

37. OTDK Biológiai Szekció

Bioszimiláris Nivolumab monoklonális antitest affinitás kromatográfiás tisztítása CHO sejt kultúrából

Hallgató:

Fejér Rebeka, Génsebészet szak, IV. év, Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Csíkszeredai Kar

Témavezetők:

dr. Albert Beáta, egyetemi professzor
dr. Salamon Pál, egyetemi tanársegéd

2024

Tartalomjegyzék

1	Irodalmi áttekintés	4
1.1	Bevezetés	4
1.2	Az antitestek és hatásmechanizmusai	4
1.3	A Nivolumab monoklonális antitest, mint terápiás módszer	7
1.3.1	Az IgG4	7
1.3.2	A programozott sejthalál -1 útvonal (PD-1 útvonal)	9
1.4	Az antitestek tisztítási módszerei	12
1.4.1	Kromatográfiás eljárások	12
1.4.2	Gyors folyadékkromatográfiás módszer (FPLC)	12
1.4.3	Gélszűrési kromatográfia	14
1.4.4	Ioncserés kromatográfia, CaptoQ, CaptoS	16
1.4.5	Affinitás kromatográfia, Protein A	17
1.5	A fehérjetisztítás fontossága	22
2	Eredeti hozzájárulás a témához	23
2.1	Kutatási célok	23
2.2	A kutatás módszertana	24
2.2.1	Nivolumab tisztítása CHO sejt kultúrából HiTrap Protein A affinitás kromatográfiás oszlopon	24
2.2.2	A tisztított bioszimiláris Nivolumab molekula méretének meghatározása	27
2.3	Eredmények	28
2.3.1	Antitest tisztítása affinitás kromatográfiás módszerrel	28
2.3.2	A tisztított bioszimiláris Nivolumab antitest méretének validálása	32
3	Következtetések	33
4	Köszönetnyilvánítás	36
5	Irodalomjegyzék	37

Kivonat

A biotechnológia gyors fejlődésével számos új lehetőség tárult fel mind a tudományban, mind az iparban. Az elmúlt harminc évben a monoklonális antitestek (mAb) egyre inkább kiemelkedő szerepet töltenek be a daganatellenes terápiákban, mivel azok célzottan irányíthatóak és kevésbé toxikus kezelések a daganatban szenvedőknek, mint a hagyományos terápiák.

A Nivolumabot, amely egy programozott sejthalál fehérje-1 (PD-1) útvonal blokkoló mAb az FDA 2014. decemberében, a Bristol-Myers Squibb Pharma EEIG 2015. -ben engedélyezte, az Európai Unió egész területén szolid tumoros indikációban (adjuváns és metasztatikus melanoma, fej-nyak laphámsejtes karcinóma, nem kissejtes tüdőrák, vesesejtes karcinóma, uroteliális karcinóma).

Az antitestek tömeges előállításánál hibridóma technológiát, bakteriális sejtkultúrát, esetleg fag display-t használnak. Azonban az antitestek fajtái, valamint azok forrásai problémákat okozhatnak egyes tisztítási eljárások kiválasztásánál, ennél az oknál fogva pedig a tisztítás nehézségei gátolják azok alkalmazásait. Az antitestek tisztításának egyik elterjedt módszere a Protein A affinitás kromatográfia képezi.

Kutatásunk célja CHO expressziós rendszerben termeltetett bioszimiláris Nivolumab monoklonális antitestek tisztítása Protein A affinitás kromatográfia módszerrel, meghatározva különböző passzázsszámok közötti összefüggéseket, valamint a tisztított fehérje méret validálása MALDI-TOF-MS és SDS-PAGE elválasztással. A négy különböző passzázsszámú minta vizsgálata során, eredményeink azt igazolták, hogy a növekvő passzázsszámmal arányosan a termeltetett antitest koncentráció is növekedett.

1 Irodalmi áttekintés

1.1 Bevezetés

Napjainkban a rohamosan fejlődő biotechnológia új utakat nyitott meg mind a tudományban, mint pedig az iparban. A modern géntechnológia által képesek vagyunk a genetikai információ oly mértékű manipulációjára, amely segítséget kínál az egészségügyi, ipari, mezőgazdasági és környezetvédelmi problémák megoldására, illetve azok előrelendítésére.

A modern orvostudományban kiemelkedő szerepet kapott a gyógyszer -biotechnológia, rekombináns fehérjék létrehozása, összejt -terápia, valamint a tumorterápia (Bhatia, 2018).

Az elmúlt évtizedben az antitestek a leggyorsabban növekvő biológiai gyógyszer -piaci szegmenst képviselik, ami által egyre szélesebb körű elfogadásra tettek szert világszerte az egészségügyben.

Jelen klinikai vizsgálatokban, valamint terápiákban használt bioterápiás szerek több mint 30%- át antitestek és FC- fúziós fehérjék alkotják. A humán szérumból tisztított immunoglobulin G egyre gyakrabban használatos különböző rendellenességek kezelésére, mint például elsődleges és másodlagos immundeficienciák, fertőzések, autoimmun betegségek és daganatos megbetegedések.

Míg a nukleinsavak tisztítására már több éve léteznek szabványosított eljárások, addig a fehérjék tisztítására nem feltétlenül vannak stabil lábakon álló szigorú szabályok lefektetve. Ez a szabálytalanság a fehérjék sokszínűségének és kölcsönhatásaiknak köszönhető. Annak érdekében, hogy a célfehérje elérje a kívánt tisztaságot optimalizációkra lehet szükség a fehérje sajátos jellemzői, valamint biológiai rendszeréből származó körülményei alapján (Denizli, 2011).

Az antitestek tisztítására kromatográfias technikákat alkalmaznak, melyek közé sorolható például a protein A affinitás kromatográfia, a magas teljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC), az ioncserélő kromatográfia, valamint a méretkizárásos kromatográfia. Az imént említett eljárások közül a *Staphylococcus*ból származó protein A volt az elsőként felfedezett IgG- kötő molekula, amelyet széles körben alkalmaznak ma is ezen antitestek tisztítására biospecifikus ligandként (Denizli, 2011).

1.2 Az antitestek és hatásmechanizmusai

Az antitesteket úgy is meghatározták, mint olyan laboratóriumban előállított molekulákat, amelyeket úgy terveztek, hogy helyettesítő antitestként szolgáljanak és helyreállítsák, vagy

fokozzák az immunrendszer rákos sejtek elleni támadását (Bayer, 2019). Az antitesteket először 1890 -ben írta le Behring és Shibasaburo, mint neutralizáló anyag a vérben. A következő évszázadban pedig kutatások indultak annak folyamán, hogy hogyan is lehet az ellentesteket felhasználni a daganatos betegségek terápiájaként. Heidelberger és Avery az antitesteket olyan fehérjeként azonosította, amelyek speciális antigéneket képesek felismerni. 1947 -ben aztán Astrid Fagraeus rájött, hogy az antitesteket a B sejtek termelik, amelyek az adaptív immunrendszerhez kötődnek. A monoklonális antitestek egyedi B -sejt klónjai termelnek, amelyek az antigének egy specifikus régiójához, úgynevezett etióphoz kötődnek (Zahavi and Weiner, 2020). Az első antitesteket úgy hozták létre, hogy a kísérleti állatokat antigénnel immunizálták, majd szérum tisztítását követően antitest frakciót izoláltak, ilyen volt az a plazmasejt -klón, amely homogén antitestet hozott létre, amelyet lépsejtek ismételt átjuttatásával szaporítottak egerekbe. Milstein és Kohler 1984 -ben elnyerték az élettani és orvosi Nobel-díjat, melynek eredményeképpen képesek lettek nagy mennyiségű mAb -et *in vivo* reprodukálni, így született meg a „hibridoma” technológia (Bayer, 2019). Ahogy létrejött az első hibridóma elkezdődött a mAb -ok terápiás célokra való felhasználása. Mivel a korai terápiás monoklonális antitestek egér eredetűek voltak ezért a betegek immunitását rosszul indukálták, ezáltal korlátozva a klinikai alkalmazhatóságukat. Az 1980 -as években létrehozott humanizált antitestek aztán ledöntötték ezeket a korlátokat. Az utóbbi években pedig létrehozták a teljesen humán eredetű monoklonális antitesteket transzgénikus egér vagy *in vitro* élesztő, valamint fág display segítségével. Ezekkel az eredményekkel a mAb -ok fontos tényezői lettek a daganatos terápiának

Az antitestek nagyméretű glikoproteinek, amelyek az immunoglobulinok szupercsaládjába tartoznak. A szerepük, hogy felismerjék az idegen antigéneket, majd azokat semlegesítsék ezzel kiváltva a jövőbeli immunválaszt. A struktúrájuk egy „Y” -ra hasonlít, rendelkeznek két darab nehéz láncsal és két darab könnyű láncsal, amelyeket diszulfid hidak kötnek össze. A struktúra mindkét csúcsán található egy antigénköti fragmentum, az úgynevezett Fab -régió, amely a specifikus antigének felismeréséért felelős. A struktúra alján pedig az úgynevezett kristályosítható- vagy Fc -régió helyezkedik el, amely az antitest és az immunrendszer közötti kapcsolatért felelős (Bayer, 2019; Zahavi és Weiner, 2020).

A nehéz lánc szerint az immunoglobulinok öt osztályát különböztetjük meg: IgA, IgM, IgD, IgE és IgG. Ezek közül az IgG a leggyakrabban használt az antitestterápiákban mivel az IgG -k kölcsönhatásba lépnek a hozzájuk kapcsolódó FcR -típussal, az FcγR -rel, amely a természetes ölősejteken (NK), valamint a neutrofileken és monocitákon található. Ezek olyan speciális funkciókat közvetítenek, mint az antitest-függő sejtcsapócitotoxicitás (ADCC) és a

komplementfüggő citotoxicitás (CDC). Az IgG osztály az Fc -régióknak az említett funkciókat elősegítő képessége alapján tovább osztható: Az IgG1 és IgG3 képes az ADCC -t és CDC -t kiváltani, míg az IgG2 és IgG4 erre nem képes.

Az elmúlt harminc évben a monoklonális antitestek hatalmas szerepet töltenek be a daganatellenes terápiákban, hisz nagyobb hatékonyságú és kevésbé toxikus kezelések lennének a daganatban szenvedőknek, mint a hagyományos kemoterápia.

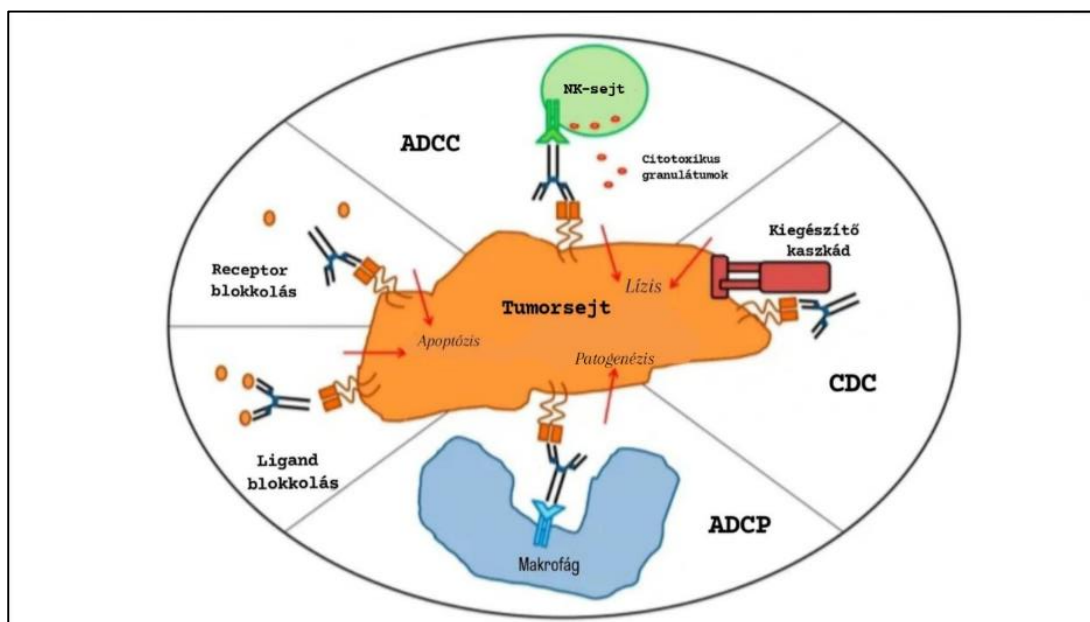
1988-ban fedezték fel a CD20 fehérjét, amely az érett rákos B -sejteken fejeződött ki a non-Hodgkin -limfómában, viszont az érett egészséges B -sejteken nem volt megtalálható. Ezért kifejlesztettek egy olyan mAb kezelést, amely a CD20 -at célozza meg és elpusztítja a rákos sejteket, de az egészséges B -sejteket érintetlenül hagyja. Erre a célra az első kifejlesztett antitest a rituximab volt, amelyet engedélyeztek a rák kezelésére (Zahavi and Weiner, 2020).

A mAb -ok közvetett hatásmechanizmusai a gazdaszervezet immunrendszerének összetevőinek bevonását igénylik, ezek közé tartoznak a CDC -k, az antitest -függő sejtes fagocitózis (ADCP) és az ADCC (1.1. ábra). A legtöbb célzott mAb képes aktiválni a komplementrendszer. A CDC optimalizálása antitest -manipuláció révén fokozhatja a daganatellenes aktivitást.

Az ADCP akkor fordul elő, amikor a sejteken, például makrofágokon expresszált FcγRI olyan IgG1 vagy IgG3 mAb -okhoz kötődik, amelyek opsonizáltak egy tumorsejtet. Nagyon korlátozott számú tanulmány készült az ADCP -ről; azonban van néhány bizonyíték arra vonatkozóan, hogy az ADCP fontos szerepet játszik a keringő tumorsejtek elpusztításában mAb-kezelést követően, a célsejteket ellenanyagok opsonizálják, amelyek aztán effektorsejteket toboroznak, hogy nem fagocita mechanizmusok révén célsejthalált indukáljanak. Az antitestek hídként működnek azáltal, hogy a célsejt felszínén lévő antigénekhez kötődnek Fab -részeiken keresztül, és összekapcsolják az effektor sejteket Fc -részeiken keresztül.

Míg az IgG, IgA és IgE mind ADCC -t közvetíthet, az IgG1 a rákellenes terápiás antitestek legrelevánsabb alosztálya. Az effektorsejteknek FcR -t kell expresszálniuk, amely megköti az antitestet az ADCC elősegítése érdekében. Az antitestek mindegyik osztályához tartozik egy megfelelő FcR osztály, például az FcγR, amely az IgG -t köti, és az FcαR, amely az IgA -hoz kötődik. Az FcγR a daganatsejtek ADCC szempontjából legrelevánsabb osztálya. Amikor egy aktiváló FcγR egy effektorsejtben megköti az antitestreceptor Fc -régióját, akkor térhálósodik, és lefelé irányuló jel terjed. Az NK -sejtek a fő effektor típus, amely ADCC-t közvetít; azonban más mieloid típusok, például monociták, makrofágok, neutrofilek, eozinofilek és dendritikus sejtek is képesek. Az effektorsejtek citotoxikus szemcsefelszabadulás, Fas jelátvitel és reaktív

oxigénfajták beindítása révén célsejthalált indukálnak. Míg számos mieloid sejttípusról kimutatták, hogy ADCC -t közvetítenek az immunterápia során, a legtöbb célzott mAb klinikai hatékonysága főként NK -sejt -függő (Zahavi and Weiner, 2020).



1.1. ábra: Az antitestek hatásmechanizmusai (Zahavi and Weiner, 2020)

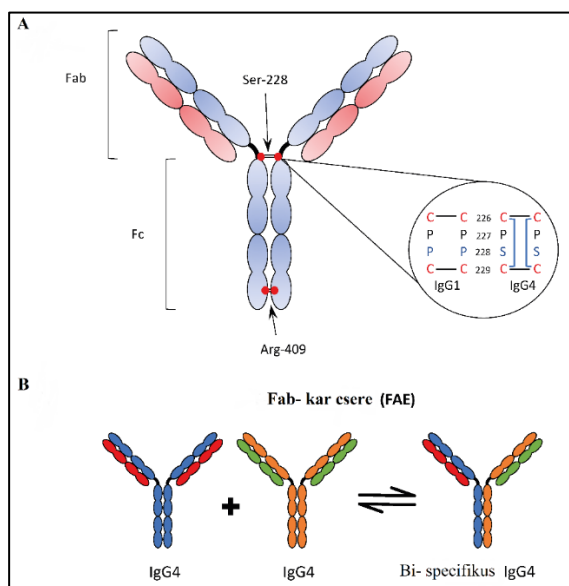
1.3 A Nivolumab monoklonális antitest, mint terápiás módszer

1.3.1 Az IgG4

Az antigénnel való érintkezéskor gyakran az IgG3 az első alosztály, amely kialakul, míg a későbbi válaszokért az IgG1 a felelős. Két azonos nehéz lánc és két azonos könnyű lánc alegység, amelyek intramolekuláris diszulfid kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz, heterotetramer glikoproteinek formájában alkotják az IgG -t. Négyféle nehéz lánc létezik ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ és $\gamma 4$), amelyek mérete körülbelül 50 kDa. Ezek egy variábilis N -terminális doménből (VH) állnak, amelyet három konstans domén (CH1, CH2 és CH3) követ. A nehézláncok mellett csak kétféle könnyű lánc létezik (κ vagy λ), amelyek mérete körülbelül 25 kDa, és ezek egy variábilis N-terminális doménből (VL) és egy konstans doménből (CL) állnak. A könnyű és nehéz láncok a VL-VH és CL-CH1 doménekhez kapcsolódnak, és két „Fab kart” alkotnak, amelyek megkötik az antigént. A CH2 és CH3 domént tartalmazó régió a kristályosítható fragmens vagyis az Fc régió. A CH1 és CH2 domének között egy rugalmas csuklórégió köti össze az Fab -ot az Fc régióval (Bianchini *et al.*, 2020).

Az IgG4 gyakran egy antigénnek való ismételt vagy hosszan tartó expozíció eredménye. Azonban közvetlen osztályváltás sem kizárható IgM -ről IgG4 -et expresszáló natív B -sejtekre (Bianchini *et al.*, 2020). Az IgG4 -ből található a legkevesebb a szérumban, vagyis a teljes IgG kb. 5% -a. Aalberse, Rispens és munkatársai (2009) az IgG4 -et furcsa antitestként írták le,

mivel egyedi biológiai tulajdonságai vannak, vagyis nem felel meg az antitestszerkezet hagyományos tulajdonságainak. Az IgG4 egyedi szerkezeti jellemzőket tartalmaz összehasonlítva más IgG alosztályokkal a csuklórégióban, a CH2 és CH3 doménekben, amelyekről úgy gondolják, hogy felelősek szerkezeti tulajdonságaiért, kötési jellemzőiért és csökkent effektor funkcióiért, amely az Fc régió és az effektor molekulák kölcsönhatásától függenek. Az IgG4 szerkezete más IgG -hez képest rövidebb csuklórégiót (12 aminosav) és alacsonyabb Fab -kar rugalmasságot mutat. Ez az antitest egyedülálló módon megy keresztül egy *in vivo* folyamaton, amelyet Fab -kar cserének neveznek (FAE), a folyamat során egy bispecifikus, funkcionálisan monovalens antitest jön létre (1.2. ábra B). Ez a tulajdonság hozzájárul az IgG4 gyulladásos tulajdonságaihoz és korlátozza az immunkomplexek képződését (Davies and Sutton, 2015).



1.2. ábra: A: IgG 4 magkapocs Pro228Ser szubsztitúció. B: A Fab -kar csere által létrejött bi -specifikus IgG4 (Davies and Sutton, 2015)

A Fab -kar cseréjének folyamata magába foglalja a két különböző antitestből származó IgG4 nehéz láncainak elválasztását, hogy félmolekulák alakuljanak ki, melyek tartalmaznak egy nehéz és egy könnyű láncot. Két meghatározó tényező teszi lehetővé az IgG4 számára, hogy átessen FAE-n, nevezetesen a magkapocs és a C γ 3-C γ 3 domén interfész, amely a két nehéz lánc közötti kovalens és nem kovalens kölcsönhatásokat egyaránt érinti. Az IgG4 magkapocsa ekvivalens cisztein oldalláncokat és Pro228Ser szubsztitúciót is tartalmaz (1.2. ábra A), ami elősegíti a rugalmasabb kapocsrégiót, ami inkább intra -nehézlánc közötti diszulfid kötések kialakulásához vezet, ellentétben más IgG -kel, ahol cisztein -prolin -prolin -cisztein motívumot tartalmaz. Emellett az IgG4 409. pozíciójában tartalmaz egy Lys409Arg

szubsztitúciót, ami gyengíti a Cy3-Cy3 domén kölcsönhatást, mivel gyenge, nem kovalens kötést okoz.

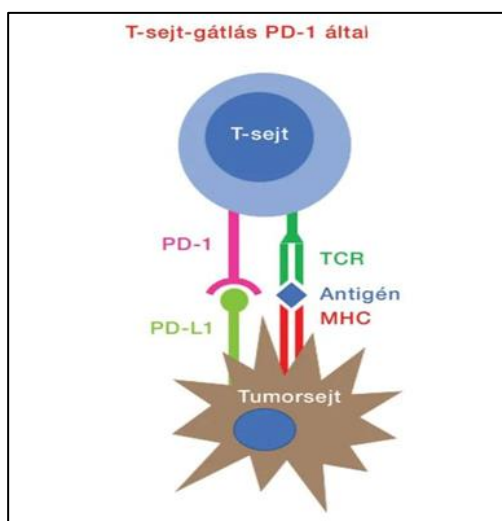
Az IgG4 egy potenciális terápiás monoklonális antitestként tartják számon, így például a Nivolumabot és a pembrolizumabot is. Azonban ennek a feltétele a FAE megakadályozása. Számos tanulmány megállapította, hogy ezt a folyamatot a redox folyamatok befolyásolják, vagyis megfelelő redox pufferek kiválasztásával ez *in vivo* és *in vitro* is befolyásolható. A magcsukló stabilizálása a FAE megelőzése érdekében egy tervezési szempont az IgG4 típusú mAb -ok esetében, mivel azok nem rendelkeznek Ser228Pro mutációval, amely megszüntethetné a FAE -t, azonban mind a Pembrolizumab, mint pedig a Nivolumab tartalmazza ezt a mutációt, így a magkapocs stabil marad (Davies and Sutton, 2015; Bianchini *et al.*, 2020).

1.3.2 A programozott sejthalál -1 útvonal (PD-1 útvonal)

Az immunrendszer feladata, hogy fenntartsa az egyensúlyt az ép szövetek és az idegen anyagok között, vagyis amíg a saját szöveteit védi, addig az idegen anyagokat támadja. Amikor ezt az egyensúlyt valami felbontja, autoimmun válasz alakul ki. Annak érdekében, hogy az ép szöveteket ne érje másodlagos károsodás, természetes gátló visszacsatolási folyamatok jönnek létre, amelyeket immunellenőrző pontoknak neveznek. Feladatuk, hogy az immunválasz lejárta után leállítsák a gyulladásos folyamatot. A kutatások arra is rávezettek, hogy az immunválaszok képesek a szervezet megváltozott saját sejtjeit is elpusztítani, vagyis a rákos sejteket is. Ennek érdekében olyan kutatások indultak, amelyek a daganatellenes terápiákat az immunellenőrzőpontok gátlására építik fel. Ennek a két fő képviselője a citotoxikus T -limfocita antigén 4 (CTLA -4) és a programozott sejthalál fehérje -1 (PD -1). Mind a két fehérje egy immunfék, amelyeknek feloldása révén felszabadítható az immunrendszer daganatsejteket megtámadó és elpusztító képessége.

A PD -1 ellenőrzési pontot T. Honjo és munkatársai (1992) fedezték fel, amely a B7/CD28 -család tagja és a T -sejtek életciklusának egy későbbi szakaszában, a perifériás szövetekben, a tumor környezetében gátolja az effektor T -sejteket. A PD -1 fehérjének két liganduma van a PD -L1 és PD -L2, amelyek gyakran kifejeződnek daganatos sejteken, illetve antigén prezentáló sejteken. A PD -1 és ligandumai I. típusú glikoproteinek, amelyek egy változó típusú immunoglobulin (IgV) extracelluláris doménjéből, egy transzmembrán régióból és egy citoplazmatikus farokból áll, amely dokkolóhelyként szolgál a jelátvitelhez. Normál esetben amikor az antigénprezentáló sejteken (APC) lévő B7-1/ CD80 molekula a T -sejt CD28 antigénhez kötődik a T -limfociták aktiválódnak, azonban, ha az APC a felületén lévő PD -L1

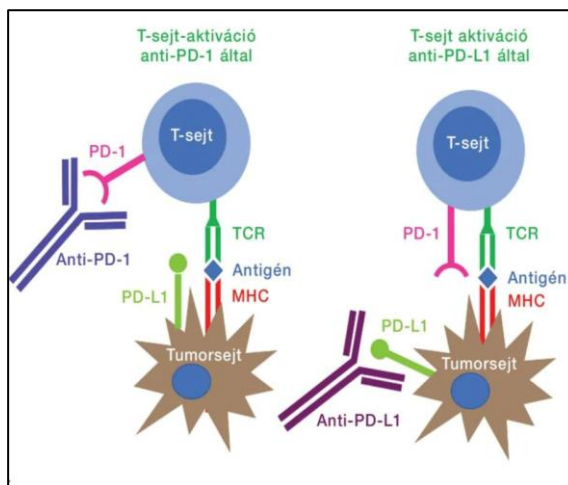
molekula a T -sejten lévő PD -1 receptorhoz kötődik negatív koinhibitor jel keletkezik, ezáltal a T -limfociták nem kativálódnak és a daganatellenes immunválaszok legyengülnek (1.3. ábra) (Tibor Bakács, Marcell Szász A. and Magdolna Dank, 2018; Kiss, 2019; Patsoukis *et al.*, 2020).



1.3. ábra: T-sejt gátlás a PD -1 által (Kiss, 2019)

A ligandumok közül a PD -L1 expressziója nagyon széles (melanóma, tüdő daganat, vese daganat), humán sejtekben ez a leginkább indukálható. A PD -1: PD -L1 útvonal fő szerepe a T -sejtek gátlása, azáltal, hogy a PD -1 ligandumai kötődnek a T -sejtekben lévő PD -1 receptorhoz az antigénprezentáló sejteken. Ezek a gátló kölcsönhatások nemcsak elnyomják a T -sejteket a másodlagos limfoid szövetekben az immunválasz indító fázisában, hanem modulálják az effektor T -sejtek válaszait is, akár a gyulladás helyére való migráció során, akár magában a célszövetben. A PD -1 -en keresztül történő jelzés jelentős hatással van a T -sejtek citokin termelésére, gátolva az IFN - γ , a tumor nekrosis faktor - α és az interleukin -2 termelését. A PD -1 gátolhatja a T -sejtek proliferációját is, valamint gátolja a Bcl -xL, egy antiapoptotikus fehérje expressziójának növelését. Végül a PD -1 jelátvitel csökkenti a GATA -3, a Tbet és az Eomes transzkripciós faktorok expresszióját, amelyek a T -sejt effektor funkciójához kapcsolódnak. A PD -1 jelzés a TCR jelzés által közvetített „stop jel” megfordításában is szerepet játszik. Ez azt jelenti, hogy PD -1 jelenlétében a T -sejtek tartózkodási ideje lerövidül az APC -kel való kölcsönhatásaikban, ami a T-sejtek aktivációjának csökkenéséhez vezethet, és elősegítheti a Treg -ek (regulátor T -sejt) indukcióját is. A PD -1 gátolhatja a B -sejt -receptorokon keresztüli jelátvitelt is (Riella *et al.*, 2012). A PD -1 és ligandumai tehát negatív visszacsatolási mechanizmusként szolgálnak az effektor T -sejtes válaszok csillapítására, így védve a saját szöveteit a károsodástól, illetve a tumorokat az immunrendszer támadásától. Ezt a jelenséget „adaptív immunrezisztenciának is nevezik” (LaFleur *et al.*, 2018).

Ahhoz, hogy a T -sejt -gátló szignálokat blokkolva fokozzák a T -sejt által vezetett immunválaszt immunellenőrzőpont gátlókat fejlesztettek ki. Ezek az immunellenőrzőpont gátlók rekombináns humán vagy humanizált monoklonális antitestek. A PD -1 vagy PD -L1 blokkolásával az immunrendszer effektor fázisát serkentjük, a kimerült T -limfociták visszakapcsolásával (1.4. ábra). A PD -1 útvonalat blokkoló mAb -ok a Nivolumab és a pembrolizumab. A Nivolumabot 2014 decemberében az Egyesült Államok Élelmiszer -és Gyógyszerügyi Hatósága (FDA), 2015 -ben pedig a Bristol-Myers Squibb Pharma EEIG engedélyezte, az Európai Unió egész területén, már hat szolid tumoros indikációban (adjuváns és metasztatikus melanoma, fej-nyak laphámsejtes karcinóma, nem kissejtes tüdőrák, vesesejtes karcinóma, uroteliális karcinóma) (Kiss, 2019). 2015 -ben engedélyeztették az első kombinált immunellenőrzőpont blokádot is, amely az anti -PD-1 (Nivolumab) kombinációját jelentette az anti -CTLA-4 -el (ipilimumab). Ezek a terápiák széles spektrumú aktivitást eredményeztek fej -nyaki daganatnál, Hodgkin -limfómánál és urotheliális daganatnál (Viktória Fésüs, 2017; LaFleur *et al.*, 2018).



1.4. ábra: T-sejt aktiválás anti-PD-1 illetve anti -PD -L1 használatával (Kiss, 2019)

A Nivolumab a PD -1 -hez kötődik egy N- terminális hurok segítségével, amely megakadályozza a ligandumaival való kapcsolódást. Ezt az antitestet transzgenikus egerekben állították elő, amelyek tartalmaztak humán immunoglobulin minilókuszt a nehéz láncnak, valamint humán immunoglobulin kappa lókuszt a könnyű láncnak. Mindezek mellett tartalmaztak olyan mutációkat is, amelyek megakadályozták az egerantitestek termelését. Ezeket az egereket rekombináns humán PD -1 Fc fehérjével immunizálták, amely a PD -1 extracelluláris doménjéből, a humán IgG1 Fc részéből és PD -1-et expresszáló kínai hörcsög petefészek (CHO) sejtekből állt. Az ebből létrejövő antitesteket a továbbiakban kínai hörcsög

petefészeksejtekben expresszálták standard emlős sejtenyészési technológiával (Wang *et al.*, 2014; Brahmer, Hammers and Lipson, 2015).

1.4 Az antitestek tisztítási módszerei

1.4.1 Kromatográfiás eljárások

A kromatográfiás eljárások alapja, hogy a komponensek egy álló- és egy mozgófázis között oszlanak meg. Az állófázis lehet szilárd anyag, vagy nagy viszkozitású, szilárd hordozóra felvitt folyadék, míg a mozgó fázis folyadék vagy gáz lehet. Az anyagátadás a két fázis között alapulhat ionos kölcsönhatáson, adszorpción, oldhatóságon vagy diffúzión. Az affinitás kromatográfia esetén ezek az anyagátadások specifikus kölcsönhatásokon alapulnak.

Annak érdekében, hogy a kromatográfiás eljárás sikeres legyen tudnunk kell, hogy milyen molekulát milyen komponensektől akarunk elválasztani, ezt követően pedig ki kell választanunk a módszert, amelynek alapján a tisztítást véghez vesszük. Attól függően, hogy mi alapján akarjuk szétválasztani a molekulákat sokféle módszer ismeretes. Így például a makromolekulák eltérő méretét kihasználva használhatjuk a géliszűrési kromatográfiát, ha a molekuláknak eltérő a töltésük van használhatjuk az ioncserélő kromatográfiát, ha pedig affinitás kromatográfiát használunk akkor valamilyen specifitás alapján, pl. antigén -antitest kölcsönhatást használhatunk fel az elválasztás céljából.

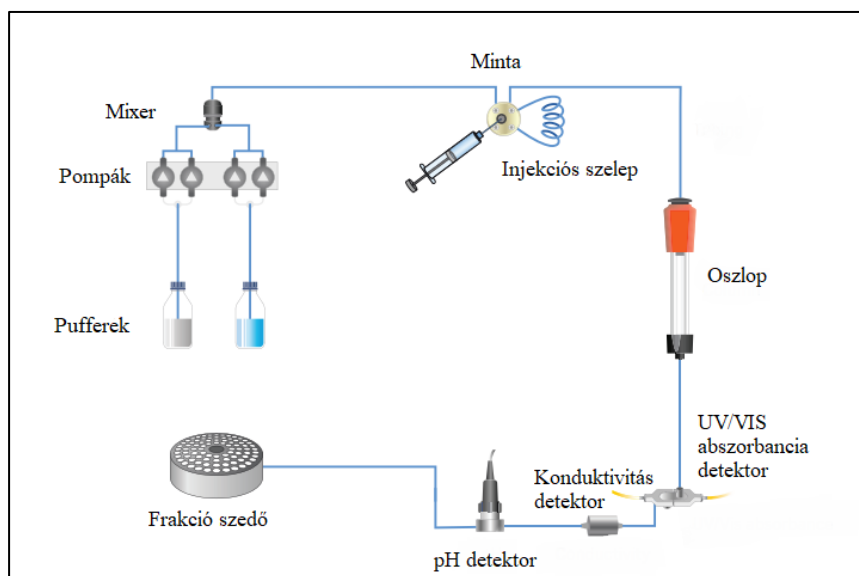
A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) egy olyan módszer, amely 3-10 μm szemcseméretű mátrixokkal dolgozik, amely során a mozgó fázis áramoltatása csak nagy nyomású, 10 MPa körüli, speciális precíziós pumpák alkalmazásával oldható meg. Az ehhez használatos oszlopok töltetei szilikagél alapúak, amelyek biztosítják, hogy azok ne legyenek összenyomhatóak, valamint megfelelő körülmények között kellően szilárd, meghatározott szemcseméretű és pórusméretű gélek készíthetőek belőle (Hegyi György, 2013).

1.4.2 Gyors folyadékkromatográfiás módszer (FPLC)

Annak érdekében, hogy a biopolimereket nagyobb hatékonysággal tudják elválasztani a Pharmacia LKB kifejlesztette a gyors fehérje -kromatográfiát (FPLC) 1982-ben (Madadlou, O'Sullivan and Sheehan, 2011; Hegyi György, 2013). Az FPLC abban különbözik az nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiától, hogy az oszlop töltetek dextrán alapú, vagy szintetikus polimer anyagból készülnek, amelyek nagy porózitással bírnak, valamint hidrofilek, ami miatt kiválóan alkalmazhatóak biopolimerek szeparálására. A kisebb nyomásállóság, valamint a nagyobb szemcseméret miatt 0,5-1 MPa nyomás folyadékáramlást lehet biztosítani, amely megfelelő a fehérjékkel kapcsolatos elvárásoknak. Az oszlopok emellett nyomásálló

boroszilikát üvegből készülnek, valamint a pumpába és a csőrendszerbe is kerülnek fém alkatrészek.

A rendszer jellemzően egy programvezérlőből, legfeljebb négy P -900 szivattyúból, egy M-925 -ös keverőből, egy előszűrőből, egy M-7 szelepből, egy töltőhurokból, egy oszlopból, egy UV 900 -monitorból, egy áramláskorlátozóból és egy frakciógyűjtőből áll. Mindezek mellett tartalmaz egy elválasztó egységet, valamint egy olyan számítógépet, amelyen az UNICORN™ szoftver fut az elválasztó egység vezérléséhez (1.5. ábra) (Madadlou, O’Sullivan és Sheehan, 2011).



1.5. ábra: Egy tipikus folyadékkromatográfias rendszer ábrázolása (Instrument management handbook, 2020)

A mintát az oszlopra háromféle módon vihetjük fel: egy előtöltött mintahurokból, közvetlen injekció által mintapompa segítségével, valamint közvetlen injekció által a rendszer pompáján keresztül. A csőhurkokat kevesebb mennyiségű mintákhoz használják, ami által a reprodukálhatóság magas lesz, mivel a minta felvitelének nem lesz hozzákötött szerepe az áramlási sebességhez. A Superloop -okat teljes mintavolumen oszlopra viteléhez vagy ismételt mintainjekcióhoz használják manuális beavatkozás nélkül. Egy minta -vagy rendszerpompát lehet használni abban az esetben, ha egy mintát közvetlenül az oszlopra szeretnénk juttatni. Ebben az esetben a rendszerben lehet használni egy légszenzort is, amely akkor ad jelet, amikor a tartály kiürül, ekkor a mintaszelep elfordul és megakadályozza a levegő oszlopba jutását.

Az UV/VIS abszorbanancia görbe a kromatogramon a tisztítási eredményt mutatja meg. Ez egy inline vagyis integrált eszköz a kromatográfias rendszerbe. A fehérjéket 280 nm -en mérjük mivel a triptofán, tirozin és a fenilalanin ezen a hullámhosszon abszorbeál erőteljesen. Az ÄKTA UV/VIS abszorbanancia érzékelők 2000 mAU -ig lineárisak, ezen túlmenően a jelek nem

arányosak a fehérje koncentrációjával. A rendszerben található egy beépített vezetőképesség mérő is, amely a sókoncentráció és más töltött molekulák jelenlétét lehet észlelni. Mindezek mellett a rendszerhez lehet csatlakoztatni egy pH elektródát is.

A frakciószedő biztosítja az eluensek különböző tartályokba való gyűjtését. Az eluáló csúcsokat általában több tartályba gyűjtik, annak érdekében, hogy tisztább fehérjét kapjanak.

A rendszer hosszútávú fenntartása érdekében elengedhetetlen a megfelelő karbantartás és tisztítás (1.1. táblázat). A só eltömítheti a szelepeket és a kapillárisokat, eltávolítására vizet vagy pufferoldatot használunk. Ha a rendszer folyamatos használat alatt van, akkor ajánlatos átmosni 0,5-1 M NaOH oldattal.

1.1. táblázat: A rendszer tisztítására alkalmas anyagok (Instrument management handbook, 2020)

Eltávolítani kívánt anyag	Tisztítószer
Puffer és só	upH ₂ O
Fehérje, zsír és sejt törmelék	0,5-1 M NaOH
Azok a részek, amelyek nem távolíthatók el NaOH segítségével	1-10 M ecetsav
Hidrofób részek, melyek nem távolíthatóak el ecetsav és NaOH segítségével sem	szerves oldószer, pl. izopropanol

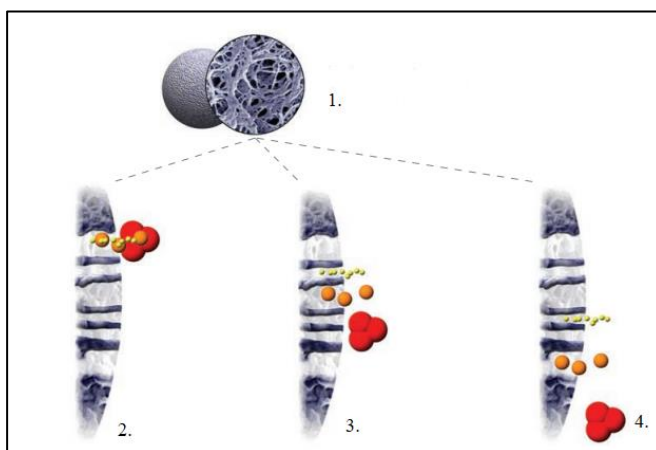
A rendszert 20% -os etanolban lehet tárolni, amely megvédi azt a lehetséges mikrobiális szennyeződésektől. A rendszerből az etanolt vízzel távolítjuk el (Instrument management handbook, 2020).

1.4.3 Géliszűrési kromatográfia

A géliszűrés vagy méretkizárásos kromatográfia kulcsszerepet játszik az enzimek, nukleinsavak, fehérjék és más biológiai makromolekulák tisztításában. Ez a módszer a molekulákat a méretbeli különbségeik alapján választja szét, ellentétben az ioncserés és az affinitás kromatográfiával, itt a molekulák nem kötődnek kromatográfiás közeghez. Jól alkalmazható olyan biomolekulák szétválasztásához, amelyek érzékenyek a pH- ra, fémionokra, koenzim koncentráció- vagy egyéb környezeti feltételek változására.

A géliszűréshez használatos közeg egy porózus mátrix, gömb alakú részecskék formájában, amely egy oszlopba vannak pakolva, hogy tömött közeget képezzenek. A gömb alakú részecskék kémiai és fizikailag stabilak, valamint inerte (hiányzik a reaktivitásuk és adszorbív tulajdonságaik). Ezt a tömött közeget először pufferrel hozzák egyensúlyba, hogy a

részecskék közötti teret és a mátrix pórusait kitöltse. A pórusok közötti folyadékot nevezik álló fázisnak, amely egyensúlyban van a mozgó fázissal, ez esetben a részecskéken kívüli folyadékkal. A méretkizárásos kromatográfia esetében az eluálás izokratikusan folyik, ami annyit jelent, hogy nincs szükség különböző pufferek használatára. A tisztítás végén azonban az oszlopot átöblítik egy úgynevezett futó pufferrel, amely megkönnyíti a visszatartott molekulák eltávolítását, valamint regenerálja az oszlopot.



1.6. ábra: Különböző méretű molekulák áthaladása a porózus gélen: 1. Az oszlopban levő gömb alakú részecske pórusai, 2. a minta felvitele az oszlopra, 3. A mozgófázis végig vándorol az oszlopon és a molekulák ki- és befundálnak a mátrix pórusaiból, a kisebb molekulák elidőznek a mátrix pórusaiban, 4. mivel a puffernek állandó áramlási sebessége van, a nagyobb molekulák nem tudnak befundálni a pórusokba és hamarabb vándorolnak végig az oszlopon (Handbooks from GE Healthcare, 2007).

A tisztítás során a molekulák mozgása két tényezőtől függ: mozgó fázis áramlási sebességétől, valamint a diffúziótól, amely során a molekulák méretüktől függően átjárják a gél szemcsék belsejét. Ahogy a nevéből is következtethető a méretkizárásos kromatográfias eljárás alapja, hogy egy adott mérettartománnyal rendelkező gél oszlop esetén míg egyes molekulák könnyedén beférnek a gél szemcsék belsejébe, mások számára az átjárhatatlan, így számukra csak a szemcsék közötti tér átjárható. Annak következtében, hogy ezek a molekulák a külső teret használják vándorlásuk során, így ők hamarabb érnek az oszlop aljára, míg a tőlük kisebb molekulák az álló fázisban időznek, vagyis az ők vándorlásuk több időbe fog telni (1.6. ábra).

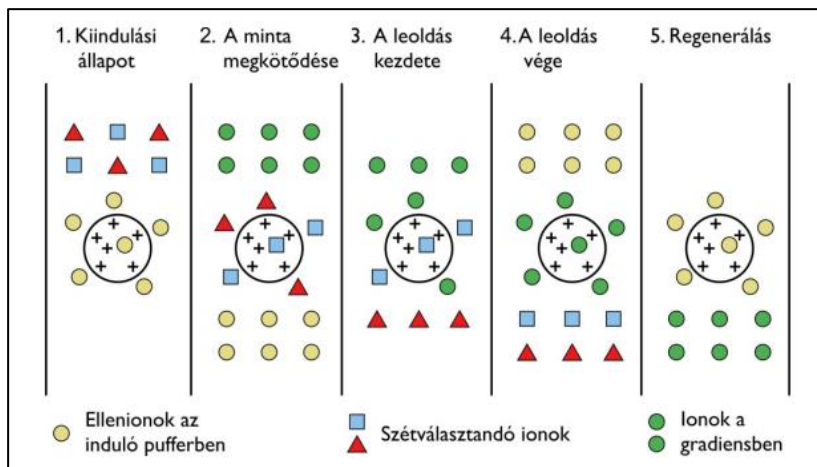
A térhálósított dextrán az elsőként kifejlesztett és még ma is használt gél anyag, amelyből készült különböző pórusméretű gyöngypolimerek Sephadex márkaneven ismertek.

A minta térfogatát úgy kell kiválasztani, hogy az oszlop térfogatának 1-5% -a legyen. Fehérjék sómentesítésénél a mintatérfogatot akár 15-20% -ra is növelhetjük (Handbooks from GE Healthcare, 2007; Hegyi György, 2013).

1.4.4 Ioncserés kromatográfia, CaptoQ, CaptoS

Annak érdekében, hogy a töltéssel rendelkező molekulákat egymástól elválasszuk a leghatékonyabb módszer az ioncserés kromatográfia. Az ehhez használt oszloptöltetek egy mátrix felszínéhez kovalensen kötött töltött csoportokat tartalmaznak. A módszer alapja az ellentétes töltésű rögzített ioncserélő csoportokra töltött oldott molekulák reverzibilis adszorpciója.

Az ioncserélő kromatográfias módszert általában öt fő lépésben hajtják végre (1.7. ábra). Az első lépés az oszlop egy pufferrel történő egyensúlyba hozása, amelynek lényege a kezdeti körülmények (pH, ionerő) létrehozása. Ebben a fázisban a töltött csoportokhoz könnyen kicserélhető egyszerű ionok kapcsolódnak, amelyek lehetnek például nátrium vagy kloridionok. A második lépés maga a minta felvitele és reverzibilis megkötése az oszlopon. Itt történik a fel nem kötődött komponensek lemosása az induló pufferrel. A harmadik és negyedik lépés maga a célmolekula eluálása, amelyet az eluáló puffer összetételének megváltoztatásával érnek el. A legegyszerűbb eluálási mód az ionerő, vagyis az ellenionok koncentrációjának növelése. A másik mód az eluáló puffer pH-jának megváltoztatása. Létezik egy harmadik mód, amely a leghatékonyabbnak bizonyult, ez az úgynevezett gradiens elúció, melynek során az ionerőt vagy a pH-t folyamatosan változtatják, így az oszlopról először a kisebb nettó töltésű molekulák válnak le (Handbooks from Amersham Biosciences, 1991; Hegyi György, 2013; Instrument management handbook, 2021).



1.7. ábra: Az ioncserélő kromatográfia lépései. Itt egy pozitív töltésű anion cserélő részecske látható, kiindulási állapotban ellenionokkal a felszínén. A második fázisban történik a szétválasztandó töltéssel rendelkező molekulák megkötése, az eluálás első fázisában (3.), a gyengébben kötődő molekulák szorulnak le, az eluálás végén, pedig az erősebben kötődő molekulák is leválnak (4.) (Hegyi György, 2013).

Az antitest tisztításban is használatos Capto S (Cytiva) egy erős kation, a Capto Q (Cytiva) pedig egy erős anion- cserélő kromatográfias oszlop, amelyek növelik a sebességet és a

kapacitást a tisztításban. Ezek a kromatográfiás oszlopok nagy áramlási sebességet és dinamikus kötőkapacitást kínálnak, amely által a folyamatidő csökken, a hozam pedig nő. A Capto S szulfonát ($-\text{SO}_3^-$) csoportot, míg a Capto Q kvaternér amin ($-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) csoportot használ. Mindkét oszlop esetében a mátrix agaróz alapú, amely alacsony visszanyomást biztosít magas áteresztőképesség mellett (Cytiva, 2020).

1.4.5 Affinitás kromatográfia, Protein A

Az affinitás kromatográfia a biomolekulák specifikus kölcsönhatásain alapul, amely során a szeparálandó biomolekula kölcsönható partnerét immobilizálják a kromatográfiás töltethez. Ez a rögzített ligandum megköti a mozgó fázisban lévő keresett biomolekulát, amely majd a mozgó fázis összetételének megváltoztatásával eluálható le. Az affinitás kromatográfia egy olyan kromatográfiás módszer, amely lehetővé teszi egy biomolekula szelektivitását az egyedi kémiai szerkezete és funkciója alapján. A minta és a ligand közötti kölcsönhatások lehetnek elektrosztatikus vagy hidrofób kölcsönhatások, illetve másodlagos kémiai kötések, van der Waals erők vagy hidrogén kötések. A célmolekulát a kromatográfiás oszlopról a kölcsönhatás megfordításával vagy a pH, ionerősség vagy polaritás változtatásával lehet eluálni. A ligand egy olyan bispecifikus molekula kell legyen, amelyet kovalensen lehet kapcsolni a kromatográfiás mátrixhoz, ez mellett a ligand és a molekula közötti kötésnek visszafordíthatónak kell lennie, ahhoz, hogy a biomolekulát aktív formában tudjuk eluálni az oszlopról.

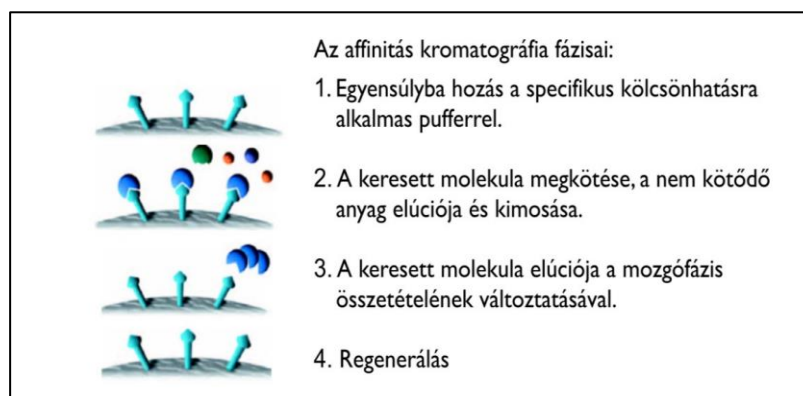
Nagy jelentősége van a rekombináns fehérjék tisztítása során, mivel a termeltetett rekombináns fehérjét gyakran látják el az N vagy C terminálisán egy fúziós „címkével” géntechnológiai módszerekkel, aminek segítségével a rekombináns fehérje affinitás kromatográfiával egyszerűen kinyerhető. Ilyen címke a láncvégekhez fuzionált oligo-hisztidin (His-tag), ami reverzibilisen kötődik fémkelátokhoz, például szilárd fázishoz rögzített Nickeláthoz, vagy a glutation S transzferáz (GST) fúziós fehérje, ami mátrixhoz rögzített glutation segítségével izolálható.

Affinitás kromatográfiában gyakran használt kölcsönhatások például az enzim -szubsztrát kölcsönhatás, az antigén -antitest kölcsönhatás, a hormon -receptor kölcsönhatás, illetve a fennebb említett fém kelát -His-tag vagy glutation -GTS fúziós fehérjék használata.

A HiTrap™ oszlopok jól alkalmazhatóak laboratóriumi léptékű alkalmazásokban. Ezeket az oszlopokat lehet működtetni fecskendővel, perisztaltikus pompával vagy bármely ÄKTA™ kromatográfiás rendszerrel (Handbooks from GE Helathcare, 2007).

Az affinitás kromatográfia folyamán 4 alapvető fázist kell (1.8. ábra), hogy követnünk a megfelelő tisztítás eléréséhez. Első sorban a kromatográfia elkezdése előtt elengedhetetlen a

megfelelő mintaelőkészítés. A folyamat során a mintának tiszta, szilárd részecskéktől mentes oldatnak kell lennie. Ez centrifugálással és/vagy szűréssel érhető el. Ezt követően ellenőrizni kell, hogy a minta oldékonyságát és stabilitását hogyan befolyásolja a kiinduló oldat pH -ja, a só koncentráció, esetleg szerves oldószer jelenléte. Ezután meg kell határozni a kötő puffer összetételét is.



1.8. ábra: Az affinitás kromatográfia fázisai. A mátrixhoz kötött specifikus ligandumhoz csak a „hozáillő” kötőhellyel rendelkező molekulák kötődnek, a többi molekula lemosható. A mozgó fázis összetételének megváltoztatásával a keresett molekulák tisztán izolálhatók (Handbooks from GE Healthcare, 2007)

A minta előkészítés után kezdetét veheti a kromatográfia első lépése, vagyis, hogy egyensúlyba hozzuk a specifikus kölcsönhatásra alkalmas pufferrel. A lépés folyamán az oszlopot mossuk, valamint a mintát dializáljuk a kiinduló kötő pufferrel. A második lépésben a keresett molekulát kell megkötni, valamint a nem kötő anyagokat lemosni. Ebben az lépésben a nagy affinitás esetén a minta felvitel áramlási sebessége nagy lehet, gyenge kölcsönhatás esetén, vagy ha az egyensúly kialakulása lassú folyamat, csökkentjük a mintafelvitel sebességét. A minta felvitel után a kötő pufferrel kell mosni tovább az oszlopot, amíg az összes nem kötődő komponens el nem távolítottuk. A következő lépés a keresett molekula eluálása a mozgófázis változtatásával. Az elúció egyik lehetséges módja, amikor a ligandum és a célfehérje közötti kölcsönhatás erősség csökken. A másik módszer a pH változtatás, melynek során változik a ligandum és a célfehérje töltött csoportjainak ionizációja, ezáltal változik meg a kölcsönhatás erőssége. A pH változás közvetlen változásokat okozhat a kötőhelyeken, melynek során az affinitás gyengül, vagy közvetetten is befolyásolhatja a változást, a konformáció megváltoztatása által. Ha az eluáláshoz alacsony pH-t kell alkalmazni, a frakciók elválasztása után ajánlott azokhoz pH semlegesítő puffert adni, amely lehet például egy 1 M Tris- HCl, pH=9 oldat, annak érdekében, hogy a frakció semleges pH-t kapjon. Az ionerősség növelése (rendszerint NaCl koncentráció emelésével) szintén csökkenti a kölcsönhatás erősségét. Kompetitív elúció során olyan anyagokat használunk, amelyek a ligandummal vagy

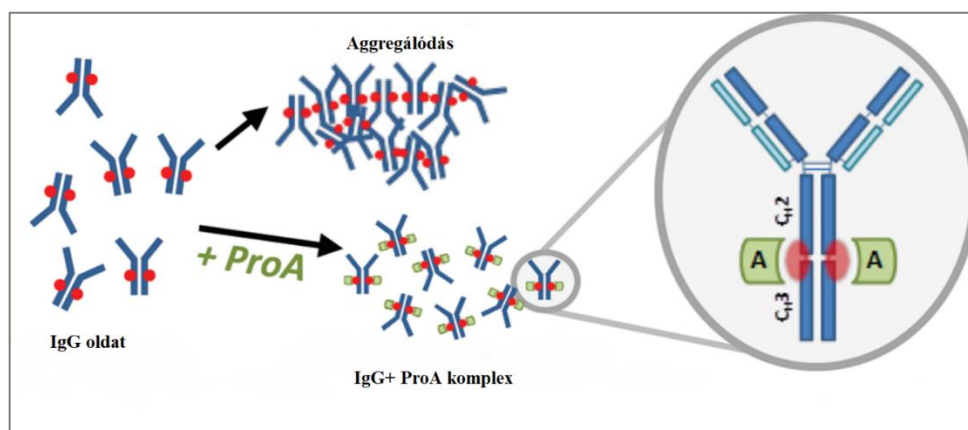
a célfehérjével reagálva, ezekkel vetélkedve a korábban kialakult kölcsönhatást megszüntetik. Az utolsó lépésben pedig a regenerálás történik, amikor az elúció befejezése után az oszlopot kiinduló kötő pufferrel mossuk, hogy később majd újra fel tudjuk használni.

Az antitestek és fragmentumaik tisztításának egyik előnye, hogy elegendő információ áll rendelkezésünkre a célmolekuláról, illetve a fő szennyező tulajdonságokról. Az IgG alosztályai számára a hatékony tisztítási módszer alapja a Protein A- hoz, illetve Protein G- hez való affinitás a poliklonális, illetve monoklonális antitestek Fc- régiójához (Handbooks from GE Healthcare, 2007).

Számos sejt és vírus felületén fehérjék találhatók, amelyek az immunglobulinok Fc- részéhez kötődnek. E kölcsönhatás miatt az ilyen fehérjéket Fc-receptoroknak nevezik. Baktériumokban ezeket az immunglobulin-kötő fehérjéket virulenciafaktoroknak tekintik, amelyek lehetővé teszik a kórokozók számára, hogy elkerüljék a gazdaszervezet immunválaszát. A legjobban tanulmányozott ebben a csoportban a *Staphylococcus aureus*-ból származó Protein A és a *Streptococcus*-ból származó Protein G, amelyek különböző forrásokból származó IgG- t kötnek, és annak konstans régióinak ugyanahhoz a részéhez kötődnek, ami az ilyen fehérjék konvergens evolúcióját jelzi. A Protein A -t és Protein G -t számos affinitási alkalmazásban ligandumként használják. Valószínűleg a protein- A- affinitás kromatográfia a leggyakoribb módszer az antitestek tisztítására. Ennek az az oka, hogy az A- proteinnek van néhány fontos erénye az affinitásligandumként való alkalmazáshoz: jól jellemzett, és nagy mennyiségben beszerezhető rekombináns baktériumokból (Huse, Böhme and Scholz, 2002).

Az antitestek is bomlási folyamatoknak vannak kitéve, amelyek károsítják a komplex szerkezetüket. Ezek közül a legsúlyosabb probléma az aggregáció, mivel az aggregátumok jelenléte megváltoztatja a hatékonyságot, valamint növelheti a veszélyes immunogén mellékhatások lehetőségét. Az aggregáció magában foglalja a fehérjemolekulák homotípusos társulását oligomerekhez valamint magasabb rendű aggregátumokhoz. Az aggregációra számos modell létezik azonban a két legfontosabb a fehérje kibomlás által irányított aggregáció és a fehérje- fehérje kölcsönhatások által szabályozott aggregáció. A fehérje kibomlás által irányított aggregációt a fehérje konformációjának a változása irányítja és ezt konformációs instabilitásnak nevezzük. A fehérje- fehérje kölcsönhatások által szabályozott aggregációt a molekulák közötti kapcsolatok irányítják, amelyek kolloidképződéshez vezetnek, ezt kolloidális instabilitásnak nevezzük. Ahhoz, hogy ezeket megakadályozzák segédanyagok hozzáadását használták, hogy megpróbálják megőrizni a natív konformációt és így javítani a konformációs stabilitást, vagy antitest-technológiát használtak az aggregációra hajlamos "forró pontok" módosítására és a kolloid stabilitás fokozására.

A fehérjék natív konformációját a ligandum- kötő kölcsönhatások stabilizálják és mind az A mind a Protein G egyaránt nagy affinitással kötődik az IgG-hez, ezért feltételezték, hogy mind az A, mind a Protein G javítja az IgG konformációs stabilitását és gátolja az aggregációját (1.9. ábra). Ezen felül az Protein A és Protein G nagy affinitással kötődik a CH2 és CH3 domének közötti határfelületek közelében lévő átfedő, de nem azonos régióhoz ezért feltételezték, hogy szintén javítják a kolloid stabilitást azáltal, hogy blokkolják ezt a helyet.



1.9. ábra: A protein- A hatása az immunoglobulinokra (Zhang and Topp, 2012a)

Kutatások azt bizonyítják, hogy az A fehérje szinte teljes mértékben gátolja az IgG aggregációját, míg a Protein G csak részleges védelmet nyújtott. Az eredmények azt sugallták, hogy az IgG aggregáció gátlás nem csak a ligandumkötés következtében javuló konformációs stabilitásnak köszönhető, hanem a fokozott kolloidális stabilitásnak is, amelyet az IgG egy aggregációra hajlamos helyének blokkolása biztosít (Zhang and Topp, 2012b, 2012a).

A Protein A széles pH-tartományban (pH 2–11) stabil, és karbamid- és guanidinium-sók denaturáló oldataival végzett kezelés után újra felhasználható. A Protein A szorbensek több ciklust tesznek lehetővé az antitestek megkötésére és eluálására, ami javítja működési hatékonyságukat. Továbbá, mivel az A fehérje négy kötőhelyet tartalmaz, amelyek közül kettő egyidejűleg képes kölcsönhatásba lépni az immunoglobulinok Fc részével, a Protein A hordozókhoz való kapcsolása egyszerű. Bármilyen legyen is a kapcsolási eljárás kémiai természete, a kapott Protein A konjugátum hatékonyan köti meg az antitesteket.

A Protein G nemcsak az antitestekhez, hanem az albuminhoz és az α 2-makroglobulinhoz is kötőhelyeket mutat, amelyek a Protein-G alapú affinitástisztítást követően szennyeznék az antitesteket. A Protein G azonban már elérhető genetikailag módosított formában, a további kötőhelyek eltávolításával.

A bakteriális Fc-receptorok antitestek tisztítására való alkalmazásának korlátozása az alacsony pH-n történő eluálás, ami megváltoztathatja az immunglobulinok konformációját. Ezért kísérleteket tettek a Protein A szerkezetének módosítására, hogy olyan affinitási ligandumokat kapjanak, amelyek enyhébb körülményeket tesznek lehetővé az elúcióhoz. Az egyik ilyen próbálkozás az úgynevezett Protein Z genetikai manipulálása, amely egy IgG-kötő domén származék, az A fehérje B doménje alapján. Az immunglobulinokhoz való affinitás csökkenthető, és az antitestek eluálhatók 4 feletti pH-értéken (Huse, Böhme and Scholz, 2002).

A Protein A fehérjét affinitási ligandként Sepharose- hoz kapcsolják. A rekombináns Protein A-t úgy alakították ki, hogy tartalmazzon egy ciszteint a C- terminális végén és ezzel egy pontos kapcsolódás érhető el a Sepharose- hoz, minek által a kötőképesség nő (Handbooks from GE Healthcare, 2007).

A HiTrap™ rProtein A FF, HiTrap Protein A HP és a HiTrap Protein G HP (Cytiva) olyan oszlopok, melyeket affinitás kromatográfiához terveztek, és különböző affinitás- mátrixokkal kombinálva gyors és egyszerű elválasztást biztosítanak. Az oszlopok 1, valamint 5 mL- s térfogatban kaphatóak, melyeket monoklonális és poliklonális antitestek tisztításához fejlesztettek ki. Az oszlopok affinitás alapja a Protein A, valamint Protein G kötődése az IgG család Fc régiójához.

A HiTrap oszlopok polipropilénből készültek melynek fő jellemzője, hogy biokompatibilis anyag, valamint, hogy nem lép kölcsönhatásba biomolekulákkal. A HiTrap Protein A HP és a HiTrap Protein G HP alaplátrixa Sepharose High Performance, melyhez a Protein A és G ligandokat N- hidroxiszukcinimid aktiválási módszerrel kapcsolják. Az agaróz alapon a szénhidrát hidrofíl tulajdonságával kémiai szempontból kedvező körülményeket biztosít, míg a 34 µm- es gömb alakú részecskék kiváló kromatográfiás tulajdonságot eredményeznek.

Mindhárom oszlop esetében az IgG- hez való kötő kapacitás függ az immunoglobulin forrásától, az áramlási sebességtől, valamint a minta koncentrációjától. Az oszlopok fő tulajdonságait a 1.2. táblázat tartalmazza.

1.2. táblázat: A HiTrap rProtein A FF, HiTrap Protein A HP és HiTrap G Protein G HP oszlopok főbb tulajdonságai ('HiTrap rProtein A FF HiTrap Protein A HP HiTrap Protein G HP, AFFINITY CHROMATOGRAPHY', 2020).

Tulajdonság	HiTrap rProtein A FF	HiTrap Protein A HP	HiTrap Protein G HP
Oszlop térfogat	1 mL és 5 mL		
Oszlop méret	0,7 x 2,5 cm (1 mL) 1,6 x 2,5 cm (5 mL)		
Ligand	Rekombináns Protein A (<i>E. coli</i>)	Protein A	Protein G
Kötő kapacitás	~35 mg humán IgG/mL gyanta	~ 20 mg humán IgG/mL gyanta	~ 25 mg humán IgG/mL gyanta
Szemcseméret	~ 90 µm	~ 34 µm	~ 34 µm
Mátrix	Keresztkötéses agaróz, 4%, gömbölyű	Keresztkötéses agaróz, gömbölyű	Keresztkötéses agaróz, gömbölyű
Javasolt áramlási sebesség	Az 1 mL térfogatú oszlopnak 1 mL/perc, az 5 mL térfogatú oszlopnak 5 mL/perc		
Maximális áramlási sebesség	Az 1 mL térfogatú oszlopnak 4 mL/perc, az 5 mL térfogatú oszlopnak 20 mL/perc		
Oszlop nyomáshatára	0,3 MPa (5 bar, 70 psi)		
pH stabilitás	3-10	2-10	2-9
Tárolás	2-8°C, 20% etanol		

1.5 A fehérjetisztítás fontossága

Az elmúlt évtizedek során a fehérjékkel kapcsolatos kutatások egyre kiemelkedőbb szerepet kapnak a biotechnológiai iparban. Ez alól a fehérjetisztítás sem jelent kivételt, hiszen nagymértékben befolyásolja a fehérjék későbbi felhasználását. A jó minőségű fehérjék jelentőséggel bírnak a további szerkezetkutatásban, valamint továbbfejlesztésében. Mivel a fehérjék összetett szerkezetű molekulák ezért könnyen befolyásolják a külső és belső tényezők (pl. hőmérséklet, pH), mindazonáltal a tisztításuk is kihívást jelent.

A fehérjetisztítás során fontos, hogy megőrizzék szerkezeti integritásukat, valamint biológiai funkciójukat. Mindezek elérése érdekében egy olyan tisztítási stratégiát kell kialakítani, ami által a legkevesebb lépéssel megfelelő tisztaság, koncentráció, aktivitás és hozam érhető el.

A tisztítás lényege, hogy megszabaduljunk a szennyeződésektől, amelyek lehetnek vírusok, prionok, más fehérjék, sejtenyészet stb., valamint különböző izoformák jelenlététől, amelyek poszttranszlációs módosulásokból származhatnak. Ezek a kontamináló dolgok nemcsak a további szerkezetkutatásokra lehetnek negatív hatással, hanem a későbbi

felhasználás során is veszélyt jelenthet a felhasználó szervezet számára (Labrou, 2014; Du *et al.*, 2022).

2 Eredeti hozzájárulás a témához

2.1 Kutatási célok

Az elmúlt évek során a monoklonális antitestek terápiás alkalmazása nagy figyelmet kap az orvostudományban használatos módszerek között. Ezeknek a terápiáknak köszönhetően a daganatos betegségben szenvedőknek hatékonyabb és kevésbé toxikus eljárásokat nyújtanak. Ebből az okból kifolyólag az antitestek előállítása, illetve azok vizsgálata fénykorát éli a modern biotechnológiai kutatásokban.

A Nivolumab antitestet 2014- ben az USA, majd 2015- ben az Európai Unió is engedélyeztette hat daganatos betegség (adjuváns és metasztatikus melanoma, fej-nyak laphámsejtes karcinóma, nem kissejtes tüdőrák, vesesejtes karcinóma, uroteliális karcinóma) terápiájaként (Kiss, 2019).

Az antitestek előállítása során nemcsak az upstream műveletek képeznek kiemelkedő fontosságot. A downstream műveletek elengedhetetlenek ahhoz, hogy az előállított antitestről megfelelő információhoz jussunk a további felhasználása érdekében. Ezek közé a műveletek közé tartozik a fehérjetisztítás, melynek célja az antitest elválasztása az őt termelő sejteknek tápanyagul szolgáló tápoldattól, illetve az egyéb kontamináló összetevőktől, amelyek a későbbiekben kihatással lehetnek, mint a szerkezetére, mint az aktivitására.

A TDK dolgozatom kutatási célja bioszimiláris Nivolumab monoklonális antitestek tisztítása FPLC- n. Az antitestek tisztítása HiTrap™ Protein A HP 1 mL- es kromatográfiás oszlopon történik, amelynek használata során optimalizáljuk a hígítási faktort, illetve az áramlási sebességet.

A tisztítást tápoldatból (későbbiekben felülúszó), valamint sejttöledékből (későbbiekben pellet) is végeztük, illetve összefüggést állítottunk fel a különböző passzázsszámú minták tisztításainak eredményei között. A kutatás során szintén mennyiségi és minőségi összefüggéseket kerestünk a szekretált, valamint a nem szekretált antitestek között.

A kutatás első fázisában először a kötőpuffert, valamint az eluáló puffert kell előkészítenünk, amelyek a jelen említett oszlopnál 20 mM-os nátrium-foszfát kötőpuffer és 100 mM-os citrát-NaOH mosópuffer. Az FPLC 0,300 MPa nyomáshatárral rendelkezik, ezért a térfogatáramot is szabályoznunk kell a tisztítás sikeressége érdekében. Ezen paraméterek mind hozzájárulnak a tisztítás sikerességéhez.

A felülúszó, illetve a pellet mintákat különböző passzázsszámokból választjuk ki. Négy minta tisztítását végezzük el, amelyek passzálási ideje jól elkülöníthető egymástól. A minták tisztítását ugyanazon optimalizált protokollal végezzük el. Az utolsó passzázsszámú minta esetében nem csak a tápoldatból tisztítunk antitesteket, hanem a leülepedett sejtekből is, amelyhez első sorban arra van szükségünk, hogy azokat a sejteket feltárjuk. Ezek után az felülúszóhoz hasonló tisztítási protokollal tisztítjuk a benne lévő antitesteket.

A felülúszóból és a pelletből kapott kromatogramokat összehasonlítjuk, megfigyeljük a passzázssok közötti összefüggéseket, eltéréseket.

Az antitest tisztítás sikerességének ellenőrzésére különböző módszereket alkalmazunk. A tisztítást követően Qubit 2.0 fluorométer segítségével meghatározzuk a kapott eluált antitestek koncentrációját, hogy meghatározzuk, különböző passzázssok között mekkora koncentráció eltérések vannak.

Ezt követően az antitesteket méretbeli validálásnak vessük alá. Ennek érdekében nátrium dodecil szulfát -poliakrilamid -gélelektroforézis (SDS- PAGE) módszert alkalmazunk, amelynek során az elválasztás kizárólag a molekula mérete szerint történik függetlenül annak natív töltésétől és alakjától. A vizsgálat alapján megkaphatjuk a biNivolumab antitest könnyű és nehéz láncának méretét, valamint, hogy sikerült-e megtisztítani megfelelően a kontamináló anyagoktól. A molekulaméretet MALDI - TOF - MS műszerrel is ellenőrizzük, amely során meghatározható lesz a teljes molekulaméret is.

2.2 A kutatás módszertana

2.2.1 Nivolumab tisztítása CHO sejt kultúrából HiTrap Protein A affinitás kromatográfiás oszlopon

A kutatás során használt rekombináns bioszimiláris Nivolumab monoklonális antitestet CHO expressziós rendszerben állították elő a Corax Bioneer munkatársai, a „Monoklonális antitestek előállítási technológia fejlesztése” projekten belül. A különböző passzázssokból származó tápoldat, illetve sejt mintákat 4 °C -on tárolták a tisztítási folyamatok kezdetéig. Az antitest tisztítást ÄKTA FPLC (GE Healthcare) készülékkel végeztük, HiTrap™ Protein A HP (Cytiva, LOT: 10334326) 1 mL -es affinitás kromatográfiás oszlopon.

A minták előkészítése

A kutatáshoz a Corax Bioneer korábbi kutatásaiból származó mintákat használtuk fel. A passzázsszámok kiválasztásánál az volt a cél, hogy időben megfelelően távol legyenek egymástól, így a 10, 12, 17, valamint 21 -es passzázsszámú felülúszó, illetve a 21 -es passzázsszámú pelletet mintákat választottuk ki.

A tápoldatot először átszűrtük egy 0,22 μm -es szűrőn, annak érdekében, hogy eltávolítsuk a nagyobb méretű szennyező anyagokat. A kutatás első fázisában meghatároztuk a minták hígítását annak érdekében, hogy megfelelő elúciós csúcsot érjünk el. A mintákat végül négyszeresen hígítottuk foszfát puffer (PBS) segítségével 12 mL végtérfogatban (3 mL mintához 9 mL PBS puffer hozzáadása).

A sejtekből származó minta tisztításához először fel kellett tárnunk a sejteket. Ehhez az első lépésben a sejteket 10 mL lízis pufferben (2,5 M NaCl, 0,1 M dinátrium EDTA, 0,01 M Tris base, 0,2 M NaOH, 0,03408 M N-lauroylsarcosin nátrium só) oldottuk fel, majd szonikáltuk a sejteket. A szonikálás (UP 200S Ultrasonic Processor, hielscher Ultrasound Technology) 3 ciklusba történt, melynek időtartama 5 perc volt, 75% amplitudón, 0,5 cikluson. A ciklusok között 5 perc pihentetési idő telt el. A szonikálást követően a mintákat 500 rpm -en 16 percig centrifugáltuk, a felülúszót 0,22 μm -es szűrő segítségével átszűrtük, majd négyszeresen hígítottuk PBS puffer segítségével 12 mL végtérfogatban.

Az antitest tisztítási folyamata

A tisztítás első lépéseként elő kellett készítenünk az ÄKTA FPLC (GE Healthcare, UNICORN 5.11. szoftver) rendszerét. A pompákat és a rendszert a fertőzések elkerülése érdekében 20% -os etil- alkohollal ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), majd ezt követően a semlegesítés érdekében ultrasteril vízzel (upH_2O) mostuk át. A rendszert manuális beállítással 15 mL térfogattal, 3 mL/perc áramlási térfogattal és 0,3 MPa nyomás alatt mostuk át. Az oszlop felhelyezés után azt átmosása 10 oszloptérfogatnyi (CV) 20% -os etil -alkohollal, valamint ultrasteril vízzel. Az oszlop átmosásakor az áramlási sebességet csökkentettük 0,75 mL/perc -re mivel, a 0,3 MPa nyomáshatárt ezen az áramlási sebességen tudta megtartani.

A tisztítás második lépése a kötő puffer, valamint az elúciós puffer elkészítése volt. Kötő pufferként 0,02 M -os foszfát puffert, $\text{pH}=7$ (2.1. táblázat), elúciós pufferként pedig 0,1 M -os citrát puffert, $\text{pH}= 3$ (2.1. táblázat), használtunk. Az elkészítéshez szükséges anyagokat analitikai mérleg (KERN AEJ 200-4CM) segítségével mértük ki. Az anyagok összemérése után mindkét puffer számára beállítottuk a megfelelő pH -t automata pH mérő (ORION) segítségével. Ezt követően a pufferekből a nemkívánatos anyagokat egy 47 mm -es membránszűrő (porafil CA LOT: CD300022) segítségével távolítottuk. A szűrés után a puffereket szonikáltuk (VWR Ultrasonic Cleaner USC- TH) 15 percet, szobahőmérsékleten (RT), annak érdekében, hogy az oldatokat kellően levegőmentesítsük.

2.1. táblázat: Tisztítás során használt pufferek elkészítése

Puffer neve	Szükséges anyagok	Mennyiség
1 L, 0,02 M foszfát puffer, pH= 7	$\text{HNa}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (VWR LOT: 21F224111)	2,056 g
	$\text{H}_2\text{NaPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (VWR LOT:21F164116)	0,650 g
1 L, 0,1 M citrát puffer, pH= 3	$\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_7$ (Alfa Aesar LOT: F12V010)	2,759 g
	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (Thermo Scientific LOT: 110450010)	17,410 g
100 mL, 1 M Tris - HCl, pH= 10	Tris - base (VWR LOT: 19J104114)	12,110 g

A tisztítás harmadik lépése volt a minta felvitele. A mintát először egy 10 mL -es loopba injektáltuk be majd ezt követően került az oszlopra. Az UNICORN™ szoftver segítségével egy tisztítási protokollt hoztunk létre, mely mind az öt tisztítás során ugyanaz volt (2.2. táblázat). A rendszer 2 mL kötő pufferrel egyenlítettük ki majd 10 mL mintát injektáltunk rá. Ezt követően az oszlopot 10 mL kötőpufferrel mostuk át, a nem kötő komponensek eltávolítása érdekében. A következő lépés az elúció volt, amikor B pumpa 100% -on működött és az oszlopot 5 mL elúciós pufferrel mostuk, a tisztított antitest eluálása érdekében. Az utolsó lépés az oszlop regenerálása volt 10 mL kötőpufferrel. A tisztítást 0,3 MPa nyomáshatár beállítása mellett 0,75 mL/perc áramlási sebességgel végeztük (2.2. táblázat). Az antitestek tisztítási folyamatát UV/VIS detektor (UV-900) segítségével követtük 280 nm -en.

2.2. táblázat: A tisztítás során használt program leírása

Áramlási sebesség (mL/perc)	0,75
Oszlop nyomáshatár (MPa)	0,300
Oszlop kiegyenlítése (mL)	2,00
Minta injektálása (mL)	10,00
Nem kötődő komponensek lemosása (mL)	10,00
B pompa működése (%B)	100,00
Elúció (mL)	5,00
Oszlop regenerálása (mL)	5,00

Az eluált frakciókat 1 mL térfogatban gyűjtöttük össze, amelynek pH -ját 1 M Tris- HCl, pH= 10 oldattal semlegesítettünk (2.1. táblázat). A mintához 1:5 arányban tettük hozzá a puffert.

A tisztított biNivolumab mAb koncentrációjának meghatározása Qubit 2.0 fluorométerrel

A tisztított biNivolumab antitest koncentrációját Qubit 2.0 fluorométer segítségével mértük le. Az első lépésben a munkaoldatot kellett előkészítenünk, amelyhez 1:200 arányban hígítottunk Qubit™ reagenst és Qubit™ puffert. Ezt követően 1 µL mintához 199 µL munkaoldatot adtunk, majd vortexeltük 2-3 percet és inkubáltuk szobahőmérsékleten 2 percig. Az inkubálás után a műszer segítségével mértük az antitest koncentrációját. Az eredmények feldolgozásához Excel táblázatkezelő felületet használtunk.

2.2.2 A tisztított bioszimiláris Nivolumab molekula méretének meghatározása

SDS - PAGE

A minták tisztítása után azok méret validálását nátrium dodecil szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS - PAGE) módszer segítségével végeztük el. Ez egy olyan gélelektroforetikus módszer, amely során az elválasztás csak a molekula mérete alapján zajlik.

Minden mintát 6x Laemmli pufferrel (6x LB) kezeltünk, melynek összetétele: 375 mM Tris.HCl, pH 6.8 9% SDS, 50% Glicerol, 0.03% Bromofenol kék (50 µL mintához 10 µL festéket tettünk), a denaturálás 98°C -on történt 5 percig és 10 µL mennyiségben vittük fel a gélre. A molekulaszúly létrát (Thermo Scientific Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder) 4 µL térfogatban használtuk.

A minták szétválasztása 15% -os futtató gélen történt (2.3. táblázat) Mini Protean elektroforézis kádban, PowerPac Basic tápegységgel (BIO - RAD). A gélen való futtatás 30 perc 90 V -on, majd 1 óra 120 V -on történt.

A gél előhívására Coomassie Brilliant Blue (0,2% Coomassie Blue, 7,5% ecetsav, 50% etanol) oldatot használtunk, amelyet rázattunk 30 percen keresztül, majd festéktelenítő oldatba helyeztük és ismét 30 percet rázattuk.

Az antitest nehéz, valamint könnyű láncának elméleti molekulaméretét ProtParam Tool - ExPASy¹ online program segítségével határoztuk meg, amelyhez a szükséges aminosav szekvenciát a KEGG DRUG² weboldal használatával kerestük meg.

¹ ProtParam Tool- ExPASy weboldal: <https://web.expasy.org/protparam/> letöltés dátuma: 2024.02.14

² KEGG DRUG Nivolumab aminosav szekvencia weboldal: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?D10316 letöltés dátuma: 2024.02.14

2.3. táblázat: 15% -os SDS - PAGE -hez használt futtató, valamint 6% -os koncentrálo gél összetétele

Összetevők	15% -os futtató gél	6% -os koncentrálo gél
40%-os biszakrilamid oldat (Thermo scientific LOT: Y09I500)	6 mL	1,5 mL
1,5 M Tris- HCl oldat, pH 8,8	4 mL	-
0,5 M Tris- HCl oldat, pH 6,8	-	2,5 mL
10% -os SDS oldat (Sigma Aldrich LOT:090M0108V)	160 µL	100 µL
Tetrametil -etilén -diamin (TEMED) (SIGMA LOT: BCB09391V)	16 µL	10 µL
10% ammónium -perszulfát (APS) (SIGMA LOT: 105K0700)	160 µL	100 µL
Ultrasteril víz	5,7 mL	5,8 mL

MALDI - TOF - MS

A következő lépésben MALDI - TOF Biotyper (BRUKER DALTONCS) segítségével is meghatároztuk a tisztított antitest molekulaméretét. A vizsgálat során α -ciano -4 - hidroxifahéjsavat (HCCA) használtunk mátrixként, a szolvens összetétele: 50% acetonitril, 47,5% upH₂O és 2,5% trifluorecetsav. 5 µL mintához 5 µL mátrixot adtunk hozzá, majd azt ráhelyezve a targetre vártuk, hogy az kristályosodjon. Ezt követően 98% -os lézer intenzitáson, 12000-157000 Da molekuláris tartományban, lineáris módban, 2698 V -on határoztuk meg a molekulatömeget.

2.3 Eredmények

Kutatásunk során biNivolumab antitestet tisztítottunk Protein A affinitás kromatográfiás módszerrel ÄKTA FPLC rendszeren. A tisztítást 280 nm hullámhosszon követtük, ezen kromatogramokat értékeltük. A tisztított antitest koncentrációját Qubit 2.0 műszer segítségével meghatároztuk meg. Az utolsó lépésben a méret validálást MALDI- TOF- MS és SDS- PAGE módszerekkel végeztük.

2.3.1 Antitest tisztítása affinitás kromatográfiás módszerrel

A tisztítás során négy, időben eltérő passzázból származó minták elúcióját hasonlítottuk össze. A tisztított mintákat 1 mL térfogatban szedtük le. Az első, nevezetesen a 10 -es

passzázsból származó mintában többszörös tisztítási kísérlet után sem találtunk antitestet. A másik három: 12, 17 és 21 -es passzázsokból származó mintákban viszont már megtörtént az antitest termelés, amelyeket az elúciós csúcsok igazolnak.

A 2.4. táblázat foglalja össze a tisztítás során kapott eluálási csúcsok magasságát, valamint azok területeit. A tápoldatból tisztított minták csúcsait összehasonlítottuk, majd százalékos növekedést számoltunk, viszonyítva a 12 -es mintához.

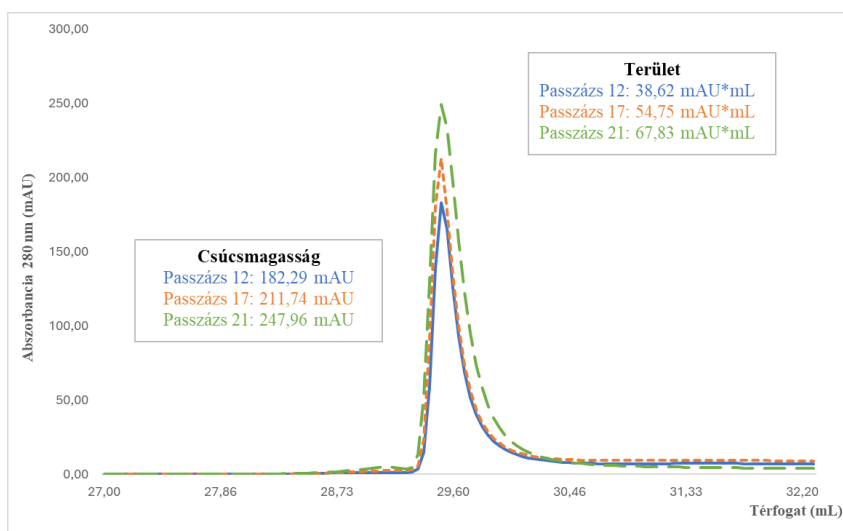
2.4. táblázat: Különböző passzázsszámú minták csúcs magassága, csúcs alatti területe, valamint a minták csúcs alatti területének százalékos növekedése, viszonyítva a 12 -es mintához

Minta	Csúcsmagasság (mAU)	Csúcs alatti terület (mAU*mL)	A csúcs alatti terület százalékos növekedés a 12 -es mintához viszonyítva (%)
12	182,29	38,62	-
17	211,74	54,75	+ 41,68
21	247,96	67,75	+ 75,63
21 pellet	139,69	37,97	-

A 12 -es passzázsból származó tisztított antitestet elúciós csúcsmagassága 182,29 mAU volt, a csúcs alatti terület pedig 38,62 mAU*mL volt (2.1. ábra).

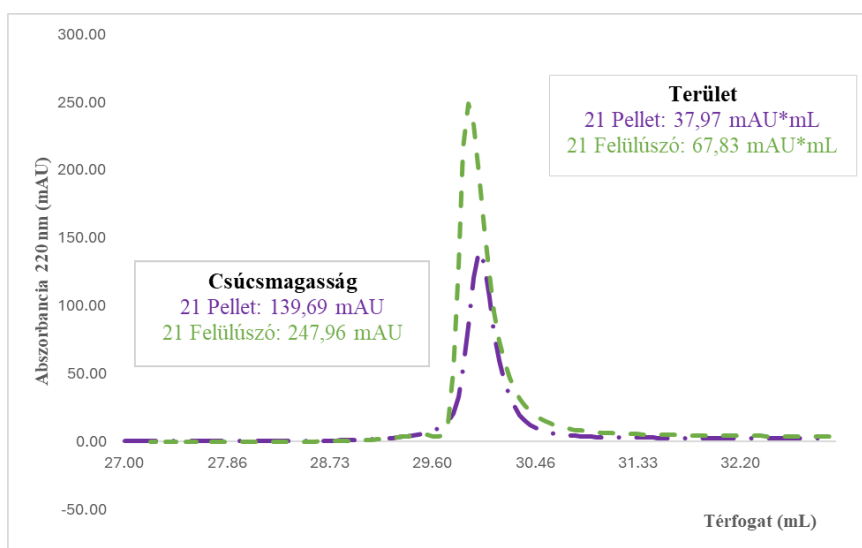
A 17 -es passzázsból származó tisztított antitest csúcsmagassága az előzőhöz képest 29,45 mAU -val lett a csúcsalatti terület pedig 41,68% -al (54,72 mAU*mL) növekedett (2.1. ábra).

Az utolsó 21 -es passzázsszámú tisztított antitestből származó elúciós csúcsmagassága az előzőhöz képest 36,22 mAU -val növekedett és a csúcsalatti területe pedig 23,89% -al lett nagyobb (67,83 mAU*mL) (2.1. ábra). A 21 -es minta elúciós területe a 12 -eshez képest 75,63% -al növekedett.



2.1. ábra: A 12-es (kék folytonos vonal), 17-es (narancs kisebb szaggatott vonal) és 21-es (zöld nagyobb szaggatott vonal) elúciós csúcsainak összehasonlítása

A 21-es minta feltárt sejtjeiből tisztított minta esetében lényegesen kisebb elúciós csúcsot kaptunk, mint annak tápoldatából tisztított mintából. Az elúciós csúcsmagasság 139,69 mAU volt és a csúcs alatti terület pedig 37,97 mAU*mL (2.2. ábra). Az eredmények alapján a sejtekből feltárt tisztított antitestek csúcs alatti területe 44,03% -kal kisebb, mint a tápoldatból tisztított antitesteké.



2.2. ábra: A 21-es passzázsszámú minta extra- és intracelluláris mAb tisztításának kromatogramjainak összehasonlítása

Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a passzázatok növekedésével az antitest termelés is egyenesen arányosan növekedik. A termelődött antitest koncentrációnövekedését későbbiekben a Qubit 2.0 fluorométerrel végzett koncentrációmérés is bizonyította.

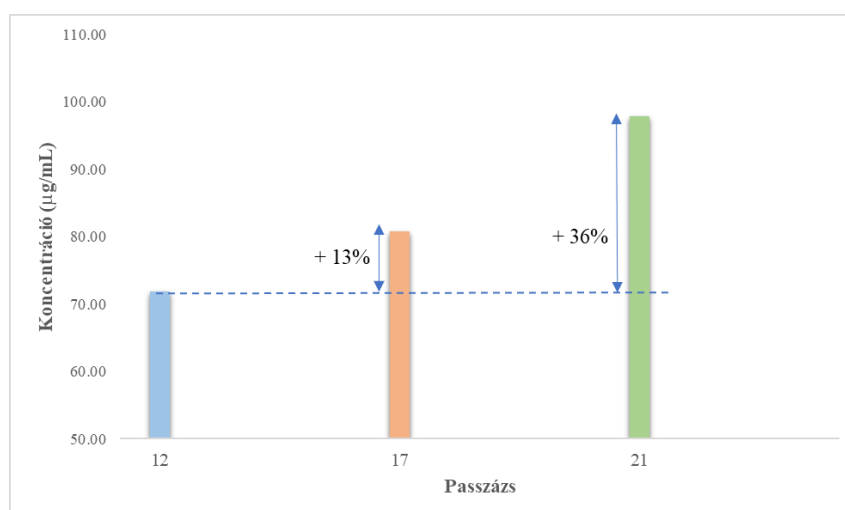
A bioszimiláris Nivolumab antitest koncentráció meghatározása

Az antitest tisztítása során meghatároztuk a csúcs alatti területet. A számított terület a koncentrációval volt arányos. Annak érdekében, hogy a tisztított antitest koncentrációt pontosabban meghatározzuk Qubit 2.0 fluorométert használtuk.

2.5. táblázat: A Qubit 2.0 fluorométer segítségével kapott koncentráció értékek, valamint azok százalékos növekedése

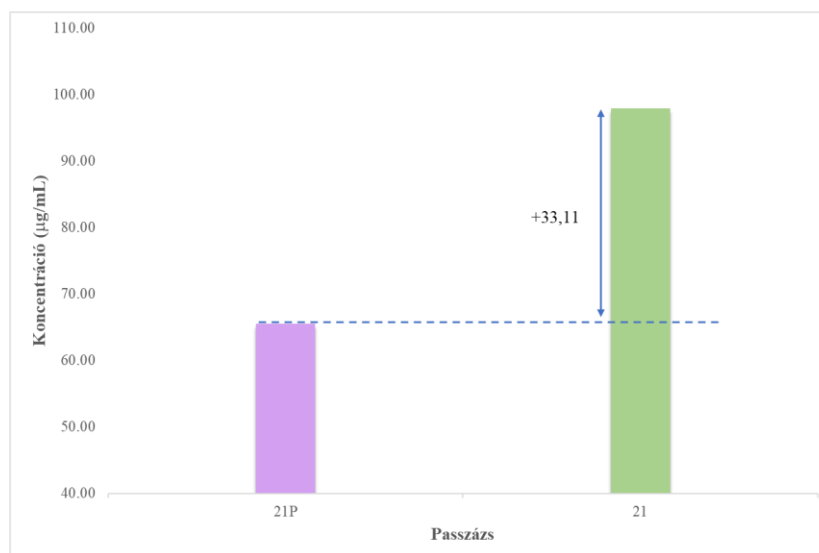
Minta	Koncentráció ($\mu\text{g/mL}$)	Százalékos növekedés a 12 -es mintához viszonyítva (%)
12	$71,80 \pm 0,52$	-
17	$80,80 \pm 0,40$	$+13 \pm 0,56$
21	$97,87 \pm 0,23$	$+36 \pm 0,32$
21 pellet	$65,47 \pm 0,83$	-

A 2.5. táblázat: A Qubit 2.0 fluorométer segítségével kapott koncentráció értékek, valamint azok százalékos növekedése szemlélteti az egyes minták mért koncentrációjának értékeit, valamint a termelődött antitestek százalékos növekedését. A 17 -es passzázsszámú tisztított minta esetében a koncentráció mértéke 13 % -kal nőtt az előzőhöz képest. Az utolsó passzázsból származó tisztított antitest koncentrációja a 12 -eshez képest 36% -al növekedett (2.3. ábra).



2.3. ábra: A biNivolumab koncentrációja a passzázssokban

A kapott eredmények igazolták, hogy ahogy növekszik a passzázsszám úgy növekszik a termelődött biNivolumab antitest koncentrációja is.



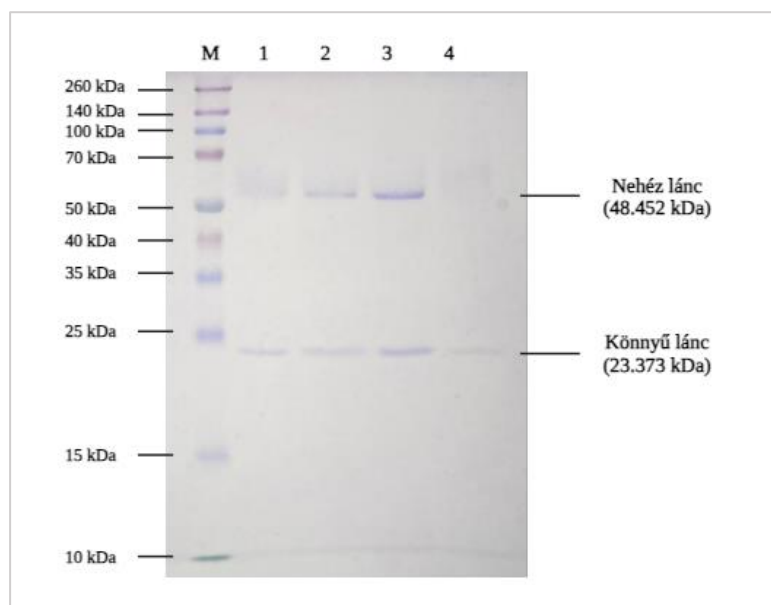
2.4. ábra: A 21-es passzázsszámú felülúszó és pelletminták mAB koncentrációja

A sejtekből (pellet) tisztított antitestek koncentrációja 65,47 µg/mL volt, amely 33,11% -al kevesebb mint a tápoldatból tisztított antitestek koncentrációja (2.4. ábra).

2.3.2 A tisztított bioszimiláris Nivolumab antitest méretének validálása SDS - PAGE

Az SDS - PAGE elvégzése során az antitest denaturálódik és különválik a nehéz, valamint könnyű láncra. A vizsgálat során megbizonyosodtunk arról, hogy a biNivolumab antitestet sikerült megtisztítanunk a kontamináló anyagoktól.

A géltre felvittük a különböző passzázssokból származó tisztított mintákat, amelyekhez előzetesen adtunk mintakezelő puffert, valamint hőkezeltük. A gélkép előhívása után azonosítottuk a könnyű, valamint nehéz láncokat. Mind a négy esetben megtörtént a denaturálódás és a láncok elkülönültek egymástól. A három felülúszóból tisztított minta esetében jól látható a 23,373 kDa -os könnyű lánc, valamint a 48,452 kDa -os nehéz lánc (2.5. ábra). A megjelenő sávok az antitest koncentrációjáról is információt adnak, mivel a sávok vastagsága egyenesen arányos a koncentráció mértékével. Ez esetben is igazolható a termelt antitest koncentráció növekedése.



2.5. ábra: A biNivolumab antitest SDS-PAGE gélképe M: molekulalétra (Thermo Scientific Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder), 1: 12 -es passzázs, 2: 17 -es passzázs, 3: 21 -es passzázs, 4: a 21 -es passzázsból feltárt sejtekből származó tisztított antitest

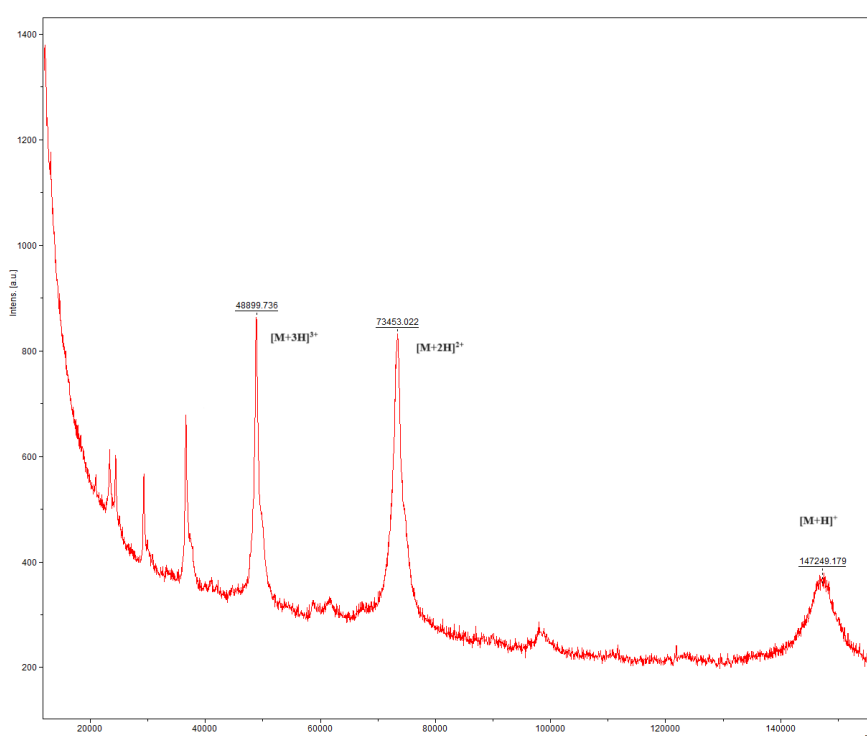
A feltárt sejtekből tisztított minta esetében is látható a nehéz, valamint a könnyű lánc jelenléte, viszont mivel a koncentráció kisebb, mint a felülúszók esetében ennek megfelelően a megjelenő sávok is halványabbak.

MALDI - TOF - MS

A méretének meghatározásához MALDI-TOF-MS mérést végeztünk. A mérés során HCCA mátrixot alkalmaztunk. Az ionizáció során három csúcsot figyelhettünk meg, a passzázsok szerinti tömeg/töltés (m/z) értékeit a 2.6. táblázat tartalmazza. Az első csúcs mind a négy minta esetében 48800 m/z érték fölött volt, amely a biNivolumab antitest háromszoros töltésének ($[M+3H]^{3+}$) felel meg. A második csúcs ± 73000 m/z értékű, amely az antitest kétszeres töltésének ($[M+2H]^{2+}$) felel meg. Végül a harmadik csúcs 147000 m/z érték feletti, amely a molekula egyszeres töltésének, a teljes molekula méretének felel meg (2.6 ábra). A standard deviáció értéke a 12, 17 és 21 -es passzázs számú minták esetében az 1. csúcsnál $\pm 19,25$ m/z , a második csúcsnál $\pm 59,94$ m/z , a harmadik csúcsnál pedig $\pm 29,35$ m/z .

2.6. táblázat: MALDI- TOF- MS műszer segítségével meghatározott m/z értékek a különböző passzázsszámú mintákban.

Minta	1. csúcs (m/z)	2. csúcs (m/z)	3. csúcs (m/z)
12 -es passzázs	48866,359	73349,883	147220,185
17 -es passzázs	48899,736	73453,022	147205,210
21 -es passzázs	48899,736	73453,022	147249,179
21 -es passzázs pellet	48904,311	73384,917	147692,284
Referencia Nivo	48895,533	73191,214	146882,974



2.6 ábra: A 21. passzázsból tisztított mAb MALDI- TOF- MS tömegspektrogramja

A kapott molekulaméretetek alapján igazoltuk, hogy tisztítás során a biNivolumab antitestet tisztítottuk meg.

3 Következtetések

Kutatásunk során bioszimiláris Nivolumab monoklonális antitest tisztítását végeztük HiTrap™ Protein A affinitás kromatográfiás módszerrel ÄKTA FPLC rendszer segítségével. A Nivolumab antitestet CHO expressziós rendszerben volt termeltetve, a tisztításhoz pedig négy időben elkülönülő passzázsszámú minta tápoldatát használtuk fel és az utolsó mintának pedig feltárást követően a sejtekből is tisztítottunk antitestet.

A tisztítás során a minták elúciós csúcsát hasonlítottuk össze. A 10 -es passzázsszámú mintában nem találtunk antitestet. A másik három mintából tisztított antitestek csúcsainak területeit összehasonlítottuk diagramok segítségével. A kapott eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a passzázsszámok növekedésével az antitest termelődés is növekedik. Ezt Az állítást a Qubit 2.0 fluorométerrel mért antitest koncentrációk támasztották alá. A mérés során a 12. passzázsszámú mintában a biNivolumab antitest koncentrációja 71,80 µg/mL volt, ehhez képest a 17 -esé 13% -kal, a 21 -esé pedig 36% -kal növekedett.

A sejtekből feltárt tisztított biNivolumab csúcs alatti területe 55,97% -kal lett kisebb, mint a tápoldatból tisztított antitestek elúciós területe. Ezek szerint extracellulárisan is termelődött antitest, viszont fele annyi, mint intracellulárisan. A koncentráció meghatározása is alátámasztja ezt az állítást, hiszen a sejtekből feltárt tisztított minta esetében a tisztított antitest koncentrációja 65,47 µg/mL volt, amely 66,89% -al kevesebb mint a tápoldatból tisztított antitestek koncentrációja.

A kutatás további részében a tisztított Nivolumab mAb méretének validálása történt, melynek során megbizonyosodtunk arról, hogy az említett antitestet sikerült megtisztítani, valamint, hogy megszabadultunk -e a kontamináló anyagoktól.

Első sorban SDS - PAGE módszert alkalmaztunk, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy az antitestet tisztán eluáltuk. Mind a négy esetben megtörtént a denaturálódás és a láncok elkülönültek egymástól. A három felülúszóból tisztított minta esetében jól látható a 23,373 kDa- os könnyű lánc, valamint a 48,452 kDa- os nehéz lánc. A megjelenő sávok az antitest koncentrációjáról is információt adnak, mivel a sávok vastagsága egyenesen arányos a koncentráció mértékével. Ez esetben is igazolható a termelt antitest koncentráció növekedése.

A pellet esetében mivel kisebb a koncentráció jelentősen halványabbak a megjelenő sávok, viszont itt is elkülöníthető a nehéz, valamint a könnyű lánc.

Az utolsó vizsgálat során MALDI - TOF - MS műszert használtunk az antitest méretének meghatározásához. Az első csúcs 48904,311 m/z értékű, amely a Nivolumab antitest nehéz láncának (HC), 48,904 kDa- nak felel meg. A második csúcs 73384,917 m/z értékű, amely az antitest egy nehéz és egy könnyű láncának, 73,384 kDa- nak felel meg. Végül a harmadik csúcs az egész antitest molekulaméretének felel meg, amely 147,69 kDa méretű. A kapott molekulaméreteket alapján igazoltuk, hogy tisztítás során a Nivolumab antitestet tisztítottuk meg.

Összegezve kijelenthetjük, hogy a Nivolumab antitest tisztítása HiTrap™ Protein A HP affinitás kromatográfiás oszlopon sikeres volt. Az eredményekből kiderült, hogy a passzázsszám növelésével az antitest termelődés is növekedett.

Jövőbeli terveink közé tartozik, hogy az antitestet töltése alapján való elválasztásának vizsgálata Nativ - PAGE módszer segítségével, valamint HPLC készüléken vizsgálni az antitest aggregációját.

4 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni a Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem Biomérnöki Tanszékének, valamint a Corax Bioneer csapatának a laborban biztosított helyért, műszerekért, felhasznált eszközökért, valamint a segítségért, amely hozzájárul a kutatásom kivitelezéséhez és a dolgozatom elkészítéséhez.

5 Irodalomjegyzék

Bayer, V. (2019) ‘An Overview of Monoclonal Antibodies’, *Seminars in Oncology Nursing*, 35(5). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.08.006>.

Bhatia, S. (2018) ‘History, scope and development of biotechnology’, in *Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Volume 1*. IOP Publishing, pp. 1–61. Available at: <https://doi.org/10.1088/978-0-7503-1299-8ch1>.

Bianchini, R. *et al.* (2020) ‘The role of IgG4 in the fine tuning of tolerance in ige-mediated allergy and cancer’, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21145017>.

Brahmer, J.R., Hammers, H. and Lipson, E.J. (2015) ‘Nivolumab: Targeting PD-1 to bolster antitumor immunity’, *Future Oncology*, 11(9), pp. 1307–1326. Available at: <https://doi.org/10.2217/fon.15.52>.

Cytiva (2020) ‘Capto S Capto Q Capto DEAE - Ion exchange resins’, *Cytiva* [Preprint]. Available at: <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-14017-original> (Accessed: 11 February 2024).

Davies, A.M. and Sutton, B.J. (2015) ‘Human IgG4: A structural perspective’, *Immunological Reviews*, 268(1), pp. 139–159. Available at: <https://doi.org/10.1111/imr.12349>.

Denizli, A. (2011) ‘Purification of Antibodies by Affinity Chromatography’, *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 39(1), pp. 1–18.

Du, M. *et al.* (2022) ‘Progress, applications, challenges and prospects of protein purification technology’, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Frontiers Media S.A. Available at: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1028691>.

Handbooks from Amersham Biosciences (1991) *Ion exchange chromatography: principles and methods*. Pharmacia LKB Biotechnology.

Handbooks from GE Healthcare (2007) *Gel filtration Principles and Methods*. GE Healthcare Bio-Science AB. Available at: <http://josephgroup.ucsd.edu/Protocols/AKTA/Gel%20Filtration.pdf> (Accessed: 12 February 2024).

Handbooks from GE Helathcare (2007) *Affinity Chromatography Principles and Methods*. GE Heltcare. Available at: https://b3p.it.helsinki.fi/download/GE_Protein_Purification_Handbooks/Affinity_Chromatography_Handbook.pdf (Accessed: 12 February 2024).

Hegyi György (2013) ‘Kromatográfás módszerek’, in Hegyi György *et al.* (eds) *Bevezetés a biokémiába gyakorlati jegyzet*. ELTE TTK, pp. 64–79. Available at: <http://www.renderx.com/>.

Cytiva (2020) ‘HiTrap rProtein A FF HiTrap Protein A HP HiTrap Protein G HP- Affinity chromatography’, *Cytiva* [Preprint]. Available at: <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-13703-pdf> (Accessed: 9 March 2024).

Huse, K., Böhme, H.J. and Scholz, G.H. (2002) ‘Purification of antibodies by affinity chromatography’, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 51(3), pp. 217–231. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(02\)00017-9](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(02)00017-9).

Instrument managemaint handbook (2021) *Ion exchange chromatography- Principles and methods*. Cytiva. Available at: https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-13101-pdf?_gl=1*4jw3zo*_gcl_au*MTg3MTUzOTI2OC4xNzA3NzM4OTgx (Accessed: 12 February 2024).

Instrument management handbook (2020) *ÄKTA Laboratory-scale Chromatography Systems*. Cytiva. Available at: <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-16189-pdf> (Accessed: 12 February 2024).

Kiss, E. (2019) 'Immunológia újabb lehetőségei az onkológiai terápiában', *Central European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 5(2), pp. 68–73. Available at: <https://doi.org/10.33570/ceujgh.5.2.68>.

Labrou, N.E. (2014) 'Protein purification: An overview', *Methods in Molecular Biology*, 1129, pp. 3–10. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-977-2_1.

LaFleur, M.W. *et al.* (2018) 'Inhibitors of the PD-1 Pathway in Tumor Therapy', *The Journal of Immunology*, 200(2), pp. 375–383. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701044>.

Madadlou, A., O'Sullivan, S. and Sheehan, D. (2011) 'Fast Protein Liquid Chromatography', *Methods in Molecular Biology*, 681, pp. 439–447. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_25.

Patsoukis, N. *et al.* (2020) 'Revisiting the PD-1 pathway', *Science Advances*, 6(38), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd2712>.

Riella, L. V. *et al.* (2012) 'Role of the PD-1 Pathway in the Immune Response', *American Journal of Transplantation*, 12(10), pp. 2575–2587. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1600-6143.2012.04224.X>.

Tibor Bakács, Marcell Szász A. and Magdolna Dank (2018) 'Az immunellenőrző pontok gátlása alacsony dózisban és hatékony lehetőség az előrehaladott áttétes daganatok kezelésében', *Nőgyógyászati Onkológia*, 23, pp. 16–24.

Viktória Fésüs (2017) 'Az immunológia újdonságai a szolid tumorok és a hematológiai daganatok kezelésében - az immunellenőrzőpont gátlók', *Magyar Onkológia*, 61, pp. 116–125.

Wang, C. *et al.* (2014) 'In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates', *Cancer immunology research*, 2(9), pp. 846–856. Available at: <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0040>.

Zahavi, D. and Weiner, L. (2020) 'Monoclonal antibodies in cancer therapy', *Antibodies*, 9(3), pp. 1–20. Available at: <https://doi.org/10.3390/antib9030034>.

Zhang, J. and Topp, E.M. (2012a) 'Protein G, protein A and protein A-derived peptides inhibit the agitation induced aggregation of IgG', *Molecular Pharmaceutics*, 9(3), pp. 622–628. Available at: <https://doi.org/10.1021/mp200548x>.

Zhang, J. and Topp, E.M. (2012b) 'Protein G, protein A and protein A-derived peptides inhibit the agitation induced aggregation of IgG', *Molecular Pharmaceutics*, 9(3), pp. 622–628. Available at: <https://doi.org/10.1021/mp200548x>.