

Vaskó Dorottya¹ – Hirsch Edit¹ – Fehér Csaba^{1,2}¹BME Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar²BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

vasko.dorottya@edu.bme.hu

Monoklonális antitestek hagyományos és alternatív tisztítási módszerei

A monoklonális antitestek jellemzői

A monoklonális antitestek jelentősége

Az Egyesült Államok Élelmezési és Gyógyszerészeti Igazgatósága (USA FDA) 1986-ban hagyta jóvá az első monoklonális antitest (*monoclonal antibody*, mAb) forgalmazását. Azóta az antitestek a gyógyszerpiac legkeresettebb készítményeivé váltak, a hatóságok pedig már számos betegség kezelésére engedélyezték az antitest-terápiák használatát, többek között rákos megbetegedésekre, májgyulladásra, gyulladásos ízületi megbetegedésre, cukorbetegségre, Crohn-betegségre és sclerosis multiplexre [1]. A monoklonális antitestek használata a 2019 végén megjelent Covid-19 vírus által megfertőzöttek kezelésében is hatékony gyógymódot kínál. Már korábbi kutatások is bizonyították, hogy a monoklonális antitestek használata új megközelítést jelent a vírusos megbetegedések kezelésében, mint például az influenza, a SARS, a MERS és az Ebola [2].

A monoklonális antitestek termelése és feldolgozása

A fehérjealapú gyógyszerek összetett, többségük élő szervezetek által, specifikusan kialakított sejtszrendszerek és rekombináns DNS-technológia felhasználásával készülnek. Az *upstream* művelet során a monoklonális antitestek termelését CHO (*Chinese hamster ovary*) sejtvonalakkal valósítják meg (1. ábra), jellemzően rátáplálásos (*fed-batch*), szakaszos technológiával. Azonban jelentős törekvések vannak az iparban a folyamatos üzemeltetésre való áttérésre, annak számos előnye miatt. Az egyik legjelentősebb ezek közül, hogy a holt idők kiiktatásával csökkenthető a gyártási idő, ami jelentősen nagyobb termelékenységhez vezethet. Az emlőssejteket általában keverővel ellátott bioreaktorban, szuszpenziós közegben tenyésztik. A megfelelő minőségű és mennyiségű monoklonális antitestek termelése szempontjából elengedhetetlen az egyes kritikus paraméterek, többek között az oldottóxicitás-szint, a hőmérséklet (általában 37 °C), a pH (vérre jellemző 7,4-es érték), valamint a nitrogén- és szénforrások koncentrációjának megfelelő szinten tartása. Ezeken kívül célszerű vizsgálni a sejtek aminosavszükségletét, mert egy-egy aminosav esetleges hiánya korlátozhatja a sejtek növekedését és termelékenységét [3].

A *downstream* műveletek a sejtek által termelt monoklonális antitestek elválasztási és tisztítási lépéseit foglalják magukba,



1. ábra. Monoklonális antitestek laboratóriumi termelése

amelyek célja, hogy emberi felhasználásra alkalmas, nagy tisztaságú készítményt állítsunk elő. Ehhez a termelődött antitesteket el kell választani a sejtektől és a sejttörmelékektől, majd a megfelelő módszerrel megtisztítani a fermentáléban lévő egyéb szennyezőktől. Ehhez egy hatékony, összetett tisztítási eljárásra van szükség, amelynek során számos szennyező (pl. gazdasejtfehérje és DNS, vírusrészecskék, antitest-aggregátumok és fragmentumok) mennyiségét a hatóságok által meghatározott érték alá kell csökkenteni. Erre a gyógyszeriparban jelenleg többlépéses kromatográfiás tisztítást alkalmaznak, szűrési és vírusinaktiválási lépésekkel egybekötve.

A monoklonális antitestek kinyerése és tisztítása

Az antitestek tisztítására széles körben elterjedt módszer az affinitáskromatográfia (2. ábra), amely egy specifikus fehérje-ligand kölcsönhatáson alapszik. A leggyakrabban használt ligan-



2. ábra. Affinitáskromatográfiás laboratóriumi tisztítás

dum a protein A fehérje, amely a *Staphylococcus aureus* sejtfal-összetevője. A protein A Fc régiója és az IgG immunfehérje közötti natív kölcsönhatás volt az első, amelyet felfedeztek, és felhasználták a fehérjetisztítási affinitásrendszer kifejlesztésére.

Az affinitáskromatográfiás tisztítási lépés kezdetén a sejtmentes felúszót semleges pH-n az oszlopra töltik, amely során az antitestek megkötődnek az állófázison immobilizált ligandon. A tisztítási lépés végén a terméket kis pH mellett eluálják az oszlopról, ami egyben a savas közeg miatt a vírusok inaktiválását is lehetővé teszi. Az oszlop betöltése és az eluálás közé gyakran egy mosási lépést iktatnak be közbenső pH-n, amely elősegíti a gazdasejtfehérjék és más szennyeződések eltávolítását. Végül az oszlopot lúgos pH-n tisztítják, majd regenerálják. A protein A affinitáskromatográfiának számos kedvező tulajdonsága van. Egyrészt egyszerű és gyors elválasztási lépés, másrészt rendkívül szelektív a mAb-okra, így akár 95%-nál nagyobb tisztaságot is eredményezhet [4]. Az így elérhető nagy tisztaság ellenére azonban további lépésekre is szükség van a megmaradt gazdasejtfehérjék (HCP), a DNS-darabok és a nagy molekulatömegű termékaggregátumok eltávolításához, valamint a vírusmentesség biztosításához [5]. Az affinitáskromatográfia egyik hátránya a töltetek nagy költsége; ezek akár tízszer drágábbak is lehetnek, mint a hagyományos kromatográfiás töltetek. A kiadások mérséklése érdekében az oszlopok hasznos élettartamának maximalizálása a *downstream* folyamatok fejlesztésének egyik központi témája. Az affinitáskromatográfia másik hátránya, hogy a termék elúciójához használt kis pH nagymértékű antitest-aggregációt és/vagy oldhatatlan csapadékképződést eredményezhet, ami a termékhozam jelentős csökkenéséhez vezethet.

A legtöbb mAb-tisztítási eljárás ezt követően legalább egy, de általában két további kromatográfiás lépést tartalmaz. A két gyakran használt típus a kationcserés kromatográfia (CEX) és az anioncserés kromatográfia (AEX). Az ioncserés kromatográfia ideális a nagy molekulatömegű aggregátumok, a maradék DNS-darabok, a gazdasejtfehérjék, a leszakadt proteincsökkentésére [6]. A kationcserés kromatográfia emellett képes az antitestek különböző töltésvariánsait elválasztani egymástól. A tisztítandó antitestek az oszlopra történő felvitelük során a ligandhoz kötődnek, míg a szennyeződések eltávolíthatók a mosási lépésben. Végül az eluáló puffer megfelelő beállításával az antitesteket eluálják az oszlopról. Az eluálás során leggyakrabban pH- vagy sógradienst alkalmaznak [5]. Ezzel szemben az anioncserés kromatográfiát általában enyhén savas pH-n végzik, átfolyó üzemmódban, amely azt jelenti, hogy az antitestjeink nem kötődnek

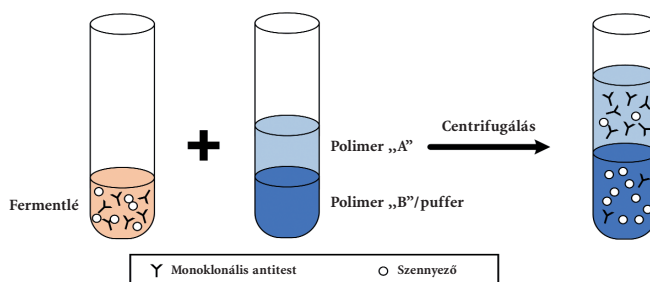
fel az oszlopra, hanem csak keresztülfolyanak rajta. Eközben viszont a DNS-molekulák, egyes vírusok és egyéb savas jellegű szennyezők az oszlopra kötődnek, így elválnak a számunkra fontos antitestektől [6].

Alternatív tisztítási módszerek

A hagyományos technológiák fejlesztése mellett egyre nagyobb az igény a kromatográfiás módszereket kiváltó alternatív, költségcsökkentett folyamatokra, mint például a vizes kétfázisú rendszerben (*aqueous two-phase system*, ATPS) végzett extrakció, a kicsapás-visszaoldás módszere, a flokkuláció vagy a kristályosítás. A fejlesztések során a technológia folyamatosíthatósága is kiemelt szerepet játszik.

Vizes kétfázisú extrakció

Az extrakció olyan szétválasztási művelet, amelynek során két nem elegyedő, eltérő polaritású oldószerben egy adott komponens megoszlik, és emiatt kinyerhető, majd megtisztítható. Ilyen tisztítási művelet alkalmazható az antitestekre is; leginkább vizes kétfázisú extrakcióval valósítják meg (3. ábra). Itt mindkét fázis vízalapú, és a rendszerhez hozzáadott fázisképző anyagok ha-



3. ábra. Monoklonális antitestek tisztítása vizes kétfázisú extrakcióval

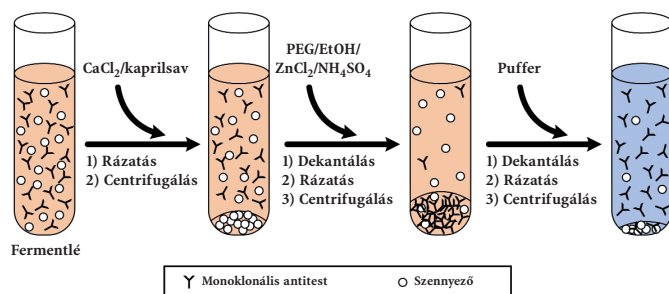
tására alakul ki a két eltérő polaritású fázis. Ezek a rendszerek azért előnyösek, mert a nagy víztartalomnak (70–80%), a fázisképző polimer stabilizáló hatásának [7] és a fázisok között levő kis határfelületi feszültségnek köszönhetően enyhébb körülmények között zajlik az extrakció, így kevésbé jellemző a fehérjék kicsapódása [8]. A fázisokat alkotó fő komponensek alapján megkülönböztetünk polimer-polimer vagy polimer-puffer rendszereket. Az első esetben két nagy molekulatömegű, eltérő polaritású polimer (pl.: polietilén-glikol (PEG) és dextrán) hatására alakul ki két nem elegyedő fázis. A polimer-puffer rendszer esetében egy nagy molekulatömegű homopolimer (pl.: PEG) vagy kopolimer (pl.: etilén-oxid/propilén-oxid kopolimer) alkot nem elegyedő rendszert szulfátból, foszfátból vagy citrátból álló tömény sóoldattal [8,9]. Az antitest megoszlását a két fázisban több tényező is befolyásolja, ilyen például a fázisok relatív hidrofobicitása, az alkalmazott polimer molekulatömege, a rendszer ionerőssége, pH-értéke és a tisztítandó fehérje töltése [10].

Az ATPS könnyen integrálható a *downstream* módszerek közé, mivel a fázist alkotó komponensek kis toxicitással rendelkeznek, a folyamat pedig könnyen méretnövelhető és egyszerű berendezésekben megvalósítható. Az ATPS-rendszer alkalmazása energia- és költséghatékonyabb lehet, mint a kromatográfiás tisztítási folyamat, valamint a folyamatos technológiákba is könnyebben beilleszthető [7,11]. Az ATPS-technológia hátránya azonban, hogy hatékonysága az antitesttisztulás és -kinyerés tekintetében jelenleg még elmarad a kromatográfiás eljárásétól.



A kicsapás-visszaoldás módszere

A vizes kétfázisú extrakciós rendszerek mellett másik lehetőség az antitestek kinyerésére és tisztítására a kicsapás-visszaoldás módszerének alkalmazása (4. ábra).



4. ábra. Antitestek tisztítása kicsapás-visszaoldás módszerével

Ennek alapja az antitestek reverzibilis kicsapása, amit többször valamilyen polimerrel végeznek, jellemzően PEG-gel. Bár a hozzáadott PEG jelentősen csökkenti az antitestek oldhatóságát, nem alkalmas a nagy molekulatömegű szennyezők, például aggregátumok, kétszálú DNS-darabok és nagyobb fehérjék szelektív eltávolítására. Így érdemes ezeket egy másik lépésben kalcium-klorid vagy kaprilsav segítségével kicsapni az antitestek mellől [12]. Mivel a PEG nagy viszkozitását anyagként nehezen elválasztható az antitestektől a folyamat végén, ráadásul a visszamaradt PEG ipari méretben nagy rendszernyomást is eredményezhet a szűrések során, ezért vizsgálják ennek kiválthatóságát más antitest-kicsapószerkezzel. Az irodalomból ismert módszerek az ammónium-szulfátos, a cink-kloridos [13] és a hideg etanolos kicsapások [14]. Mindezeket az antitestet és szennyezőket kicsapó lépéseket többféle módon és kombinációban lehet alkalmazni, hogy minél jobb elválasztást és nagyobb tisztaságot érjünk el. A kicsapós lépéseket végül az antitest visszaoldása követi, aminek hatékonyságát főként az oldat pH-ja és ionerőssége határozza meg, végezhetjük hisztidinnel, tris, acetát, foszfát vagy citrát pufferrel is [15]. Az antitest kicsapás-visszaoldás módszerének előnye, hogy egyszerű készülékekben, gyorsan és hatékonyan vé-

gezhető. Hátránya, hogy a megfelelő tisztaság eléréséhez többlépcsős kicsapási-visszaoldási művelet sorra van szükség, illetve a kicsapás hatására a fehérjék veszhetnek biológiai aktivitásukból.

Összefoglalás

A monoklonális antitestek gyógyszeripari alkalmazása egyre jelentősebb, viszont előállítási költségük, így fogyasztási áruk továbbra is magas. Mivel az antitestek jelenleg használt kromatográfiás tisztítási művelete az előállítási költség több mint 50%-a is lehet, ezért az ipari technológia fejlesztésére, költség- és energiahatékonyabbá tételére nagy igény mutatkozik. A megjelent alternatív tisztítási módszerek jó helyettesítői lehetnek a kromatográfiás lépéseknek. A bemutatott eljárásoknak, tehát a vizes kétfázisú extrakció és a kicsapás-visszaoldás módszerének számos előnyük van. Könnyen méretnövelhető, működtethető folyamatos üzemmódban és akár költséghatékonyabb megoldások is lehetnek, mint a jelenlegi kromatográfiás tisztítási lépések. Bár az ipari alkalmazásukig még számos problémát kell megoldani, mindenképpen potenciális alternatívának számítanak.

IRODALOM

- [1] O. H. Brekke, I. Sandlie, Nat. Rev. Drug Discov. (2003) 2, 52.
- [2] L. Jahanshahlu, N. Rezaei, Biomed. Pharmacother. (2020) 129, 110337.
- [3] M. M. Papatheanasiou, A. L. Quiroga-Campano, F. Steinebach, M. Elviro, A. Mantalaris, E. N. Pistikopoulos, Biotechnol. Prog. (2017) 33, 966.
- [4] Y. Yigzaw, R. Piper, M. Tran, A. A. Shukla, Biotechnol. Prog. (2006) 22, 288.
- [5] A. A. Shukla, B. Hubbard, T. Tressel, S. Guhan, D. Low, J. Chromatogr. B (2007) 848, 28.
- [6] H. F. Liu, J. Ma, C. Winter, R. Bayer, MAbs (2010) 2, 480.
- [7] A. M. Azevedo, P. A. J. Rosa, I. F. Ferreira, M. R. Aires-Barros, Trends Biotechnol. (2009) 27, 240.
- [8] J. A. Asenjo, B. A. Andrews, J. Chromatogr. A (2012) 1238, 1.
- [9] S. Y. Lee, I. Khoiroh, T. C. Ling, P. L. Show, Sep. Purif. Rev. (2016) 45, 81.
- [10] M. Iqbal, Y. Tao, S. Xie, Y. Zhu, D. Chen, X. Wang, L. Huang, D. Peng, A. Sattar, M. A. B. Shabbir, H. I. Hussain, S. Ahmed, Z. Yuan, Biol. Proced. Online (2016) 18, 1.
- [11] J. A. Asenjo, B. A. Andrews, J. Chromatogr. A (2011) 1218, 8826.
- [12] R. Sommer, A. Tscheliessnig, P. Satzer, H. Schulz, B. Helk, A. Jungbauer, Biochem. Eng. J. (2015) 93, 200.
- [13] G. Dutra, D. Komuczki, A. Jungbauer, P. Satzer, Eng. Life Sci. (2020) 20, 265.
- [14] A. Tscheliessnig, P. Satzer, N. Hammerschmidt, H. Schulz, B. Helk, A. Jungbauer, J. Biotechnol. (2014) 188, 17.
- [15] N. Hammerschmidt, S. Hobiger, A. Jungbauer, Process Biochem. (2016) 51, 325.

Egy híres antitestkóktél

A Regeneron Pharmaceuticals áprilisban tette közzé annak a vizsgálatnak az eredményeit, amelyben a Covid-19 kialakulásának megelőzésére szánt antitestkóktél (a casirivimab és az imdevimab nevű antitestek keverékét tartalmazó, REGEN-COV) hatékonyságát igyekeztek felmérni. Ez az a készítmény, amellyel 2020 októberében a frissen megfertőződött Donald Trumpot is talpra állították.

A cég közleménye szerint a monoklonális antitesteket tartalmazó kóktél 81 százalékkal csökkentette annak az kockázatát, hogy a koronavírusral megfertőzött tesztalanyok súlyosan megbetegedjenek.



A vizsgálatban 1500 olyan egészséges önkéntes vett részt, aki egy háztartásban élt pozitív Covid-tesztet produkáló szemé-

lyekkel. A kutatók két csoportba osztották őket: az egyik tagjai egyetlen dózis antitestkóktélt kaptak injekció formájában, míg a másik csoportnak placebót adtak. 29 nap múlva az antitestkezelésen átesett csoportból 11, míg a placebósok közül 59 embernél alakult ki a Covid-19, ráadásul az első csoport betegeinél átlagosan egy hét alatt lezajlott a betegség, a kontrollcsoportban ugyanez átlagosan három hétig tartott.

A Regeneron vizsgálata hasonló eredményeket hozott, mint az Eli Lilly monoklonálisantitest-terápiája (a bamlanivimab és az etesevimab keverékének alkalmazása). A készítmények nyilván nem helyettesítik a vakcinákat, bár a Regeneron azt szeretné, ha a jövőben megelőzés céljából is engedélyeznék a gyógyszerhatóságok. (qubit.hu)

Az előbbi két kóktél alkalmazását az Európai Gyógyszerügynökség korábban már engedélyezte, és más, hasonló gyógyszerek is készülnek; például folyik a brit GlaxoSmithKline és az amerikai Vir Biotechnology által közösen fejlesztett, Sotrovimab nevű antitestkészítmény tesztelése a Covid-19 kezelésére.