RE¹, Brinkmann U²: **Bispecific antibodies.** *Drug Discov Today.* 2015 Feb 26. pii: S1359-6446(15)00077-X. doi: 10.1016/j.drudis.2015.02.008.
16. Seimetz D¹: **Novel monoclonal antibodies for cancer treatment: the trifunctional antibody catumaxomab (removab).** *J Cancer.* 2011;2:309-16. Epub 2011 May 25.
17. Baldo BA¹: **Chimeric fusion proteins used for therapy: indications, mechanisms, and safety.** *Drug Saf.* 2015 May;38(5):455-79. doi: 10.1007/s40264-015-0285-9.
18. Sgro C¹: **Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review.** *Toxicology.* 1995 Dec 20;105(1):23-9.
19. Renders L, Valerius T: **Engineered CD3 antibodies for immunosuppression.** *Clin Exp Immunol.* 2003 Sep;133(3):307-9.
20. Atzeni F¹, Talotta R, Salaffi F, Cassinotti A, Varisco V, Battellino M, Ardizzone S, Pace F, Sarzi-Puttini P: **Immunogenicity and autoimmunity during anti-TNF therapy.** *Autoimmun Rev.* 2013 May;12(7):703-8. doi: 10.1016/j.autrev.2012.10.021. Epub 2012 Nov 30.
21. Brüggemann M¹, Taussig MJ: **Production of human antibody repertoires in transgenic mice.** *Curr Opin Biotechnol.* 1997 Aug;8(4):455-8.
22. WHO: **General policies for monoclonal antibodies** (<http://www.who.int/medicines/services/inn/generalpoliciesmonoclonalantibodiesjan10.pdf>)
23. Ecker DM¹, Jones SD, Levine HL: **The therapeutic monoclonal antibody market.** *MAbs.* 2015;7(1):9-14. doi: 10.4161/19420862.2015.989042.
24. Nobelprize.org: **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1972** (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1972/)
25. Nobelprize.org: **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1984** (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1984/)