



IMMUNOLÓGIAI ÉS  
BIOTECHNOLÓGIAI  
INTÉZET



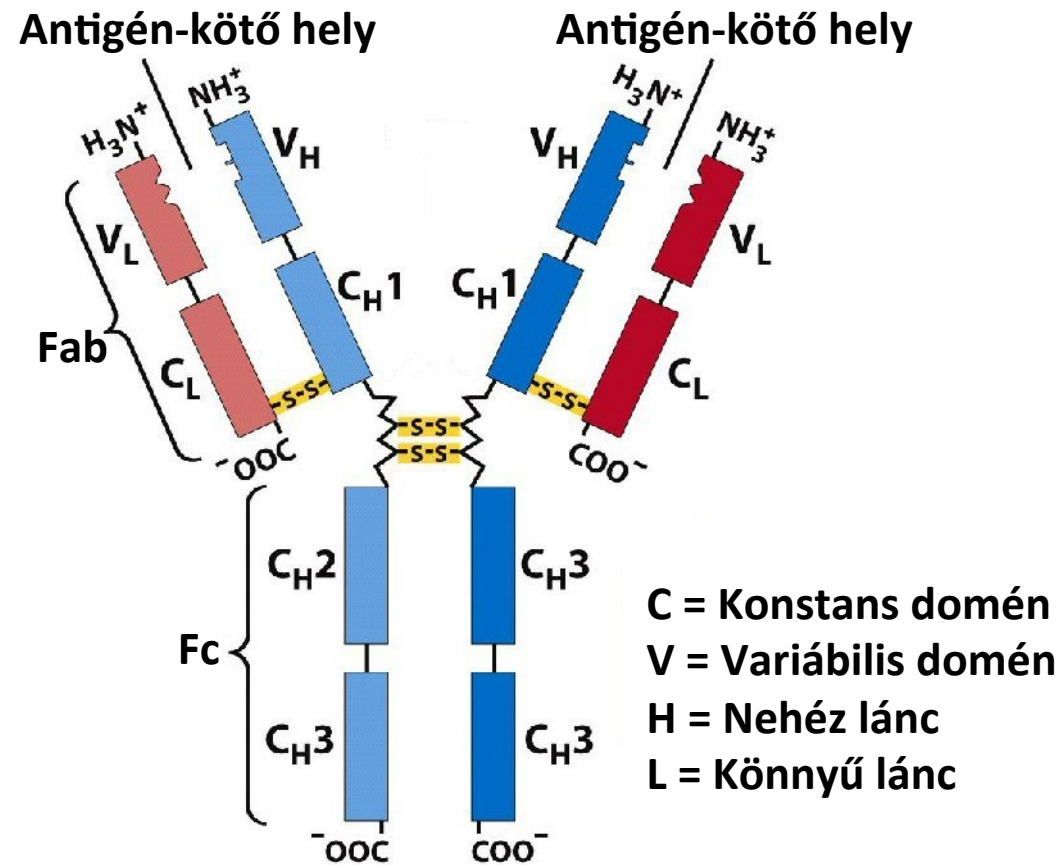
# 3. gyakorlat: Mono- és poliklonális ellenanyagok, hibridóma-technika

Az immunológia alapjai

PTE-KK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

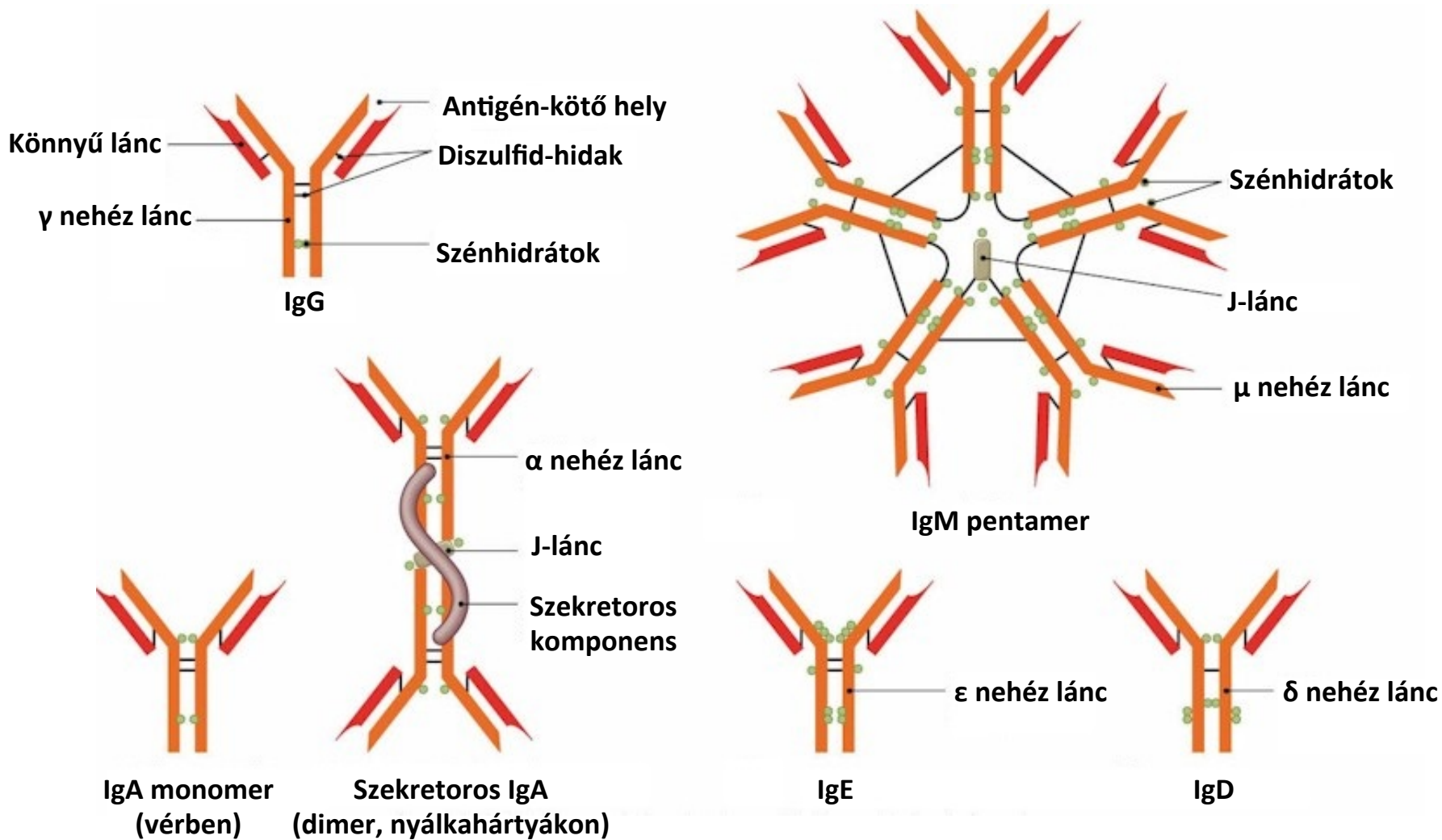
Pécs, 2016.

# Az immunglobulinok szerkezete

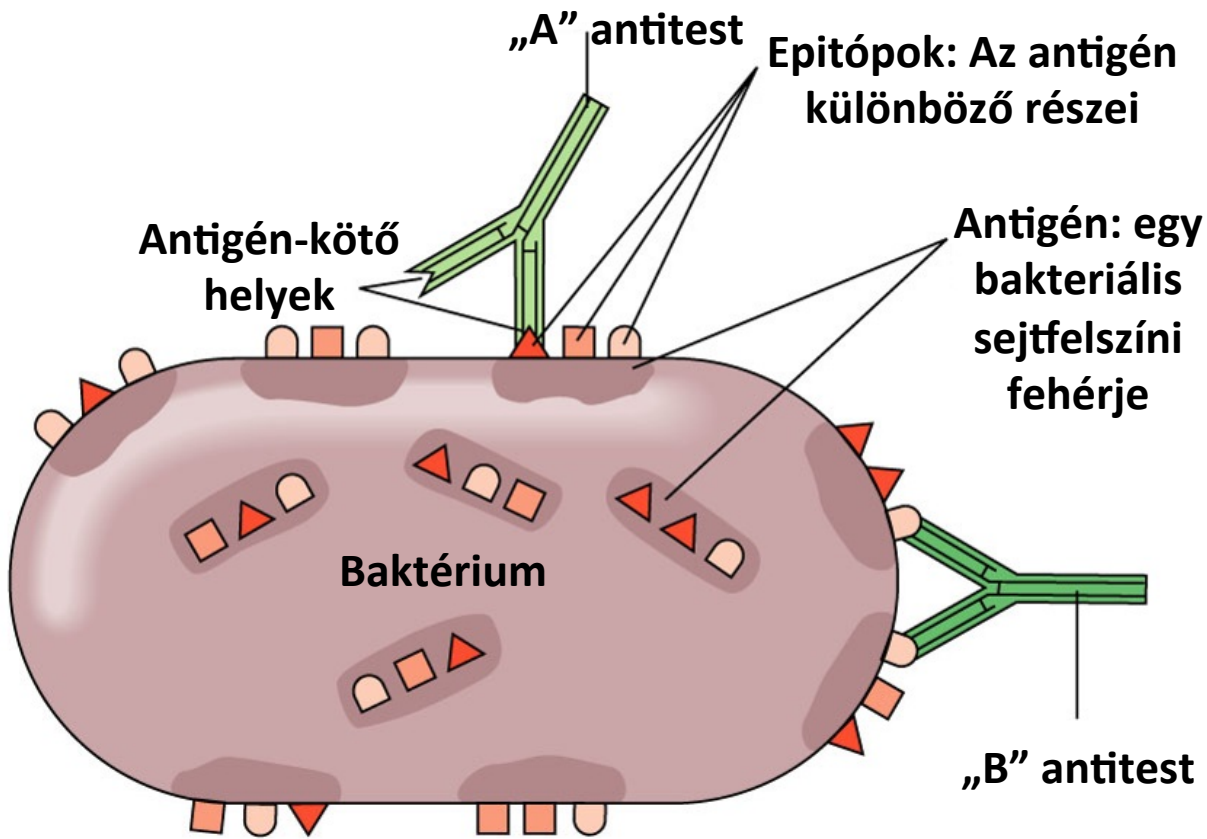


- Immunglobulin = **Plazmasejt** által termelt antigén-felismerő **fehérje**.
- Két könnyű és két nehéz lánc alkotja.
- Könnyű lánc:  $\kappa$  vagy  $\lambda$
- Nehéz lánc:  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  vagy  $\mu$
- **Izotípus:** nehéz lánc típusa alapján: IgA, IgG, IgD, IgE, vagy IgM
- **Idiotípus:** az antigén-kötő helyre utal
- Antigén az antitest vonatkozásában: az a struktúra (pl. egy kórokozó felszíni fehérjéje), amit az antitest felismer.
- **Epitóp** (antigén determináns): Az antigén azon konkrét szakasza, amit az antitest felismer. (kisebb rész az antigénen belül)

# Az immunglobulin osztályok

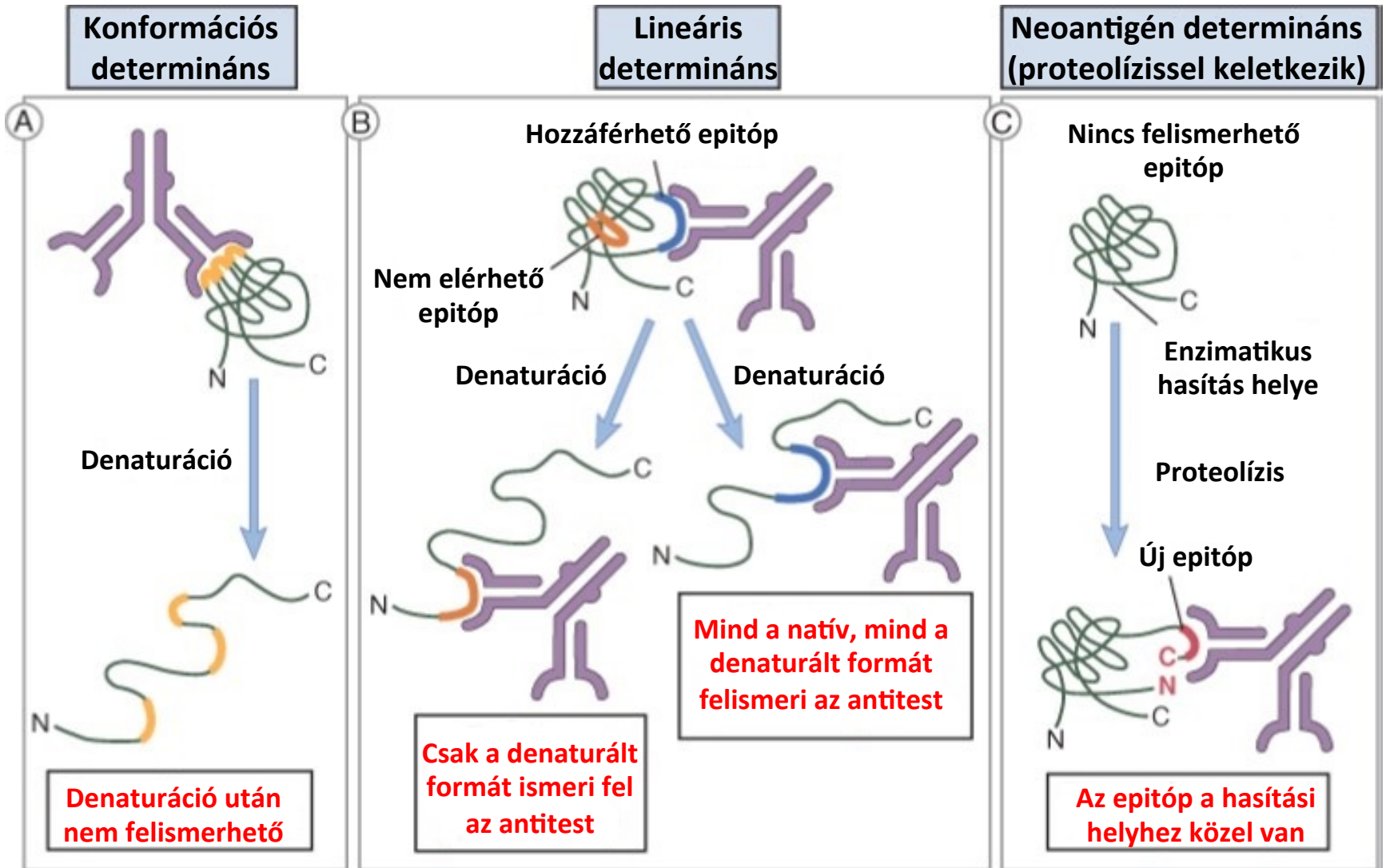


# Az antigén és az epitópok közötti különbség

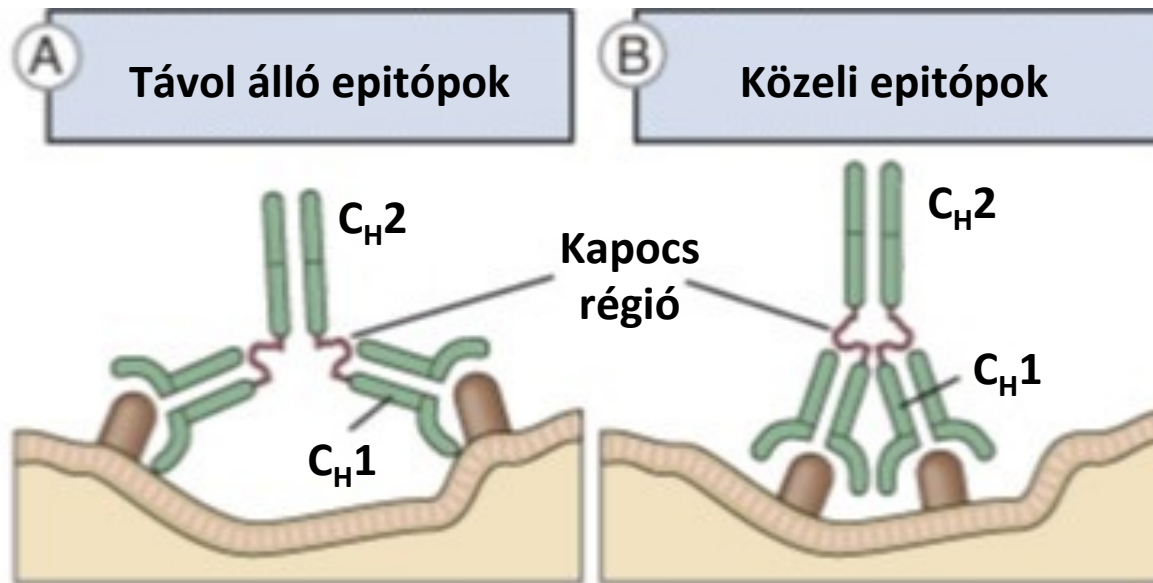


Az antigén az „A” és a „B” antitest vonatkozásában megegyezik (ugyanaz a bakteriális fehérje), de annak eltérő részeit (epitópjait) ismerik fel.

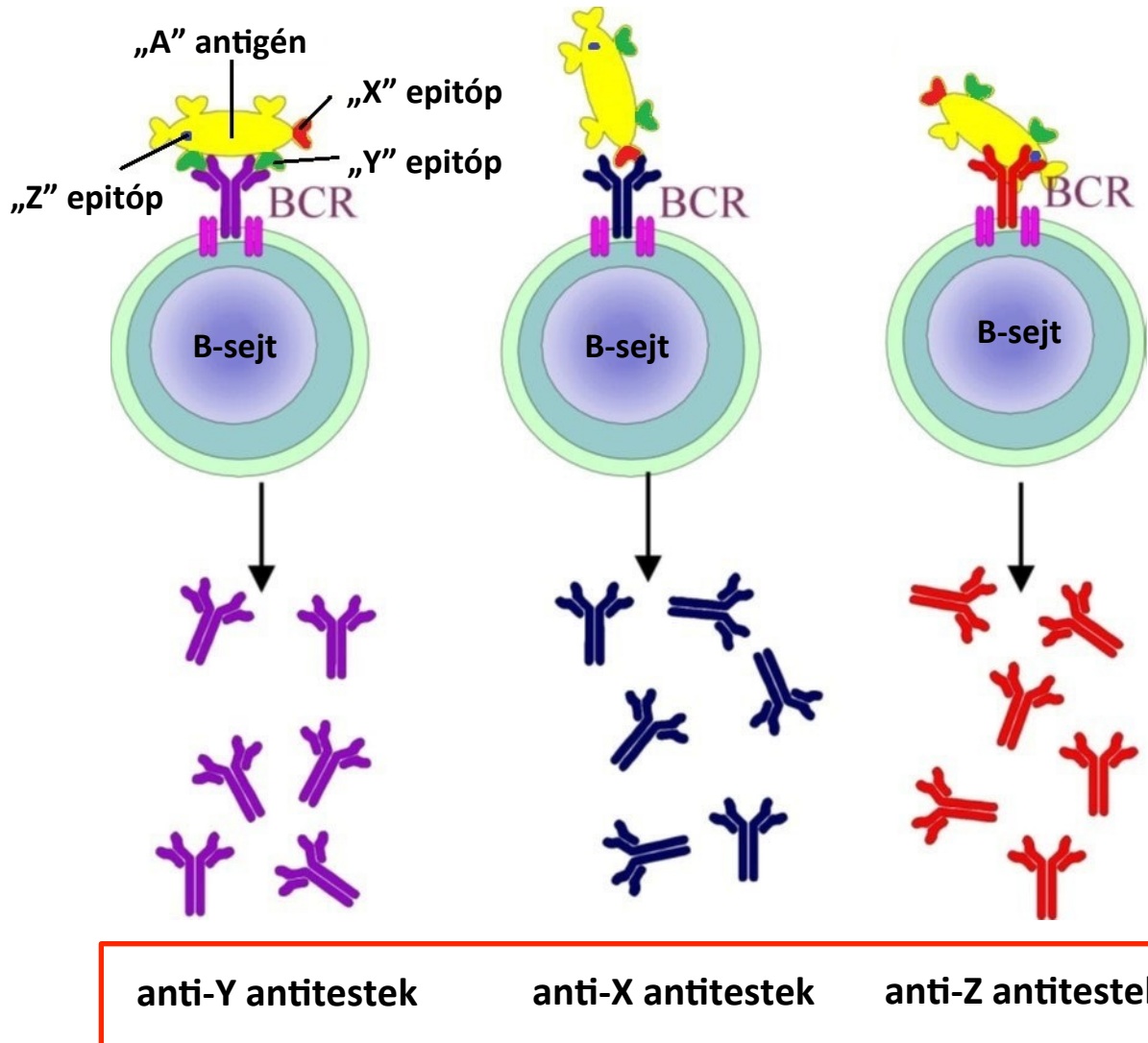
# Az epitópok fajtái



# A kapocs régió szerepe



# Poliklonális antitestek



Az immunválasz során mindig **poliklonális aktiváció** történik és poliklonális antitest termelődik!

**POLIKLONÁLIS anti-A antitest**



anti-Y antitestek      anti-X antitestek      anti-Z antitestek

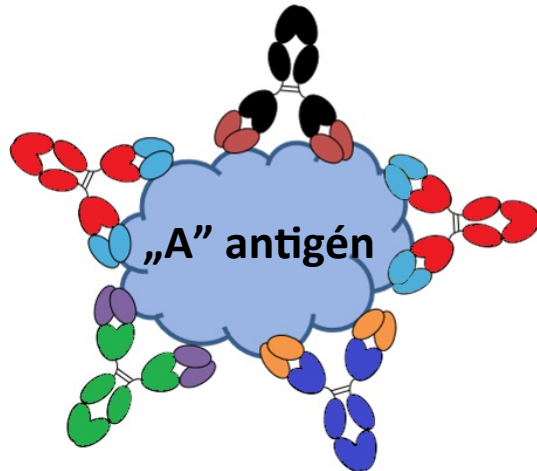


# Mono- és poliklonális antitestek összehasonlítása



„You wanna play a little game?”

## Poliklonális anti-„A” antitest



Poliklonális:

- **Különböző B-sejt klónok** termékei
- Egy adott antigén **eltérő epitópjait** ismerik fel
- A specificitásuk és affinitásuk **különböző**
- (Több monoklonális ellenanyag keverékeként fogható fel)

## Monoklonális anti-„A” antitest



Monoklonális:

- **Egyetlen B-sejt klón** terméke
- Egy adott antigén **meghatározott epitópját** ismeri fel
- A specificitás és affinitás **állandó**

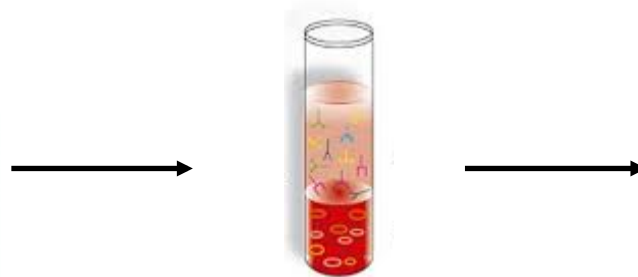


# Immunizálás

- Immunizálás: Élő szervezet beoltása egy számára **idegen antigénnel** azzal a céllal, hogy az antigénnel szembeni immunválaszt és **antitest termelést** váltsunk ki.
- Fertőzések megelőzése céljából végzett immunizálás = Védőoltás (lásd később)
- Poliklonális antitestek előállítása:
  - Állat immunizálása az antigénnel
  - Az immunválasz létrejöttét követően az állat **vérserumából** kinyerhető az **antigén ellen** termelt **poliklonális antitest**<sup>[1.]</sup>
- Probléma: monoklonális antitestek a vérserumból nem nyerhetők
- Megoldás: hibridóma-technika (lásd később)

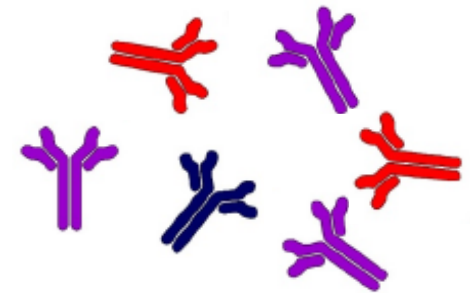


1. „A” antigén beoltása



2. Vérserum, benne poliklonális antitestek

Pl.: poliklonális anti-A nyúl IgG



3. Antitestek kinyerése, tisztítása

# Beoltás

- A megfelelő állatok kiválasztása fontos, a főbb szempontok:<sup>[2.]</sup>
  - Mennyi antitestre van szükség?
  - Milyen könnyen lehet az állattól szérumot nyerni?
  - Mennyire fajidegen az adott állatban a beoltandó antigén?
  - Mire akarjuk felhasználni a termelt antitestet?
- Poliklonális antitest termeléshez általában nyulat, kecskét, birkát vagy csirkét használnak, monoklonális antitest előállításához pedig egeret vagy patkányt. (lásd később)
- A beoltandó antigén tulajdonságai is sokat számítanak:
  - Tisztaság: szennyeződés esetén a szennyező anyag ellen is termelődhetnek antitestek
  - Milyen formában juttatjuk be az antigént: egész sejteket adunk be, natív, vagy módosított fehérjét, kötjük-e valamilyen hordozóhoz (pl. haptén)
- A beadás módja: orális (per os), intrakután (ic.), szubkután (sc.) vagy intramuszkuláris (im.)

# Immunizálásához használt állatok

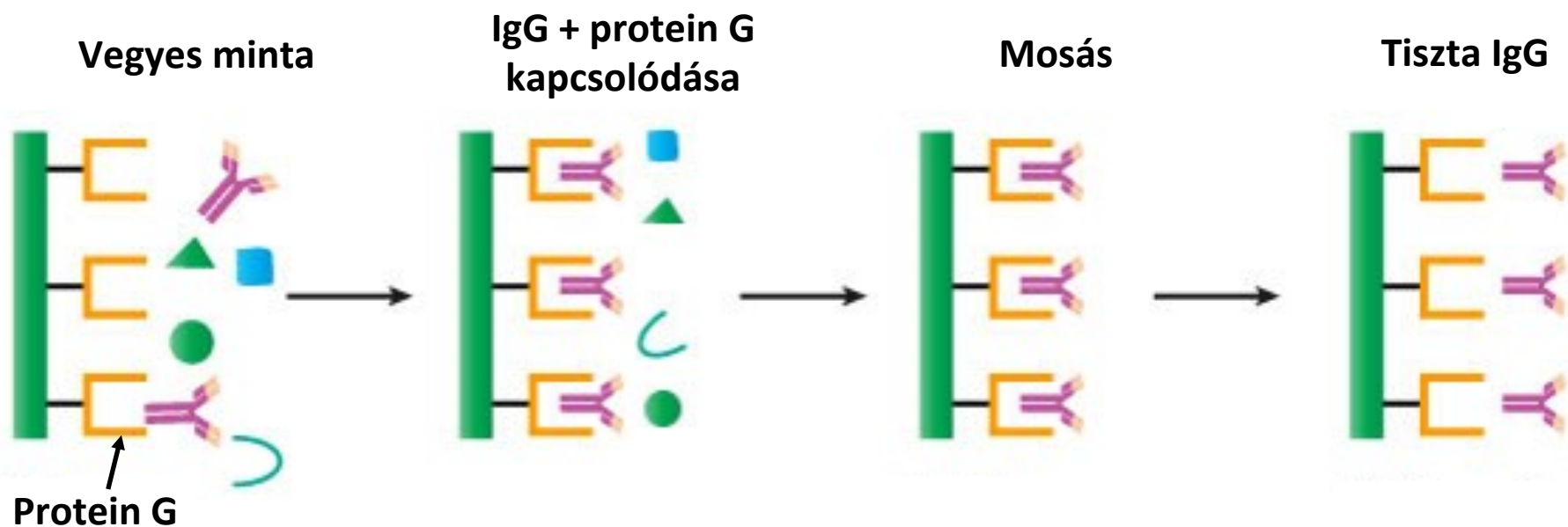


# Adjuvánsok

- Olyan anyagok, amik elnyújtják és összességében **erősítik** a beadott antigénnel szembeni **immunválaszt**, ezáltal erőteljesebb antitest termelés érhető el. Adjuvánsokat használnak az emberi védőoltásoknál is. (lásd később)<sup>[3,4.]</sup>
- Lehetséges hatásmechanizmusuk:
  - Növelik az antigén-felvételét
  - PRR-okon keresztül aktiválják a veleszületett immunrendszer sejtjeit, pl. a macrophagokat
  - Fokozzák az MHC II-n keresztüli antigén-bemutatást
- Néhány példa adjuvánsokra:
  - **Alumínium-sók** (pl. alumínium-foszfát, alumínium-oxid-hidroxid, ezek a humán oltásokban is a leggyakoribb adjuvánsok)
  - Lipid A analógok (pl. Cervarix<sup>©</sup> = HPV oltás)
  - **Freund adjuváns**: az antigén ásványi olajjal képez emulziót
    - Komplet (CFA): előlt *Mycobacterium tuberculosis* baktériumokat tartalmaz<sup>[5.]</sup>
    - Inkomplet (IFA): nincs benne *Mycobacterium*
  - Vírus fehérjéket tartalmazó **liposzómák**<sup>[6.]</sup>

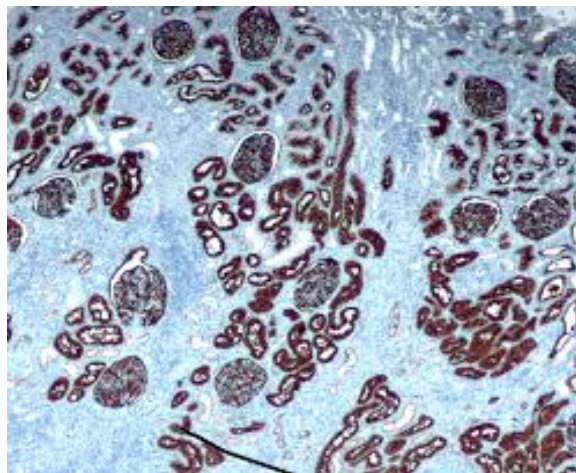
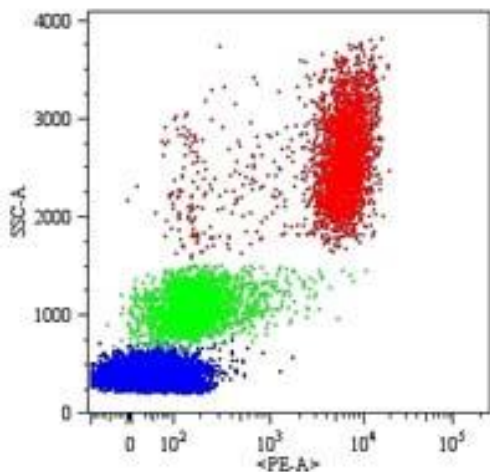
# Az antitestek tisztítása

- Az antitesteket az állatok **vérserumából** nyerik ki.
- A különböző izoformák tisztítására eltérő módszerek ideálisak.
- IgG<sup>[7.]</sup>
  - Precipitáció (pl. ammónium-szulfáttal)
  - **Kromatográfiás** módszerek, leginkább affinitás-kromatográfia **protein A** (*Staphylococcus*) vagy **protein G** (*Streptococcus*) segítségével vagy ioncserélő-kromatográfia



# A kinyert antitestek tesztelése

- A kinyert antitest **titerét** (=mennyiségét) és **specifitását** ellenőrizni kell az **antigén** segítségével **ugyanabban a rendszerben**, amiben majd a felhasználás is történni fog. Példák (részletesen később lesz szó róluk):
  - Áramlási citometria
  - ELISA
  - Immunhisztokémia



Áramlási citometriás dot-plot    Immunhisztokémiai metszet  
(CD10 kimutatása normális vesében)

ELISA lemez

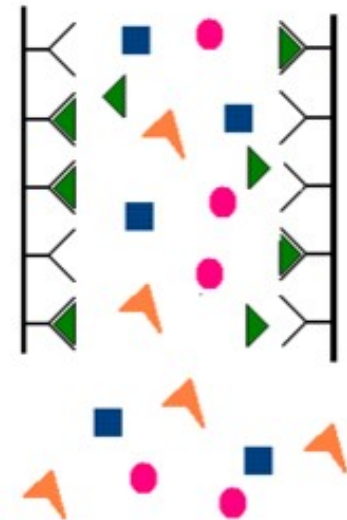


# Monoklonális antitestek jelentősége

- A **poliklonális** antitestek **változó affinitással** és **specifitással** rendelkeznek, ami limitálja a felhasználásukat. (pl. keresztreaktivitás, minden egyes immunizált állatból eltérő specificitású és affinitású antitest keverék nyerhető)
- A fentiek miatt nagy igény volt a **monoklonális** antitestek előállítására, amik **egyetlen jól meghatározott epitópot** ismernek fel és **állandó affinitással** képesek azt megkötni.

## MONOKLONÁLIS ANTITESTEK FELHASZNÁLÁSA

- Preparatív módszerek:
  - **Fehérjék specifikus tisztítása** (pl. immunoaffinitás-kromatográfia)
- **Analitikai módszerek** (diagnosztika, kutatás):
  - **Szerológiai tesztek** (lásd később)
  - Egyes **sejtcsoportok specifikus elkülönítése** (pl. CD-markerek kimutatása)
- **Terápiás felhasználás:**
  - Célmolekulák/sejtek specifikus gátlása vagy serkentése (lásd később)

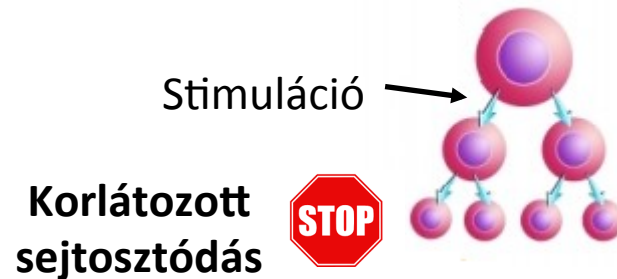


A kevert fehérjemintából a tisztítandó fehérjék **kikötődnek az oszlophoz**, majd tisztán kinyerhetők.



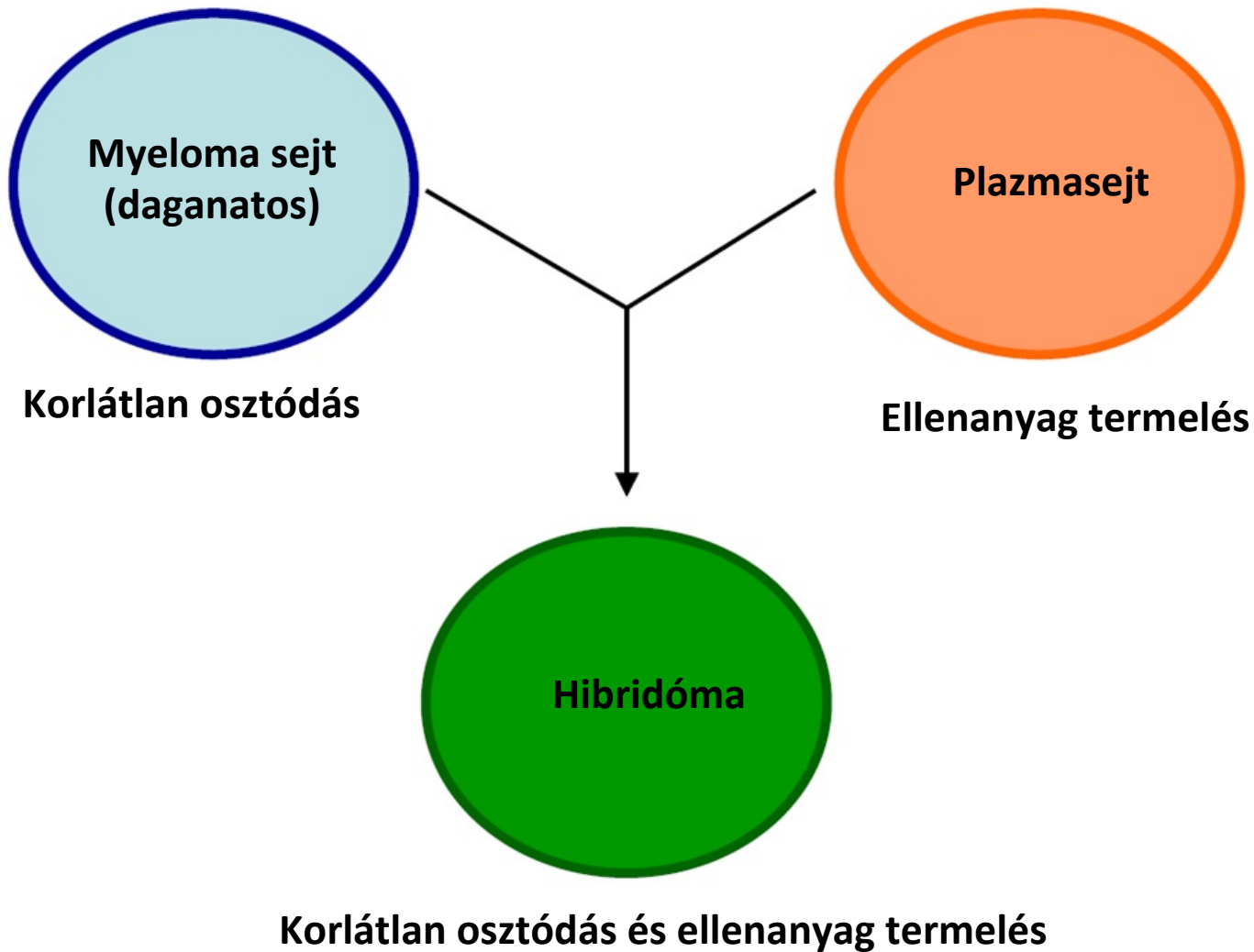
# Monoklonális ellenanyagok előállítása

- Mi a probléma?
  - Egyetlen B-sejt klónjai által termelt antitestet kellene nagy mennyiségben előállítani. → Ennek felszaporítása nem lehetséges, mert a B-sejtek **idővel elpusztulnak**, nem oszthatnak korlátlanul.

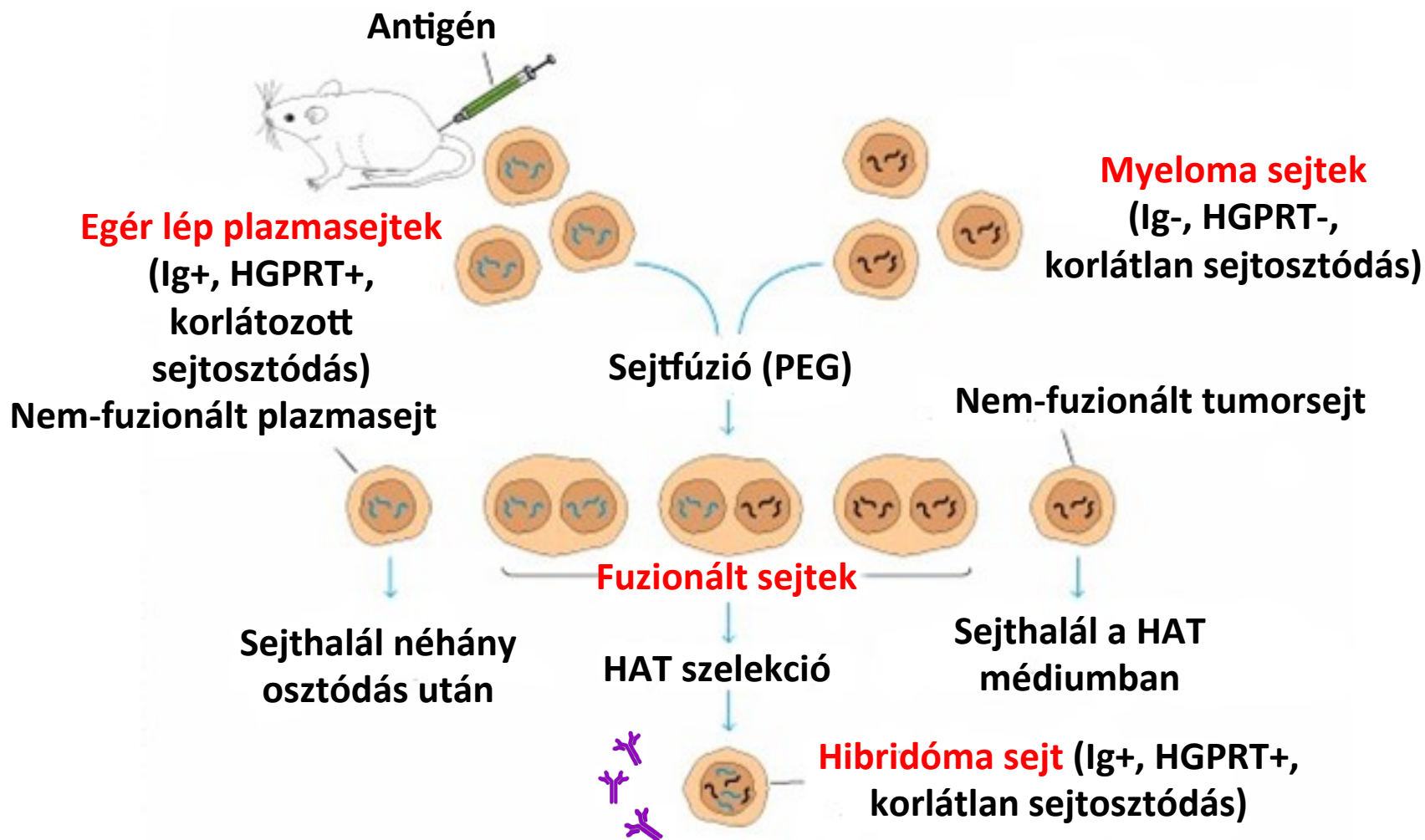


- Megoldás: A **sejtek immortalizálása**
  - Hogyan? → Fuzionáltatják (egyesítik) őket tumorsejtekkel
  - Miért? → A daganatsejtek korlátlan osztódási potenciállal rendelkeznek
- Eredmény: **Hibridóma-technika**<sup>[8,9.]</sup>
  - **Daganatsejt** és antitest-termelő **plazmasejt** mesterséges, in vitro **fúziója**
  - A keletkező **hibrid** (=keverék) sejtek egyesítik a két sejtípus számunka előnyös tulajdonságait, végtelen ideig fenntarthatók, szaporíthatók és az eredeti B-sejt klónra jellemző antitestet termelik.

# A lényeg:



# Hibridóma-technika 1.



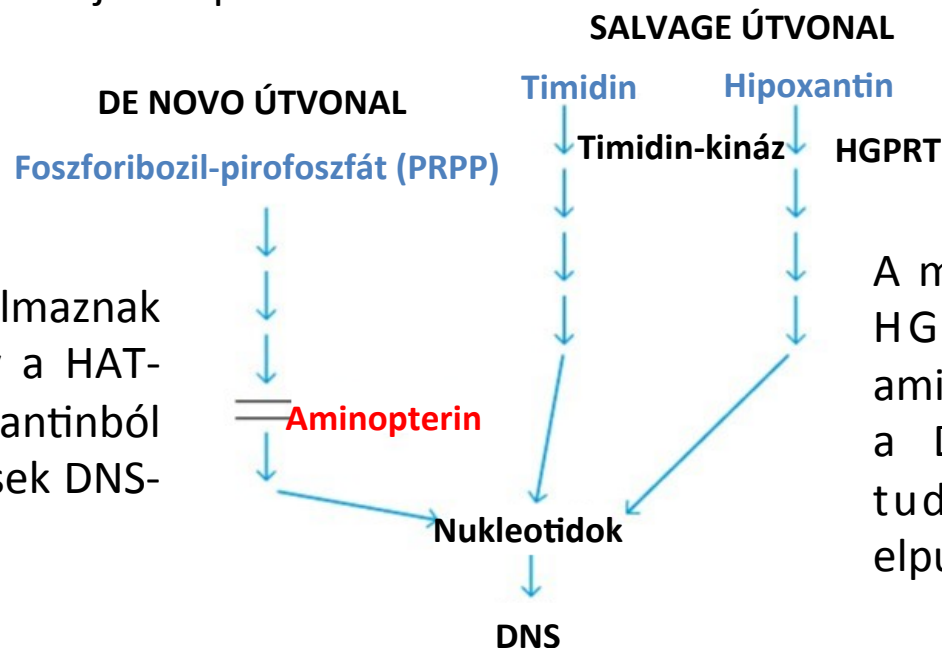
HGPRT: Hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz (lásd következő dia)

PEG: Polietilén-glikol

HAT: Hipoxantin-aminopterin-timidin sejtmedium (lásd következő dia)

# Hibridóma-technika 2.

1. Állat **immunizálása** (általában egér vagy patkány)
2. Az állat lépének eltávolítása, **plazmasejtek izolálása**
3. **Sejtfúzió**: egér plazmasejt + **nem-szekreteros** myeloma sejtek (plazmasejtes daganat, pl. egér Sp2 sejtek) fúziója: **Polietilén-glikol (PEG)** vagy **elektromos áram** segítségével (elektrofúzió)
4. **Szelekció**: **HAT-médium** (hipoxantin, aminopterin és timidin tartalmú) segítségével kisselektálják a plazmasejt-myeloma hibrideket, a nem-fuzionált vagy egymással fuzionált tumorsejtek elpusztulnak.

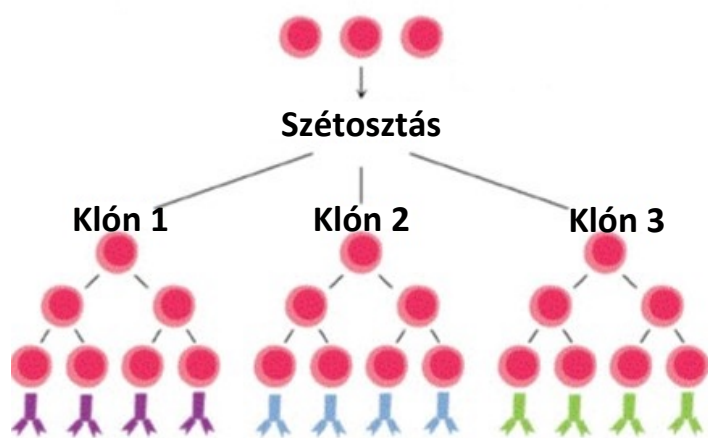


A hibrid sejtek tartalmaznak HGPRT-t és TK-t, így a HAT-médiumban a hipoxantinból és a timidinből képesek DNS-t szintetizálni.

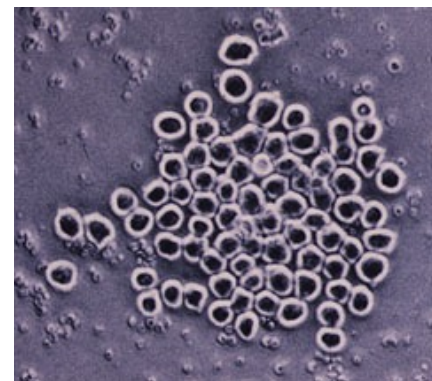
A myeloma sejtekben nincs HGPRT és TK, így az aminopterin okozta blokkot a DNS-szintézisben nem tudják áthidalni, ezért elpusztulnak.

# Hibridóma-technika 3.

- **Monoklónok létrehozása:** A HAT-szelekcióval kapott hibridsejteket **szétosztják** 96 lyukú lemezen, úgy, hogy minden lyukba lehetőleg **egyetlen sejt** kerüljön, majd külön-külön felszaporítják őket, így minden lyukban egyetlen plazmasejtre jellemző antitest-termelő klónok jönnek létre. → Monoklonális antitest termelés
- Termelt antitestek **tesztelése** a vizsgált antigénre ELISA-val
- Az ideális antitestet termelő klón felszaporítása



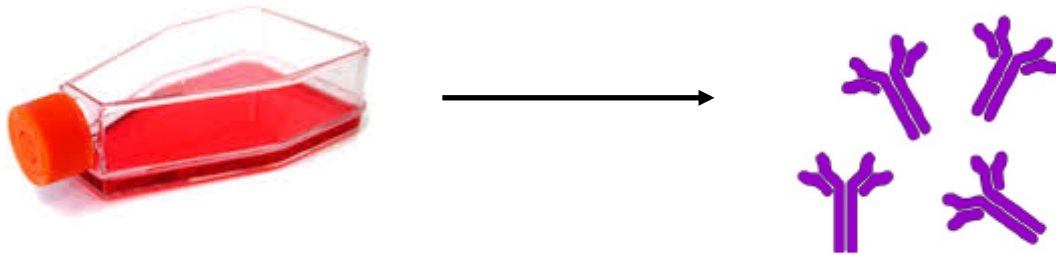
96 lyukú lemez



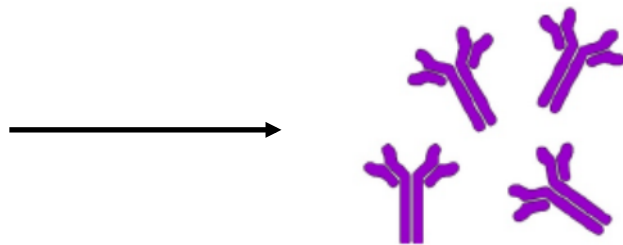
Hibridóma sejtek  
sejtenyésztő médiumban

# Folyamatos antitest termelés

- A kapott hibridómák a sejtenyésző médiumba szekretálják (=termelik és kiválasztják) az ellenanyagot. → In vitro, a **felülúszóból** kinyerhető.



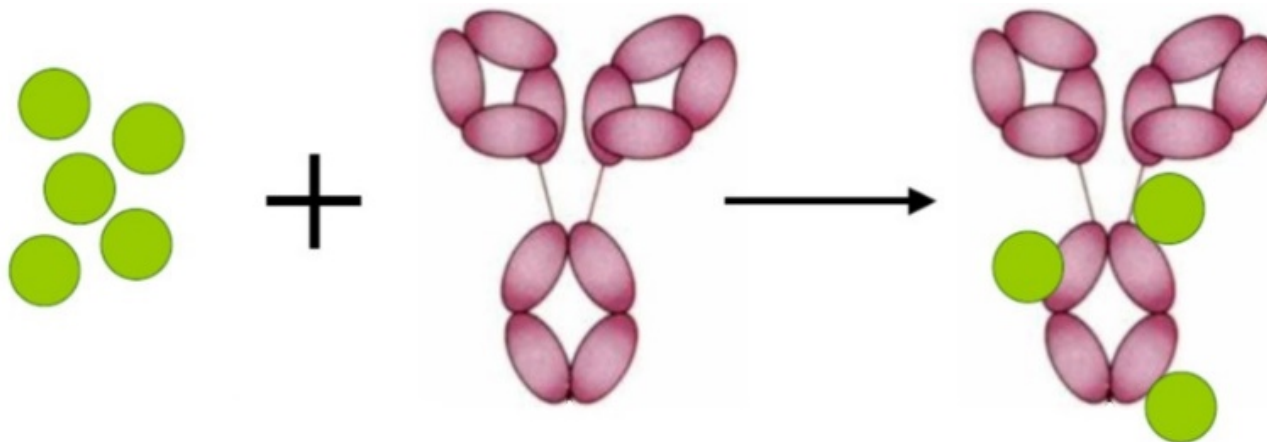
- A sejteket befecskendezhetik kísérleti állatok (pl. egér) hasüregébe is, a hashártyán megtapadnak és antitestet termelnek. → In vivo, a keletkező **ascitesből** kinyerhető.



- Ipari előállítás: **fermentorok** („műegér”) segítségével.

# Antitestek jelölése

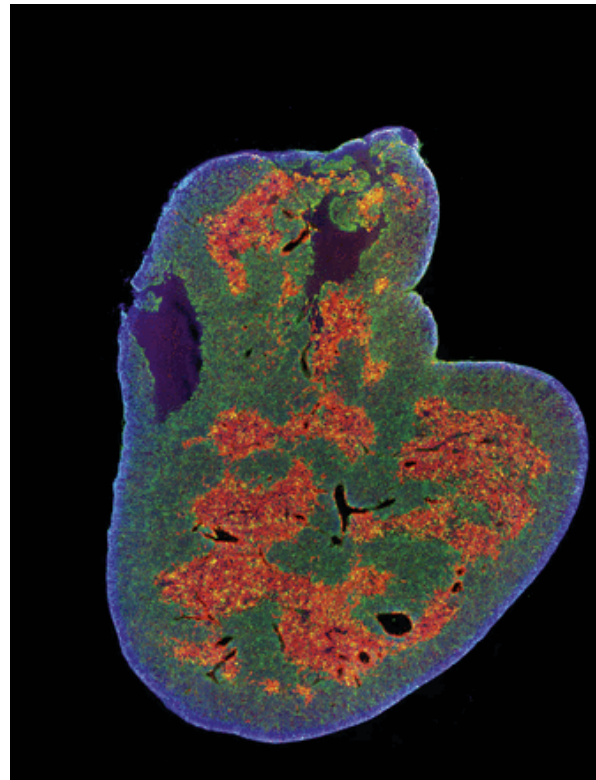
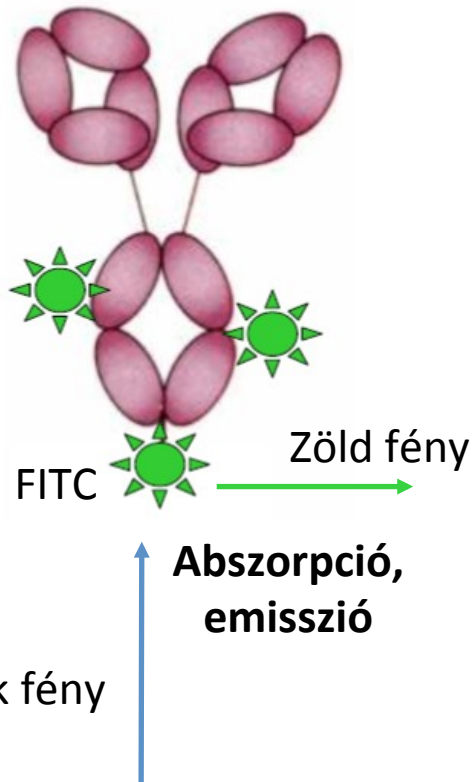
- Az antitest-antigén reakció **színtelen**, nem látható. Ha jelölőmolekulákat konjugálunk az antitestekhez, akkor viszont már detektálhatjuk.
- Konjugátumok:
  - **Fluoreszcens anyagok** (fluorofór vagy fluorokróm, ugyanazt jelenti), pl. FITC, PE, stb. (lásd később) → **áramlási citometria, fluoreszcens mikroszkópia**
  - **Enzimek** (kromogénnel és szubsztráttal színreakciót adnak), pl. HRP, ALP (lásd később) → **immunhisztokémia, ELISA, Western blot**
  - **Radioaktív izotópok:**
    - Diagnosztika →  $\gamma$ -sugárzó izotópok





# Fluoreszcens konjugátumok

## Fluoreszcens mikroszkópia



Egér thymus IF<sup>[10.]</sup>:

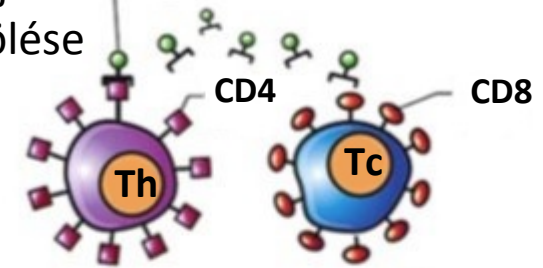
Vörös: Medullaris epithel

Zöld: Corticalis epithel

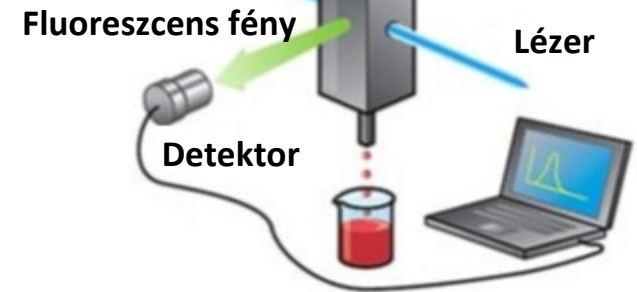
Kék (DAPI): Sejtmagok

## Áramlási citometria

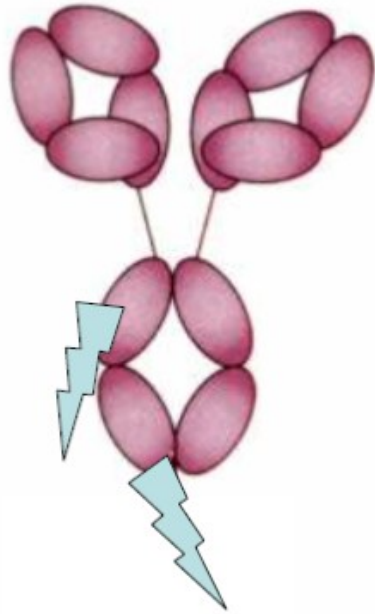
1. Sejtek jelölése  
Jelölt anti-CD4 antitest



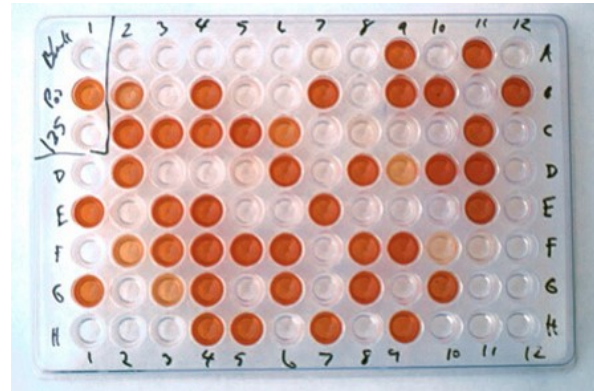
2. Citometriás mérés



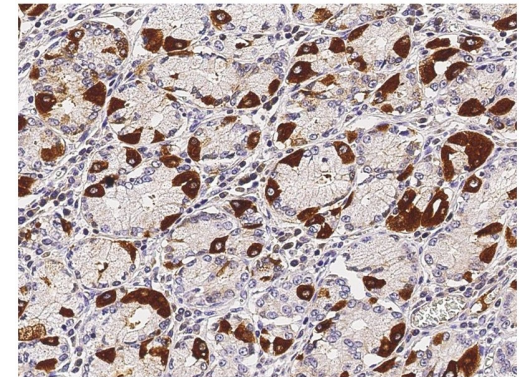
# Enzim konjugátumok



ELISA



Immunohisztokémia



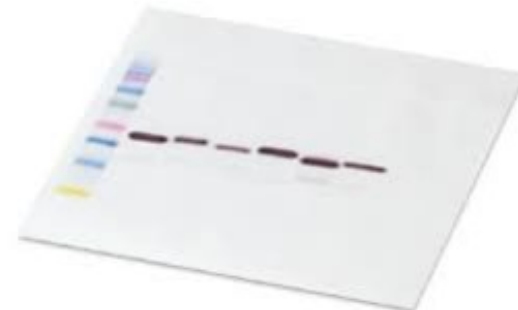
(intrinsic factor jelölése  
humán gyomorban)

Enzim az antitesten + Kromogén  
és szubsztrát



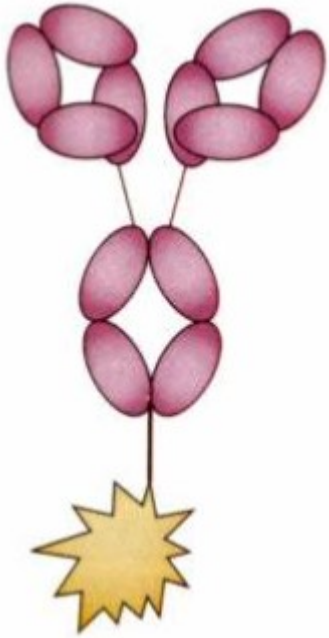
Színreakció

Western blot



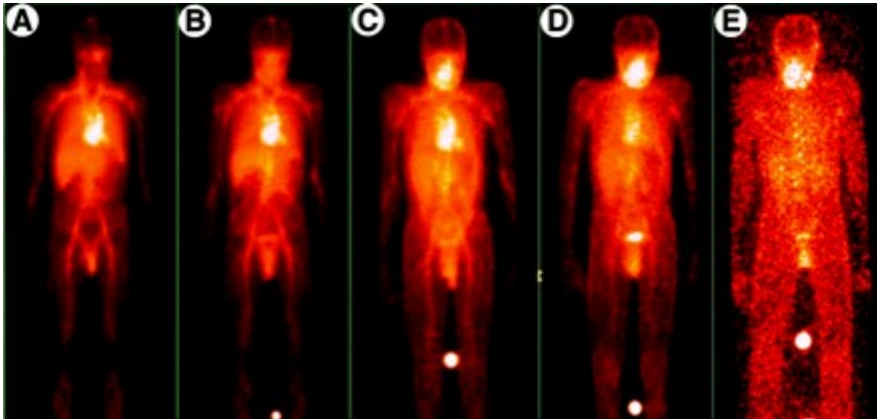
Gyakran használt enzimek: **HRP** (torma peroxidáz), **ALP** (alkalikus foszfatáz)

# Radioaktív konjugátumok



Antitest + sugárzó izotóp

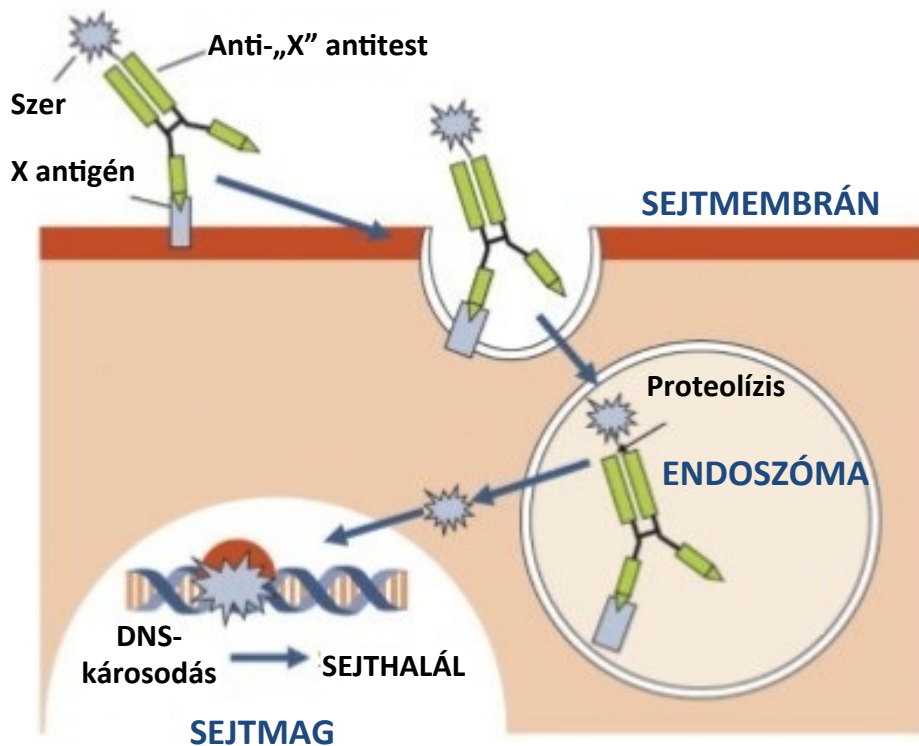
- **Diagnosztikus célra** (radioimmun-képzés):<sup>[11.]</sup>
  - $\gamma$ -részecskét vagy pozitront sugárzó izotópot konjugálnak az antitestre
  - Az antitest szelektíven kötődik a célsejthez (pl. daganatsejt)
  - Gamma-kamerával vagy PET-tel (Pozitronemissziós tomográfia) detektálható a testből érkező jel (pl. mikrometasztázisok)
- **Terápiás célra:**
  - $\alpha$ - vagy  $\beta$ -sugárzó izotópokat használnak  $\rightarrow$  lokálisan, nagy dózisban éri a tumort a besugárzás



Oropharyngeális tumort kimutató immuno-PET vizsgálat, 1 (A), 24 (B), 72 (C), 144 (D) és 312 (E) órával a jelölt antitest beadását követően.<sup>[12.]</sup>

# ADC (Antibody-drug conjugate)

- Az antitest **szelektíven** eljuttatja a gyógyszert a célsejthez, amit a sejt az antitesttel együtt felvesz a citoplazmájába, ahol a gyógyszer majd kifejtheti hatását. **Daganatok ellen** használt terápiás megközelítés, leginkább kemoterápiás szereket kapcsolnak az antitestekhez.<sup>[13.]</sup>



## Néhány példa gyógyszer-konjugált terápiás antitestre

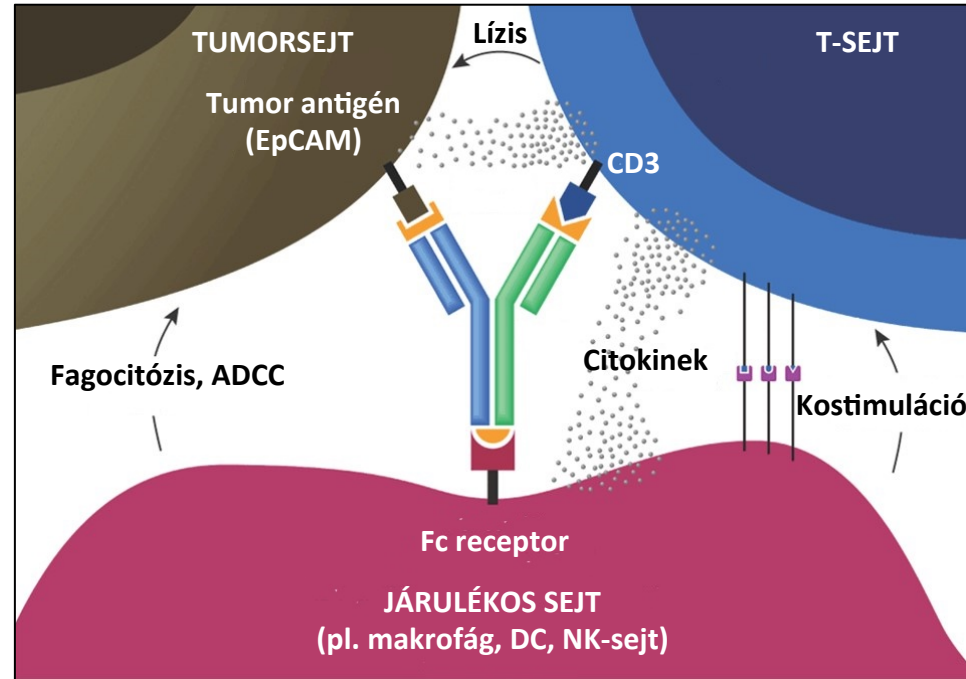
Gyógyszer	Célmolekula	Betegség
Brentuximab vedotin	CD30	Hodgkin-limfóma
Gemtuzumab ozogamicin*	CD33	Akut mieloid leukémia
Trastuzumab emtansine	HER2	Emlőrák

\*2010-ben a Pfizer® visszavonta a piacról<sup>[14.]</sup>

A daganatellenes ADC-k általános hatásmechanizmusa

# Egyéb módosítások

- **Bispecifikus antitestek:**<sup>[15.]</sup>
  - Rekombináns immunglobulinok, melyek antigén-kötő helyei különböző antigéneket ismernek fel.
  - Felhasználásuk: Az immunsejtek és a daganatsejtek összekötésével elsősorban **tumorok ellen** használatosak.
- **Fúziós fehérjék:**<sup>[17.]</sup>
  - Általában immunglobulin Fc részhez kötött rekombináns humán fehérjék. Pár példa (részletesen lásd később):
    - Abatacept (CTLA-4 + IgG1)
    - Etanercept (TNF $\alpha$ R + IgG1)
    - Romiplostim (TPO + IgG1)



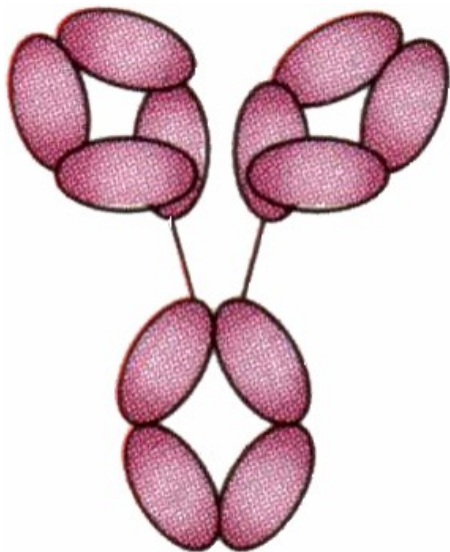
Egy bispecifikus antitest (catumaxomab) hatásmechanizmusa<sup>[16.]</sup>

Rheumatoid arthritis (RA)

Immun thrombocytopenia (ITP)



# Rágcsáló antitestek



- Az első terápiás monoklonális antitest (muromonab) egy teljes egészében egér immunglobulin volt.
- Transzplantációt követően adták a szervkilökődések megelőzésére. (lásd később)
- Fő hátrány: Ez egy **fajidegen fehérje** az emberi szervezet számára!



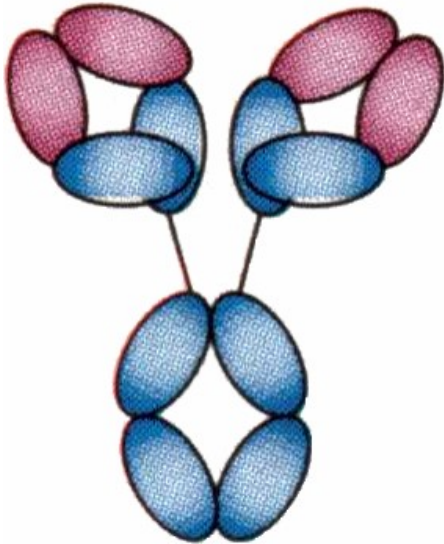
A betegekben ellenanyag termelést váltott ki és néhányukban anaphylaxiás reakciót (lásd később) is előidézett:<sup>[18.]</sup>

**HAMA (human anti-mouse antibody): humán anti-egér antitest**

Bár az ellenanyagok konstans része konzerváltnak tekinthető, az egyes fajok között nem azonos.

A muromonab az egyedüli terápiás rágcsáló monoklonális antitest. Akut esetben, más szerre nem reagáló kilökődésénél még használják, de megelőző cézzattal már nem adják a transzplantált betegeknek.<sup>[19.]</sup>

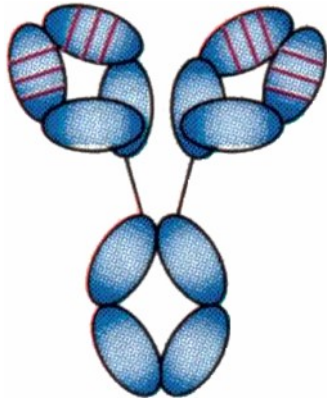
# Kiméra antitestek



- A kiválasztott rágcsáló monoklonális antitest variábilis (Fv) régióját kódoló géneket hozzákapcsolják egy humán antitest Fc részét kódoló génjeihez.
- A keletkező antitest **megőrzi** az eredeti egér immunglobulin **specifitását**, de a konstans lánc már humán eredetű.
- Durván 75 százalékban humán.
- Előny a rágcsáló antitestekhez képest: **Kisebb az esélye**, hogy **idegenként** felismerje a beteg immunrendszere és a humán Fc az **effektor funkciókat** is hatékonyabban ellátja az emberi szervezetben, illetve növeli a molekula **életidejét**.
- Hátrány: A betegek egy részében ez is ellenanyag termelést vált ki<sup>[20.]</sup> → **(HACA): humán anti-kiméra antitest**
- Kiméra antitesteket széleskörűen használnak különböző betegségek kezelésére. (lásd a táblázatban a diasor végén)

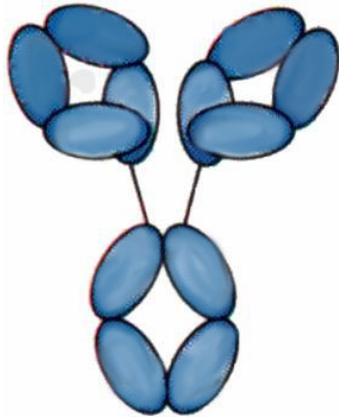


# Humanizált és humán antitestek



## HUMANIZÁLT:

- Az eredeti rágcsáló antitestből kizárólag a hipervariábilis régiókat (CDR) hagyják meg, a többi szekvencia már humán.
- A humanizált ellenanyag > 90 százaléka humán.
- A specificitása hasonló az eredeti rágcsáló antitestéhez, effektor funkciója és féléletideje pedig csaknem azonos az emberi immunglobulinokéval.



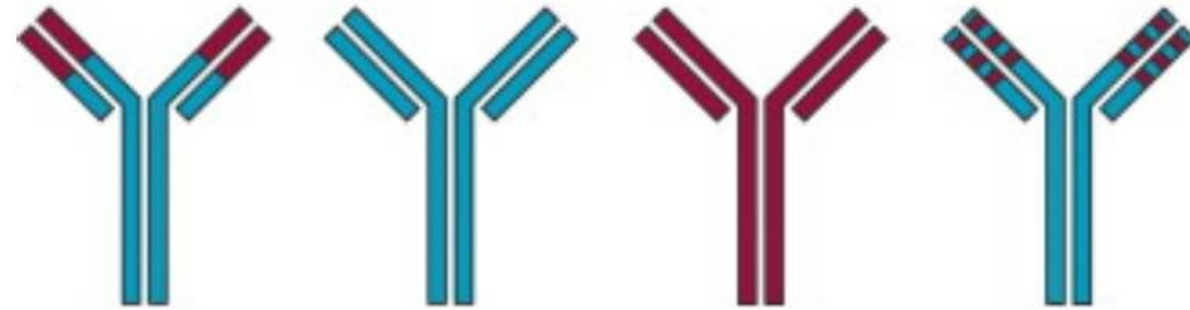
## HUMÁN:

- A humán immunglobulinok génjeit beviszik egérbe, majd az ilyen transzgenikus egeret immunizálják és a plazmasejtjeiből hibridómát hoznak létre.<sup>[21.]</sup>



Teljes egészében humán ellenanyag

# Nevezéktan



**Infliximab**  
**Rituximab**  
**Abciximab**

**Adalimumab**  
**Ipilimumab**

**Muromonab**

**Daclizumab**  
**Trastuzumab**

**mab** = monoklonális antitest

**xi** = kiméra antitest

**zu** = humanizált antitest

**mu** = teljesen humán antitest

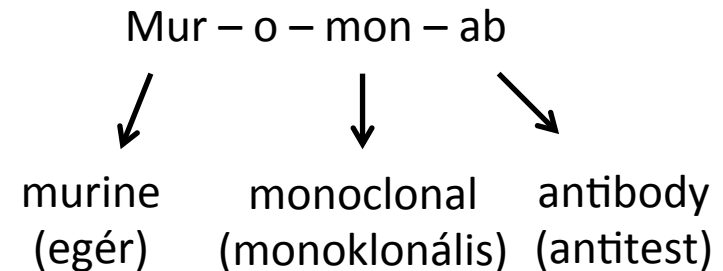
**li** = immunmoduláns hatás

**tu** = daganatellenes hatás

**ci** = kardiovaszkuláris betegségben használható antitest

A WHO **egységes nevezéktant** vezetett be a monoklonális antitestekhez.<sup>[22.]</sup>

A muromonab kivételes, mivel az első terápiás monoklonális antitest:



# Néhány FDA által bejegyzett antitest 1.

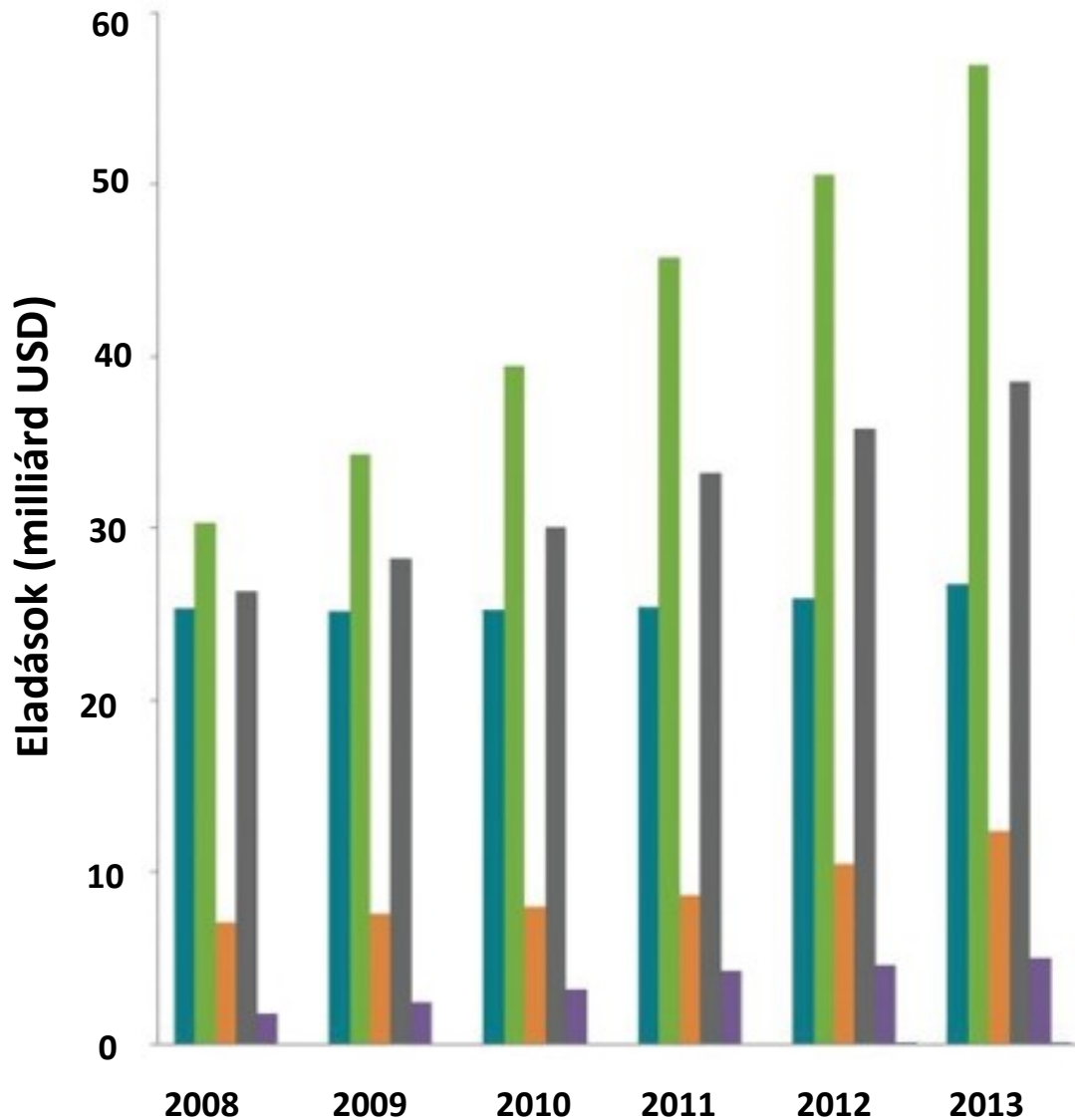
Bejegyzés éve	Hatóanyag név	Típusa	Gyári név	Célmolekula	Alkalmazás
1986	muromonab	egér	Orthoclone-OKT-3	CD3	Transzplantáció rejekeció
1994	abciximab	kiméra	ReoPro	Gp IIb/IIIa	PCI
1997	daclizumab	humanizált	Zenapax	CD25	Transzplantáció rejekeció
1997	rituximab	kiméra	Rituxan, Mabthera	CD20	B-sejtes NHL
1998	infliximab	kiméra	Remicade	TNF $\alpha$	RA, Crohn-betegség, Psoriasis
1998	trastuzumab	humanizált	Herceptin	HER2	Emlőrák
1998	basiliximab	kiméra	Simulect	CD25	Transzplantáció rejekeció
2001	alemtuzumab	humanizált	Campath	CD52	CLL
2002	adalimumab	humán	Humira	TNF $\alpha$	RA
2004	bevacizumab	humanizált	Avastin	VEGF-A	Vastagbélrák

# Néhány FDA által bejegyzett antitest 2.

Bejegyzés éve	Hatóanyag név	Típusa	Gyári név	Célmolekula	Alkalmazás
2004	cetuximab	kiméra	Erbitux	EGF-R	Vastagbélrák, fej-nyak tumor
2006	natalizumab	humanizált	Tysabri	$\alpha$ 4 integrin	SM, Crohn-betegség
2006	panitumumab	humán	Vectibix	EGF-R	Vastagbélrák
2006	ranibizumab	humanizált	Lucentis	VEGF-A	Macula degeneráció
2009	golimumab	humán	Simponi	TNF $\alpha$	RA
2010	denosumab	humán	Amgen	RANK-L	Csontritkulás
2010	tocilizumab	humanizált	Actemra	IL-6 R	RA
2011	ipilimumab	humán	Yervoy	CTLA-4	Melanoma malignum
2014	nivolumab	humán	Opdivo	PD-1	Melanoma malignum, nem-kissejtes tüdőrák
2015	secukinumab	humán	Cosentyx	IL-17A	Psoriasis



# Terápiás antitestek forgalma<sup>[23.]</sup>



1 g arany vs 100 mg infliximab  
10.955 Ft vs 153.549 Ft  
(támogatott ár)  
(2016.02.12.)

- Rekomináns fehérjék emlős sejtkultúrából (133 Kg 2013-ban)
- **Monoklonális antitestek** emlős sejtkultúrából (8182 Kg 2013-ban)
- **Monoklonális antitest** fragmentumok, konjugátumok vagy fúziós fehérjék emlős sejtkultúrából (1677 Kg 2013-ban)
- Rekomináns fehérjék (inzulin is) mikrobiális fermentációból (8497 Kg 2013-ban)
- **Monoklonális antitestek** mikrobiális fermentációból (102 Kg 2013-ban)
- Növény sejtkultúrából származó készítmények (189 g 2013-ban)

# Köszönjük a figyelmet!

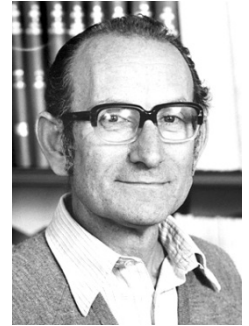


Gerald M. Edelman Rodney R. Porter



1972-es Fiziológiai és orvostudományi Nobel-díj:

„Az antitestek kémiai szerkezetével kapcsolatos felfedezéseikért”.<sup>[24.]</sup>



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



1984-es Fiziológiai és orvostudományi Nobel-díj:

„Az immunrendszer specifikus szabályozó mechanizmusának és felépítésének, valamint a monoklonális ellenanyagok termelési elvének felfedezéséért”.<sup>[25.]</sup>

# Hivatkozások 1.

1. Cooper HM<sup>1</sup>, Paterson Y: **Production of polyclonal antisera.** *Curr Protoc Neurosci.* 2009 Jul;Chapter 5:Unit 5.5. doi: 10.1002/0471142301.ns0505s48.
2. Leenaars M<sup>1</sup>, Hendriksen CF: **Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations.** *ILAR J.* 2005;46(3):269-79.
3. Reed SG<sup>1</sup>, 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 T<sup>1</sup>, Lindqvist M<sup>1</sup>, Harandi AM<sup>2</sup>: **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 Jr<sup>1</sup>: **Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants.** *ILAR J.* 2005;46(3):280-93.
6. Glück R<sup>1</sup>, Burri KG, Metcalfe I: **Adjuvant and antigen delivery properties of virosomes.** *Curr Drug Deliv.* 2005 Oct;2(4):395-400.
7. Andrew SM<sup>1</sup>, 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 M<sup>1</sup>, Tsumoto K: **Hybridoma technologies for antibody production.** *Immunotherapy.* 2011 Mar; 3(3):371-80. doi: 10.2217/imt.11.4.
10. Irla M<sup>1</sup>, 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 AC<sup>1</sup>, Wu AM<sup>2</sup>: **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 GA<sup>1</sup>, 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.



# Hivatkozások 2.

14. Mack F<sup>1</sup>, Ritchie M<sup>1</sup>, Sapra P<sup>2</sup>: **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.
15. FDA: **Pfizer Voluntarily Withdraws Cancer Treatment Mylotarg from U.S. Market** (<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm216448.htm>)
16. Kontermann RE<sup>1</sup>, Brinkmann U<sup>2</sup>: **Bispecific antibodies.** *Drug Discov Today.* 2015 Feb 26. pii: S1359-6446(15)00077-X. doi: 10.1016/j.drudis.2015.02.008.
17. Seimetz D<sup>1</sup>: **Novel monoclonal antibodies for cancer treatment: the trifunctional antibody catumaxomab (removab).** *J Cancer.* 2011;2:309-16. Epub 2011 May 25.
18. Baldo BA<sup>1</sup>: **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.
19. Sgro C<sup>1</sup>: **Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review.** *Toxicology.* 1995 Dec 20;105(1):23-9.
20. Renders L, Valerius T: **Engineered CD3 antibodies for immunosuppression.** *Clin Exp Immunol.* 2003 Sep; 133(3):307-9.
21. Atzeni F<sup>1</sup>, 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.
22. Brüggemann M<sup>1</sup>, Taussig MJ: **Production of human antibody repertoires in transgenic mice.** *Curr Opin Biotechnol.* 1997 Aug;8(4):455-8.
23. WHO: **General policies for monoclonal antibodies** (<http://www.who.int/medicines/services/inn/generalpoliciesmonoclonalantibodiesjan10.pdf>)
24. Ecker DM<sup>1</sup>, 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/](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/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1984/))