

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésmérnöki és Biomérnöki Kar

Pharmatech Modell Laboratórium

**Ioncserés kromatográfiás oszlopok minősítése és adalimumab
fehérje tisztításának optimalizálása**

TDK dolgozat

Készítette

Márkus Eszter

Vegyésmérnök BSc hallgató

Témavezető

Dr. Hirsch Edit

tudományos munkatárs (SzKTT)

Konzulens

Vaskó Dorottya

PhD hallgató (SzKTT)

Madarász-Kádár Szabina

tudományos segédmunkatárs (SzKTT)

2024

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés	6
2. Szakirodalmi áttekintés.....	7
2.1. Monoklonális antitestek és jelentőségük	7
2.1.1. Az antitestek általános szerkezete és tenyésztése.....	7
2.1.2. Adalimumab	9
2.2. Monoklonális antitestek előállítása és feldolgozása.....	10
2.2.1. Upstream	10
2.3. Monoklonális antitestek downstream folyamatai	11
2.3.1. Sejtek és sejtörmelékek elválasztása	12
2.3.2. Affinitás kromatográfia	13
2.3.3. Ioncserés kromatográfia	14
2.3.3.1. Kationcserés kromatográfia	14
2.3.3.2. Anioncserés kromatográfia.....	15
2.3.4. FPLC rendszer	17
2.3.5. Vírus inaktiválás, vírusszűrés	18
2.3.6. Ultraszűrés, diaszűrés	19
2.4. Downstream folyamat kihívásai	20
2.5. Downstream folyamatok tisztítás hatékonyságának ellenőrzésére szolgáló analitikai módszerek.....	21
2.5.1. HPLC méretkizárásos kromatográfia	21
2.5.2. Dinamikus fényszórás	22
2.5.3. dsDNS szennyező azonosítása	24
3. Céltkítűzés	25
4. Anyagok és módszerek.....	26

4.1. ÄKTA™ pure rendszer.....	26
4.2. Kationcserés kromatográfiás tisztítás	26
4.2.1. Felhasznált oldatok.....	27
4.2.2. Kationcserés kromatográfiás oszlop töltése	27
4.2.3. Protokoll a töltött oszlopra	27
4.3. Anioncserés kromatográfiás tisztítás	28
4.3.1. Felhasznált oldatok.....	28
4.3.2. Anioncserés kromatográfiás oszlop.....	28
4.3.3. Protokoll az anioncserés kromatográfiás oszlophoz.....	29
4.4. HPLC méretkizárásos kromatográfiás tisztítás	30
4.5. dsDNS szennyező mérés	30
4.6. Dinamikus fényszórás mérés	31
5. Eredmények.....	32
5.1. Előkísérletek.....	32
5.1.1. A minta pH-jának optimalizálása	33
5.1.2. Az elúció paramétereinek optimalizálása.....	34
5.2. Sógradiens elúció.....	36
5.3. Fehérjekoncentráció és aggregáció meghatározása SEC mérésekkel	38
5.4. dsDNS szennyező mérése.....	42
5.5. DLS mérés	47
6. Összefoglalás.....	52
Köszönetnyilvánítás	54
Irodalomjegyzék.....	55
Függelék.....	61

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Rövidítés	Angol	Magyar
mAb	<i>monoclonal antibody</i>	monoklonális antitest
Ig	<i>immunoglobulin</i>	immunglobulin
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>	Az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>	kristályosítható fragmens
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>	antigént kötő fragmens
TNFα	<i>tumor necrosis factor alfa</i>	tumor nekrosis faktor alfa
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>	kínai hörcsög petefészek
HCP	<i>host cell proteins</i>	gazdasejt fehérjék
CEX	<i>cation exchange chromatography</i>	kationcserés kromatográfia
AEX	<i>anion exchange chromatography</i>	anioncserés kromatográfia
Tris	<i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>	trisz-(hidroximetil)-amino-metán
pI	<i>isoelectric point</i>	izoelektromos pont
UF	<i>ultrafiltration</i>	ultraszűrés
DF	<i>diafiltration</i>	diaszűrés
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>	gyors fehérje folyadékkromatográfia
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>	nagyteljesítményű folyadékkromatográfia
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>	méretkizárásos kromatográfia
t_R	<i>retention time</i>	retenciós idő
t₀	<i>dead time</i>	holtidő
DLS	<i>dynamic light scattering</i>	dinamikus fényszórás
SLS	<i>static light scattering</i>	statikus fényszórás
D	<i>translational diffusion coefficient</i>	transzlációs diffúziós koefficiens

D_H	<i>hydrodynamic diameter</i>	hidrodinamikai átmérő
WHO	<i>World Health Organization</i>	Egészségügyi Világszervezet
dsDNS	<i>double-stranded DNA</i>	kettősszálú DNS
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>	kvantitatív polimeráz-láncreakció
CV	<i>column volume</i>	kolonna térfogat
CIP	<i>cleaning in place</i>	helyben történő tisztítás
UP	<i>ultrapure</i>	ultratiszta

1. BEVEZETÉS

A gyógyszeripar napjaink egyik legdinamikusabban fejlődő ágazata, amelyben kiemelkedő szerepet töltenek be a biotechnológiai eredetű gyógyszerek. A biotechnológiai gyógyszereken belül a monoklonális antitestek a leggyorsabban növekvő csoport, mivel számos gyulladásos és daganatos betegség kezelésében hatékony terápiás lehetőséget kínálnak. Kiemelkedő példa erre az adalimumab (Humira®), amely éveken át vezette a globális gyógyszereladási listákat.

A monoklonális antitestek előállítása rekombináns technológiával történik, amely során emlőssejtvonalakat alkalmaznak, mint például a kínai hörcsög petefészek sejtvonalát. Az antitesteket a sejtenyésztési folyamat végén kell elválasztani a sejtektől és a termelt melléktermékektől. A tisztítás folyamata több lépéses, költséges kromatográfiás eljárást foglal magában, amely biztosítja a készítmény gyógyszer minőségű tisztaságát.

Az elmúlt évtizedek technológiai fejlődése lehetővé tette a fermentációs folyamatok produktivitásának jelentős növekedését, amely ugyan javította a termelési hatékonyságot, de egyúttal új kihívásokat is hozott a tisztítási technológiák számára. Ez különösen fontos a monoklonális antitestek esetében, mivel ezek a fehérjék érzékenyek a gyártási és tisztítási körülményekre, és bármilyen szennyeződés vagy aggregáció súlyosan befolyásolhatja hatásukat és biztonságukat.

Kutatásom a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Gyógyszertechnológiai Laboratóriumában zajlott, ahol kínai hörcsög petefészek sejtvonal segítségével előállított monoklonális antitest anioncserés kromatográfiás módszerfejlesztését valósítottam meg.

2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

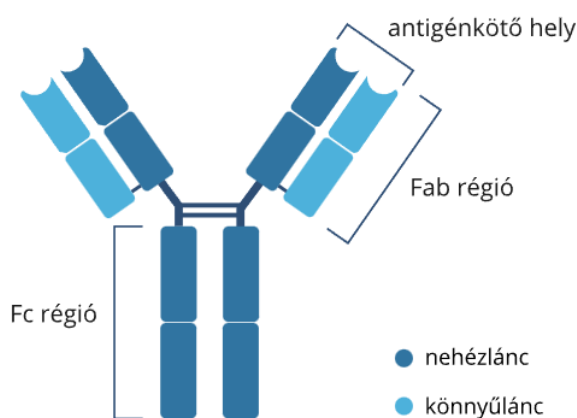
2.1. Monoklonális antitestek és jelentőségük

Az antitestek olyan fehérjemolekulák, amelyeket az immunrendszer termel annak érdekében, hogy felismerje és elősegítse az idegen anyagok (antigének) eltávolítását a szervezetből, amely lehet például baktérium, vírus vagy toxin. Minden ellenanyag egy idegen molekula egyedi részét (epitópját) ismeri fel és ahhoz kötődik, ezért terápiás kezelésekre alkalmazható.

Az első monoklonális antitest (*monoclonal antibody*, mAb) 1986-ban került forgalomba és 2017-ig közel 60 terápiás monoklonális antitestet engedélyezett az FDA (*U.S. Food and Drug Administration*), amelyek jelenleg a klinikai vizsgálatok különböző fázisaiban értékelés alatt állnak. Majdnem négy évtized alatt a folyamatos fejlődésnek köszönhetően számos területen sikerrel hasznosították őket, mint például szív- és érrendszeri, légzőrendszeri, rákos megbetegedésekre, illetve asztma kezelésére.[1–5]

2.1.1. Az antitestek általános szerkezete és tenyésztése

A monoklonális antitestek az immunglobulin G (IgG) vegyületcsaládba tartoznak. Szerkezetileg két fő részre oszthatók (1. ábra): kristályosítható fragmensre (*Fragment crystallizable*, Fc), illetve antigént kötő fragmensre (*Fragment antigen binding*, Fab), amelyek együttesen egy körülbelül 150 kDa tömegű, Y alakú struktúrát hoznak létre.



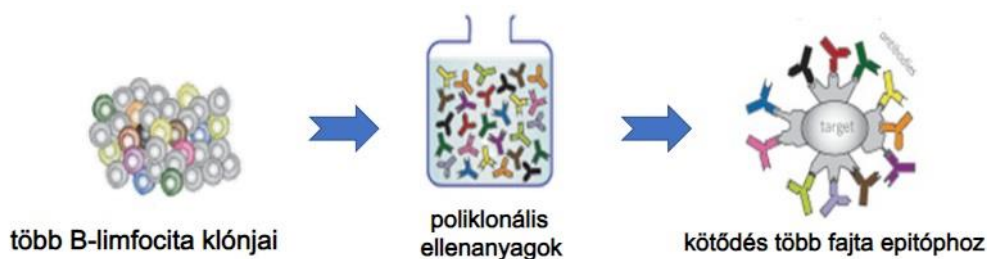
1. ábra Az antitestek felépítése

Az Fc régió két darab azonos, 50 kDa tömegű nehézláncból áll, míg a Fab régió két, egyenként 25 kDa tömegű könnyűláncból épülnek fel. Egy-egy nehéz lánchoz egy-egy könnyű lánc csatlakozik, diszulfid kötéssel, valamint a nehézláncokat is diszulfidhidak tartják össze, melyet *hinge* régióknak neveznek, ami flexibilis kapcsolatot biztosít az Y alakú molekula két Fab régiója

között. Az Fc és Fab régiók más-más feladatot látnak el, míg a Fab régió az antigén epitópjához képes kötődni, addig az Fc régió képes az immunrendszer további elemeihez kötődni, ezáltal megfelelő immunválaszt tud kiváltani.[6–9]

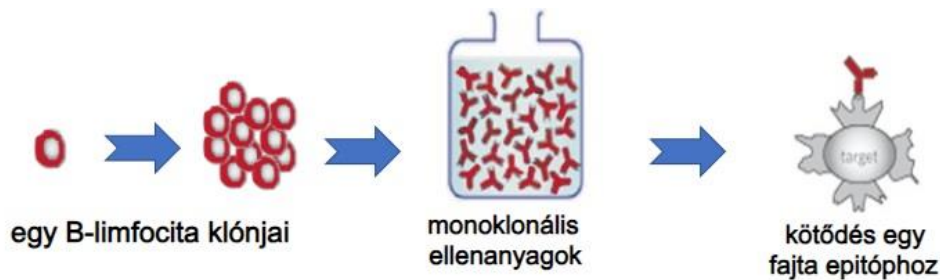
Az antitesteket élő állatok segítségével (egérben, nyúlban, kecskében, birkában, marhában, szamárban, patkányban és csirkében) vagy sejt kultúrákban tenyésztik. Monoklonális és poliklonális antitesteket különböztetünk meg attól függően, hogy az antitestet termelő sejtek egy, vagy több immunsejt utódai. A monoklonális antitestek előállítása lassabb, jóval munkaigényesebb és nagyobb technológiai felszereltséget igénylő folyamat, mint a poliklonális antitestek előállítása, viszont terápiás szempontból kedvezőbbek.

Poliklonális antitestet legegyszerűbben valamilyen állat immunizációjával nyerhető. Az állat kiválasztása általában a mérete alapján történik, ez attól függ, hogy mennyi ellenanyagot szeretnének előállítani. Az antigént az állatba juttatják, majd egy hét múlva egy emlékeztető oltást adnak be, így pár hét múlva már elegendő ellenanyagot tartalmaz a vér, amit levesznek és lecentrifugálva vagy tisztítással kinyerik az antitesteket. (2. ábra)



2. ábra Poliklonális antitestek előállítása[10]

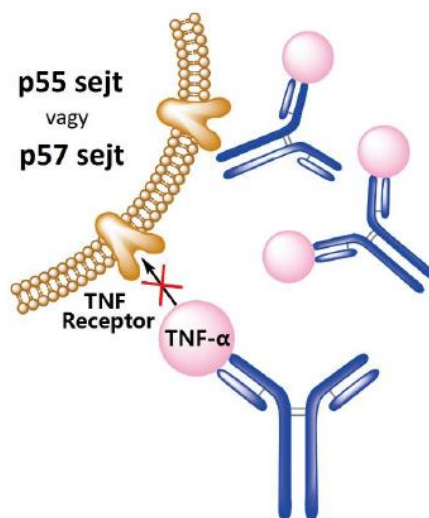
A monoklonális antitest előállítása szintén egy állat immunizálásával kezdődik úgy, mint a poliklonális antitest esetén, majd az állat lépéből kinyerik az ellenanyag termelő B-sejteket. (3. ábra) Ezek önmagukban *in vitro* körülmények között nem szaporíthatók, ezért humán tumorsejtekkel fuzionáltatják őket, hogy hibrid sejt vonalat, azaz hibridómákat hozzanak létre. A továbbiakban a sejteket *in vitro* körülmények között, hipoxantin-aminopterin-timidint (HAT) tartalmazó tápközegben szelektálják, amely lehetővé teszi, hogy csak a hibridóma sejtek maradjanak életben és szaporodjanak, míg az eredeti tumorsejtek elpusztulnak. Mivel a B-sejtek önállóan nem képesek korlátlan szaporodásra, egy idő elteltével kizárólag a hibridóma sejtek maradnak a kultúrában, amelyek antitesteket termelnek. Ezeket egyesével szétválogatják és táptalajon szaporítják, majd megvizsgálják, hogy melyik tenyészet termeli a számunkra megfelelő ellenanyagot. A megfelelőt kiválasztják és a sejt vonalat akár a végtelenségig fenntartva, termeltetik a monoklonális antitestet.[8,11]



3. ábra Monoklonális antitestek előállítása[10]

2.1.2. Adalimumab

Az adalimumab egy humán monoklonális antitest a tumor nekrosis faktor (TNF- α) ellen, amelyet szubkután beadásra fejlesztettek ki. Ez egy olyan rekombináns antitest, amit phage display technológiával állítanak elő, kínai hörcsög petefészek (*chinese hamster ovary*, CHO) emlős sejtvonalban. Mivel szerkezetében és működésében nem különbözik a természetben előforduló humán IgG1-től, ezért az adalimumab nagy szelektivitással és affinitással rendelkezik a TNF iránt. Terápiás hatását a TNF és a p55 és p75 sejt felszíni TNF receptorok kölcsönhatásának blokkolásával feje ki, ugyanis a TNF gyulladásos folyamatokat serkentő enzim. Azzal, hogy az adalimumab TNF α -hoz kapcsolódik, meggátolja ezt a folyamatot, amivel számos betegség kezelésében játszik fontos szerepet (4. ábra). Egyik előnye, hogy az általa kiváltott allergiás reakciók előfordulási gyakorisága kicsi és csak enyhe mellékhatása van. Az első adalimumabból készült készítményt (Humira®) 2002-ben hagyták jóvá az Egyesült Államokban. Ezután számos betegség kezelésére alkalmazták, mint például reumás ízületi gyulladásra, a gyermekkori, ismeretlen eredetű sokízületi gyulladásra, a pikkelysömörrel járó ízületi gyulladásra és a Crohn-betegségre.[12–15]



4. ábra Az adalimumab hatásmechanizmusa

2.2. Monoklonális antitestek előállítása és feldolgozása

A monoklonális antitesteken (mAb) alapuló terápiák a gyógyszerek és diagnosztikai szerek fontos osztályává váltak, különösen az emberi rosszindulatú daganatok és más krónikus gyulladásos állapotok kezelésére. Nagyrészt sajátosságuknak és szelektivitásuknak köszönhető, hogy az elmúlt néhány évben megnövekedett az igény irántuk. Az antitestek az egyik legdrágább terápiás szerek közé tartoznak, ami azzal magyarázható, hogy krónikus betegségek esetén nagy dózisban (≥ 100 mg) alkalmazzák őket (alacsony hatékonyságuk miatt). Ezért nagyüzemi eljárásokra van szükség a jellemzően 10-100 kg/év volumenű előállításra a piaci igények kielégítéséhez. A monoklonális antitestek iránti kereslet folyamatosan növekedése szükségessé teszi az előállítási költségek csökkentését, ezért előfeltétellé válik a monoklonális antitestek előállítására használt meglévő eljárások hatékonyságának javítása.

A mAb-termelés *upstream* és *downstream* műveletekre osztható. Az *upstream* műveletek magukba foglalják a termék előállításához szükséges expressziós (tenyésztési) sejtek kiválasztása, felszaporítása, illetve a sejtek tenyésztése. A *downstream* műveletekhez pedig a sejtek által termelt monoklonális antitestek elválasztási és tisztítási lépései tartoznak. A betegek megfelelő és hatékony kezelése érdekében fontos, hogy a folyamat során nagy tisztaságú monoklonális antitestet állítsunk elő.[16,17]

2.2.1. Upstream

A monoklonális antitestek előállítására emlőssejteket, leginkább kínai hörcsög petefészek sejteket alkalmaznak. A népszerűsége annak köszönhető, hogy humán terápiás kezelés szempontjából biztonságosak, ezért az előállított terápiás fehérjék könnyebben megfeleltethetők a hatósági forgalomba hozatali követelményeknek. A CHO sejtvonala képes nagy volumenben, a hatalmas piaci igényeket kielégítő, magas koncentrációjú (1-5 g/l) fehérjetermelésre.[18]

Az *upstream* technológiát nagymértékben korszerűsítették a gyártáshoz használt gazdasejtekről a bioreaktorok típusára és kapacitására. Az *upstream* folyamatok előrehaladása a volumetrikus termelékenység 100-szoros növekedéséhez vezetett az elmúlt évtizedben, és gazdaságosabbá tette a monoklonális antitestek előállítását a terápiás alkalmazásokhoz. Emellett szükségessé vált az új bioreaktorok tervezése vagy a meglévők módosítása, illetve a meglévő folyamatok optimalizálása is.

Különböző típusú bioreaktorokat használnak emlős sejtenyésztéshez kísérleti és ipari méretekben, mint például a kevert tartályos bioreaktor, a légi szállító bioreaktor, az üreges rostos bioreaktor és a rotációs sejtenyésztő rendszer. Mindegyik reaktornak megvannak a maga előnyei és hátrányai, és ennek megfelelően alkalmasak különböző feladatokra. Legtöbbször, ipari méretben a monoklonális antitest termelését CHO sejtvonalakkal valósítják meg, jellemzően rátáplálásos (*fed-batch*) fermentációs technológiával, azonban kezd elterjedni a folyamatosan kevert tartályos bioreaktor is a terápiás fehérjetermelés ipari méretű gyártásánál a könnyű méretnövelés és a kényelmes vezérlés miatt.

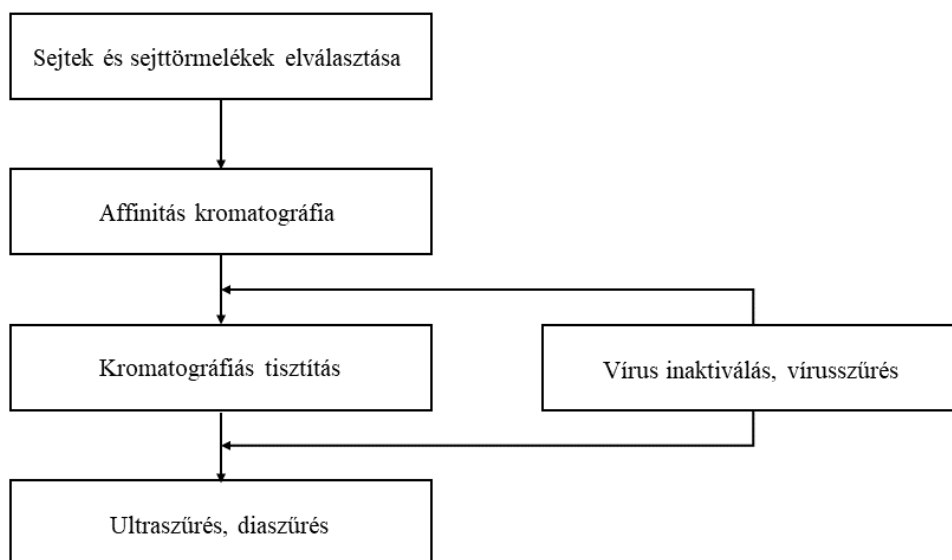
A megfelelő minőségű és mennyiségű monoklonális antitesttermelés szempontjából elengedhetetlen az egyes kritikus paraméterek, többek között a megfelelő tápanyagtartalom, a hőmérséklet (37 °C), az oldott oxigén koncentráció és a pH (7,4-es érték) pontos követése és megfelelő tartományon belüli értékre szabályozása. Ezen kívül célszerű vizsgálni a sejtek aminosav szükségletét, mert egy-egy aminosav esetleges hiánya korlátozhatja a sejtek növekedését és termelékenységét.[19–21]

2.3. Monoklonális antitestek downstream folyamatai

Az *upstream* folyamat végén a sejtek és a termelt monoklonális antitestek mellett egyéb, különböző forrásból származó szennyezőket tartalmazhat a kapott fermentlé. Az embereknek beadható biogyógyszereknek nagyon magas tisztasági követelményeknek kell megfelelniük, hogy a szervezetben az esetleges mellékhatásokat és heves immunreakciókat elkerüljék. Ezért az értékes és tiszta hatóanyag eléréséhez fontos a fermentlé tisztítása a *downstream* feldolgozási folyamatok során.

Az antitestek tisztítására különböző *downstream* eljárásokat dolgoztak már ki, viszont az ezek során használt feldolgozási és tisztítási műveletek köre és sorrendje nagyon hasonló. Első lépésben eltávolítják a sejteket és sejttermelékeket a fermentléből, jellemzően különféle centrifugák és szűrők segítségével. Ezt követően többlépéses folyamat során a sejtvonalból származó szennyezőktől (pl. gazdasejt fehérjék (*host cell proteins*, HCP), DNS, RNS, endotoxinok és vírusok) és a termeléssel kapcsolatos szennyezőktől (pl. habzágátló, antibiotikum, ProteinA) kell megtisztítani az oldatot. Továbbá szükséges a termékéből származó lehetséges fehérje-módosulatok (pl. bomlástermékek és aggregátumok) mennyiségét is ellenőrizni, ugyanis ezeket szintén el kell választani a főterméktől.[22] A felülúszó adalimumab tartalmát ezután affinitás kromatográfiával kötik meg, majd egy speciális pufferrel választják le és mossák le (eluálják) az oszlopról. Az eluátumot további kromatográfiás tisztítási lépések

követik, illetve több vírusinaktiválási vagy vírusszűrési lépést is beiktatnak. Az egyes kromatográfiás lépések közötti vagy a folyamat végén szükséges puffercserét diaszűréssel, míg a végső termék töményítését ultraszűréssel valósítják meg. A tisztítás legköltségesebb része a kromatográfiás lépések, ezért ezek optimalizálása és összehangolása rendkívül fontos.[21,23]



5. ábra A monoklonális antitestek tisztítási folyamatábrája [24]

2.3.1. Sejtek és sejttörmelék elválasztása

A sejtek és a sejtmarmadványok eltávolítása érdekében a tápközeget centrifugálással, majd mélységi szűréssel tisztítják. A centrifugálás az oldhatatlan szilárd anyagok és a folyadék közötti sűrűségkülönbséget használja fel a szuszpendált szilárd komponensek elválasztására, szabályozott centrifugális erők alkalmazásával. Nagy előnye a könnyű méretezhetősége és gazdaságos üzemeltetése, így nagyobb mennyiség tisztítására is alkalmas, viszont nem képes a sejtek és a sejtmarmadványok teljeskörű elválasztására. Így a centrifugálást rendszerint szűrési lépések követik, mivel a kromatográfiás tisztítás előtt feltétlenül szükséges a nagyobb méretű szilárd szennyezők eltávolítása.

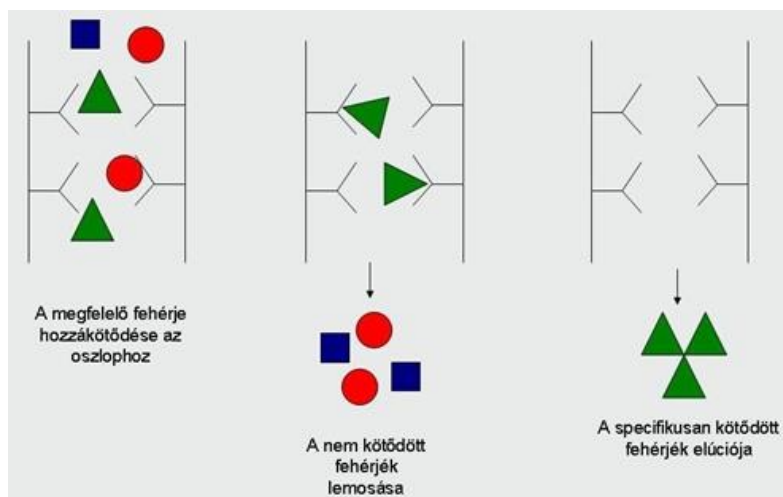
A mélységi szűrőt (*depth filtration*) széles körben használják a biofarmakon gyártási folyamatokban. Ez egy olyan elválasztási lépés, amely képes nagy mennyiségű oldhatatlan szennyező eltávolítására a kromatográfiás lépés előtt, hogy megvédjék az oszlopot az elszennyeződéstől. A mélységi szűrőrendszerek eldobható elsődleges és másodlagos szűrőkből állnak, amelyeket egyetlen lépésben egyesítenek, hogy csökkentsék az idő- és anyagköltséget. Az elsődleges elsősorban a sejtek és más nagyobb részecskék eltávolítására szolgál, míg a másodlagos eltávolítja a maradék sejttörmelékét és a finomabb részecskéket. Mindkét mélységi

szűrő eltávolíthatja az oldható szennyeződések a szűrő és az oldott anyag tulajdonságai alapján. A mélységi szűrők cellulóz vagy polipropilén (PP) szálakból készülnek, szűrést elősegítő szerek (pl. kovaföld) és polimer kötőanyagokkal, amelyek a szálakon tartják a szűrési segédanyagokat, így biztosítva a szerkezetét. A sejtek, sejttermelékek és részecskék eltávolítása a mélységi szűrők kanyargós áramlási csatornáiba való beszorulással történik, főként a méret alapján, míg az oldható szennyeződések elektrosztatikus és hidrofób kölcsönhatások révén kerülnek a szűrő felületére. A másodlagos szűrők általában több szűrési segédanyagot és kötőanyagot tartalmaznak, mint az elsődleges szűrők, és alkalmanként speciális polimereket is hozzáadnak. A mélységi szűrők viszonylag kis költségűek, és jól kombinálható műveleti lépések a tisztítási feldolgozás során.[25–27]

2.3.2. Affinitás kromatográfia

Az affinitás kromatográfia a folyadékkromatográfia egyik fajtája, amely olyan biológiai ágenszt használ az állófázisban, ami megköti a célmolekulát a tisztítandó mintából (mozgófázis). (6. ábra) Széleskörben elterjedt módszer az antitestek tisztítására, amely egy specifikus fehérje-ligandum kölcsönhatáson alapszik. Ez az egyetlen olyan kromatográfiás elválasztási módszer, amely biológiai kölcsönhatáson alapul. Ilyen például az enzim-szubsztrát kötődések, az antitest-antigén kapcsolatok, lektin-poliszacharid, hormon-receptor, fémion-polihisztidin fúziós fehérje, nukleinsav-kiegészítő bázissorrend vagy a Protein A-immunglobulin kontaktusok. A leggyakrabban használt ligandum a protein A fehérje, amely a *Staphylococcus aureus* sejtfal-összetevője. A speciális kötődési tulajdonságnak köszönhetően az affinitás kromatográfiával nagy szelektivitás és hozam érhető el. Ennek köszönhetően sokkal könnyebb az elválasztás, más elválasztási műveletekhez képest, amelyek sokkal bonyolultabb előkészítést igényelnek és időigényesebbek.

A Protein A-t genetikai módszerekkel fejlesztették azért, hogy növeljék a lúggal szembeni stabilitását, javítsák az elúció során mutatott viselkedését, illetve növeljék a kromatográfiás oszlopok kötési kapacitását. A Protein A kromatográfia további előnye, hogy egy komplex biológiai mintából a célvegyület rendkívül nagy tisztasággal, szelektíven, gyorsan és kíméletesen elválasztható. Hátrányuk, hogy a megfelelő állófázisok elkészítése, azaz a ligandumok rögzítése bonyolult és kellő gyakorlatot igényel, az állófázisok többségükben labilisak és élettartamuk rövid, összességében a módszerek, különös tekintettel a speciális ligandumokra drágák. Emellett egy *leaching*-nek (kimosódás) nevezett jelenség is fennáll, amely lényegében azt jelenti, hogy a ligandum leszakadhat az oszlopról, így a célmolekulával együtt eluálódhat, elszennyezve az eluátumot.[28,29]



6. ábra Az affinitás kromatográfiás elválasztás sematikus ábrázolása[30]

2.3.3. Ioncserés kromatográfia

A legtöbb mAb tisztítási eljárás az affinitás kromatográfiát követően legalább egy, de általában kettő további kromatográfiás lépést tartalmaz, erre leggyakrabban ioncserés kromatográfiát alkalmaznak, amely során ioncserélő tulajdonságú anyagokat használnak állófázisként az állandó töltéssel rendelkező vegyületek (pl. erős savak és bázisok, szerves ionok) elválasztására. Az elválasztás az egyes ionok és az állófázison elhelyezkedő ellentétes töltésű funkciós csoportok között kialakuló kölcsönhatáson alapszik. Az ioncserés kromatográfiás módszerek töltés szerint csoportosíthatók: kationcserés, ha negatív töltésű funkciós csoportokkal rendelkezik (pl. deprotonált szulfonsav, karboxilcsoport) és anioncserés, ha pozitív töltésű funkciós csoportokkal rendelkezik (pl. protonált aminocsoport, kvaterner ammónium). Illetve a töltésük csoportosítható még a pH-függése szerint is: erős ioncserélő, ha az ioncsere kapacitása független a pH-tól, illetve gyenge ioncserélő, ha az ioncsere kapacitása pH függő. Mivel a fehérjéket aminosavak építik fel, ezért számos gyengén savas, illetve gyengén bázikus oldallánc található a megkötendő molekulán. Ezeknek a csoportoknak a protonáltságát, illetve deprotonáltságát tudjuk befolyásolni a pH változtatásával. Az ioncserés kromatográfia esetén az amfoter jellegét használják ki a fehérjéknek.[31]

2.3.3.1. Kationcserés kromatográfia

Az affinitás kromatográfiás tisztítás után a kapott oldat még nem felel meg a klinikai tisztasági feltételeknek. A számunkra fontos antitestek mellett maradhatnak emlőssejt fehérjék (HCP), DNS, aggregálódott antitest vagy a leszakadt protein A töltet, így további tisztítási lépésekre van még szükség. A kationcserés kromatográfiát (*cation exchange chromatography*, CEX) használják a legszélesebb körben a monoklonális antitestek tisztításához és jellemzéséhez.[32]

A kationcserés kromatográfia során a kromatográfiás oszlop töltetére olyan csoportot kötnek, mely megfelelő körülmények között negatív töltéssel rendelkezik, így a fehérjék pozitív töltésű oldalláncaihoz képesek kapcsolódni. A tisztítandó antitesteket az oszlopra juttatva a ligandumhoz kötődnek, míg a szennyeződések eltávolíthatók a mosási lépésben. Végül az eluáló puffer megfelelő beállításával az antitesteket eluálják az oszlopról. Az eluálás során leggyakrabban pH gradienst, vagy sógradienst alkalmaznak.[24]

A sógradiens a kationcserés kromatográfia kritikus lépése, amikor is a terméket eluáljuk az oszlopról. Ennek alapja az antitest-ligandum kötés felbontása a megfelelő elúciós pufferrel, ilyenkor az eluensként alkalmazott sóoldat koncentrációját folyamatosan növeljük az elúció alatt, mely így megfelelő sorrendben szorítja le az oszlopról a felkötődött szennyezőket és antitesteket. Először a leggyengébb ionos kölcsönhatással rendelkező molekulák kezdenek el az oszlopról lemosódni, majd a nagyobb töltéssel rendelkezők magasabb sókoncentrációt igényelnek, és így később eluálódnak a gradiensben, tehát az adott fehérje töltésvariánsai is elválaszthatók. A leggyakrabban használt eluens a NaCl, amelyet nagyjából 0-2 M-os koncentrációtartományban használnak. Hátránya, hogy általában hosszadalmas folyamat egy kationcserés kromatográfiás módszer fejlesztése, illetve az optimális beállítások termék-specifikusak, tehát más antitest, vagy más fermentációs körülmények esetén ezt mindig újra el kell végezni.[33]

pH-gradiens alkalmazása esetén a fehérjék nettó töltésmennyiségének csökkentésén keresztül érik el az antitest-ligandum kötések felszakadását. Az eljárás során a fehérjéket általában egy kationcserés állófázisra rögzítik, ahonnan a mozgófázis pH-jának növelésével eluálják azokat. Az izoelektromos pont (pI) elérésével az antitestek a nettó töltésüket elvesztik, de ahhoz, hogy teljesen elváljanak, a pH-gradienst gyakran $\text{pH} > \text{pI}$ végponttal szokták megtervezni. Ennél az elválasztási módszernél fontos a lineáris pH gradiens biztosítása viszonylag széles tartományban, amelyet például Tris bázisból (trisz-(hidroximetil)-amino-metán), piperazinból és imidazolból készített puffer tud biztosítani 6,0 és 9,5 közötti pH-tartományban.[34]

2.3.3.2. Anioncserés kromatográfia

Az anioncserés kromatográfiát (*anion exchange chromatography*, AEX) a mAb fehérjék *downstream* feldolgozása során széles körben alkalmazzák, leggyakrabban kationcserés tisztítási lépést követően.[35] Bár az ezt megelőző lépésekben a szennyeződések nagy része eltávolítható, viszont még mindig maradhatnak egyéb savas karakterű szennyezők. Zhou és Tressel a 2006-os publikációjában több kutató eredményeit összevetette és megállapította, hogy *flow-through* (átfolyási) módszerrel működő anioncserélő membránok hatékonyak a Protein A

tisztítása után. Szerintük az anioncserés kromatográfia a leghatékonyabb eszköz különféle vírusok, DNS és endotoxin eltávolítására. A *flow-through* módszer ideális, ugyanis viszonylag kis helyigény mellett elegendő kapacitással rendelkezik a nyomokban jelenlévő szennyeződések megkötéséhez. Semleges pH körül és alacsony vezetőképesség mellett sok vírus, DNS, endotoxin és a gazdasajtfehérjék nagy százaléka negatív töltésű, így kötődik az anioncserés kromatográfiás oszlop gyantájához, míg a tipikusan bázikus (azaz semleges pH-n pozitív töltésű) antitestfajták nem. Ezért általában tisztítási lépésként használják a mAb fehérjék gyártása során.[36,37]

Az anioncserés kromatográfia két üzemeltetési módban is elterjedt. Használható *flow-through* (átfolyási) módban, illetve *bind-and-elute* (kötési és eluálási) módban, az ellenanyag pI értékétől és az eltávolítandó szennyeződésektől függően.

A 7,5 feletti pI-értékkel rendelkező antitestek esetében, amelyek magukban foglalják a legtöbb humanizált IgG1 és IgG2 antitestet, az *flow-through* mód jobb választás lehet a szennyeződések eltávolítására. Ilyenkor a szennyeződések megkötődnek a gyantán, és a kívánt termék átfolyik. Az oszlop kapacitása, azaz a tisztítandó antitest tömege a töltet tömegéhez viszonyítva meglehetősen nagy lehet, mivel a gyantán lévő kötőhelyeket csak a szennyeződések foglalják el. Ennél a módszernél a pH általában 8,0 és 8,2 között változik és ilyenkor az antitest termék átesik az oszlopon, miközben a szennyeződések megkötődnek. A kationcserés oszlophoz hasonlóan az oszlopról a szennyeződések regenerációs pufferes mosással a vezetőképesség növelésével távolítják el. Fejlesztési célból ez a mosófolyadék lehet 1,0 M NaCl (vagy valamilyen más megfelelő só), hogy a regenerációs frakcióban meg lehessen vizsgálni a gazdasajt fehérjeit, DNS-ét és antitesteket a tömegegyensúly biztosítása érdekében. Később, a gyártás során ezt a magas sótartalmú mosást általában fertőtlenítő pufferrel, például 1,0 M NaOH-val helyettesítik. Amellett, hogy a nagy ionerőssége miatt eluálja a fehérjéket, a fehérjéket és más molekulákat is lebontja, és eltávolítja az oszlopról.[38,39]

Azon antitestek esetében, amelyek pI-értéke a savas és a semleges tartományban van, amely magában foglalja a legtöbb humanizált IgG4-et, a *bind-and-elute* mód használható a folyamattal és a termékkel kapcsolatos szennyeződések eltávolítására az adott termékből. A fehérje oldatot először az oszlopra töltik, majd a kívánt terméket magasabb sókoncentrációval eluálják lépcsőzetes elúcióval vagy lineáris gradienssel, így a szennyeződések többsége az oszlophoz kötődik. A szennyezők a tisztítási vagy regenerálási lépés során eluálódnak az oszlopról. *Bind-and-elute* módban a fejlesztés és az optimalizálás során a pH-nak a termék pI értéke felett vagy annak közelében kell lennie, hogy nettó negatív töltést vagy magasabb negatív töltésszámot

kapjunk az antitestmolekulák felületén, és ezáltal nagyobb kötőképességet érjünk el a kromatográfiás lépés során. A módszer előnye, hogy a szennyezők nagy hányada erősebben kötődik, mint az antitest, illetve a legtöbb gazdasejt fehérje pI-értéke kisebb, mint az elválasztáshoz használt pufferek pH-ja, így ezen szennyezők hatékonyan eltávolíthatók. A körülményeket tehát úgy érdemes megválasztani, hogy a termék ne kötődjön az oszlophoz, amíg a szennyezők megtapadnak.[39,40]

A két üzemeltetési mód közül a *flow-through* módszer fejlesztése egyszerűbb, illetve szélesebb körben alkalmazható az antitestek magas izoelektromos pontja miatt, ugyanis ekkor a töltet kötőhelyeit csak a szennyeződések foglalják el.[39]

2.3.4. FPLC rendszer

A fentebb említett kromatográfiás tisztítások megvalósításához az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a gyors fehérje-folyadékkromatográfia (*fast protein liquid chromatography*, FPLC), amely a nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) egyik fajtája. A módszert kifejezetten fehérjék, peptidok és polinukleotidok elválasztására dolgozták ki, melynek jellemzői a nagy terhelési kapacitás, a biokompatibilis vizes pufferrendszerek, a gyors áramlási sebesség, a közepes és alacsony nyomás, az oszlop nagy belső átmérője, valamint az, hogy a legtöbb kromatográfiai módban alkalmazható (például ioncsere, fordított fázis és affinitás kromatográfia). A rendszer lehetővé teszi a reprodukálható elválasztást azáltal, hogy automatizálható, beleértve az automatikus mintavevőket, a gradiens programvezérlést és a csúcsgyűjtést. A fehérjéken kívül a módszer más típusú biológiai mintákra is alkalmazható, mint például az oligonukleotidokra és plazmidokra.[41]

Az FPLC-t 1982-ben egy svéd cég, a Pharmacia vezette be a piacra. A módszer elve hasonló a nagy teljesítményű folyadékkromatográfiához. Például mindkét rendszer infúziós pumpával, érzékeny detektorokkal, gradienselúciós eszközökkel, automatikus gyűjtőkészülékkel és számítógépes vezérléssel van felszerelve, illetve mindkettőt gyorsaság, nagy felbontás és nagy elválasztási hatékonyság jellemzi. Az FPLC rendszer abban különbözik a HPLC-től, hogy a csőrendszere nagy nyomásnak ellenálló műanyag csövekből áll, az áramlási sebesség tartománya 0-100 ml/perc, az analitikai pontossága nem olyan nagy, mint a HPLC-é, és csak hagyományos szervesen oldható anyagok alkalmazhatók. A legfőbb különbség az, hogy alkalmas minták nagy léptékű tisztítására, ugyanis míg a HPLC elsősorban kis anyagmennyiségű minták elemzésére szolgáló analitikai módszer, addig az FPLC preparatív célú technika. Ennél a

rendszerénél használt oszlopok mérete nagyjából 5 ml-től 15 l-ig terjed, amely bizonyítja, hogy nem csak fejlesztési, de gyártási célra is használható a technológia.[42,43]

2.3.5. Vírus inaktiválás, vírusszűrés

Az mAb fehérjék és más terápiás rekombináns fehérjék előállításához használt emlőssejtek endogén retrovírusokat termelnek, és a feldolgozás során előfordul, hogy járulékos vírusokkal fertőződnek meg. A biztonsági előírások miatt az emlős sejtekből származó termékek millió adagonként kevesebb mint egy vírusrészecskét tartalmazhatnak. Az affinitás kromatográfia 10^7 nagyságrendű vírusszűrést képes biztosítani, majd az ezt követő ioncserélő kromatográfiás lépések további 10^4 -es csökkenést eredményezhetnek. A víruseltávolítási és inaktiválási lépések beépítése a tisztítási folyamatokba a termékbiztonsági stratégiák szerves részét képezi. Általában a kromatográfiás elválasztások mellett legalább két független lépés alkalmazása a követelmény, amelyek specifikusak a vírustartalom csökkentésére, így az egyik mechanizmus által nem tisztított vírusokat a másik eltávolíthatja, amellyel garantálhatják az előállított termékek biztonságát.[24,38,39]

A legtöbb ipari folyamat az alacsony pH-jú inaktiváláson alapul, amely sikeresen inaktiválhatja a vírusokat számos biotechnológiai termékben. Mivel a Protein A oszlop eluátumának pH-ja alacsony, és tekintettel arra, hogy a legtöbb mAb stabil oldatban alacsony pH-jú körülmények között, viszonylag könnyű egy alacsony pH-jú inkubációs lépést beiktatni a vírusok inaktiválására. Az alacsony pH-jú kezeléssel kimutatták, hogy sikeresen inaktiválja a retrovírusokat számos biotechnológiai termék esetében. Gyenge savakat, például 0,5 M-os foszforsavat érdemes használni a megfelelő pH elérése érdekében. Erős savak, például HCl használata kerülendő annak ellenére, hogy keveset kell belőle adagolni, ugyanis a termék denaturálódhat azon a helyen, ahol az oldatot hozzáadják. A mAb-ok esetén az inaktiválás pH-értékét az optimális elúciós körülmények és a termék inaktiválás alatti stabilitásának figyelembevételével kell meghatározni. A folyamattól függ az inaktiválás ideje, amely 30 és 120 perc között változhat. Az inaktiváláshoz szükséges specifikus időt (inkubációs időt) azonban az inaktiválás kinetikájának figyelembevételével kell megállapítani. Az inkubációs idő lejártá után a pH-t beállítjuk, és a tisztítási folyamat folytatódhat a következő lépésben.[24,26]

A vírusszűrés egy méretalapú elválasztási módszer, amely kiegészíti a többi víruseltávolítási lépést. A biotechnológiai iparban gyakran két kategóriába sorolják: az 50 nm-es vagy nagyobb vírusok (retrovírusok) szűrői és a 20 nm-es vagy nagyobb vírusok szűrői (parvovírusok). A vírusszűrőket általában állandó nyomáson működtetik. Kis pórusméretük miatt (különösen a

parvovírus minőségű szűrők) viszonylag gyorsan eltömődnek részecskeaggregátumok jelenlétében, ezért túlnyomásos tartályokat alkalmaznak a folyadék átvezetésére. Megfelelő előszűrőkkel jelentősen csökkenthető az eltömődés kockázata, és növelhető a vírusszűrő teljesítménye. A vírusszűrő membránok hidrofil poliéter-szulfonból (PES), hidrofil polivinilidénből (PVDF) és regenerált cellulózból készülnek. A vírusszűrőket általában a folyamat végére helyezik, vagy a kromatográfiás tisztítási lépések közé iktatják be.[24,26,39]

2.3.6. Ultraszűrés, diaszűrés

Az ultraszűrés (*ultrafiltration*, UF) - diaszűrés (*diafiltration*, DF) műveletet széles körben alkalmazzák a nagy koncentrációjú mAb gyógyszerjelölt nagyléptékű tisztításának végső szakaszában, hogy a céldózisig koncentrálják (ultraszűrés), és puffercserét (diafiltrációt) végezzenek a kívánt végső készítménybe. Az ultraszűrés egy nyomásvezérelt membrán eljárás. Vírusszűréshez hasonlóan ez is egy méret alapú elválasztás, viszont az UF-nél használt kisebb, 1-20 nm pórusméretű membrán már a 0,5-1000 kDa molekulatömegű antitesteket is képes visszatartani. Az ultraszűrő membránja sokféle polimerből készülhet, például a poliszulfonból, a poliéter-szulfonból, a polivinilidén-fluoridból vagy regenerált cellulózból. Az ultraszűrő membránok egyedülálló anizotróp szerkezettel rendelkeznek, azaz térben nem egységes a szerkezetük. A membránszelektivitást egy vékony, körülbelül 0,5 μm vastag hártya szabályozza, a mechanikai szilárdságot pedig egy vastagabb makropórusos alsó réteg biztosítja. Ez lehetővé teszi a retenciót (visszatartást) a membrán felületén, meggátolva, hogy a szűrőszerkezeten belül történjen visszatartás.[39] A membrán elszennyeződése és tisztítása viszont kritikus tényező ezeknek a folyamatoknak a teljesítményében, bár ezekről nagyon korlátozott adatok állnak rendelkezésre, különösen a jelenlegi UF-DF-rendszerekben használt magas monoklonális antitest-koncentrációk esetén.

A tisztítási folyamat végén kapott oldat töményítése egy fontos lépés, amennyiben a terápiás mAb készítményeket szubkután, azaz a bőr alatti kötőszövetbe injektálva adják be a betegeknek. A kívánt terápiás dózis egyetlen szubkután injekciójában általában nagy koncentrációra van szükség (jóval 100 g/l felett). A fehérje stabilitásának biztosítása és az aggregáció minimalizálása nehézkes lehet az UF-DF feldolgozás során, mivel nemcsak a mAb van kitéve különféle környezeti terheléseknek, hanem folyamatosan változnak mind a fehérjekoncentráció, mind az oldat jellemzői, ugyanis töményebb oldatban nagyobb az aggregátumképződés esélye. Kifejezetten nagy koncentrációjú készítmények esetén bevált módszer, hogy nagyobb hőmérsékleten végzik a szűrési eljárást. Luo és munkatársai nagy viszkozitású IgG1 antitest oldat esetén például 23 °C-ról 46 °C-ra emelve a hőmérsékletet azt

tapasztalták, hogy a viszkozitás a felére csökkent, ami lehetővé tette az akár 200 g/l fölötti koncentráció elérését és megállapították, hogy nagyobb hőmérsékleten történő feldolgozás nem befolyásolta a termék minőségét.[39,44,45]

A puffercserét diaszűréssel érik el, amelyben a kívánt végső összetételű puffert ugyanolyan sebességgel adják a retentátumrendszerhez mint, ahogy a szűrlet távolítják el, így állandó visszatartott térfogatot tartanak fenn. A diaszűrés az ultraszűrés egy speciális formája, amikor a visszamaradt oldatot (retentát) vízzel vagy egy tetszőleges pufferrel hígítják, és visszaforgatva azt a betáplálási ágba, újraszűrik. A diaszűrés során az antitestek koncentrációja nem változik, csak a membránon áthaladó komponenseké csökken. A diaszűrést jellemzően a kromatográfiás lépések között vagy a folyamat végén alkalmazzák.[39,44]

2.4. Downstream folyamat kihívásai

A monoklonális antitestek növekvő termékigénye miatt egyre olcsóbb termékeket igényelnek a versenyképesség megőrzése érdekében, ezért a jelenlegi meglehetősen költséges gyártási folyamatokat jelentősen javítani kell. A *downstream* fejlesztés a költség és az idő minimalizálására, illetve ezek mellett a minőségre összpontosít. Ez a szétválasztási hatékonyságának növelésével, a meglévő létesítmények bővítésével, valamint a meglévő és alternatív folyamatok optimalizálásával érhető el.[21]

A *downstream* folyamatokban az egyik legfőbb kritikus szempont a fehérjék stabilitásának megőrzése, mivel a fehérjék érzékenyek lehetnek a pH, sókoncentráció és hőmérséklet változásaira, amelyek denaturációhoz vagy aggregációhoz vezethetnek. A megfelelő pH és vezetőképesség fenntartása alapvető fontosságú a fehérjék oldhatóságának és stabilitásának biztosítása érdekében. A sók koncentrációja, típusa, valamint a kromatográfiás elúciós profil szintén döntő szerepet játszik a tisztítás hatékonyságában. Éppen ezért a tisztítási folyamat hatékonyságának javítása érdekében új típusú ioncserés kromatográfiás oszlopok kerülnek forgalomba, amelyek optimális vizsgálati módszerei még nem kidolgozottak, ezért szükséges ezen oszlopokat alkalmazó analitikai módszer fejlesztése. Az új elválasztási technológiák ipari léptékű megvalósítása jelentős fejlesztési, bővítési és validálási beruházásokat igényel, beleértve a kapcsolódó kockázatokat is. Kisebb térfogatú kromatográfiás oszlopokkal elérhető a mérési idő minimalizálása, amelyhez, ha egy megfelelő módszert sikerül kifejleszteni, az rengeteg anyagi megtakarításhoz vezethet hosszútávon.[21]

2.5. Downstream folyamatok tisztítás hatékonyságának ellenőrzésére szolgáló analitikai módszerek

2.5.1. HPLC méretkizárásos kromatográfia

A méretkizárásos kromatográfia (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) a leggyakrabban használt módszer a mAb-ok stabilitásának/aggregációjának nyomon követésére. Fehérje multimerek (monomerek, dimerek, trimerek és oligomerek) mennyiségi meghatározására is használják 1 és 100 nm közötti mérettartományban mAb-oknál.[46] A méretkizárásos kromatográfia alapja, hogy a különféle molekulákat méretük szerint választja el. Ehhez olyan pórusos töltettel rendelkező kolonnákat használnak, ahol ideális esetben semmilyen kölcsönhatás nem jön létre az állófázis és a mintát alkotó komponensek között. Az elválasztáshoz porózus (makropórusos) különböző kémiai minőségű tölteteket használnak, mint pl. szilikagél, módosított szilikagél és szerves polimerek. A töltet pórusai igen tág méreteloszlásúak, mely az elválasztandó, különböző méretű makromolekulák mérettartományába esik. Míg a hagyományos folyadékkromatográfiában alkalmazott porózus töltetek pórusátmérője jellemzően 5-15 nm között van, addig a méretkizárásos kromatográfiában 5-10 μm -es tartományba esik, mivel jellemzően nagy molekulatömegű (10^2 - 10^8 Da) biopolimerek, peptidek, enzimek, szerves polimerek, fehérjék elválasztására használják.[47] Nagy előnye ennek a kromatográfiás módszernek, hogy enyhe körülményeket használ (vizes mozgófázis, környezeti hőmérséklet, viszonylag kis nyomás, fiziológiás körüli mozgófázis pH), ezért a fehérjéket a természetes konformációs szerkezetüket megtartva tudjuk elválasztani. Attól függően, hogy az elválasztandó minta vízben vagy szerves oldószerben oldódik, beszélhetünk vizes vagy szerves oldószeres közegű méretkizárásos kromatográfiáról. Vízben általában a biopolimerek (pl. fehérjék) oldódnak jól, míg a szintetikus polimer molekulák szerves oldószerben oldódnak, így elválasztásukkor tetrahidrofuránt, toluolt kell alkalmazni eluensként, amelyek környezetvédelmi szempontból nem túl előnyösek. A mozgófázissal szemben támasztott legfontosabb követelmény, hogy a vizsgálandó mintát megfelelő mértékben oldja, illetve, hogy az eluens ne változtassa meg az állófázis tulajdonságait.

A különböző pórusméretű mintát alkotó komponensek közül a legnagyobb méretű molekulák a mozgófázis sebességével haladnak végig a tölteten, ugyanis egyetlen pórusba sem férnek bele. Ezt a méretet kizárási méretnek nevezik és ebben az esetben a kizárt molekulák retenciós ideje (t_R) adja meg a holtidőt (t_0). A kizárási méretnél kisebb molekulák már beleférnek a pórusokba,

azaz visszatartódnak. Az adott töltet által vizsgálható (tehát a visszatartott) tömegtartományt nevezik mérési vagy működési tartománynak. Minél kisebb a molekula mérete, annál több pórusba tud beleférni, azaz annál nagyobb lesz a retenciós ideje.[8,31,48,49]

2.5.2. Dinamikus fényszórás

A dinamikus fényszórás (*Dynamic Light Scattering*, DLS) egy viszonylag gyors módszer az oldatban lévő biomolekulák méretének jellemzésére, ugyanis a mérési idő rendkívül rövid, mindössze néhány percet vesz igénybe. A DLS a homogén monodiszperz és az aggregált minta megkülönböztetésére használható. Amikor a fény áthalad egy molekulákat tartalmazó oldaton, a rendszer optikai paramétereitől függően a fény egy része szóródik és ezt a szórt fényt intenzitása, illetve fluktuációja alapján lehet elemezni. Az előbbi statikus fényszórásnak (*Static Light Scattering*, SLS) nevezik, amely felhasználható a moláris tömeg és a forgási sugár meghatározására. Számos tipikus biomolekula (<20 nm) esetében azonban a forgási sugár nehezen mérhető, mivel az intenzitásban csak kismértékű szögeltérés mutatkozik. Ez azt jelenti, hogy a méréseket egyetlen szögben is el lehet végezni, feltéve, hogy a koncentráció és a törésmutató ismert. A DLS azonban érzékeli a szórási intenzitás ingadozásait az oldatban lévő molekulák Brown-mozgásának köszönhetően. A szórási jel statisztikáit korrelátorral elemzi és a kapott korrelációs függvényt invertálhatjuk, hogy megtaláljuk az oldatban lévő molekulák méreteloszlását. Ez a technika a mintakoncentráció pontos ismerete nélkül működik, és sikerrel alkalmazták a szerkezetbiológiában. Az egyetlen követelmény az, hogy megfelelően nagy legyen a fényszórás a korrelációs függvény kellő statisztikai pontosságának eléréséhez. A gyakorlatban a DLS-kísérletek végzésekor a legfontosabb paraméterek a hőmérséklet, a törésmutató és a viszkozitás.[46,50,51]

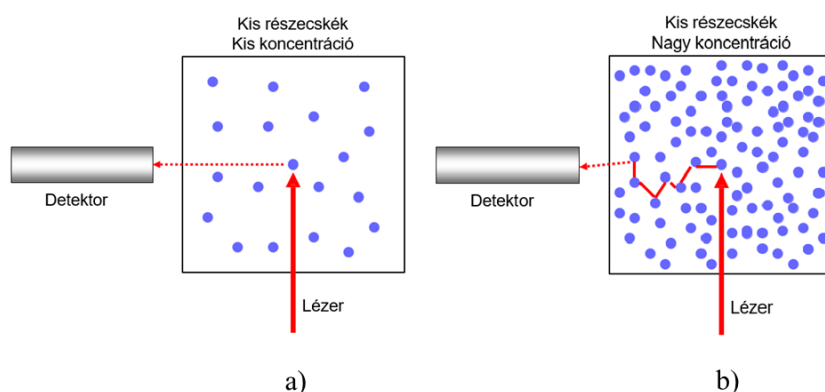
A dinamikus fényszórás a szórt fény intenzitás időfüggő fluktuációját méri, a translációs diffúziós koefficiens (D) meghatározásához, amelyből a hidrodinamikai átmérő (D_H) kapható meg az Einstein-Stokes összefüggés (*1. egyenlet*) alapján, amely megadja a részecske méretét különböző diszpergáló folyadékokban. A hidrodinamikai átmérő egy olyan gömb átmérője, amelynek a translációs diffúziós koefficiense a részecskével megegyező.

$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

1. egyenlet Einstein-Stokes összefüggés

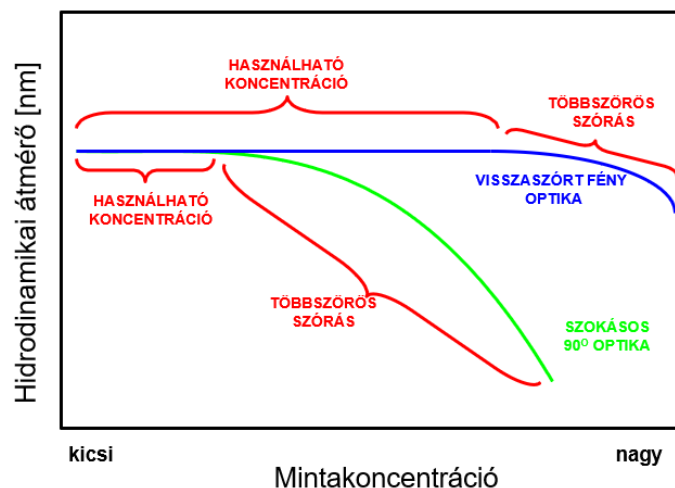
Ahol a D_H a hidrodinamikai átmérő [m], a k a Boltzmann-állandó [$1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K], a T az abszolút hőmérséklet [K], a η a viszkozitás [Pas] és a D a translációs diffúziós koefficiens [m^2/s].

Mivel a szórt fény intenzitását detektáljuk egy adott részecskéről, ezért fontos, hogy a mérés során ne lépjen fel többszörös szórás, amikor a részecskén szóródó fény a detektorba jutás előtt több másik részecskén is szóródik. (7. ábra) A többszörös szórás hatását minimalizálni kell, hogy nagyobb koncentrációk esetén is megbízható legyen a mérés. Ehhez a lehető legkisebbre kell csökkenteni a szórt fény áthaladásának hosszát, amely elérhető visszaszórt fény optika használatával, ilyenkor a szórt fény detektálása 173° -os szögnél történik.[50]



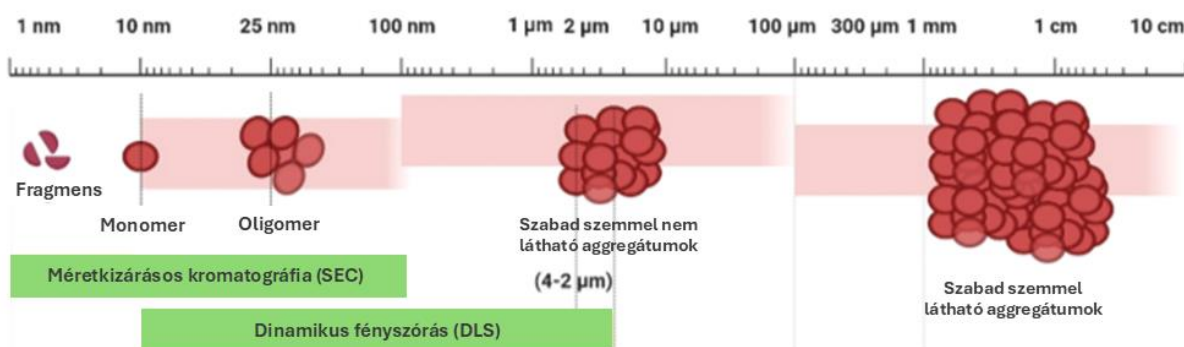
7. ábra Az egyszeres szórás (a) és a többszörös szórás (b) jelensége

A DLS felső koncentráció határát meghatározza egyrészt a többszörös szórás, ugyanis ez csökkenti a megjelenő méretet és a jel/zaj viszonyt, másrészt a részecske-részecske kölcsönhatás is, amely befolyásolja a részecskék diffúziós sebességét és ezáltal a megjelenő méretet. Az alsó koncentráció határ függ a minta által a szuszpendáló anyaghoz képest generált többlet fény mennyiségétől. (8. ábra) Ha túl kevés részecske van a mintában, akkor a jelszintet lényegesen befolyásolja a mérési térfogatba be-, illetve kilépő részecskék száma.[50]



8. ábra A hidrodinamikai átmérő függése a mintakonzentrációtól

Egyre nagyobb figyelmet kap a DLS mérés a SEC-kel szemben, ugyanis a méretkizárásos kromatográfiának számos hátránya van. A hagyományos SEC-analízis lassú, a tipikus mintaelemzési ideje 30 perc/minta, és drága műszereket és fogyóeszközöket igényel, míg egy DLS méréshez a mintánkat egy küvettába töltjük és lemérjük pár perc alatt. A SEC oszlopba nagyobb aggregátumok (>100 nm) beszorulhatnak, megakadályozva, hogy áthaladjanak az oszlopon és a detektoron. (9. ábra) Éppen ezért, hogy a SEC méréshez oszlopot és a készüléket kíméljük, előzetes szűrést végzünk a mintaelőkészítés során, amely szintén meghosszabbítja a mérést és ezáltal a vizsgálható mérettartományt is korlátozza.[46]



9. ábra A méretkizárásos kromatográfia (SEC) és a dinamikus fényszórás (DLS) vizsgálati mérettartománya[46]

2.5.3. dsDNS szennyező azonosítása

Az Egészségügyi Világszervezet (*World Health Organization*, WHO) a gazdaséjtből származó DNS-re vonatkozó követelményt 10 ng/dózis alatti mennyiségben határozta meg a biotechnológiai készítményekben. A dsDNS (kettősszálú DNS, *double-stranded DNA*) nagy koncentrációban van jelen a sejttenyésztő folyadéokban (> 1 000 ng/mg), azonban ez szűréssel jelentősen csökkenthető. A dsDNS mennyiségi meghatározását *dsDNA assay kit* segítségével szokták végezni, míg a minőségi meghatározását kvantitatív polimeráz-láncreakció (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) módszerrel.[38]

3. CÉLKITŰZÉS

A monoklonális antitestek, egyre fontosabb szerepet töltenek be a különböző típusú megbetegedések kezelésében, és a folyamatosan növekvő igények miatt elengedhetetlen a gyártási folyamatok fejlesztése. A downstream feldolgozás, különösen a tisztítás, kritikus lépés a megfelelő minőségű termék előállításához, hiszen a fermentléből kinyert antitestek szennyeződésektől való megtisztítása jelentős hatással van a termék hatékonyságára és biztonságára. A hatékonyság növelése és a költségek csökkentése érdekében szükség van az anioncserés kromatográfiás módszerek optimalizálására, különösen az új típusú oszlopok alkalmazásával.

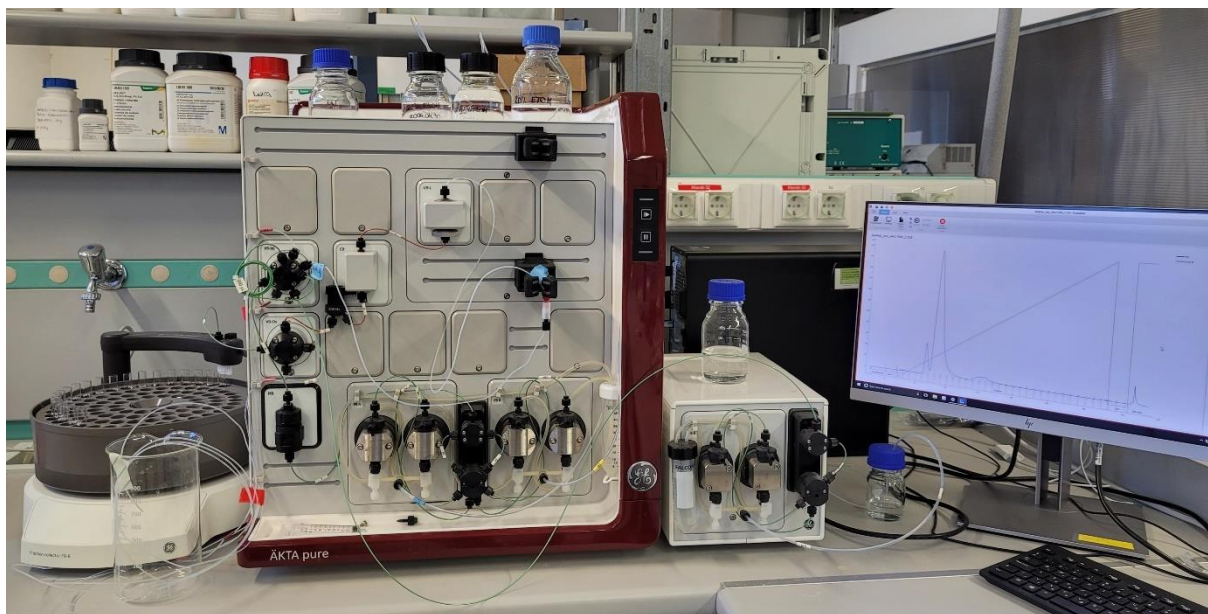
Éppen ezért munkám célja egy hatékony anioncserés kromatográfiás módszer kidolgozása, amely alkalmas a fermentlében található szennyeződésektől megtisztítani az adalimumab antitesteket. A fehérje alapú gyógyszerek egyik kritikus faktora a megfelelő fehérjetartalom mellett a jelenlevő szennyeződés (mint a pl.: dsDNS) és az aggregáció mértéke. A módszerfejlesztést a két alapvető elúciós eljárás: a sógradiens és a pH-gradiens módszer alkalmazásával kezdem egy új típusú anioncserés oszlopon. Első körben a minta pH-jának, illetve az elúció mennyiségének optimalizálását végzem el. Ezt követően a sógradiens optimalizálásához egy kísérletterv alapú módszerfejlesztést tervezek megvalósítani, amely során 3 vizsgált pH-n 6 különböző ionerősségi beállítással végzek kromatográfiás tisztítást. A fejlesztőmunka mellett céloom továbbá a rendszer minél alaposabb megismerése.

A kitűzött céljaim között szerepel az egyes kromatográfiás tisztítások után a kritikus termékjellemző paraméterek vizsgálata, mint a fehérjetartalom, valamint a szennyeződések közül a gazdasejt DNS tartalom vizsgálata, illetve dinamikus fényszórás méréssel a minták méreteloszlásának meghatározása. Munkám során kationcserés és anioncserés kromatográfiás elválasztás módszerfejlesztésével és összehasonlításával foglalkozom, így ezen lépések szennyező tisztítási hatékonyságát tervezem megvizsgálni és statisztikailag értékelni a kapott eredményeket.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. ÄKTA™ pure rendszer

A munkám során a GE Healthcare Life Sciences cég ÄKTA™ pure FPLC rendszerén végeztem a kromatográfiás elválasztásokat. (10. ábra) A berendezés egy munkaállomásból, egy pufferkeverő és vezérlő egységből, egy M9 mixerből, U9-L UV detektorból, C9 vezetőképesség mérőből, különböző szelepekből, oszloptartóból és egy frakciószedőből áll. A munkaállomáson két darab P9 pumpa található, amelyek A és B betűkkel vannak jelölve. Az U9-L UV detektor az oldatok UV jelét 280 nm-es hullámhosszon méri. A C9 jelzésű egység az oszlopból kilépő oldatok vezetőképességét méri. A berendezésen található még egy V9-Inj szelep, ami a minta felvitelét biztosítja az oszlopra. *Loop F*, *Loop E*, *W1*, *W2*, *Col*, *Syp*, *Syr* és *Sap* állásokban használható. Emellett található még egy szelep, ami a kolonnáról távozó oldatot tudja négy különböző ágon elvezetni; *Frac*, *In*, *Out* és *W* állásokban. A rendszert számítógépről vezéreltem a Unicorn 7.2 nevű program segítségével.



10. ábra ÄKTA™ pure FPLC rendszer

4.2. Kationcserés kromatográfiás tisztítás

Ehhez a lépéshez szükséges volt előzetesen a mAb-ot tartalmazó fermentlevek affinitás kromatográfiás tisztítására. Az így megtisztított mAb oldatot használtam a kationcserés tisztításra, amelyhez a kutatócsoportunk által kifejlesztett módszert alkalmaztam.[52]

4.2.1. Felhasznált oldatok

Ekvilibráló puffer:	20 mM Na-citrát pH=4,5
Mosópuffer:	20 mM Na-citrát pH=4,5
Elúciós puffer:	A eluens: 20 mM Tris puffer pH=7,0 B eluens: 20 mM Tris puffer pH=9,1 + 500 mM NaCl
CIP oldatok:	2,0 M-os NaCl, 1,0 M-os NaOH oldat
Tároló oldat:	20%-os etanol oldat

4.2.2. Kationcserés kromatográfiás oszlop töltése

A kationcserés tisztítási lépésekhez PALL Life Sciences 10 x 120 mm-es oszlopot használtam. Töltésként a Thermo Fisher Scientific cég POROSTM 50 HS típusú erős kationcserélő gyantáját használtam.[53] Az általam töltött oszlop térfogata 5,0 ml.

4.2.3. Protokoll a töltött oszlopra

Oszlop előkészítése (ekvilibrálás):

Az oszlopot hűtőben tároltam 4 °C-on, 20%-os etanol oldattal feltöltve. A mintafelvétel előtt ezért szükséges a tárolóoldat lemosása és az oszlop előkészítése. Először 1 CV UP (ultratiszta, *ultrapure*) vízzel, majd 3 CV ekvilibráló pufferrel mostam az oszlopot. Az oszlophoz 1 ml/perc áramlási sebességet választottam.

Mintafelvétel:

A mintafelvétel térfogata 5,5 ml volt. A minta felvitele az ekvilibrálással azonos sebességgel történt.

Mosás:

A *Sample* ágban maradt minta felmosása érdekében az oszlop mosása 3 CV ekvilibráló pufferrel történt.

Elúció:

A lineáris gradiens elúció során a 20 mM Tris puffer oldatról (pH=7,0) a 20 mM Tris puffer (pH=9,1) + 500 mM NaCl oldatra változott. Majd, amikor elérte a 100%-ot a gradiens, 1 CV oldatot még felvittem az oszlopra a B oldatból.

CIP:

A CIP tisztítás célja a maradék szennyeződés és nem eluálódott mAb eltávolítása az oszlopról. Ezt 2 CV NaCl oldattal és 2 CV NaOH oldattal végeztem.

Reekvilibrálás:

A CIP tisztítást követően szükséges az oszlop, tárolás előtti reekvilibrálása. Ez 3 CV ekvilibráló pufferes, valamint 2 CV 20%-os etanolos mosást jelent. Ezt követően az oszlopot visszatettem a hűtőbe (4 °C) a következő használatig.

4.3. Anioncserés kromatográfiás tisztítás

Az anioncserés kromatográfiás méréshez szintén szükség volt a mAb-ot tartalmazó fermentlevek affinitás kromatográfiás tisztítására, illetve a minta puffercseréjére, amelyhez az Amicon® Ultra-15 30K centrifugacsövet használtam.[54] Az így megtisztított és puffercserélt mAb oldatot használtam az anioncserés tisztításra. Főleg egy online javasolt módszer alapján indultam el, majd készítettem el a protokollt.[55,56]

4.3.1. Felhasznált oldatok

Ekvilibráló puffer: 10 mM Tris-HCl (A pH kísérletenként változott.)

Mosópuffer: 10 mM Tris-HCl (A pH kísérletenként változott.)

Elúciós puffer: Kísérletenként változott.

CIP oldatok: 500 mM NaOH

Tároló oldat: 20%-os etanol oldat

4.3.2. Anioncserés kromatográfiás oszlop

Az anioncserés tisztítási lépésekhez 1 ml-es Skillpak TOYOPEARL NH₂-750F töltetes oszlopot használtam.[57] (11. ábra) A NH₂-750F töltet egy gyenge anioncserélő, porózus és gömb alakú polimerből áll, szemcsemérete pedig 30-60 µm-es tartományban mozog.[58]



11. ábra SkillPak 1 ml-es TOYOPEARL NH2-750F töltetes oszlop

4.3.3. Protokoll az anioncserés kromatográfiás oszlophoz

Oszlop előkészítése (ekvilibrálás):

Az oszlopot hűtőben tároltam 4 °C-on, 20%-os etanol oldattal feltöltve. A mintafelvétel előtt ezért szükséges a tárolóoldat lemosása és az oszlop előkészítése. Először 1 CV UP vízzel, majd 5 CV ekvilibráló pufferrel mostam az oszlopot, hogy kellően lemossam a tárolóoldatot. Az oszlophoz 1 ml/perc áramlási sebességet választottam.

Mintafelvétel:

A mintafelvétel térfogata mindig pontosan 4,0 ml volt. A minta felvitele 0,25 ml/perc-es sebességgel történt.

Mosás:

A *Sample* ágban maradt minta felmosása érdekében az oszlop mosása 2 ml ekvilibráló pufferrel történt.

Elúció:

Munkám egyik fő célkitűzése ennek optimalizálása volt, így kísérletenként változott.

CIP:

A CIP tisztítás célja a maradék szennyeződés és nem eluálódott mAb eltávolítása az oszlopról. Ezt 5 CV 500mM-os NaOH oldattal végeztem.

Reekvilibrálás:

A CIP tisztítást követően szükséges az oszlop, tárolás előtti reekvilibrálása. Ehhez 5 CV 20%-os etanolos oldatot alkalmaztam. Ezt követően az oszlopot visszatettem a hűtőbe (4 °C) a következő használatig.

4.4. HPLC méretkizárásos kromatográfiás tisztítás

Az ioncserés kromatográfia során gyűjtött minták tisztaságának ellenőrzésére méretkizárásos kromatográfiát (SEC) alkalmaztam, amelyet egy Agilent 1260 Infinity II típusú HPLC-vel valósítottam meg. A méréshez SEC A méréshez SEC kolonnát (TSKgel G3000SWx1, 7,8mm(D)x300mm(L), 5µm (d) - GFC) alkalmaztam 0,2 M nátrium-foszfát (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4) pufferből (pH=6,8) álló mozgófázissal kombinálva, amely alkalmas 10-500 kDa méretig a molekulák elválasztására. A fehérjemintákat injektálás előtt 0,45 µm-es szűrőn (Millipore) szűrtem. A mintákból 20 µl-t injektáltam az oszlopra, és az elválasztást 1 ml/perc áramlási sebességgel végeztem. A detektálás UV-abszorpció alapon történt, a fehérjék detektálására alkalmas 280 nm-en.

A méretalapú elválasztás lehetővé tette egy kalibrációs görbe létrehozását, amely ismert koncentrációjú, adalimumab referenciaoldat sorozat hígítása alapján készült. Ezt használtam fel az adalimumab koncentrációjának és a szennyezők százalékos arányának becslésére az ismeretlen mintákban.

1. táblázat HPLC mérés paraméterei

Mozgó fázis	0,2M nátrium-foszfát puffer (pH=6,8)
Áramlási sebesség	1,0 ml/perc
Elválasztás módja	Izokratikus elválasztás
Oszlop hőmérséklete	25 °C
Mintatér hőmérséklete	25 °C
Injektálási térfogat	20 µl
Oszlop nyomása	~ 60 bar
Detektálás	UV, 280 nm
Stop time	20 perc
Retenció idő	~ 7,9 perc

4.5. dsDNS szennyező mérés

A dsDNS szennyező méréséhez az Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Reagent and Kit készletet használtam. Ez egy in vitro immunvizsgálati módszer, amely gazdasejtből származó DNS szennyező mennyiségének vizsgálatára szolgál, egy ultraérzékeny fluoreszcens nukleinsavfesték segítségével. A Kit három oldatot tartalmaz: Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNS reagens, 20X TE puffer (200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH=7,5) és Lambda DNS standard.

Elkészítettük a leírat alapján a szükséges oldatokat, a kalibrációs sort és a mintáink tízszeres hígítását. A microplate assayhez egy 96 well-es platet használtam, majd alapos összekeverés után 2–5 percig szobahőmérsékleten inkubáltam, megfelelő fényvédelem mellett. A gerjesztés 480 nm hullámhosszon történt és a fluoreszcencia emisszió intenzitását 520 nm hullámhosszon mértem spektrofluorométerrel.[59]

4.6. Dinamikus fényszórás mérés

A tisztított minták részecskeméret-eloszlását fotonkorrelációs spektroszkópia alkalmazásával határoztam meg Zetasizer NanoZS készülék (Malvern Instruments, Malvern, Egyesült Királyság) segítségével. A fényszórás mérést 25 °C-on, 90°-os szórási szög mellett 3 párhuzamossal végeztem el és a fehérjeminták elemzéséhez alkalmazható L-Curve analízist használtam.

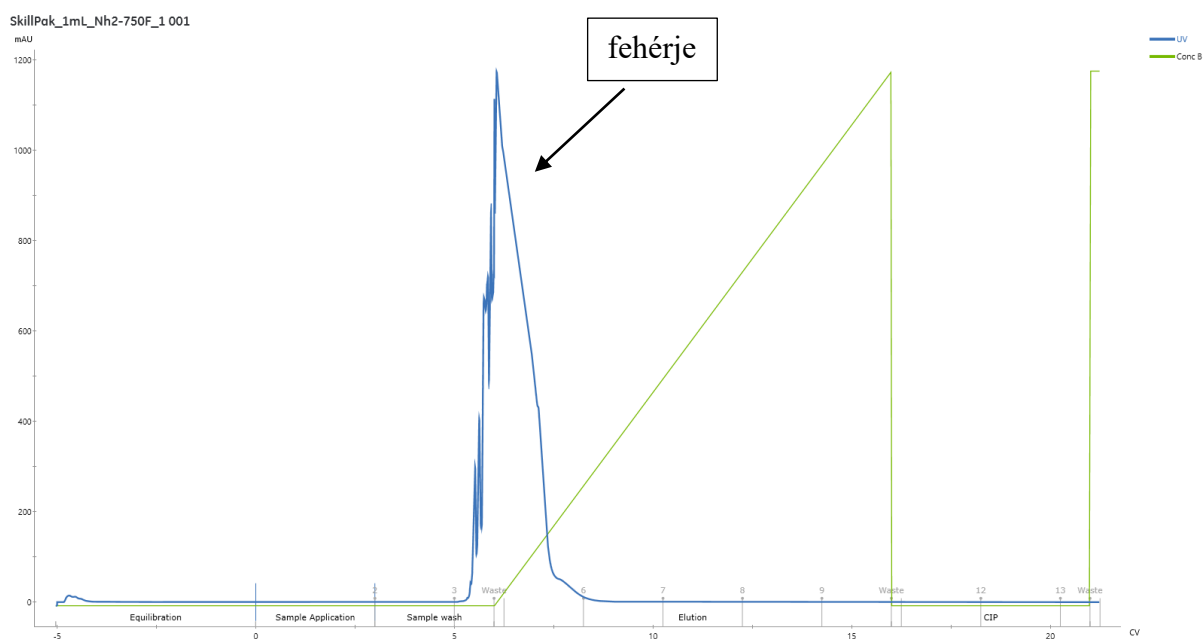
5. EREDMÉNYEK

A munkám célja ioncserés kromatográfia alkalmazása volt az adalimumab fehérje tisztítására, a rendszer vizsgálatával pedig egy hatékony elválasztási módszer kidolgozása anioncserés kromatográfias oszlopra. A módszerfejlesztés lépéseit a 4.3. *Anioncserés kromatográfias tisztítás* fejezetben leírtak szerint végeztem el.

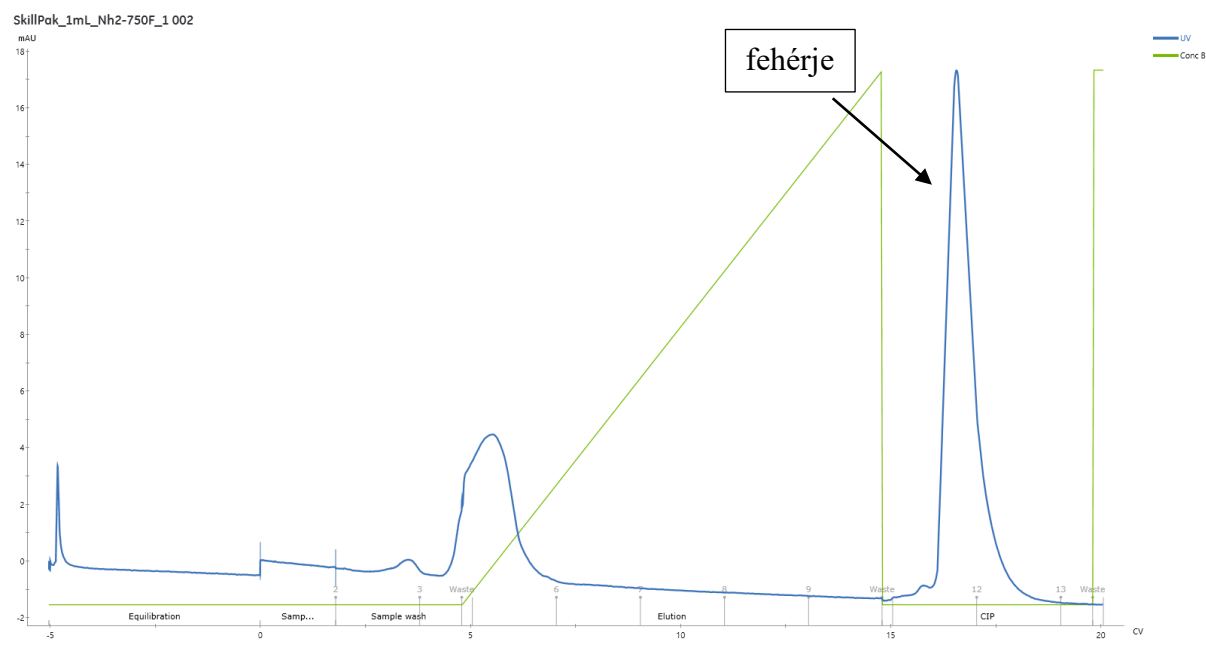
Az anioncserés kromatográfias oszlop módszerfejlesztése során feladatom volt, hogy az elúció mennyiségét, illetve a megfelelő sógradienst meghatározzam a fehérje és a szennyezők elválasztására különböző pH értékeken. 7,0-es, 8,0-as és 9,0-es pH-n végeztem a kísérleteket, ugyanis az adalimumab pI pontja 8,7-8,9-es tartományban található.[60]

5.1. Előkísérletek

A rendelkezésre álló adatok alapján az anioncserés kromatográfias oszlopnál elsőként a gyártói ajánlás alapján végeztem a tisztítást. 10 CV-s elúcióval kezdtem a méréseket 8,0-as és 9,0-es pH-n, amely során a mintát bármiféle előzetes mintaelőkészítés nélkül vittem fel az oszlopra. Az elúcióhoz az A eluensnek 10 mM-os Tris-HCl oldatot, a B eluensnek pedig 10 mM-os Tris-HCl + 500 mM NaCl-os oldatot alkalmaztam.[61] A két pH-n elvégzett kísérletek kromatogramjai a 12. és 13. ábrán láthatóak, nyíllal jelölve a fehérjéhez tartozó csúcsot. (Minden feltüntetett FPLC kromatogramon az x tengely a CV [ml], míg az y tengely az intenzitás [mAU].)



12. ábra 8,0-as pH-n végzett előkísérlet kromatogramja (10 CV, minta pH nincs beállítva, A eluens: 10 mM Tris-HCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl)

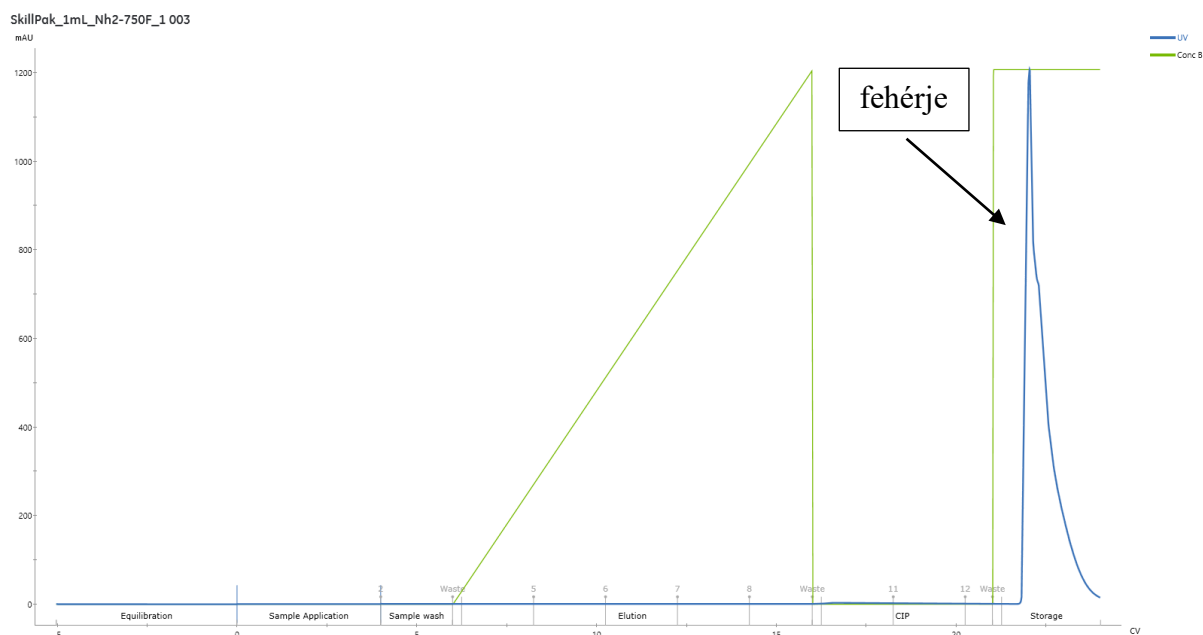


13. ábra 9,0-es pH-n végzett előkísérlet kromatogramja (10 CV, minta pH nincs beállítva, A eluens: 10 mM Tris-HCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl)

A 12. ábrán látható, hogy a 8,0-as pH-n végzett tisztítás nem volt megfelelő, hiszen a fehérje már a gradiens elúció előtt átesett az oszlopon. Míg a 9,0-es pH-n végzett előkísérlet kromatogramján (13. ábra) az figyelhető meg, hogy a minta az elúció során nem vált le az oszlopról, hanem csak az oszlop tisztítási lépésében eluálódott. Ezen eredmények alapján azt a következtetést tudtam levonni, hogy szükséges a módszer optimalizálása. Az optimalizálás első lépéseként elvégeztem az adalimumab tartalmú minta pH-jának beállítását.

5.1.1. A minta pH-jának optimalizálása

A következő lépésben a mintaelőkészítéssel kiegészítve végeztem el a kísérleteket. A minta megfelelő pH-ra való beállítását puffercserével végeztem el, amely során adott mennyiségű mintát a kívánt pH-jú 10 mM-os Tris-HCl oldattal hígítottam és egy 30kDa-os PES szűrőn centrifugálás során átszűrtem. A centrifugálás után a maradék oldatot kipipettáztam, a hígító oldattal átmostam a szűrőt és a tisztításhoz szükséges térfogatra hígítottam. A minta pH-jának optimalizálása során a tisztítást 9,0-es pH-n végeztem úgy, hogy a minta pH-ját változtattam. (14. ábra és F1.-F3. ábrák).



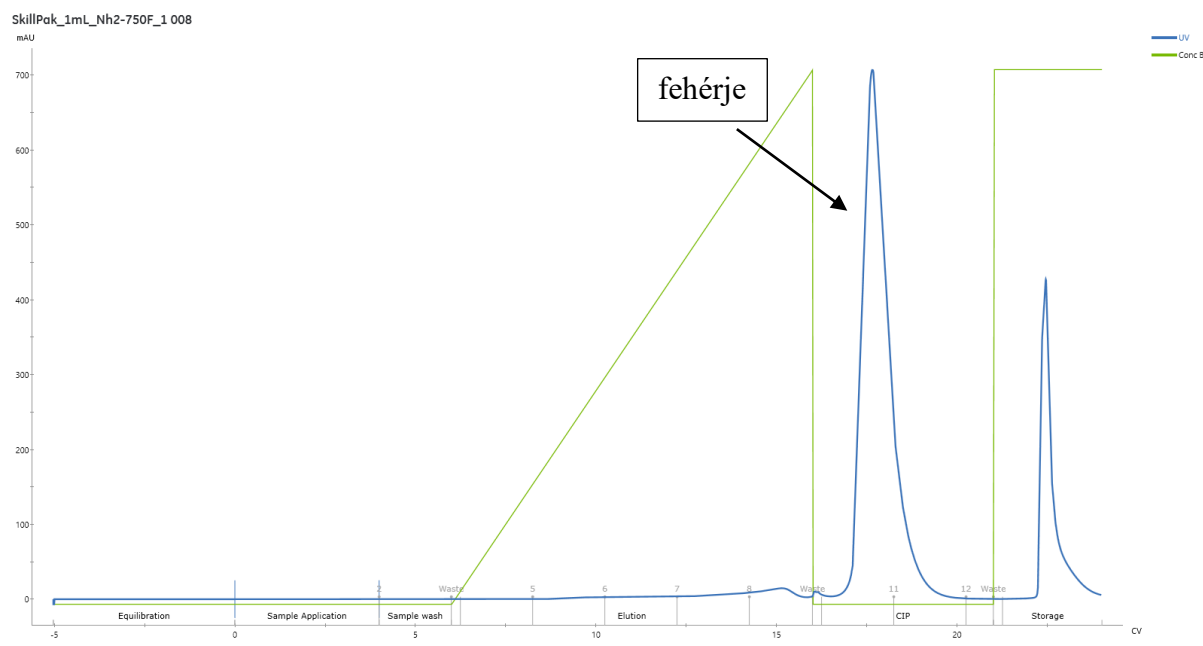
14. ábra 9,0-es pH-n végzett előkísérlet kromatogramja (10 CV, minta pH=9,0

A eluens: 10 mM Tris-HCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl)

Az eredmények alapján azt tapasztaltam, hogy a minta pH-jának változtatása nem javított a módszeren. 8,0-as pH-n is elvégeztem egy tisztítást, 8,0-as minta pH-val (F9. ábra), viszont itt is hasonló eredményt kaptam, így más úton haladtam tovább a módszerfejlesztésben.

5.1.2. Az elúció paramétereinek optimalizálása

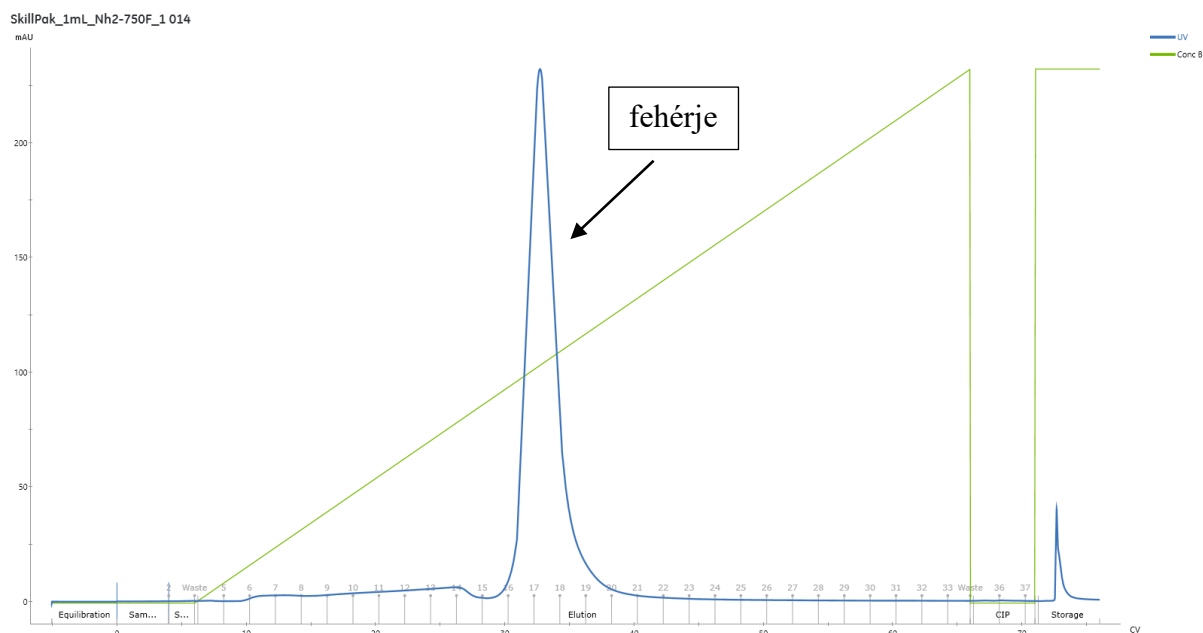
A következő lépésben az elúcióhoz használt oldatok összetételén változtattam úgy, hogy a tisztítás során a minta pH-ját a továbbiakban az elúcióhoz használt oldatok pH értékével megegyezőre állítottam. Ezen optimalizáció során első körben a B eluens ionerősségét növeltem 1,0 M NaCl-ra (15. ábra).



15. ábra 8,0-as pH-n végzett előkísérlet kromatogramja (10 CV, minta pH=8,0
A eluens: 10 mM Tris-HCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)

Az ionerősség növelésének hatására a kromatogramon látható változás történt (két csúcs figyelhető meg), viszont látható, hogy még mindig a tisztítási, illetve a tároló oldatban jött a fehérjéhez tartozó csúcs, így szükség volt még az elúciós lépés további optimalizálására. Az oldatok ionerősségének változtatásán túl az elúció idejének növelése ezáltal egy lassabb gradiens alkalmazása segíthet a fehérje oszlopról történő megfelelő leválásában, így a következőkben ezzel kísérleteztem.

További méréseim során az elúció hosszának elsőként 15, majd 20 CV-t alkalmaztam (F10. és F11. ábra), ezek már nagymértékű javulást eredményeztek a fehérje elúciójában, viszont még mindig további elúciós idő növelésre volt szükség. Azt tapasztaltam, hogy 60 CV-n keresztül tartó elúció (16. ábra) bizonyult a legmegfelelőbbnek, hiszen a fehérjéhez tartozó csúcs már az elúcióban jött, így a következő lépés a sógradiens fejlesztése volt.

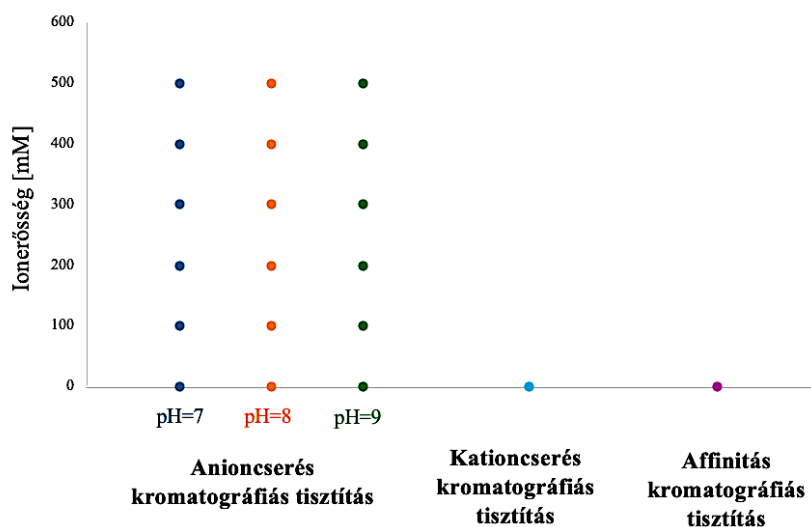


16. ábra 8,0-as pH-n végzett előkísérlet kromatogramja (60 CV, minta pH=8,0

A eluens: 10 mM Tris-HCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)

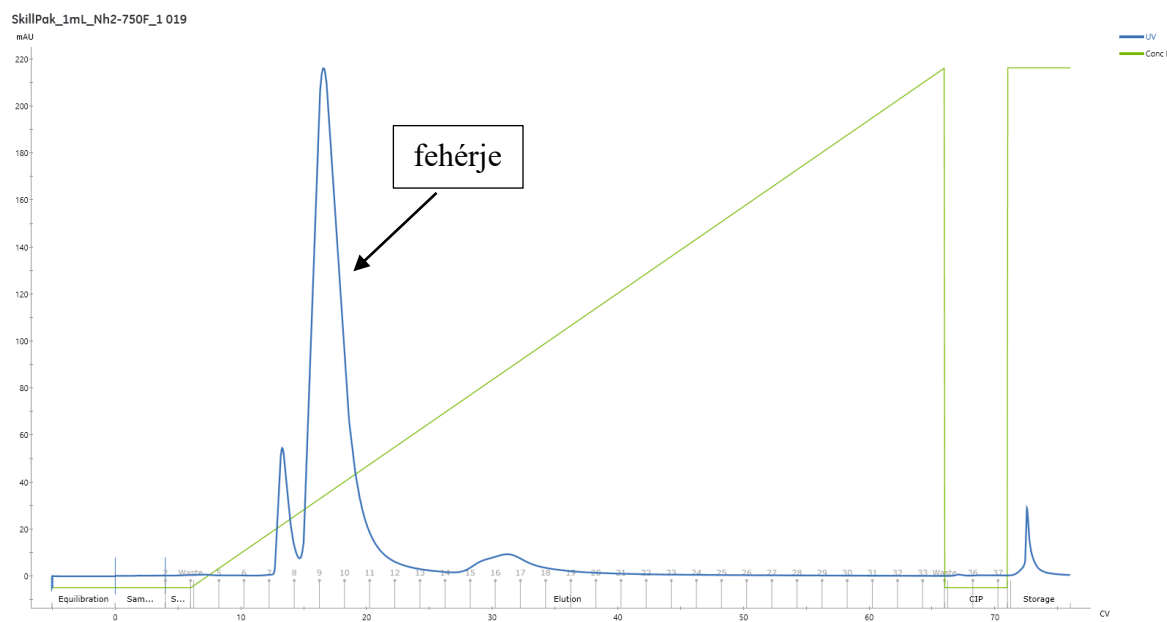
5.2. Sógradiens elúció

A sógradienst az A eluens összetételével optimalizáltam. B eluensnek minden mérésnél 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl oldatot használtam, A eluensnek pedig a 10 mM Tris-HCl oldathoz 0-500 mM-ig változtattam a sókoncentrációt 100 mM-ként növelve. Mindhárom pH-n elvégeztem a kísérleteket. A kísérletek számát és a mérés során lévő kritikus paraméterek különböző beállítási szintjeit a 17. ábrán vizuálisan is szemléltetem, illetve táblázatokban összefoglalva megtalálhatók a paraméterek a függelékben. (F1.-F5. táblázatok)



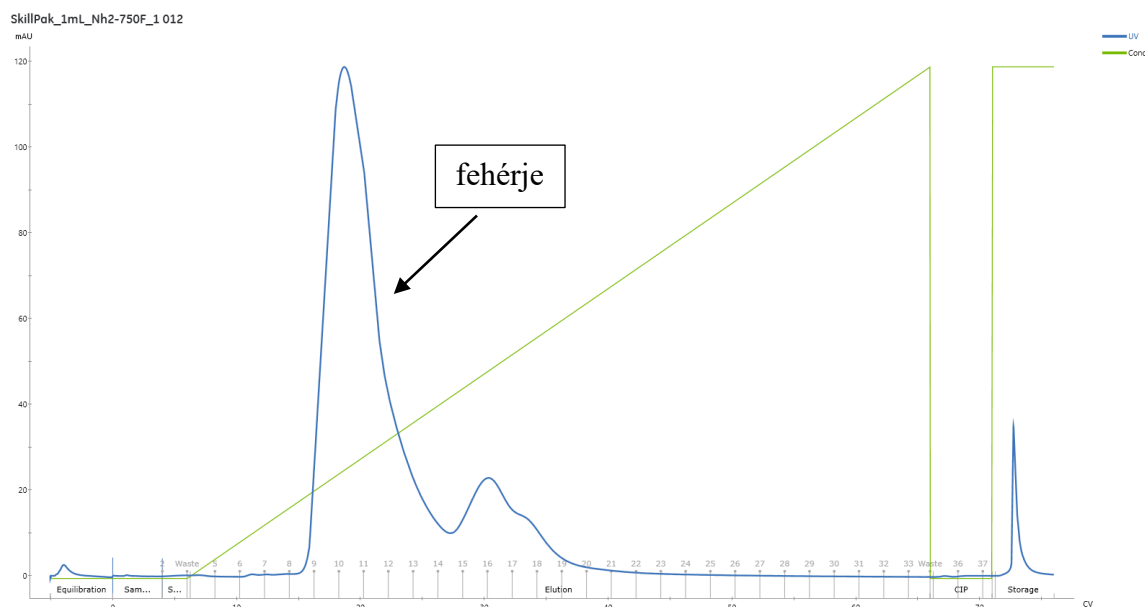
17. ábra A kísérletek száma és a kritikus paraméterek különböző beállítási szintjei

A mérések során a legtöbb esetben a 16. ábrához hasonló kromatogramot kaptam, (F12. és F13. ábrák) amelyeken egy csúcs található, amiből pedig megállapítható, hogy ezen esetekben a fehérje és a szennyező nem vált el. Viszont jelentős változás történt, amint elértem a 300 mM-os koncentrációt, ahol már több csúcs volt megfigyelhető a kromatogramokon (18. és 19. ábrák). 400 és 500 mM-os NaCl koncentrációval is végeztem méréseket, majd a minta fehérje és szennyező tartalmát további módszerekkel vizsgáltam annak eldöntésére, hogy melyik módszer bizonyul a legmegfelelőbbnek fehérjetisztításra.



18. ábra 9,0-es pH-n végzett mérés kromatogramja (60 CV, minta pH=9,0

A eluens: 10 mM Tris-HCl + 300 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)

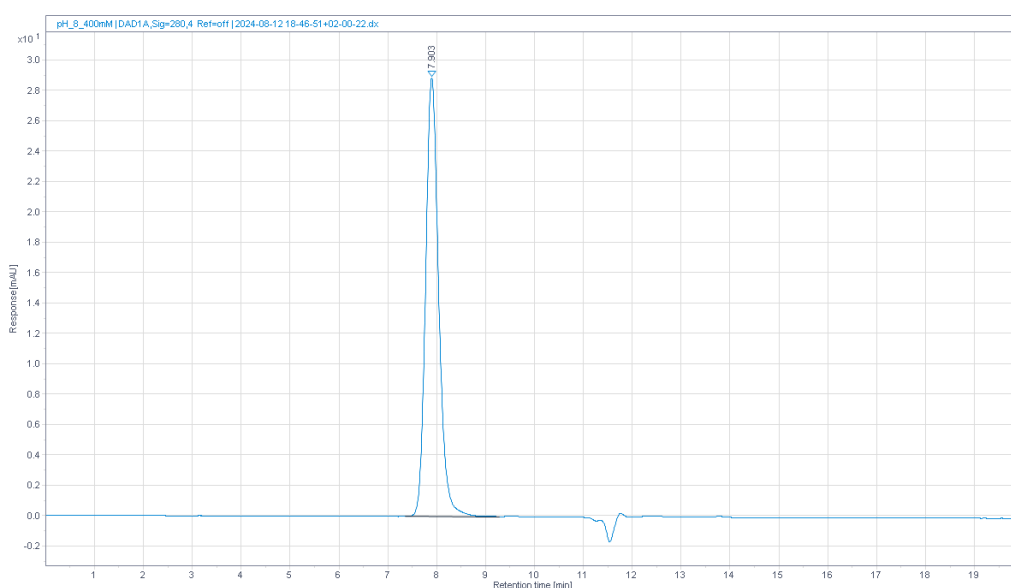


19. ábra 8,0-as pH-n végzett mérés kromatogramja (60 CV, minta pH=8,0

A eluens: 10 mM Tris-HCl + 300 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)

5.3. Fehérjekoncentráció és aggregáció meghatározása SEC mérésekkel

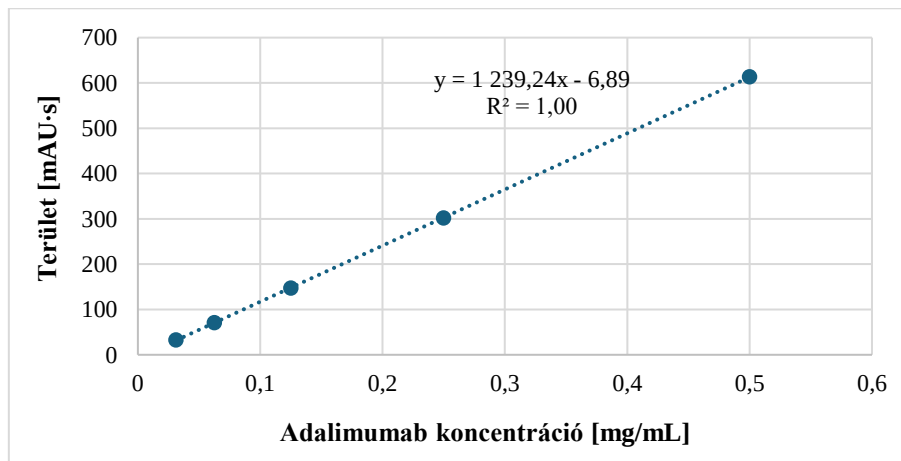
A HPLC-SEC mérésekkel határoztam meg a fehérjekoncentrációt, illetve ellenőriztem a mintáim tisztaságát. A SEC oszlop védelme érdekében a kezeletlen fermentlé tisztítását nem vizsgáltam. A minták mérése előtt elvégeztem egy molekula standard mérést, valamint egy kalibrációs egyenest vettem fel az adalimumab standard oldat hígítási sorával. Az adalimumab standard alapján az adalimumabnak 8,0 perc körüli retenciós ideje van. A 20. ábrán látható a 8-as pH-n és 10 mM Tris-HCl + 400 mM NaCl oldattal elvégzett tisztítás során kapott minta HPLC kromatogramja, amelyben semmilyen szennyező nem látható. A többi kromatogram a függelékben megtalálható. (F22. - F38. ábra)



20. ábra HPLC kromatogram (8,0-as pH-n végzett mérés, 60 CV, minta pH=8,0

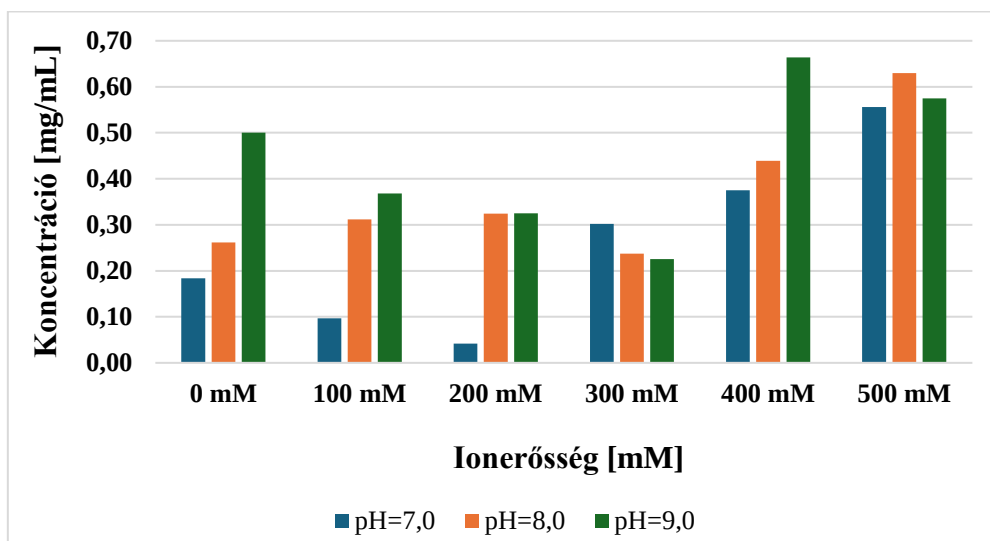
A eluens: 10 mM Tris-HCl + 400 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)

A minta adalimumab koncentrációját a standard hígítási sorból készített kalibrációs egyenes segítségével számítottam ki, amely az 21. ábrán látható.



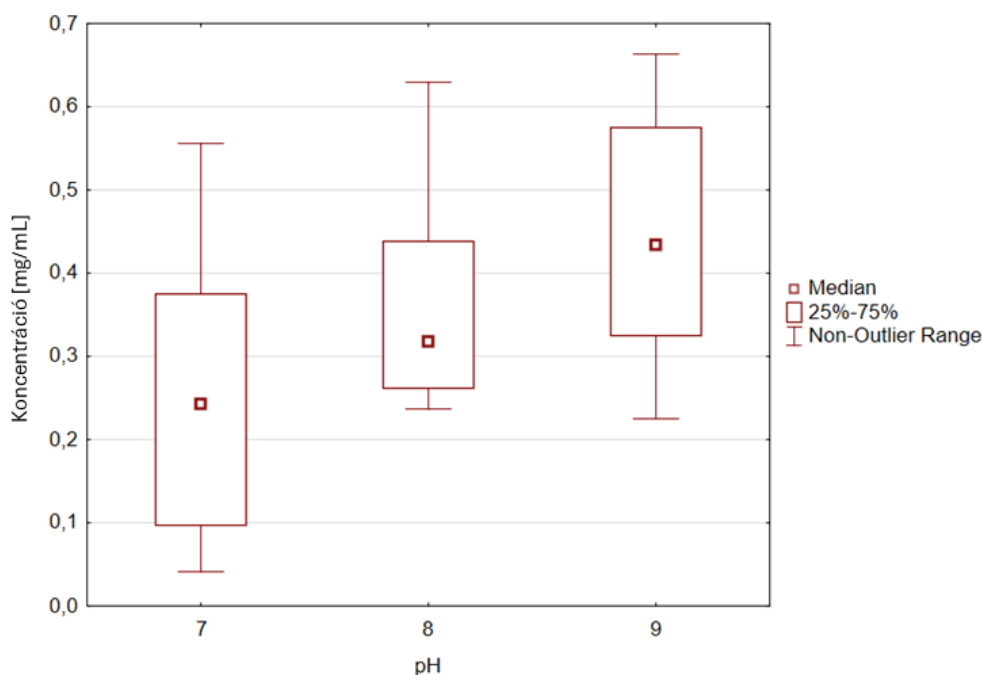
21. ábra HPLC mérés kalibrációs görbéje

Az így meghatározott fehérjekoncentrációkat a 22. ábrán tüntettem fel együttesen. (Az adatokat lásd F6. táblázat.)



22. ábra Összesített HPLC eredmények

Az eredmények alapján elmondható, hogy minden pH-n, a 400 és 500 mM ionerősség mellett végzett tisztítások eredményezték a legmagasabb adalimumab koncentrációt. Annak érdekében, hogy megállapítsam, hogy a pH-nak és az ionerősségnek milyen hatása van a fehérje koncentrációjára, statisztikai elemzést is végeztem a Statistica szoftverrel (14.1. verzió). A hatások vizsgálatára két rögzített faktoros (pH és ionerősség) varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztam. Először a pH faktor hatásának vizsgálatára elkészítettem a box-plotot (23. ábra).



23. ábra Box-plot ábra a pH hatásának vizsgálatára

A box-plot ábrán látható, hogy a fehérjekoncentrációban a pH növelésével egy növekvő tendencia figyelhető meg, a 9,0-es pH mediánja veszi fel a legnagyobb értéket, azaz ezen a pH-n végzett tisztításokkal kaptam a középértéket tekintve a legnagyobb fehérjekoncentrációt. A legnagyobb koncentráció érték a 9,0-es és 8,0-as pH-n közel azonos, viszont a 8,0-as pH-n az interkvartilis terjedelem (azaz a doboz szélessége) jóval kisebb tartományban helyezkedik el. Megjegyzendő, hogy ismételt mérések hiányában a dobozok szélességét az ionerősség szintjeinek különbözőségéből származó ingadozás is adja. A varianciaanalízis eredményeit a 2. táblázatban foglaltam össze.

2. táblázat ANOVA elemzés eredményei

Effect	SS	Szabadsági fokok száma	MS	F	p
Intercept	2,28813	1	2,28813	231,19	0,0000
pH	0,10201	2	0,05101	5,15	0,0290
Ionerősség	0,32699	5	0,06540	6,61	0,0058
Error	0,098973	10	0,00990		

A fenti ANOVA táblázatból leolvasható, hogy mind a 2 faktor (pH és Ionerősség) p -értéke kisebb, mint az α (0,05) szignifikancia szint. Ez azt jelenti, hogy a pH-nak és az ionerősségnek statisztikailag szignifikáns hatása van az adalimumab koncentrációra. A köztük levő kölcsönhatást azonban ismételt mérés hiányában nem tudtuk elemezni, hiszen a minták tisztításánál nem tudunk párhuzamos méréseket végezni a fermentlé korlátozott mennyisége miatt. A varianciaanalízis szokásos feltételei (a hibatag normális eloszlása, homoszkedaszticitás, függetlenség) a reziduum-ábrák alapján teljesülnek. (F39. ábra)

Néhány mérés esetében a HPLC-SEC mérések során kismértékű szennyezők jelentek meg a kromatogramokon. Az adalimumabnál nagyobb méretű szennyeződések és az antitest aggregátumok korábban eluálódnának az oszlopról, amelyet a legtöbb minta esetében tapasztaltam. Néhány esetben szennyezőt fedeztem fel a kromatogramon, amelyek az antitest után eluálódtak, azaz a fehérjénél kisebb méretű szennyeződések voltak. A szennyezőket csak 11 percig vettem figyelembe, mivel 11-12 perc között a kromatogramokon is látható egy völgyszerű „törés”, amely a vízjel, azaz oldószerhez tartozó jel, ami az injektált minta esetében a legkisebb molekula. Az ennél kisebb csúcsok pedig feltehetően az oszloppal kölcsönhatásba lépő molekulákhoz tartoznak. Mivel nem ismertek a pontos szennyezők, ezért a görbe alatti

területek összehasonlításával jellemeztem a különböző tisztítási módszereket, azaz szennyező területét a főcsúcs területéhez arányosítottam, ezeket az adatokat a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat Szennyező területe a főcsúcs területéhez arányosítva

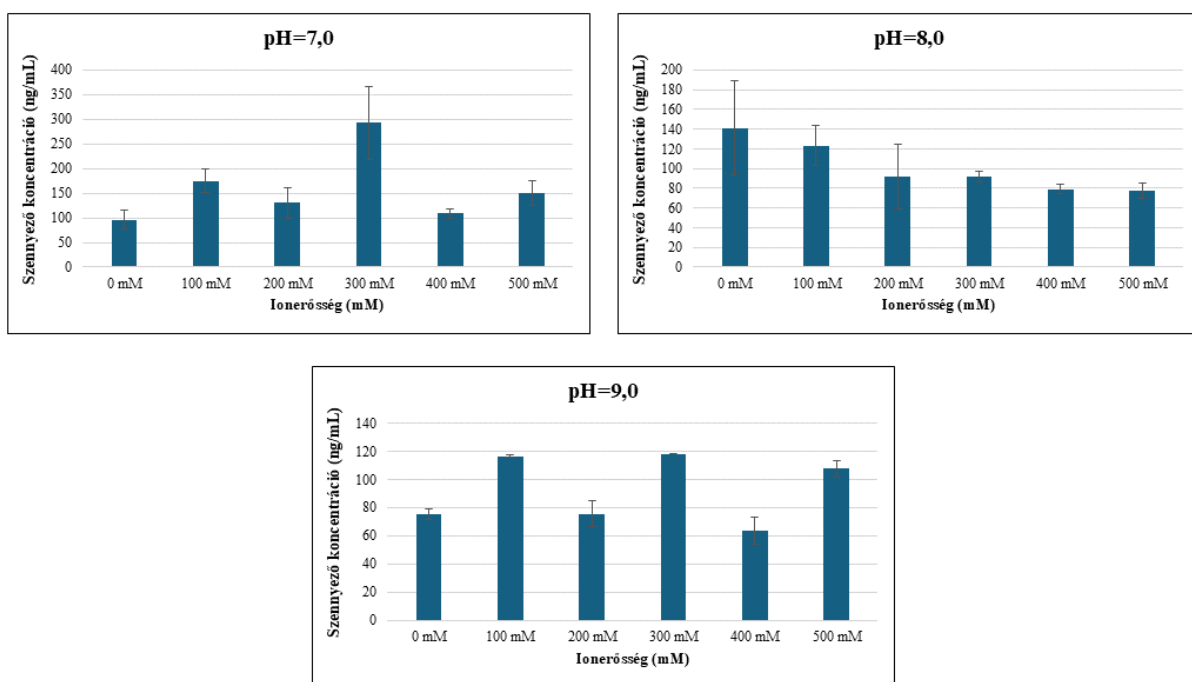
Retenció idő [perc]	~6,6	9,51	10,115	10,30
pH=7,0 (200 mM)	0,53%	0,53%		0,55%
pH=7,0 (500 mM)	0,88%			
pH=8,0 (0 mM)	1,28%			
pH=8,0 (100 mM)	1,23%			
pH=8,0 (200 mM)	1,50%			
pH=8,0 (300 mM)	0,82%		2,37%	
pH=8,0 (500 mM)	1,27%			
pH=9,0 (0 mM)	1,60%			
pH=9,0 (100 mM)	1,34%			
pH=9,0 (200 mM)	1,26%			
pH=9,0 (300 mM)	0,29%			
pH=9,0 (400 mM)	0,96%			
pH=9,0 (500 mM)	1,33%			
POROS HS50	0,74%			

Elmondható, hogy a jelenlévő szennyezők legnagyobb része a fehérje előtt eluálódik, ami aggregátumokra utal. Az aggregátumok a fehérjék és biohatóanyagok egyik leggyakoribb szennyezői, bár ezen szennyezők szinte minden mintában jelen vannak, a mennyiségük rendkívül alacsony, a legnagyobb aggregátummennyiség is csak 1,5% a főcsúcs területéhez viszonyítva. Az aggregátumok mennyiségének minimalizálása fontos a termék stabilitásának biztosításának érdekében, valamint az immunogenitás elkerülése érdekében. Az irányelvek szerint az aggregátumok mennyiségét a lehető legkisebb szintre kell csökkenteni, általában 0,5-2% közötti értékekkel.[62] Bár ezen mérés a szennyezőkre nézve nem egy kvantitatív módszer, viszont az irányelveket alapján a főcsúcs területéhez viszonyítva a tisztításaink során kapott

aggregátummennyiség alacsonynak tekinthető. Viszont annak érdekében, hogy még pontosabb képet kapjak a minták szennyező tartalmáról, a dsDNS szennyező tartalmát is megvizsgáltam a mintákban.

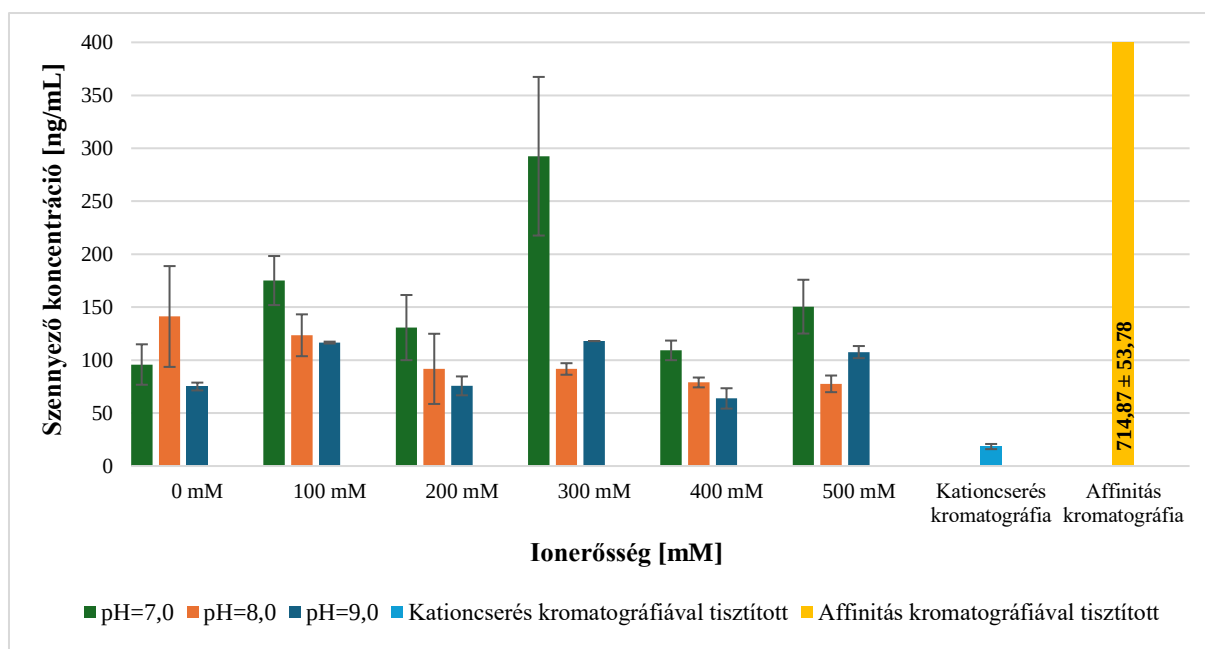
5.4. dsDNS szennyező mérése

A dsDNS méréssel határoztam meg a mintákban levő szennyezők mennyiségét, amelyhez ebben az esetben is szükség volt egy kalibrációs egyenes felvételére. A kalibrációval kiszámított szennyező koncentrációkat különböző pH értékeken külön-külön is ábrázoltam, amely a 24. ábrán látható.



24. ábra Kalibrációval kiszámított dsDNS szennyező koncentrációk

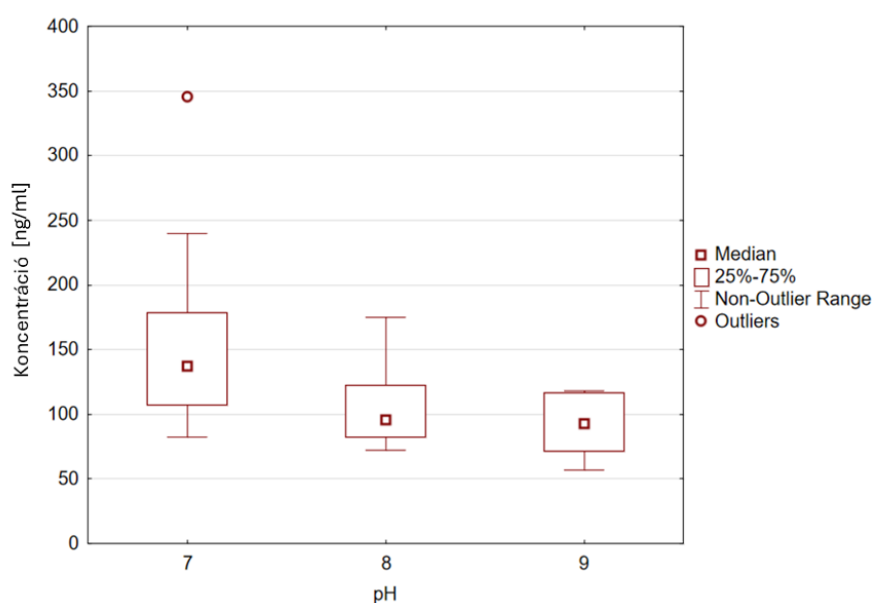
Annak érdekében, hogy a módszer hatékonyságát értékelni tudjam, a mintákat megtisztítottam egy már kifejlesztett kationcserés módszerrel is, és az így kapott minta szennyezőtartalmát is meghatároztam (25. ábra kationcserés kromatográfiás oszlop), valamint ioncserés tisztítás nélküli minta szennyezőtartalmát is meghatároztam (25. ábra affinitás kromatográfiás oszlop).



25. ábra dsDNS összesített eredmény

Megfigyelhető az ábrán, hogy a 7,0-es pH-n végzett eredmények változó tendenciát mutatnak, míg a 8,0-as pH-n egy csökkenő trendet lehet felfedezni az ionerősség növelésével a szennyező koncentrációban, addig a 9,0-es pH-n kapott értékek nem mutatnak egyértelmű tendenciát. Látható, hogy az ioncserés tisztítás nélküli mintához képest lényegesen sikerült csökkentenem a szennyezők mennyiségét.

Ebben az esetben is kiértékeltem statisztikailag a kapott eredményeket a Statistica program segítségével. Ismét kétfaktoros ANOVA elemzést végeztem el a kapott dsDNS eredményeken. Első lépésként szintén megvizsgáltam az adatsorból készített box-plot ábrát. (26. ábra)



26. ábra dsDNS szennyezőhöz tartozó box-plot ábra

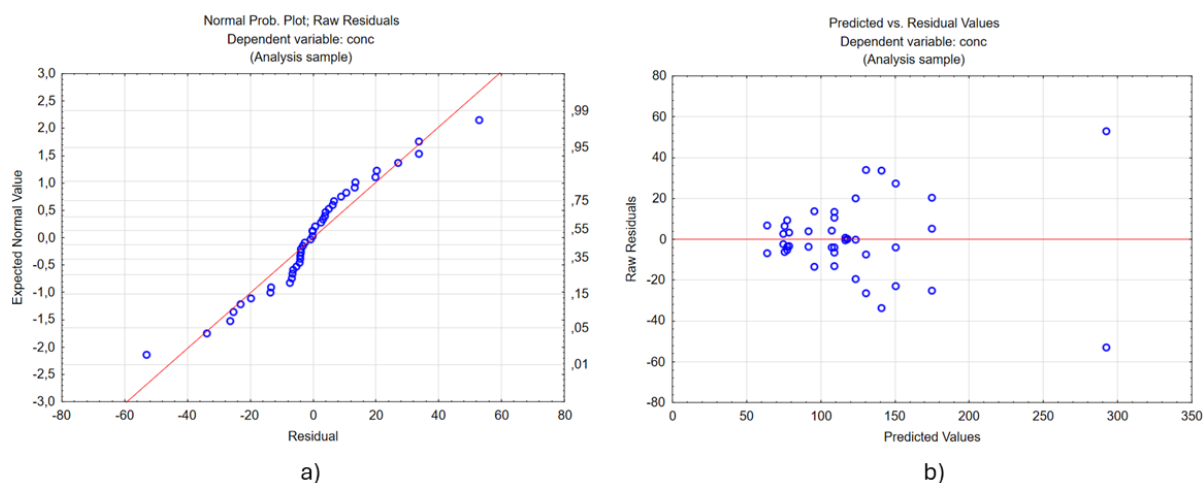
A box-plot ábrán látható, hogy a szennyező mennyisége a pH növelésével csökkenő tendenciát mutat, a 7,0-es pH mediánja veszi fel a legnagyobb értéket, azaz ezen a pH-n végzett tisztításokkal kaptam a középértéket tekintve a legtöbb szennyezőt. A 9,0-es és 8,0-as pH-n közel azonos a medián értéke, viszont ezen a két pH-n az interkvartilis terjedelem kisebb tartományban helyezkedik el.

Majd következő lépésként elvégeztem a két rögzített faktoros (pH és ionerősség) varianciaanalízist, amelynek eredményeit a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat ANOVA elemzés eredményei

Effect	SS	Szabadsági fokok száma	MS	F	p
Intercept	568469,2	1	568469,2	961,61	0,0000
pH	35842,6	2	17921,3	30,32	0,0000
Ionerősség	28193,1	5	5638,6	9,54	0,0000
pH*Ionerősség	37383,5	10	3738,3	6,32	0,0001
Error	14188,0	24	591,2		

A fenti ANOVA táblából leolvasható, hogy mind a 2 faktor (pH és Ionerősség) p -értéke kisebb, mint az α (0,05) szignifikancia szint. Ez azt jelenti, hogy a pH-nak és az ionerősségnek statisztikailag szignifikáns a hatása az szennyező koncentrációra. Ezen mérés esetében a két faktor kölcsönhatása is vizsgálható volt, hiszen ebben az esetben megvalósítható volt a párhuzamos mérések végzése. Látható, hogy a két faktor kölcsönhatásának p -értéke is kisebb mint 0,05 azaz a kölcsönhatás is statisztikailag szignifikáns hatással van a függő változóra. Ezt követően elvégeztem az ANOVA feltételeinek az ellenőrzését, megvizsgáltam a reziduumok normális eloszlását és a varianciák azonosságát. (27. ábra)



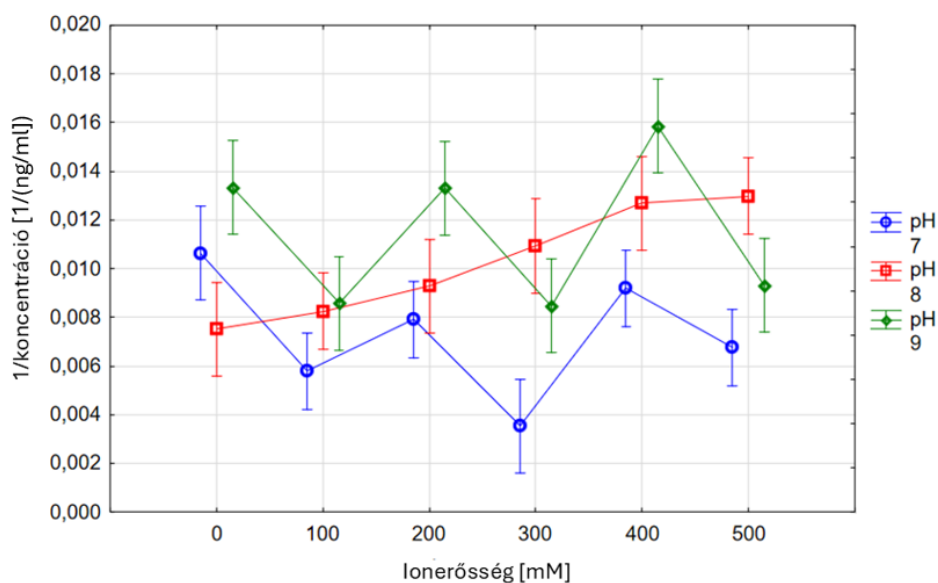
27. ábra Reziduumok normális eloszlása (a) és a varianciák azonossága (b)

Megfigyelhető az ábrákon, hogy a reziduumok enyhe S alakot képezve követik a piros vonalat, valamint a reziduumok a becült érték függvényében nem véletlenszerűen helyezkednek el, azaz egy tendencia lép fel a szóródásukban. Tehát a hibatag varianciájának konstansságára vonatkozó feltétel sérül. Ebben az esetben szükség van az adatok box-cox transzformálására. A Statistica szoftverrel meghatározott transzformáció az $1/y$, vagyis a mérési eredmények reciprokát véve értékeltem ki újra az eredményeket. A kétfaktoros varianciaanalízis eredményeit az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat A kétfaktoros varianciaanalízis eredményei a transzformált adatokkal

Effect	SS	Szabadsági fokok száma	MS	F	p
Intercept	0,0038	1	0,0038	2180,75	0,0000
pH	0,0001	2	0,0001	37,00	0,0000
Ionerősség	0,0001	5	0,0000	14,08	0,0000
pH*Ionerősség	0,0001	10	0,0000	6,43	0,0001
Error	0,0000	24	0,0000		

A fenti ANOVA táblából leolvasható, hogy a transzformálás után is mind a 2 faktor (pH és ionerősség) és a két faktor kölcsönhatásának p -értéke kisebb, mint az α (0,05) szignifikancia szint. Ez azt jelenti, hogy a pH-nak, az ionerősségnek és a kölcsönhatásnak is statisztikailag szignifikáns a hatása az szennyező koncentrációra. Ezután újra ellenőriztem az ANOVA elemzés feltételeit, amelyek a transzformáció után megfelelőnek bizonyultak. (F40. ábra) Diagramon ábrázolva (28. ábra) jobban megfigyelhető a szignifikáns jellege a faktoroknak. Megállapítható, hogy a 8,0-as pH esetén látunk megfelelő tendenciát az ionerősség változtatásával, így ezt a pH-t tartom legjobbnak az adalimumab anioncserés tisztításához. Az ionerősséget tekintve a tisztítás során tapasztaltból, a HPLC-SEC mérés által kapott eredményekből, valamint a szennyező mértékéből arra a következtetésre jutottam, hogy ezen antitest elválasztására a 500 mM ionerősség az optimális.



28. ábra LS-means (least squares means)-plot

Annak érdekében, hogy statisztikailag is összehasonlítsam a különböző tisztítási módszerekkel kapott szennyezőtartalmat, ezáltal a módszerek hatékonyságát értékelhessem, kétmintás *t*-próbával is összevetettem az eredményeimet (a három különböző pH eredményeit összesítve, illetve a 8,0-as és 9,0-es pH legjobb tisztítási módszerét) a kationcserés oszlophoz, illetve az affinitás kromatográfiás tisztítotthoz hasonlítva, amelynek az eredményei a 6. táblázatban látható.

6. táblázat Kétmintás *t*-próba eredményei

	<i>t</i> -próba <i>p</i> -érték (Kationcserés k.)	<i>t</i> -próba <i>p</i> -érték (Affinitás k.)
pH = 7,0	$1,14 \cdot 10^{-2}$	$6,79 \cdot 10^{-11}$
pH = 8,0	$2,32 \cdot 10^{-3}$	$1,17 \cdot 10^{-15}$
pH = 8,0 (400 mM)	$3,75 \cdot 10^{-3}$	$2,14 \cdot 10^{-4}$
pH = 9,0	$9,05 \cdot 10^{-4}$	$1,54 \cdot 10^{-14}$
pH = 9,0 (400 mM)	$2,31 \cdot 10^{-2}$	$2,06 \cdot 10^{-4}$
Anion	$1,14 \cdot 10^{-2}$	$4,41 \cdot 10^{-23}$
Kation	-	$1,62 \cdot 10^{-4}$

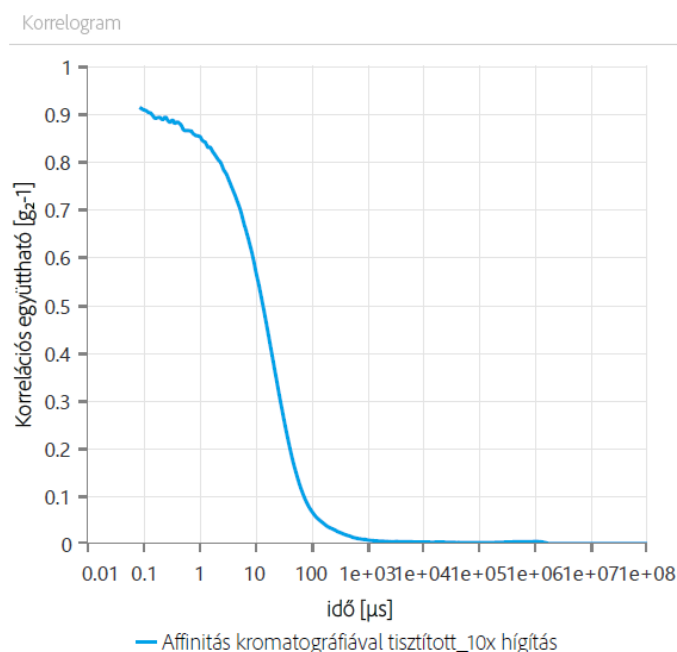
Látható, hogy a kétmintás *t*-próba *p*-értékei minden esetben kisebbek, mint 0,05, így elmondható, hogy az affinitás kromatográfiás tisztított kiindulási mintához képest valóban lényegesen lecsökkent a szennyező mennyisége. A kationcserés módszerhez képest is jelentős ($p < 0,05$) eltérést mutatnak az anionos tisztítás eredményei.

Összességében megállapítható a kapott adatok alapján, hogy a 7,0-es pH nem alkalmas ezen minta tisztítására, mivel ezen a pH-n a dsDNS szennyező jelentős maradt a tisztítás után is. Ezzel szemben a 8,0-as és 9,0-es pH alkalmazható az adalimumab anioncserés tisztítására, hiszen ezen a két pH-n a szennyezők mennyisége már alacsonyabbnak mutatkozott. Tehát az általam fejlesztett anionos módszer alkalmas az adalimumab szennyezők csökkentésére, viszont a kationos módszerhez képest kisebb hatékonysággal. Fontos azonban megjegyezni, hogy a két módszer egymás kiegészítésére szolgál, hiszen az mindkét módszer képes olyan szennyezők eltávolítására, amelyre a másik kevésbé alkalmazható. Mindazonáltal, ahogyan az irodalmi áttekintésben is említettem, a gazdasejtből származó dsDNS-re vonatkozó követelmény maximum 10 ng/dózis. Ez egyik alkalmazott tisztítási módszer esetében sem teljesült, így a jövőben a két módszer kombinálása szükséges lehet a jobb eredmények elérése érdekében. Viszont mindenképp szem előtt tartandó, hogy a dsDNS szennyező mellett más szennyezők vizsgálata is szükséges, mint például a HCP, illetve a vírus meghatározása, melyek egy további munka részét fogják képezni.

5.5. DLS mérés

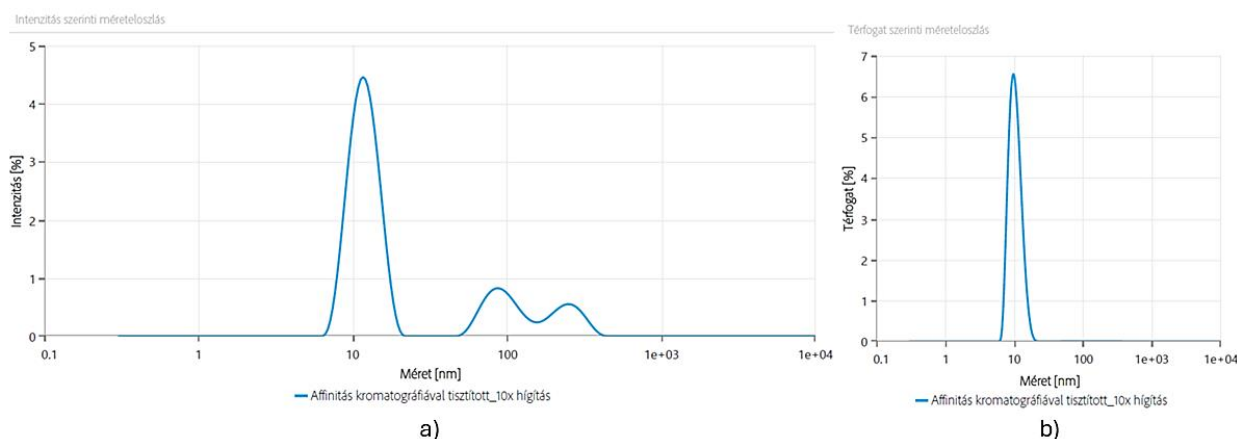
A dinamikus fényszórás (DLS) mérést a nagyobb méretű fehérjeaggregátumok meglétének vizsgálatára és azok átlagos méretének becslésére alkalmaztam. Az adalimumab esetén általánosan a részecskeméret 5–20 nm tartományba (jellemzően 15 nm) esik a kisebb aggregátumok esetén, de stressz vagy degradációs körülmények között nagyobb aggregátumok is megjelenhetnek, melyek akár 100 nm vagy annál nagyobb méretűek is lehetnek. Ezek a méretváltozások jelentősen befolyásolhatják a gyógyszer hatékonyságát és immunogenitását, ezért a DLS mérések rendkívül fontosak a stabilitás ellenőrzésében és a különböző gyártási tételek összehasonlításában.

A mérés során néhány minta esetében hígításra volt szükség a megfelelő mérési pontosság érdekében (az affinitás kromatográfiával tisztított minta esetében 10x hígítás, a pH=7,0, 0 mM mintája esetében 5x hígítás, a pH=7,0, 0 mM mintája esetében 7x hígítás, 8,0-as pH minden mintája, valamint a kationos tisztítás során gyűjtött minta esetében 2x hígítás alkalmazására volt szükség). A mérés akkor tekinthető megbízhatónak és elfogadhatónak, hogy ha a korrelogramon ábrázolt korrelációs együttható kiindulási értéke 0,7-1,0 között van (29. ábra), így a hígítások mértékét is ennek megfelelően valósítottam meg.



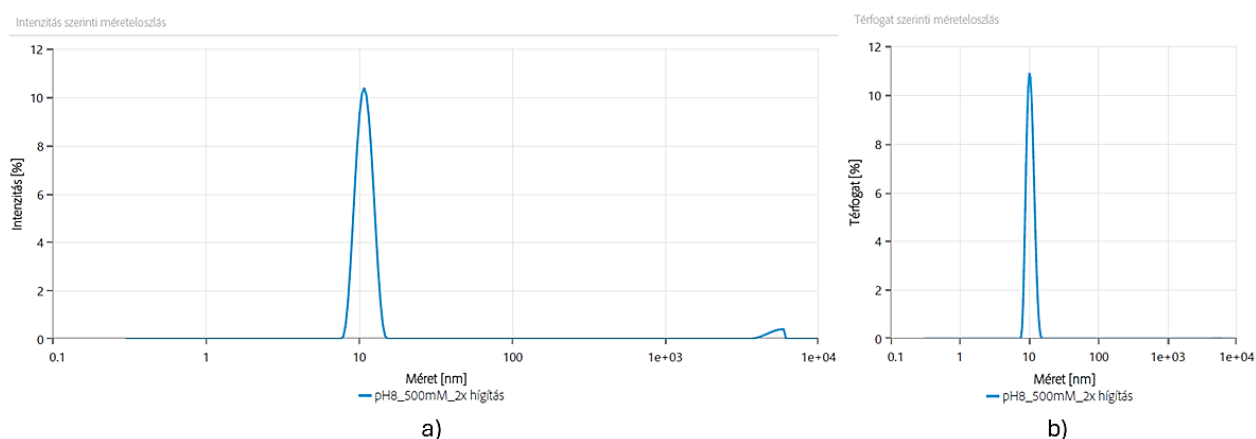
29. ábra Affinitás kromatográfiával tisztított minta kollorogramja

A 30. ábra a fermentléből származó, affinitás kromatográfiával tisztított minta, míg a 31. ábra a pH=8,0, 500 mM mintájáról készült részecskeeloszlásait mutatja be példaként. A 30. ábrán látható, hogy az affinitás kromatográfiával tisztított minta többféle méretű részecskét tartalmaz az intenzitás szerinti eloszlás alapján, viszont a minta nagy része kisebb részecskékből áll, amely a monoklonális antitest monomerjeként azonosítható. Azonban érdemes megjegyezni, hogy a dinamikus fényszórás az egyes részecskék által szórt fény intenzitásán alapszik és mivel a szórt fény intenzitása erősen függ a részecskék méretétől, a nagyobb részecskék sokkal erősebben szórják a fényt, így aránytalanul nagyobb hatással lesznek az eloszlásra. Éppen ezért az intenzitás szerinti eloszlás érzékenyebb a nagyobb aggregátumokra, ezért gyorsan kimutatja, ha aggregáció történik. (30. ábra/a) Ez egy gyors és érzékeny módszer, de az eloszlás erősen torzíthat a nagyobb részecskék irányába. Annak érdekében, hogy pontosabb képet kapjak a részecskék fizikai eloszlásáról, megvizsgáltam a térfogat szerinti eloszlást is (30. ábra/b), hiszen ez figyelembe veszi a részecskék tényleges térfogatát is. Ezzel a módszerrel minden részecske a méretével arányos térfogatot kap, függetlenül attól, hogy mekkora fényt szór. A térfogat szerinti eloszlás ezért kiegyensúlyozottabb, és pontosabb képet ad a részecskék méreteloszlásáról, mivel nem torzít olyan mértékben a nagyobb részecskék irányába, mint az intenzitás szerinti eloszlás. Látható, hogy ezen értékelési módszerrel már csak egy csúcs figyelhető meg, ami alapján megállapítható, hogy az aggregátumok bár jelen vannak a mintában, de rendkívül kis mennyiségben.



30. ábra Affinitás kromatográfiával tisztított minta DLS mérésének eredménye, intenzitás szerinti eloszlás (a), térfogat szerinti eloszlás (b)

A pH=8,0, 500 mM tisztítási minta intenzitás szerinti részecskeméret-eloszlása (31. ábra/a) szintén a 10 nm körüli tartományban mutat egy intenzív csúcsot, de ebben az esetben az eloszlás még homogénebb, és kevésbé jellemzőek a nagyobb méretű részecskék. Ez azt mutatja, hogy az alkalmazott tisztítási módszer jelentős hatást gyakorol a részecskék méretére, és általában egy egyenletesebb, homogénebb méreteloszlást eredményez. Ebben az esetben is megvizsgáltam a térfogat szerinti méreteloszlást (31. ábra/b), amely esetén hasonló következtetést lehet levonni, mint az affinitás kromatográfiával tisztított mintánál leírtak.



31. ábra pH=8,0-as 500 mM-os minta DLS mérésének eredménye, intenzitás szerinti eloszlás (a), térfogat szerinti eloszlás (b)

A többi optimalizációs paraméterrel végzett tisztítások részecskeméret-eloszlás ábrája a függelékben megtekinthető. (F41.-F58. ábrák) Az egyes kísérletek során kapott részecskeméret eredményeit a 7. táblázatban foglaltam össze.

7. táblázat DLS mérés eredmények

	Ionerősség	Monomer átlagos részecskemérete [nm]	Aggregátum(ok) részecskemérete [nm]
pH=7,0	0 mM	8,598	-
	100 mM	8,733	16,68 409,4
	200 mM	7,364	12,49 155,2
	300 mM	8,561	-
	400 mM	10,04	219,1
	500 mM	10,65	327,7
pH=8,0	0 mM	10,69	319,9
	100 mM	8,89	72,35
	200 mM	9,68	-
	300 mM	10,49	125,1 718
	400 mM	8,076	-
	500 mM	10,91	5176
pH=9,0	0 mM	11,2	851,3
	100 mM	9,826	172,5
	200 mM	10,59	538,2
	300 mM	9,878	217,6
	400 mM	10,83	274,9
	500 mM	9,419	43,95
Kationcserés k. tisztítás	-	8,941	53,3
Affinitás k. tisztított minta	-	11,97	94,43 249,1

Az átlagos részecskeméret elemzése során jól látható, hogy mind a pH, mind az ionerősség jelentős hatással van az antitestek aggregációra. A 7,0-es pH esetén megfigyelhető, hogy az ionerősség növelésével a monomer részecskék mérete 7 és 10 nm között változott, míg a nagyobb aggregátumok jelenléte is megfigyelhető volt, különösen a 100 mM és 500 mM ionerősségnél. A nagyobb ionerősségnél az aggregátumok mérete 219,1 nm-től egészen 327,7 nm-ig terjedt, ami azt mutatja, hogy az aggregáció mértéke nőtt a tisztítás során. Az

aggregátumok a 8,0-as és 9,0-es pH esetén végzett tisztítások mintái legtöbbjeiben is megfigyelhetők.

Összességében elmondható, hogy rendkívül fontos a tisztítás során a részecskék homogén eloszlásához a megadott pH-n optimális ionerősséget megtalálni, hiszen látható, hogy a 8,0-as pH esetén két esetben is sikerült nagyobb aggregátumtól mentes tisztítást megvalósítanom.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A monoklonális antitestek növekvő termékigénye miatt a gyártási folyamatok és a hatékonyság javítása a megfelelő minőség biztosítása mellett kiemelkedő fontosságú. A downstream műveletek során alkalmazott tisztítási folyamat hatékonyságának javítására új típusú ioncserés kromatográfiás oszlopok kerülnek forgalomba, amelyek optimális vizsgálati módszerei még nem kidolgozottak, ezért szükséges ezen oszlopokat alkalmazó analitikai módszer fejlesztése.

Így kutatómunkám során megvalósítottam egy új fejlesztésű anioncserés kromatográfiás oszlop felhasználásával az adalimumab anioncserés tisztításának módszerfejlesztését, ahol az előkísérletek során megvizsgáltam és optimalizáltam a minta pH-jának, az elúció mennyiségének hatását a kromatográfiás tisztításra. Ezt követően egy kísérletterv alapú módszerfejlesztés keretében megvalósítottam a pH és sógradiens optimalizálását és megállapítottam, hogy ezen kritikus paraméterek kombinálása elengedhetetlen az adalimumab teljes mértékű elúciójához és töltésvariánsainak megfelelő elválasztásához. Ezen mérések elvégzése során kapott kromatogramok alapján már megfigyelhető volt, hogy 7,0-es pH-jú pufferrendszert alkalmazva az elválasztás nem bizonyult megfelelőnek, amit a későbbiekben további mérésekkel is bizonyítottam.

Méretkizárásos kromatográfiát alkalmazva meghatároztam az egyes tisztítások során vett minták fehérjekoncentrációját, amelyek során megállapítottam, hogy a sókoncentráció növekedésével a fehérjemennyiség is nő. Továbbá a módszer lehetővé tette a szennyező mennyiségének vizsgálatát is, amelyek alapján megállapítható volt, hogy a 8,0-as pH-jú, 400 mM-os minta tűnt a legmegfelelőbbnek, ugyanis a kromatogramon semmilyen szennyező nem volt látható.

Ezt követően meghatároztam a dsDNS szennyező mennyiségét és megbizonyosodtam arról, hogy a 8,0-as pH-n az 500 mM-os mérésben található a legkevesebb dsDNS szennyező, 9,0-es pH-n pedig a 400 mM-os mintában, amelyek a legjobb mérési eredménynek bizonyultak. Összehasonlítva a kiindulási, tehát az affinitás kromatográfiával tisztított mintából, lényegesen sikerült a szennyező mennyiségét lecsökkenteni, viszont megfigyelhető, hogy a kationcserés tisztításnál valamelyest alacsonyabb dsDNS szennyező mennyiséget kaptam, bár a két módszer egymás kiegészítésére szolgál, hiszen mindkét módszer képes olyan szennyezők eltávolítására, amelyre a másik kevésbé alkalmazható, éppen ezért ezen két ioncserés kromatográfiás tisztítás kombinálását a jövőben tervezem megvalósítani.

Mindkét analitikai módszer által kapott eredményt statisztikailag is értékeltem, amelyek alapján megállapítható volt, hogy mind a pH-nak mind pedig az ionerősségnek szignifikáns hatása van a fehérjekoncentrációra és a szennyezők mennyiségére is.

Végül dinamikai fényszórás méréssel a szennyezők intenzitás szerinti méreteloszlását is megvizsgáltam, amely érzékenyebb a nagyobb méretű aggregátumok jelenlétére. Ezek a mérések alátámasztották a korábbi eredményeimet, azaz, hogy 7,0-es pH-n nem célszerű ezen fehérje tisztítását végezni, hiszen ezen pH-n végzett tisztítások mintái több aggregátumot tartalmaztak. Viszont a térfogat szerinti eloszlás alapján, amely kiegyensúlyozottabb, és pontosabb képet ad a részecskék méreteloszlásáról, megállapítható, hogy az aggregátumok bár jelen vannak a mintában, de rendkívül kis mennyiségben. Az aggregátumok a 8,0-as és 9,0-es pH esetén végzett tisztítások mintái legtöbbszörben is megfigyelhetők, viszont a 8,0-as pH esetén két esetben is sikerült nagyobb aggregátumtól mentes tisztítást megvalósítanom. A tapasztalataim és statisztikai elemzések is megerősítették, hogy a 8,0-as pH optimális az anioncserés tisztítás továbbfejlesztéséhez.

Összességében elmondható, hogy az általam kifejlesztett módszer lehetőséget biztosít a biogógyszerek tisztításának hatékonyabbá tételére, ezáltal növelve a gyártási folyamat megbízhatóságát és biztonságát. Mindez hozzájárulhat a humán alkalmazásra szánt készítmények minőségének javításához, és hosszú távon a biotechnológiai iparban is széleskörűen alkalmazhatóvá válhat.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazon személyeknek, akik nélkül laboratóriumi munkám és dolgozatom nem jöhetett volna létre.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Hirsch Editnek, illetve konzulenseimnek, Vaskó Dorottyanak, de legfőképpen Madarász-Kádár Szabinának, hogy végig segített a kísérletek megtervezésében és kiértékelésében, valamint tanácsaival segítette a TDK dolgozatom megírását.

Köszönöm a fluoreszcencia mérések során nyújtott segítséget Hajdinák Péternek.

Ugyancsak köszönettel tartozom Dr. Pusztai Évának a Statistica programban nyújtott segítségért.

Végül, de nem utolsósorban köszönettel tartozom barátomnak és családomnak biztatásukért, támogatásukért és végtelen türelmükért.

A munka az RRF-2.3.1-21-2022-00015 számú projekt keretében az Európai Unió, valamint az Innovációs és Technológiai Minisztérium által a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott PD142301 projekt és a Richter Gedeon Nyrt. Talentum alapítvány támogatásával valósult meg.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Singh, S.; Kumar, N.K.; Dwiwedi, P.; Charan, J.; Kaur, R.; Sidhu, P.; Chugh, V.K. Monoclonal Antibodies: A Review. *Curr Clin Pharmacol* **2018**, *13*, 85–99, doi:10.2174/1574884712666170809124728.
2. Catley, M.C.; Coote, J.; Bari, M.; Tomlinson, K.L. Monoclonal Antibodies for the Treatment of Asthma. *Pharmacol Ther* **2011**, *132*, 333–351, doi:10.1016/j.pharmthera.2011.09.005.
3. Pento, J.T. Monoclonal Antibodies for the Treatment of Cancer. *Anticancer Res* **2017**, *37*, 5935–5939, doi:10.21873/anticancerres.12040.
4. Liu, J.K.H. The History of Monoclonal Antibody Development - Progress, Remaining Challenges and Future Innovations. *Annals of Medicine and Surgery* **2014**, *3*, 113–116.
5. Stone, C.A.; Spiller, B.W.; Smith, S.A. Engineering Therapeutic Monoclonal Antibodies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2024**, *153*, 539–548, doi:10.1016/j.jaci.2023.11.018.
6. Wang, W.; Singh, S.; Zeng, D.L.; King, K.; Nema, S. Antibody Structure, Instability, and Formulation. *J Pharm Sci* **2007**, *96*, 1–26, doi:10.1002/jps.20727.
7. Kovács, E.; Albert, B. Antitest Termelő Sejtvonal Fejlesztése Laboratóriumi Jegyzet Gőnésebész Hallgatók Számára CSÍKSZEREDA; **2023**.
8. Pokol Gy.; Gyurcsányi R.; Simon A.; Bezúr L.; Horvai Gy.; Horváth V.; Dudás K. ANALITIKAI KÉMIA Egyetemi Tananyag; *Typotex*, **2011**; ISBN 9789632794662.
9. Mekala J.R.; Nalluri H.P.; Reddy P.N.; Sainath S.B.; Kumar N.S.S.; Sai Kiran G.V.S.D., Dhiman R.; Chamorthy S.; Komaragiri R.R.; Manyam R.R.; Dirisala V.R.; Emerging Trends and Therapeutic Applications of Monoclonal Antibodies. *Gene* **2024**, *925*, 148607, doi:10.1016/j.gene.2024.148607.
10. <https://slideplayer.hu/Slide/2109160/> (Megtekintve: 2024.08.28.)
11. Wunderlich L. Molekuláris Biológiai Technikák; *Typotex*, **2014**; ISBN 9789632791746.
12. Scheinfeld, N. Adalimumab: A Review of Side Effects. *Expert Opin Drug Saf* **2005**, *4*, 637–641, doi:10.1517/14740338.4.4.637.

13. Mease, P.J. Adalimumab in the Treatment of Arthritis. *Ther Clin Risk Manag* **2007**, *3*, 133–148, doi:10.2147/tcrm.s31133.
14. Burness, C.B.; McKeage, K. Adalimumab: A Review in Chronic Plaque Psoriasis. *Drugs* **2015**, *75*, 2119–2130, doi:10.1007/s40265-015-0503-x.
15. Scheinfeld, N. Adalimumab (Humira™): A Brief Review for Dermatologists. *Journal of Dermatological Treatment* **2004**, *15*, 348–352, doi:10.1080/09546630410017284.
16. Spitali, M. *DOWNSTREAM PROCESSING OF MONOCLONAL ANTIBODY FRAGMENTS*; **2017**; 537-558, doi: 10.1002/9781119126942.ch25.
17. Gupta, T.; Kumar, A.; Seshadri, S. Bioprocess Challenges in Purification of Therapeutic Protein Charge Variants. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **2023**, *28*, 493–506, doi:10.1007/s12257-023-0078-4.
18. Chen, C.; Wong, H.E.; Goudar, C.T. Upstream Process Intensification and Continuous Manufacturing. *Curr Opin Chem Eng* **2018**, *22*, 191–198, doi:10.1016/j.coche.2018.10.006.
19. Jain, E.; Kumar, A. Upstream Processes in Antibody Production: Evaluation of Critical Parameters. *Biotechnol Adv* **2008**, *26*, 46–72, doi:10.1016/j.biotechadv.2007.09.004.
20. Park, S.; Reimonn, T.M.; Agarabi, C.D.; Brorson, K.A.; Yoon, S. Metabolic Responses and Pathway Changes of Mammalian Cells under Different Culture Conditions with Media Supplementations. *Biotechnol Prog* **2018**, *34*, 793–805, doi:10.1002/btpr.2623.
21. Gronemeyer, P.; Ditz, R.; Strube, J. Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. *Bioengineering* **2014**, *1*, 188–212, doi:10.3390/bioengineering1040188.
22. Flatman, S.; Alam, I.; Gerard, J.; Mussa, N. Process Analytics for Purification of Monoclonal Antibodies. *Journal of Chromatography B* **2007**, *848*, 79–87, doi:10.1016/j.jchromb.2006.11.018.
23. Kelley, B. *DOWNSTREAM PROCESSING OF MONOCLONAL ANTIBODIES: CURRENT PRACTICES AND FUTURE OPPORTUNITIES. Process Scale Purification of Antibodies*; Wiley, **2017**; pp. 1–21. doi: 10.1002/9781119126942.ch1

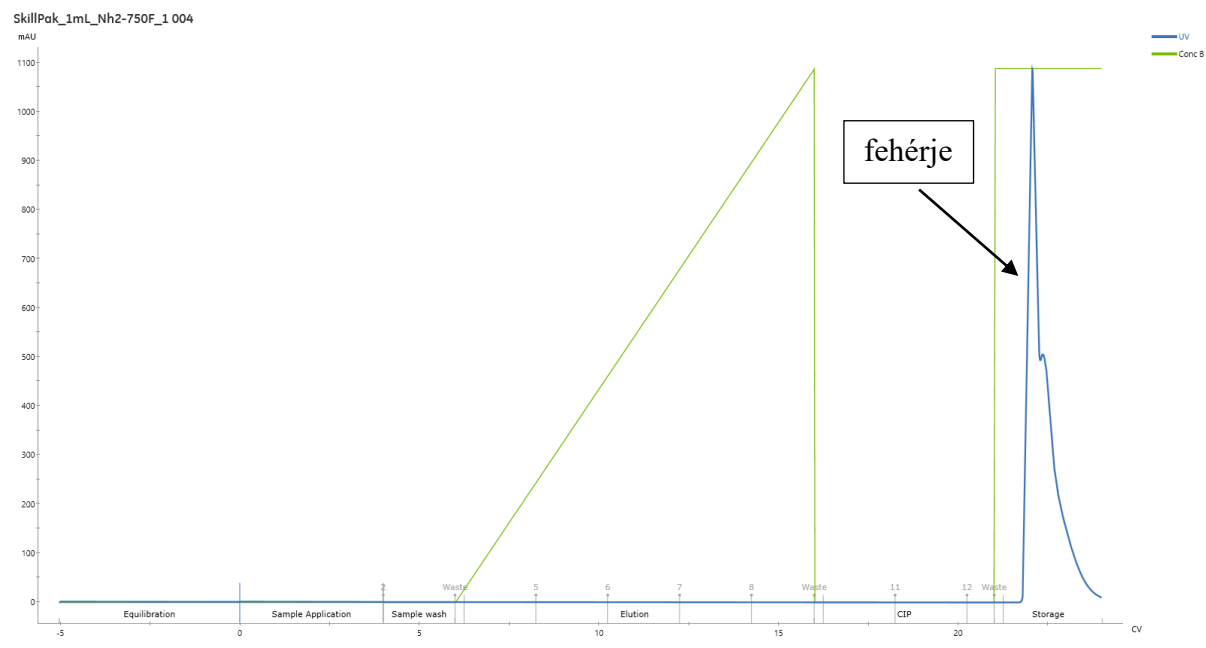
24. Shukla, A.A.; Hubbard, B.; Tressel, T.; Guhan, S.; Low, D. Downstream Processing of Monoclonal Antibodies—Application of Platform Approaches. *Journal of Chromatography B* **2007**, *848*, 28–39, doi:10.1016/j.jchromb.2006.09.026.
25. Yamada, T.; Yamamoto, K.; Ishihara, T.; Ohta, S. Purification of Monoclonal Antibodies Entirely in Flow-through Mode. *Journal of Chromatography B* **2017**, *1061–1062*, 110–116, doi:10.1016/j.jchromb.2017.07.002.
26. Marichal-Gallardo, P.A.; Álvarez, M.M. State-of-the-Art in Downstream Processing of Monoclonal Antibodies: Process Trends in Design and Validation. *Biotechnol Prog* **2012**, *28*, 899–916, doi:10.1002/btpr.1567.
27. Yu, D.; Mayani, M.; Song, Y.; Xing, Z.; Ghose, S.; Li, Z.J. Control of Antibody High and Low Molecular Weight Species by Depth Filtration-Based Cell Culture Harvesting. *Biotechnol Bioeng* **2019**, *116*, 2610–2620, doi:10.1002/bit.27081.
28. Ayyar, B.V.; Arora, S.; Murphy, C.; O’Kennedy, R. Affinity Chromatography as a Tool for Antibody Purification. *Methods* **2012**, *56*, 116–129, doi:10.1016/j.ymeth.2011.10.007.
29. Fekete J.; Kormány R.; Fekete Sz. A Folyadékkromatográfia Fejlesztési Irányai, Gyors Folyadékkromatográfia; **2015**; ISBN 9789630894074.
30. https://www.vilaglex.hu/kemia/html/affikrom_.htm (Megtekintve: 2024.08.28.)
31. Galbács, G.; Felinger, A.; Csóka, B. Illusztrált Segédanyag a Modern Műszeres Analitikai Kémia Oktatásához; Szegedi Tudományegyetem; Pécsi Tudományegyetem, **2012**; ISBN 978-963-642-874-7.
32. Stein, A.; Kiesewetter, A. Cation Exchange Chromatography in Antibody Purification: PH Screening for Optimised Binding and HCP Removal. *Journal of Chromatography B* **2007**, *848*, 151–158, doi:10.1016/j.jchromb.2006.10.010.
33. Fekete, S.; Beck, A.; Fekete, J.; Guillarme, D. Method Development for the Separation of Monoclonal Antibody Charge Variants in Cation Exchange Chromatography, Part I: Salt Gradient Approach. *J Pharm Biomed Anal* **2015**, *102*, 33–44, doi:10.1016/j.jpba.2014.08.035.
34. Fekete, S.; Beck, A.; Fekete, J.; Guillarme, D. Method Development for the Separation of Monoclonal Antibody Charge Variants in Cation Exchange Chromatography, Part II:

- PH Gradient Approach. *J Pharm Biomed Anal* **2015**, *102*, 282–289, doi:10.1016/j.jpba.2014.09.032.
35. Zimoch-Rumanek, P.; Antos, D. Coupling Cation and Anion Exchange Chromatography for Fast Separation of Monoclonal Antibody Charge Variants. *J Chromatogr A* **2024**, *1733*, 465256, doi:10.1016/j.chroma.2024.465256.
 36. Brown, A.; Bill, J.; Tully, T.; Radhamohan, A.; Dowd, C. Overloading Ion-exchange Membranes as a Purification Step for Monoclonal Antibodies. *Biotechnol Appl Biochem* **2010**, *56*, 59–70, doi:10.1042/BA20090369.
 37. Zhou, J.X.; Tressel, T. Basic Concepts in Q Membrane Chromatography for Large-Scale Antibody Production. *Biotechnol Prog* **2006**, *22*, 341–349, doi:10.1021/bp050425v.
 38. Fahrner, R.L.; Knudsen, H.L.; Basey, C.D.; Galan, W.; Feuerhelm, D.; Vanderlaan, M.; Blank, G.S. Industrial Purification of Pharmaceutical Antibodies: Development, Operation, and Validation of Chromatography Processes. *Biotechnol Genet Eng Rev* **2001**, *18*, 301–327, doi:10.1080/02648725.2001.10648017.
 39. Liu, H.F.; Ma, J.; Winter, C.; Bayer, R. Recovery and Purification Process Development for Monoclonal Antibody Production. *MAbs* **2010**, *2*, 480–499, doi:10.4161/mabs.2.5.12645.
 40. Liu, H.F.; McCooey, B.; Duarte, T.; Myers, D.E.; Hudson, T.; Amanullah, A.; van Reis, R.; Kelley, B.D. Exploration of Overloaded Cation Exchange Chromatography for Monoclonal Antibody Purification. *J Chromatogr A* **2011**, *1218*, 6943–6952, doi:10.1016/j.chroma.2011.08.008.
 41. *Protein Chromatography*; Walls, D., Loughran, S.T., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer Protocols, **2017**; Vol. 1485; ISBN 978-1-4939-6410-9.
 42. <https://www.bio-rad.com/en-hu/applications-technologies/fast-protein-liquid-chromatography?id=MWHBF4CZF> (Megtekintve: 2024.08.22.)
 43. <https://antiteck.com/hu/hplc-rendszer-2/> (Megtekintve: 2024.08.22.)
 44. Luo, R.; Waghmare, R.; Krishnan, M.; Adams, C.; Poon, E.; Kahn, D. High-Concentration UF/DF of a Monoclonal Antibody Strategy for Optimization and Scale-Up; *BioProcess International* **2006**; Vol. 4;. 44-48.

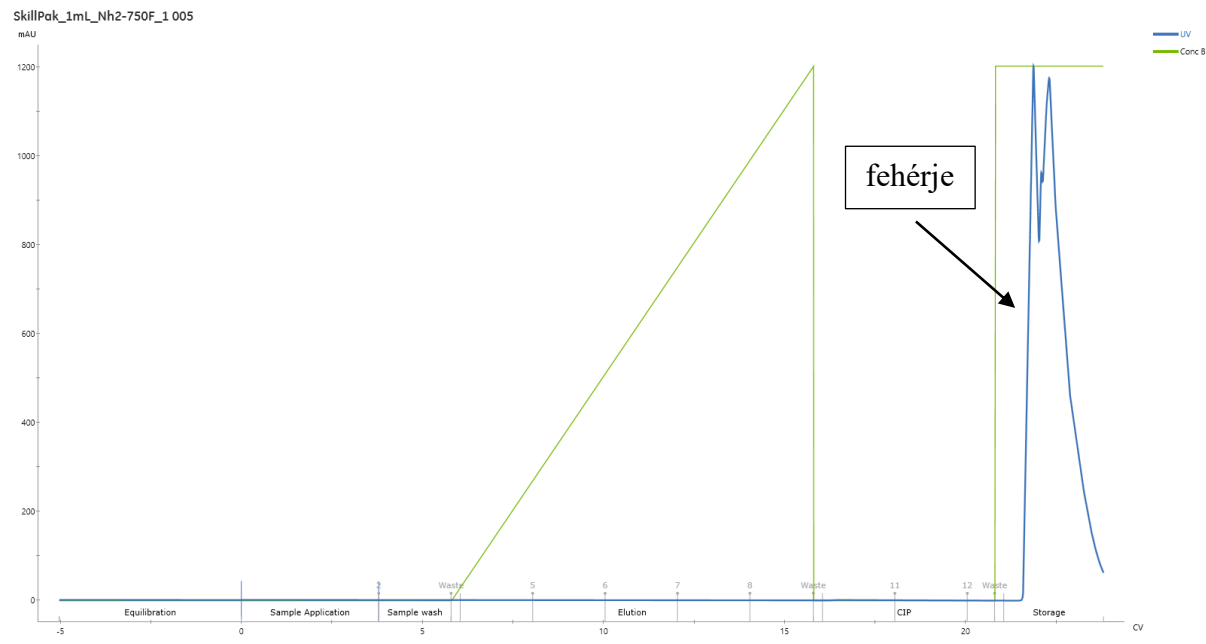
45. Baek, Y.; Yang, D.; Zydney, A.L. Development of a Hydrodynamic Cleaning Cycle for Ultrafiltration/Diafiltration Processes Used for Monoclonal Antibody Formulation. *Ind Eng Chem Res* **2018**, *57*, 16110–16115, doi:10.1021/acs.iecr.8b02608.
46. Shrivastava, A.; Mandal, S.; Pattanayek, S.K.; Rathore, A.S. Rapid Estimation of Size-Based Heterogeneity in Monoclonal Antibodies by Machine Learning-Enhanced Dynamic Light Scattering. *Anal Chem* **2023**, *95*, 8299–8309, doi:10.1021/acs.analchem.3c00650.
47. Fekete J.; Fekete Sz.; Kormány R.; Imrik P. *Kromatográfus*; Real Press Nyomda, **2016**;
48. Chakrabarti, A. Separation of Monoclonal Antibodies by Analytical Size Exclusion Chromatography. In *Antibody Engineering*; InTech, **2018**; pp. 133–172 ISBN 9789535138266.
49. D’Atri, V.; Imiolek, M.; Quinn, C.; Finny, A.; Lauber, M.; Fekete, S.; Guilleme, D. Size Exclusion Chromatography of Biopharmaceutical Products: From Current Practices for Proteins to Emerging Trends for Viral Vectors, Nucleic Acids and Lipid Nanoparticles. *J Chromatogr A* **2024**, *1722*, 464862, doi:10.1016/j.chroma.2024.464862.
50. Nobbmann, U.; Connah, M.; Fish, B.; Varley, P.; Gee, C.; Mulot, S.; Chen, J.; Zhou, L.; Lu, Y.; Sheng, F.; et al. Dynamic Light Scattering as a Relative Tool for Assessing the Molecular Integrity and Stability of Monoclonal Antibodies. *Biotechnol Genet Eng Rev* **2007**, *24*, 117–128, doi:10.1080/02648725.2007.10648095.
51. Pakalapati, A.; Ranganadhareddy, A.; Kumar, N.N.P. From Formation to Detection: Understanding Monoclonal Antibody Aggregation through Analytical Lenses. *J Biochem Technol* **2024**, *15*, 27–32, doi:10.51847/MgvdN50FBW.
52. Vaskó, D.; Domján, J.; Szűcs, B.; Bakk, L.; Hajdinák, P.; Marosi, G.; Nagy, Z.K.; Hirsch, E.; Fehér, C. Development and Comparison of Alternative Methods for the Purification of Adalimumab Directly from Harvested Cell Culture Fluid. *Food Technol Biotechnol* **2023**, *61*, 339–349, doi:10.17113/ftb.61.03.23.8094.
53. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/1335909>
(Megtekintve: 2024.08.29.)
54. Amicon ® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices (User Guide).

55. <https://www.bioprocessintl.com/sponsored-content/reduce-downstream-processing-costs-for-mabs-by-switching-to-a-two-step-platform>
(Megtekintve: 2024.08.30.)
56. <https://www.separations.eu.tosohbioscience.com/products/process-media/ion-exchange/toyoparl-nh2-750f> (Megtekintve: 2024.08.30.)
57. SkillPak™ Pre-Packed Columns.
58. INSTRUCTION MANUAL Ion Exchanger TOYOPEARL® NH2-750F.
59. Quant-IT™ PicoGreen™ DsDNA Reagent and Kit.
60. Goyon, A.; Excoffier, M.; Janin-Bussat, M.-C.; Bobaly, B.; Fekete, S.; Guilleme, D.; Beck, A. Determination of Isoelectric Points and Relative Charge Variants of 23 Therapeutic Monoclonal Antibodies. *Journal of Chromatography B* **2017**, *1065–1066*, 119–128, doi:10.1016/j.jchromb.2017.09.033.
61. TOYOPEARL NH2-750F Flow-through Aggregate Removal from Monoclonal Antibodies.
62. Rathore A.; Joshi V.; Yadav N. Aggregation of Monoclonal Antibody Products: Formation and Removal. *Biopharm Int* **2013**, *26*, 40–45.

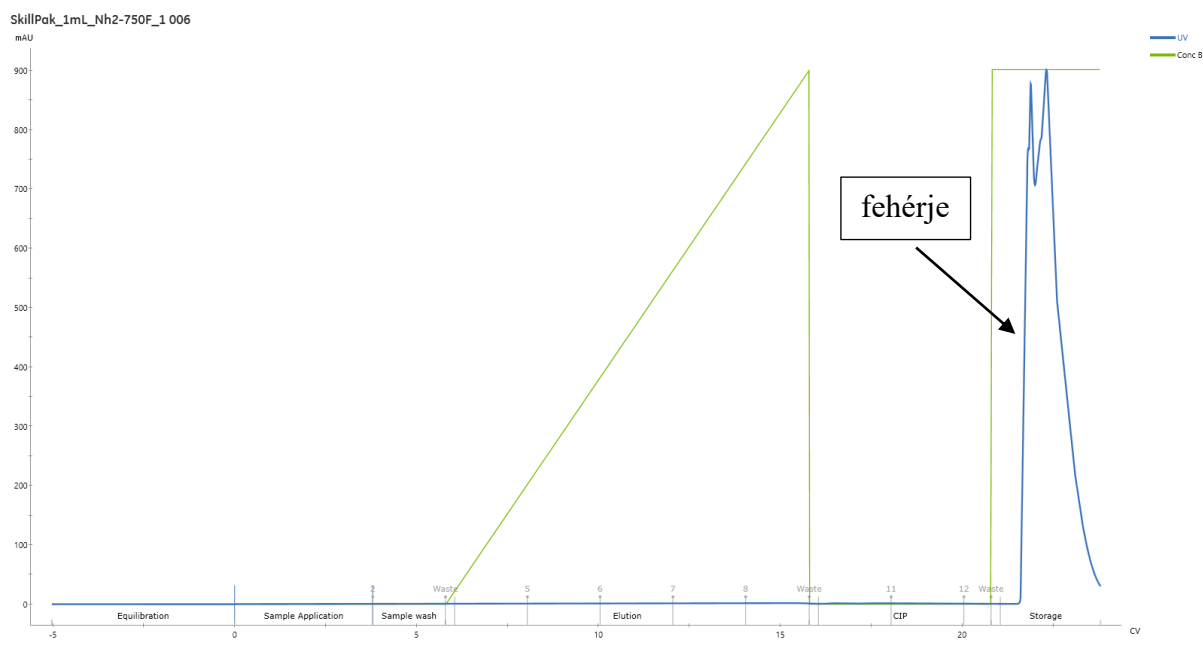
FÜGGELÉK



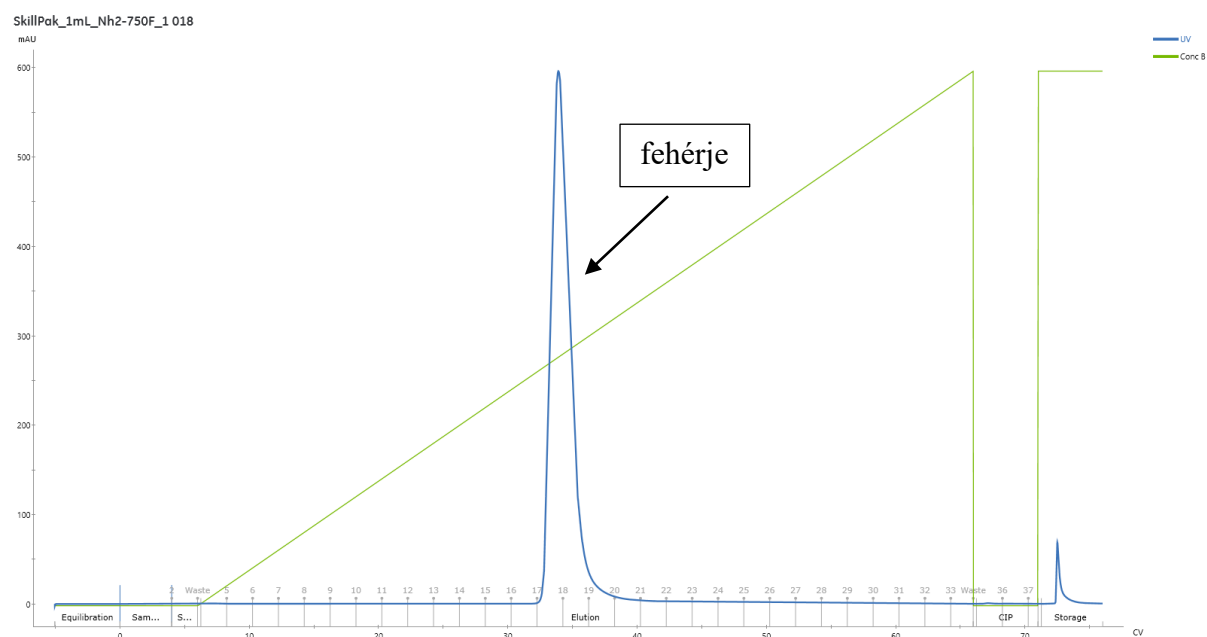
F1. ábra 9,0-es pH-n végzett előkísérlet kromatogramja (10 CV, minta pH=8,0
A eluens: 10 mM Tris-HCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl)



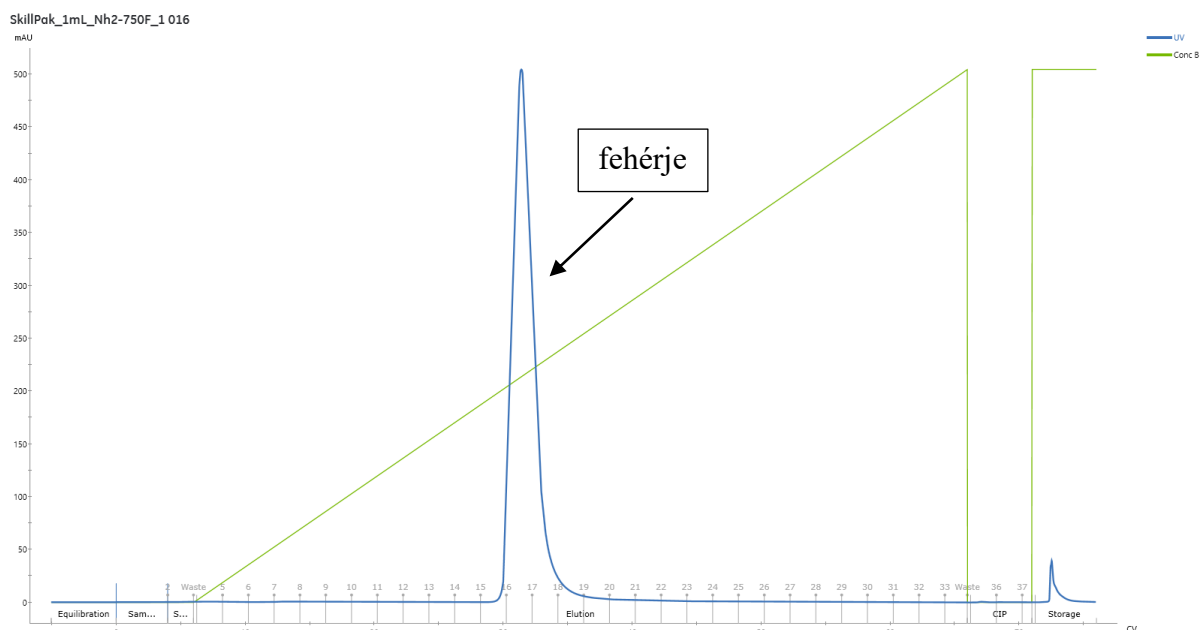
F2. ábra 9,0-es pH-n végzett előkísérlet kromatogramja (10 CV, minta pH=7,0
A eluens: 10 mM Tris-HCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl)



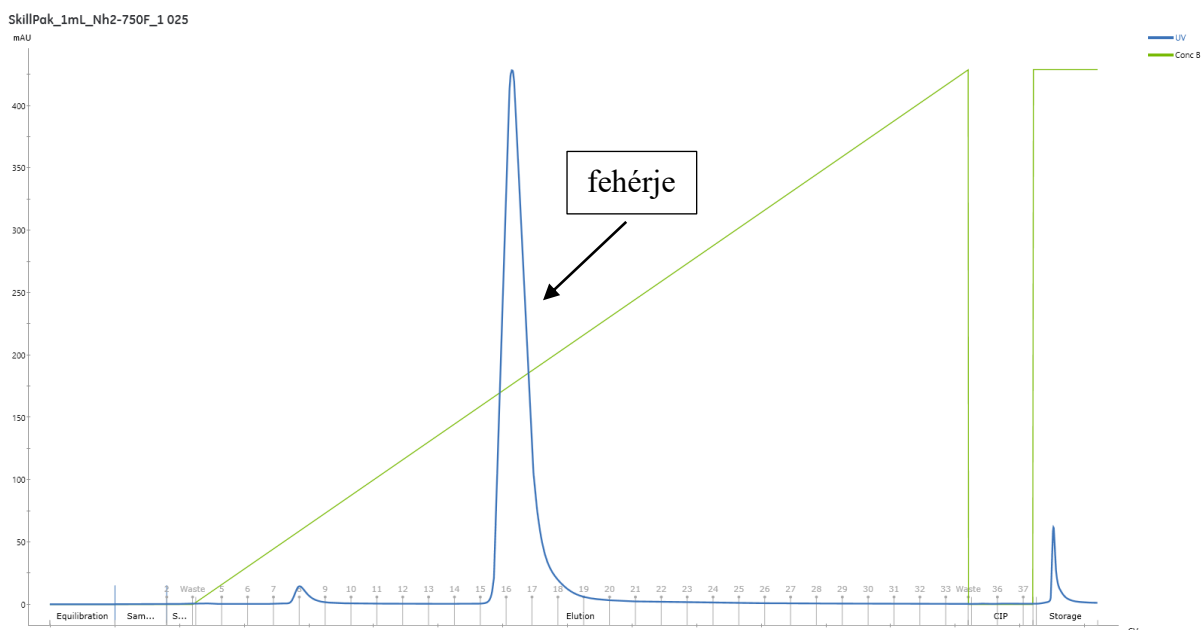
F3. ábra 9,0-es pH-n végzett előkísérlet kromatogramja (10 CV, minta pH=6,0
 A eluens: 10 mM Tris-HCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl)



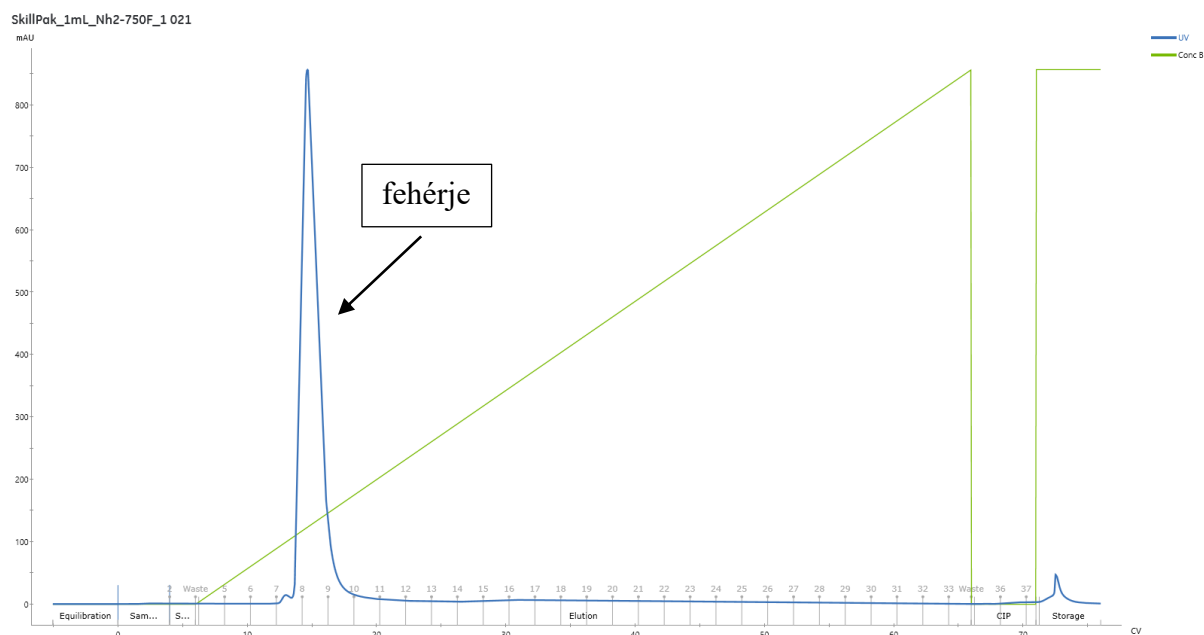
F4. ábra 9,0-es pH-n végzett mérés kromatogramja (60 CV, minta pH=9,0
 A eluens: 10 mM Tris-HCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



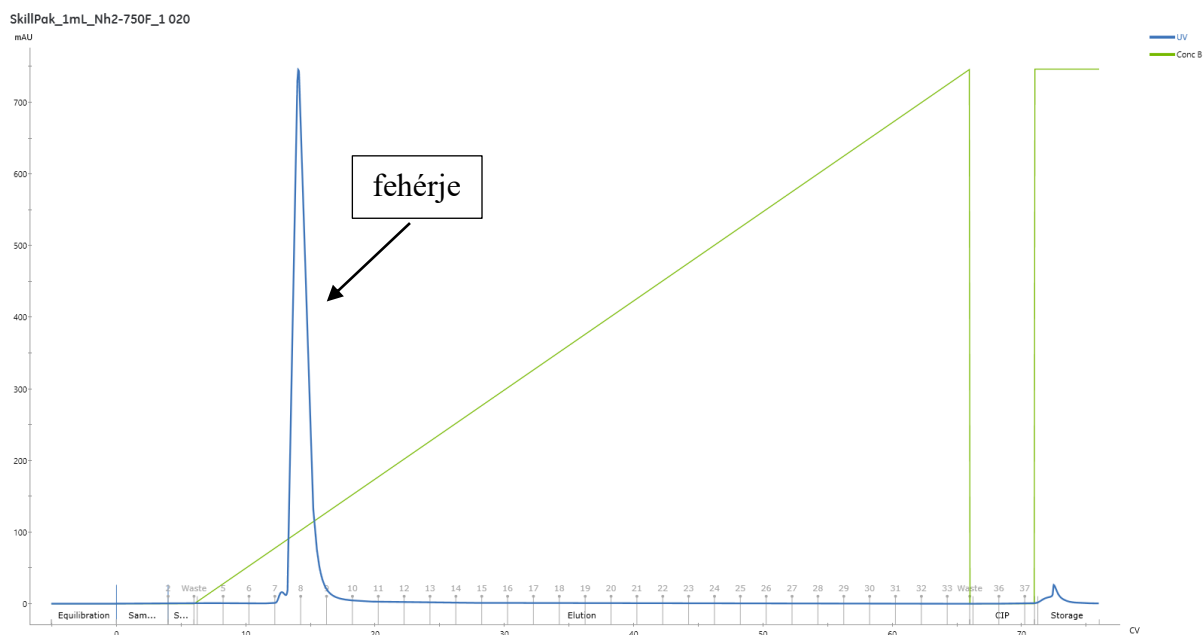
F5. ábra 9,0-es pH-n végzett mérés kromatogramja (60 CV, minta pH=9,0
A eluens: 10 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



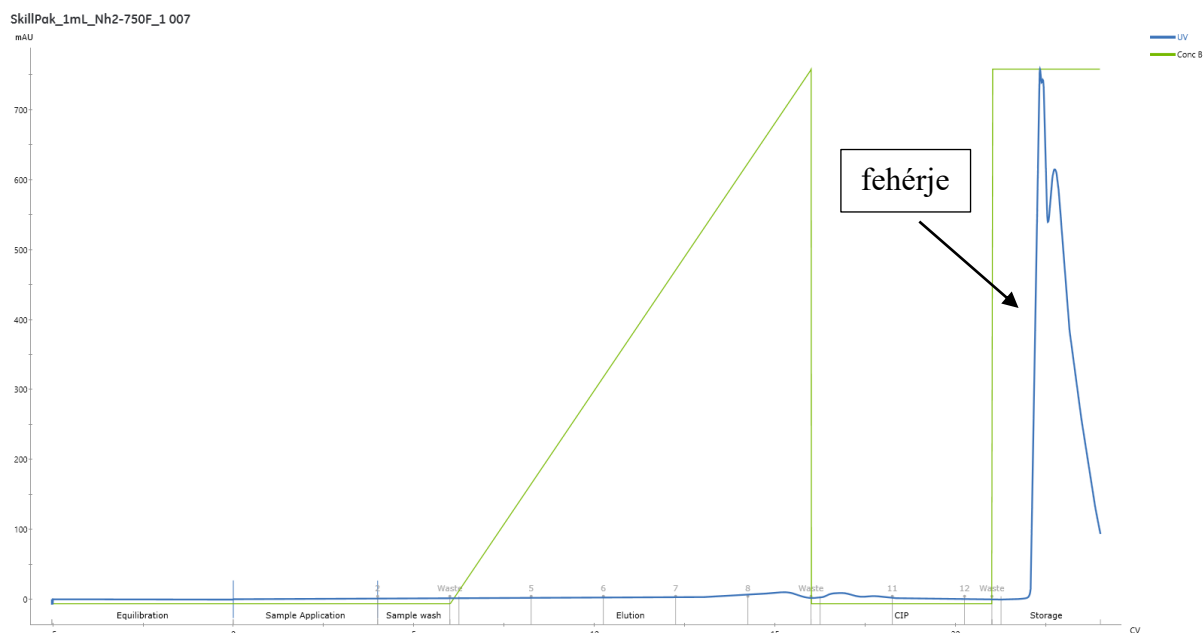
F6. ábra 9,0-es pH-n végzett mérés kromatogramja (60 CV, minta pH=9,0
A eluens: 10 mM Tris-HCl + 200 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



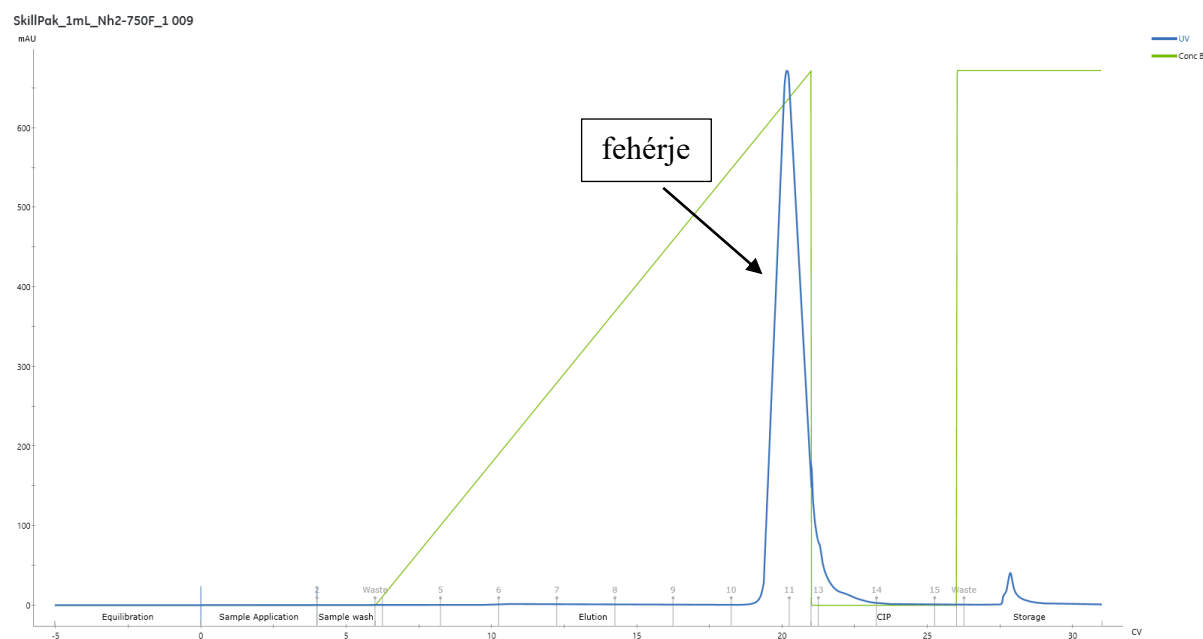
F7. ábra 9,0-es pH-n végzett mérés kromatogramja (60 CV, minta pH=9,0
A eluens: 10 mM Tris-HCl + 400 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



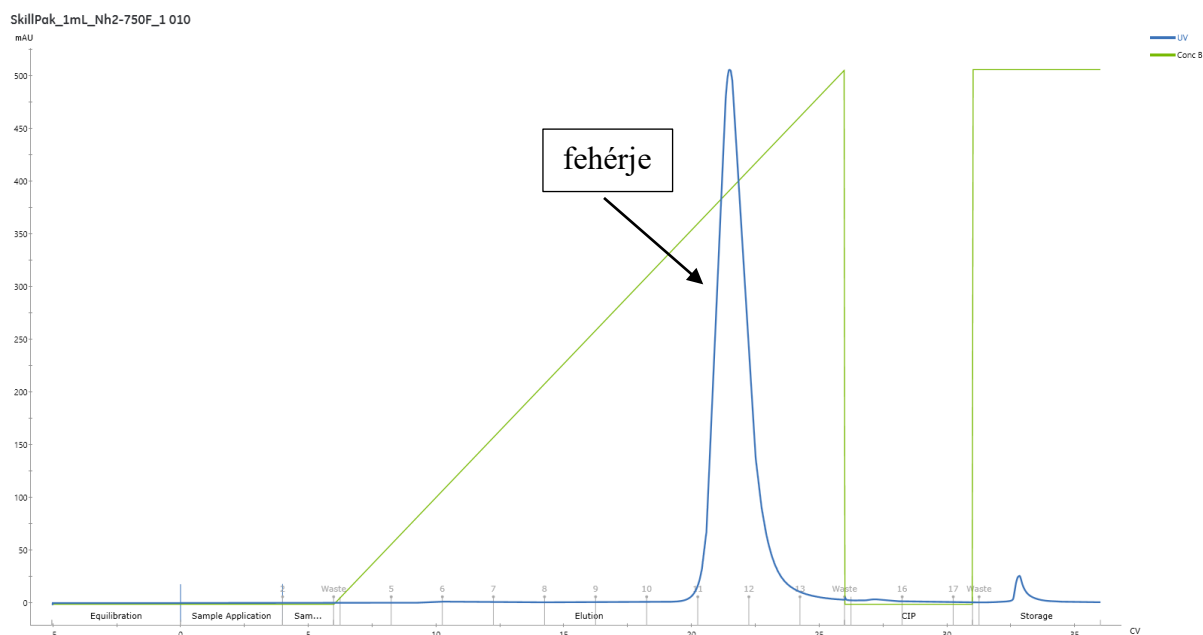
F8. ábra 9,0-es pH-n végzett mérés kromatogramja (60 CV, minta pH=9,0
A eluens: 10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



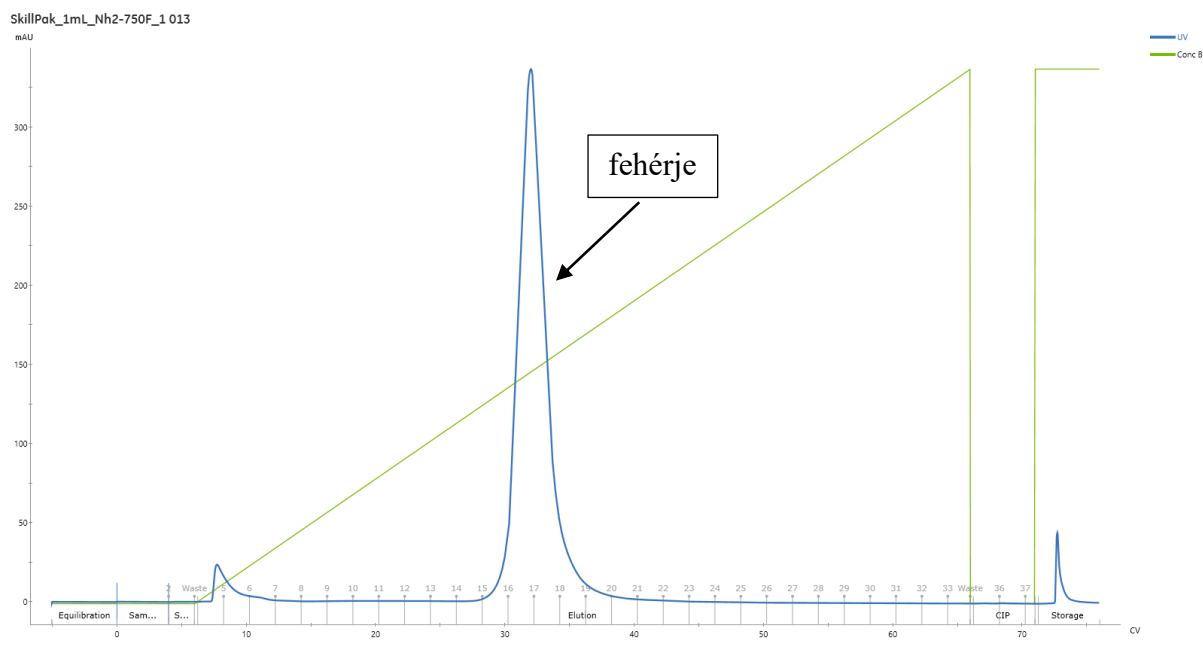
F9. ábra 8,0-as pH-n végzett előkísérlet kromatogramja (10 CV, minta pH=8,0
A eluens: 10 mM Tris-HCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl)



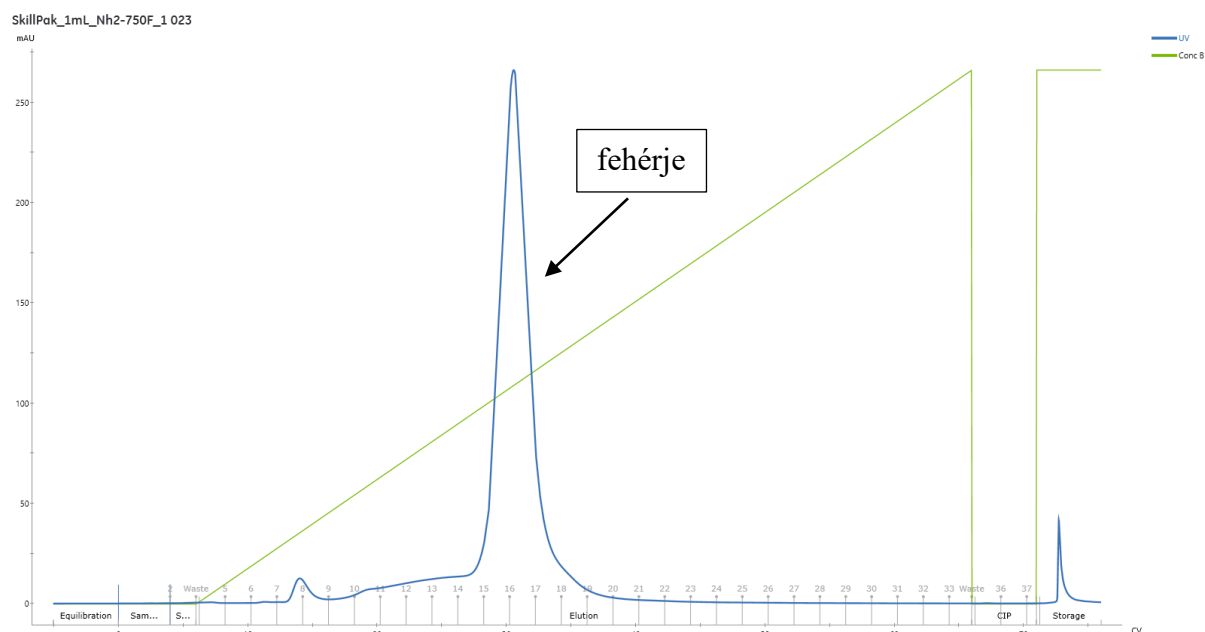
F10. ábra 8,0-as pH-n végzett előkísérlet kromatogramja (15 CV, minta pH=8,0
A eluens: 10 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



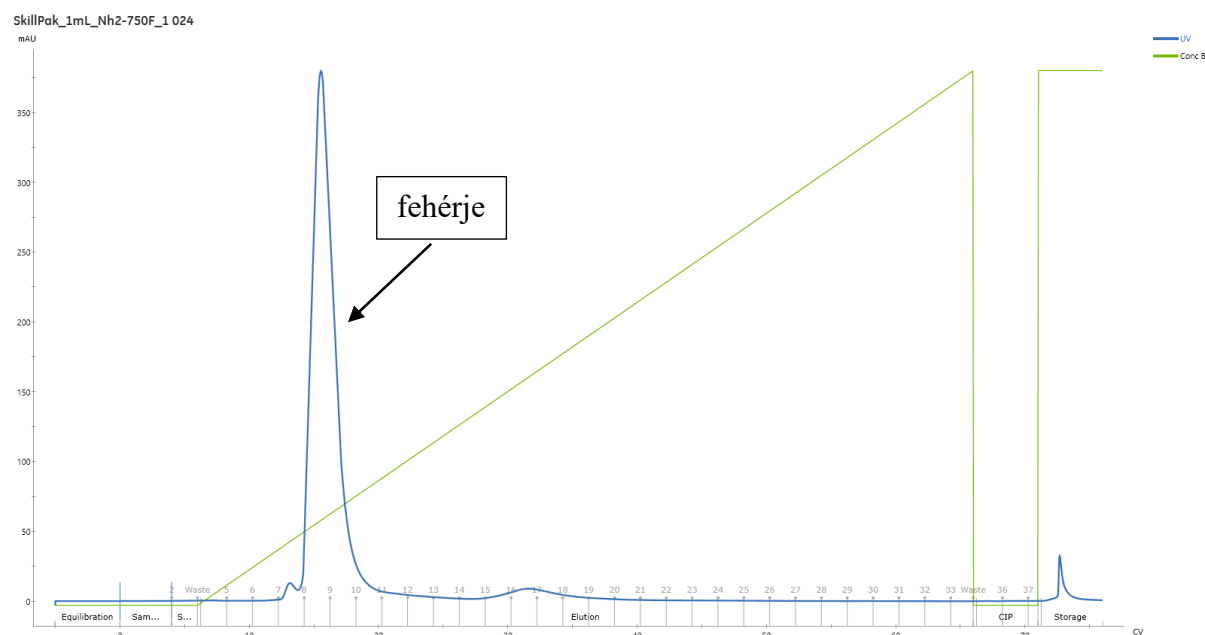
F11. ábra 8,0-as pH-n végzett előkísérlet kromatogramja (20 CV, minta pH=8,0
A eluens: 10 mM Tris-HCl + 300 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



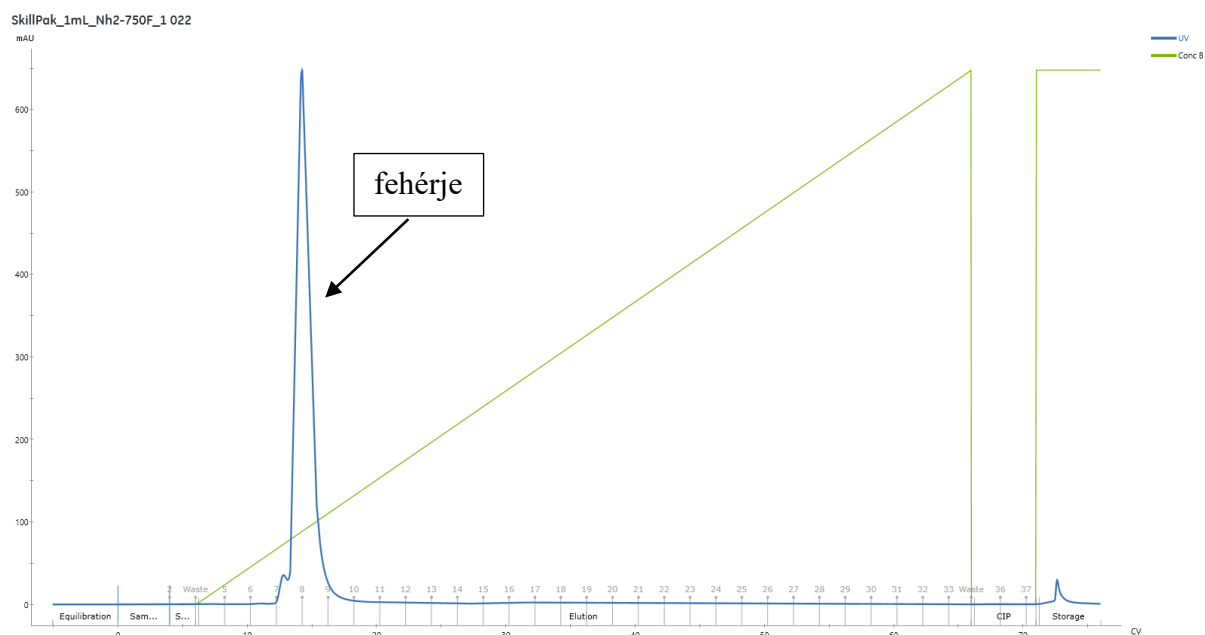
F12. ábra 8,0-as pH-n végzett mérés kromatogramja (60 CV, minta pH=8,0
A eluens: 10 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



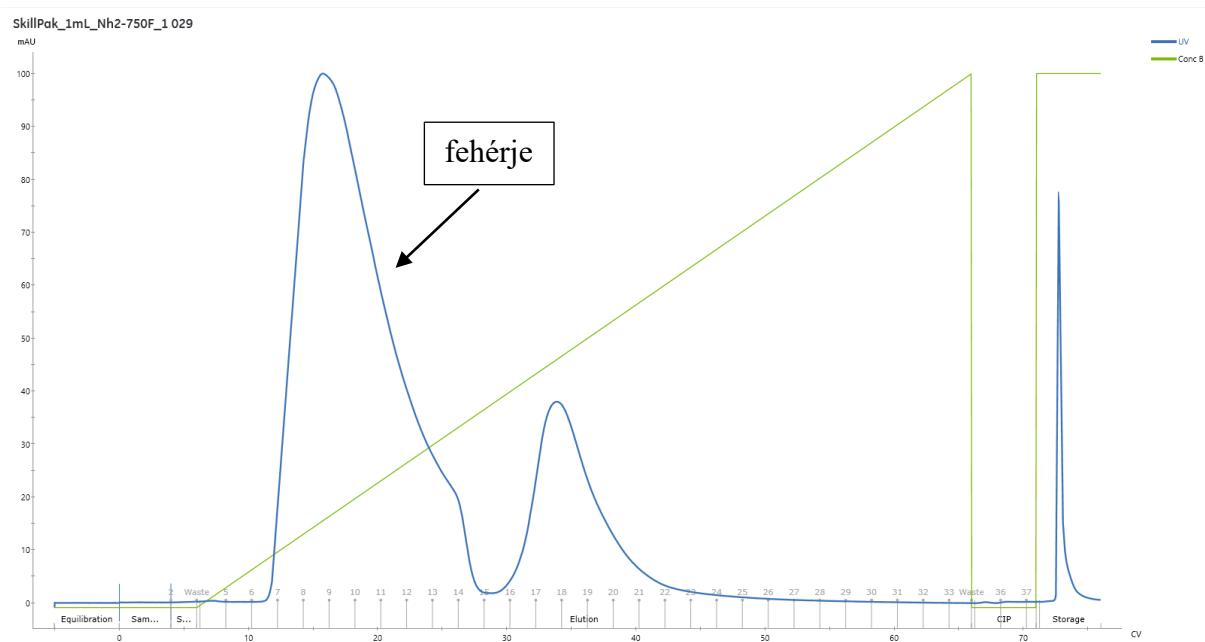
F13. ábra 8,0-as pH-n végzett mérés kromatogramja (60 CV, minta pH=8,0
A eluens: 10 mM Tris-HCl + 200 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



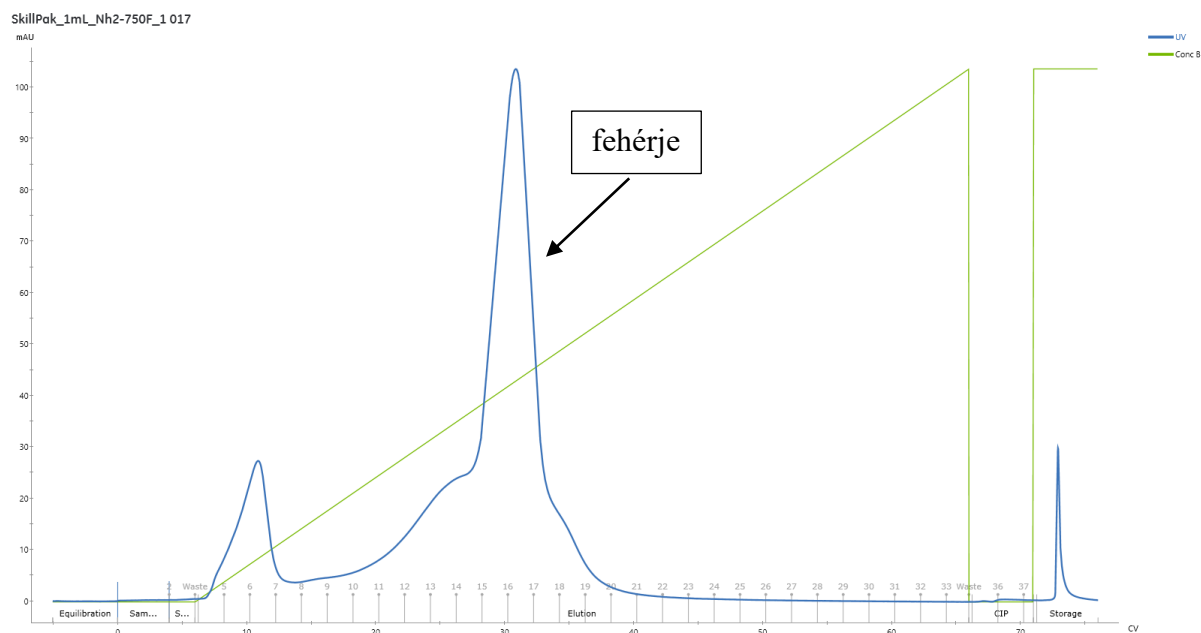
F14. ábra 8,0-as pH-n végzett mérés kromatogramja (60 CV, minta pH=8,0
A eluens: 10 mM Tris-HCl + 400 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



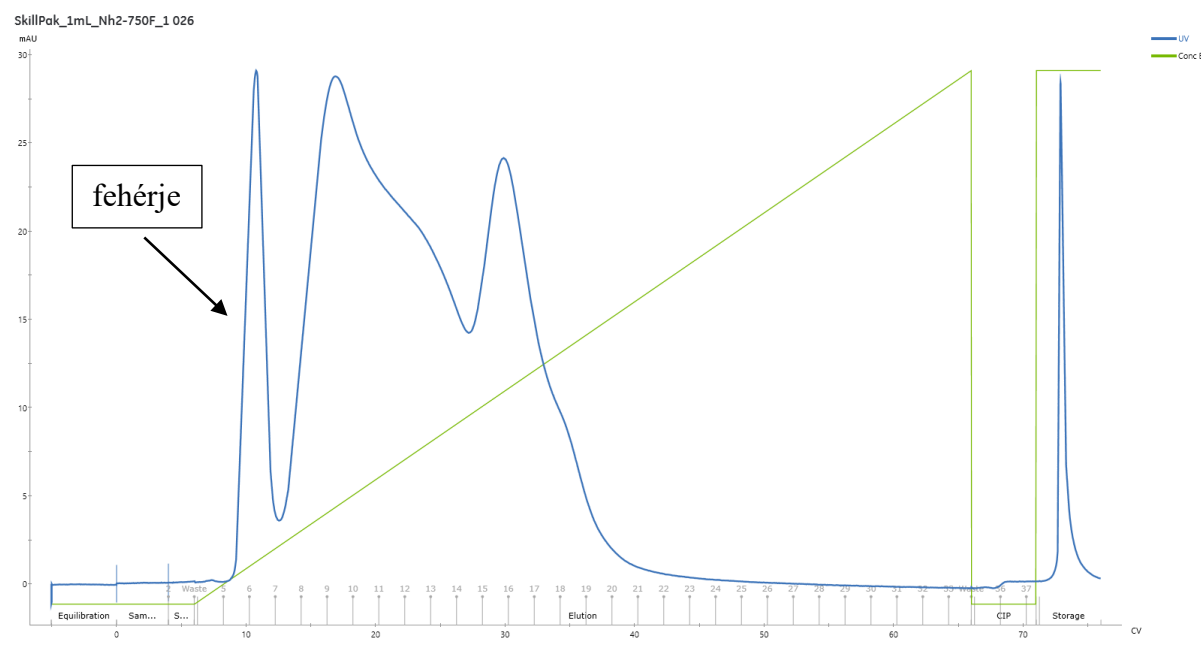
F15. ábra 8,0-as pH-n végzett mérés kromatogramja (60 CV, minta pH=8,0
 A eluens: 10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



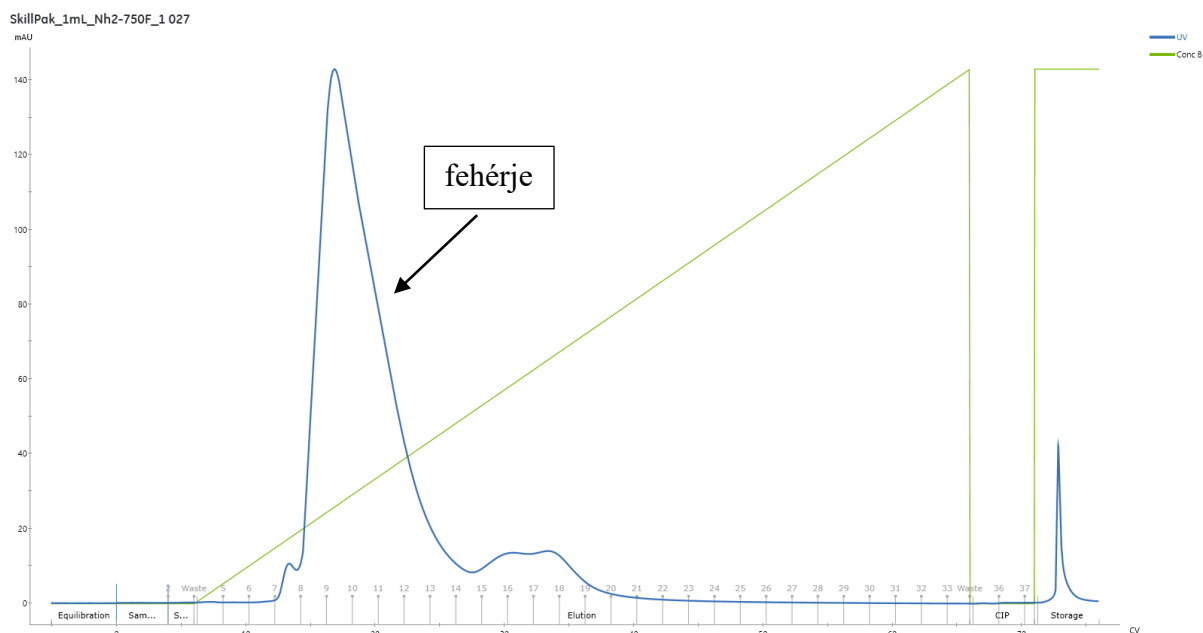
F16. ábra 7,0-es pH-n végzett mérés kromatogramja (60 CV, minta pH=7,0
 A eluens: 10 mM Tris-HCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



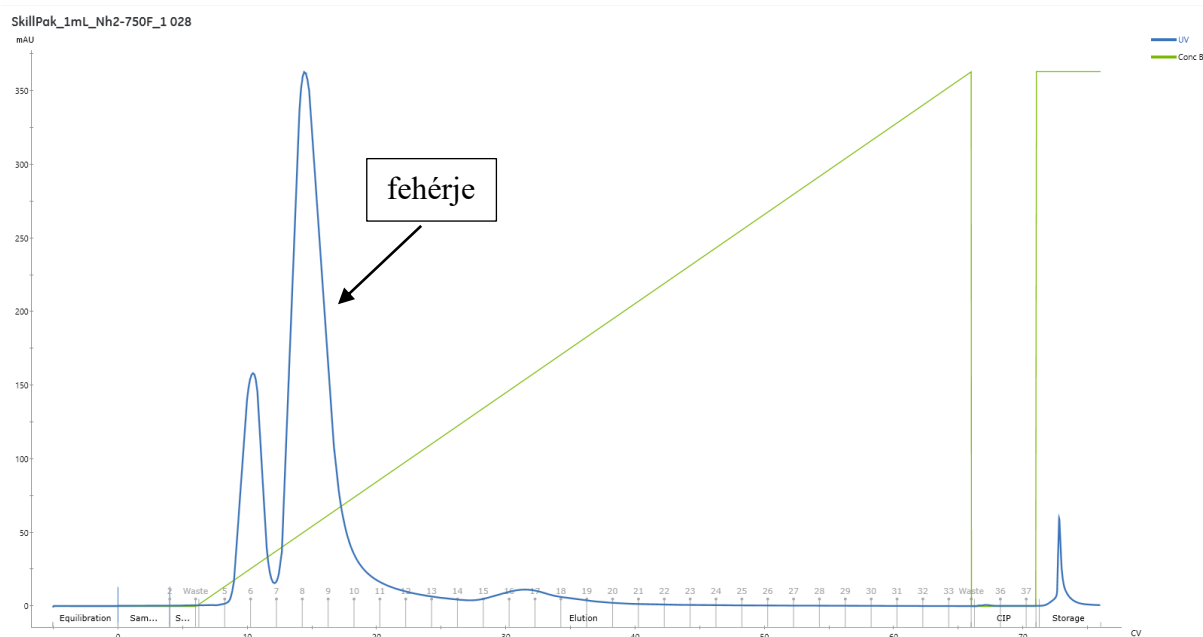
F17. ábra 7,0-es pH-n végzett mérés kromatogramja (60 CV, minta pH=7,0
A eluens: 10 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



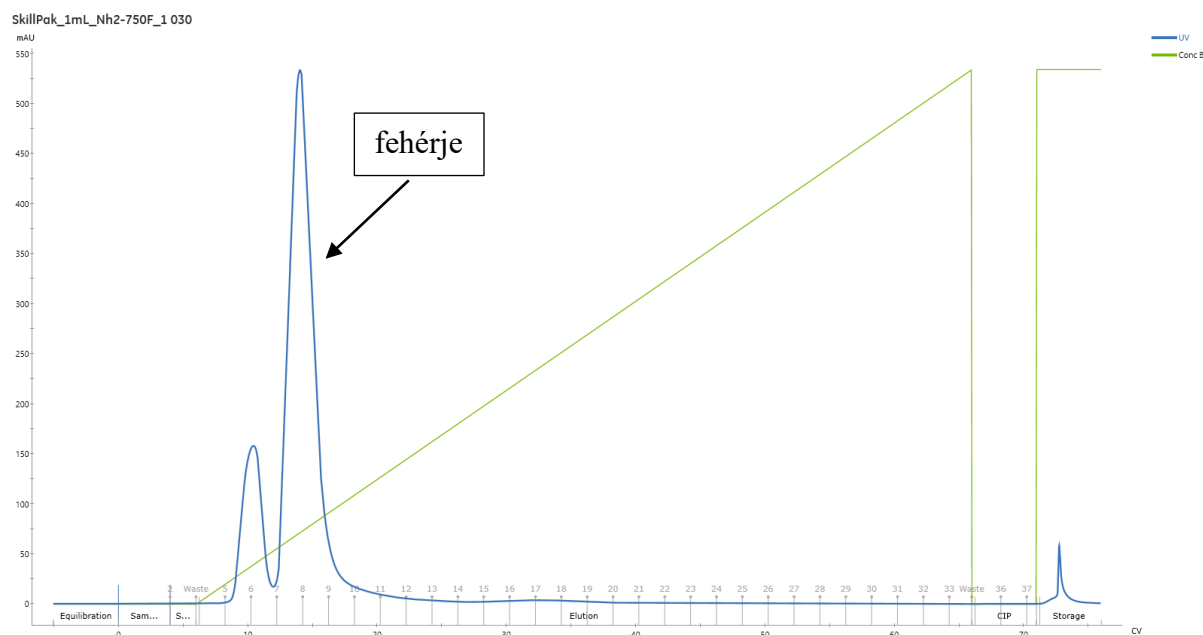
F18. ábra 7,0-es pH-n végzett mérés kromatogramja (60 CV, minta pH=7,0
A eluens: 10 mM Tris-HCl + 200 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



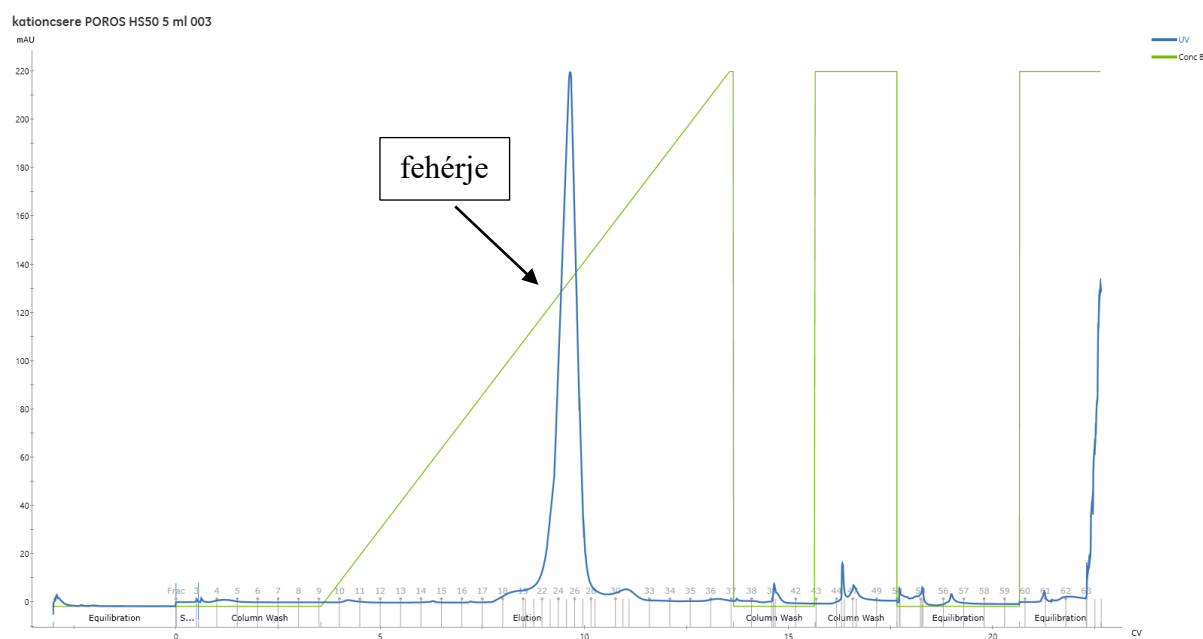
F19. ábra 7,0-es pH-n végzett mérés kromatogramja (60 CV, minta pH=7,0
A eluens: 10 mM Tris-HCl + 300 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



F19. ábra 7,0-es pH-n végzett mérés kromatogramja (60 CV, minta pH=7,0
A eluens: 10 mM Tris-HCl + 400 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



F20. ábra 7,0-es pH-n végzett mérés kromatogramja (60 CV, minta pH=7,0
A eluens: 10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



F21. ábra Kationcsere kromatográfiás oszloppal végzett tisztítás

F1. táblázat Előkísérletek 9,0-es pH-n

Ekvilibráló oldat	Minta pH	Elúció oldat A	Elúció oldat B	Elúció CV
10 mM Tris-HCl	nem lett beállítva	10 mM Tris-HCl	10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl	10 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 9,0	10 mM Tris-HCl	10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl	10 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 8,0	10 mM Tris-HCl	10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl	10 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 7,0	10 mM Tris-HCl	10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl	10 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 6,0	10 mM Tris-HCl	10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl	10 CV

F2. táblázat Előkísérletek 8,0-as pH-n

Ekvilibráló oldat	Minta pH	Elúció oldat A	Elúció oldat B	Elúció CV
10 mM Tris-HCl	nem lett beállítva	10 mM Tris-HCl	10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl	10 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 8,0	10 mM Tris-HCl	10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl	10 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 8,0	10 mM Tris-HCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	10 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 8,0	10 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	15 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 8,0	10 mM Tris-HCl + 300 mM NaCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	20 CV

F3. táblázat Mérések paramétereit 9,0-es pH-n

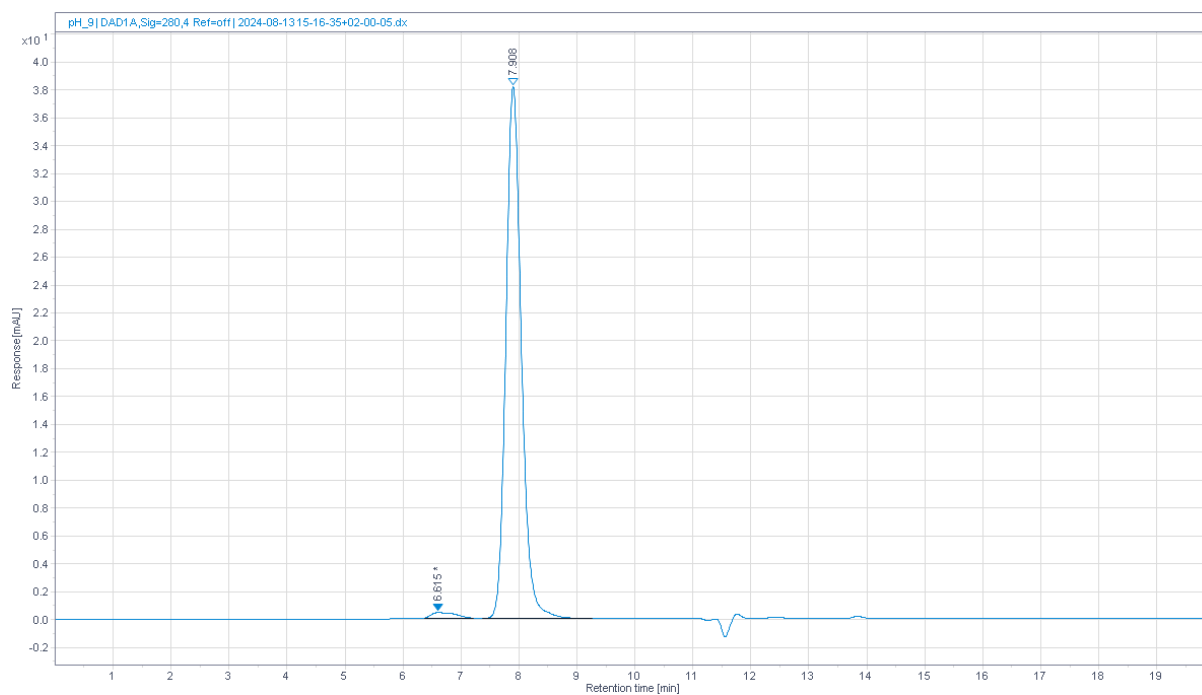
Ekvilibráló oldat	Minta pH	Elúció oldat A	Elúció oldat B	Elúció CV
10 mM Tris-HCl	pH = 9,0	10 mM Tris-HCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	60 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 9,0	10 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	60 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 9,0	10 mM Tris-HCl + 200 mM NaCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	60 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 9,0	10 mM Tris-HCl + 300 mM NaCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	60 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 9,0	10 mM Tris-HCl + 400 mM NaCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	60 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 9,0	10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	60 CV

F4. táblázat Mérések paramétereit 8,0-as pH-n

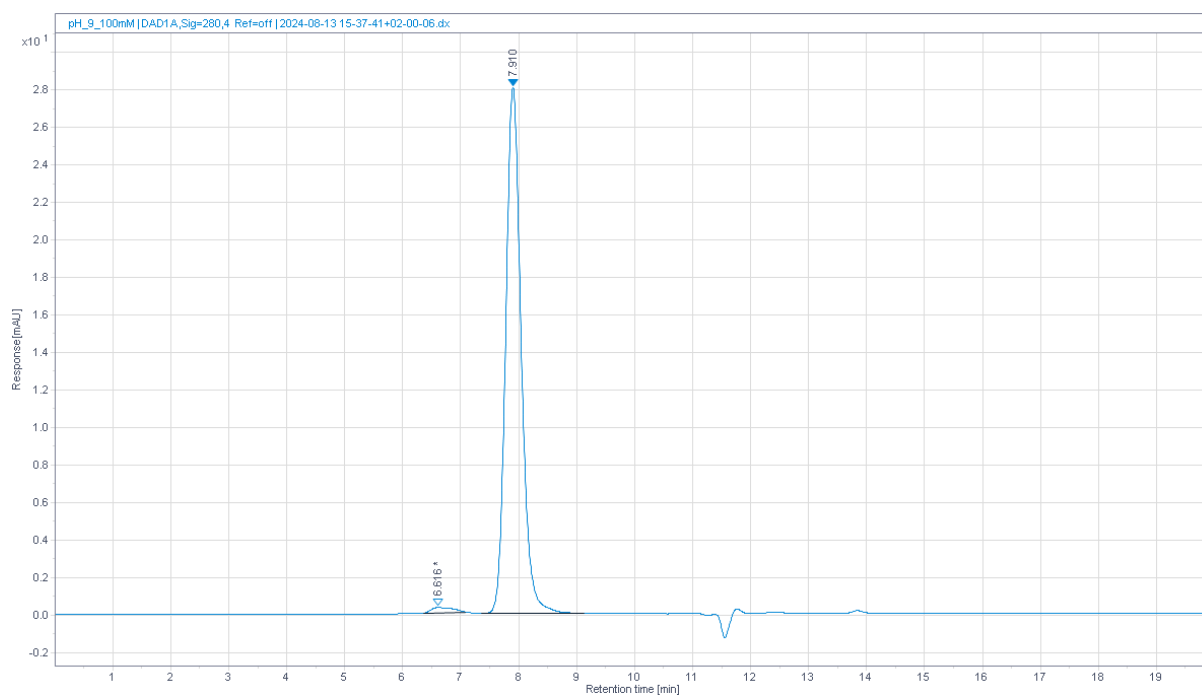
Ekvibráló oldat	Minta pH	Elúció oldat A	Elúció oldat B	Elúció CV
10 mM Tris-HCl	pH = 8,0	10 mM Tris-HCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	60 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 8,0	10 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	60 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 8,0	10 mM Tris-HCl + 200 mM NaCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	60 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 8,0	10 mM Tris-HCl + 300 mM NaCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	60 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 8,0	10 mM Tris-HCl + 400 mM NaCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	60 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 8,0	10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	60 CV

F5. táblázat Mérések paramétereit 7,0-es pH-n

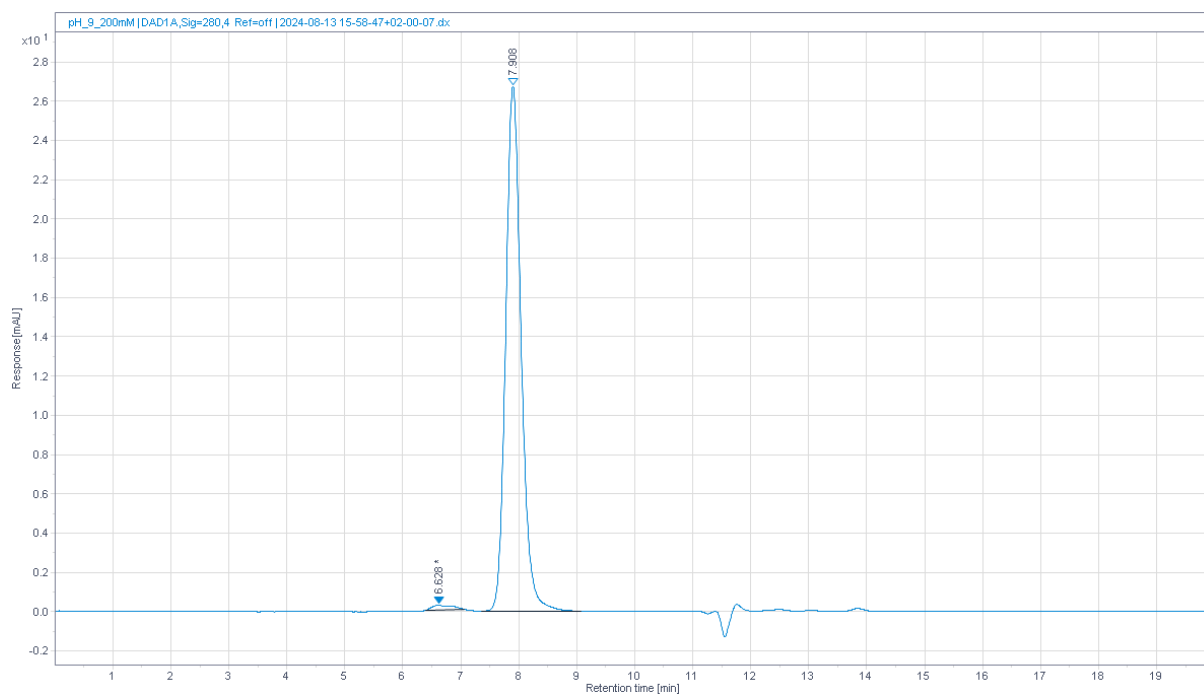
Ekvibráló oldat	Minta pH	Elúció oldat A	Elúció oldat B	Elúció CV
10 mM Tris-HCl	pH = 7,0	10 mM Tris-HCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	60 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 7,0	10 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	60 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 7,0	10 mM Tris-HCl + 200 mM NaCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	60 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 7,0	10 mM Tris-HCl + 300 mM NaCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	60 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 7,0	10 mM Tris-HCl + 400 mM NaCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	60 CV
10 mM Tris-HCl	pH = 7,0	10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl	10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl	60 CV



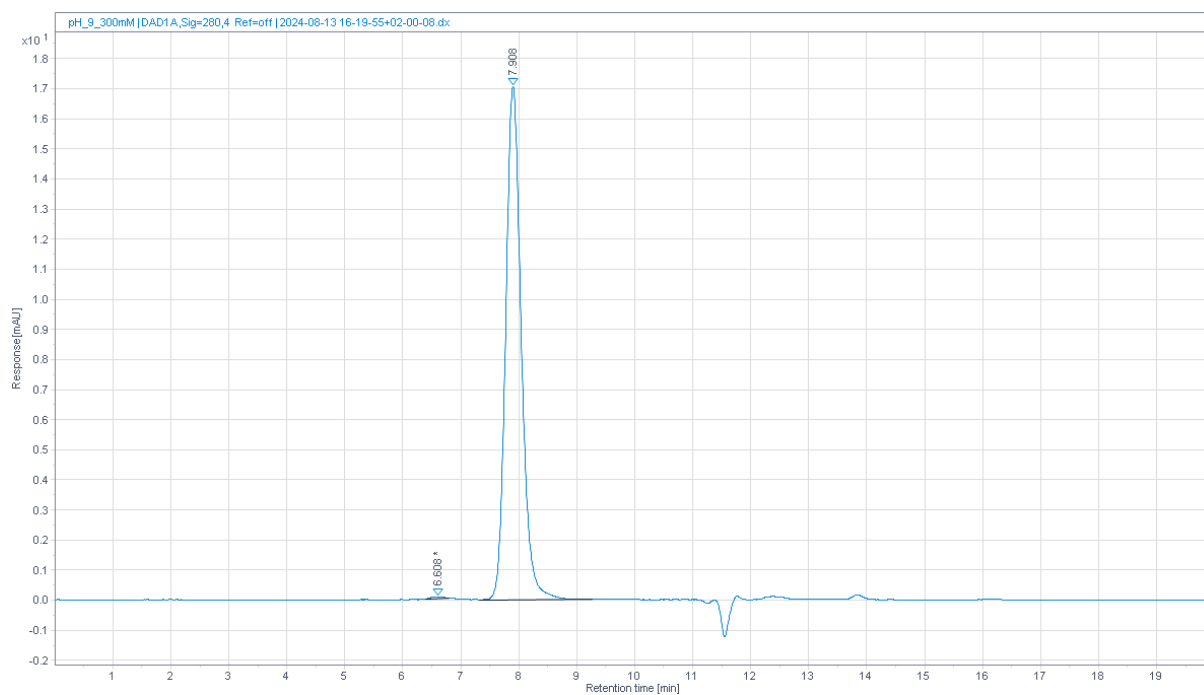
F22. ábra HPLC kromatogram (60 CV, minta pH=9,0 A eluens: 10 mM Tris-HCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



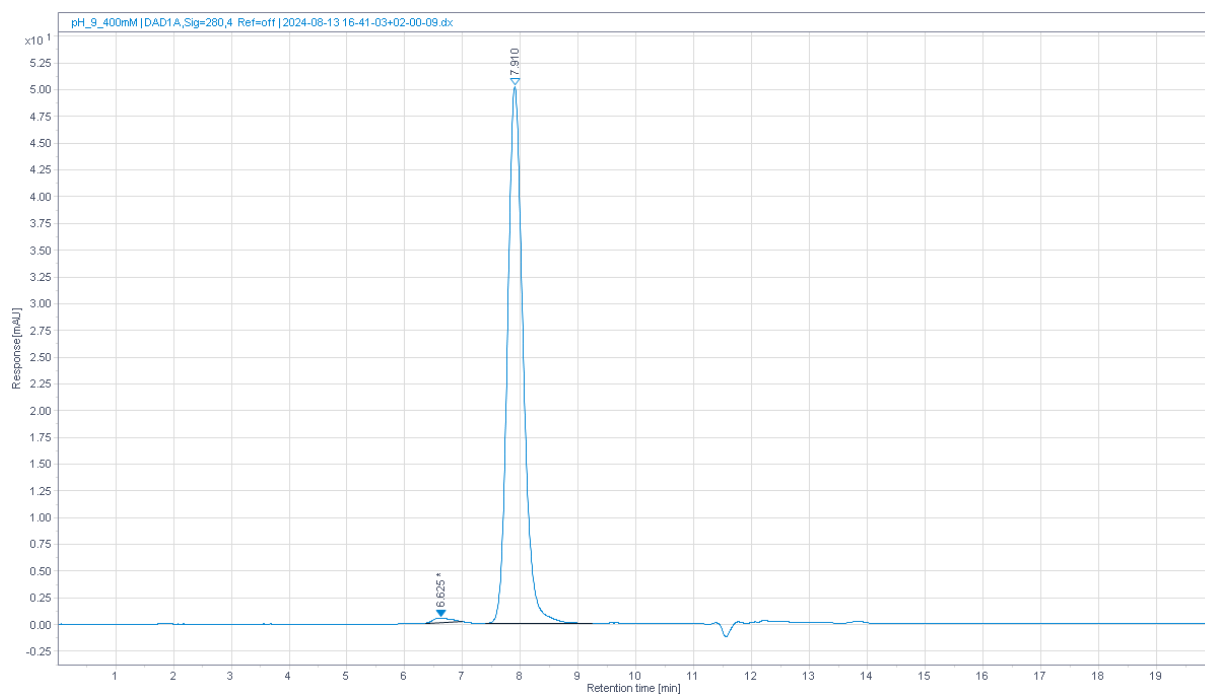
F23. ábra HPLC kromatogram (60 CV, minta pH=9,0 A eluens: 10 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



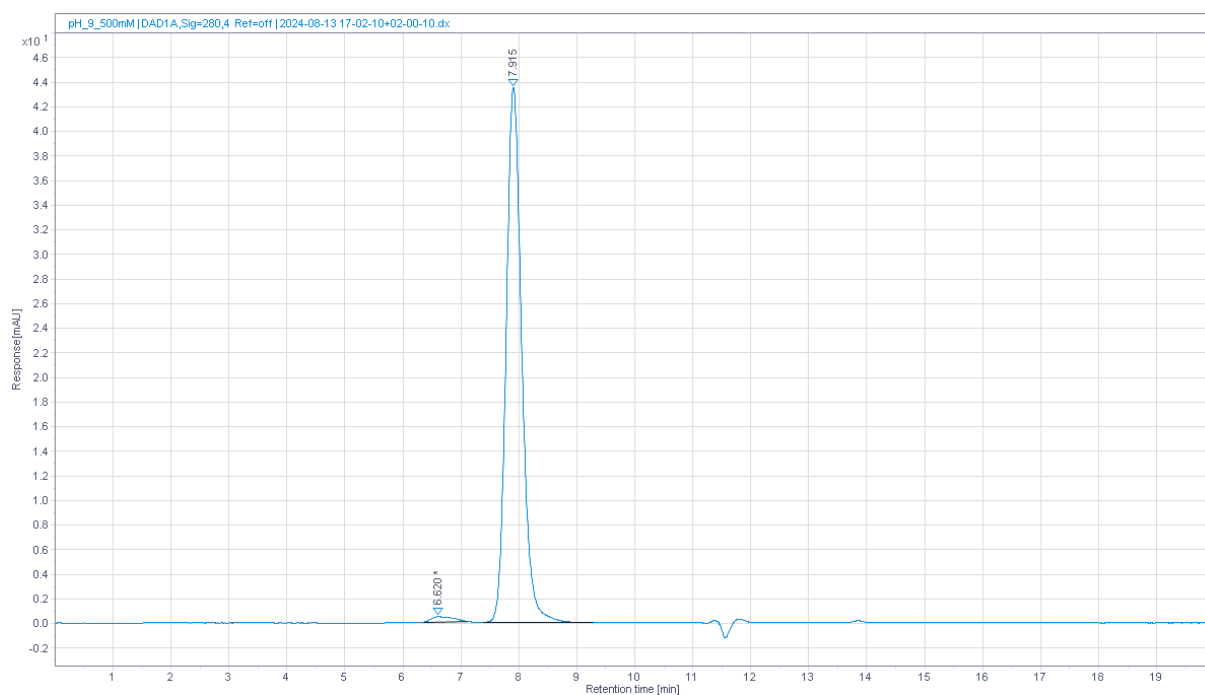
F24. ábra HPLC kromatogram (60 CV, minta pH=9,0 A eluens: 10 mM Tris-HCl + 200 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



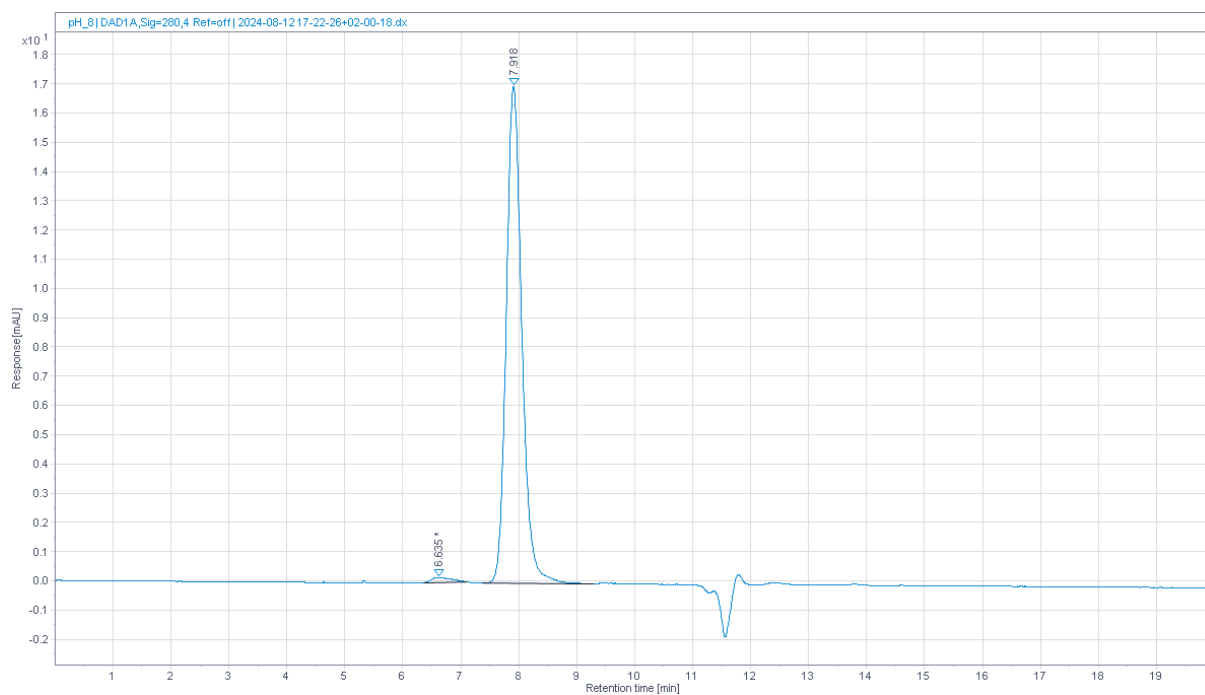
F25. ábra HPLC kromatogram (60 CV, minta pH=9,0 A eluens: 10 mM Tris-HCl + 300 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



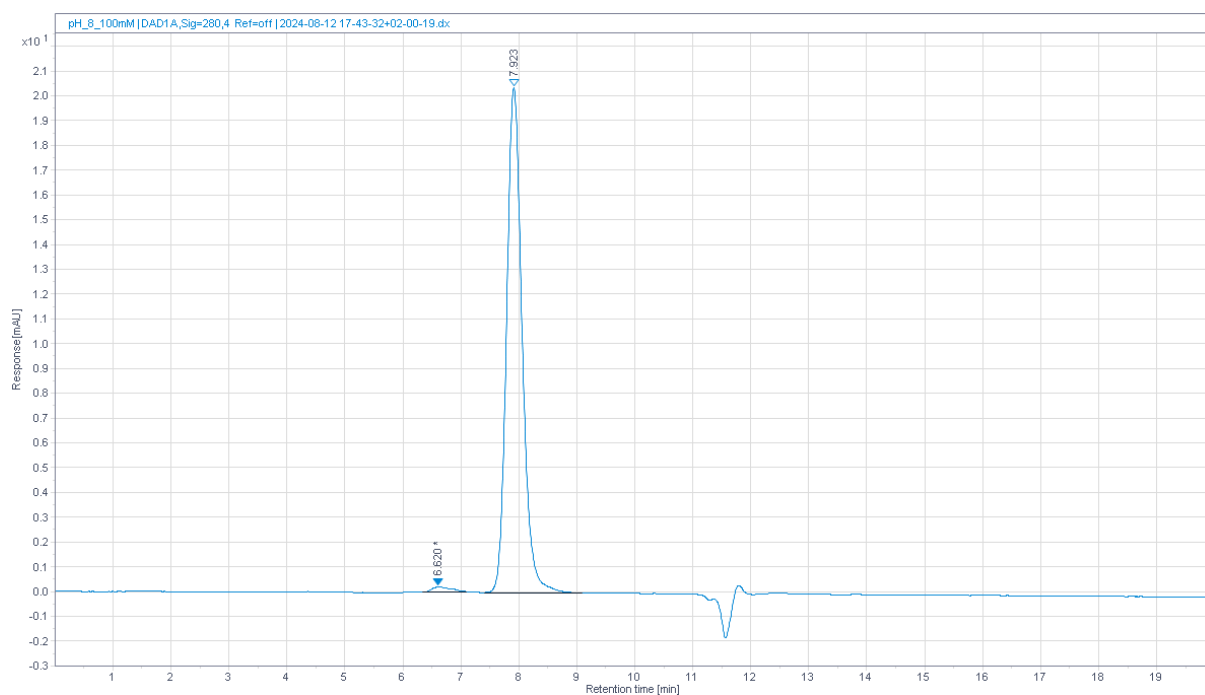
F26. ábra HPLC kromatogram (60 CV, minta pH=9,0 A eluens: 10 mM Tris-HCl + 400 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



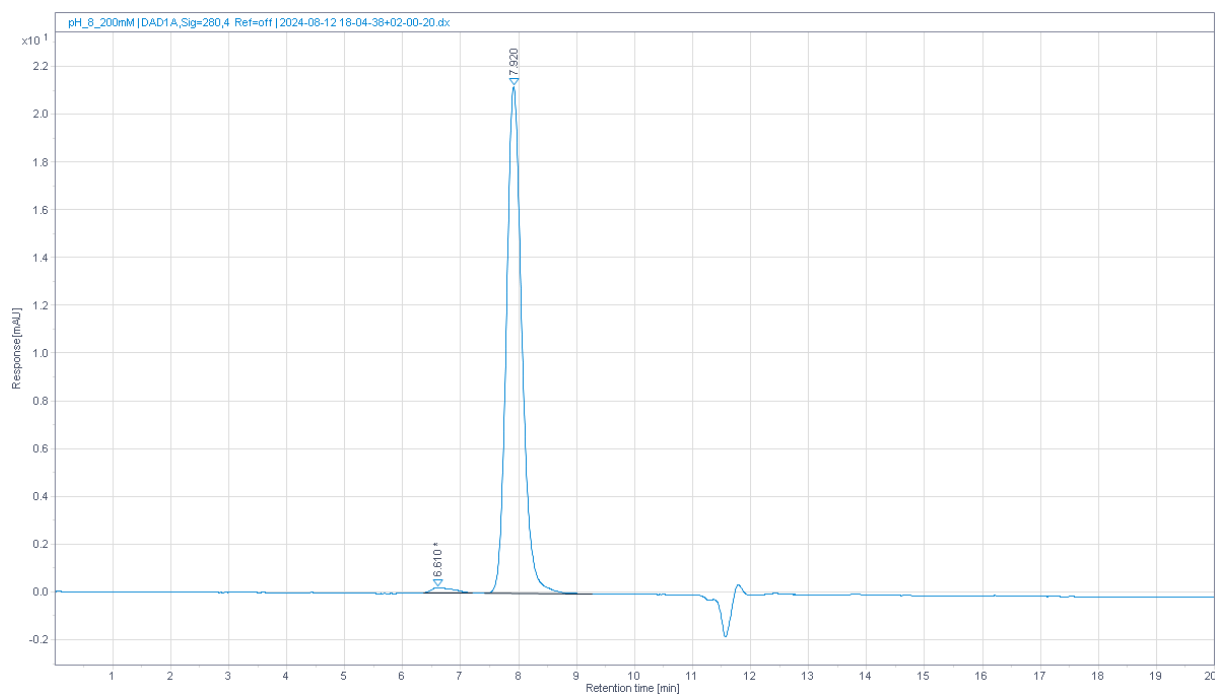
F27. ábra HPLC kromatogram (60 CV, minta pH=9,0 A eluens: 10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



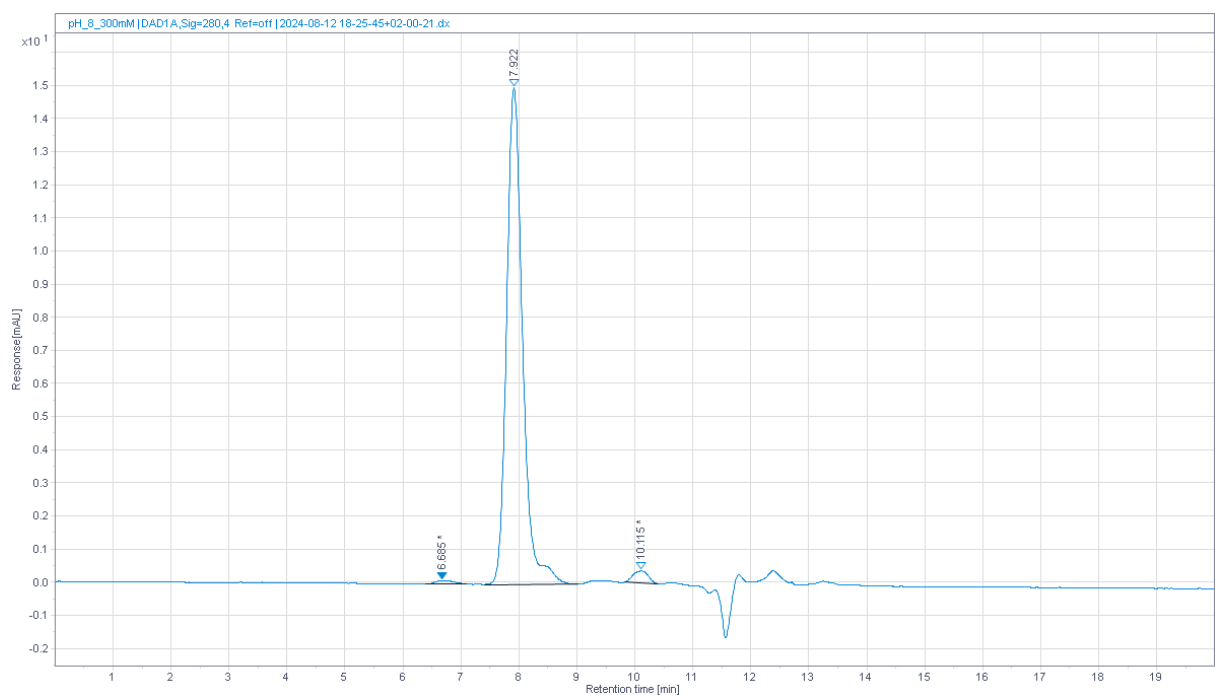
F28. ábra HPLC kromatogram (60 CV, minta pH=8,0 A eluens: 10 mM Tris-HCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



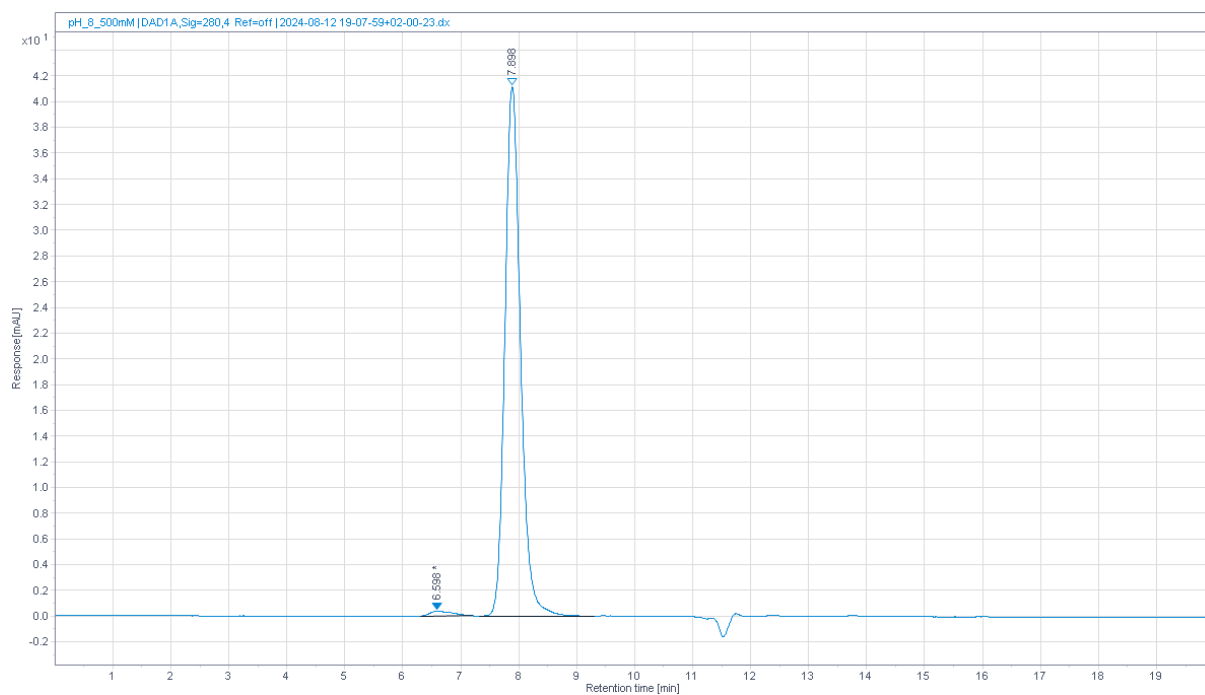
F29. ábra HPLC kromatogram (60 CV, minta pH=8,0 A eluens: 10 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



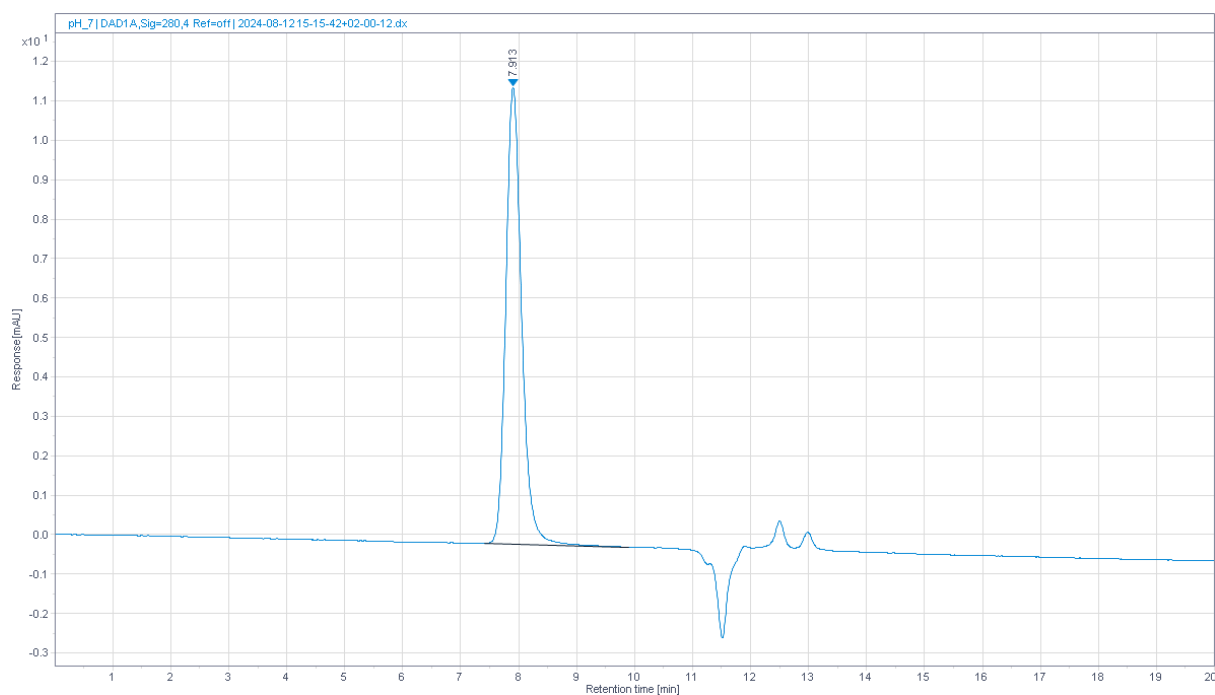
F30. ábra HPLC kromatogram (60 CV, minta pH=8,0 A eluens: 10 mM Tris-HCl + 200 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



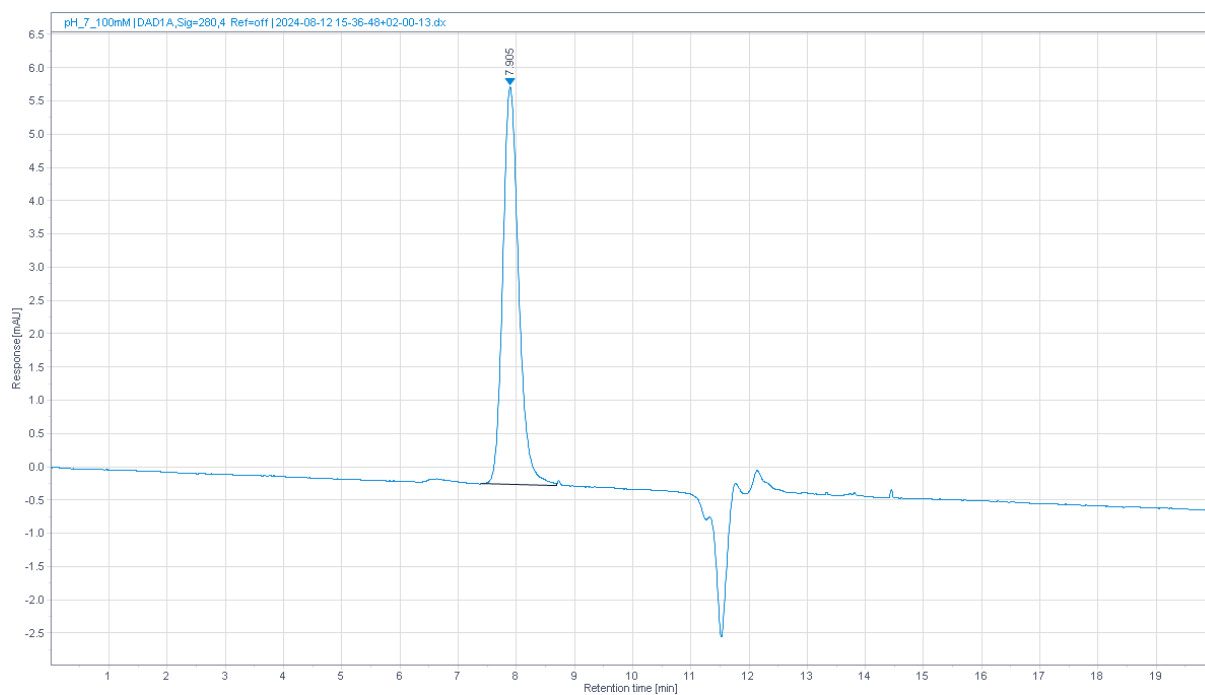
F31. ábra HPLC kromatogram (60 CV, minta pH=8,0 A eluens: 10 mM Tris-HCl + 300 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



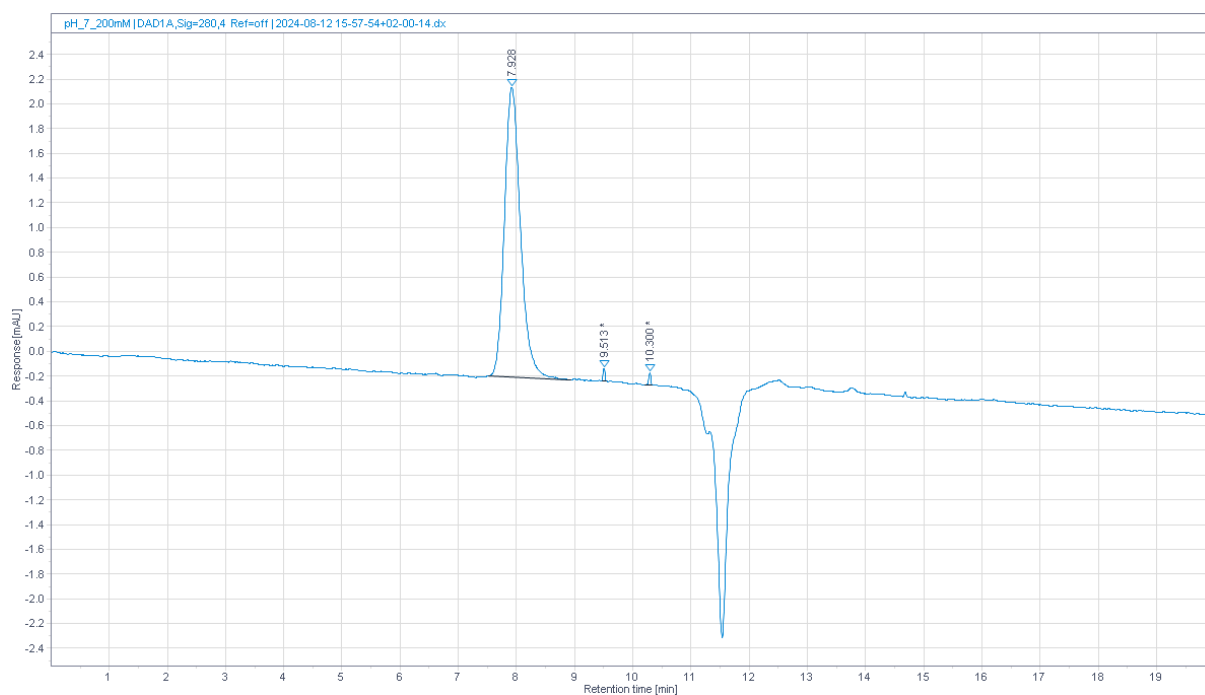
F32. ábra HPLC kromatogram (60 CV, minta pH=8,0 A eluens: 10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



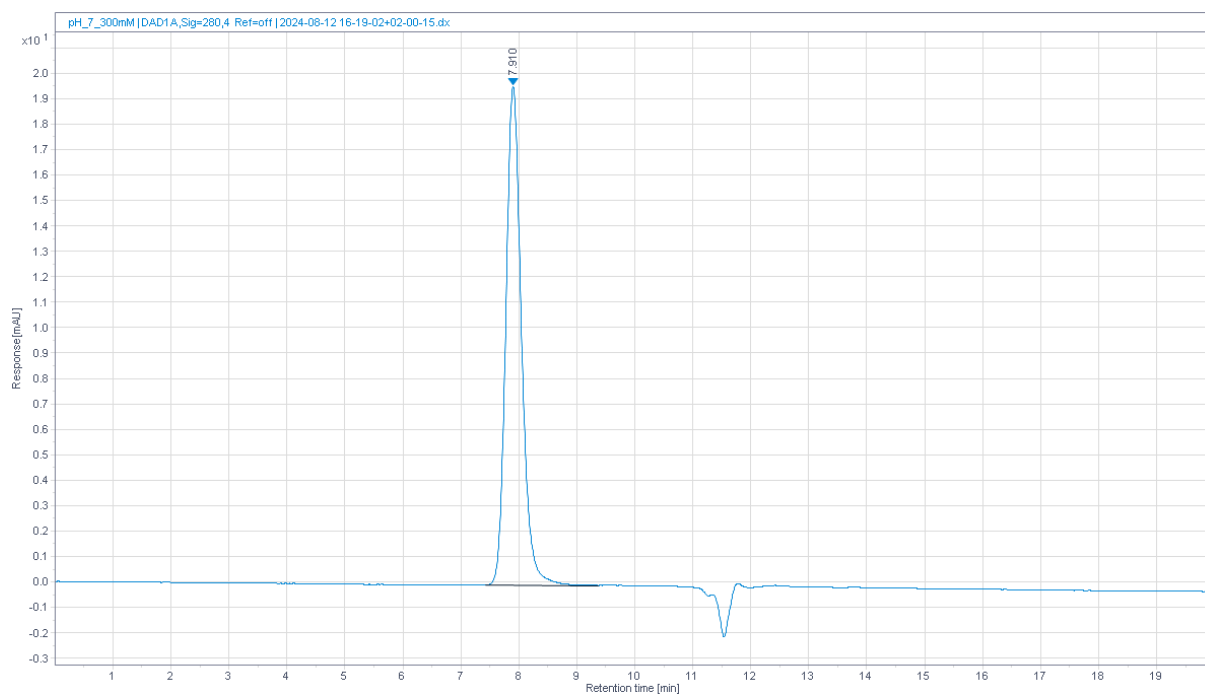
F33. ábra HPLC kromatogram (60 CV, minta pH=7,0 A eluens: 10 mM Tris-HCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



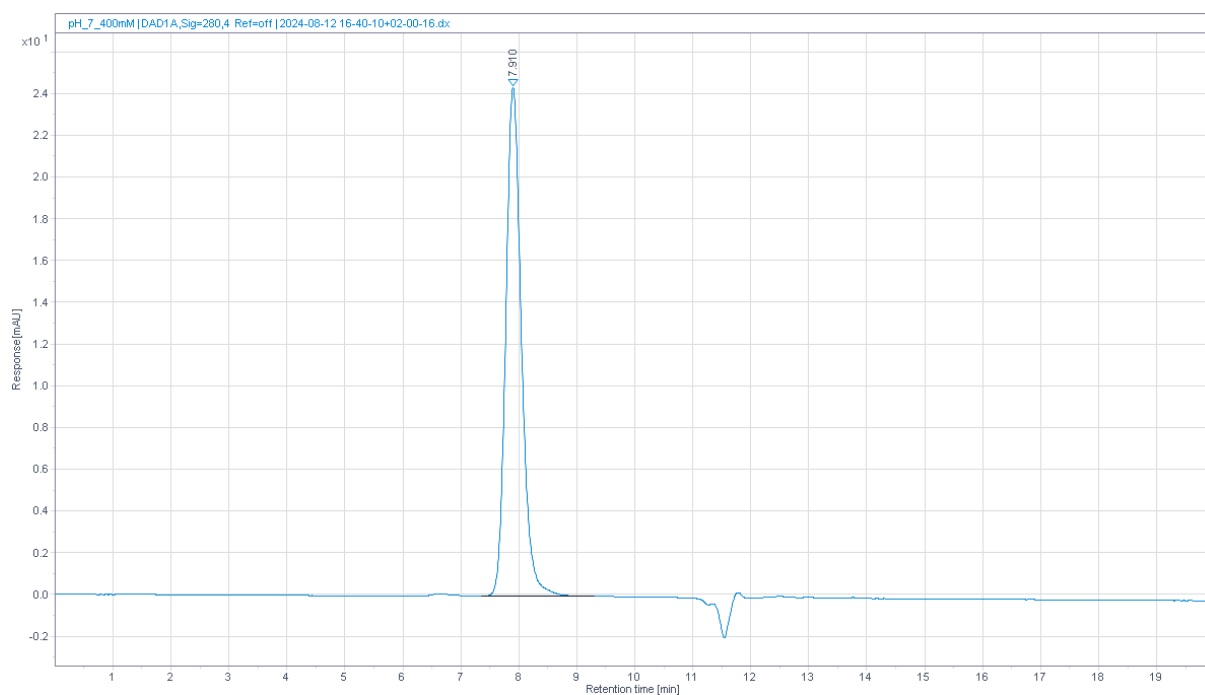
F34. ábra HPLC kromatogram (60 CV, minta pH=7,0 A eluens: 10 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



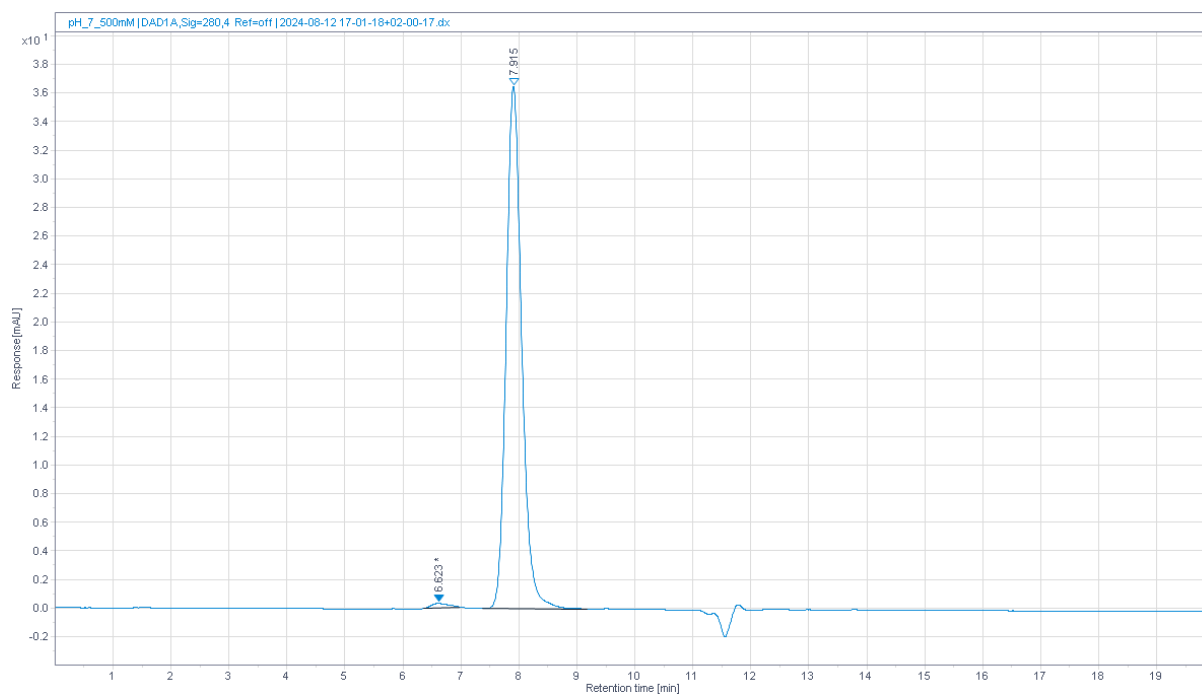
F35. ábra HPLC kromatogram (60 CV, minta pH=7,0 A eluens: 10 mM Tris-HCl + 200 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



F36. ábra HPLC kromatogram (60 CV, minta pH=7,0 A eluens: 10 mM Tris-HCl + 300 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



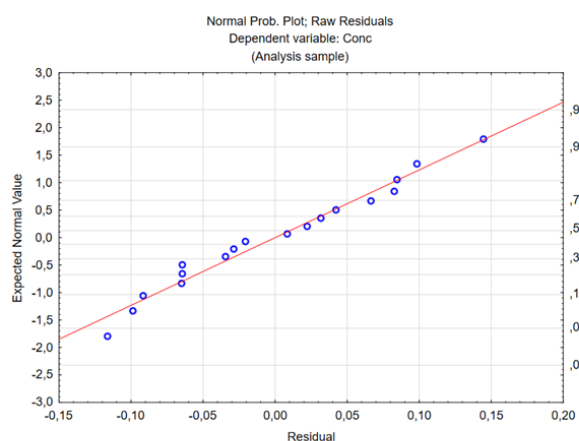
F37. ábra HPLC kromatogram (60 CV, minta pH=7,0 A eluens: 10 mM Tris-HCl + 400 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)



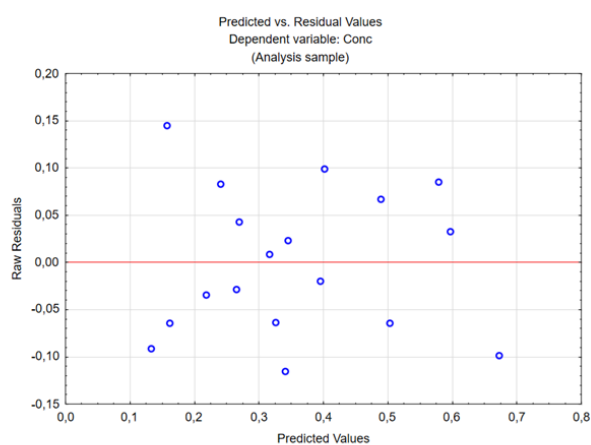
F38. ábra HPLC kromatogram (60 CV, minta pH=7,0 A eluens: 10 mM Tris-HCl + 500 mM NaCl, B eluens: 10 mM Tris-HCl + 1,0 M NaCl)

F6. táblázat HPLC méréssel meghatározott fehérjekoncentrációk

	Ionerősség	Fehérjekoncentráció [mg/ml]
pH=7,0	0 mM	0,1838
	100 mM	0,0970
	200 mM	0,0419
	300 mM	0,3023
	400 mM	0,3751
	500 mM	0,5562
pH=8,0	0 mM	0,2620
	100 mM	0,3121
	200 mM	0,3242
	300 mM	0,2372
	400 mM	0,4389
	500 mM	0,6298
pH=9,0	0 mM	0,5005
	100 mM	0,3678
	200 mM	0,3252
	300 mM	0,2252
	400 mM	0,6637
	500 mM	0,5746
Kationos tisztítás	-	0,1828

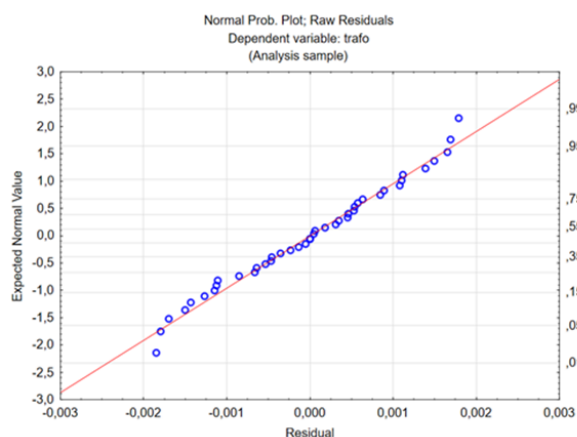


a)

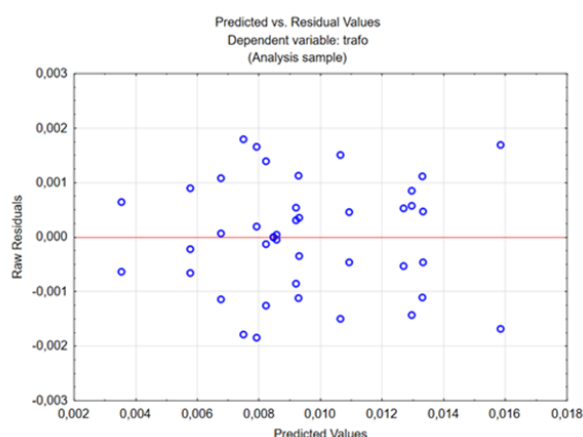


b)

F39. ábra HPLC mérés esetén a reziduuumok normális eloszlása (a)
és a varianciák azonossága (b)

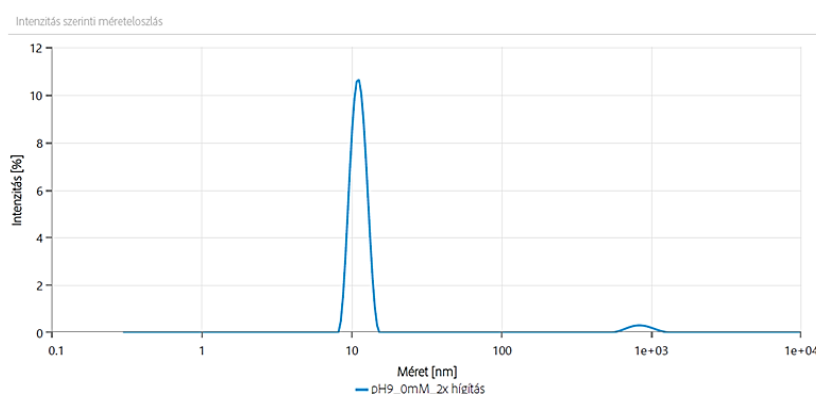


a)

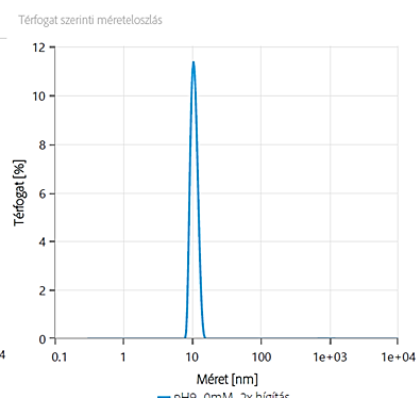


b)

F40. ábra dsDNS szennyező mérés esetén a reziduumok normális eloszlása (a) és a varianciák azonossága (b)

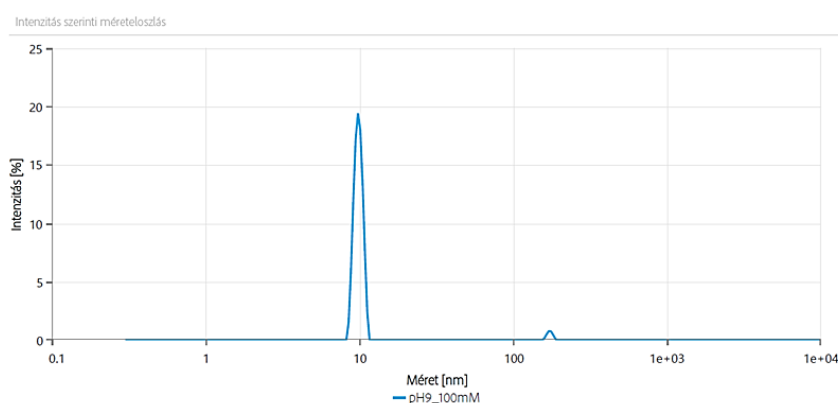


a)

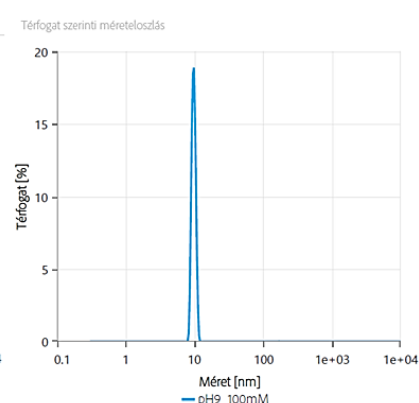


b)

F41. ábra pH=9,0-es 0 mM-os minta DLS mérésének eredménye, intenzitás szerinti eloszlás (a), térfogat szerinti eloszlás (b)

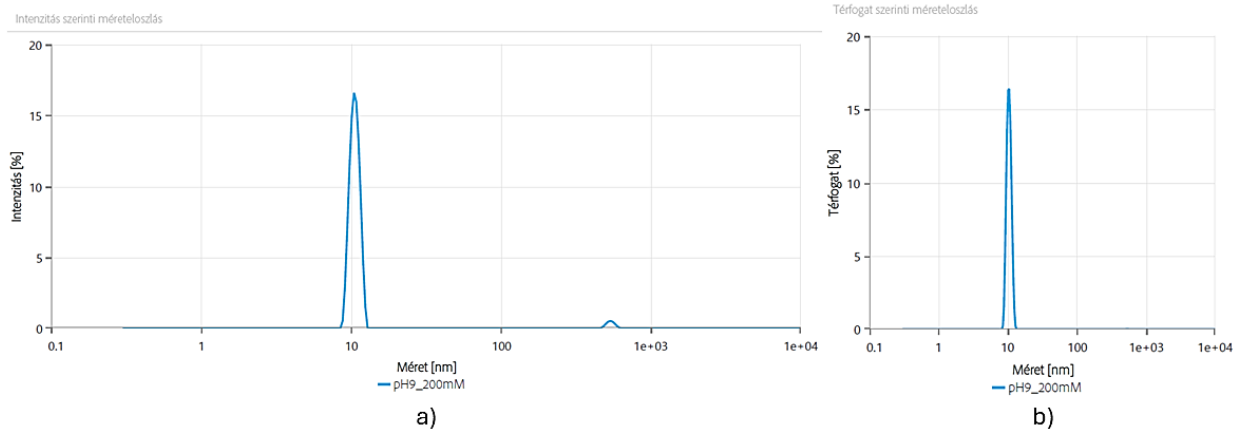


a)

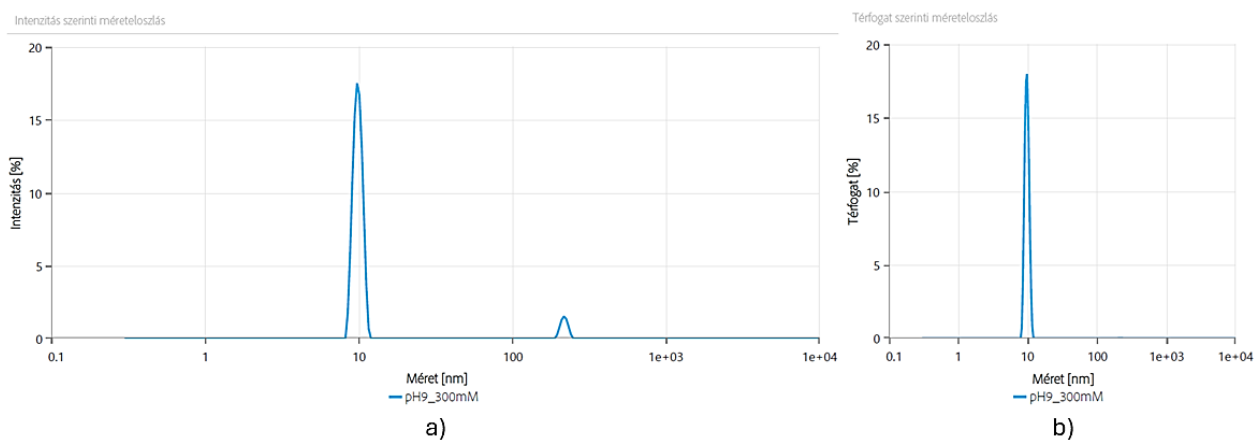


b)

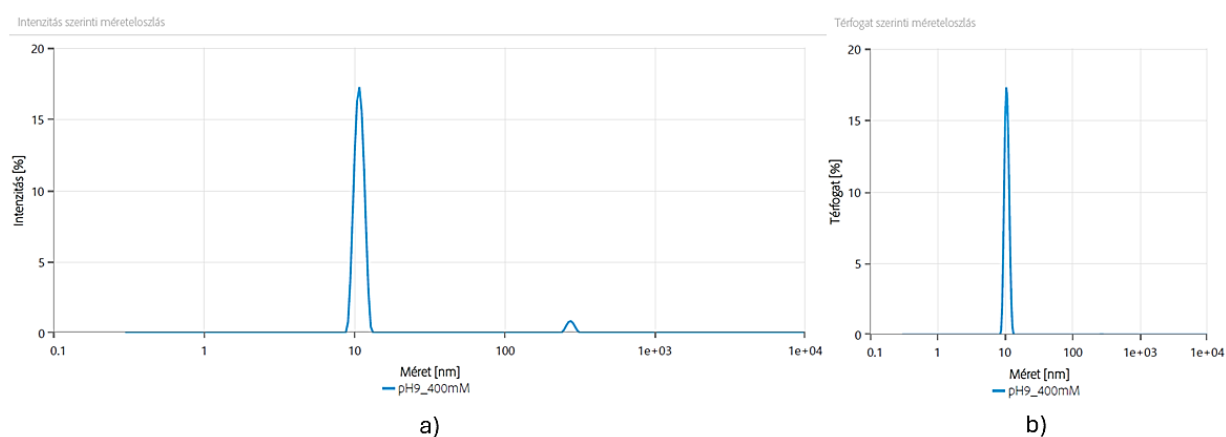
F42. ábra pH=9,0-es 100 mM-os minta DLS mérésének eredménye, intenzitás szerinti eloszlás (a), térfogat szerinti eloszlás (b)



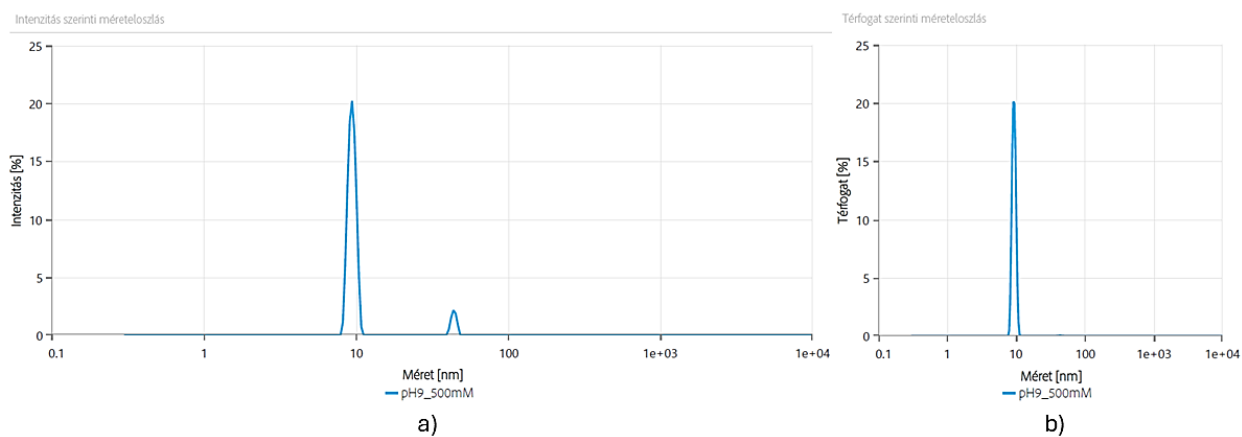
F43. ábra pH=9,0-es 200 mM-os minta DLS mérésének eredménye, intenzitás szerinti eloszlás (a), térfogat szerinti eloszlás (b)



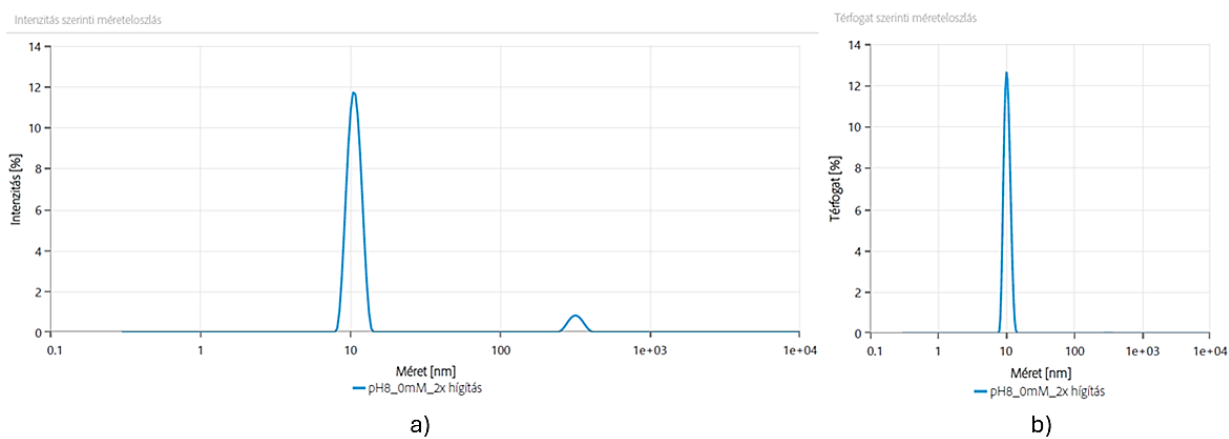
F44. ábra pH=9,0-es 300 mM-os minta DLS mérésének eredménye, intenzitás szerinti eloszlás (a), térfogat szerinti eloszlás (b)



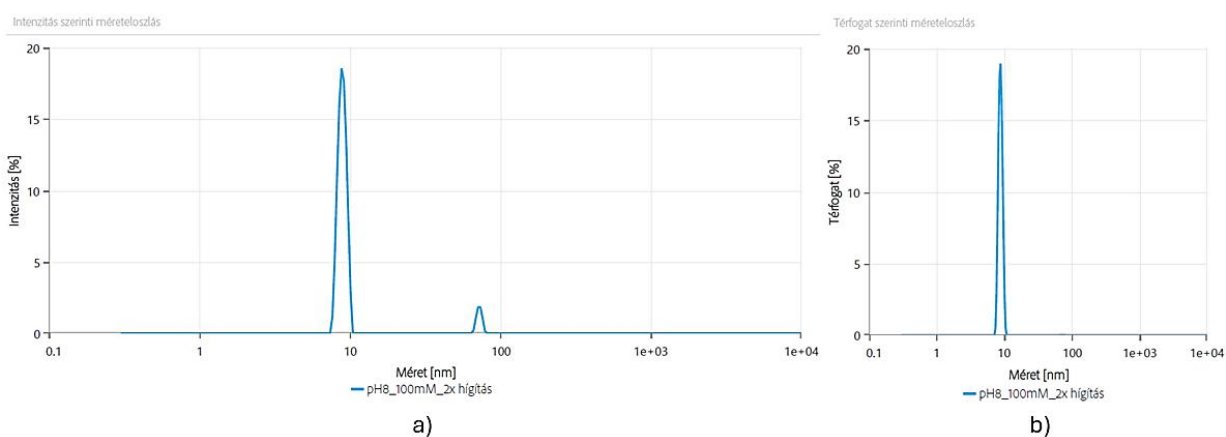
F45. ábra pH=9,0-es 400 mM-os minta DLS mérésének eredménye, intenzitás szerinti eloszlás (a), térfogat szerinti eloszlás (b)



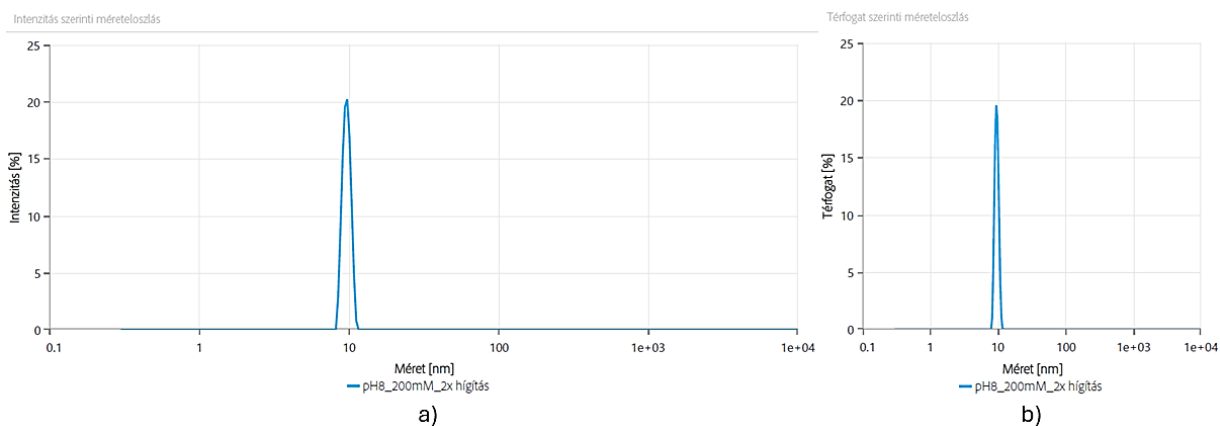
F46. ábra pH=9,0-es 500 mM-os minta DLS mérésének eredménye,
intenzitás szerinti eloszlás (a), térfogat szerinti eloszlás (b)



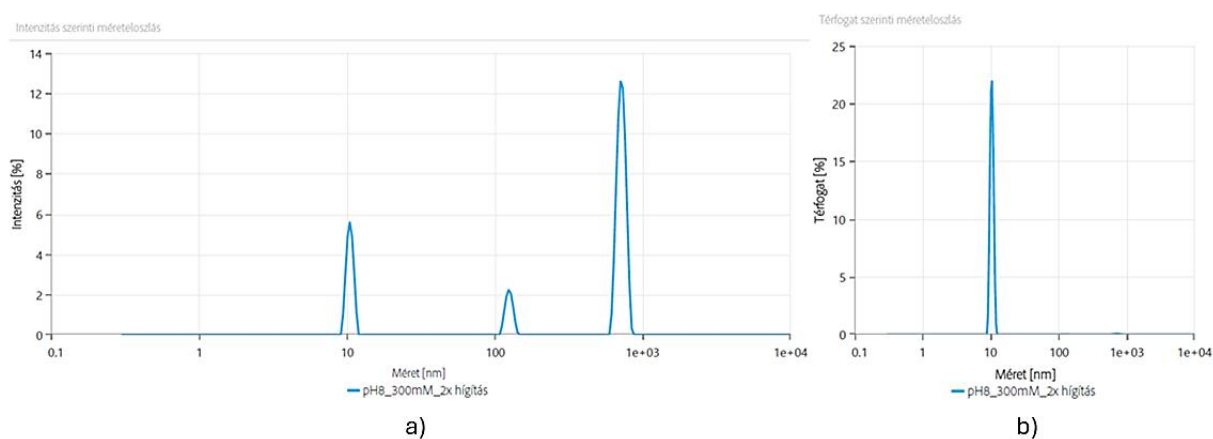
F47. ábra pH=8,0-as 0 mM-os minta DLS mérésének eredménye,
intenzitás szerinti eloszlás (a), térfogat szerinti eloszlás (b)



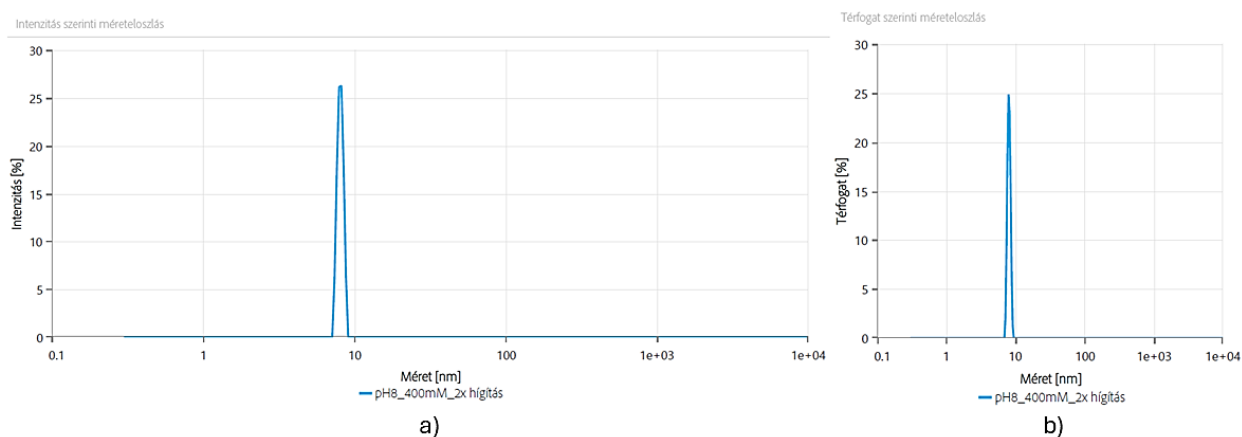
F48. ábra pH=8,0-as 100 mM-os minta DLS mérésének eredménye,
intenzitás szerinti eloszlás (a), térfogat szerinti eloszlás (b)



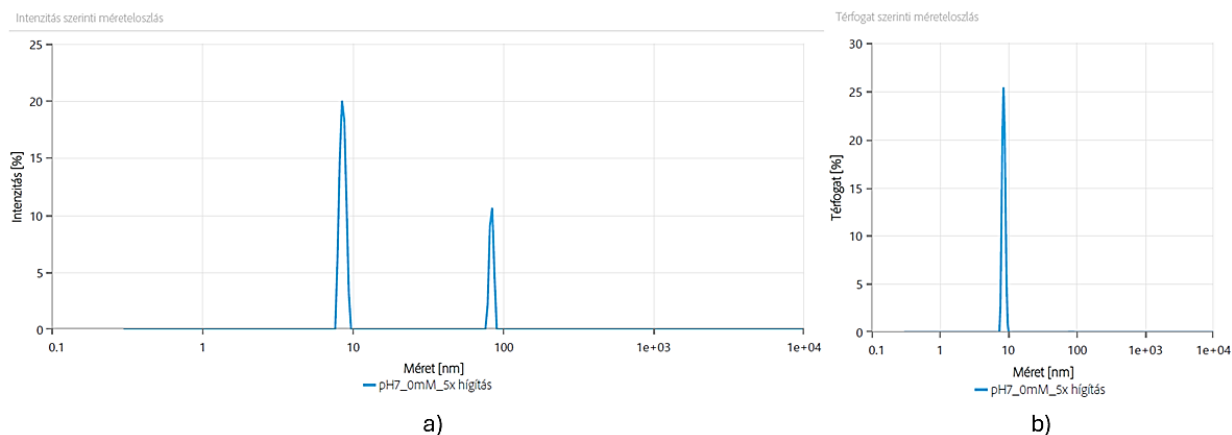
F49. ábra pH=8,0-as 200 mM-os minta DLS mérésének eredménye, intenzitás szerinti eloszlás (a), térfogat szerinti eloszlás (b)



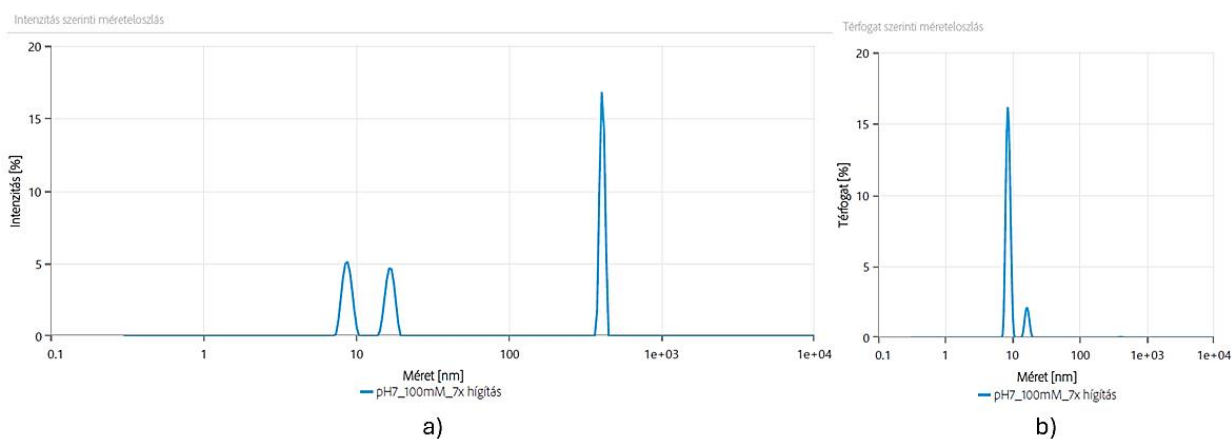
F50. ábra pH=8,0-as 300 mM-os minta DLS mérésének eredménye, intenzitás szerinti eloszlás (a), térfogat szerinti eloszlás (b)



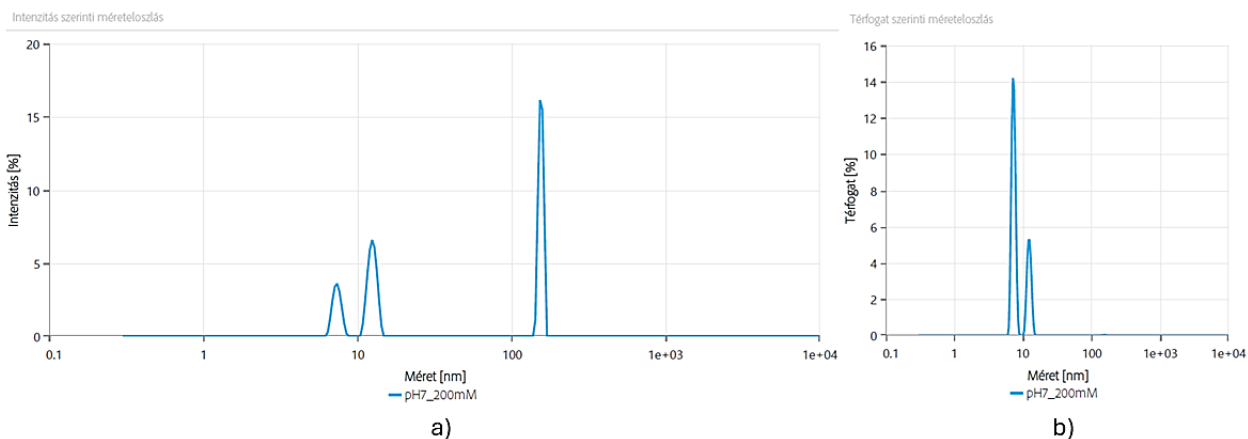
F51. ábra pH=8,0-as 400 mM-os minta DLS mérésének eredménye, intenzitás szerinti eloszlás (a), térfogat szerinti eloszlás (b)



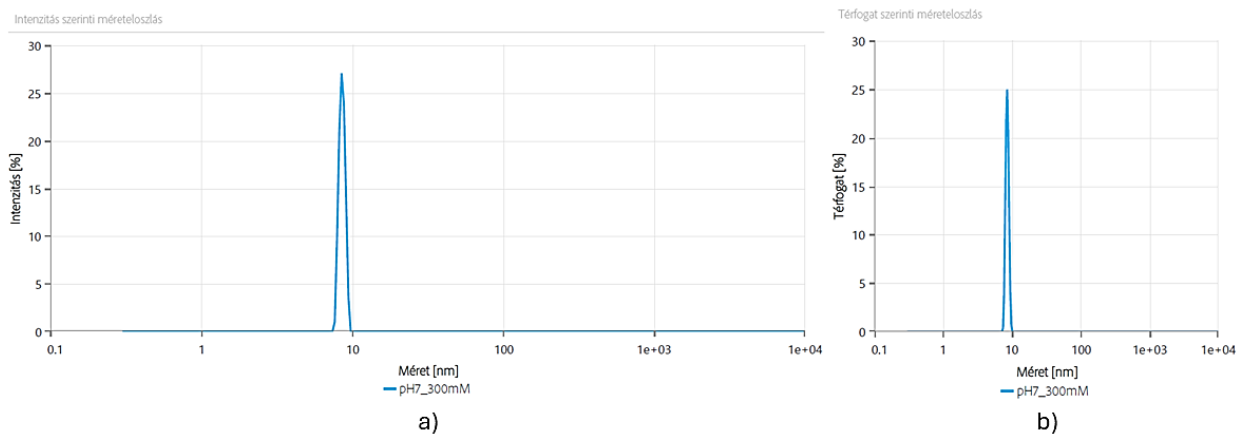
F52. ábra pH=7,0-es 0 mM-os minta DLS mérésének eredménye, intenzitás szerinti eloszlás (a), térfogat szerinti eloszlás (b)



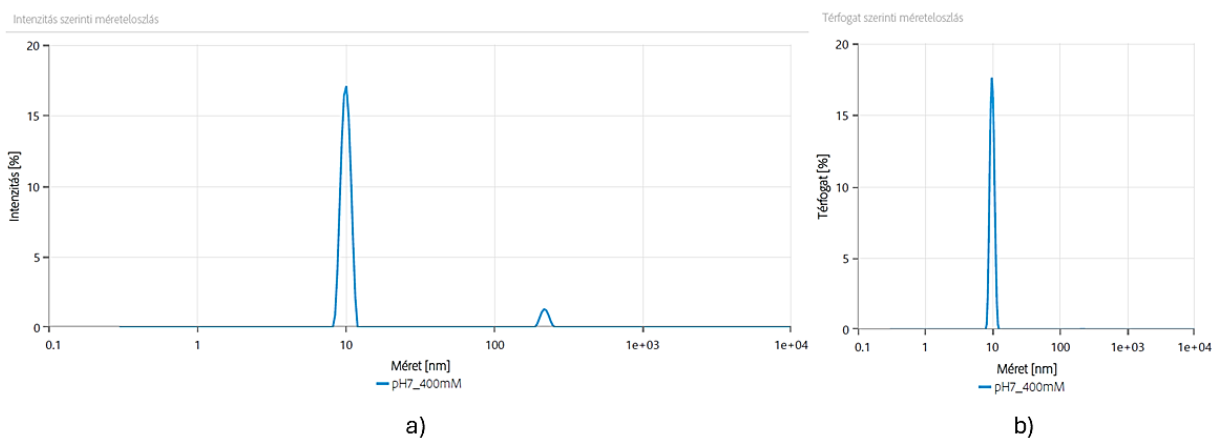
F53. ábra pH=7,0-es 100 mM-os minta DLS mérésének eredménye, intenzitás szerinti eloszlás (a), térfogat szerinti eloszlás (b)



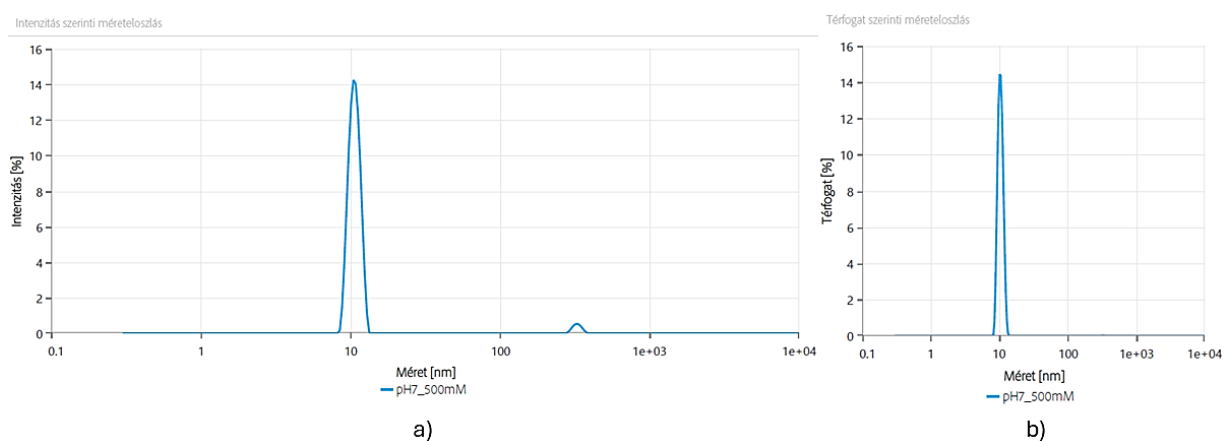
F54. ábra pH=7,0-es 200 mM-os minta DLS mérésének eredménye, intenzitás szerinti eloszlás (a), térfogat szerinti eloszlás (b)



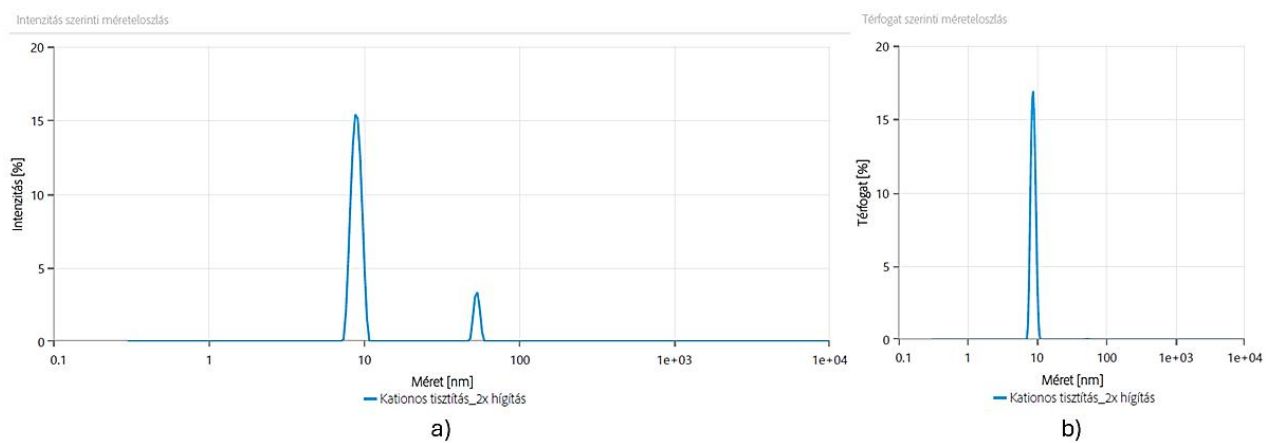
F55. ábra pH=7,0-es 300 mM-os minta DLS mérésének eredménye, intenzitás szerinti eloszlás (a), térfogat szerinti eloszlás (b)



F56. ábra pH=7,0-es 400 mM-os minta DLS mérésének eredménye, intenzitás szerinti eloszlás (a), térfogat szerinti eloszlás (b)



F57. ábra pH=7,0-es 500 mM-os minta DLS mérésének eredménye, intenzitás szerinti eloszlás (a), térfogat szerinti eloszlás (b)



F58. ábra Kationcserés oszloppal tisztított minta DLS mérésének eredménye, intenzitás szerinti eloszlás (a), térfogat szerinti eloszlás (b)