

PANNON EGYETEM

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

FARSANG EVELIN

DOI:10.18136/PE.2021.790

VESZPRÉM

2021

**ÁLLÓ- ÉS MOZGÓFÁZISOK VIZSGÁLATA A MONOKLONÁLIS ANTITESTEK
KATIONCSERE-KROMATOGRÁFIÁJÁBAN**

Az értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében készült a Pannon Egyetem
Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskolája keretében

Kémiai tudományok tudományágban

Írta: Farsang Evelin

Témavezető: Dr. Horváth Krisztián

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....
Dr. Horváth Krisztián

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: igen /nem

.....
Bíráló aláírása

Bíráló neve: igen /nem

.....
Bíráló aláírása

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján %-ot ért el.

Veszprém,

.....
a Bíráló bizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése:

Veszprém,

.....
az EDHT elnöke

Kivonat

Álló- és mozgófázisok vizsgálata a monoklonális antitestek kationcsere-kromatográfiájában

A munka célja a monoklonális antitestek analíziséhez gyakran alkalmazott kationcsere-kromatográfiás (CEX) elválasztási módszerek fejlesztése. Az alternatív pufferrendszerek kidolgozása mellett a Szerző kitér kereskedelmi forgalomban kapható oszlopok vizsgálatára, valamint a különböző álló- és mozgófázisok kombinálásával kapott pH-válasz tanulmányozására is.

Az "Irodalmi összefoglaló" a monoklonális antitestek (mAb-ok) szerkezeti tulajdonságain keresztül mutatja be az igényt az átfogó analitikai eszköztár kidolgozására. Ismerteti az egyik legelterjedtebb módszer, a kromatográfia alapfogalmait, valamint a típusait a mAb-ok elválasztása szempontjából. Kitér a tömegspektrometriás detektálással való kompatibilitási nehézségekre és az alkalmazott megoldásokra. Az "Eszközök és anyagok" fejezet a kísérletekhez használt anyagokat, berendezéseket és szoftvereket foglalja össze.

A Szerző a kereskedelmi forgalomban kapható pH-gradiens pufferrendszerek alternatívájaként kétkomponensű eluens rendszereket dolgoz ki mAb-ok elválasztására. A 2-(N-morfolino)-etánszulfonsavat (MES) és 1,3-diamino-2-propanolt (DAP), valamint a citromsavat, 2-ciklohexilamino-etánszulfonsavat (CHES) és nátrium-hidroxidot (NaOH) tartalmazó mozgófázisokkal megfelelő csúcsalak és szelektivitás érhető el. A sókoncentráció (c_S), a gradiens idő (t_G) és hőmérséklet optimalizálásával meghatározhatók a legjobb elválasztási körülmények emésztett daratumumab és cetuximab alegységek elválasztásához.

A tömegspektrometriás detektálás feltétele, hogy az alkalmazott pufferkomponensek megfelelő illékonysággal rendelkezzenek. A Szerző ammónium-acetát és ammónium-karbonát alapú mozgófázist fejleszt ki mAb-ok CEX-MS analíziséhez és vizsgálja a két összetevő koncentrációjának szelektivitásra gyakorolt hatását. A legjobb elválasztás 50 mM ammónium-acetát és 50 mM ammónium-karbonát tartalom esetében érhető el.

A Szerző vizsgálja a kereskedelmi forgalomban kapható legújabb kationcserélő oszlopokat a visszatartás, hatékonyság, valamint az elúciós pH és a mAb-ok izoelektromos pontja (pI) közötti korreláció tekintetében. Gyors elválasztást dolgoz ki töltésvariánsok meghatározására 50×2 mm-es gyenge kationcserélő oszlopon. Ezzel a módszerrel intakt és részlegesen emésztett antitestek 4-6 perc alatt analizálhatók.

A hatékony pH-gradiens elválasztás feltétele a közel lineáris pH-válasz, ezért a Szerző vizsgálja a különböző oszlopokon, különböző pufferrendszerekkel kialakuló pH-válasz függvényeket. A legtöbb kombinációban meredek emelkedő szakaszok és töréspontok figyelhetők meg, amik nem megfelelő szelektivitást eredményeznek. A citromsav/CHES+NaOH rendszer esetében sor kerül a különböző gradiens idők, a lépcsőzetes gradiens program és az alkalmazott NaOH kálium-hidroxidra történő cserélésével kapott pH-válaszok vizsgálatára.

Abstract

Study of mobile and stationary phases for cation-exchange chromatography of monoclonal antibodies

The aim of the work is to improve the cation-exchange chromatographic (CEX) methods for the separation of monoclonal antibodies (mAbs). Beside the development of alternative mobile phases, the commercially available new stationary phases and the pH-response generated on the columns were also studied.

The "Literature review" focuses on the correlation of the mAb structure and the need of the proper analytical tools. The basic concepts and methods of the chromatography are described in terms of the mAb separation. The difficulty of coupling CEX with mass spectrometric detection (MS) is covered, and the applied MS-compatible solutions are collected. The materials, methods, devices and softwares can be found in the "Experimental" section.

Alternative binary mobile phase systems were studied for the separation of mAbs. The eluents containing 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) and 1,3-diamino-2-propanol (DAP), or citric acid, 2-(cyclohexylamino)ethanesulfonic acid (CHES) and sodium-hydroxide (NaOH) can provide proper peak shape and selectivity. Optimizing the salt concentration (c_s), gradient time (t_G) and temperature the separation parameters of digested daratumumab and cetuximab subunits can be determined.

The mass spectrometric detection requires volatile buffer compounds. Ammonium acetate and ammonium carbonate-based mobile phases were studied for separation of mAbs and the concentration of the components in eluent B were optimized in order to enhance the selectivity. The best separation can be achieved applying 50 mM ammonium acetate and 50 mM ammonium carbonate.

The state of the art stationary phases were systematically studied in terms of retentivity, effectivity, and the correlation between the elution pH and the isoelectric point (pI) of mAbs. Fast separation method was developed for separation of charge variants on a 50×2 mm weak CEX column. Using this method intact and partially digested antibodies can be analysed in 4-6 minutes.

The condition of the pH-gradient separation is the nearly linear pH-response in the function of the eluent composition. The pH-response was studied on different columns using different mobile phases. In most cases "S"-shaped responses, breaking points and steep ramps can be observed. In these steep ranges mAbs can not be separated with proper selectivity. The pH-response of the citric acid/CHES+NaOH system was studied applying different gradient times, step-wise gradient and potassium hydroxide instead of NaOH.

Abstract

Studio di fasi mobili e stazionarie per cromatografia a scambio cationico di anticorpi monoclonali Lo scopo del lavoro è migliorare i metodi cromatografici a scambio cationico (CEX) per la separazioni di anticorpi monoclonali (mAbs). Oltre allo sviluppo di fasi mobili alternative, sono state studiate anche le nuove fasi stazionarie disponibili in commercio e la risposta del pH generata sulle colonne. La "Revisione della letteratura" si concentra sulla correlazione tra la struttura del mAb e la necessità di strumenti analitici adeguati. I concetti e i metodi di base della cromatografia sono descritti in termini di separazione di mAb. Viene trattata la difficoltà di accoppiare CEX con il rilevamento spettrometrico di massa (MS) e vengono raccolte le soluzioni compatibili con MS applicate. I materiali, i metodi, i dispositivi e i software sono disponibili nella sezione "Sperimentale". Sono stati studiati sistemi binari di fase mobile alternativi per la separazione di mAb. Gli eluenti contenenti acido 2-(N-morfolino)etansolfonico (MES) e 1,3-diammino-2-propanolo (DAP), o acido citrico, acido 2-(cicloesilammino)etansolfonico (CHES) e idrossido di sodio (NaOH) può garantire una forma del picco e una selettività adeguate. Ottimizzando la concentrazione di sale (cs), il tempo di gradiente (tG) e la temperatura è possibile determinare i parametri di separazione delle subunità di daratumumab e cetuximab digerite. Il rilevamento spettrometrico di massa richiede composti tampone volatili. Sono state studiate fasi mobili a base di acetato di ammonio e carbonato di ammonio per la separazione di mAbs e la concentrazione dei componenti nell'eluente B è stata ottimizzata per aumentarne la selettività. La migliore separazione può essere ottenuta applicando acetato di ammonio 50 mM e carbonato di ammonio 50 mM. Le fasi stazionarie modernissime sono state studiate sistematicamente in termini di ritenzione, efficacia e correlazione tra il pH di eluizione e il punto isoelettrico (pI) di mAbs. Il metodo di separazione rapida è stato sviluppato per la separazione delle varianti di carica su una colonna CEX debole di 50x2 mm. Usando questo metodo gli anticorpi intatti e parzialmente digeriti possono essere analizzati in 4-6 minuti. La condizione della separazione del gradiente di pH è la risposta del pH quasi lineare in funzione della composizione dell'eluente. La risposta del pH è stata studiata su diverse colonne utilizzando diverse fasi mobili. Nella maggior parte dei casi si possono osservare risposte a forma di "S", punti di rottura e rampe ripide. In questi intervalli ripidi gli mAbs non possono essere separati con la selettività adeguata. La risposta del pH del sistema acido citrico/CHES+NaOH è stata studiata applicando diversi tempi di gradiente, gradiente graduale e idrossido di potassio invece di NaOH.

Tartalomjegyzék

Bevezetés és célkitűzés	1
1. Irodalmi összefoglaló	2
1.1. A terápiás fehérjék felépítése és működése	2
1.2. Kromatográfias alapfogalmak	5
1.3. A fehérjék analizésére leggyakrabban alkalmazott kromatográfias módsze- rek bemutatása	10
1.3.1. Fordított fázisú folyadékkromatográfia	10
1.3.2. Méretkizárásos kromatográfia	11
1.3.3. Hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia	13
1.3.4. Hidrofil kölcsönhatáson alapuló kromatográfia	14
1.3.5. Protein A kromatográfia	15
1.3.6. Ioncsere-kromatográfia	15
1.4. Tömegspektrometriás megoldások a fehérjeanalitikában	19
1.4.1. Az RPLC és az MS kapcsolata	19
1.4.2. A SEC és az MS kapcsolata	20
1.4.3. A HIC és az MS kapcsolata	21
1.4.4. A HILIC és az MS kapcsolata	22
1.4.5. Az IEX és az MS kapcsolata	23
1.5. A kationcsere-kromatográfiában kialakuló pH-válasz vizsgálata	25
2. Eszközök és anyagok	29
2.1. Eszközök és szoftverek	29
2.2. Vegyszerek	30
2.3. Minták	30
2.4. Oszlopok	31
2.5. Mozgófázis előkészítés és az alkalmazott gradiens programok	32
3. Eredmények	34
3.1. Mozgófázis fejlesztés	34
3.1.1. A mozgófázisok pH-válaszai	34
3.1.2. A különböző mozgófázis rendszerek kromatográfias vizsgálata	36
3.1.3. Retenció modellezése és módszer optimalizálás	40
3.1.4. Gradiens program tervezése lineáris pH-válasz kialakításához	47
3.2. Illékony pufferrendszer az MS detektáláshoz	49
3.2.1. Az optimális illékony puffer összetétel meghatározása mAb-ok elválasztásához	49
3.3. Állófázis tesztelés	56

3.3.1.	A retenció tulajdonságok vizsgálata	56
3.3.2.	A relatív szelektivitás vizsgálata	58
3.3.3.	Az elúciós pH kapcsolata az izoelektromos ponttal	60
3.3.4.	Az állófázisok hatékonyságának összehasonlítása	63
3.3.5.	Töltésvariánsok gyors elválasztása rövid kationcserélő oszlopon .	63
3.4.	Az oszlopokon kialakuló pH-válasz vizsgálata	68
3.4.1.	A pH-eltolódás természetének vizsgálata	70
3.4.2.	A pH-eltolódás kromatográfiás szelektivitásra gyakorolt hatása . .	73
4.	Összefoglalás	75
	Irodalomjegyzék	89
	Tézispontok	I
	Theses	II
	A szerző tudományos munkássága	III
I.	Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó publikációk	III
II.	Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó konferencia előadások és poszterek	III
III.	Az értekezés tématerületét érintő publikációk	IV
IV.	Az értekezés tématerületét érintő konferencia előadások és poszterek . . .	V
	Függelék	VII
	Köszönetnyilvánítás	IX

Bevezetés és célkitűzés

A terápiás fehérjék gyógyászatban történő alkalmazása egyre nagyobb teret hódít, hiszen közvetlenül vagy közvetve a citotoxikus kismolekulák célba juttatásával a probléma helyén tudják kifejteni hatásukat. Az antitest terápia hatékonyabb és kevesebb mellékhatással jár, mint a kemoterápia vagy a sugárkezelés. A laboratóriumban előállított antitestek különböző módosulásai a hatékonyság romlását okozzák, ezért nagy hangsúlyt fektetnek az analitikai módszerek fejlesztésére. Az egyik legelterjedtebb eljárás a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC), amelynek története az 1940-es években a megoszlásos- és rétegekromatográfiával kezdődött, majd az 1970-es években Horváth Csabának köszönhetően hozott áttörést az elválasztástechnikában. Az elválasztás mechanizmusának megfelelően különböző technikák alakultak ki, köztük a fehérjéket töltésvariánsaik szerint elválasztó kationcsere-kromatográfia.

Az ioncsere-kromatográfia a Pannon Egyetem Analitikai kémia kutatócsoportjában nagy múltra tekint vissza. 1970-es évektől Dr. Inczédy János az Analitikai Kémia Tanszék vezetőjeként nemzetközileg elismert eredményeket ért el a kromatográfia és az ioncsere területén, de a tudományos életben ma is aktívan szerepet játszó Dr. Hajós Péter nevéhez is számos közlemény fűződik ezen a területen. A disszertáció témája illeszkedik a kutatócsoport munkájához, terápiás fehérjéket bevonva a kationcsere-kromatográfias mérésekbe.

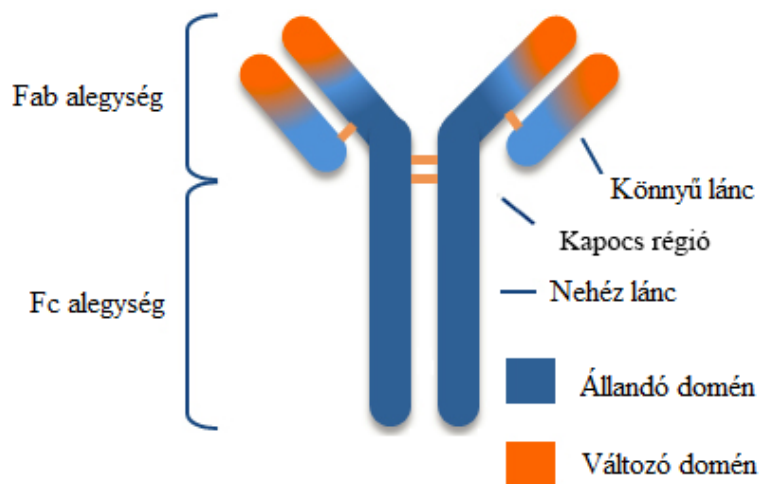
A kationcsere-kromatográfia előnye a többi kromatográfias eljárással szemben, hogy nem-denaturáló körülményeket alkalmazva a molekulák megőrzik természetes (intakt) formájukat az analízis során. Munkám célja olyan új, egyszerű és olcsó kationcsere-kromatográfias pufferrendszerek kidolgozása, amik lehetőséget nyújtanak szimultán pH- és sógradiens létrehozására, valamint összemérhető szelektivitást biztosítanak a gyakran használt, kereskedelmi forgalomban kapható kationcserés mozgófázisokkal. A hagyományosan használt pufferkomponensek mellett szükségesnek tartottam olyan eluens rendszerek kidolgozását, amik lehetőséget adnak a tömegspektrometriás detektálásra is. A mozgófázis mellett az elválasztásokat jelentősen befolyásolja az állófázis, amelynek számos tulajdonsága (funkciós csoportok minősége, felületi borítottság, szemcseméret, porozitás, stb.) képezheti a fejlesztések tárgyát. Célul tűztem ki az újonnan forgalomba kerülő kationcserélő oszlopok szisztematikus vizsgálatát monoklonális antitestek (mAb-ok) elválasztásának szempontjából a retenciós tulajdonságok és a szelektivitás tekintetében.

Az ioncsere folyamatokban a mozgófázis ionjai és a töltéssel rendelkező minta ionok versengenek az állófázis funkciós csoportjaiért. A nagy számú, különböző protonálódási állandóval rendelkező komponensek szerepet játszanak az ioncsere egyensúly kialakításában, így a különböző eluens rendszerek az egyes oszlopokon eltérő pH-választ generálnak. A fehérjék elválasztása szempontjából az oszlopon kialakuló pH kiemelt jelentőséggel bír, ezért a megfelelő módszer kidolgozása érdekében a különböző álló- és mozgófázisok együttes vizsgálatát is fontosnak tartottam.

1. Irodalmi összefoglaló

1.1. A terápiás fehérjék felépítése és működése

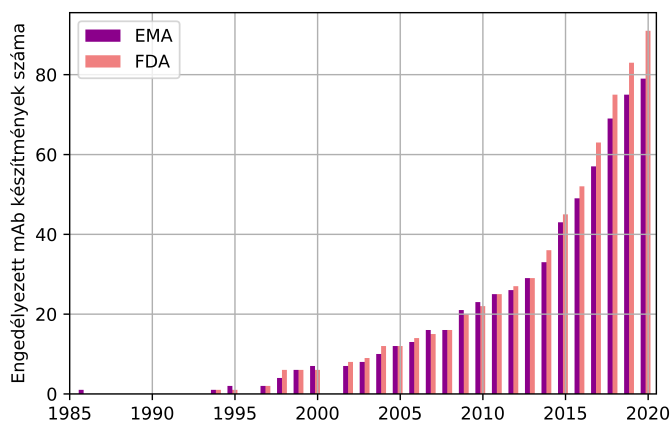
Az antitestek (ellenanyagok) a természetes immunválasz részeként az emberi szervezetbe kerülő idegen anyagok (antigének) hatására termelődnek. A monoklonális antitestek jellemzője, hogy felismerik ezeket az anyagokat vagy akár a daganatos sejtek felületén levő meghatározott sejtfelszíni fehérjét (epitópot), kötődnek hozzá, amivel a sejt közvetlen vagy közvetett halálát okozzák. A laboratóriumban előállított mAb-ok a terápiás fehérjék csoportjába tartozó készítmények, amelyek hatékonysága számos területen bizonyított: alkalmazhatók fertőző betegségek kezelésére, valamint onkológiai és immunológiai esetek gyógyítására [1, 2]. Szerkezetük alapján Y-alakú nagymolekuláknak (~ 150 kDa) tekinthető immunglobulinok, két nehéz és két könnyű láncukat meghatározott aminosav szekvencia jellemzi. Az egyes láncok diszulfid hidakkal, valamint elektrosztatikus és H-híd kölcsönhatásokkal kapcsolódnak egymáshoz. A láncok egyik vége az állandó doménben, a másik vége az antigénkötő epitópokat tartalmazó változó doménben zárul. A mAb molekulák funkciójukat tekintve két részre bonthatók: antigén-kötő fragmens ($F(ab')_2$, ami két Fab egységből áll, N-terminális) és kristályosítható fragmens (Fc, C-terminális). Az $F(ab')_2$ a változó doméneket foglalja magába és az antitest sejthez való kötődését biztosítja, míg az Fc a különböző hatással bíró, ún. effektor komponenseket hordozza [3].



1. ábra. A monoklonális antitestek szerkezete.

Kung és mtsai 1979-ben fedezték fel az első mAb-okat (Orthoclone OKT1, OKT3 és OKT4), de az OKT3 első klinikai felhasználására Muromonab-CD3 néven csak 1986-ban került sor veseátültetést követő kilökődés megelőzésére [4]. Az Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelet (Food and Drug Administration, FDA) és az Európai Gyógyszerügynökség (European Medicines Agency, EMA) által engedélyezett hatóanyagok száma az 1900-as évek végén kezdett emelkedni (2. ábra). Jelenleg az EMA és az FDA által jóváhagyott készítmények száma 79, illetve 91, valamint további 11, illetve 15 termék áll felülvizsgálat

alatt [5]. Az engedélyezési eljárás részeként megfogalmazzák a mAb-ok előállítására és klinikai tesztelésére vonatkozó általános irányelveket, valamint a tisztítást követő karakterizálás módszereit. A dokumentáció a terápiás gyógyszerkészítmények analitikájára SDS-poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE), izoelektromos fókuszálást (IEF), nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát, tömegspektrometriát (MS), illetve egyéb fizikai, kémiai módszereket ír elő [6].



2. ábra. Az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) és az Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelet (FDA) által engedélyezett mAb készítmények száma (2020. augusztus 17. állapot) [5].

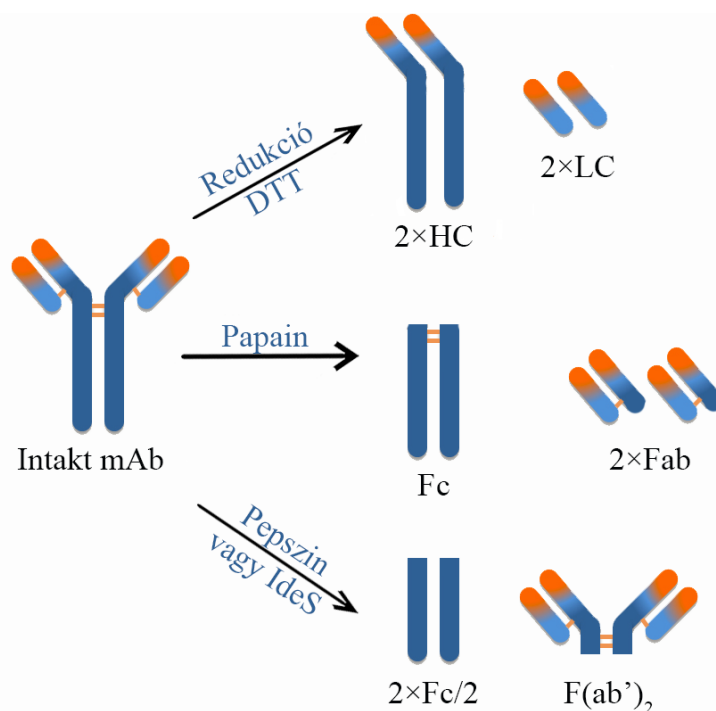
A mAb-ok előállítása és poszttranszlációs módosulása (pl. oxidáció, deamidáció, glikoziláció, fragmentáció) során keletkező variánsok különböző biológiai aktivitással, hatékonysággal, esetleg toxicitással rendelkeznek. A kémiai módosulások közül a szialiláció és a deamidáció a savas karakterű variánsok arányának növekedését okozza, míg a C-terminális lizineken történő változás 1 vagy 2 pozitív töltés kialakulásával, így bázikus karakterű variánsok keletkezésével jár. A fehérjék glikozilációja a szénhidrátmolekulák kovalens kötését jelenti és hatással van a készítmények stabilitására és a megfelelő hatásuk kifejtésére. A glikoziláció mértéke, mint kritikus minőségi paraméter (Critical Quality Attribute, CQA), meghatározott határértékkel, tartománnyal vagy eloszlással rendelkezik [7]. A mAb-ok töltésváltozással járó módosulásait az 1. táblázat tartalmazza [8].

Mivel a mAb-ok heterogén és dinamikus rendszereknek tekinthetők, karakterizálásuk komplex folyamat és számos analitikai módszert igényel [9–15]. Ezen kívül az originális és bioszimiláris minták összehasonlítása, illetve stabilitási vizsgálatok elvégzése szempontjából is szükség van a megfelelő analitikai eszköztárra. A teljes karakterizálási folyamatban a fehérjék intakt formában történő analízise (Top Down analízis) mellett gyakran vizsgálják a mAb-ok különböző bontási módszerekkel kapott fragmenseit (Bottom Up módszerek) [16]. Redukálás során (leggyakrabban ditiotritollal (DTT)) a diszulfid hidak bontásával kapjuk a könnyű és a nehéz láncot (LC és HC), míg enzimes emésztéssel (pepszin, papain, vagy

1. táblázat. A monoklonális antitestek töltésvariánsok képződésével járó kémiai módosulásai [8].

Módosulás	Hatás	Keletkező variáns
Szialisiláció	COOH addíció	savas
Deamidáció	COOH keletkezés	savas
C-terminális lizin hasadás	NH ₂ vesztes	savas
Addukt képződés	COOH keletkezés vagy NH ₂ vesztes	savas
Szukcinimid képződés	COOH vesztes	bázikus
Metionin, cisztein, lizin, hisztidin, triptofán oxidációja	konformációs változás	bázikus
Aszialisiláció	COOH vesztes	bázikus
C-terminális lizin és glicin amidáció	NH ₂ képződés vagy COOH vesztes	bázikus

IdeS) a nehéz lánc ún. kapocs régiójában történik változás. Pepszinnel vagy IdeS enzimmel történő emésztéskor a molekula két részre, F(ab')₂ (~ 100 kDa) antigénkötő egységre és Fc kristályosítható fragmensre bomlik, papainnal emésztve az Fc mellett két Fab egység (~ 50-50 kDa) keletkezik. Az emésztésnek ezt a három módszerét limitált proteolízisnek vagy részleges emésztésnek is nevezik. A fehérjék redukálási és emésztési útvonalait, valamint a keletkező fragmenseket a 3. ábra szemlélteti.



3. ábra. Az antitestek redukálással és emésztéssel keletkező fragmensei.

A mAb-ok mellett széleskörűen vizsgált gyógyszerkészítménynek tekinthetők az antitest-gyógyszer konjugátumok (Antibody-Drug Conjugate, ADC) és a bispecifikus antitestek. Az ADC-k egy antitestből és egy linkeren keresztül hozzájuk kapcsolódó

gyógyszermolekulából (általában valamilyen citotoxin) állnak [17]. Legelterjedtebb alkalmazási területük a daganatos megbetegedések kezelése, mivel a mAb képes felismerni a rákos sejteket és a citotoxin célba juttatásával a sejt elhalását okozza [18, 19]. A bispecifikus antitestek olyan fehérjék, amelyek két különböző immunglobulin Fab alegységét tartalmazzák. Ez egyrészt kialakítható két immunglobulin protolízisével (peptidkötés hasítása) szabadabbá váló két Fab alegység kémiai keresztkötésével. Az így létrejövő antitest egyik fele tumorspecifikus, a másik fele pedig az effektor molekulát hordozza. Egy másik módszerrel adott immunglobulin egyik Fab szakasza kicserélhető egy másik fehérje Fab fragmensével. Az így kialakított antitest háromfunkciónak tekinthető, hiszen a két különböző Fab fragmens mellett az Fc is alkalmas effektor molekula hordozására [20].

A terápiás fehérjék szerkezetének meghatározásához és viselkedésük megértéséhez több folyadékromatográfiás lehetőség áll rendelkezésre:

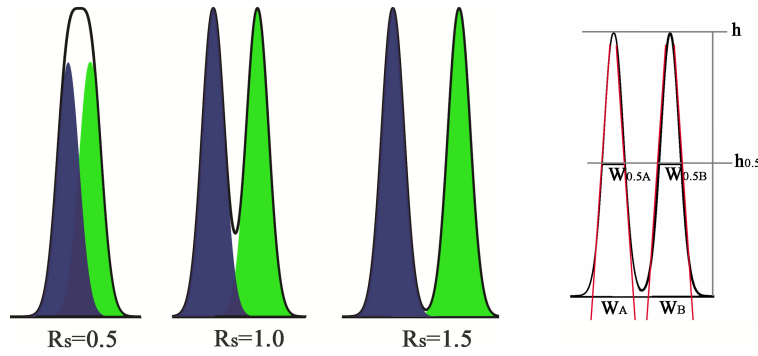
- fordított fázisú kromatográfia (RPLC)
- méretkizárásos kromatográfia (SEC)
- hidrofób kölcsönhatású kromatográfia (HIC)
- hidrofil kölcsönhatású kromatográfia (HILIC)
- ioncsere kromatográfia (IEX)

A töltésvariánsok elválasztására az IEX módszerek mellett rendelkezésre állnak elektroforetikus technikák, például a kapilláris elektroforézis (Capillary Electrophoresis, CZE) és a kapilláris izoelektromos fókuszálás (Capillary Isoelectric Focusing, cIEF) [21, 22].

1.2. Kromatográfiás alapfogalmak

A kromatográfiás elválasztások során a mintakomponensek különböző fizikai és kémiai tulajdonságaik miatt eltérő sebességgel vándorolnak az oszlopon, majd különböző időpontokban elhagyják azt. A komponensek oszlopon töltött idejét retenciós időnek (t_R) nevezzük. Az oszlopon nem megkötődő komponens retenciós idejét a holtidő (t_0), az eluálásához szükséges mozgófázis térfogatot a holttérfogat (V_0) jellemzi. Ha a komponensek vándorlási sebessége az elúció során nem változik, akkor adott komponens retenciós tényezője (k) a retenciós idő és a holtidő ismeretében az alábbi képletből számítható:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$



4. ábra. Csúcsátlapolások $R_S = 0,5$; $1,0$ és $1,5$ felbontás esetén.

A komponensek megoszlási hányadosa (K) az álló- és a mozgófázisbeli koncentrációjuk arányaként fejezhető ki:

$$K = \frac{c_S}{c_M} \quad (2)$$

ahol c_S az állófázisbeli egyensúlyi koncentráció, c_M a mozgófázisbeli egyensúlyi koncentráció.

A holtidő (t_0), a térfogatáram (F) és az oszlop hosszának (L) és átmérőjének (d_c) ismeretében kiszámítható a mozgófázis lineáris sebessége (u_0) és az oszlop porozitása, ami a mozgófázis teljes térkitöltési tényezőjeként is értelmezhető (ϵ_T) az alábbi egyenletek alapján:

$$u_0 = \frac{L}{t_0} \quad (3)$$

$$\epsilon_T = \frac{4Ft_0}{d_c^2 \pi L} \quad (4)$$

Két komponens elválaszthatóságának termodinamikai lehetőségét az elválasztási vagy szelektivitási tényező értéke mutatja meg:

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{K_B}{K_A} = \frac{t_{R,B} - t_0}{t_{R,A} - t_0} \quad (5)$$

ahol B az erősebben, A a gyengébben kötődő komponenst jelöli. Akkor valósul meg elválasztás, ha $\alpha > 1$ értékű.

Két, egymás után eluálódó A és B csúcs elválasztását a felbontással (R_S) jellemezzük, ami az elválasztás hatékonyságának jellemzésére használt paraméter:

$$R_S = \frac{t_{R,B} - t_{R,A}}{\frac{1}{2}(W_B + W_A)} \quad (6)$$

ahol W_A és W_B az A és a B komponens alapvonalon mért csúcsszélessége. A felbontás akkor tekinthető megfelelőnek, ha meghaladja az $R_S \geq 1,5$ értéket (4. ábra).

A kromatográfiás elválasztás hatékonysága az elméleti tányérmagassággal is megadható, ami az oszlophossz (L) és az elméleti tányérszám (N), valamint a sáv szélesség (σ_z) ismeretében kifejezhető:

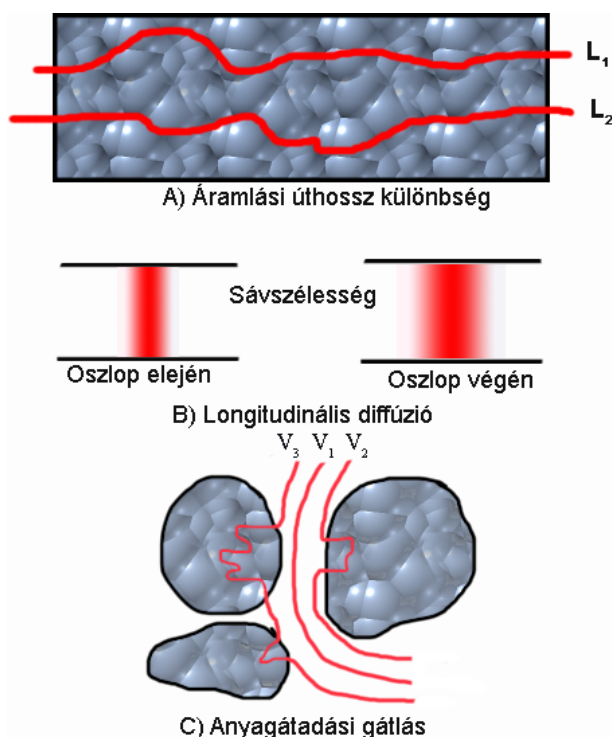
$$H = \frac{L}{N} = \frac{\sigma_z^2}{L} \quad (7)$$

Az elméleti tányérszám meghatározható a kromatográfiás csúcsok retenciós ideje és félértékszélessége segítségével, ha a komponensek vándorlási sebessége nem változik az elúció során:

$$N = \frac{t_R^2}{\sigma_t^2} \approx 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \approx 5,55 \left(\frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2 \quad (8)$$

ahol a σ_t az időben kifejezett varianca, amit nehézkes meghatározása miatt gyakrabban a kromatográfiás csúcs alapvonali szélességéből fejeznek ki ($\sigma_t = W/4$).

A sávok szélesedésének leírása van Deemter nevéhez fűződik [23]. Az oszlopra injektált keskeny mintasáv az oszlopban történő vándorlása során Gauss-jellegű csúcs formájában jelenik meg a kromatogramon. A sáv szélesedésében a longitudinális és örvénydiffúzió, az anyagátadási gátlás, valamint oszlopon kívüli hatások (pl. készülék vezetékének térfogata, detektorcella térfogat) játszanak szerepet, amiket az 5. ábra szemléltet.



5. ábra. A kromatográfiás sáv szélesedéséhez hozzájáruló kinetikai tényezők: örvénydiffúzió (A), longitudinális diffúzió (B), anyagátadási gátlás (C).

A mozgófázis sebességének növelésével az anyagátadási gátlás hatása felerősödik, így

szélesebb sávok kialakulása figyelhető meg. A sávszélesítő tényezőket a van Deemter egyenlet foglalja magába, ami az elválasztási hatékonyságot az elméleti tányérmagassággal (Height Equivalent to a Theoretical Plate, HETP) fejezi ki az eluens lineáris áramlási sebességének (u_0) függvényében ((9) egyenlet). Az áramlási sebesség függvényében kísérleti úton meghatározott tányérmagasság ábrázolásából az optimális áramlási sebesség meghatározható.

$$HETP = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (9)$$

A van Deemter egyenlet A tagja az örvénydiffúziót fejezi ki, ami a töltött oszlop szemcséi között áthaladás során megtett úthosszkülönbségekből adódik és az $A = 2\lambda d_p$ képlettel írható le, ahol λ az oszloptöltetből eredő geometriai állandó és d_p a töltet szemcsemérete. A B/u tag a szemcsék közötti axiális diszperziót (longitudinális diffúzió) jellemzi és $B = 2\gamma D_m$, ahol γ a szemcsék közötti tér kanyargósságára utaló obstrukciós (labirintus) faktor és D_m a mintakomponensek diffúziós állandója.

Az állófázis szemcséinek pórusait kitöltő eluens nem áramlik, azonban a komponensek számára diffúzió révén hozzáférhető. Minél több időt töltenek el a molekulák a pórusokban, annál szélesebb sávban fognak továbbhaladni. A van Deemter egyenlet Cu tagja a külső anyagátadási gátlást, a pórusdiffúziót és az adszorpciót-deszorpciót foglalja magába [23].

A (9) egyenletből következik, hogy kis áramlási sebességeknél a longitudinális diffúzió (B/u), nagyobb sebességeknél az anyagátadási gátlás (Cu) dominál a sávok szélesítésében. A lineáris áramlási sebesség figyelembe veszi a mozgófázis térfogatáramát (F), az oszlop porozitását (ε_T) és az oszlop átmérőjét (d_c):

$$u = \frac{4F}{\varepsilon_T \pi d_c^2} \quad (10)$$

A (9) egyenlet felírható olyan formában is, hogy az egyes paraméterek analitikai körülményektől való függése elhanyagolható legyen:

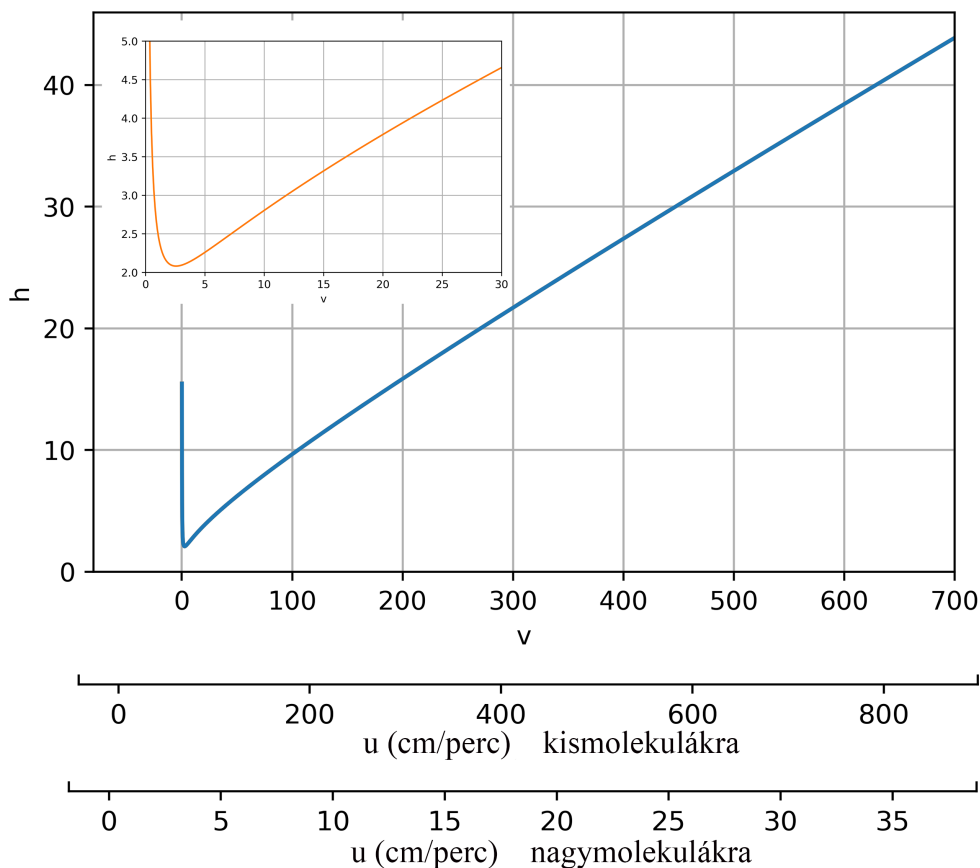
$$h = a + \frac{b}{v} + cv \quad (11)$$

ahol h a redukált elméleti tányérmagasság és v a redukált lineáris áramlási sebesség, amiket az alábbi egyenletek fejeznek ki:

$$h = \frac{H}{d_p} \quad (12)$$

$$v = \frac{ud_p}{D_m} \quad (13)$$

A redukált tányérmagasság ((12) egyenlet) és a redukált lineáris áramlási sebesség (13) összefüggését a 6. ábra szemlélteti. Az ábra tartalmazza a redukált lineáris áramlási sebességeknek megfelelő u -tartományokat jelölő tengelyeket kismolekula (benzol, $D_M = 1,02 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{perc}$) és nagymolekula (humán IgG, $D_M = 4,4 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{perc}$) esetében.



6. ábra. A redukált tányérmagasság függése a redukált lineáris áramlási sebességtől kismolekulák és nagymolekulák esetében.

A 6. ábra tanulsága, hogy a kromatográfias elválasztások során alkalmazott mozgófázis áramlási sebességnek (0,5-1 mL/perc) megfelelő lineáris áramlási sebesség értékeknél ($L=10$ cm hosszú, $d=0,3$ cm átmérőjű, $d_p=5 \mu\text{m}$ szemcseméretű oszlopon 12-25 cm/perc) a kismolekulák esetében jobb hatékonyságú elválasztás érhető el ($3 \leq h \leq 4,5$), míg nagymolekulákra $20 \leq h \leq 30$. A nem porózus szemcsék alkalmazásával a szemcséken belüli diffúzió és anyagátadási gátlás elhanyagolható. Ebből adódóan a csúcshélességre a szemcseméret nincs direkt hatással (legfeljebb a töltés minőségéből és a külső porozitásból adódóan), de a másodlagos kölcsönhatások csúcsalakra gyakorolt hatásával számolni kell.

Egy másik hatékonysági mérőszámnak tekinthető a csúskapacitás (n_c), ami a teljes analízisidő alatt $R_s = 1$ felbontással megkülönböztethető csúcsok számát jelöli, és a gradiens idő (t_G), a holtidő (t_0) és a csúcshélesség (W) ismeretében a következő összefüggés szerint számítható ki:

$$n_c = 1 + \frac{t_G - t_0}{W} \quad (14)$$

1.3. A fehérjék analízisére leggyakrabban alkalmazott kromatográfias módszerek bemutatása

A fehérjék elválasztása során az elválasztás alapját jelentő tulajdonság szerint különböző kromatográfias módszerek állnak rendelkezésünkre. Ilyen tulajdonság lehet a különböző polaritás, molekulaméret és felületi töltés.

1.3.1. Fordított fázisú folyadékkromatográfia

A fordított fázisú kromatográfia a mintakomponenseket polaritásuk (hidrofóbicitásuk) alapján választja el. A vízből és szerves oldószerből (általában metanol vagy acetonitril (ACN)) álló mozgófázis rendszer alkalmas gradiens képzésére, valamint tömegspektrometriás detektálás alkalmazására. Ennél a technikánál hátrányt jelent a gyorsabb anyagátadás érdekében, valamint a másodlagos kölcsönhatások csökkentése miatt szükséges magas hőmérséklet és a savas körülmények, ami a fehérjék denaturációját okozhatja [24]. Az eluensekhez ionpárképzőt (trifluor-ecetsav (TFA), hangyasav (FA), ecetsav, stb.) kis mennyiségben (0,2-0,25 %) adva a másodlagos kölcsönhatások és sávszélesedés kiküszöbölhető, így a csúcsalak javítható [25].

Az RPLC körülmények között lejátszódó retenciós mechanizmus leírására három elmélet terjedt el. Az egyik a Horváth Csaba és mtsai által 1980-ban leírt szolvofób elmélet, ami a mintakomponensek és az állófázis közti hidrofób kölcsönhatásokon alapul, és a víz, mint retenciót szabályozó komponens szerepét magyarázza [26–28]. A másik elmélet Martire és Boehm (1983) nevéhez fűződik, és figyelembe veszi a mozgófázis szerkezetét, a mintakomponensek természetét és a hőmérsékletet egyaránt [29]. Néhány évvel később Dill megalkotta a partíciónálási elméletet, miszerint a molekulák mozgófázisból állófázisba való átjutását három tényező befolyásolja: a mintakomponensek keverékének entrópiája, a funkciós csoportot tartalmazó láncok konfigurációs entrópiája, valamint az oldószer, az állófázis láncai és a mintakomponensek között fellépő kölcsönhatások. A modell azt feltételezi, hogy a mintakomponensek a láncok közé ágyazódnak be, és nem azok felületén adszorbeálódnak [30].

A hagyományos RPLC állófázis apoláris szénláncsal (C4-C18) borított szilika szemcsékből áll, amik a monoklonális antitestek nem poláris aminosav csoportjaival tudnak kölcsönhatásba lépni. A szerkezetüket tekintve találhatóak teljesen porózus szemcséket tartalmazó oszlopok, de a nagymolekulák lassú diffúziója miatt előnyösebbek a nem teljesen porózus töltetek, amikben a diffúziós út lerövidül és gyorsabb az anyagátadás (kisebb C konstans). Ezeket a héjszerkezetű tölteteket (Superficially Porous Particles, SPPs) számos kutatócsoport tanulmányozta [31–34]. Az állófázisok szempontjából a szemcsék szerkezete mellett a másik fontos tényező a pórusok átmérője. Kis molekulák elválasztása gyorsan és hatékonyan megvalósítható kis pórusméretű tölteteken ($\sim 90 \text{ \AA}$), de a nagy molekulatömegű és nagy hidrodinamikai átmérőjű fehérjékhez nagy pórusátmérőjű

töltetek ($>200 \text{ \AA}$) szükségesek.

Az oszloptöltetek külön csoportját alkotják a monolit töltetek, amiket 1989 óta alkalmaznak HPLC elválasztásokhoz [35]. Ezek egy porózus anyagból (polimetakrilát, polisztirol-divinilbenzol vagy szilika alapú) képzett tömbből állnak, és jó áteresztőképességgel és hatékonysággal rendelkeznek a makromolekulák elválasztásához [36–38]. Az első szilikagél monolit oszlopokat 2000-ben a Merck és a Phenomenex bocsátotta a piacra Chromolith, illetve Onyx néven. Ezek szerkezetüket tekintve $2 \mu\text{m}$ átmérőjű makropórusokat és 13 nm (130 \AA) átmérőjű mezopórusokat tartalmaznak [39].

Fordított fázisú kromatográfiában általában $70\text{--}90 \text{ }^\circ\text{C}$ hőmérsékletre fűtik fel az oszlopot a fehérjék jobb visszanyerése céljából, azonban ez a fehérjék denaturációját okozza (különösen hosszú analízisidő esetén) [40–42]. A molekulák retenciójának és a hőmérsékletnek a kapcsolatát a van't Hoff egyenlet írja le:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \varphi \quad (15)$$

ahol k a retenciós tényező, ΔH° és ΔS° a komponens mozgófázisból állófázisra történő átjutása során fellépő entalpia-, illetve entrópiaváltozás, R az egyetemes gázállandó, T az abszolút hőmérséklet és φ az oszlopban levő álló- és mozgófázis térfogataránya.

Alacsony hőmérsékleten a fehérjék roncsolása elkerülhető, azonban a megfelelő elválasztáshoz és visszanyeréshez szükséges hőmérsékletet több kutatócsoport is tanulmányozta [41, 43, 44]. Fekete és mtsai négy, nagy pórusméretű oszlopon (BEH300 C4, BEH300 C18, Aeris WP C4, Aeris WP C18) vizsgálták a hőmérséklet hatását három intakt és emésztett monoklonális antitest visszanyerésére. Azt tapasztalták, hogy a hőmérsékletet $40 \text{ }^\circ\text{C}$ -ról $80 \text{ }^\circ\text{C}$ -ra emelve a monoklonális antitestek visszanyerése jelentősen megnövekszik az adszorpció/deszorpció sebességének növekedése következtében [40].

Navas és mtsai az International Conference on Harmonization (ICH) irányelveknek megfelelő RPLC módszert dolgoztak ki intakt rituximab meghatározására. Az analízist $70 \text{ }^\circ\text{C}$ -on végezve a módszer alkalmas stabilitás tesztek elvégzésre a minőségi ellenőrzés során, valamint a hosszútávú stabilitási vizsgálatokhoz [45]. Hasonlóan enyhe körülményeket dolgozott ki Bobály és mtsai monoklonális antitestek RPLC analíziséhez nagy pórusméretű és fenil-borítottságú héjszerkezetű tölteten. A hőmérsékletet intakt mAb-ok esetében 75 , alegységek esetében $65 \text{ }^\circ\text{C}$ -ra csökkentve $> 90 \%$ visszanyerés érhető el [46].

A fordított fázisú kromatográfiás körülmények és az alkalmazott illékony komponenseket tartalmazó mozgófázis lehetővé teszik a direkt RPLC-MS csatolást, ami előnyt jelent más elválasztási technikákkal (pl. méretkizárásos vagy ioncsere-kromatográfia) szemben.

1.3.2. Méretkizárásos kromatográfia

Az irreverzibilisen aggregálódott és reverzibilisen összekapcsolódott fehérjék hatással vannak az őket tartalmazó gyógyszerkészítmények hatékonyságára és biztonságosságára.

Az aggregátumok jelenléte kritikus minőségi tulajdonság, ezért ellenőrzésük kötelező [47]. A méretkizárásos (vagy gélfiltrációs) kromatográfia a monoklonális antitesteket, aggregátumaikat és fragmentumaikat hidrodinamikai átmérőjük alapján elválasztó, nem denaturáló módszer. Az alkalmazott enyhe körülmények (pl. szobahőmérséklet, víz alapú mozgófázis, semleges pH, alacsony nyomás) és a szükséges adalékok (NaCl, KCl) lehetővé teszik a mAb-ok intakt formában történő analízisét. A méretkizáráson alapuló elválasztáshoz használt oszlopok jól kontrollált méretű pórusokkal és pórusméret eloszlással rendelkeznek. Ideális esetben az elválasztandó komponensek nem lépnek kölcsönhatásba az állófázissal, a gyakorlatban azonban számolni kell hidrofób, ioncserés vagy ionkizárásos kölcsönhatásokkal. A módszer alkalmazható gyógyszeripari kutatásokban rutin és validált mérésekhez egyaránt [48]. A dimerek, trimerek és egyéb aggregátumok vizsgálatát több komponens esetében elvégezték már (pl. inzulin [49, 50], rekombináns humán növekedési hormon (rHGH) [51], mAb [52, 53]).

A SEC mozgófázis fiziológiás tulajdonságai nem denaturáló körülményeket biztosítanak: pH~7 pufferoldat kis mennyiségű sóval (pl. 100 mM foszfát vagy NaCl). Az esetleges elektrosztatikus kölcsönhatások kiküszöbölése érdekében az ionerősség vagy a sókoncentráció növelhető. Kopaciewicz és mtsai a 0,005-0,025 tartományba eső ionerősség esetén az elektrosztatikus kölcsönhatást elhanyagolhatónak találták, ennél kisebb ionerősség esetén azonban számolni kell vele [54].

Méretkizárásos kromatográfia során a pórusokból kizáródó nagyméretű komponensek a mozgófázis sebességével haladva hagyják el az oszlopot, így ezek retenciója az oszlop méretének függvénye. A hagyományos méretkizárásos analízis az oszlopok nagy mérete (300 mm hossz, 6-8 mm belső átmérő), az 5-10 μm szemcseméret és a kis eluensáramlási sebesség miatt hosszú időt vett igénybe (25-40 perc) [55]. Gyorsabb elválasztás elérése érdekében az oszlopméretet és a pórusméretet csökkenteni kellett. 2013-ban megjelentek a 150×4,6 mm hosszúságú, $1,7 < d_p < 3 \mu\text{m}$ szemcseméretű, 200 Å pórusokkal rendelkező oszlopok. Goyon és mtsai négy, különböző szemcseméretű (1,7-2,7 μm) SEC oszlopot vizsgált. A kis szemcsékkel (1,7-2 μm) töltött oszlopokon a hatékonyság 1,5-2-szer nagyobbak bizonyult, mint a 2,7 μm esetében [56].

Míg a hagyományos SEC oszlopokon a lassan áramló eluens nem okozott hőhatást (sem hosszirányú, sem sugárirányú hőmérséklet gradienst), a finom szemcséket tartalmazó oszlopokban ezzel számolni kell. A magasabb hőmérséklet előnye, hogy a mozgófázis viszkozitásának csökkenése révén a nyomásesés kisebb lesz és a térfogatáram növelhető, azonban a hőmérsékletre érzékeny fehérjék esetében aggregáció lép fel, ami megnövekedett aggregátum mennyiséget eredményez az eredetileg jelenlevő aggregátumok koncentrációjához képest. A nyomást 130 bar-ról 470 bar-ra növelve az aggregátumok mennyisége 4,3-ról 6,8 %-ra, míg a hőmérsékletet 30-ról 60 °C-ra emelve 4-ről 10 %-ra nő a fő csúcs területének arányában [57].

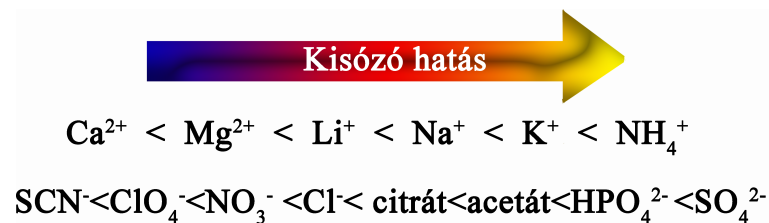
Az állófázis és a komponensek közötti kölcsönhatás vizsgálata alapján megállapították,

hogy a fellépő hidrofób kölcsönhatás jelentősebb, mint az elektrosztatikus kölcsönhatás [56]. Az állófázis fejlesztés másik vonala a szemcsék stabilitásának javítására irányul, amivel nagyobb áramlási sebesség és nyomásesés érhető el [58].

A SEC módszerek gyakran alkalmaznak arginint, mivel különböző funkciókat betöltve szerepet játszik az elválasztás hatékonyságának növelésében: csökkenti az elektrosztatikus kölcsönhatást, részt vesz a fehérjék negyedleges (feltekeredett) szerkezetének megtartásában, javítja az oldhatóságot és elősegíti az aggregátumok fenntartását [59–62]. A proteinek oldhatóságának növelésére gyakran guanidin-hidrokloridot alkalmaznak, ami azonban denaturációt okoz [63].

1.3.3. Hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia

A HIC a komponenseket a hidrofób tulajdonságai alapján elválasztó, nem denaturáló módszer, ahol a gyenge másodlagos kölcsönhatás az állófázis immobilizált hidrofób ligandumai és a molekulák nem poláris részei között jön létre. A fordított fázisú kromatográfiahoz képest HIC esetében az állófázis kevésbé hidrofób karakterű és az elválasztáshoz alkalmazott körülmények nem okozzák a fehérjék denaturációját. A hidrofób fehérjeláncok adszorpciója nem spontán folyamat, hanem ún. kisózást kell alkalmazni. A magas kozmotróp sókoncentrációjú (1,5-3 M) vizes mozgófázisban a molekulák hidrofób részei nem szolvatálódnak megfelelő mértékben, ami az állófázishoz való kötődésüket eredményezi. Az egyes ionok kisózó hatásának mértékét a Hofmeister-sor szerint a 7. ábra mutatja be [64].



7. ábra. A kationok és anionok kisózó hatása a Hofmeister-sor alapján.

HIC elválasztások során a komponensek oszlopról történő eluálása a sókoncentráció csökkentésével (negatív sógradiens) érhető el [65, 66]. Meredek gradienst alkalmazva a gradiens program vége előtt a kis sókoncentrációnál a retenciós tényező növekedése figyelhető meg. Ennek oka a fehérjék újbóli megkötődése, ami U-alakú görbét eredményez a retenciós tényező sókoncentráció függvényében történő ábrázolásakor [67]. A HIC módszerfejlesztés elméleti és gyakorlati megfontolásait mAb-ok, ADC-k és bispecifikus antitestek elválasztására Fekete és mtsai foglalták össze [68]. Részletezik az állófázis, a mozgófázis összetétel, az alkalmazott só minősége és mennyisége, a hőmérséklet, a pH és a szerves módosító elválasztásra gyakorolt hatását.

A hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia leggyakoribb alkalmazási körét az ADC-k karakterizálása és a fehérjék oxidációjának monitorozása képezi. A HIC módszer

alkalmas ADC-k különböző számú gyógyszermolekulát hordozó variánsainak elválasztására az eltérő hidrofóbicitásuk következtében. A gyógyszermolekulákat ciszteinen keresztül kötő brentuximab vedotin konjugált antitest kromatogramja esetében a fő csúcs előtt a hidrofil, míg a fő csúcs után a hidrofób variánsok jelennek meg. Ezek segítségével az antitestek gyógyszermolekulákkal történő borítottsága és a gyógyszermolekula/antitest aránya (drug-to-antibody ratio, DAR) kiszámíthatók [69]. A HIC alkalmas lehet a rekombináns monoklonális antitesteket tartalmazó készítményekben megfigyelhető heterogenitás okának meghatározására. Az IdeS enzimmel emésztett mAb eltérő hidrofóbicitással rendelkező fragmentumai HIC módszerrel elválaszthatók, és MS detektálással azonosíthatók (pl. az $F(ab')_2$ fragmentumon bekövetkező aszparaginát deamidáció, ami a molekula gyengébb kötődését eredményezi a specifikus antigénhez) [70].

Az erősen hidrofób karakterű komponensek oszlopról való lemosása gyakran nehézségeket és gyenge visszanyerést okoz. A szerves módosítók jelentősen befolyásolják az elválasztás hatékonyságát, de a pontos szerepük a folyamatokban jelenleg nem tisztázott. Egyes tanulmányok szerint a felbontás jelentősen növelhető velük [71], mások a leginkább hidrofób karakterű komponensek állófázishoz való kötődésének gyengítése miatt javasolják az alkalmazásukat [72]. Módosítóként 0-40 % arányban protikus szerves oldószert (pl. izoropil-alkohol (IPA)) vagy aprotikus ACN-t alkalmazva vizsgálták a denaturációra gyakorolt hatást. IPA esetében a fehérjék jobban megőrizték természetes konformációjukat, amennyiben az IPA koncentráció a 10-15 % tartományba esett. Az elválasztási hőmérséklet tekintetében 40 °C, a pH vonatkozásában lúgos vagy semleges tartomány javasolt az antitestek Y-alakú intakt szerkezetének megtartása érdekében [73].

A különböző DAR-értékekkel rendelkező ADC-k elválasztási hatékonyságának növelése történhet nem-lineáris gradiens program alkalmazásával is. Például logaritmikus program szerinti mozgófázis változtatás a szelektivitás növekedését és a gyógyszermolekulát nem tartalmazó (DAR0) komponens csúcsának fókuszálását teszi lehetővé [74].

1.3.4. Hidrofil kölcsönhatáson alapuló kromatográfia

A hidrofil kölcsönhatáson alapuló kromatográfiai eljárást eredetileg olyan kisméretű poláris és ionizált komponensek hidrophil jelleg alapján történő elválasztására dolgozták ki, amelyek visszatartása RPLC körülmények között nem valósult meg. Ennek értelmében a HILIC és az RPLC ortogonális technikáknak tekinthetők, mert a retenció két különböző mechanizmus szerint zajlik le. Az RPLC-ben gyengén visszatartott és koeluálódó, ezért nehezen elválasztható komponensekre a HILIC-ben alkalmazott körülmények megoldást nyújthatnak [75].

A HILIC elválasztás valójában a komponensek megoszlási egyensúlyán alapul a 60-95 % aprotikus szerves oldószert tartalmazó mozgófázis és az állófázis felületén kialakult vízréteg között. A komponensek megkötődését a hidrophil megoszlás mellett a ionos kölcsönhatások, hidrogénhid kötések és hidrofób kölcsönhatások is befolyásolhatják. A nagy

molekulák elválasztását a nagy pórusú HILIC oszloptöltetek megjelenése tette lehetővé. A 300 Å pórusú töltetek alkalmazásával az intakt és az emésztett fehérjék elválaszthatók, mAb-ok glikozilációs profilja és ADC-k DAR értékei meghatározhatók [76]. Mivel a mAb-ok glikozilációja kritikus minőségi tulajdonság, a glikán-profil monitorozása a mAb gyártás minden szakaszában elvárt. D'Atri és mtsai a brentuximab vedotin gyógyszer-molekulákkal való telítettségét és a glikozilációs variánsok jelenlétét vizsgálták HILIC-MS módszerrel. Az egyedi, ún. middle-up eljárással a kétféle molekula egyszerre vizsgálható egy kromatográfiás analízis keretén belül [77].

1.3.5. Protein A kromatográfia

A Protein A (ProtA) olyan affinitás kromatográfia, amelynek során az antitestek az oszloptöltet felületén rögzített protein A ligandumokhoz (antigének) kötődnek. A töltet alapváza lehet természetes agaróz vagy cellulóz, illetve szintetikus anyagok (polivinil-éter, polisztirol-divinilbenzol, porózus üveg vagy polimetakrilát). A módszer hátrányát a költségesen előállított, rövid életű töltetek jelentik, amik adszorpciós kapacitása gyakran hamar lecsökken a ligandumok irreverzibilis elszennyeződése miatt. Az oszlop élettartama NaOH, mint stabilizáló adalék alkalmazásával növelhető, mivel alacsony hőmérsékletű elválasztások során csökkenti a ligandumok hidrolízisét és szennyeződését [78].

A ligandumok egy Gram-pozitív baktérium (*Staphylococcus aureus*) sejtfelületén megtalálható ~56 kDa méretű fehérjék, amik az öt IgG-kötő doménjük segítségével az antitesteket a nehéz láncuk Fc fragmentumán keresztül kötik meg [79]. A Protein A kromatográfia a gyógyszeriparban széles körben elterjedt tisztítási eljárás a nagy kötési affinitás és az elérhető nagy tisztaság miatt. Az antitesteket is tartalmazó sejt kultúrát semleges pH-viszonyok mellett az oszlopra juttatják, ahol a mAb-ok elválaszthatók a gazdasejt többi fehérjéjétől. A mozgófázis pH-jának csökkentésével a komponensek deszorbeálhatók az oszlopról, majd a töltet regenerálható [80].

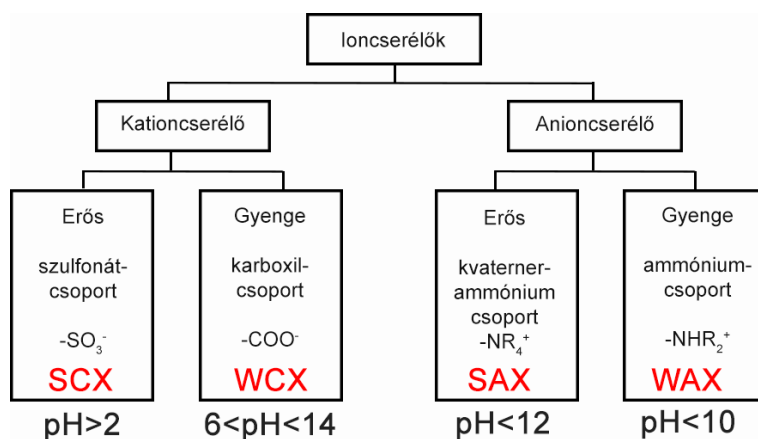
1.3.6. Ioncsere-kromatográfia

Az ioncsere-kromatográfia, azon belül is a kationcsere-kromatográfia egy gyakran használt, nem denaturáló módszer mAb-ok savas és bázikus formáinak főcsúcstól történő elválasztására. Az oszlop típusának, valamint a mozgófázis pH-jának és sókoncentrációjának megválasztása jelentős szerepet játszik az egyes antitestek megfelelő elválasztási körülményeinek megválasztásakor [21, 81–86]. Ioncsere-kromatográfia során az elválasztás alapja az ioncserélő töltet funkcionális csoportjai és a fehérje elérhető töltései között fellépő kölcsönhatás. Anioncsere során a pozitív töltésű funkcionális csoportokkal (protonált aminocsoport, kvaterner amin) borított állófázison a negatív töltésű komponensek választhatók el, míg kationcsere esetében a negatív töltéssel rendelkező tölteten (szulfonát- vagy karboxilcsoport) a pozitív töltésű ionokat választjuk el. A fehérjék állófázishoz való

kötődése az elérhető felületi töltésük függvénye, így az elúciós pH függ a gradiens alakjától és meredekségétől, az állófázis töltésétől, az ionerősségtől és az eluens komponenseinek oszlophoz vagy fehérjéhez való kötődésétől [87, 88].

A kationcsere-kromatográfia állófázisai

Az ioncserélő gyanta típusától függően erős és gyenge kationcserélő (strong cation exchange (SCX) és weak cation exchange (WCX)) oszlopokról beszélhetünk. A gyenge kationcserélő fázisok gyenge sav anionokat (pl. karboxilcsoport) tartalmaznak, amik az ioncserélő kapacitásukat 6-14 közötti pH értéken tudják biztosítani. Az SCX fázisok tölteteit általában szulfonátcsoportok borítják, amelyek negatív töltéssel rendelkeznek a $\text{pH} \sim 2$ tartományban is [9, 89]. Az állófázisok típusait a 8. ábra szemlélteti. Bár kaphatók porózus szemcsékkel töltött oszlopok is, a nagyméretű biológiai molekulák töltésvariánsainak elválasztására használt CEX kolonnák új generációja nagyrészt nemporózus töltettel rendelkezik. Ezekben hidrofil polimer gyöngyök (polimetakrilát vagy sztírol-divinilbenzol kopolimer) találhatóak töltésként, amik lehetőséget nyújtanak széles pH-tartományú ($2 \leq \text{pH} \leq 12$) és magas hőmérsékletű (60°C) elválasztások megvalósítására. A szemcsék szerkezete és morfológiája nagymértékben befolyásolja a fehérjék elválasztásában nyújtott hatékonyságát. Ennek oka, hogy a nagy fehérjék anyagátadási gátlás miatti lassú diffúziójából eredő sávszélesedés így csökkenthető [89].



8. ábra. Az ioncsere-kromatográfia típusainak csoportosítása az állófázis funkció csoportjai szerint.

A kationcsere-kromatográfias oszlopok jellemzésére Fekete és mtsai 2015-ben dolgoztak ki egy átfogó módszert. Öt különböző, korszerű CEX állófázis retenciós tulajdonságát, szelektivitását és felbontását vizsgálták mAb-ok elválasztására. A retenció vizsgálatához adott mozgófázis összetétel (pH- és sógradiens módban is), hőmérséklet és lineáris gradiensprogram alkalmazásával mérték a komponensek retenciós idejét, majd a látszólagos retenciós tényezőt ($k_{app} = (t_R - t_0)/t_0$) egy referencia oszlopon (YMC BioPro SP-F) mért retenciós tényező függvényében ábrázolták. Így az egyes oszlopok visszatartása közvetlenül összehasonlítható a töltetek morfológiai eltéréseitől függetlenül. A fehérjék

izoelektromos pontjainak függvényében ábrázolva a k_{app} értékeket az oszlopokon kapott elúciós ablak (a legelőször és a legutoljára eluálódó komponens távolsága időben kifejezve) és a szelektivitás vizsgálata válik lehetővé [10].

A kationcsere-kromatográfiás mozgófázisok fehérjék elválasztásához

Kationcsere-kromatográfia során három lehetőség van az ionos komponensek eluálására:

1. sógradiens: a sókoncentráció növelésével a mintakomponensek és az állófázis közötti ionos kölcsönhatás gyengül
2. pH-gradiens: állandó ionerősség mellett az eluens pH-jának növelésével a fehérjék nettó felületi töltése csökken
3. szimultán pH- és sógradiens

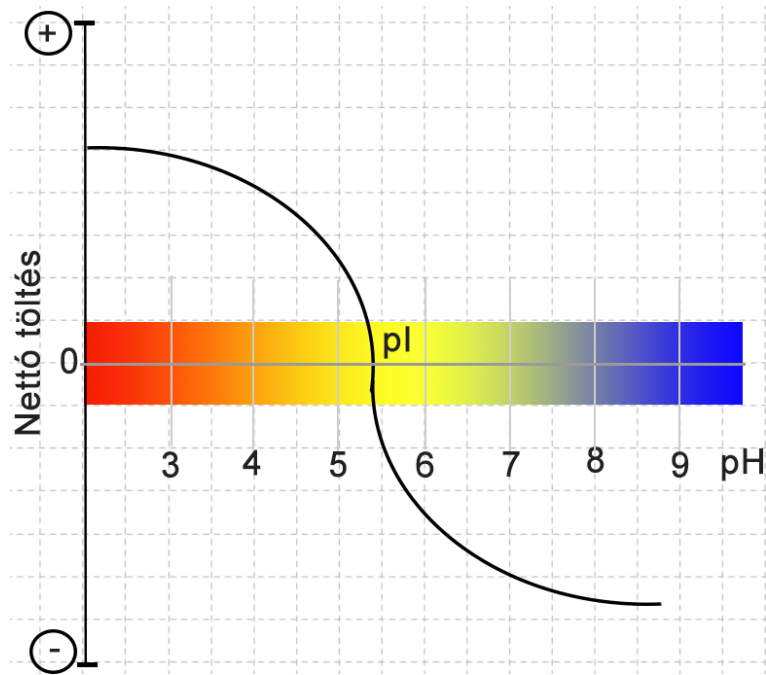
Sógradiens

A kationcsere-kromatográfiás analízis során használt hagyományos elválasztási módszer a sógradienssel történő elúció. Ilyenkor az eluens sókoncentrációjának növelésével az adszorbeált fehérjemolekulák leszoríthatók az oszlop kötőhelyeiről. Az általános sógradiens mód az állófázis természetének, a mozgófázis pH-jának és a gradiens profiljának változtatásával szabályozható. A gradiens meredeksége és alakja, valamint a lefedett pH-tartomány képezik a mAb elválasztás optimalizálásának fő paramétereit. Farjami és mtsai vizsgálták a sókoncentráció, sógradiens meredekség, mozgófázis pH, áramlási sebesség és hőmérséklet hatását a cetuximab töltésvariánsainak elválasztási hatékonyságára [90], míg mások gyors, nemlineáris módszert dolgoztak ki mAb-ok CEX elválasztására [91]. Sóként általában nátrium-kloridot alkalmaznak.

pH-gradiens

Az elúció másik lehetősége a mozgófázis pH-jának állandó ionerősség melletti növelése. A pH-gradiens kialakításának helye szerint két módszer különböztethető meg. Az egyik a pH-gradienst az oszlopon belül kialakító kromatofókuszálás, amikor egy nagy pufferkapacitású mátrixon egy speciális pufferrendszerrel pH-gradienst hoznak létre az oszlop hossza mentén. A fehérjék az izoelektromos pontjuknak megfelelő helyen fókuszálódnak, majd az eleinte bázikus pH-jú mátrixot lassan savas pH-júra cserélik, így a fehérjék jó felbontással eluálódnak. A módszer hátránya, hogy nagy mennyiségű, drága amfil polimer puffert igényel, továbbá a komponensek fizikai és kémiai tulajdonságaiban nagy eltérés figyelhető meg, ami gyenge reprodukálhatóságot eredményez [92, 93].

A másik lehetőség az eluensek oszlopon kívüli összekeverése egy pumparendszer segítségével, amivel jól definiált pH-gradiens hozható létre széles pH-tartományban. Ennél az



9. ábra. A komponensek nettó töltésének változása az eluens pH függvényében (illusztráció).

elúciós módszernél a pozitív töltésű komponensek a kezdeti alacsony pH-jú körülmények mellett megkötődnek az állófázison. A gradiens program során a mozgófázis pH-jának növelésével a fehérjék nettó felületi töltése csökken. Amikor a mozgófázis pH-ja meg egyezik adott protein izoelektromos pontjával, akkor az ionos kölcsönhatás megszűnése következtében a komponens elhagyja az oszlopot (9. ábra). Ezt a módszert nevezik gradiens kromatofókuszálásnak, illetve egyszerűbben pH-gradiens elválasztásnak [81, 94, 95].

A pH-gradiens elválasztással szemben elvárás, hogy a pH lineárisan változzon az összetétel függvényében. Ideális esetben egy állandó gradiens meredekség érhető el, így az elválasztás szelektivitása biztosítható. A meredek szakaszt tartalmazó gradiens program gyenge elválasztást eredményez, mert az ezekbe a szakaszokba eső izoelektromos pontú komponensek nem választhatók el. A pH-gradiens elválasztásokhoz leggyakrabban trisz-(hidroximetil)-amino-metánt (TRIS bázis), piperazint, imidazolt, trietanol-amint (TEA), dietanol-amint (DEA) és ammónium-hidroxidot (NH_4OH) használnak pufferkomponensként [95–97].

Szimultán pH- és sógradiens

Az elválasztás hatékonyságának növelése érdekében a pH-gradiens egy enyhe sógradienssel kombinálható [97]. Az így létrehozott szimultán pH- és sógradiens alkalmas lehet mAb-ok szélesebb skálájának egyidejű analizésére [97]. A legtöbb, B-eluens összetétel változásra lineáris pH-választ biztosító pufferrendszer esetében az A- és B-eluens ionerőssége különböző. A mAb-ok elválasztására használatos, többféle ikerionos szulfonsavat tartalmazó pufferek, például a kereskedelmi forgalomba is kapható Thermo CX-1

pH-gradiens puffer esetében a pH lineáris növelése érdekében a teljes ionerősség csökkentése szükséges. A nagy pufferkoncentrációjú mozgófázisok ionerőssége alacsony pH-n magasabb, ami kationcserélő oszlopon a savas mAb-ok nem megfelelő retencióját okozza. Azt is érdemes figyelembe venni, hogy a bázikus komponensek elúciós profilja magas mozgófázis pH-n nem optimális. Ennek oka, hogy a relatív alacsony ionerősség csúcshéledést okoz, ami a felbontás csökkenését vonja maga után az ellenionok sávkompressziós hatásának hiánya miatt. Ezért az ionerősség modulálása és a megfelelő gradiens elérése érdekében sógradiens alkalmazása is ajánlott a B-eluens alacsony ionerősségének kompenzálásra.

Optimalizált szimultán pH-és sógradiens alkalmazható 6,2-9,4 pI-értékű mAb-ok elválasztására. Zhang és mtsai egyidejűleg optimalizálták a puffer pH-ját és sókoncentrációját, majd egy széles pH-tartományú módszert írtak le mAb variánsok nagy felbontású elválasztására [97].

1.4. Tömegspektrometriás megoldások a fehérjeanalitikában

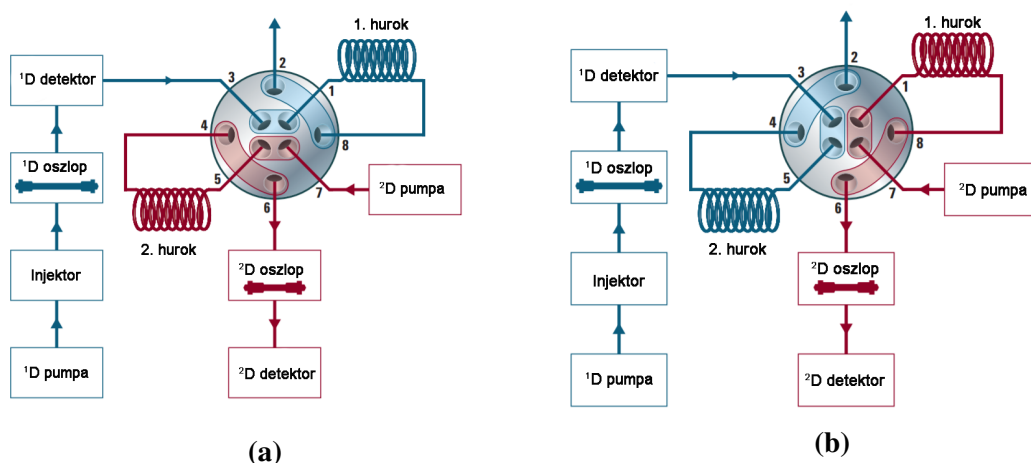
A tömegspektrometria térhódítása lehetővé tette a komplex minták gyors és érzékeny analizését. A lágy ionizációs technikák (elektrospray ionizáció (ESI), Mátrix-segített lézer deszorpció/ionizáció (MALDI)) megjelenésével megvalósíthatóvá vált az intakt antitestek fragmentáció nélküli, úgynevezett natív analízise és az MS analizátorok fejlesztésével egyre nagyobb felbontás, tömegpontosság és érzékenység lett elérhető. A transláció utáni módosulások azonosítására különféle tandem MS (MS/MS vagy MS²) technikák állnak rendelkezésre. Az ESI egységben keletkező, nagyszámú töltéssel rendelkező ionok a töltésérzékeny orbitrap vagy a Fourier-transzformációs ion ciklotron rezonancia tömegspektrométerekben detektálhatók. A töltések számának növelésére és az ionizáció fokozására gyakran alkalmaznak denaturáló ionizációs körülményeket, ami azonban a fehérje aktivitásával, szerkezetével és konformációjával kapcsolatos információk elvesztését okozza. A nanoelektrospray ionizációs technika lehetővé teszi az ionizációt pufferált vizes oldatban a fehérjék natív szerkezetének megtartásával [98].

1.4.1. Az RPLC és az MS kapcsolata

A fordított fázisú kromatográfia során alkalmazott mozgófázisok alkalmazhatók közvetlen MS detektálásra, ami lehetőséget ad az egyéb kromatográfias módszer MS-kapcsolására kétdimenziós (2D) elválasztások formájában. Az RPLC-t a méretkizárásos vagy az ioncsere-kromatográfiával összekapcsolva a mAb-ok aggregátumai vagy töltésvariánsai MS detektálással meghatározhatók [99]. Elektrospray ionizáció alkalmazásakor a TFA-t hangyasavval kell helyettesíteni, mert a TFA visszaszorítja a komponensek ionizációját [25].

A kétdimenziós folyadékkromatográfias csatolásoknak két módja van: a komprehenzív

(átfogó vagy teljeskörű) módszerrel az első dimenziót (1D) elhagyó effluens teljes egészét kis frakciókba rendezve átengedik a 2. dimenzióba (2D), míg az ún. heart-cutting megoldással csak az első dimenzió kromatográfiás csúcsainak kiválasztott részletét (vagy részleteit) analizálják a 2. dimenzióban. Utóbbi módszer "lelke" egy többfuratú szelep, amelynek hurkai tárolják a 2. dimenzióban vizsgálni kívánt frakciókat (10.a) ábra), majd a szelep forgatásával ezek a frakciók a 2. oszlopra injektálhatók (10.b) ábra) [100].



10. ábra. Az Agilent 1290 Infinity 2D-LC rendszer multiple heart-cutting szelepe a hurok töltésekor (a) és a hurok tartalmának 2. dimenzióba történő ürítésekor (b) [100].

1.4.2. A SEC és az MS kapcsolata

A méretkizárásos kromatográfia közvetlenül alkalmassá tehető tömegspektrometriával történő csatolásra, ha a klasszikus, nem illékony mozgófázis helyett különböző MS-kompatibilis eluenseket használunk. Goyon és mtsai 100 mM ammónium-acetát (pH=6,9) tartalmú illékony pufferrendszer alkalmazásával elérhető csúcsalakot hasonlítottak össze 50 mM kálium-foszfátot és 250 mM KCl-ot tartalmazó puffer (pH=6,5) esetében kapottal 24 mAb, 2 ADC-k és 4 Fc-fúziós fehérje elválasztása során. Az ammónium-acetát tartalmú mozgófázissal csak a savas karakterű terápiás fehérjék választhatók el megfelelő aszimmetria faktoral ($0,8 \leq A_s \leq 1,5$) és megfelelő alapvonali felbontással, a többi esetben kis érzékenység (egységnyi koncentrációváltozásra adott jelváltozás a detektorban) és gyenge visszanyerés tapasztalható. Ennek oka lehet az új generációs oszlopok nem megfelelő inertsége. A megfelelő hatékonyság eléréséhez a szerzők magasabb pH-jú mozgófázist (pH~7,5-8) javasolnak [101].

Lazar és mtsai só-mentes, szerves oldószer tartalmú eluentet használtak rekombináns monoklonális antitest és a különböző számú gyógyszermolekulát tartalmazó immunokonjugátumának SEC elválasztásához. Az ACN-t, TFA-t és hangyasavat különböző arányokban tartalmazó mozgófázis esetében vizsgálták az egyes összetevők mennyiségének szerepét a tömegspektrumra, és azt állapították meg, hogy 50 % ACN, 0,02 % TFA és 1 % hangyasav

biztosítja a legjobb eredményeket [102]. Ugyanezeket a mozgófázis összetevőket alkalmazva 0,2 mL/perc áramlási sebesség és kis ACN koncentráció mellett nagy felbontású analízis érhető el. Az ACN tartalmat 0,02 %-ról 0,1 %-ra növelve a mAb-ok könnyű és nehéz láncának elválasztása is megvalósítható, amire az ideális, nem denaturáló körülmények esetében nincs lehetőség [63]. Meg kell azonban jegyezni, hogy az ilyen módszereknél a másodlagos kölcsönhatások dominálnak a retenció szempontjából, továbbá az aggregátumok instabillá válnak, így ezek elválasztási hatékonysága ilyen feltételek mellett nem növelhető.

A méretkizárásos oszlopokat gyakran használják puffercserélő 2. dimenzióként az MS-hez történő kapcsolás előtt. A tömegspektrométer előtt bevezetett, ammónium-acetátot alkalmazó SEC elválasztás automatikus mintaelőkészítési folyamatnak tekinthető és nagyfelbontású ($R_S > 2000$), valamint nagy tömegpontosságú (< 80 ppm) tömegspektrum érhető el vele, ami jelentős előny a manuális puffercserélő eljárásokhoz képest [103]. A SEC \times SEC módszer esetében a klasszikus pufferrel (50 mM foszfát puffer KCl-dal, pH=6,8) a nagy és kis molekulatömegű komponensek elválaszthatók, majd a második dimenzióban alkalmazott 100 mM ammónium-acetáttal a foszfát tartalmú eluens illékony mozgófázisra cserélhető, így az aggregátumok közvetlenül analizálhatók MS-ben [104].

A hagyományos, foszfát puffert alkalmazó méretkizárásos elválasztás MS-kompatibilissá tehető egy SEC \times RPLC kapcsolással is. Az antitest-gyógyszer konjugátumok nagy molekulaméretű komponensei az első oszlopon elválaszthatók a monomer ADC-től, valamint a nagy molekulák elúcióját követően alkalmazott ACN-t tartalmazó gradienssel a kis molekuláktól (szabad gyógyszermolekulák és linkerek, valamint gyógyszer-linker molekulák) is. A heart-cutting online kapcsolással az egyes csúcsok külön-külön juttathatók be a 2. dimenzióként szolgáló RPLC oszlopba, ahol a kismolekulás komponensek egy újabb ACN-gradiens segítségével elválaszthatók [105]. Ehhez hasonló SEC \times RPLC kapcsolást írtak le Li és mtsai. Az 1. dimenzióban használt 80 % 0,1 M nátrium-foszfát vizes oldatát és 20 % ACN-t tartalmazó mozgófázissal (pH=6,0) dolgozó izokratikus SEC elválasztást követően az RPLC dimenzió kezdeti eluense 0,05 % hangyasav, míg a B-eluens 100 % ACN volt. A 2. dimenzióban az eluens összetételét multilineáris gradiens program szerint először 25-60 % B-re emelték 10 perc alatt, majd 60-90 % B-re további 5 perc alatt [106].

A SEC \times RPLC/MS módszer alkalmas lehet szójaliszt intakt fehérjéinek izolálására és MS analízisére. Az 0,3 M NaCl tartalmú 50 mM foszfát pufferrel (pH=6,8) végzett méretkülönbségen alapuló elválasztást követően az egyes frakciókat 0,1 % TFA tartalmú vízzel moshatók, majd a fordított fázisú dimenzióban ezek 0,1 % TFA tartalmú ACN-lel tovább szeparálhatók [107].

1.4.3. A HIC és az MS kapcsolata

A magas sókoncentrációjú mozgófázis miatt a HIC-MS csatolás nehézkes. Egyik lehetőség az offline-MS alkalmazás, amelynek során a HIC oszlopról lejövő frakciók

gyűjtését követően egy RPLC oszlopon a sótartalmú eluens cseréje történik 0,1 % TFA tartalmú ACN-re, majd innen történik a közvetlen injektálás az MS detektorba [70]. A mozgófázisban soként leggyakrabban alkalmazott ammónium-szulfátot ammónium-acetátra cserélve egy MS-kompatibilis eluenst kapunk, aminek illékonyága és elúciós erőssége szerves oldószerek hozzáadásával tovább növelhető. A hagyományos HIC oszlopok ilyen körülmények alkalmazásával nem biztosítanak megfelelő visszatartást, így új típusú, hibrid HIC oszlopok fejlesztése került előtérbe. Ezek az oszlopok különböző hosszúságú szénláncot hordozó poliaszparaginsav töltetet tartalmaznak (polipentil-, polihexil-, poliheptil-, polioctil-, polinonil- és polidecil-aszparaginat) 100 mm × 0,2 mm méretű kapilláris oszlopba töltve. Például az A-eluenst 1 M ammónium-acetát vizes oldatának, a B-eluenst 20 mM ammónium-acetát 50 % ACN-t tartalmazó vizes oldatának beállítva a hagyományos oszlopoktól eltérő retenciójú és szelektivitású elválasztás érhető el [108].

A HIC elválasztás MS-kompatibilissé tételének másik útja az online kétdimenziós kapcsolás, amivel például cisztein-konjugált ADC-k meghatározhatók. Az ammónium-szulfát és Na-foszfát tartalmú eluenssel dolgozó HIC elválasztást követően az RPLC dimenzióban alkalmazott eluens MS-kompatibilis. A komponensek az ¹D-t natív formában hagyják el, RPLC körülmények között viszont a nem-kovalens kölcsönhatások felszakadnak, így lehetőség nyílik a DAR kiszámítására és a cys-ADC alegységek struktúrájának meghatározására [109]. A HIC-ben alkalmazott ammónium-szulfát oldatósági problémákat okozhat, amikor az RPLC szerves oldószerevel elegyedik. Ezzel szemben az ammónium-acetát és -formiát oldhatósága metanolban és ACN-ben is megfelelő.

Átfogó 2D-LC analízis végezhető HIC és SEC kapcsolásával is. A HIC elválasztáshoz használt 2,5 M ammónium-acetát és 0,1 M nátrium-hidrogén-foszfát (NaH₂PO₄) tartalmú A-eluens, valamint a 0,1 M NaH₂PO₄ (NaOH-dal pH=7,0 értékre állítva) alkalmas az ADC-k különböző DAR értékű variánsainak elválasztására. A HIC oszlopot követő online SEC dimenzióban az eluens sótartalmának (~100 Da) ADC-ktől (~150 kDa) történő elválasztása megvalósítható 100 mM ammónium-acetát eluenssel izokratikus elúciós módban [110].

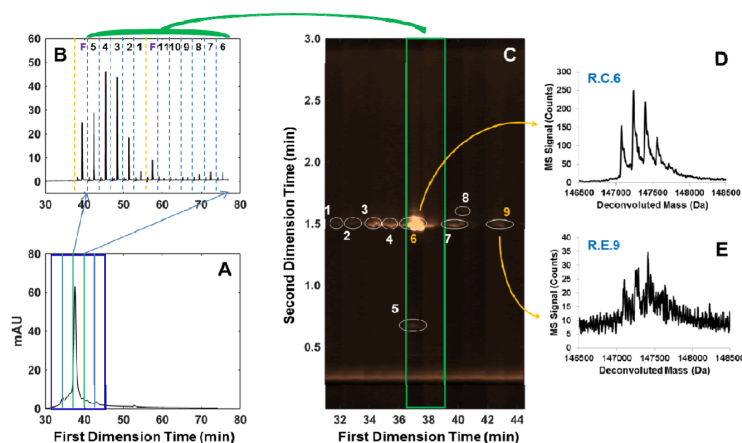
1.4.4. A HILIC és az MS kapcsolata

A HILIC mozgófázis közvetlenül alkalmas tömegspektrometriás detektáláshoz, hiszen az eluens kezdeti 80-95 % szerves oldószertartalma (leggyakrabban ACN) egy gradiens program szerint 40-60 %-ra csökken le. A retenciós tényező állandóságának biztosítására és az MS-beli ionizáció fokozására kis koncentrációjú puffer adható az eluensekhez, azonban a nagy szerves oldószertartalom miatt a pH eltolódásával számolni kell. A leggyakrabban alkalmazott pufferkomponensek az ammónium-formiát/hangyasav vagy az ammónium-acetát/ecetsav 5-10 mM koncentrációban [75].

1.4.5. Az IEX és az MS kapcsolata

Az IEX elválasztáshoz általánosan használt pufferkomponensek és sók természetüknél fogva nem alkalmasak közvetlen MS detektáláshoz. A komponensek tömegspektrométerrel történő azonosítása sómentesítő egység (pl. RP oszlop) vagy illékony pufferrendszerek használatát követeli meg. Alvarez és mtsai az IEX oszlopról eluálódó csúcsokat hat, fordított fázisú töltetet tartalmazó egységen csapdázták. Az egyes frakciókat 95 % A-eluenssel (0,1% TFA vízben) 5-10 percig mosták, majd 65 % B-eluensig (0,1 % TFA ACN-ben) terjedő gradiens programmal eluálták. Az RP-csapdákat elhagyó effluens közvetlenül a tömegspektrométerbe vezethető. Az IEX oszlopon gyengén elválasztott komponensek és a kis csúcsok a 2. dimenzióban koncentrálhatók az injektálás többszöri megismétlésével [99].

A két dimenzió közti kapcsolás a fordított fázisú kromatográfiánál bemutatott heart-cutting módszerrel is megoldható. Stoll és mtsai intakt rituximab kationcsere-kromatográfiás csúcsát öt darab, egyenként 2,75 perc hosszú frakcióra osztották (11.A) ábra). A kiválasztott frakciót (zöld keretben) a fordított fázisú oszlopra injektálva két dimenziós kromatogram (11.C) ábra) és az egyes pontjaihoz tartozó tömegspektrumok (11.E) és F) ábra) kaphatók. A CEX mérés 5-szöri megismétlésével, a frakciókat egyesével a 2. dimenzióba injektálva szelektív kétdimenziós elválasztás érhető el az információvesztés elkerülésével [111].



11. ábra. Szelektív LC×LC módszer intakt rituximab analízisére [111].

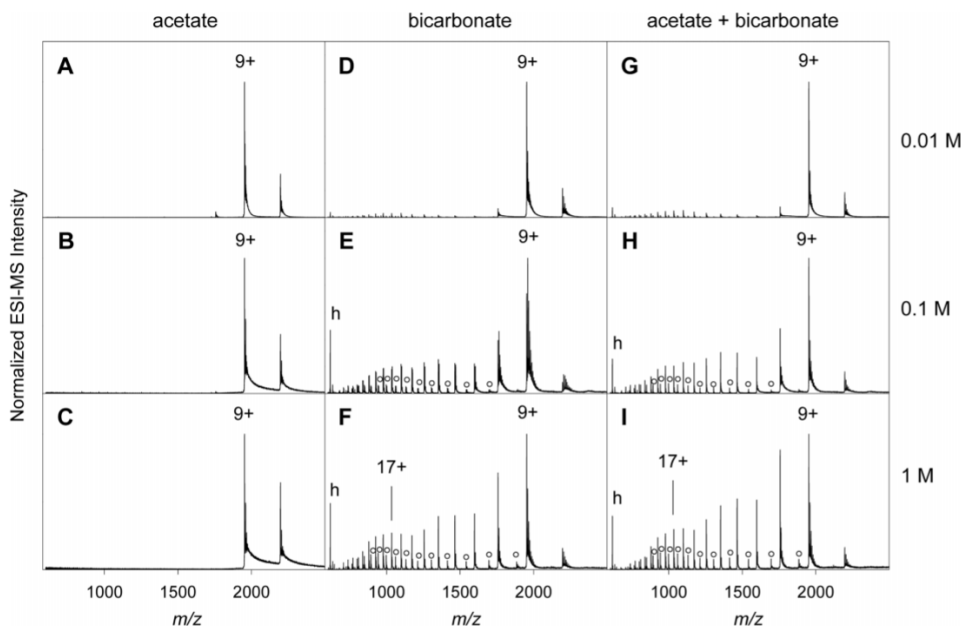
A CEX effluenséből történő off-line frakciógyűjtést vagy az automatizált on-line kapcsolást követő RPLC elemzés hátránya az időigényesség és a nehézség. Ezért is van igény a közvetlen CEX-MS analízisre, aminek azonban feltétele a könnyen gőzfázisba vihető pufferkomponensek alkalmazása. Az illékony komponenseket kis koncentrációban tartalmazó pufferek alkalmasak a mAb-ok közvetlen IEX-MS analízisére széles pH-tartományban ($5,3 \leq \text{pH} \leq 10,2$). Ilyen eluens komponensek a különböző aminok (pl. ammónium-acetát, ammónium-formiát, ammónium-hidroxid, ammónium-karbonát/bikarbonát vagy trietil-ammónium) vagy az illékony savak (pl. hangyasav, ecet-

sav). Intakt és töltésvariánsok keletkezésével járó kémiai módosuláson átesett mAb-ok közvetlen szerkezeti analízisét teszi lehetővé a 20 mM ammónium-formiátot alkalmazó pH-gradiens CEX-MS elválasztás [112]. Ehhez hasonló, 50 mM ammónium-formiátot és hangyasavat tartalmazó A-eluens (pH=3,9) és 500 mM ammónium-acetát tartalmú B-eluens (pH=7,4) alkalmazható enzimesen emésztett mAb fragmensek IEX-MS vizsgálatára [113].

Konermann kétségbe vonta az ammónium-acetát "semleges pH-jú puffer" elnevezését, mivel sem az ammónium-ion, sem az acetát-ion pK_a értéke nem esik a semleges pH tartományba ($pK_{a_{NH_4^+}}=9,25$ és $pK_{a_{CH_3COO^-}}=4,75$). Ennek ellenére alkalmas az ESI-MS detektáláshoz mozgófázis eluensként, de pozitív módú elektropray ionizáció esetén számítani kell az eredetileg semleges pH-jú oldat savas tartományba (pH=4,75 ± 1) történő elmozdulására [114]. Ammónium-acetátot 50 mM koncentrációban tartalmazó A-eluens (pH=6,6), valamint az A-eluents és a pH növeléséhez ammónium-hidroxidot tartalmazó B-eluens (pH=10,1) alkalmazásával mAb-ok IEX-MS analízise végezhető el széles pI-tartományban [115]. A B-eluents 140 mM ammónium-acetát és 10 mM ammónium-karbonát elegyére cserélve nagy felbontású IEX elválasztás és ultraérzékeny MS detektálás érhető el [116]. Az ammónium-acetát és ammónium-karbonát (vagy -bikarbonát) pufferrendszer nagy pufferkapacitást és közel lineáris pH-választ biztosít széles pH tartományban, így robusztus és reprodukálható módszerfejlesztésére ad lehetőséget.

Füssl és mtsai 25 mM ammónium-bikarbonátot és 30 mM ecetsavat tartalmazó pH=5,3 A-eluents és 10 mM ammónium-hidroxidot tartalmazó 2 mM ecetsavból álló B-eluens (pH=10,18) alkalmazását vizsgálták antitestek töltésvariánsainak elválasztására. A rendszer alkalmazható mAb-ok MS-kompatibilis analízisének módszerfejlesztésére és a különböző glikozilációs profilú variánsok átfogó jellemzésére nagy felbontású orbitrap MS detektálással. Ugyanez a mozgófázis rendszer alkalmazható hét mAb esetében az optimális elválasztási körülmények meghatározására. A kezdeti átfogó gradiens program (0-100 % B 10 perc alatt) antitestenként történő optimalizálásával a savas és bázikus variánsok megfelelő szelektivitással elválaszthatók. Például az adalimumab esetében a C-terminális lizinen történő módosulások következtében kialakuló töltésvariánsok meghatározhatók [84, 117].

A bikarbonát alapú mozgófázisok ESI-MS detektáláshoz történő alkalmazhatóságát egyes kutatócsoportok megkérdőjelezték az ESI-ben kialakuló cseppekben feltehetőleg keletkező CO₂ légbuborékok miatt. Az ESI-ben alkalmazott magas feszültség és hőmérséklet mellett a bikarbonát a fehérjék különböző töltésvariánsainak kialakulását idézi elő, ami a molekulák összetekeredett szerkezetének megváltoztatásával jár [98]. A mioglobin esetében a különböző koncentrációjú acetát és bikarbonát tartalmú eluenssel kapott ESI-MS profilok a 12. ábrán láthatók. A kis koncentrációknál dominál a 9+ töltéssel rendelkező natív komponens mellett nagyobb koncentrációk esetén megjelennek az ESI cseppekben CO₂ hatására kialakuló, nagyszámú töltéssel rendelkező ionok (22+). A töltésállapotok nagymértékű megváltozása az MS-sel kapott teljes ionáram kromatogram



12. ábra. A mioglobin ESI-MS profiljai különböző koncentrációjú acetát és bikarbonát eluens esetében [118].

és az UV-detektálással kapott kromatogram eltérését okozza, ami a csúcsok azonosítását nehezékké teszi. A jelenség elkerülhető acetát tartalmú eluens natív ESI-MS analízishez történő alkalmazásával [118]. A Hofmeister-sort vizsgálva is hasonló következtetésre juthatunk. A kozmotróp bikarbonát és formiát kevésbé alkalmas MS detektáláshoz, mint a kaotróp acetát [98].

A Waters vállalat 2019-ben hozta forgalomba az IonHance elnevezésű MS-kompatibilis pH/ionerősség gradiens pufferrendszert mAb-ok és alegységeinek IEX-MS elválasztásához. A koncentrátumok tízszeres hígításával 50 mM ammónium-acetátot, 2 % ACN-t és a pH beállításához alkalmazott ecetsavat tartalmazó A-eluens (pH=5,0), valamint 160 mM ammónium-acetát, 2 % ACN és a pH beállításához szükséges mennyiségű ammónium-hidroxid tartalmú B-eluens alakítható ki. A 2,1 × 50 mm méretű Waters BioResolve SCX mAb oszlopon hatékony elválasztás és tiszta MS spektrum érhető el 30 perces gradiens program alkalmazásával [119].

Az ioncsere elválasztásokhoz alkalmazott tömegspektrométer-kompatibilis mozgófázis rendszerek a 2. táblázatban kerültek összefoglalásra.

1.5. A kationcsere-kromatográfiában kialakuló pH-válasz vizsgálata

Az oszlopon belüli pH-választ több kutatócsoport vizsgálta. A Füssl és mtsai által kifejlesztett, illékony komponenseket (ammónium-bikarbonát, ecetsav, ammónium-hidroxid) tartalmazó pufferrendszerrel egy konvex pH-gradiens programot alakítottak ki cetuximab alegységeinek elválasztására. Az oszlopról lejövő effluens pH-jának online monitorozásával megállapították, hogy erős kationcsereelő oszlop esetében a mért pH-válasz eltér a

2. táblázat. A különböző kutatócsoportok által alkalmazott CEX-MS mozgófázisok összefoglalása

Mozgófázis-összetétel	Hivatkozás
A: 20 mM ammónium-formiát (pH=6,5) B: 20 mM ammónium-formiát (pH=8,6)	Sankaran és mtsai [112]
A: 50 mM ammónium-formiát+FA (pH=3,9) B: 500 mM ammónium-acetát (pH=7,4)	LeBlanc és mtsai [113]
A: 50 mM ammónium-acetát (pH=6,6) B: 50 mM ammónium-acetát + ammónium-hidroxid (pH=10.1)	Bailey és mtsai [115]
A: 20 mM ammónium-acetát+20 mM ecetsav (pH=5,6) B: 140 mM ammónium-acetát+10 mM ammónium-bikarbonát	Yan és mtsai [116]
A: 25 mM ammónium-bikarbonát+30 mM ecetsav (pH=5,3) B: 2 mM ecetsav+10 mM ammónium-hidroxid (pH=10,8)	Füssl és mtsai [117]
A: 25 mM ammónium-bikarbonát+30 mM ecetsav (pH=5,3) B: 10 mM ammónium-hidroxid (pH=10,9)	Füssl és mtsai [84]
A: 50 mM ammónium-acetát + 2% ACN (pH=5) B: 160 mM ammónium-acetát + 2% ACN (pH=8,5)	Ippoliti és mtsai [119]

gradiens programtól. Ugyanezekből a komponensekből összeállított azonos pH-jú, de különböző koncentrációjú eluensekkel megismételve a mérést, a kapott pH-válasz eltér az elméletileg várhatótól. A jelenséget a mozgófázis és az állófázis funkciós csoportjai arányának változásával magyarázzák. Az eluensek ellenionjainak a nagy pufferkapacitású állófázison történő megkötődésével a mozgófázisba kerülő oxóniumion (H_3O^+) és hidroxidion (OH^-) a pH megváltozását okozza [117]. Helfferich, valamint Ghose és mtsai vizsgálták a pH-eltolódást különböző pufferkomponensek, sókoncentráció és állófázisok esetében. Azok az állófázisok, amelyek polimetakrilát vázon gyenge kationcserélő karboxilcsoportot tartalmaznak, nagyobb pH-eltolódást mutatnak [120, 121]. Az oszlopot adott koncentrációjú és pH-jú eluenssel ekvilibrálva, majd azonos pH-jú, de különböző koncentrációjú eluenszt áramoltatva az összetételbeli változás az oszlopon hullámként terjed végig. A hullámoknak két formája van: az első hullám egy gyors Na^+ -hullám, ami után az oszlop a kezdeti egyensúlyban marad, majd a második, ioncsere hullám után kerül egyensúlyba az új eluenssel [120].

Jansen és mtsai azt találták, hogy magasabb pH esetén az effluensben a gyenge sav koncentrációja megnő annak ellenére is, hogy a mozgófázisbeli koncentrációja állandó volt. Magasabb koncentráció esetén ez a jelenség erőteljesebb, valószínűleg a nem disszociált komponensek oszlophoz való kötődése miatt [122]. A különböző kutatócsoportok eredményeiből arra következtethetünk, hogy a mozgófázisban mérhető pH-válasz nem csak a mozgófázis természetétől és koncentrációjától függ, hanem az oszlop is befolyásolja.

A különböző ioncserélő rendszerek leírása érdekében több kutatócsoport is tanulmányozta az ioncserélő gyanták tulajdonságait és termodinamikáját [123, 124]. Született ioncsere egyensúlyokat leíró elmélet is, amiben az ioncserélő állófázist, mint puffert, illetve

mint nagy mennyiségű iont tartalmazó komponenst vesznek számításba, ami így jelentős szerepet játszik a sav-bázis egyensúly kialakulásában [125]. Azt is megfigyelték, hogy nem csak az állófázisról származó ionok koncentrációja, hanem a felületen levő ellenionokhoz képesti arányuk is fontos [120, 126]. Az ionok adszorpciója vagy deszorpciója az egyensúly újra beállásáig a pH eltolódását okozza. Ez a jelenség a H^+ vagy az OH^- ionok, illetve a puffer ellenionjai (pl. Na^+ vagy K^+ kationcsere, Cl^- anioncsere esetében) álló- és mozgófázis közti megoszlásával magyarázható [121]. A szimultán pH- és sógradienst alkalmazó gradiens esetében az állófázist először egy kis sótartalmú eluenssel ekvilibráljuk, majd a sókoncentráció növelésével a kationok lelékik az állófázis H^+ ionjait. A mozgófázis pufferkomponensei és a benne levő só dinamikus rendszert alkotnak, ami befolyásolja a pH-t. Ebből adódóan széles pK_a értékű pufferkomponenseket és kis ionerősségű só választva a pH eltolódás mérsékelhető.

A mintaoldat pH-ja és összetétele is hatással lehet az oszlopon átáramló mozgófázis pH-jára és így a fehérjék megkötődésére. Ha a minta pH-ja magasabb az eluens aktuális pH-jánál, akkor az oszlopon belül egy magasabb pH-jú zóna alakul ki. Ennek következtében kationcsere-kromatográfia során a mintakomponens adszorpciója nem teljes és az oszlopon belüli vándorlása miatt retenciója a vártnál kisebb lesz. Ebből adódóan az injektált térfogat befolyásolja a mintakomponensek migrációját és ezáltal a csúcsalakot.

Látható, hogy a mozgófázis IEX oszlopon belüli pH-eltolódása több okból is bekövetkezhet. A pH-eltolódást Helfferich és mtsai a többkomponensű egyensúlyi rendszerek hullámelméletével írták le, ahol a hullámokat, mint mozgó koncentráció blokkokat írták le [120]. A hullám haladási sebessége a következő differenciális tömegmérleg-egyenletből (egyensúlyi-diszperzív modell) vezethető le, ami kiköti, hogy az adott helyen az i komponens koncentrációjának változása kizárólag az oda bemenő és onnan kimenő komponensek következménye, kémiai reakció nem lép fel [127].

$$\frac{\partial C_{M,i}}{\partial t} + F \frac{\partial C_{S,i}}{\partial t} + u_0 \frac{\partial C_{M,i}}{\partial z} = D_{L,i} \frac{\partial^2 C_{M,i}}{\partial z^2} \quad (16)$$

ahol $C_{M,i}$ az i komponens koncentrációja az mozgófázisban, $C_{S,i}$ az i komponens koncentrációja az állófázison (ioncsere kapacitás), $F = V_S/V_M$ a fázisarány, u_0 a mozgófázis lokális áramlási sebessége, $D_{L,i}$ a mozgófázisbeli axiális diffúziós koefficiens. Egy C_i koncentrációjú mintát tartalmazó hullám egységnyi idő alatt megtett úthossza (u_{C_i}), ha az i komponens se nem képződik, se nem bomlik le a hullámban:

$$u_{C_i} = \left(\frac{\partial z}{\partial t} \right)_{C_{M,i}} = \frac{u_0}{1 + (\partial C_{S,i} / \partial C_{M,i})_z} \quad (17)$$

ahol u_0 a folyadéktömb áramlási sebessége (m/s). A $(\partial C_{S,i} / \partial C_{M,i})_z$ hányados a K termodinamikai megoszlási hányadosként is jellemezhető.

A (17) egyenlet csak azokra a komponensekre értelmezhető, amelyek nem vesznek részt kémiai reakcióban. A hullám sebességének koncentrációtól való függése alapján a

hullámok három csoportba sorolhatók. A nem élesítő hullám esetében a sebesség a hullám elején nagyobb, mint a végén, ami a diffúzió megnövekedése révén széles hullámokat eredményez. Élesítő hullámról beszélhetünk, ha a hullám végén nagyobb a sebesség, mint az elején, ami a hullámok élesedését okozza. A hullámot indifferens nevezük, ha a hullám sebessége nem függ a koncentrációtól, így a hullám szélesedése csak a perturbációk következtében alakulhat ki.

2. Eszközök és anyagok

2.1. Eszközök és szoftverek

A mozgófázis-fejlesztéshez kapcsolódó méréseket egy Acquity UPLC™ I-Class (Waters, Milford, MA, USA) rendszeren végeztem, ami bináris pumpával, 15 μL térfogatú átfolyótűs (flow-through-needle, FTN) automata mintavevő injektossal és 2 μL térfogatú áramlási cellájú fluoreszcens detektorral (FL) dolgozik. Az injektort és az oszlopot összekötő vezeték aktív előfűtő egységet tartalmaz, belső átmérője 0,13 mm, az oszlop és a detektor közti vezetéké 0,10 mm. A teljes oszlopon kívüli térfogat 8 μL -nek adódott, míg a holtterefogat 100 μL volt.

A kromatográfiás oszlopokon kialakuló pH-válasz méréséhez egy Acquity UPLC™ H-Class Bio rendszert (Waters) használtam, ami kvaterner pumpával, átfolyótűs injektossal, FL detektorral és egy pH/C-900 típusú online pH-mérővel (Amersham Pharmacia Biotech), valamint pH elektróddal (General Electric, Baden, Svájc) van felszerelve. A pH-t az oszlopot elhagyó effluens ágban mértem. Az online pH-mérések során a detektort eltávolítottam a rendszerből a nyomás okozta károsodás megelőzésére (a detektorcellán a megengedhető maximális nyomás 5 bar). A gradiens késési idő (az az időtartam, amíg a pH-gradiens eléri az elektródot) 0,6 perc, ami 0,8 mL/perc térfogatáram esetén 0,48 mL gradiens késési térfogatot jelent. A kromatogramok felvételéhez használt fluoreszcens detektáláshoz a gerjesztési hullámhosszot 280 nm-re, az emissziós hullámhosszot 350 nm-re állítottam be mindkét készüléken. Az Acquity készülékeken az adatok kiértékeléséhez és a rendszer működtetéséhez Empower Pro 3 szoftvert (Waters) használtam.

A tömegspektrométer kompatibilis módszerfejlesztést egy Agilent 1290 Infinity ultranagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás rendszeren végeztem. A rendszer ultranagy nyomású pumpát, automata mintainjektálót, fűthető kolonnateret és diódasoros UV detektort tartalmaz. A berendezés működtetését és a kromatogramok kiértékelését a ChemStation program segítségével végeztem.

A tömegspektrometriás mérésekhez egy Shimadzu Prominence UFLC készüléket használtam, ami gradiens pumpát, automata injektort, fűthető oszlopteret, valamint UV/Vis és egyszeres kvadrupól tömegspektrométer detektort tartalmaz (Per-Form Hungária Kft., Budapest). Az ESI ionforrással 2000 m/z tömegtartományig detektálhatók a komponensek. A detektor feszültséget 3,6 kV, az ionforrás hőmérsékletét 275 °C értékre állítottam be pozitív polaritás mód alkalmazásával.

A mozgófázis pH-jának méréséhez és beállításához egy Seven-Multi S40 típusú pH mérőt (Mettler Toledo, Greifensee, Svájc) használtam. A retenció modellezése és a módszer optimalizálása DryLab® 4 kromatográfiás modellező program segítségével történt (Molnar-Institute, Berlin, Németország). A különböző pufferrendszerek pH-ját BATE pH Calculator 1.0.3.15 programmal (ChemBuddy), valamint a Pythonban írt programmal

számítottam. A számításokhoz és az adatok feldolgozásához Excel sablonokat, valamint a Python programnyelv (v. 3.7, Anaconda Python Distribution, <https://anaconda.com>) NumPy csomagját használtam.

2.2. Vegyszerek

A gradiens tisztaságú víz, a kálium-hidroxid (KOH) és a piperazin a Fisher Scientific (Dublin, Írország), a citromsav, a 2-(N-morfolino)-etánszulfonsav (MES) monohidrát, a ditiotreitól (DTT), az 1,3-diamino-2-propanol (DAP), a citromsav, a nátrium-klorid (NaCl), a 2-ciklohexilamino-etánszulfonsav (CHES), az imidazol, a tris-hidroximetilaminometán hidroklorid (TRIS-HCl), az ammónium-hidroxid oldat (28 % NH_3 vizes oldata) és az ammónium-acetát a Sigma-Aldrich Kft.-től (Buchs, Svájc) származik. A nátrium-hidroxidot (NaOH) a VWR Scientifictől (Radnor, PA, USA), az ecetsavat a Biosolvtól (Dieuze, Franciaország) vásároltuk. Az IdeS enzim (FABRICATOR ®, art A0-FR1-050) forgalmazója a Genovis AB (Lund, Svédország).

A CX-1 pH-gradiens puffereket ($\text{pH}_A=5,6$ és $\text{pH}_B=10,2$) a Thermo Fisher Scientifictől (Waltham, MA, USA) szereztük be. Ez a pufferrendszer ikerionos pufferkomponenseket (2-(N-morfolino)etánszulfonsav, 3-(N-morfolino)propánszulfonsav, N-[Tris(hidroximetil)metil]-3-aminopropánszulfonsav és 3-ciklohexilamino-2-hidroxi-1-propánszulfonsav), valamint NaCl-ot és NaOH-ot tartalmaz.

A BioResolve CX pH-gradiens pufferrendszer a mérések elvégzésekor referencia eluens volt, amiket a Waters biztosított. Ez a rendszer borostyánkősavat, BIS-TRIS propánt, trietanolamint és N-ciklohexil-3-aminopropánszulfonsavat tartalmaz.

A tömegspektrometriás módszerfejlesztéshez használt ammónium-acetát, esetsav és ammónium-karbonát a Sigma-Aldrich Kft. termékei.

2.3. Minták

Az Európai Unió által gyógyszerészeti minőségűnek besorolt terápiás IgG monoklonális antitesteket (bevacizumab, cetuximab, daratumumab, eculizumab, infliximab, obinutuzumab, panitumumab, pembrolizumab, pertuzumab, ramucirumab, reslizumab, rituximab, trastuzumab) az illetékes gyártóktól, a szarvasmarha hasnyálmirigyből származó inzulint a Sigma Aldrich Kft.-től szerezttem be. A NIST mAb referencia komponens forgalmazója a National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). A mérések során alkalmazott antitestek és kapilláris izoelektromos fókuszálással mért izoelektromos pontjaik (pI) a 3. táblázatban található [83].

A mérésekhez intakt monoklonális antitestek vízben való hígításával 1 mg/mL koncentrációjú mintaoldatokat készítettem (lásd Függelék 1. táblázat). A mAb-ok redukálásához az 1 mg/mL oldatokhoz 10 %-ban 1 M koncentrációjú DTT oldatot adtam, míg az emésztéshez az IdeS-t gyárilag tartalmazó Eppendorf csőbe 10 μL 100 mM koncentrációban

3. táblázat. Az alkalmazott antitestek és izoelektromos pontjaik [83]. * A daratumumab pI értékét a Pannon Egyetemen működő Transzlációs Glikomika Kutatólaboratórium határozta meg.

	Izoelektromos pont
Bevacizumab	8.3
Cetuximab	8.8
Daratumumab*	8.2
Eculizumab	6.1
Infliximab	7.6
NIST mAb	9.2
Obinutuzumab	8.6
Panitumumab	6.8
Pembrolizumab	7.6
Pertuzumab	9.0
Ramucirumab	9.1
Reslizumab	7.1
Rituximab	9.4
Trastuzumab	9.1

TRIS-HCl oldatot és 1 mg/mL koncentrációban mAb-ot mértem be, majd a térfogatot 100 μ L-re állítottam be nagy tisztaságú vízzel. Az emésztéshez és a redukáláshoz szükséges 38 °C hőmérsékletet inkubátorral biztosítottam 30 percen keresztül. A minták végső térfogata 100 μ L volt, amiből kis térfogatú mintatartó segítségével közvetlenül történt az injektálás. Az injektálási térfogatot 2 μ L-re állítottam be.

A tömegspektrométer limitált tömegtartománya miatt az MS mérésekhez szarvasmarha hasnyálmirigyből izolált inzulint (Sigma-Aldrich Kft.) használtam.

2.4. Oszlopok

Az elválasztásokhoz használt Supelco Antibodix WCX-NP3 gyenge kationcserélő oszlopot a Sigma-Aldrich, a ProPac Elite gyenge kationcserélő oszlopokat a Thermo Fisher Scientific, a BioZen WCX oszlopot a Phenomenex Inc. (Torrance, CA, USA), a BioPro SP-F erős kationcserélő oszlopot a YMC (Kioto, Japán), a BioResolve SCX mAb oszlopot és a Protein-Pak Hi Res SP oszlopot a Waters forgalmazza. Az oszlopok tulajdonságait a 4. táblázat tartalmazza.

Az oszlopok vizsgálatokor általános gradiens (0-100 % B) programot választottam az oszlopok térfogatát figyelembe véve. A 100 \times 4,6 mm oszlopok esetében 0,8 mL/perc térfogatáramot és 15 perc gradiens időt, míg a 150 \times 4 mm ProPac Elite oszlopon 0,6 mL/perc és 22,5 perc paramétereket alkalmaztam. Az oszlop hőmérséklete minden esetben 25 °C volt.

4. táblázat. Az alkalmazott oszlopok tulajdonságai: oszlophossz (L), belső átmérő (ID), szemcseméret (D), funkciós csoport, porozitás és holtterefogat (V_0)

	L (mm)	ID (mm)	d_p (μm)	Funkciós csoport	Porozitás	V_0 (mL)
Supelco Antibodix	150	4,6	3	Karboxil	0,35	0,87
Thermo ProPac Elite	150	4	5	Karboxil	0,38	0,72
Thermo ProPac Elite	50	2	5	Karboxil	0,38	0,06
Phenomenex BioZen	100	4,6	6	Karboxil	0,39	0,65
YMC BioPro SP-F	100	4,6	5	Szulfonát	0,35	0,58
Waters BioResolve SCX mAb	100	4,6	3	Szulfonát	0,30	0,50
Waters Protein-Pak Hi Res SP	100	4,6	7	Szulfonát	0,36	0,60

2.5. Mozgófézis előkészítés és az alkalmazott gradiens programok

A pH-gradiens elválasztásokhoz MES, DAP, citromsav és CHES 10, 20 és 50 mM koncentrációjú, valamint imidazol és piperazin 10 mM koncentrációjú vizes oldatát készítettem el. Az eluens pH-jának összetételtől való függését a savas és bázikus komponensből 0:10 és 10:0 tartományban képzett eluenspárok pH-jának mérésével határoztam meg. A vizsgált eluenspárok a (1) MES/piperazin, (2) citromsav/DAP, (3) MES/DAP, (4) citromsav/imidazol, (5) MES/imidazol és (6) citromsav/CHES voltak. Az ammónium-acetát alapú mozgófázishoz 50 mM koncentrációjú oldatot készítettem, aminek pH-ját ecetsavval 6-ra állítottam be (A-eluens), míg a B-eluens 50 mM ammónium-acetát volt, melynek pH-ját ammónium-hidroxiddal 10-re emeltem.

A klasszikus sógradienshez 10 mM MES (pH=6) oldatot készítettem (A-eluens), a B-eluens 10 mM MES és 0,25-0,4 M NaCl oldata volt. A pH-gradiens mérésekhez a kereskedelmi forgalomban kapható CX-1 pH-gradiens puffer esetében a B-eluens arányát 0 %-ról 100 %-ra növeltem, ami 5,6-10,2 közti pH-t jelent. A szimultán pH- és sógradiens elválasztásokhoz a pH-gradiensnél leírt pufferrendszereket alkalmaztam azzal a különbséggel, hogy a B-eluenshez NaCl-ot adtam különböző koncentrációkban (20, 60, 100 és 150 mM). A Thermo CX-1 és Waters BioResolve CX puffereket a koncentrátumok tízszeres vizes hígításával állítottam elő.

Az oszlopok teszteléséhez négy mozgófázis rendszert választottam: a kereskedelmi forgalomban kapható Thermo CX-1 és a Waters BioResolve CX pufferrendszereket, a klasszikus MES-alapú sógradienst, valamint az általunk kifejlesztett MES/DAP szimultán pH- és sógradienst. A klasszikus sógradiens A-eluense 10 mM MES (pH=6,0), a B-eluens 10 mM MES és 0,25 M NaCl (pH=6,0) vizes oldata. Szimultán pH- és sógradiens esetében az A-eluens 20 mM MES és 20 mM DAP 90:10 arányú keveréke volt (pH=5,6), míg a B-eluens 30:70 arányban tartalmazta a két összetevőt, valamint 30 mM NaCl-ot (pH=9,9).

A pH-válasz online vizsgálatához a kereskedelmi forgalomban kapható puffereket, az oszlopok teszteléséhez is használt MES/DAP rendszert és a citromsav/CHES+NaOH mozgófázist választottam. Utóbbi esetben az A-eluens 10 mM citromsavat, 10 mM CHES-t és 12,5 mM NaOH-ot vagy KOH-ot tartalmazott, míg a B-eluens 20 mM CHES-t és

12,5 mM NaOH-ot vagy KOH-ot. A gradiens program mind a négy esetben lineáris 0-100 % B volt különböző gradiens időkkel ($t_G = 10, 20, 30$ perc). A gradiens program előtt az oszlopot az A-eluenssel 3 percig mostam, majd a program végén a B-eluens arányát 3 percig 100 %-on tartottam. Az alkalmazott gradiens program a 10 perces gradiens idő esetében az 5. táblázatban látható.

A tömegspektrométer kompatibilis mozgófázis fejlesztéshez az alacsony ionerősségű A-eluens 10 mM ammónium-acetát és 10 mM esetsav keveréke (pH~5,2), míg a B-eluens ammónium-acetát és ammónium-karbonát különböző koncentrációjú (az egyes összetevőkre 10 mM, 25 mM, 50 mM és 100 mM) elegye, így összesen tizenhat pufferösszetétel kombinációt vizsgáltam.

5. táblázat. Az alkalmazott gradiens program 10 perc gradiens idő esetében.

Idő (perc)	A-eluens %	B-eluens %
0	100	0
3	100	0
13	0	100
16	0	100
17	100	0

A pH-választ lépcsőzetes gradiens esetén is vizsgáltuk 3 perc hosszú izokratikus szegmensekkel 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 és 100 % B-eluens összetételnél, az egyes lépések között 0,01 perces gradiens lépcsőket alkalmazva. A térfogatáram 0,8 mL/perc volt. A pH-válasz görbék ábrázolásakor figyelembe vettem az oszlopok holtterfogatát és a gradiens késési térfogatot.

3. Eredmények

3.1. Mozgófázis fejlesztés

3.1.1. A mozgófázisok pH-válaszai

A kationcsere-kromatográfia során kialakított pH-gradiens hatására a mAb-ok nettó töltése a funkciós csoportok deprotonálódása miatt változik. Mivel a fehérjék pI értéke széles tartományt fed le, fontos, hogy az alkalmazott pH-gradiens is széles tartományban változzon. Munkám során olyan egyszerű, két komponensből álló alternatív pufferrendszereket dolgoztam ki, amelyek az elválasztáshoz szükséges pH-tartományt biztosítani tudják. A pH-válasz kezdeti vizsgálataihoz olyan komponenseket választottam, amelyek biológiai és gyógyszeripari gyakorlatban elterjedtek. A komponensek koncentrációi, a leadott/felvett hidrogénionok száma és a protonálódási állandói ismeretében a különböző pufferrendszerekkel elérhető pH-tartomány és pH-válasz az alábbi egyensúlyok figyelembe vételével kiszámítható. A mozgófázisban az n számú pozitív töltéssel rendelkező B^n bázis által történő hidrogénion (H^+) felvételével az alábbi protonálódási egyensúlyok alakulnak ki:



Ha a rendszer a kétértékű bázis mellett egyértékű savat (HA) is tartalmaz, akkor a töltésegyensúly értelmében a mozgófázisbeli pozitív és negatív töltések mennyiségének meg kell egyeznie:

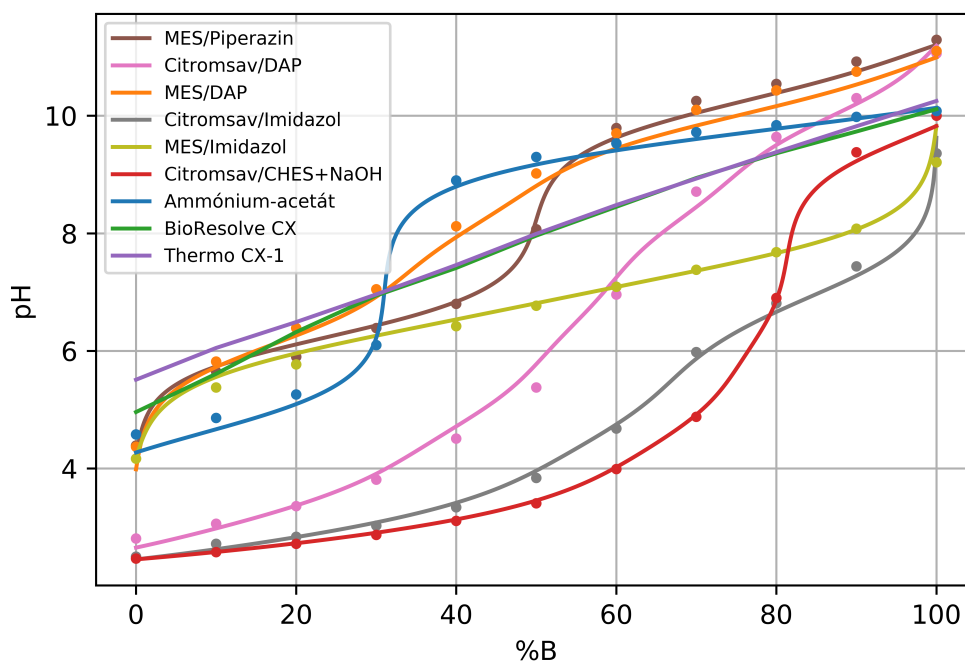
$$[H^+] + \sum_{i=1}^n i \cdot [BH_i^{i+}] = [OH^-] + \sum_{j=0}^{m-1} (m-j)[H_jA^{m-j}] \quad (20)$$

ahol n és m a bázis, illetve a sav által maximálisan felvehető protonok száma.

A hidroxidion koncentráció kifejezhető a víziionszorzat és a hidrogénion koncentráció hányadosaként:

$$[OH^-] = \frac{K_v}{[H^+]} \quad (21)$$

A (20) egyenletet a hidrogénion koncentrációra megoldva a pH kiszámítható. Az előzetesen meghatározott pH-válasz alapján kiválasztott legalkalmasabb puffereket készítettem el és a bázikus tag arányát 0-100 % között 10 %-onként változtatva felvettem a rendszer pH-válaszát. A 20-20 mM koncentrációjú pufferrendszerek (MES/piperazin, citromsav/DAP, MES/DAP, citromsav/imidazol, MES/imidazol, citromsav/CHES+NaOH),



13. ábra. A különböző pufferrendszerek pH-válasza a bázikus eluens térfogatarányának függvényében (folytonos vonal: számított értékek; pontok: mért értékek).

az 50 mM koncentrációjú ammónium-acetát rendszer és a két kereskedelmi forgalomban kapható pH-gradiens mozgófázis rendszer számított és mért pH-válaszai a 13. ábrán láthatók.

A 13. ábra alapján elmondható, hogy a számított pH-válaszok jó illeszkedést mutatnak a mért értékekkel, ami a jövőbeli módszerfejlesztések során megkönnyítheti a megfelelő pufferkomponensek kiválasztását.

A MES/piperazin rendszerben a MES egy gyakran használt pufferkomponens a CEX elválasztásokhoz sógradiens módban és a mozgófázis pH-jának 6-ra történő beállításához. Protonálódási állandója ($pK_a=6,27$) alapján alkalmazható kationcserés elválasztások kiindulási puffereként. A piperazin szintén egy gyakori pufferkomponens pH-gradiens kialakításakor ($pK_a=9,73$). Ezzel a pufferrendszerrel 4,5-11 közti pH-tartományt lehet kialakítani, azonban a pH-válasz nem lineáris: pH=6,5 (40 % piperazin) és pH=9,5 (60 % piperazin) között egy meredek emelkedő szakasz figyelhető meg.

A MES/imidazol rendszerben az imidazol amfoter karakterű vegyület ($pK_a \sim 7,0$ és 14,5), CEX elválasztások során gyakran használt mozgófázis összetevő. A kereskedelmi forgalomban kapható CX-1 puffer (Thermo) is tartalmaz imidazolt, ennek ellenére a MES és imidazol kombinációját még nem alkalmazták mozgófázisként. A rendszer a $5 \leq \text{pH} \leq 8$ tartományban lineáris választ ad, ami főleg a kevésbé bázikus karakterű mAb-ok elválasztásakor jelenthet előnyt.

Az imidazol a pH-tartomány kibővítése érdekében kombinálható egyéb savakkal is,

például citromsavval. A citromsav egy 3 funkciós szerves sav, pK_a értékei 3,13; 4,76 és 6,40. A két vegyület párosításával a $2,5 \leq \text{pH} \leq 9,4$ tartományban folytonos, konvex pH-választ lehet előállítani, ami megfelelő elválasztást biztosíthat a savasabb antitestek (pl. panitumumab) és savas fúziós fehérjék (pl. abatacept) esetében.

Citromsav/CHES: a CHES ($pK_a=9,3$) szintén egy gyakran használt pufferkomponens fehérjék ioncserés és elektroforetikus elválasztásához. A citromsav/imidazol rendszerhez hasonló pH-választ biztosít. A CHES-t tartalmazó B-eluenshez nátrium-hidroxidot adva a pH-tartomány felső határa megemelhető ($2,5 \leq \text{pH} \leq 10$).

Citromsav/DAP: a DAP fehérjék elválasztásához ritkán használt komponens, de a CEX elválasztások hatékonyságát növelheti. A DAP egy kétfogú diamin, 7,9 és 9,7 pK_a értékekkel rendelkezik, valamint megfelelő pufferkapacitással a $7 \leq \text{pH} \leq 10,5$ tartományban. Citromsavval való kombinálása széles pH-tartományt ($2,5 < \text{pH} < 11$) lefed jó pufferkapacitással. Ezen tulajdonságai alapján alkalmas jelölt lehet egy általános puffernek CEX elválasztások esetében. A gyakorlatban a pH-válasza az összetétel függvényében egy enyhe szigmoid görbét ad, aminek $\text{pH} \sim 7$ -nél inflexiós pontja van.

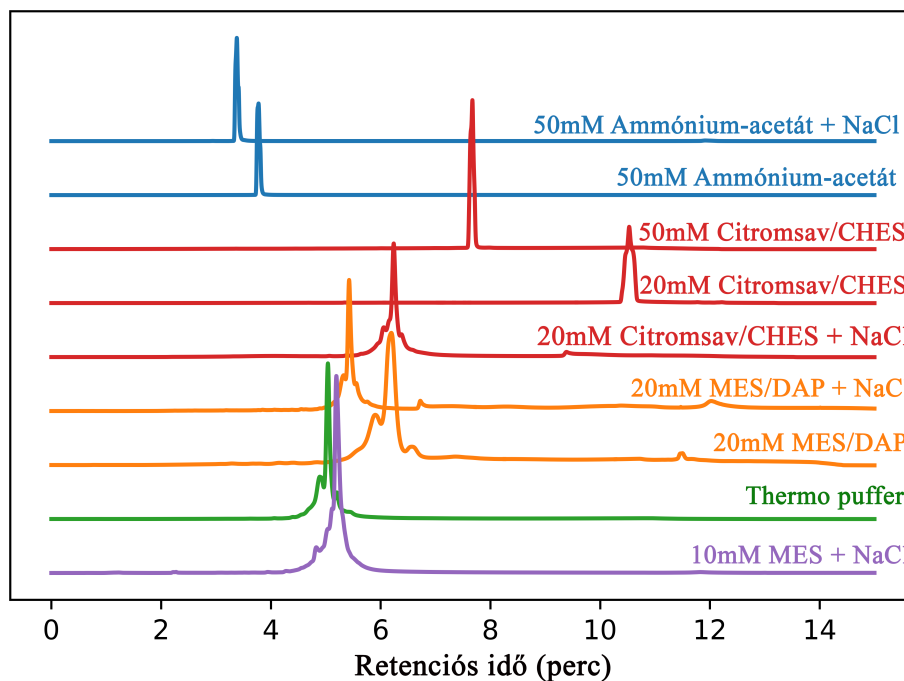
MES/DAP: a mAb-ok elválasztásakor gyakran a szűk pH-tartomány a célravezetőbb, ezért vizsgáltuk citromsav helyett a MES és a DAP kombinációját. A MES/DAP rendszer pH-válasza enyhén konkáv a $4,4 \leq \text{pH} \leq 11$ tartományban.

Az illékony pufferek közül az ammónium-acetátot teszteltük, ami alkalmas CEX elválasztásokat követő közvetlen MS detektáláshoz [115]. A rendszer pH-válasza egy szigmoid görbe, melynek inflexiós pontja $\text{pH} \sim 7$ -nél található.

3.1.2. A különböző mozgófázis rendszerek kromatográfiás vizsgálata

A csúcsalakok és az elúciós ablak tanulmányozása érdekében intakt mAb-ok (daratumumab, bevacizumab, panitumumab, pertuzumab és rituximab) retenciós viselkedését vizsgáltam hét különböző pufferrendszer esetében pH-gradiens és szimultán pH- és sógradiens alkalmazásával (2.5. fejezet). A pufferek 10, 20 és 50 mM koncentrációban tartalmazták a komponenseket, szimultán pH- és sógradiens esetben 150 mM NaCl-ot adtam a B-eluenshez. A kezdeti mérések során általános lineáris gradienst alkalmaztam (0-tól 100 % B 10 perc alatt), 0,8 mL/perc áramlási sebesség és 25 °C oszlophőmérséklet mellett. A mérésekhez a YMC BioPro SP-F (100×4,6 mm, 5 μm) oszlopot használtam.

A vizsgált mozgófázisok közül a MES/DAP, citromsav/CHES és az ammónium-acetát adott elfogadható csúcsalakot, a többi esetben hasadt vagy torzult csúcsok figyelhetők meg. Néhány esetben a mAb-ok a gradiens program legvégén eluálódtak annak ellenére, hogy pI -jük kisebb, mint a mozgófázis végső pH-ja (feltételezhetően a nem megfelelő pufferkapacitás miatt). A 14. ábrán a bevacizumab kromatogramjai láthatók MES/DAP, citromsav/CHES és ammónium-acetát, valamint összehasonlítás céljából standard só- és pH-gradiens pufferrendszerekkel. Az általam vizsgált mozgófázisok szimultán pH- és sógradienssel felvett kromatogramjait is feltüntettem (150 mM NaCl a B-eluensben).



14. ábra. Az intakt bevacizumab kationcsere kromatogramjai a különböző pufferrendszerekkel a YMC BioPro SP-F oszlopon.

Ahogy a 14. ábrán látható, a vizsgált pufferrendszerek hasonló retenciót és csúcsalakot biztosítanak, mint a hagyományosan használt só- és pH-gradiens pufferek, különbség csak a savas (fő csúcs előtti) csúcsok szelektivitásában van. Ugyan a MES/DAP rendszer esetében nagyobb a retenció és szélesebbek a csúcsok, de a szelektivitása jobb, így néhány bázikus forma is elválasztható (ellentétben a klasszikus pufferekkel). A NaCl MES/DAP rendszerbe történő adagolásával a növekvő kation koncentráció miatt fókuszáló hatás lép fel, ami a csúcsalak javulását és a retenció csökkenését okozza. Az így kapott elválasztás nagyon hasonló a klasszikus pufferekkel kapottakhoz, így ez a rendszer jó alternatíva lehet mAb-ok kationcserés elválasztásához.

A citromsav/CHES rendszer jelentős visszatartást és gyenge szelektivitást mutat. A koncentráció 20 mM-ról 50 mM-ra való növelésével a retenció csökkenthető, de a szelektivitás nem javul (a savas és bázikus csúcsok nem választhatók el). A B-eluens NaCl-tartalmának folyamatos növelésével már 20 mM koncentráció esetében is javul a savas és bázikus formák elválasztásának szelektivitása, valamint a retenció is csökkenthető. Ennek megfelelően a citromsav/CHES rendszer is alkalmas lehet mAb-ok elválasztásához szimultán pH- és sógradiens módban.

Az ammónium-acetát rendszerrel ilyen összetétel esetében sem sógradiens nélkül, sem sógradiens alkalmazásával nem valósítható meg a savas és bázikus variánsok elválasztása a fő komponenstől, azonban tömegspektrométer-kompatibilitása miatt szerepe lehet a monoklonális antitestek karakterizálásában.

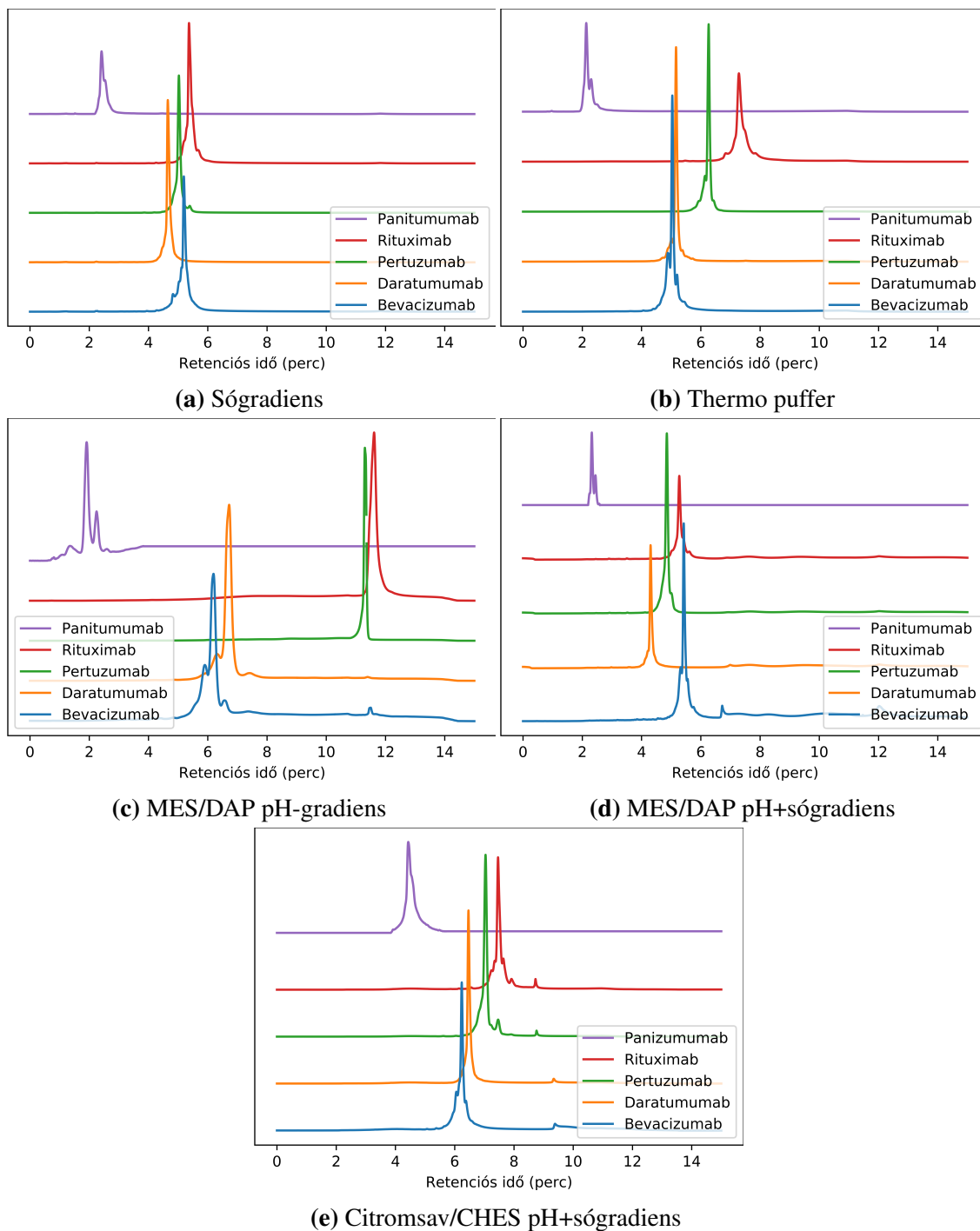
A megfelelő pH-tartomány kialakítása érdekében a pH-válasz figyelembe vételével meghatároztam az A- és a B-eluens szükséges összetételét az egyes pufferrendszerek

esetében. A MES/DAP rendszer A-eluense 20 mM MES és 20 mM DAP keveréke volt MES/DAP=80/20 arányban (pH~6,2), míg a B-eluens MES/DAP=20/80 (pH~10,2). Citromsav és CHES esetében az A-eluens 30:70 arányban tartalmazta a két komponenst (pH~10). Az ammónium-acetát rendszer A-eluense 50 mM ammónium-acetát mellett ecetsavat (pH~5,5), míg a B-eluens 50 mM ammónium-acetátot és a pH~10-re történő emelése miatt NaOH-ot tartalmazott.

A következőkben vizsgáltam a három kiválasztott pufferrendszer (MES/DAP pH-gradiens, MES/DAP szimultán pH- és sógradiens és citromsav/CHES szimultán pH- és sógradiens) szelektivitását és elúciós ablakát öt terápiás antitest elválasztása esetében (15. ábra).

Az egyes monoklonális antitestek a pI-jüknek megfelelő sorrendben eluálódtak a Thermo, a MES/DAP pH-gradiens és a citromsav/CHES szimultán pH- és sógradiens pufferekkel történő elúció esetében. Ezek közül a MES/DAP pH-gradiens módszerrel érhető el a legjobb szelektivitás és a legszélesebb elúciós ablak. Ez a viselkedés érthető, hiszen ez az egyetlen olyan rendszer a vizsgáltak közül, amely kizárólag pH-gradienst alkalmaz. Fontos megjegyezni, hogy ugyan a kereskedelmi forgalomban kapható pH-gradiens puffer (Thermo CX-1) lineáris pH-gradienst biztosít, tartalmaz NaCl-ot és NaOH-ot is, amik kationcserélő folyamatban ellenionokként vesznek részt az elválasztási folyamatban. A 15.c) és d) ábrát (tiszta pH és szimultán pH- és sógradiens MES/DAP rendszerrel) összehasonlítva látható, hogy só hozzáadásával a szelektivitás drasztikus csökkenése és az elúciós sorrend megváltozása érhető el. Mivel a szimultán pH- és sógradiens alkalmazásával tágul a vizsgálható körülmények köre, így több lehetőség nyílik a szelektivitás és a felbontás javítására.

Bár a kationcsere-kromatográfiás elválasztás során a fehérjék többé-kevésbé az izoelektromos pontjaiknak megfelelő sorrendben eluálódnak, korábbi tanulmányok azt mutatják, hogy az elúciós sorrend nem követi szigorúan a pI-értékeket [81]. Hozzá kell tenni azonban, hogy a pI meghatározása aminosav sorrenden vagy kapilláris izoelektromos fókuszálós (cIEF) méréseken alapul denaturáló körülményeket alkalmazva. Így a nem denaturáló, intakt fehérjéket vizsgáló CEX elválasztás körülményein megfigyelhető retenció nem feltétlenül korrelál a mért pI értékekkel. Ebben az esetben a látszólagos pI kifejezés jobban helytálló. Fontos továbbá megjegyezni, hogy a pI elvileg megegyezik a mozgófázis elúciós pH-jával, de a fehérje ilyenkor még hordozhat pozitív és negatív töltéseket, még ha a nettó töltése nulla is. Ennek megfelelően vonzó és taszító kölcsönhatás is kialakulhat az állófázissal, ami a retenció növekedését, illetve csökkenését okozza. Másik fontos különbség, hogy elektroforetikus módszereket alkalmazva a felületen levő és a nem hozzáférhető töltések is befolyásolják az elektromos erőterben való vándorlás sebességét, addig az ioncsere-kromatográfiában csak a felületi töltések játszanak szerepet a retencióban. Utóbbi esetben másodlagos hidrophil kölcsönhatások is befolyásolhatják a fehérjék megkötődését. A fehérjék felületi töltéeloszlása magyarázatul szolgálhat a pI és az elúciós pH közti



15. ábra. Az intakt mAb-ok kationcserés kromatogramjai a klasszikus só-gradienssel (a), valamint a Thermo pH-gradiens (b), MES/DAP pH-gradiens (c), MES/DAP szimultán pH- és sógradiens (d) és citromsav/CHES szimultán pH- és sógradiens (e) pufferekkel.

különbségre [128].

A kationcserés elválasztások során szükség van közel lineáris pH-gradiensre a fehérjék töltésállapotának folyamatos változtatásához. Ennek a követelménynek a MES/DAP puffrendszer megfelelni látszik. A mozgófázis rendszer másik előnye, hogy a nagy kihívást jelentő, savas panitumumab ($pI = 6,8$) esetén is jó szelektivitás érhető el. A 15. ábrán az is

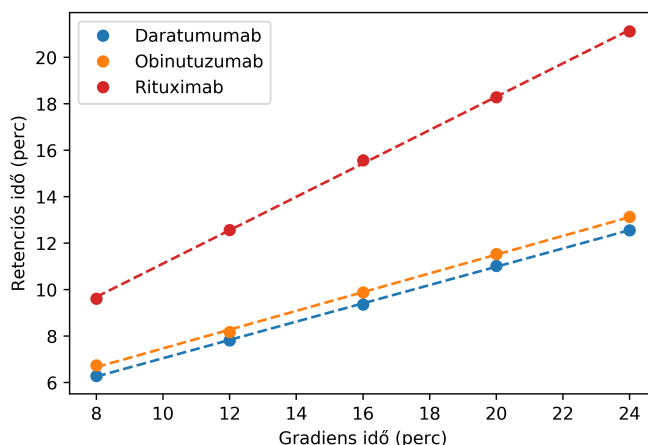
látható, hogy a különböző pufferrendszerekkel eltérő szelektivitás és elúciós sorrend tapasztalható, ezért alkalmasak lehetnek a kezdeti módszer-feltérképezések során különböző körülmények tesztelésére. A mAb-ok természetétől függően a MES/DAP és a citromsav/CHES rendszer is jobb szelektivitást biztosít, mint a gyakran használt pufferek. Például rituximab bázikus formái ezen pufferrendszerek szimultán pH- és sógradiens verziójával jobban elválaszthatók. Megállapítható tehát, hogy a MES/DAP és a citromsav/CHES megfelelő alternatív puffernek bizonyul mAb-ok CEX elválasztásához, mivel mindkettő éles csúcsokat és jó szelektivitást mutat.

3.1.3. Retenció modellezése és módszer optimalizálás

Egy általános módszerfejlesztési folyamat során a szelektivitás szempontjából legfontosabb paraméterek hatásának egyidejű vizsgálata történik az előzetesen kiválasztott analitikai oszlopon. Következő lépésként a kiválasztott MES/DAP rendszer kationcserés elválasztásban való alkalmazhatóságát vizsgáltam. Intakt mAb-ok (obinutuzumab, daratumumab és rituximab) esetében tanulmányoztam a B-eluens sókoncentrációjának (c_s), a gradiens meredekségének (gradiens idő, t_G) és a mozgófázis hőmérsékletének (T) hatását a retenciós tulajdonságokra. Az egyes paraméterek hatásának vizsgálatához öt gradiens idő (8, 12, 16, 20 és 24 perc), öt sókoncentráció (0, 20, 60, 100 és 150 mM) és öt mozgófázis hőmérséklet (25, 30, 35, 40 és 45 °C) értéknél határoztam meg az antitestek retenciós idejét. Az A-eluens összetétele 90 % 20 mM MES és 10 % 20 mM DAP, míg a B-eluensé 30 % 20 mM MES és 70 % 20 mM DAP. Az így kialakított pH-gradiens az 5,6 - 9,9 pH-tartományt fedte le. Méréseim során csak a gyakorlati szempontból hasznos tartományt vizsgáltam, ahol a körülmények alkalmasak lehetnek mind az intakt fehérjék, mind az alegységek eluálására. Az egyes paraméterek hatásának vizsgálatára létrehoztam a retenciós idő vs. gradiens idő, retenciós idő vs. sókoncentráció és retenciós tényező vs. hőmérséklet ábrákat.

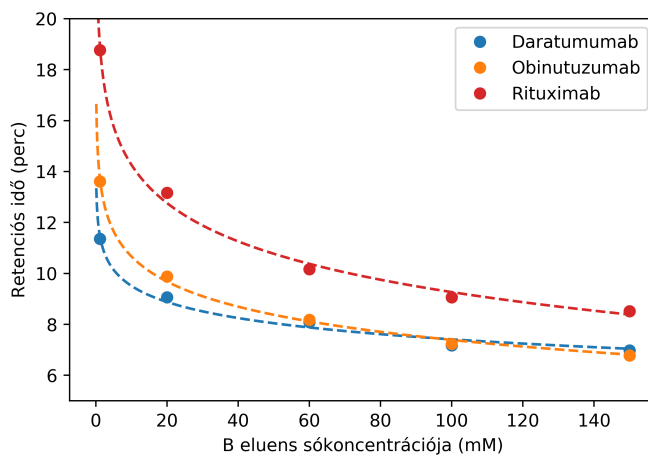
A gradiens meredekség (a gradiens idő (t_G) reciproka) hatásának vizsgálatát intakt antitestek retenciós idejének mérésével végeztem 25 °C hőmérséklet és 20 mM sókoncentráció esetén (16. ábra). A B-eluens hőmérsékletétől és sókoncentrációjától függetlenül a retenciós idő és a gradiens idő között mindig lineáris kapcsolat (szaggatott vonal) figyelhető meg (lineáris gradiens profil mellett), így ezt a paramétert módszertervezéskor elegendő 2 értéken vizsgálni. Ez a trend előrevetíti a gyakran használt lineáris oldószer erősségi modellt (Linear Solvent Strength, LSS) alkalmazhatóságát. Fekete és mtsai már korábban publikáltak hasonló viselkedést pH- vagy sógradienst alkalmazó kationcserés elválasztások során [81, 89, 129].

A retenciós időket a B-eluens sótartalmának függvényében (adott t_G mellett) ábrázolva (17. ábra) a pontokra hiperbolikus görbe illeszthető (szaggatott vonalak), így ezt a paramétert három ponton szükséges vizsgálni módszerfejlesztéskor. A megfigyelt görbe egy gyakran előforduló jelenséget igazol az ioncserés elválasztások során, valamint normálfá-



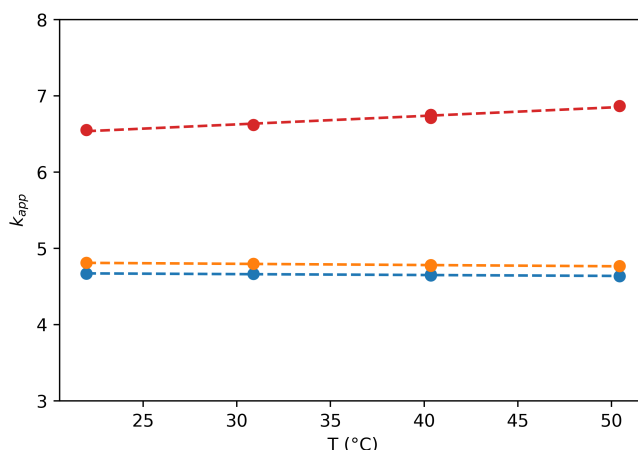
16. ábra. Retenciósi idő változása a gradiens idő függvényében ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $c_{\text{NaCl}} = 20\text{ mM}$.)

zisé és HILIC elválasztások esetében is. A szakirodalomban adszorpciós, vagy log-log modellként is emlegetik [130, 131], illetve gyakran helytelenül lineáris oldószer erősségi modellnek nevezik [132]. A B-eluens sókoncentrációja nagy szerepet játszik a fehérjék retenciójában, esetenként az elúciós sorrend változása is megfigyelhető. Feltehetőleg minél nagyobb a sókoncentráció retencióra gyakorolt hatása, annál nagyobb a mAb töltése adott körülmények között.



17. ábra. A retenciósi idő a B-eluens sótartalmának függvényében ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_G = 16\text{ perc}$).

A 18. ábra a látszólagos retenciósi tényezőt (k_{app}) ábrázolja a hőmérséklet függvényében a vizsgált három antitest esetében. Lineáris összefüggés figyelhető meg, bár az alkalmazott hőmérséklet tartomány a fehérjék hőmérsékletre való érzékenysége miatt szűk volt. Ugyanakkor megállapítható az is, hogy a hőmérsékletnek nincs jelentős hatása sem a szelektivitásra, sem a csúcshélességre. Ez arra utal, hogy az ioncsere mellett nem lép fel hőmérséklet függő kölcsönhatás, pl. adszorpció. A hőmérséklet növelésével a komponensek kinetikus energiája nő, ezért a deszorpció sebessége nagyobb lesz. Ioncsere során



18. ábra. A látszólagos retenciós tényező a hőmérséklet függvényében daratumumab, obinutuzumab és rituximab esetében ($t_G = 24$ perc, $c_{NaCl} = 20$ mM).

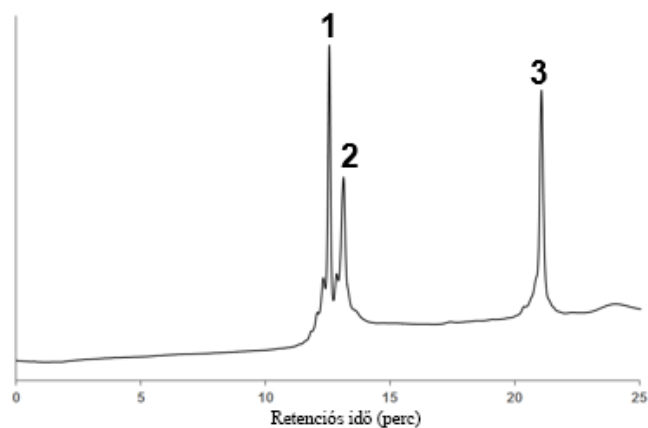
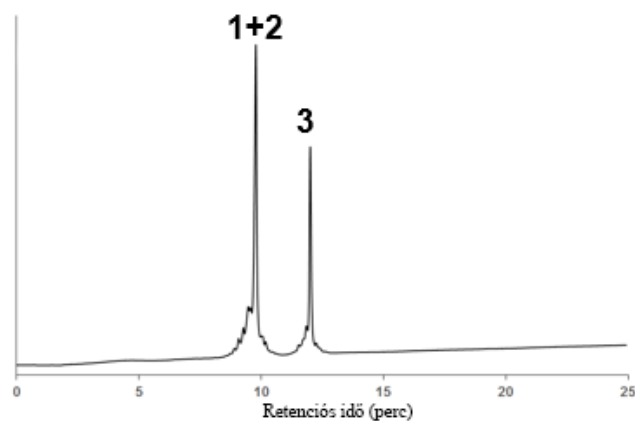
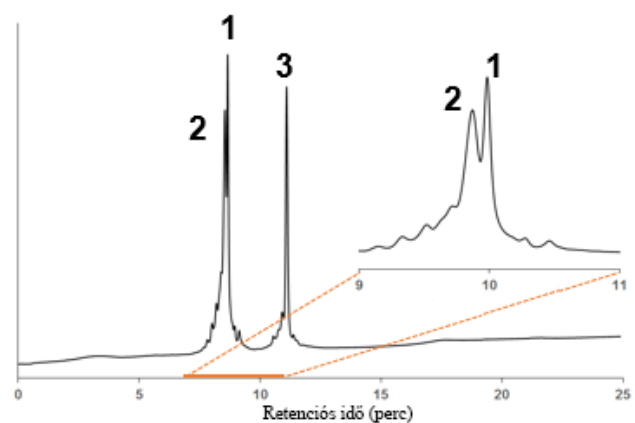
azonban az oszlopot elhagyó ion helyét azonnal betölti egy másik ion, így az egyensúly eredően nem tolódik el.

A három intakt antitest elválasztására épített $5 t_G \times 5 T \times 5 c_s$ kísérletből álló mérésorozat eredményei azt mutatják, hogy a hőmérsékletnek nincs hatása a szelektivitásra és a felbontásra, ezért állandó, alacsony értéken való tartása ajánlott (pl. $25\text{ }^\circ\text{C}$) a nem denaturáló körülmények fenntartása érdekében. A sókoncentráció és a gradiens meredekség fontos tényezők a retenció és a szelektivitás optimalizálásában. Megállapítható, hogy adott hőmérsékleten limitált számú mérés (pl. 6 futtatás: $2 t_G \times 3 c_s$) elegendő a retenció kellő pontosságú modellezéséhez (a retenciós idő becslésének átlagos hibája $\leq \sim 5\%$ -nál).

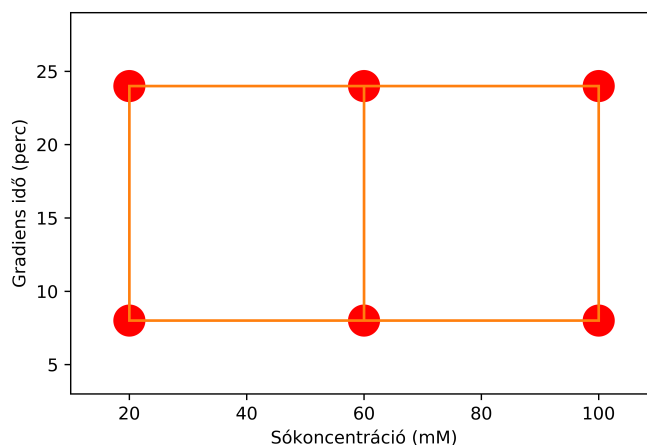
A szimultán pH- és sógradiens elúciós módszerről elmondható, hogy a két gradiens típus összevonásával lehetőségünk nyílik a szelektivitás változtatására és csúcsfókuszáló hatás elérésére. A kombinált módban az elúció alapja egyrészt a só kiszorító hatása, másrészt a vizsgálandó molekula töltésállapotának megváltoztatása.

Az előzetes kísérletek alapján a t_G és c_s bizonyult a leglényegesebb változóknak a szelektivitás növelése és a felbontás optimalizálása tekintetében mAb-ok szimultán pH- és sógradienst alkalmazó elválasztása esetében. A sókoncentráció szelektivitásra és elúciós sorrendre gyakorolt hatását daratumumab, obinutuzumab és rituximab esetében a $t_G = 24$ perc, $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$, $c_{s1} = 20$ mM, $c_{s2} = 60$ mM, $c_{s3} = 100$ mM paraméterek alkalmazása mellett 19. ábra szemlélteti. Kis sókoncentráció ((19.a) ábra) esetén a daratumumab (1. csúcs) eluálódott elsőként, majd az obinutuzumab (2. csúcs) követte, míg a sókoncentráció növelésével ((a 19.b) ábra) a két csúcs koelúciója figyelhető meg, végül nagy sókoncentrációknál a két csúcs elúciós sorrendje megváltozott ((19.c) ábra).

A szükséges számú körülmény meghatározását követően vizsgáltam az emésztett cetuximab és daratumumab alegységeinek elválasztását. A módszer optimalizáláshoz 6 kezdeti mérésből indultam ki, amelyeket a 20. ábra szemléltet. A hat mérés során a gradiens

(a) $c_{s1} = 20\text{mM}$ (b) $c_{s1} = 60\text{mM}$ (c) $c_{s1} = 100\text{mM}$

19. ábra. A sókoncentráció hatása a szelektivitásra és az intakt mAb-ok elúciós sorrendjére a YMC BioPro SP-F ($100 \times 4,6\text{mm}$, $5\mu\text{m}$) oszlopon $c_{s1}=20\text{mM}$ (a), $c_{s2}=60\text{mM}$ (b), $c_{s3}=100\text{mM}$ (c) esetében. Csúcsok: daratumumab (1), obinutuzumab (2) és rituximab (3).



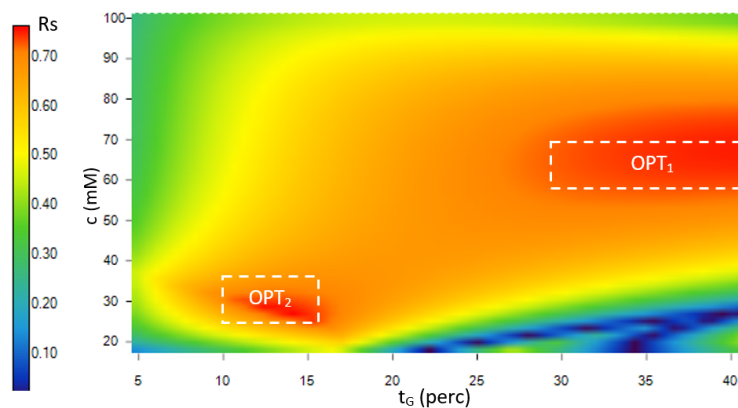
20. ábra. A módszeroptimalizálás során alkalmazott hat kezdeti paraméter.

időt 2 szinten ($t_{G1} = 8$ perc és $t_{G2} = 24$ perc), míg a sókoncentrációt 3 szinten ($c_{s1} = 20$ mM, $c_{s2} = 60$ mM és $c_{s3} = 100$ mM) változtattam. Az így kapott eredményekből a (6) egyenlet alapján számítottam ki a felbontástérképet az LSS retenciós modell felhasználásával, ahol az alkalmazott modell paramétereit a kezdeti kísérletekből illesztéssel határoztam meg. A felbontástérkép segítségével az elválasztandó csúcsok kritikus felbontása optimalizálható és további mérésekkel ellenőrizhető.

A kidolgozott általános körülményekkel a legtöbb terápiás fehérje és alegysége eluálható, még a savas antitestek (pl. panitumumab) is. Ezeket a beállításokat használva a mAb-ok elúciós sorrendje várhatóan megegyezik a pI értékeik szerinti sorrendjükkel. Továbbá, az enyhe sógradiensnek köszönhetően csúcsfókuszálás figyelhető meg, így mind savas, mind bázikus mAb-ok esetében keskeny csúcsok tapasztalhatók (pH-gradiens esetén ez nem figyelhető meg [97]). A meghatározott optimális paraméterek elválasztásra gyakorolt hatását daratumumab és cetuximab $F(ab')_2$ és Fc alegységeinek, illetve töltésvariánsai esetében vizsgáltam. A mérések során az A-eluens 90 % 20mM MES-t és 10 % 20mM DAP-t, míg a B-eluens 30 % 20 mM MES-t és 70 % 20 mM DAP-t, valamint különböző koncentrációkban NaCl-ot tartalmazott, így a pH $\sim 5,6$ és $\sim 9,9$ között változott. A mérések során 0,8 mL/perc térfogatáramot és 25 °C oszlophőmérsékletet alkalmaztam. Az injektálási térfogat daratumumab esetében 1 μ L, cetuximab esetében 2 μ L volt.

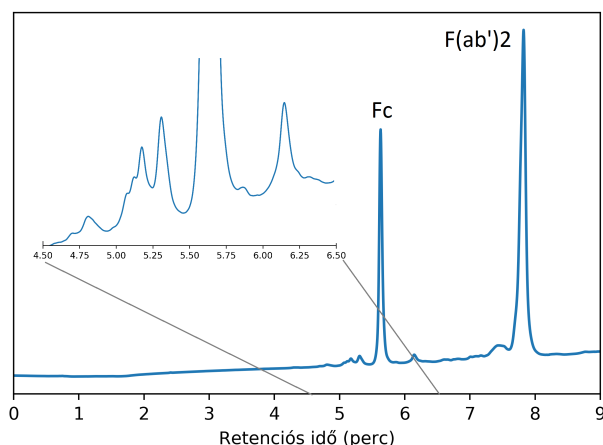
Daratumumab alegységek és töltésvariánsainak elválasztása

A hat kezdeti mérésre alapozva kétdimenziós felbontástérkép vehető fel (21. ábra), amin a meleg színek (piros) azokat a körülményeket jelölik, ahol nagy felbontás érhető el, míg a hideg színek (kék) esetén gyenge felbontás vagy koelúció figyelhető meg. Ennek megfelelően két ígéretes tartomány jelölhető ki: az egyik ~ 60 mM sókoncentráció és >30 perc gradiens időnél (OPT_1), míg a másik ~ 30 mM sókoncentrációnál és 10 perc $\leq t_G \leq 15$ perc gradiens időnél (OPT_2).



21. ábra. Kétdimenziós felbontástérkép ($t_G \times c_s$) daratumumab alegységek elválasztására a YMC BioPro SP-F oszlopon MES/DAP szimultán pH- és sógradiens alkalmazásával. Az optimális körülményeknek megfelelő munkaterületeket az OPT_1 és OPT_2 tartományok jelölik.

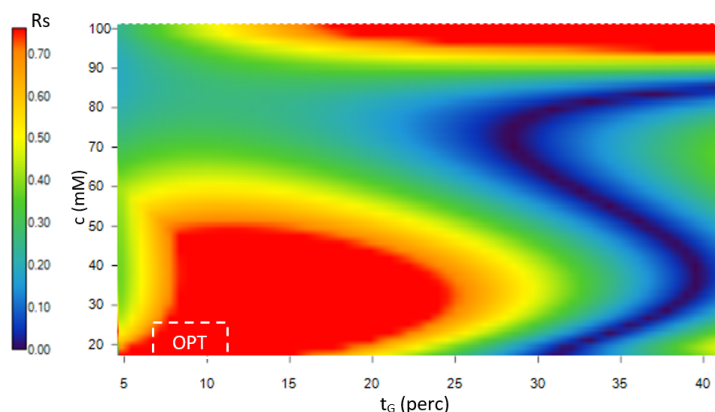
A 22. ábra a részlegesen emésztett daratumumab alegységek kromatogramját mutatja az optimalizált körülményeken (OPT_2 : $t_G = 13$ perc, $c_s = 30$ mM). A szimultán pH- és sógradiens előnye a szimmetrikus, éles csúcsokban nyilvánul meg. A gyakorlati csúcskapacitás (n_c , (14) egyenlet) 83-nak adódott (a $t_G - t_0$ elúciós ablakban), ami összemérhető a fordított fázisú elválasztások során elérhető értékkel. Kijelenthető, hogy a MES/DAP pufferrendszer szimultán pH- és sógradiens módban megfelelő elválasztást biztosít a monoklonális antitestek meghatározása során.



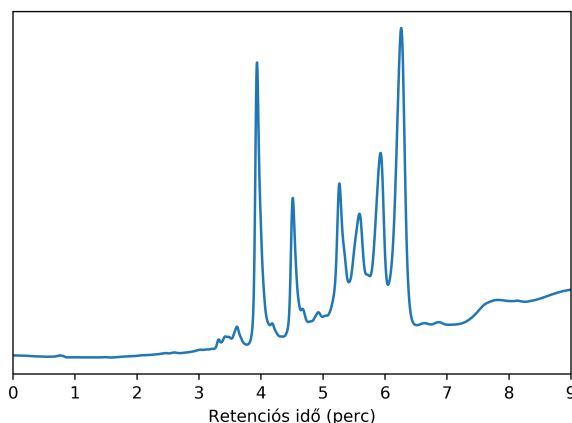
22. ábra. Emésztett daratumumab kromatogramja a MES/DAP pH- és sógradiens rendszer optimalizált körülményei között (OPT_2) a YMC BioPro SP-F oszlopon. A-eluens: 90 % 20 mM MES + 10 % 20 mM DAP, B-eluens: 30 % 20 mM MES + 70 % 20 mM DAP + 30 mM NaCl

Cetuximab alegységek és variánsainak elválasztása

Az előzőekhez hasonlóan cetuximab esetében is felépítettem a kétdimenziós felbontástérképet hat kezdeti mérésre alapozva (23. ábra). Az ábráról leolvasható, hogy az optimális elválasztáshoz kis sókoncentráció, valamint rövid analízisidő (kis t_G) társítható. Fontos kiemelni, hogy nagy sókoncentrációnál is éles csúcsok jelentkeznek, de a szelektivitás rosszabb, mint a kisebb értékeknél. Különböző kezdeti és végső mozgófázis összetételeket szimulációval vizsgáltam a DryLab szoftver segítségével ($c_s = 20$ mM és $t_G = 8$ perc), majd a legígéretesebbeket vizsgáltam kromatográfiás elválasztásokban. Az optimalizálási folyamat során az emésztett cetuximab csúcsai közül csak a hat legintenzívebbet vettem figyelembe. A kezdeti B összetétel 15 % fölé történő emelése nem jár további előnyökkel, ugyanakkor a végső összetétel 70 % alá történő csökkentésével az utoljára eluálódó csúcsok szelektivitása csökken. Megfelelő elválasztás érhető el 20 mM NaCl-koncentráció és 8 perces gradiens alkalmazásával 15-70%B gradiens programmal (*OPT*). A 24. ábra az ezekkel a paraméterekkel elérhető kromatogramot mutatja be. A hat fő töltésvariáns mellett néhány kevésbé jelentős forma is elválasztható. A retenciós idő becslésének átlagos hibája 5 % körülinek adódott.



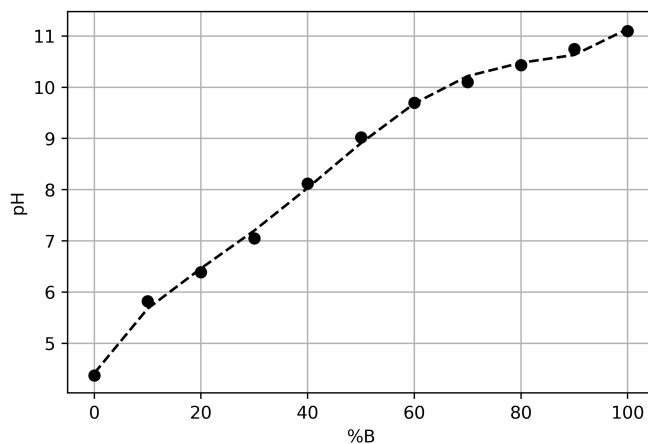
23. ábra. Kétdimenziós felbontástérkép ($t_G \times c_s$) cetuximab alegységek elválasztására a YMC BioPro SP-F oszlopon.



24. ábra. Emésztett cetuximab kromatogramja optimalizált körülmények között (*OPT*).

3.1.4. Gradiens program tervezése lineáris pH-válasz kialakításához

Ioncsere-kromatográfia során az ideálisnak tartott mozgófázis-rendszer lineáris pH-választ biztosít. Az általam vizsgált eluensek közül a MES/DAP és a citromsav/CHES + NaOH esetében az empirikus pH-válaszok ismeretében lineáris pH-választ nyújtó gradiens programot dolgoztam ki. A MES/DAP rendszer összetétel-pH görbéjére (25. ábra) polinom illesztéssel kapott egyenletből kiszámítható az adott pH-k kialakításához szükséges eluens összetétel.

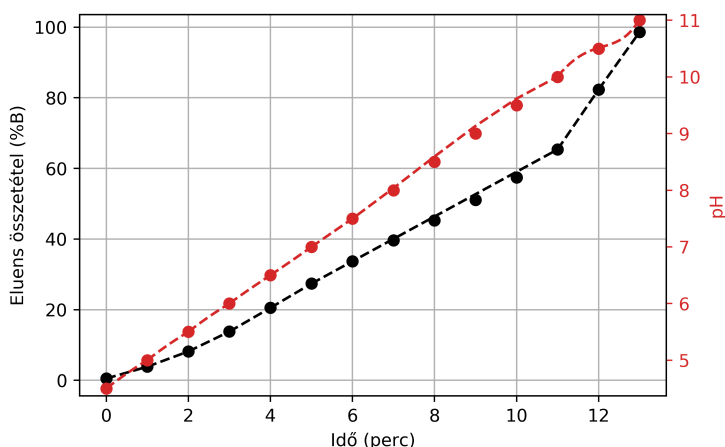


25. ábra. A MES/DAP eluens rendszer pH-válasza az összetétel függvényében (pontok) és a pontokra illesztett ötödfokú polinom (szaggatott vonal).

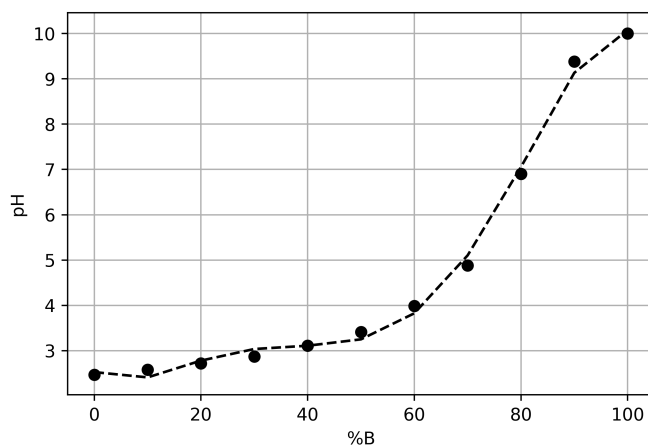
Az illesztett ötödfokú polinom egyenlete:

$$y = 8,157 \cdot 10^{-9}x^5 - 2,018 \cdot 10^{-6}x^4 + 1721 \cdot 10^{-4}x^3 - 6,251 \cdot 10^{-3}x^2 + 0,1734x + 4,415 \quad (22)$$

A (22) egyenletet felhasználva a $4,5 \leq pH \leq 11$ tartományban 0,5 pH-egységenként



26. ábra. Lineáris pH-gradiens kialakításához szükséges eluens összetételek az idő függvényében (fekete pont) és az egyes összetételekhez tartozó pH értékek (piros) a MES/DAP rendszer esetében.



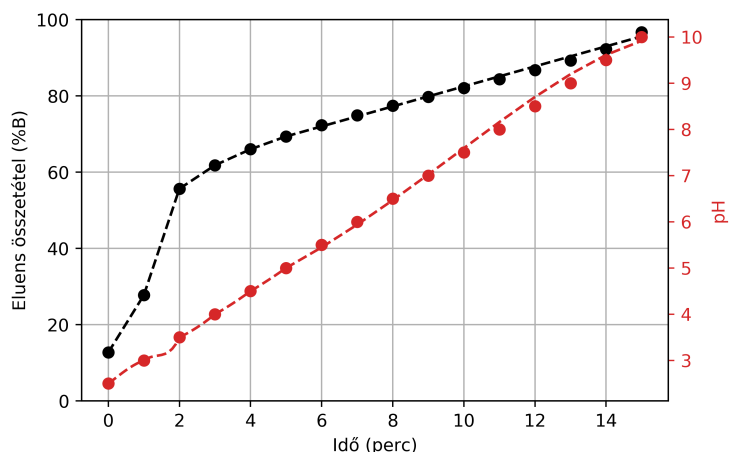
27. ábra. A citromsav/CHES + NaOH eluens rendszer pH-válasza az összetétel függvényében (pontok) és a pontokra illesztett polinom (szaggatott vonal).

kiszámíthatók az eluens összetételek, amikből 0-100 % B összetételig terjedő 13 perces gradiens program alakítható ki. A lineáris gradiens programot (eluens összetétel az idő függvényében), és az egyes időpontokhoz tartozó pH-t a 26. ábra mutatja be.

A citromsav/CHES + NaOH rendszer esetében hasonlóképpen jártunk el. A mért pH-válasz pontokra ötödfokú polinomot illesztettünk (27. ábra).

Az illesztett polinom egyenlete:

$$y = -1,736 \cdot 10^{-8}x^5 + 3,944 \cdot 10^{-6}x^4 - 2,933 \cdot 10^{-4}x^3 + 8,728 \cdot 10^{-3}x^2 - 7,333 \cdot 10^{-2}x + 2,527 \quad (23)$$



28. ábra. Lineáris pH-gradiens kialakításához szükséges eluens összetételek az idő függvényében (fekete pont) és az egyes összetételekhez tartozó pH értékek (piros) a citromsav/CHES + NaOH rendszer esetében.

A (23) egyenletet felhasználva $2,5 \leq pH \leq 10$ pH-tartományban 0,5 pH értékenként kiszámítottam az egyes pH értékekhez tartozó eluens összetételt, ami alapján egy 15 perces gradiens programot állítottam fel. A gradiens programban eltelt időkhöz tartozó eluens összetételt és pH-t a 28. ábra szemlélteti.

A 26. és a 28. ábrákon látható, hogy az így kialakított módszerrel lineáris pH-választ eredményező gradiens program alakítható ki. A módszer elvileg bármelyik pufferrendszerre alkalmazható, ennek igazolása további vizsgálatokat igényel.

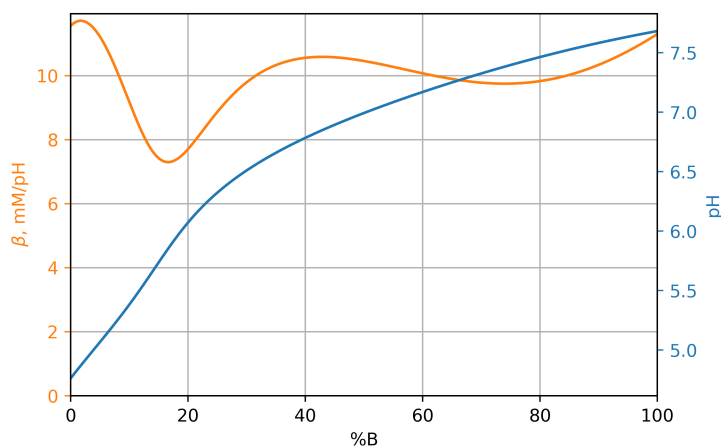
3.2. Illékony pufferrendszer az MS detektáláshoz

A monoklonális antitestek karakterizálása gyakran tömegspektrometriás csúcsazonosítást igényel. Az ioncsere-kromatográfia során használt hagyományos pH- és sógradiens módszerek mozgófázisai azonban nem kompatibilisek az MS detektálással. Ammónium-acetát és ammónium-karbonát alapú mozgófázis rendszereket a közelmúltban alkalmaztak IEX-MS mérésekhez, de az eluens összetételének csúcsalakra és retencióra gyakorolt hatásának szisztematikus vizsgálatát nem tanulmányozták [116]. Munkám ezen részének célja az ionerősség, pufferkapacitás és pH-válasz vizsgálata a retenciós tulajdonságok és a csúcsalak tekintetében.

3.2.1. Az optimális illékony puffer összetétel meghatározása mAb-ok elválasztásához

A szakirodalomban különböző eredményeket olvashatunk a pH, ionerősség, pufferkapacitás és vezetőképesség-válasz vizsgálatára néhány illékony mozgófázis (pl. ammónium-acetátot, ecetsavat, ammónium-bikarbonátot és ammónium-hidroxidot tartalmazó rendszerek) módszerfejlesztése kapcsán. A méréseket megelőzően *insilico* számításokat végeztem

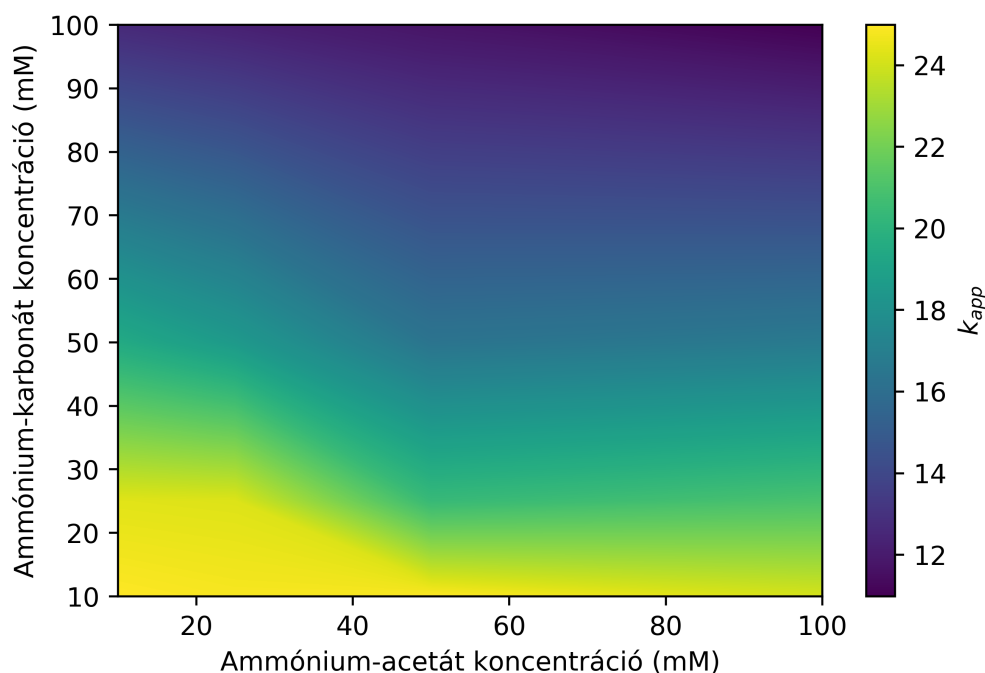
az ammónium-acetát, ecetsav és ammónium-karbonát tartalmú rendszer pufferkapacitásának és pH-válaszának becslésére. A pufferkapacitás és a pH-válasz számolását minden puffer összetétel esetében a savas és bázikus alkotók anyag- és töltésmérlegének ((20) egyenlet) figyelembe vételével az általunk írt Python programmal végeztem. Számításaim során az A-eluens 10 mM ammónium-acetát és 10 mM ecetsav, a B-eluens 50 mM ammónium-acetát és 50 mM ammónium-karbonát volt. A B-eluens összetételének függvényében kapott pH-válasz és pufferkapacitás görbék a 29. ábrán láthatók. A pH-válasz egy kisebb törésponttól eltekintve közel lineárisnak tekinthető, míg a pufferkapacitás csak 20 % B-eluens összetételnél csökken le némileg, ettől eltekintve közel állandónak mondható. Ezek alapján az ammónium-acetát/ammónium-karbonát megfelelő mozgófázis rendszernek bizonyul a pH-gradiens elválasztásokhoz.



29. ábra. Az ammónium-acetát/ammónium-karbonát rendszer pH-válasza (kék) és pufferkapacitása (narancssárga) a B-eluens összetételének függvényében.

A továbbiakban az A-eluens összetételének állandósága mellett (10 mM ammónium-acetát és 10 mM ecetsav) a B-eluensben az ammónium-acetát és az ammónium-karbonát koncentrációját 10 mM és 100 mM tartományban változtattam. Az így kialakított 16 puffer összetétellel kapott retenciót, szelektivitást és csúcsalakot három intakt mAb (bevacizumab, daratumumab és rituximab) injektálásával vizsgáltam. A méréseket az 50×2 mm Thermo ProPac Elite WCX gyenge kationcserélő oszlopon végeztem. Átfogó gradiens programot alkalmaztam (0-100 % B) 10 perces gradiens idő mellett. Az ionerősség retencióra gyakorolt hatásának jellemzéséhez a bevacizumab látszólagos retenciós tényezőjét (k_{app}) a B-eluens ammónium-acetát és ammónium-karbonát koncentrációja függvényében ábrázoltam (30. ábra) a gradiens késési idő figyelembe vételével.

A várakozásoknak megfelelően az ammónium-karbonát koncentrációja jobban befolyásolja a retenciót, mint az ammónium-acetáté. A karbonát (CO_3^{2-}) kétszer annyi, ellenionként viselkedő ammónium-iont tartalmaz, mint az acetát (CH_3COO^-). Például a 10 mM ammónium-acetát és 100 mM ammónium-karbonát összetételű B-eluens esetében



30. ábra. A bevacizumab látszólagos retenciós tényezője a B-eluens ammónium-acetát és az ammónium-karbonát koncentrációjának függvényében.

a $k_{app}=12,6$, míg 100 mM ammónium-acetát és 10 mM ammónium-karbonát összetételnél csaknem kétszer akkora, $k_{app}=24,1$ értéket kapunk. Ugyanakkor az ammónium-karbonát szükséges a kellően magas pH eléréséhez, az ammónium-acetát pedig a közel lineáris pH-válaszért és a megfelelően magas pufferkapacitásért felelős.

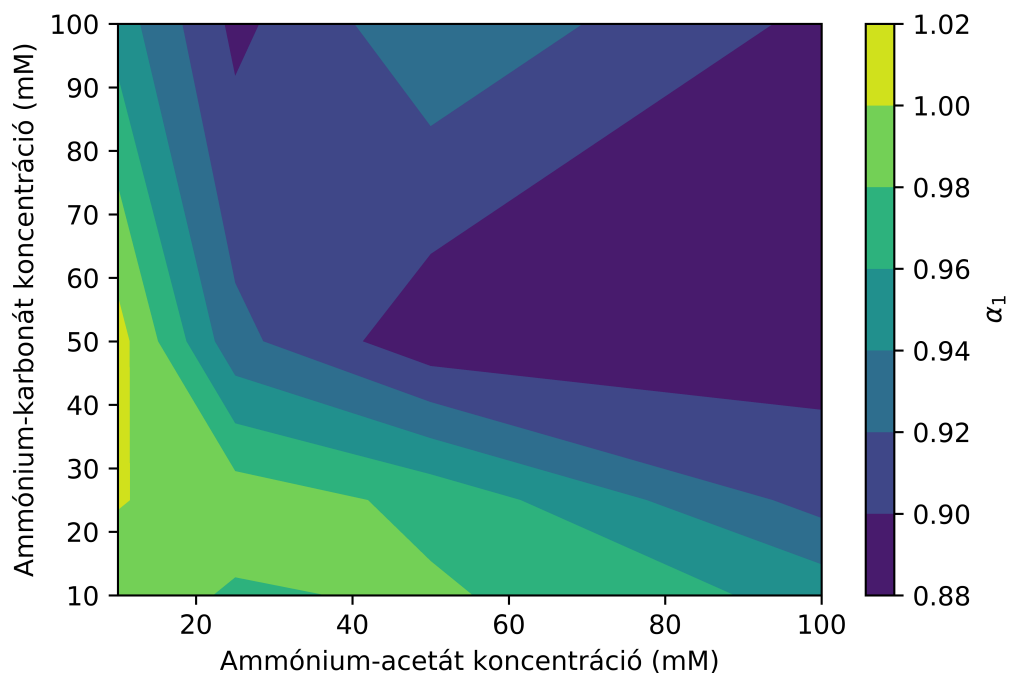
A retenciós idők (Isd. Függelék 2. táblázat) alapján kiszámítottam a bevacizumab-daratumumab és a daratumumab-rituximab párok szelektivitását az alábbi egyenleteknek megfelelően, majd ábrázoltam őket a B-eluens összetételének függvényében (31. és 32. ábra)

$$\alpha_1 = \frac{t_{daratumumab} - t_0}{t_0} / \frac{t_{bevacizumab} - t_0}{t_0} \quad (24)$$

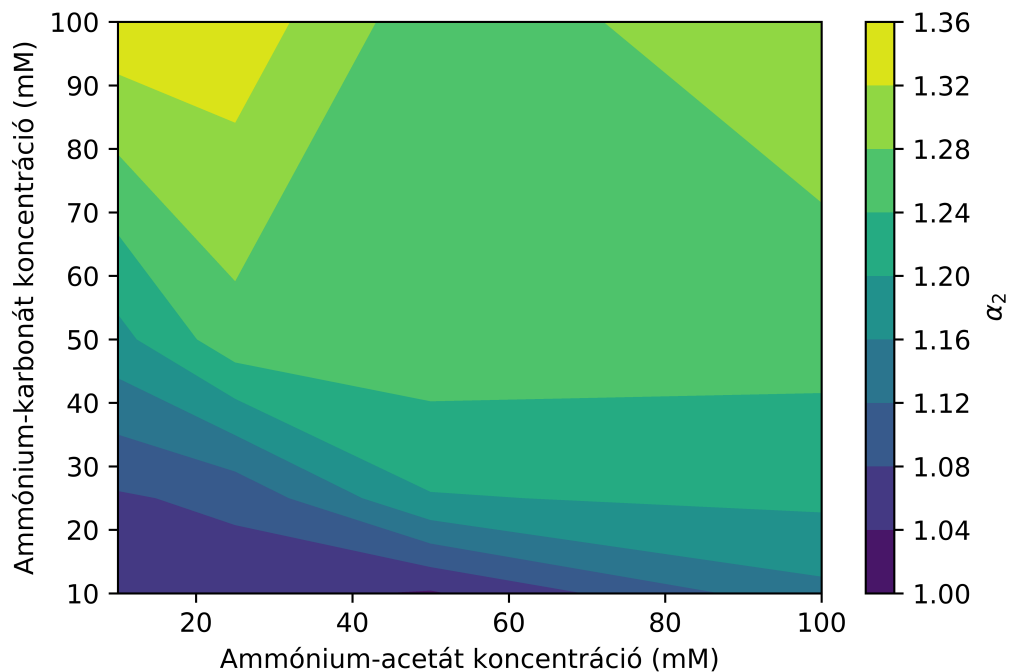
$$\alpha_2 = \frac{t_{rituximab} - t_0}{t_0} / \frac{t_{daratumumab} - t_0}{t_0} \quad (25)$$

A 31. és 32. ábrák alapján megállapítható, hogy a bevacizumab és a daratumumab kisebb koncentráció tartományban választható el megfelelő szelektivitással, míg a daratumumab és a rituximab esetében a magasabb tartományok a kedvezőbbek. A szelektivitást az ammónium-karbonát koncentráció mindkét antitest pár esetében jobban befolyásolja, mint az ammónium-acetát koncentráció. A tömegspektrometria-kompatibilitás érdekében az ionkoncentrációt érdemes minél alacsonyabb értéknek megválasztani.

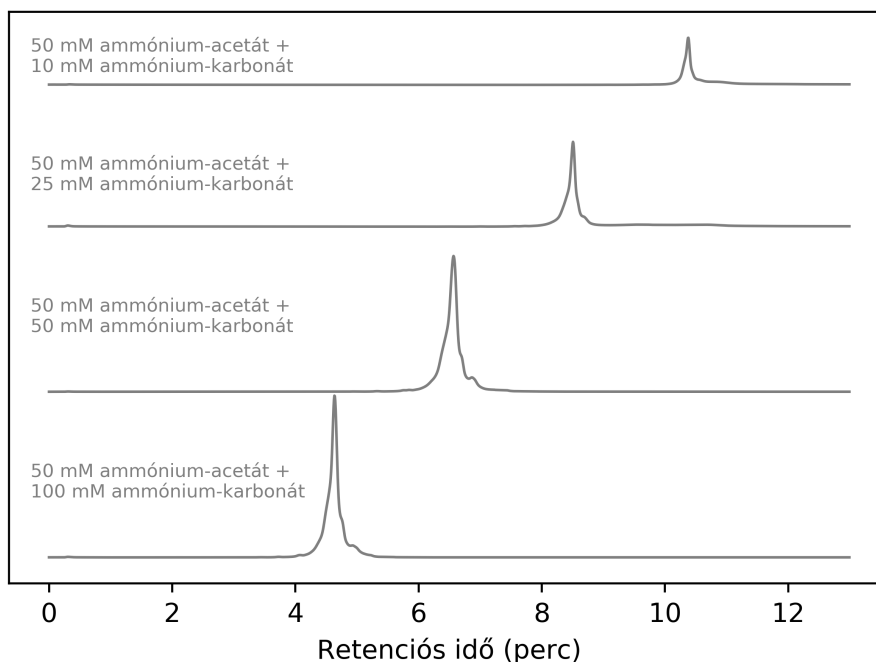
Az ammónium-karbonát csúcsfókuszáló hatásának köszönhetően lehetőséget nyújt a



31. ábra. A bevacizumab és a daratumumab elválasztási szelektivitása az ammónium-acetát és az ammónium-karbonát koncentráció függvényében.



32. ábra. A daratumumab és a rituximab elválasztási szelektivitása az ammónium-acetát és az ammónium-karbonát koncentráció függvényében.

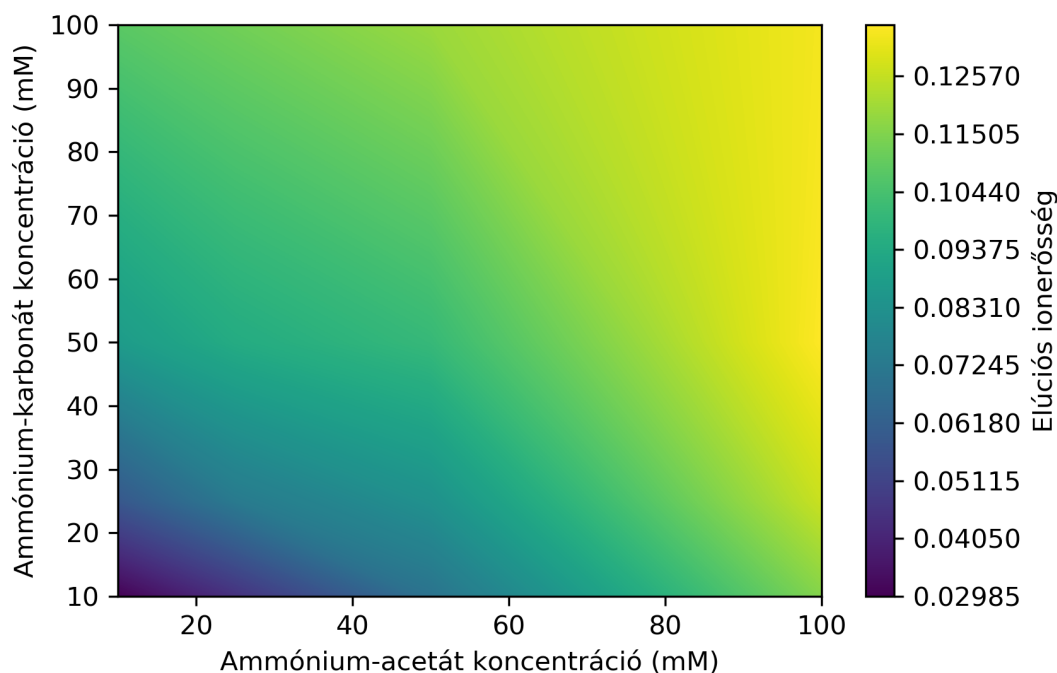


33. ábra. A bevacizumab kationcsere-kromatogramjai különböző összetételű B-eluens alkalmazásakor.

szelektivitás változtatására a szimultán pH- és sógradiens rendszerben. Az elúciót így két folyamat váltja ki: a komponens oszlopról történő leszorítása a sókoncentráció növelésével, valamint a fehérjék töltésének csökkentése a pH növelése által. Az ammónium-karbonát koncentráció retencióra gyakorolt hatását a 33. ábra kromatogramjai szemléltetik.

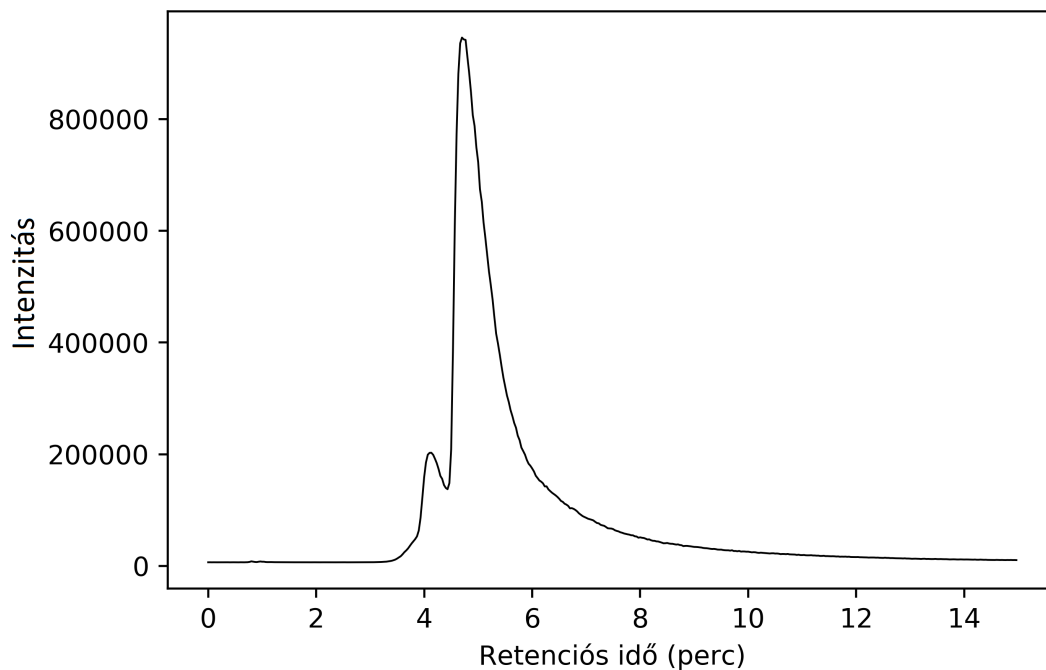
A 33. ábra alapján elmondható, hogy a sókoncentráció nem csak a retencióra, hanem a szelektivitásra és a csúcsterületre is hatással van. A B-eluensbe 10 mM ammónium-karbonátot rakva kis területű, éles csúcsot kapunk, mert a mozgófázis ionerőssége nem elég nagy a komponensek eluálásához (lásd 34. ábra). A fő csúcs mellett a savas és bázikus variánsok nem különböztethetők meg. A sókoncentráció növelésével a csúcs mérete (magassága és területe) nő, szép csúcsalakot kapunk, ami után bázikus komponensek találhatóak. A legjobb szelektivitást az 50 mM ammónium-acetát és 50 mM ammónium-karbonát tartalmú mozgófázissal érhető el.

A meghatározott optimális körülményeket felhasználva tömegspektrometriás méréseket végeztem. Erre a célra a készülékünk korlátozott érzékenysége ($<2000 m/z$) miatt inzulint használtam mintakomponensnek, ami detektálhatósága mellett alkalmas az esetleg keletkező, nagyfokú töltéssel rendelkező ionok kimutatására. A mérésekhez a Thermo ProPac Elite WCX 150×4 mm méretű oszlopot használtam. A gradiens program 10-100 % B között változott, az alkalmazott gradiens idő 10 perc volt. Az ezekkel a beállításokkal teljes ionáram módban kapott kromatogram (TIC) a 35. ábrán látható, a $t_R = 4,7$ percnél kapott tömegspektrum pedig a 36. ábrán.

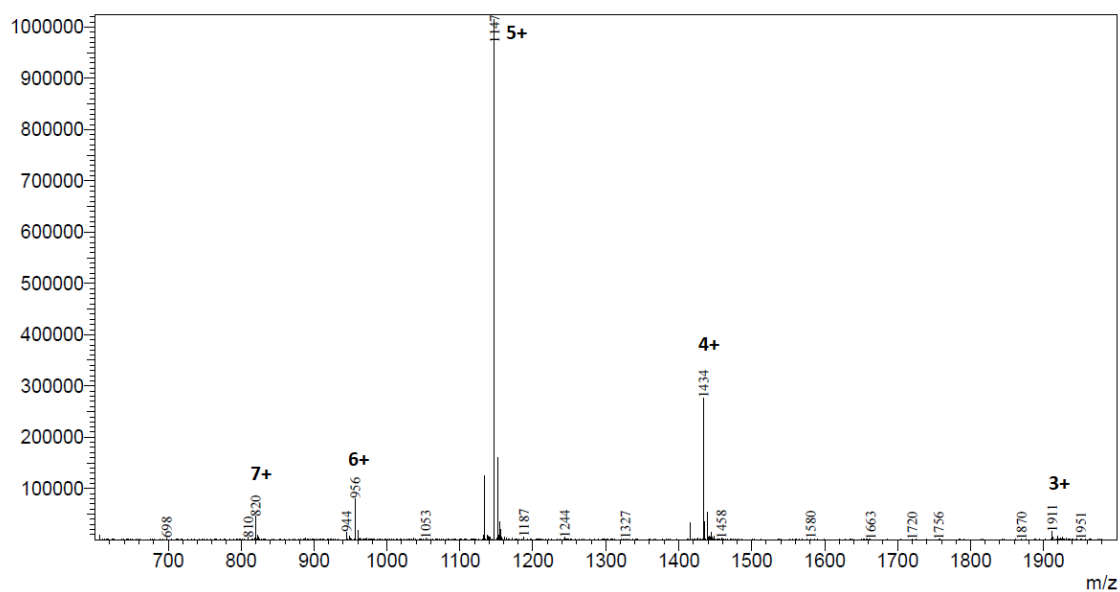


34. ábra. A bevacizumab különböző B-eluens összetételeknél mért elúciós ionerőssége.

Az inzulin móltömege ($M = 5733,49$ g/mol) és a tömegspektrum alapján látható, hogy a két legnagyobb intenzitású töltésállapot az inzulin [I] 4 és 5 hidrogénion felvételével keletkező $[I + 4 H]^{4+}$ az $m/z = 1434$ értéknél és $[I + 5 H]^{5+}$ az $m/z = 1147$ értéknél. Ezek mellett jelen van a 6 és 7 hidrogéniont hordozó $[I + 6 H]^{6+}$ az $m/z = 956$ értéknél és az $[I + 7 H]^{7+}$ az $m/z = 820$ értéknél, valamint kis intenzitással az $[I + 3 H]^{3+}$ az $m/z = 1911$ értéknél. A háromnál kevesebb töltést hordozó molekula detektálására a készülék érzékenysége miatt nincs lehetőség, hétnél nagyobb töltésű komponensek nincsenek jelen a tömegspektrumon. Ez alapján azt mondhatjuk, hogy az ammónium-karbonát tartalmú eluens nem okozza a nagyszámú töltésállapot kialakulását (szemben a bikarbonátot tartalmazó rendszerrel [118]).



35. ábra. Az inzulin teljes ionáram detektálás módban kapott kromatogramja (TIC).



36. ábra. Az inzulin tömegspektruma $t_R = 4,7$ percnél.

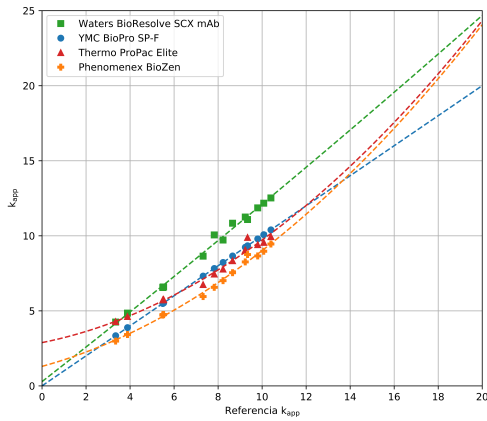
3.3. Állófázis tesztelés

A mozgófázisok vizsgálatát követően tanulmányoztam a legújabb kationcserés állófázisokat retenciós tulajdonságuk és hatékonyságuk tekintetében. A kereskedelmi forgalomban kapható kationcserélő oszlopok szilikagél vagy sűrűn keresztkött vinyl-aromás polimer szemcsék, amik felületén hidrofil polimer réteg található. A szemcsék nem porózusak, így az anyagátadási folyamatok miatt kialakuló sávszélesedés kiküszöbölhető, valamint a hidrofil réteg által a fehérjék kizárhatók az állófázis felületi rétegéből (a másodlagos kölcsönhatások minimalizálhatók). A 2015-ben forgalomban levő oszlopok tulajdonságait Fekete és mtsai tanulmányozták [10]. 2018-2019-ben három oszlop jelent meg a piacon (BioZen WCX, ProPac Elite WCX és BioResolve SCX mAb), melyek tulajdonságait a mozgófázis fejlesztéshez használt, jól bevált BioPro SP-F oszlopéval vetettem össze. Az oszlopok tulajdonságait a 4. táblázat tartalmazza. Eluensként a Thermo CX-1, Waters BioResolve CX és az általam kidolgozott MES/DAP pufferrendszereket választottam, és vizsgáltam nyolc intakt mAb és három IdeS emésztett mAb alegységeinek retencióját széles pI-tartományban.

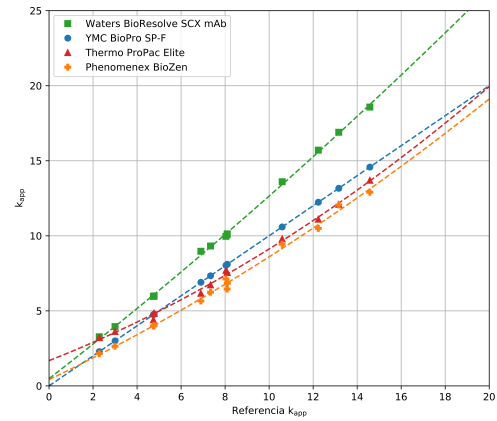
3.3.1. A retenciós tulajdonságok vizsgálata

Az egyes oszlopok visszatartásának tanulmányozásához meghatároztam a vizsgálat antitestek látszólagos retenciós tényezőjét (k_{app}) az egyes oszlopokon és összehasonlítottam a BioPro SP-F oszlopon kapottakkal. Így az oszlopok típusa (erős vagy gyenge kationcserélő) összefüggésbe hozható a mAb-ok és alegységeinek megkötődésével, valamint lehetőség adódik az oszlopok közvetlen összehasonlítására.

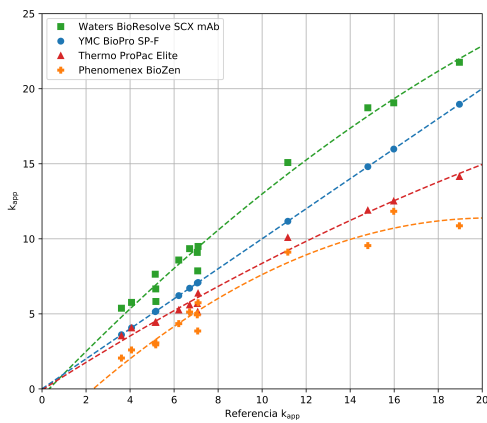
A 37. ábra alapján elmondható, hogy a vizsgált oszlopok közül az erős kationcserélő BioResolve SCX mAb mutatja a legnagyobb visszatartást mind a négy pufferrendszerrel, a gyenge kationcserélő BioZen és ProPac Elite WCX oszlopok visszatartása a referencia oszlopénál kisebb. A tendencia összefüggésbe hozható a szemcsemérettel is. Ugyan mindegyik oszlop nem porózus szemcséket tartalmaz, a legkisebb szemcsékkel ($3 \mu\text{m}$) töltött BioResolve SCX mAb nagyobb fajlagos felülettel rendelkezik, amint az azt követő YMC BioPro SP-F és Thermo ProPac Elite WCX ($5 \mu\text{m}$). A legkisebb retenció a legnagyobb szemcséket ($6 \mu\text{m}$) tartalmazó BioZen oszlopon figyelhető meg. A gömb fajlagos felülete fordítottan arányos a gömb sugarával ($A_{s,gmb} = 3/r_{gmb}$), így a $6 \mu\text{m}$ szemcsék fajlagos felülete a $5/3$ -szor nagyobb, mint az $5 \mu\text{m}$ nagyságú szemcséké. Az oszlopok felülete és a komponensek retenciója fordítottan arányos az oszlop teljes porozitásával [133]. Ennek megfelelően a legnagyobb szemcsével töltött BioZen oszlop porozitása a legnagyobb, és ezen tapasztalható a legkisebb retenció is. Ha azonos visszatartást szeretnénk elérni a különböző kolonnákon, akkor a kis retenciójú oszlopok esetében érdemes a mozgófázis erősségét (pH vagy sótartalom) növelni, nagy retenció esetén pedig csökkenteni.



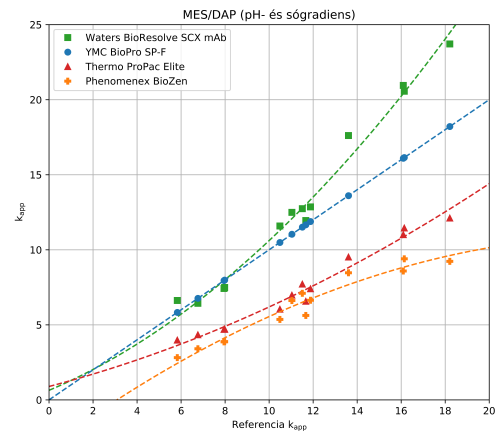
(a) Klasszikus sógradiens



(b) Thermo CX-1 pH-gradiens



(c) BioResolve CX pH-gradiens



(d) MES/DAP pH- és sógradiens

37. ábra. A terápiás mAb-ok látszólagos retenciószámának összehasonlítása sógradiens (a), pH-gradiens (b, c) és MES/DAP szimultán pH- és sógradiens (d) alkalmazásával.

A YMC BioPro SP-F oszlopot alapul véve meghatároztam a relatív retenció (rr) értékeket a 14 csúcsra kapott látszólagos retenciók átlagolásával. Az így kapott rr értékeket a 6. táblázat tartalmazza. A sógradiens és a Thermo CX-1 puffer hasonló relatív retenciót ad az egyes oszlopokkal. A BioResolve CX és a MES/DAP rendszer esetében jelentős csökkenés figyelhető meg az rr értékekben, különösen a BioZen és a ProPac oszlopokon. Ebből is adódik, hogy módszerfejlesztéskor az álló- és mozgófázist együtt kell figyelembe venni.

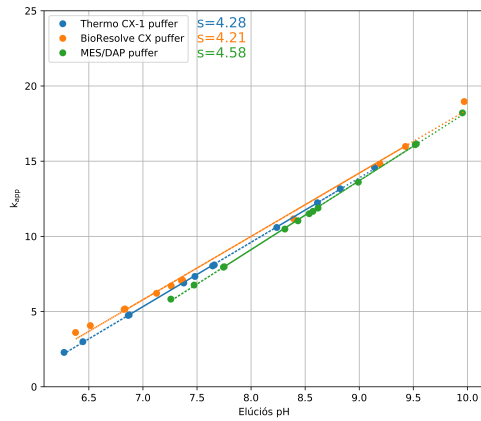
6. táblázat. A vizsgált oszlopok relatív retenciója a referencia oszlophoz viszonyítva.

Oszlop	Sógradiens	Thermo CX-1	BioResolve CX	MES/DAP
BioZen	0.88	0.87	0.67	0.54
ProPac Elite WCX	1.00	0.95	0.83	0.64
BioResolve SCX mAb	1.21	1.27	1.32	1.14

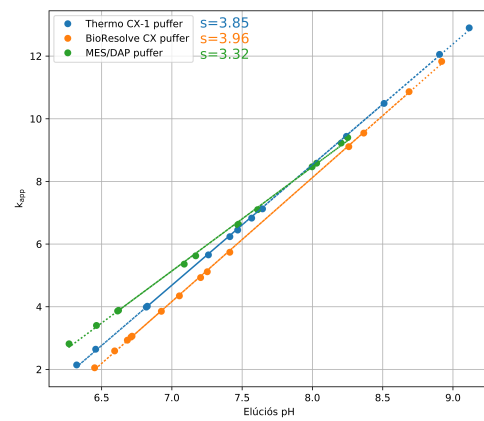
3.3.2. A relatív szelektivitás vizsgálata

Az oszlopok relatív szelektivitását vizsgálhatjuk, ha a látszólagos retenciós tényezőket a mAb-ok elúciójakor mérhető mozgófázis pH függvényében (elúciós pH) ábrázoljuk. Az elúciós pH-t az előzetesen felvett eluens összetétel szerinti pH-válaszokból határoztam meg. Az alkalmazott gradiens idő és gradiens program ismeretében az összetétel szerinti változás átszámítható időbeli változásra. Az így kapott pH vs. idő görbékre illesztett másodfokú egyenlet segítségével az adott retenciós időkhöz tartozó elúciós pH kiszámítható. A látszólagos retenciós tényezők az elúciós pH függvényében a 38. ábrán láthatók. A görbékre illesztett lineáris trendvonal meredeksége (s) az egységnyi pH-változásra jutó retenciós ablakot jelenti, így nagyobb s értékek nagyobb szelektivitásra, felbontásra és szélesebb retenciós ablakra utalnak.

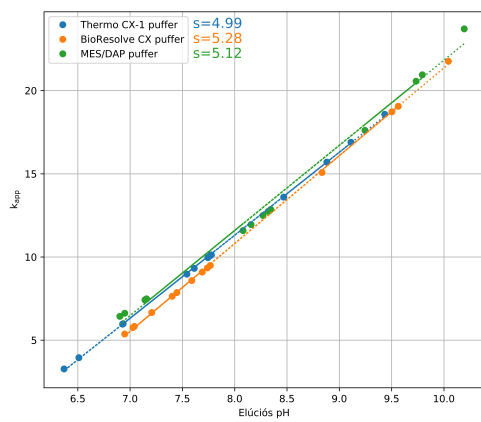
Megállapítható, hogy általános lineáris gradiensprogram alkalmazásakor a legnagyobb s értékek a BioResolve oszlopon érhetők el. A MES/DAP rendszer a legkorábban eluálódó csúcsok esetén is viszonylag nagy retenciót mutat, ami a kis kezdeti ionerősséggel magyarázható.



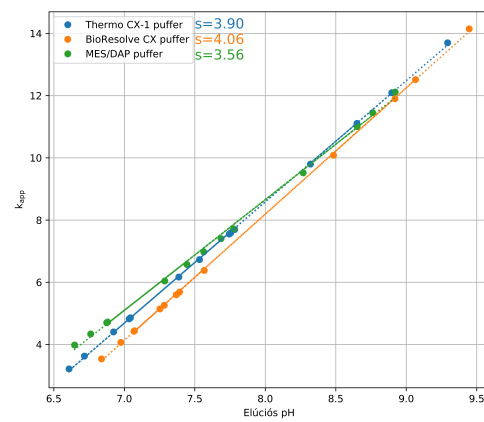
(a) YMC BioPro SP-F



(b) Phenomenex BioZen

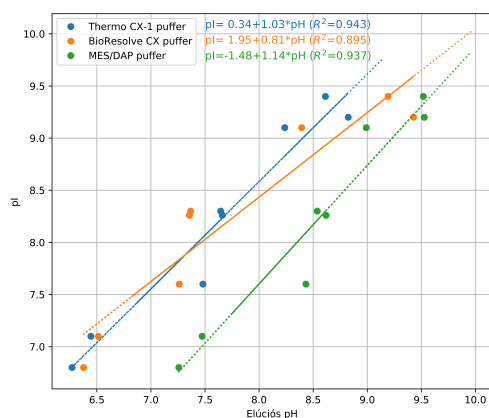


(c) Waters BioResolve SCX mAb

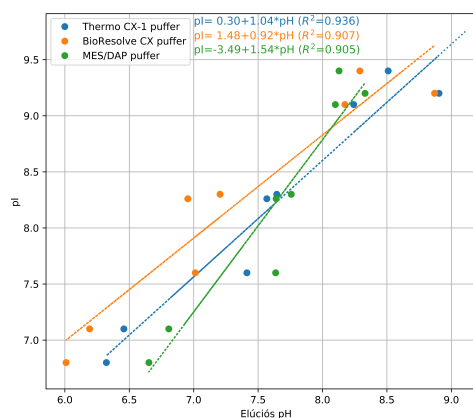


(d) Thermo ProPac Elite WCX

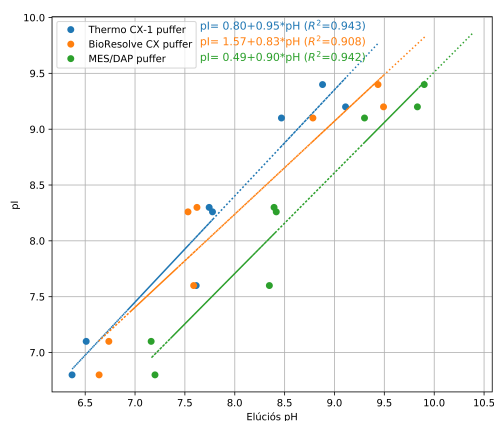
38. ábra. A látszólagos retenció tényező az elúciós pH függvényében különböző mozgófázisokkal (CX-1 (kék), BioResolve CX (narancssárga) és MES/DAP (zöld)) a YMC BioPro SP-F (a), Phenomenex BioZen (b), Waters BioResolve SCX mAb (c) és a Thermo ProPac Elite WCX (d) oszlopokon.



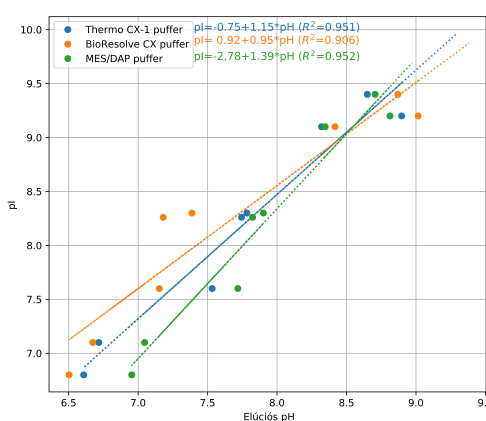
(a) YMC BioPro SP-F



(b) Phenomenex BioZen



(c) Waters BioResolve SCX mAb



(d) Thermo ProPac Elite WCX

39. ábra. A mAb-ok izoelektromos pontja (pI) az elúciós pH függvényében különböző mozgófázisokkal (CX-1 (kék), BioResolve CX (narancssárga) és MES/DAP (zöld)) a YMC BioPro SP-F (a), Phenomenex BioZen (b), Waters BioResolve SCX mAb (c) és a Thermo ProPac Elite WCX (d) oszlopokon.

3.3.3. Az elúciós pH kapcsolata az izoelektromos ponttal

Ahogy előzőleg már említettem, a kapilláris elektroforézissel meghatározott izoelektromos pont szerinti sorrend nem felel meg a kationcsere-kromatográfiával kapott elúciós sorrendnek. A kationcsere-kromatográfia relatív pI meghatározáshoz való alkalmazhatóságát a mAb-ok nominális pI-jének elúciós pH függvényében történő ábrázolásával vizsgálhatjuk. Az elúciós pH és a mAb-ok pI értékei közötti korrelációt mutatja a 39. ábra.

Az ideális viselkedés akkor valósulna meg, ha pontosra illesztett egyenesek meredeksége és az R^2 értéke 1, a tengelymetszeté pedig 0 lenne. A legjobb meredekség és R^2 a két gyenge kationcserélő oszlop, a BioZen és a ProPac Elite esetében érhető el ($s=1,04$, illetve $1,10$ és $R^2=0,856$, illetve $=0,898$), így ennél a két oszlopnál a tengelymetszetből ered a pI és az elúciós pH közti különbség. A jelenségből arra lehet következtetni, hogy az állófázis

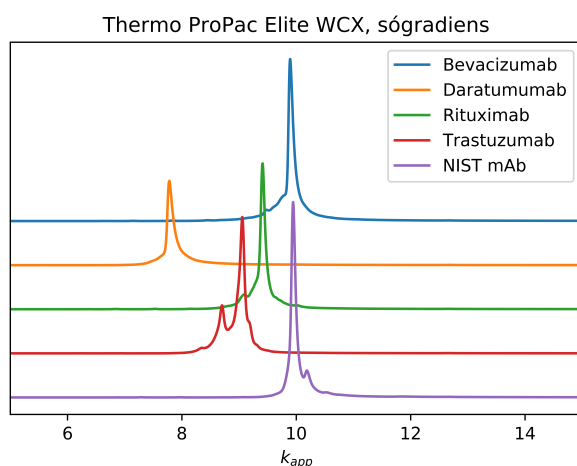
és a fehérjék között a mozgófázis pH-jától függetlenül állandó kölcsönhatások lépnek fel. Az erős kationcserélő oszlopok kisebb meredekséget és nagyobb tengelymetszetet mutatnak. A 0,80-as meredekség érték pH-függő kölcsönhatásokra és retencióra utal, amit a másodlagos kölcsönhatások befolyásolhatnak, hiszen az erős kationcserélő csoportok széles pH-tartományban megtartják negatív töltésüket.

Az egyes oszlopokat megvizsgáltam úgy is, hogy nem mozgófázisonként, hanem az összes pontra együtt illesztettem egyenest. Az illesztési paramétereket a 7. táblázat tartalmazza.

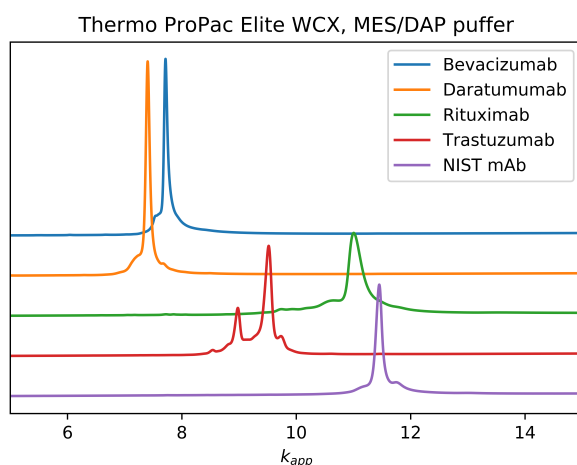
7. táblázat. Az összes mérési pontot magába foglaló egyenes illesztés paraméterei a különböző oszlopok esetében.

Oszlop	Tengelymetszet	Meredekség	R ²
YMC BioPro SP-F	1.70	0.80	0.754
Phenomenex BioZen WCX	0.38	1.04	0.856
Waters BioResolve SCX mAb	1.70	0.80	0.835
Thermo ProPac Elite WCX	-0.32	1.10	0.898

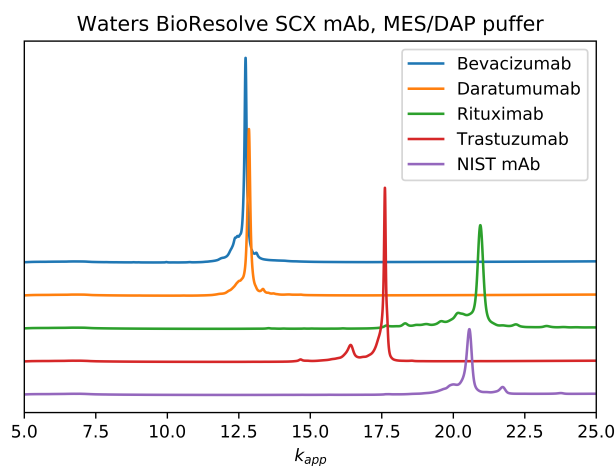
Az álló- és mozgófázis együttes figyelembe vételének fontosságát a 40. ábrán látható kromatogramok mutatják. Öt intakt antitest (daratumumab, bevacizumab, trastuzumab, NIST mAb és rituximab) kromatogramja látható ugyanazon az oszlopon (Thermo ProPac Elite WCX) különböző eluensekkel: klasszikus sógradiens (a) és MES/DAP szimultán pH- és sógradiens (b), valamint ugyanazzal az eluenssel (MES/DAP szimultán pH- és sógradiens) különböző oszlopokon (Thermo ProPac Elite WCX (b) és Waters BioResolve SCX mAb (c)). A 40.a) és b) ábra kromatogramjai a retenciós sorrendben és a retenciós ablak szélességében is lényegesen különböznek, bizonyítva, hogy az elúció módja és az eluens összetétele is befolyásolja a CEX elválasztásokat. A retenciós sorrend és szelektivitás változtatható akkor is, ha ugyanazt a mozgófázis különböző oszlopokkal kombináljuk (40.b) és c) ábra).



(a) ProPac Elite WCX - Klasszikus sógradiens



(b) ProPac Elite WCX - MES/DAP pH- és sógradiens

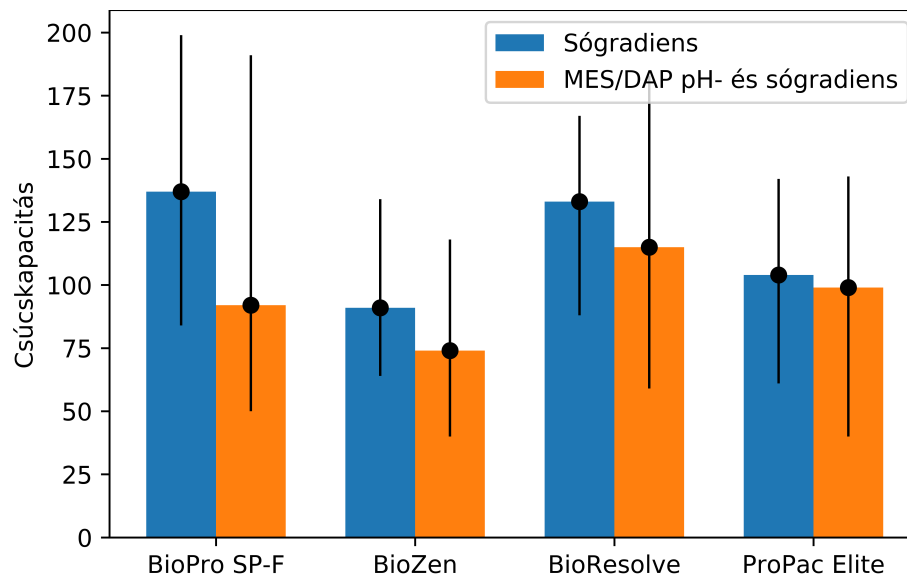


(c) BioResolve SCX mAb - MES/DAP pH- és sógradiens

40. ábra. Intakt mAb-ok kromatogramja a ProPac Elite WCX oszlopon sógradiens (a) és MES/DAP szimultán pH- és sógradiens módban (b), valamint a BioResolve SCX mAb oszlopon MES/DAP szimultán pH- és sógradiens módban (c).

3.3.4. Az állófázisok hatékonyságának összehasonlítása

A különböző oszlopokon a (14) egyenlet felhasználásával kapott átlagos csúcskapacitás értékeket az intakt és emésztett mAb-ok esetében a sógradiens és MES/DAP szimultán pH- és sógradiens alkalmazásával a 41. ábra mutatja be. A meghatározott értékeket a Függelék 3. táblázata tartalmazza. A csúcshatár meghatározását megnehezíti a csúcsok vállasodása, ami főleg a savasabb mAb-ok (pl. panitumumab, reslizumab) jelentős heterogenitása következtében a csúcsok részleges felbontása miatt jelentkezik. Az egyes mozgó- és állófázis párokon elért átlagos csúcskapacitás tekintetében elmondható, hogy a legnagyobb érték a két erős kationcserélő oszlop (BioPro SP-F és BioResolve SCX mAb) esetében érhető el. Ugyanakkor jelentős eltérések vannak az egyes mAb-ok esetében a különböző eluens-oszlop párokkal elérhető csúcskapacitásokban: a legnagyobb érték általában kb. kétszerese a legkisebb értéknek. Ennek oka lehet a mAb-ok fizikai-kémiai, valamint molekuláris tulajdonságainak és az oszloptöltetek egyedi geometriájának kapcsolata. Egyes esetekben relatív kis hatékonyság és csúcs megnyúlás (tailing) figyelhető meg, ami a nem kívánatos másodlagos kölcsönhatások jelenlétére utal. Mindezeket figyelembe véve megállapítható, hogy a csúcskapacitás nemcsak az álló- és a mozgófázistól függ, hanem az elválasztani kívánt komponensektől is.

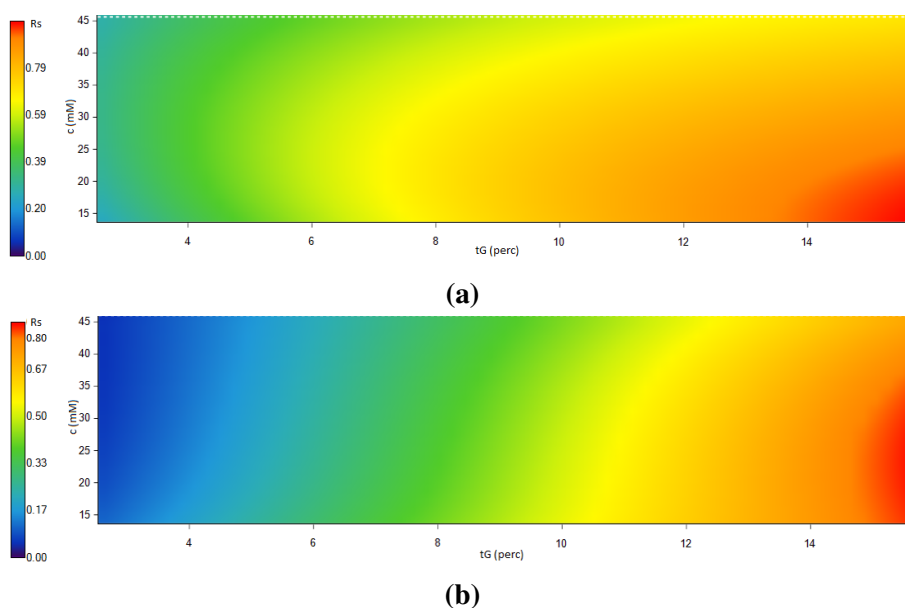


41. ábra. A különböző oszlopokon elérhető átlagos csúcskapacitás klasszikus sógradiens (kék) és MES/DAP szimultán pH- és sógradiens (narancssárga) alkalmazásával.

3.3.5. Töltésvariánsok gyors elválasztása rövid kationcserélő oszlopon

Az utóbbi időben kereskedelmi forgalomba kerülő rövid (50 mm) kationcserélő oszlopok alkalmasak gyógyszerészeti fejlesztésekben a töltésvariánsok meghatározására sógradiens és a Thermo CX-1 pH-gradiens puffer alkalmazásával [134]. A MES/DAP

mozgófázis rendszer optimális, gyors elválasztáshoz szükséges körülményeinek meghatározásához emésztett infliximab és NIST mAb mintákat vizsgáltam. Méréseimhez a Thermo ProPac Elite WCX (50×2 mm) oszlopot használtam, amin $0,3$ mL/perc térfogatáramot alkalmaztam. A MES/DAP rendszert szimultán pH- és sógradiens módban alkalmazva a gradiens időt két pontban ($t_{G1} = 4$ perc és $t_{G2} = 10$ perc), a sókoncentrációt három pontban ($c_{s1} = 15$ mM, $c_{s2} = 30$ mM és $c_{s3} = 45$ mM) vizsgáltam. A hat kezdeti mérésből felállított felbontástérkép alapján meghatároztam az intakt és emésztett infliximab és NIST mAb optimális elválasztási paramétereit. A felbontástérkép infliximab és NIST mAb alegységekre a 42.a és b ábrákon láthatók.

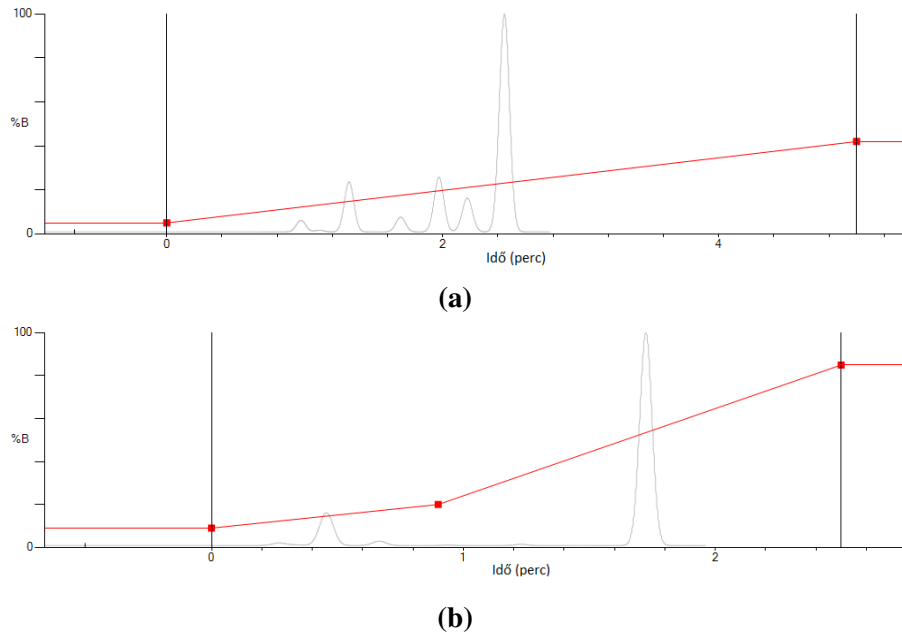


42. ábra. Emésztett infliximab (a) és NIST mAb (b) felbontástérképe két gradiens időn (4 és 10 perc) és három sókoncentráción (10, 30 és 45 mM) alapuló kezdeti mérésekből a ProPac Elite WCX 50×2 mm oszlopon.

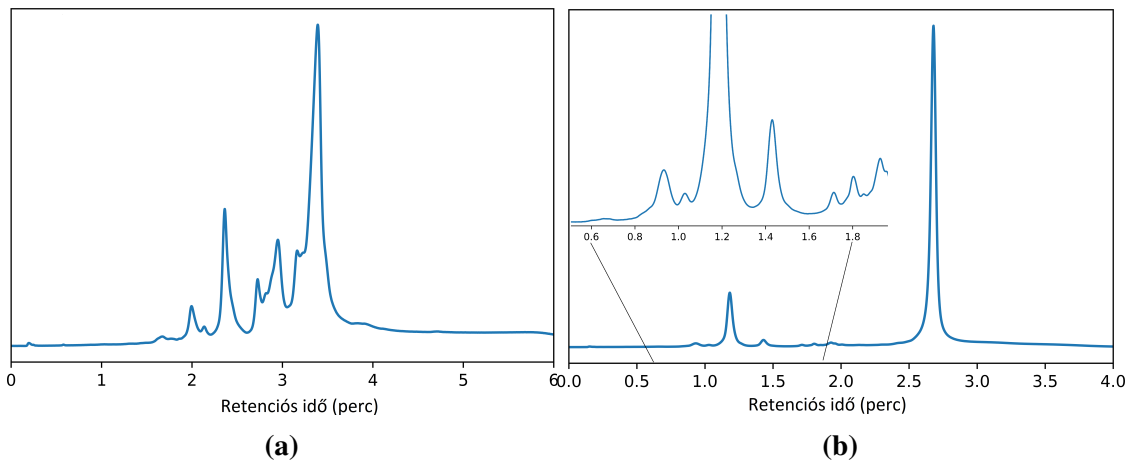
Az optimális elválasztási körülmények meghatározására a DryLab program lehetőséget nyújt, a gradiens program megtervezhető a kívánt elválasztás eléréséhez. A két emésztett mAb (influximab (a) és NIST mAb (b)) esetében beállított gradiens programot és a szoftver által jósolt kromatogramot a 43. ábra mutatja be.

A gyors elválasztás elérése érdekében NIST mAb esetében az áramlási sebességet $0,6$ mL/percnek, a sókoncentrációt 30 mM-nak választottam meg. A gradiens két lineáris szegmenst tartalmazó program szerint változott ($9-20$ % B $0,9$ perc alatt, majd $20-85$ % B a $2,5$. percre), ami nagy felbontású elválasztást eredményezett 4 perc analízisidő alatt.

Influximab elválasztásakor $0,45$ mL/perc áramlási sebességet választottam, mivel ennél gyorsabb áramlás a csúcsok szélesedését és a felbontás csökkenését okozta. A sókoncentrációt 15 mM-nak választva, 5 perc alatt $5-42$ %B-re változtatva az eluens összetételt megfelelő felbontás és analízisidő érhető el. Az optimalizált elválasztási körülmények alkalmazásával mért kromatogramok a 44. ábrán láthatók.



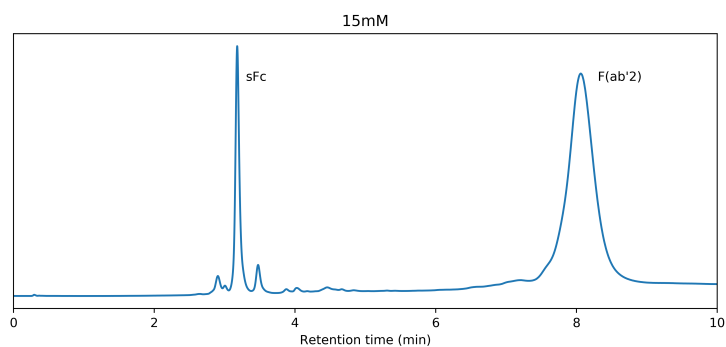
43. ábra. Emésztett infliximab (a) és NIST mAb (b) kiválasztott gradiens programja és a jószolt kromatogramok a ProPac Elite WCX 50 × 2 mm oszlopon.



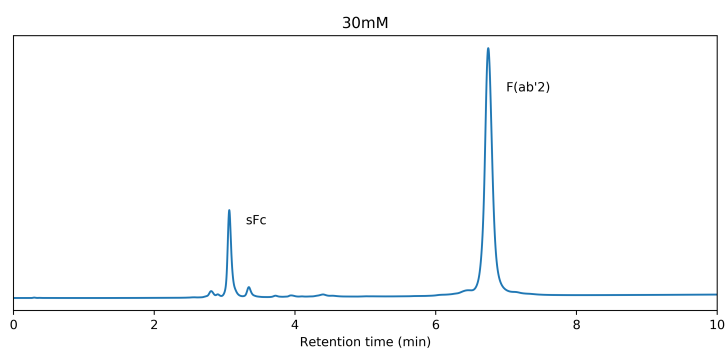
44. ábra. Emésztett infliximab (a) és NIST mAb (b) optimalizált gyors elválasztási kromatogramja a ProPac Elite WCX 50 × 2 mm oszlopon.

Szimultán pH- és sógradiens kialakításakor a só nemcsak a szelektivitást, hanem a csúcsalakot és a csúcshélességet is javítja, amit a fehérje és a só oszlopon történő kicserélődése miatti csúcsfókuszáló hatás magyaráz. A különböző sókoncentrációk csúcshélességre gyakorolt hatását az emésztett NIST mAb alegységeinek (Fc és F(ab')₂) esetében 10 perces gradiens alkalmazásával a 45. ábra szemlélteti.

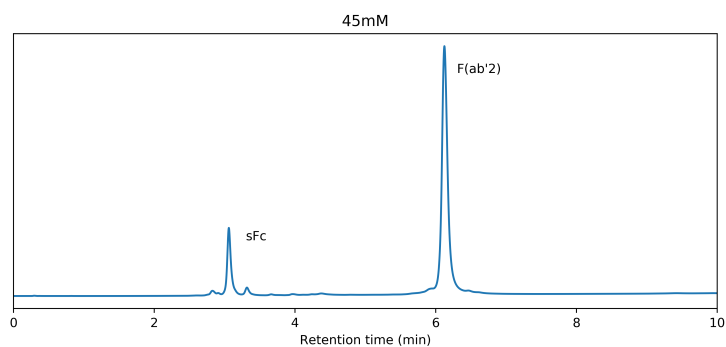
A 45. ábrán látható, hogy a NIST mAb F(ab')₂ alegysége esetében az alkalmazott sókoncentrációnak jelentős hatása van a csúcshélességre. A 15 mM koncentrációjú NaCl-ot tartalmazó B-eluenssel a F(ab')₂ csúcsának szélessége kb. 1 perc, míg 30 és 45 mM NaCl alkalmazásával 0,4, illetve 0,3 percre csökkenthető. Ugyanakkor a sókoncentráció növelésével az Fc előtt eluálódó csúcsok alakja torzul, ezért érdemes a köztes, 30 mM-os



(a)



(b)



(c)

45. ábra. Az eluens sótartalmának csúcshélessére gyakorolt hatása szimultán pH- és sógradiens módban emésztett NIST mAb alegységeinek esetében ProPac Elite WCX 50×2 mm oszlopon. Az alkalmazott sókoncentrációk a B-eluensben: 15 mM (a), 30 mM (b) és 45 mM (c), gradiens program: 0-100 % B 10 perc alatt.

sókoncentrációt választani. Hagyományos méretű oszlopokat alkalmazva az analízishez szükséges idő jellemzően 15 és 45 perc közé esik. Az 50×2 mm méretű oszlopot használva a szisztematikus optimalizálási folyamat két óra alatt elvégezhető, az optimális elválasztási körülményeket alkalmazva az analízisidő 4, illetve 6 percre csökkenthető az emésztett NIST mAb és az infliximab esetében.

A kationcserélő állófázisok szisztematikus összehasonlításával igazoltam, hogy az álló- és mozgófázisok különböző kombinációja különböző retenciót, szelektivitást és hatékonyságot eredményez. Ennek megfelelően a módszerfejlesztéskor mind az álló-, mind a mozgófázis tulajdonságait figyelembe kell venni, valamint azt is, hogy az egyes monoklonális antitestek egyedi retenciós viselkedése miatt mindegyikre külön-külön optimalizálási folyamat szükséges.

A vizsgált oszlopok visszatartása, hatékonysága és szelektivitása elég különbözőnek adódott és erősen függött az elúció módjától (pl. só-gradiens, pH-gradiens vagy szimultán pH- és sógradiens). Az egyes oszlopokon kapott eredmények alapján az javasolható, hogy töltésvariánsok elválasztására irányuló módszerfejlesztéskor több oszlop is álljon rendelkezésünkre. Láthatjuk továbbá, hogy a rövid, kis átmérőjű oszlopok használata 4-6 perc alatt biztosítja intakt és részlegesen emésztett antitestek elválasztását.

A különböző oszlopokat összehasonlítva megállapítható, hogy Waters Protein-Pak Hi Res SP oszlopon mérhető a linearitás szempontjából legmegfelelőbb pH-válaszok, míg eluensek tekintetében a Thermo CX-1 pH-gradiens puffer bizonyult a legjobbnak a Protein-Pak, BioPro SP-F és a ProPac oszlopokon. Ezek mellett a CX BioResolve pufferrendszer és a Protein-Pak vagy a ProPac oszlop is alkalmas kombináció lehet. Ha a $\Delta\text{pH}/\Delta\text{CV}$ értéket 0,5 alatt tartjuk (lapos gradiens), akkor a BioResolve SCX mAb oszlop CX BioResolve pufferrel való alkalmazása is megfelelő eredményeket biztosít. Ezekkel ellentétben a Protein-Pak és a ProPac oszlopok citromsavas eluenssel történő párosítása nem javasolt, ahogy a BioPro SP-F oszlop MES/DAP mozgófázissal való alkalmazása sem. Utóbbi esetekben ugyanis a monoklonális antitestek izoelektromos pontjának megfelelő pH-tartományban meredek emelkedő szakasz figyelhető meg a pH-válaszban, ami nem megfelelő szelektivitást és felbontást eredményez.

3.4. Az oszlopokon kialakuló pH-válasz vizsgálata

Ahogy azt a munkám eddigi eredményei alapján láthatjuk, a mozgófázis pH-válasza nem csak az eluens természetétől, koncentrációjától, ionerősségétől és pufferkapacitásától függ, hanem kialakításában az alkalmazott állófázis is jelentős szerepet játszik. Emellett nagy injektálási térfogat esetén a mintában található oldószer miatti hígulással is számolni kell. Munkám további részében az erős és gyenge ioncserélő oszlopok hatását vizsgáltam a kialakuló pH-válasz tekintetében. Az oszlopról távozó effluens pH-jának online monitorozásával négy pufferrendszert tanulmányoztam, amik az eddigi eredményeim alapján közel lineáris pH-választ biztosítanak az eluens összetétel függvényében. Az oszlopok jelenlétében kapott pH-válaszokat összehasonlítottam az oszlop nélküli rendszer esetében mérhetővel. Az egyes mozgófázis rendszerekkel a különböző oszlopokon 10 perc gradiens időt alkalmazva kapott pH-választ a 46. a-f) ábrák szemléltetik.

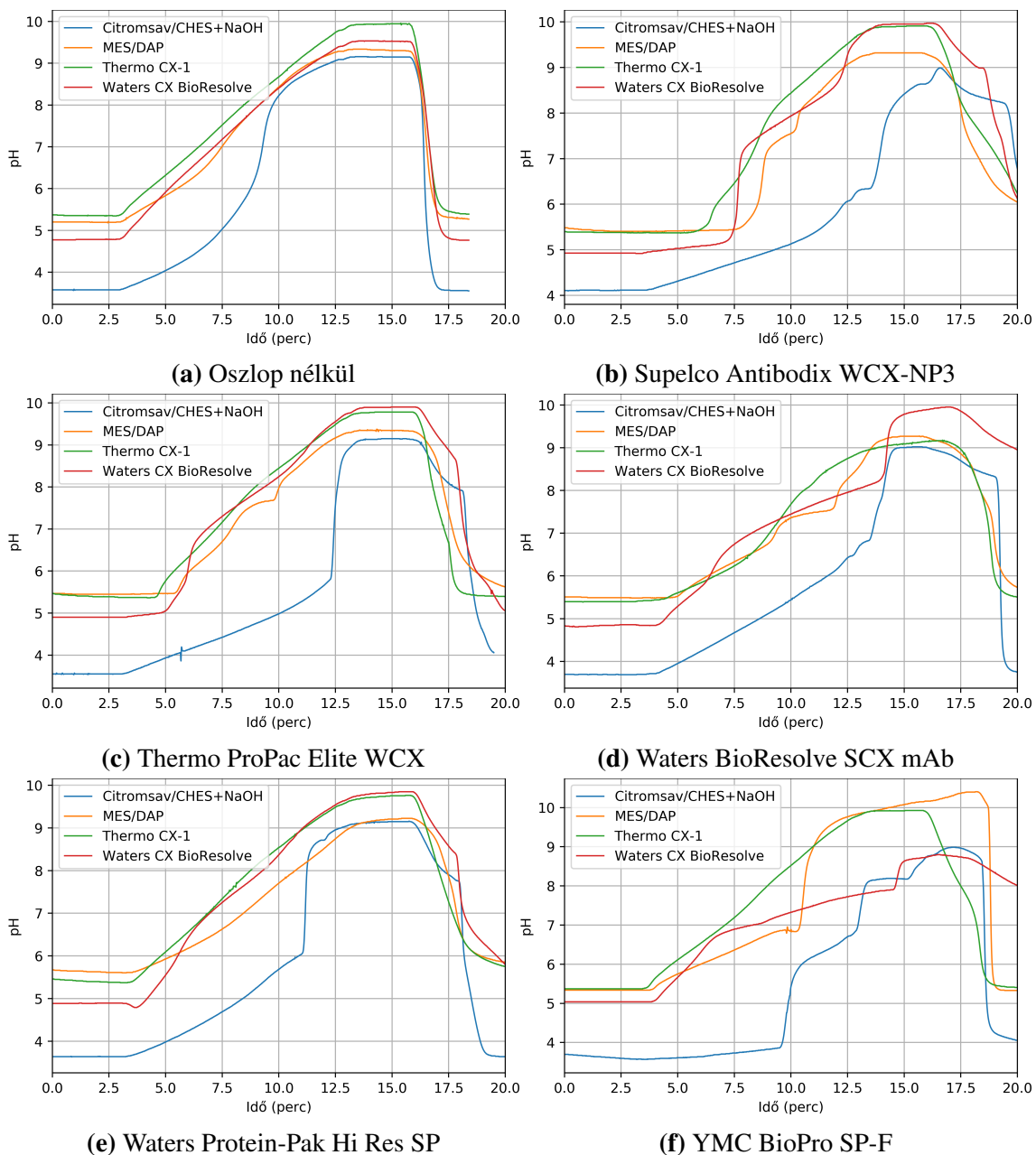
Oszlop nélkül a MES/DAP, CX-1 és a CX BioResolve puffer biztosítanak lineáris pH-választ, a citromsav/CHES+NaOH rendszer esetében "S"-alakú görbét kapunk (46.a) ábra). Az oszlop nélküli esethez képest a Supelco Antibodix oszlopon a citromsavas és a Thermo CX-1 pufferekkel kapott pH-válasz csak kicsit változott, míg a MES/DAP és a Waters BioResolve CX pufferek jelentős eltérést mutattak (46.b) ábra). A MES/DAP esetében 5,5-7,3 pH-tartományban figyelhető meg lépcsőszerű ugrás, míg a Waters pufferrel a 5,5-7,3 és 8,5-9,5 pH értékek között is. Ezekben a tartományokban az elválasztás szelektivitása gyenge lehet.

A Thermo ProPac Elite oszlop közel lineáris pH-választ mutat a MES/DAP, CX-1 és a CX BioResolve pufferekkel (46.c) ábra). A citromsav/CHES rendszerrel egy erőteljes meredek emelkedés figyelhető meg az 5,9-8,9 pH-tartományban, ami nemcsak ezen az oszlopon figyelhető meg. Ebben a pH-tartományban limitált szelektivitás érhető el. A citromsav pK_a értéke ($pK_{a3} = 6,40$) az emelkedő szakaszra esik, ami arra enged következtetni, hogy a mozgófázis pufferkapacitása ebben a pH-tartományban nem megfelelő.

A Waters BioResolve oszloppal (46.d) ábra) a citromsavas mozgófázis lineáris pH-választ ad pH = 6,8 értékig, majd egy lépcsőszerű ugrással éri el a 9-es pH-t. A CX-1 puffer "S"-alakú görbét mutat, míg a MES/DAP és a CX BioResolve pufferek alkalmazásával nagy számú töréspont figyelhető meg.

A Waters ProteinPak oszlop (46.e) ábra) három pufferrendszerrel is közel lineáris pH-választ nyújt (MES/DAP, Thermo CX-1 és CX BioResolve), de a citromsav/CHES/NaOH eluens esetében ezen az oszlopon is meredek emelkedő szakasz van a 6-8,5 pH-tartományban.

A YMC BioPro oszlopon (46.f) ábra) a CX-1 puffer a teljes pH-tartományban lineáris választ ad. Megfigyelhető még lineáris szakasz a CX BioResolve eluenssel pH = 7,9-ig, ahonnan egy meredek lépcsővel érjük el a pH = 8,6 értéket. A MES/DAP mozgófázissal 6,8 és 9,5 pH között figyelhető meg ugrás, míg a citromsavas rendszerben több töréspont van, és csak a $6,0 \leq \text{pH} \leq 6,8$ tartomány tekinthető hasznosnak a várható szelektivitás



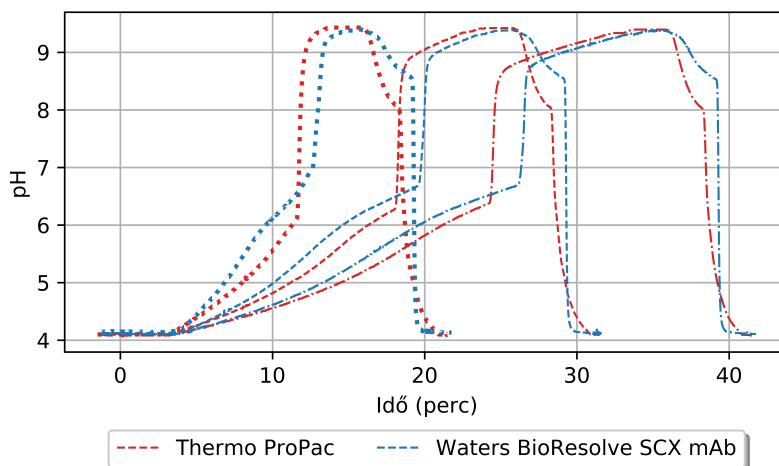
46. ábra. A mért pH-válasz lineáris gradiens alkalmazásával oszlop nélkül (a), Supelco Antibodix WCX-NP3 (b), Thermo ProPac Elite WCX (c), Waters BioResolve SCX mAb (d), Waters Protein-Pak Hi Res SP (e) és YMC BioPro SP-F (f) oszlopokon citromsav/CHES+NaOH (kék), MES/DAP (narancssárga), Thermo CX-1 (zöld) és Waters BioResolve CX (piros) pufferrendszerek alkalmazásával.

tekintetében.

A 46. ábra alapján ismételten elmondható, hogy a pH-választ nem a mozgófázis és az állófázis külön-külön befolyásolja, hanem a kettő kombinációja, így pH-gradiens módszer fejlesztésekor ezeket együttesen kell figyelembe venni. Egyes pH-tartományokban néhány oszlop-eluens pár magas szelektivitást (közel lineáris pH-válasz) tud biztosítani, szemben a meredek emelkedő szakaszokat tartalmazó görbék esetében jóval gyenge szelektivitással. Az oszlopok viselkedése nem köthető erős vagy gyenge kationcserélő jellemükhöz, a pH-válasz kialakulására a fajlagos felületük, valamint az állófázis ionjainak és a mozgófázis ellenionjainak aránya is hatással lehet. Az oszlop ioncsere kapacitása függ a felület kémiai tulajdonságaitól, a felületi borítottságtól és az oszloptérfogattól is.

3.4.1. A pH-eltolódás természetének vizsgálata

Mivel a mozgó- és állófázisok bizonyos kombinációjakor felvett pH-válaszokban töréspontok és lépcsőszerű ugrások figyelhetők meg, érdekesnek tűnt a jelenség természetének vizsgálata. A továbbiakban tanulmányoztam, hogy az eltolódások időfüggőek-e (gyors vagy lassú dinamika), vagy függetlenek attól a citromsav/CHES+NaOH mozgófázis esetében. Első lépésként a gradiens időt változtattam a ProPac Elite WCX, valamint a BioResolve SCX mAb oszlopok alkalmazásakor, mivel ezekkel a párosításokkal kaptam a legmeredekebb pH-válaszokat és töréspontokat. A 10, 20 és 30 perc gradiens idő esetében kapott pH-válasz görbék a 47. ábrán láthatók.

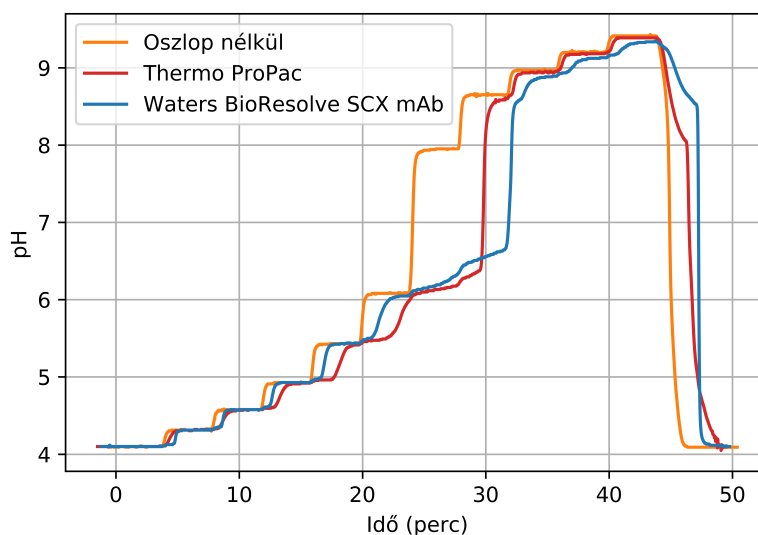


47. ábra. A mért pH-válaszok $t_G = 10$ perc (pontozott vonal), $t_G = 20$ perc (szaggatott vonal) és $t_G = 30$ perc (pontos vonal) gradiens idő alkalmazásával a Thermo ProPac Elite WCX (piros) és a Waters BioResolve SCX mAb (kék) oszlopokon.

A 47. ábra alapján elmondható, hogy a meredeken emelkedő szakasz minden esetben egy adott mozgófázis összetételnél következik be. Ez a viselkedés az egyensúlyi rendszer-

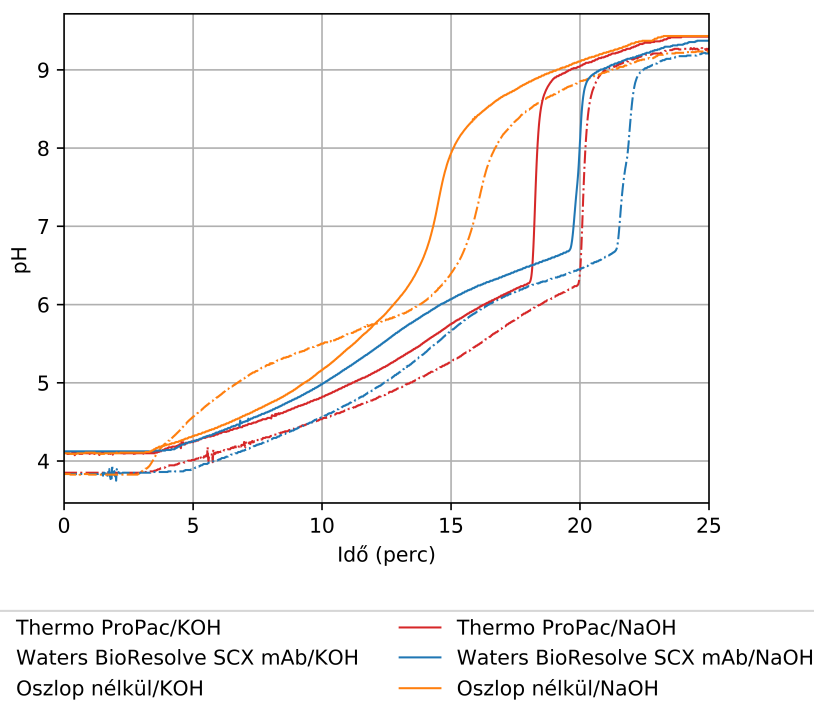
ben bekövetkező hirtelen változásra utal. A pH-ugrást a gradiens meredeksége csak kis mértékben befolyásolja, a 10 perces gradiens idő esetében némileg jelentősebb, mint $t_G = 20$, illetve $t_G = 30$ perc alkalmazásakor. A legmeredekebb gradiensprogram ($t_G = 10$ perc) esetében a meredek szakasz a $6,1 \leq \text{pH} \leq 9,4$ tartományba esik ($\Delta\text{pH} = 3,3$) a ProPac Elite oszlopon és $6,8 \leq \text{pH} \leq 9,2$ ($\Delta\text{pH} = 2,4$) a BioResolve SCX mAb oszlopon. Enyhébb gradiens meredekség ($t_G = 30$ perc) esetén a ProPac oszlopon 6,4-8,8 pH-tartományban ($\Delta\text{pH} = 2,4$), a BioResolve oszlopon 6,8-8,7 pH között ($\Delta\text{pH} = 1,9$) figyelhető meg az ugrás a pH-válaszban. Ez a jelenség igazolja, hogy a mozgófázis pufferkapacitása a citromsav egyik savi disszociációs állandójának ($\text{p}K_{\text{a}3} = 6,40$) közelében ezen a két oszlopon nem megfelelő.

A gradiens idő változtatása mellett vizsgáltam a lépcsőzetes gradiens program eredményeként kialakuló pH-válasz görbéket. A 48. ábrán a meredek emelkedő szakaszok az előzőekhez hasonlóan megtalálhatók a 6,0-8,7 pH-tartományban. A lépcsőzetes gradiens programmal kapott eredményekből arra következtethetünk, hogy ha a pH a citromsav harmadik protonálódási állandójánál kisebb, akkor a Thermo ProPac oszlop nagyobb ellenállást mutat a pH-változásra, mint a BioResolve oszlop (a piros görbe lassabban éri el a következő pH értéket). A töréspont után ($\text{pH} \geq 6,4$) azonban a BioResolve oszlop mutat nagyobb pufferkapacitást és igényel több időt az új egyensúlyi helyzet elérése (a kék vonal a piros alatt helyezkedik el).



48. ábra. A mért pH-válaszok lépcsőzetes gradiens program alkalmazásával oszlop nélküli (narancssárga), a ProPac Elite (piros) és a BioResolve SCX mAb (kék) oszlopot tartalmazó rendszerekben.

A bemutatott adatok azt mutatják, hogy a pH-kontroll jelentős kihívást jelent a relatív hosszú oszlopok viszonylag meredek gradiens programmal történő használata esetén. A pH jobban szabályozható, ha törekszünk a megfelelő mozgófázis kiválasztására és/vagy



49. ábra. A pH-beállításához használt bázis természetének (NaOH vagy KOH) szerepe a mért pH-válásra a citromsav/CHES mozgófázis esetében oszlop nélküli (narancssárga), a ProPac Elite (piros) és a BioResolve SCX mAb (kék) oszlopot tartalmazó rendszerekben 20 perc gradiens idő mellett. A folytonos vonal a NaOH-ot, a pontvonal a KOH-ot alkalmazó rendszert jelöli.

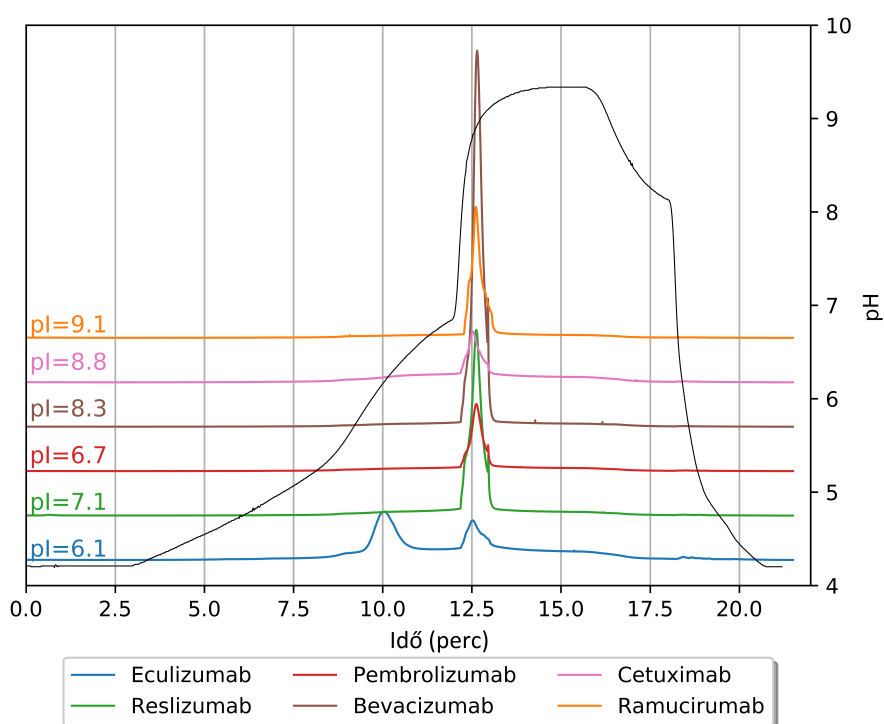
kisebb térfogatú oszlopokat alkalmazunk.

A pH-válasz további vizsgálatát a nátriumion ioncsere folyamatokban betöltött szerepének tanulmányozásával folytattam. Erre a célra a pH beállításához használt NaOH-ot KOH-ra cseréltem a citromsav/CHES mozgófázis rendszerben, mivel a K^+ -ion nagyobb kötési affinitást mutat a CEX állófázisokhoz, mint a Na^+ -ion [135]. A NaOH és a KOH koncentrációját az A- és B-eluensben is $1,25 \cdot 10^{-2}$ M értékre állítottam be, míg a H^+ -ion koncentrációja a pH-gradiens végén ennél több nagyságrenddel kisebb, $\sim 10^{-9}$ M volt. A Na^+ és a K^+ ionok ugyanolyan módon, de eltérő mértékben kötődnek az állófázis ioncserélő csoportjaihoz, mint a H^+ -ionok. A 49. ábra a ProPac Elite és a BioResolve SCX mAb, valamint az oszlopot nem tartalmazó rendszerben a citromsav/CHES mozgófázissal NaOH, illetve KOH jelenlétében kapott pH-válasz görbéket ábrázolja 20 perces gradiens idő alkalmazásakor.

A nátrium-hidroxid kálium-hidroxiddal történő helyettesítésekor az oszlop nélküli esetben is figyelhető meg változás. A pH-válasz görbe KOH esetében nagyobb kezdeti meredekséget mutat és a töréspont valamivel nagyobb B-eluens összetételnél jelentkezik. Az oszlopot is tartalmazó rendszerekben a görbék meredeksége nem változott a bázis lecserélésével, de a pH-ugráshoz tartozó % B értéke KOH esetében magasabb tartományba toldott el.

3.4.2. A pH-eltolódás kromatográfiai szelektivitásra gyakorolt hatása

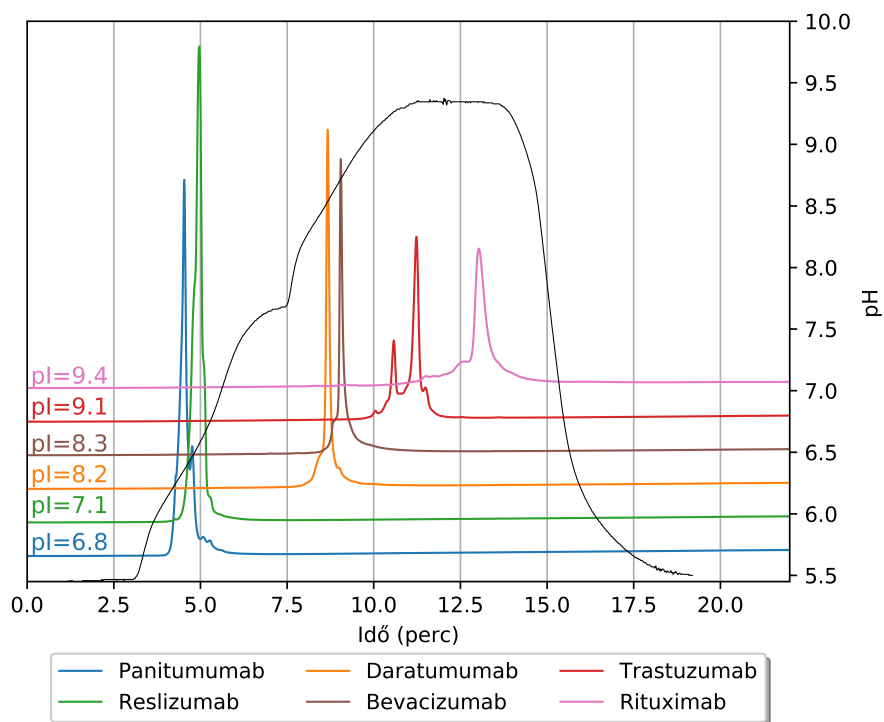
Az előző fejezetek alapján látható, hogy a monoklonális antitestek többé-kevésbé az izoelektromos pontjuknak megfelelő sorrendben hagyják el az oszlopot. A továbbiakban a pH-válaszban tapasztalható meredeken emelkedő szakaszokra eső pI értékű antitestek elválasztási nehézségeit vizsgáltam. Széles izoelektromos pont tartományban ($6,1 \leq pI \leq 9,1$) intakt mAb-okat injektáltam a ProPac Elite WCX oszlopra, és az elúcióhoz olyan mozgófázist alkalmaztam, amelyek ebben a pH-tartományban meredek emelkedő szakaszt mutat. Az így kiválasztott citromsav/CHES+NaOH eluenssel kapott kromatogramokat összehasonlítottam a MES/DAP pH-gradiens esetében kapottakkal (közel lineáris pH-válasz). Az 50. és az 51. ábrán a két eluenssel kapott kromatogramok láthatók.



50. ábra. A Thermo ProPac oszlopon citromsav/CHES+NaOH mozgófázissal kapott kromatogramok széles pI-tartományt lefedő mAb-ok esetében.

Az 50. ábrán a különböző mAb-ok azonos retenciós idő után hagyják el az oszlopot. Az ehhez a retenciós időhöz tartozó 6,8 és 9 érték közötti pH-változás megegyezik a mAb-ok által lefedett pI-tartománnyal, és a komponensek nem választhatók el egymástól. Emellett a csúcsok alakja sem megfelelő, különösen a legkisebb pI értékkel rendelkező eculizumab esetében.

Pozitív ellenpéldaként az 51. ábrán a közel lineáris pH-választ biztosító MES/DAP mozgófázissal elért elválasztásról megállapítható, hogy a mAb-ok a pI-értékeiknek megfelelő sorrendben eluálódnak. A csúcsalakok megfelelőnek bizonyultak, egyes esetekben (pl. trastuzumab) különböző töltésvariánsok is megkülönböztethetők. Az egymáshoz nagyon



51. ábra. A Thermo ProPac oszlopon MES/DAP pH-gradienssel kapott kromatogramok széles pI-tartományt lefedő mAb-ok esetében.

közel első pI-jű komponensek megfelelő felbontású elválasztása azonban nem valósult meg.

Látható, hogy az ioncserélő oszlopnak jelentős szerepe van a pH-válasz kialakításában és az egyes mozgófázis rendszerek eltérő pH-választ alakítanak ki a különböző oszlopokon. A gradiens idő növelésével és a só cseréjével a pH-görbén tapasztalható meredeken emelkedő szakaszok és töréspontok nem küszöbölhetők ki, az ezekhez tartozó pH-tartományokban a mAb-ok elválasztása nem valósítható meg.

4. Összefoglalás

Munkám célja olyan kationcsere-kromatográfiához (CEX) használható pufferrendszerek kifejlesztése volt, amelyek a kereskedelmi forgalomban kapható só- vagy pH-gradienst alkalmazó eluensek alternatívájaként megfelelő szelektivitást, csúcsalakot és hatékonyságot biztosítanak elfogadható áron. Különböző, két komponensű pufferrendszereket vizsgáltam, amelyek közül a MES/DAP és a citromsav/CHES bizonyult a legjobbnak monoklonális antitestek töltésvariánsainak elválasztásában, különösen kis koncentrációjú só-gradienssel kiegészítve. CEX módban a MES/DAP rendszer $5 \leq \text{pH} \leq 10$ tartományban ad lineáris pH-választ, míg a citromsav/CHES rendszer kisebb, $3 \leq \text{pH} \leq 9$ tartományban használható annak ellenére, hogy pH-válasza nem lineáris. Megállapítható továbbá, hogy szimultán pH- és sógradienssel dolgozva a módszerfejlesztés lehetőségeinek tárháza bővíthető a csak só-, vagy csak pH-gradienshez képest. A szimultán pH- és sógradiens módszer két legjelentősebb változója a gradiens meredeksége (a gradiens idő (t_G) reciproka) és a B-eluens sótartalma (c_s). Két különböző gradiens meredekség és három sókoncentráció esetén vizsgáltam a retenciós idő alakulását, amiből t_G és c_s egyidejűleg optimalizálható 6 kezdeti futtatással ($2 t_G \times 3 c_s$). A modell alkalmazásával a mért és számolt retenciós adatok jó egyezést mutatnak. Ha egy pufferrendszer a B-eluens arányának függvényében nem lineáris pH-választ ad (pl. citromsav/CHES), akkor a t_G -t ajánlott 3 szinten vizsgálni, amivel a modell pontossága javítható és a becslés hibája csökkenthető. Az ilyen esetekben kilenc kezdeti futtatás szükséges ($3 t_G \times 3 c_s$). Az optimalizált MES/DAP szimultán pH- és sógradiens pufferrendszert sikeresen alkalmaztam daratumumab és cetuximab alegységeinek elválasztására, majd az empirikusan meghatározott pH-válaszok ismeretében lineáris pH-választ biztosító gradiens programot dolgoztam ki.

A tömegspektrométer-kompatibilitás érdekében illékony komponenseket tartalmazó ioncserés pufferrendszert dolgoztam ki monoklonális antitestek töltésvariánsainak elválasztására. A legjobb elválasztás a 10 mM ammónium-acetát és 10 mM ecetsav összetételű A-eluens és 50 mM ammónium-acetát és 50 mM ammónium-karbonát összetételű B-eluens alkalmazásával érhető el. Ezeket a körülményeket sikeresen alkalmaztam mAb-ok elválasztására széles pI-tartományban ($6,1 \leq \text{pI} \leq 9,4$) és mAb keverékekhez is.

A kationcserélő állófázisok szisztematikus összehasonlításával igazoltam, hogy az álló- és mozgófázisok különböző kombinációja eltérő retenciót, szelektivitást és hatékonyságot eredményez. Ennek megfelelően a módszerfejlesztéskor mind az álló-, mind a mozgófázis tulajdonságait figyelembe kell venni, valamint azt is, hogy az egyes monoklonális antitestek egyedi retenciós viselkedése miatt mindegyikre külön-külön optimalizálási folyamat szükséges.

A vizsgált oszlopok elválasztási tulajdonságait az elúció módja jelentősen befolyásolja (pl. sógradiens, pH-gradiens vagy szimultán pH- és sógradiens). Az oszlopok eltérő viselkedése miatt ajánlott, hogy töltésvariánsok elválasztására irányuló módszerfejlesztéskor

több oszlop is álljon rendelkezésünkre. Kisméretű oszlopok alkalmazásával az analízis idő 4-6 percre csökkenthető intakt és részlegesen emésztett antitestek elválasztása esetén.

Munkám során bemutattam, hogy a kationcsere-kromatográfiában az ioncserélő oszlopnak jelentős szerepe van a kialakuló pH-válasz szempontjából, ha pH-gradiens elválasztást végzünk. A lineáris pH-választ biztosító rendszerek alkalmasabbnak bizonyultak a széles pI-tartományt lefedő monoklonális antitestek elválasztása szempontjából. Az általam kifejlesztett MES/DAP rendszerrel a mAb-ok széles elúciós ablakban eluálhatók. Az új módszerek tervezésénél fontos szempont, hogy különböző álló- és mozgófázisokat együttesen vizsgáljuk.

Irodalomjegyzék

- [1] C. Piggee, Therapeutic antibodies coming through the pipeline, *Analytical Chemistry* 80 (2008) 2305–2310.
- [2] G. Walsh, Biopharmaceutical benchmarks 2014, *Nature Biotechnology* 32 (2014) 992–1000.
- [3] M. L. Chiu, D. R. Goulet, A. Teplyakov, G. L. Gilliland, Antibody structure and function: The basis for engineering therapeutics, *Antibodies* 8 (2019) 55.
- [4] P. C. Kung, G. Goldstein, E. L. Reinherz, S. F. Schlossman, Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens, *Science* 206 (1979) 347–349.
- [5] J. M. Reichert, Antibody therapeutics approved or in regulatory review in the EU or US, www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/ (2020).
- [6] E. Diane, Griffin, P. McInnes, Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use (1997). U.S. Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research., *Journal of Immunotherapy* 20 (1997) 214–243.
- [7] D. Reusch, M. Tejada, Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes (CQAs)., *Glycobiology* 25 (2015) 1325–1334.
- [8] L. Khawli, S. Goswami, R. Hutchinson, Z. Kwong, J. Yang, X. Wang, Z. Yao, A. Sreedhara, T. Cano, D. Tesar, I. Nijem, D. Allison, P. Wong, Y.-H. Kao, C. Quan, A. Joshi, R. Harris, P. Motchnik, Charge variants in IgG1, *mAbs* 2 (2010) 613–24.
- [9] S. Fekete, D. Guillarme, P. Sandra, K. Sandra, Chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric methods for the analytical characterization of protein biopharmaceuticals, *Analytical Chemistry* 88 (2016) 480–507.
- [10] S. Fekete, A. Beck, D. Guillarme, Characterization of cation exchanger stationary phases applied for the separations of therapeutic monoclonal antibodies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 111 (2015) 169–176.
- [11] S. Berkowitz, J. R. Engen, J. R. Mazzeo, G. B. Jones, Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars, *Nature Reviews Drug discovery* 11 (2012) 527–540.

- [12] A. Beck, H. Diemer, D. Ayoub, F. Debaene, E. Wagner-Rousset, C. Carapito, A. Van Dorsselaer, S. Sanglier-Cianféroni, Analytical characterization of biosimilar antibodies and fc-fusion proteins, *Trends in Analytical Chemistry* 48 (2013) 81–95.
- [13] H. Liu, G. Gaza-Bulseco, D. Faldu, C. Chumsae, Heterogeneity of monoclonal antibodies, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97 (2008) 2426 – 2447.
- [14] A. Link, Multidimensional peptide separations in proteomics, *Trends in Biotechnology* 20 (2003) S8–13.
- [15] S. Fekete, A.-L. Gassner, S. Rudaz, J. Schappler, D. Guillarme, Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies, *Trends in Analytical Chemistry* 42 (2013) 74 – 83.
- [16] A. Beck, S. Sanglier-Cianféroni, A. Van Dorsselaer, Biosimilar, biobetter, and next generation antibody characterization by mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 84 (2012) 4637–4646.
- [17] S. C. Alley, K. E. Anderson, Analytical and bioanalytical technologies for characterizing antibody–drug conjugates, *Current Opinion in Chemical Biology* 17 (2013) 406 – 411.
- [18] S. O. Doronina, B. E. Toki, M. Y. Torgov, B. A. Mendelsohn, C. G. Cervený, D. F. Chace, R. L. DeBlanc, R. P. Gearing, T. D. Bovee, C. B. Siegall, J. A. Francisco, A. F. Wahl, D. L. Meyer, P. D. Senter, Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy, *Nature Biotechnology* 21 (2003) 778–784.
- [19] P. Senter, E. Sievers, The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma, *Nature Biotechnology* 30 (2012) 631–637.
- [20] M. Jäger, A. Schoberth, P. Ruf, J. Hess, H. Lindhofer, The trifunctional antibody ertumaxomab destroys tumor cells that express low levels of human epidermal growth factor receptor 2, *Cancer Research* 69 (2009) 4270–4276.
- [21] R. J. Harris, B. Kabakoff, F. D. Macchi, F. J. Shen, M. Kwong, J. D. Andya, S. J. Shire, N. Bjork, K. Totpal, A. B. Chen, Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 752 (2001) 233 – 245.
- [22] J. Dai, Y. Zhang, A middle-up approach with online capillary isoelectric focusing/mass spectrometry for in-depth characterization of cetuximab charge heterogeneity, *Analytical Chemistry* 90 (2018) 14527–14534.

- [23] J. van Deemter, F. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chemical Engineering Science* 50 (1995) 3869 – 3882.
- [24] Y. Chen, A. Mehok, C. Mant, R. Hodges, Optimum concentration of trifluoroacetic acid for reversed-phase liquid chromatography of peptides revisited, *Journal of Chromatography A* 1043 (2004) 9 – 18.
- [25] B. Bobály, A. Beck, J. Fekete, D. Guillarme, S. Fekete, Systematic evaluation of mobile phase additives for the LC–MS characterization of therapeutic proteins, *Talanta* 136 (2015) 60 – 67.
- [26] C. Horváth, W. Melander, I. Molnar, Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases, *Journal of Chromatography* 125 (1976) 129–156.
- [27] W. R. Melander, C. Horváth, *High-Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives*, Vol. 2, Academic Press, New York, 1980.
- [28] I. Molnár, Searching for robust HPLC methods – Csaba Horváth and the solvophobic theory, *Chromatographia* 62 (2005) s7–s17.
- [29] D. E. Martire, R. E. Boehm, Unified theory of retention and selectivity in liquid chromatography. 2. Reversed-phase liquid chromatography with chemically bonded phases, *The Journal of Physical Chemistry* 87 (1983) 1045–1062.
- [30] K. A. Dill, The mechanism of solute retention in reversed-phase liquid chromatography, *The Journal of Physical Chemistry* 91 (1987) 1980–1988.
- [31] S. Fekete, E. Oláh, J. Fekete, Fast liquid chromatography: The domination of core–shell and very fine particles, *Journal of Chromatography A* 1228 (2012) 57 – 71.
- [32] P. I. Ali, Z. Alothman, M. Al Za’abi, Superficially porous particles columns for super fast HPLC separations, *Biomedical Chromatography : BMC* 26 (2012) 1001–1008.
- [33] F. Gritti, G. Guiochon, The current revolution in column technology: How it began, where is it going?, *Journal of Chromatography A* 1228 (2012) 2 – 19.
- [34] V. González-Ruiz, A. I. Olives, M. A. Martín, Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography, *Trends in Analytical Chemistry* 64 (2015) 17 – 28.

- [35] S. Hjertén, J.-L. Liao, R. Zhang, High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds, *Journal of Chromatography A* 473 (1989) 273 – 275.
- [36] A. Maruska, O. Kornysova, Application of monolithic (continuous bed) chromatographic columns in phytochemical analysis, *Journal of Chromatography A* 1112 (2006) 319–330.
- [37] D. Guillarme, J. Ruta, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: A critical comparison of existing approaches, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2009) 1069–1082.
- [38] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 3498–3501.
- [39] K. Cabrera, Applications of silica-based monolithic HPLC columns, *Journal of Separation Science* 27 (2004) 843–852.
- [40] S. Fekete, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Impact of mobile phase temperature on recovery and stability of monoclonal antibodies using recent reversed-phase stationary phases, *Journal of Separation Science* 35 (2012) 3113–3123.
- [41] B. Zhang, J. Jeong, B. Burgess, M. Jazayri, Y. Tang, Y. T. Zhang, Development of a rapid RP-UHPLC–MS method for analysis of modifications in therapeutic monoclonal antibodies, *Journal of Chromatography B* 1032 (2016) 172 – 181.
- [42] V. D’Atri, A. Goyon, B. Bobaly, A. Beck, S. Fekete, D. Guillarme, Protocols for the analytical characterization of therapeutic monoclonal antibodies. III – denaturing chromatographic techniques hyphenated to mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 1096 (2018) 95 – 106.
- [43] S. Fekete, S. Rudaz, J. Fekete, D. Guillarme, Analysis of recombinant monoclonal antibodies by RPLC: Toward a generic method development approach, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 70 (2012) 158 – 168.
- [44] B. Wei, B. Zhang, B. Boyes, Y. Zhang, Reversed-phase chromatography with large pore superficially porous particles for high throughput immunoglobulin G 2 disulfide isoform separation, *Journal of Chromatography A* 1526 (2017) 104–111.
- [45] N. Navas, A. Herrera, A. Martínez-Ortega, A. Salmerón, J. Cabeza, L. Cuadros-Rodríguez, Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP)HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (2013) 9351–9363.

- [46] B. Bobaly, V. D'Atri, M. Lauber, A. Beck, D. Guillarme, S. Fekete, Characterizing various monoclonal antibodies with milder reversed phase chromatography conditions, *Journal of Chromatography B* 1096 (2018) 1–10.
- [47] A. Rathore, A. Weiskopf, A. Reason, Defining critical quality attributes for monoclonal antibody therapeutic products, *Biopharm International* 27 (2015) 34–43.
- [48] P. Hong, S. Koza, E. Bouvier, Size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 35 (2012) 2923–2950.
- [49] R. Tantipolphan, S. Romeijn, J. Engelsman, T. Rasmussen, W. Jiskoot, Elution behavior of insulin on high-performance size exclusion chromatography at neutral pH, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 52 (2010) 195–202.
- [50] B. Teska, A. Kumar, J. Carpenter, M. Wempe, Analyzing insulin samples by size-exclusion chromatography: A column degradation study, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 104 (2015) 1555–1560.
- [51] A. Oliva, M. Llabres, J. Fariña, Comparative study of protein molecular weights by size-exclusion chromatography and laser-light scattering, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 25 (2001) 833–841.
- [52] L. A. Kueltzo, W. Wang, T. W. Randolph, J. F. Carpenter, Effects of solution conditions, processing parameters, and container materials on aggregation of a monoclonal antibody during freeze-thawing, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97 (2008) 1801 – 1812.
- [53] J. Gabrielson, M. Brader, A. Pekar, K. Mathis, G. Winter, J. Carpenter, T. Randolph, Quantitation of aggregate levels in a recombinant humanized monoclonal antibody formulation by size-exclusion chromatography, asymmetrical flow field flow fractionation, and sedimentation velocity, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96 (2007) 268–279.
- [54] W. Kopaciewicz, F. Regnier, Nonideal size-exclusion chromatography of proteins: Effects of pH at low ionic strength, *Analytical Biochemistry* 126 (1) (1982) 8 – 16.
- [55] S. Fekete, A. Goyon, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Size exclusion chromatography of protein biopharmaceuticals: Past, present and future, *American Pharmaceutical Review* 21 (2018) 1–4.
- [56] A. Goyon, A. Beck, O. Colas, K. Sandra, D. Guillarme, S. Fekete, Evaluation of size exclusion chromatography columns packed with sub-3 μ m particles for the

- analysis of biopharmaceutical proteins, *Journal of Chromatography A* 1498 (2016) 80–89.
- [57] S. Fekete, K. Ganzler, D. Guillarme, Critical evaluation of fast size exclusion chromatographic separations of protein aggregates, applying sub-2 μ m particles, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 78-79 (2013) 141 – 149.
- [58] S. Fekete, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Achievable separation performance and analysis time in current liquid chromatographic practice for monoclonal antibody separations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 141 (2017) 59–69.
- [59] K. Tsumoto, M. Umetsu, I. Kumagai, D. Ejima, T. Arakawa, Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312 (2003) 1383–1386.
- [60] T. Arakawa, K. Tsumoto, The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: Not facilitate refolding, but suppress aggregation, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304 (2003) 148–152.
- [61] M. Umetsu, K. Tsumoto, S. Nitta, T. Adschiri, D. Ejima, T. Arakawa, I. Kumagai, Nondenaturing solubilization of β 2 microglobulin from inclusion bodies by L-arginine, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328 (2005) 189–97.
- [62] D. Ejima, R. Yumioka, T. Arakawa, K. Tsumoto, Arginine as an effective additive in gel permeation chromatography, *Journal of Chromatography A* 1094 (2005) 49 – 55.
- [63] H. Liu, G. Gaza-Bulseco, C. Chumsae, Analysis of reduced monoclonal antibodies using size exclusion chromatography coupled with mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 20 (2009) 2258 – 2264.
- [64] Y. Zhang, P. S. Cremer, Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series, *Current Opinion in Chemical Biology* 10 (2006) 658 – 663.
- [65] A. Tiselius, Adsorption Separation by salting out, *Arkiv for Kemi, Mineralogi och Geologi*, Almqvist & Wiksell, 1948.
- [66] W. Melander, C. Horváth, Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: An interpretation of the lyotropic series, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 183 (1977) 200 – 215.
- [67] A. Creasy, J. Lomino, G. Barker, A. Khetan, G. Carta, Gradient elution behavior of proteins in hydrophobic interaction chromatography with U-shaped retention factor curves, *Journal of Chromatography A* 1547 (2018) 53 – 61.

- [68] S. Fekete, J.-L. Veuthey, A. Beck, D. Guillarme, Hydrophobic interaction chromatography for the characterization of monoclonal antibodies and related products, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 130 (2016) 3 – 18, review Issue 2016.
- [69] A. Goyon, V. D’Atri, B. Bobaly, E. Wagner-Rousset, A. Beck, S. Fekete, D. Guillarme, Protocols for the analytical characterization of therapeutic monoclonal antibodies. I – Non-denaturing chromatographic techniques, *Journal of Chromatography B* 1058 (2017) 73 – 84.
- [70] C. King, R. Patel, G. Ponniah, C. Nowak, A. Neill, Z. Gu, H. Liu, Characterization of recombinant monoclonal antibody variants detected by hydrophobic interaction chromatography and imaged capillary isoelectric focusing electrophoresis, *Journal of Chromatography B* 1085 (2018) 96 – 103.
- [71] D. Boyd, T. Kaschak, B. Yan, HIC resolution of an IgG1 with an oxidized Trp in a complementarity determining region, *Journal of Chromatography B* 879 (2011) 955 – 960.
- [72] J. Valliere-Douglass, A. Wallace, A. Balland, Separation of populations of antibody variants by fine tuning of hydrophobic-interaction chromatography operating conditions, *Journal of Chromatography A* 1214 (2008) 81 – 89.
- [73] B. Bobaly, A. Beck, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, S. Fekete, Impact of organic modifier and temperature on protein denaturation in hydrophobic interaction chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 131 (2016) 124–132.
- [74] B. Bobaly, G. Randazzo, S. Rudaz, D. Guillarme, S. Fekete, Optimization of non-linear gradient in hydrophobic interaction chromatography for the analytical characterization of antibody-drug conjugates, *Journal of Chromatography A* 1481 (2016) 82–91.
- [75] J. Fekete, R. Kormány, S. Fekete, *Modern Folyadékkromatográfia*, KromKorm Kft., Budapest, 2017.
- [76] B. Bobaly, V. D’Atri, A. Beck, D. Guillarme, S. Fekete, Analysis of recombinant monoclonal antibodies in hydrophilic interaction chromatography: A generic method development approach, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 145 (2017) 24–32.
- [77] V. D’Atri, S. Fekete, D. Stoll, M. Lauber, A. Beck, D. Guillarme, Characterization of an antibody-drug conjugate by hydrophilic interaction chromatography coupled to mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 1080 (2018) 37–41.

- [78] T. Zhou, L. Wang, Z. Zhang, J. Mi, An enhanced regeneration strategy to improve microbial control and prolong resin lifetime for protein A resin in large-scale monoclonal antibody (mAb) purification, *Journal of Biotechnology* 289 (2019) 118–125.
- [79] S. Hober, K. Nord, M. Linhult, Protein A chromatography for antibody purification, *Journal of Chromatography B* 848 (2007) 40 – 47.
- [80] A. M. Ramos de la Peña, J. González-Valdez, O. Aguilar, Protein A chromatography: Challenges and progress in the purification of monoclonal antibodies, *Journal of Separation Science* 42 (2019) 1816–1827.
- [81] S. Fekete, A. Beck, J. Fekete, D. Guillarme, Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, part II: pH gradient approach, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 102 (2015) 282 – 289.
- [82] B. Bobaly, V. D’Atri, A. Goyon, O. Colas, A. Beck, S. Fekete, D. Guillarme, Protocols for the analytical characterization of therapeutic monoclonal antibodies. II - Enzymatic and chemical sample preparation, *Journal of Chromatography B* 1060 (2017) 325–335.
- [83] A. Goyon, M. Excoffier, M.-C. Janin-Bussat, B. Bobaly, S. Fekete, D. Guillarme, A. Beck, Determination of isoelectric points and relative charge variants of 23 therapeutic monoclonal antibodies, *Journal of Chromatography B* 1065-1066 (2017) 119 – 128.
- [84] F. Füssl, A. Trappe, K. Cook, K. Scheffler, O. Fitzgerald, J. Bones, Comprehensive characterisation of the heterogeneity of adalimumab via charge variant analysis hyphenated on-line to native high resolution orbitrap mass spectrometry, *mAbs* 11 (2019) 116–128.
- [85] Y. Xu, D. Wang, B. Mason, T. Rossomando, N. Li, D. Liu, J. K. Cheung, W. Xu, S. Raghava, A. Katiyar, C. Nowak, T. Xiang, D. D. Dong, J. Sun, A. Beck, H. Liu, Structure, heterogeneity and developability assessment of therapeutic antibodies, *mAbs* 11 (2019) 239–264.
- [86] A. Beck, H. Liu, Macro- and micro-heterogeneity of natural and recombinant IgG antibodies, *Antibodies* 8 (1) (2019) 18–40.
- [87] L. Tsonev, A. Hirsh, Theory and applications of a novel ion exchange chromatographic technology using controlled pH gradients for separating proteins on anionic and cationic stationary phases, *Journal of Chromatography A* 1200 (2008) 166–82.

- [88] H. R. Reese, C. C. Shanahan, J. Lembo, L. Tsonev, A. Hirsh, S. Menegatti, Chromatographic assay to probe the binding energy and mechanisms of homologous proteins to surface-bound ligands, *Journal of Chromatography B* 1136 (2020) 121927.
- [89] S. Fekete, A. Beck, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 113 (2015) 43–55.
- [90] A. Farjami, M. Siahi-Shadbad, P. Akbarzadehlaleh, O. Molavi, Development and validation of salt gradient CEX chromatography method for charge variants separation and quantitative analysis of the IgG mAb-cetuximab, *Chromatographia* (2018) 1649–1660.
- [91] V. Joshi, V. Kumar, A. S. Rathore, Rapid analysis of charge variants of monoclonal antibodies using non-linear salt gradient in cation-exchange high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1406 (2015) 175 – 185.
- [92] X. Kang, D. Frey, Chromatofocusing using micropellicular column packings with computer-aided design of the elution buffer composition, *Analytical Chemistry* 74 (2002) 1038–1045.
- [93] Y. Liu, S. Deldari, H. Guo, C. R. Narahari, R. C. Bates, R. Swanson, S. Ghose, Z. J. Li, D. D. Frey, Evaluation of chromatofocusing as a capture method for monoclonal antibody products, *Journal of Chromatography A* 1568 (2018) 108 – 122.
- [94] Y. Liu, D. J. Anderson, Gradient chromatofocusing high-performance liquid chromatography I. practical aspects, *Journal of Chromatography A* 762 (1997) 207 – 217.
- [95] M. Talebi, A. Nordborg, A. Gaspar, N. A. Lacher, Q. Wang, X. Z. He, P. R. Haddad, E. F. Hilder, Charge heterogeneity profiling of monoclonal antibodies using low ionic strength ion-exchange chromatography and well-controlled pH gradients on monolithic columns, *Journal of Chromatography A* 1317 (2013) 148 – 154.
- [96] J. C. Rea, G. T. Moreno, Y. Lou, D. Farnan, Validation of a pH gradient-based ion-exchange chromatography method for high-resolution monoclonal antibody charge variant separations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 54 (2011) 317 – 323.
- [97] L. Zhang, T. Patapoff, D. Farnan, B. Zhang, Improving pH gradient cation-exchange chromatography of monoclonal antibodies by controlling ionic strength, *Journal of Chromatography A* 1272 (2013) 56 – 64.

- [98] C. A. Cassou, H. J. Sterling, A. C. Susa, E. R. Williams, Electrothermal supercharging in mass spectrometry and tandem mass spectrometry of native proteins, *Analytical Chemistry* 85 (2012) 138–146.
- [99] M. Alvarez, G. Tremintin, J. Wang, M. Eng, Y.-H. Kao, J. Jeong, V. T. Ling, O. V. Borisov, On-line characterization of monoclonal antibody variants by liquid chromatography-mass spectrometry operating in a two-dimensional format, *Analytical Biochemistry* 419 (2011) 17–25.
- [100] S. Buckenmaier, Agilent 1290 infinity 2D-LC solution for multiple heart-cutting, technical overview, a (2015) 181–188.
- [101] A. Goyon, V. D’Atri, O. Colas, S. Fekete, A. Beck, D. Guillarme, Characterization of 30 therapeutic antibodies and related products by size exclusion chromatography: Feasibility assessment for future mass spectrometry hyphenation, *Journal of Chromatography B* 1065-1066 (2017) 35–43.
- [102] A. Lazar, L. Wang, W. Blättler, G. Amphlett, J. Lambert, W. Zhang, Analysis of the composition of immunoconjugates using size-exclusion chromatography coupled to mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM* 19 (2005) 1806–1814.
- [103] A. Etkirch, O. Hernandez-Alba, O. Colas, A. Beck, D. Guillarme, S. Sanglier-Cianférani, Hyphenation of size exclusion chromatography to native ion mobility mass spectrometry for the analytical characterization of therapeutic antibodies and related products, *Journal of Chromatography B* 1086 (2018) 176–183.
- [104] A. Etkirch, A. Goyon, O. Hernandez-Alba, F. Rouviere, V. D’Atri, C. Dreyfus, J.-F. Haeuw, H. Diemer, A. Beck, S. Heinisch, D. Guillarme, S. Sanglier-Cianférani, A novel online four-dimensional SEC×SEC-IM×MS methodology for characterization of monoclonal antibody size variants, *Analytical Chemistry* 90 (2018) 13929–13937.
- [105] A. Goyon, L. Sciascera, A. Clarke, D. Guillarme, R. Pell, Extending the limits of size exclusion chromatography: Simultaneous separation of free payloads and related species from antibody drug conjugates and their aggregates, *Journal of Chromatography A* 1539 (2018) 19–29.
- [106] Y. Li, C. Gu, J. Gruenhagen, K. Zhang, P. Yehl, N. Chetwyn, C. Medley, A size exclusion-reversed phase two dimensional-liquid chromatography methodology for stability and small molecule related species in antibody drug conjugates, *Journal of Chromatography A* 1393 (2015) 81–88.

- [107] D. Nardiello, M. T. Melfi, C. Pignatelli, D. Centonze, Enhancing online protein isolation as intact species from soy flour samples by actively modulated two-dimensional liquid chromatography (2D-LC), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 179 (2020) 112976.
- [108] B. Chen, Z. Lin, A. Alpert, C. Fu, Q. Zhang, W. Pritts, Y. Ge, Online hydrophobic interaction chromatography-mass spectrometry for the analysis of intact monoclonal antibodies, *Analytical Chemistry* 90 (2018) 1885–1891.
- [109] R. Birdsall, H. Shion, F. Kotch, A. Xu, T. Porter, W. Chen, A rapid on-line method for mass spectrometric confirmation of a cysteine-conjugated antibody-drug-conjugate structure using multidimensional chromatography, *mAbs* 7 (2015) 1036–1044.
- [110] A. Ehkirch, V. D’Atri, F. Rouvière, O. Hernandez-Alba, A. Goyon, O. Colas, M. Sarrut, A. Beck, D. Guillarme, S. Heinisch, S. Sanglier-Cianférani, An online four-dimensional HIC×SEC-IM×MS methodology for proof-of-concept characterization of antibody drug conjugates, *Analytical Chemistry* 90 (2017) 1578–1586.
- [111] D. R. Stoll, D. C. Harmes, J. Danforth, E. Wagner, D. Guillarme, S. Fekete, A. Beck, Direct identification of rituximab main isoforms and subunit analysis by online selective comprehensive two-dimensional liquid chromatography–mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 87 (2015) 8307–8315.
- [112] P. K. Sankaran, P. G. Kabadi, C. G. Honnappa, M. Subbarao, H. V. Pai, L. Adhikary, D. V. Palanivelu, Identification and quantification of product-related quality attributes in bio-therapeutic monoclonal antibody via a simple, and robust cation-exchange HPLC method compatible with direct online detection of UV and native ESI-QTOF-MS analysis, *Journal of Chromatography B* 1102-1103 (2018) 83 – 95.
- [113] Y. Leblanc, C. Ramon, N. Bihoreau, C. Guillaume, Charge variants characterization of a monoclonal antibody by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry: Case study after a long-term storage at +5°C, *Journal of Chromatography B* 1048 (2017) 130–139.
- [114] L. Konermann, Addressing a common misconception: Ammonium acetate as neutral pH “buffer” for native electrospray mass spectrometry, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* 28 (2017) s13361–017–1739–3.
- [115] A. Bailey, G. Han, W. Phung, P. Gazis, J. Sutton, J. L. Josephs, W. Sandoval, Charge variant native mass spectrometry benefits mass precision and dynamic range of monoclonal antibody intact mass analysis, *mAbs* 10 (2018) 1–12.

- [116] Y. Yan, A. Liu, S. Wang, T. Daly, N. Li, Ultrasensitive characterization of charge heterogeneity of therapeutic monoclonal antibodies using strong cation exchange chromatography coupled to native mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 90 (2018) 13013–13020.
- [117] F. Füssl, K. Cook, K. Scheffler, A. Farrell, S. Mittermayr, J. Bones, Charge variant analysis of monoclonal antibodies using direct coupled pH gradient cation exchange chromatography to high-resolution native mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 90 (2018) 4669–4676.
- [118] J. B. Hedges, S. Vahidi, X. Yue, L. Konermann, Effects of ammonium bicarbonate on the electrospray mass spectra of proteins: evidence for bubble-induced unfolding, *Analytical Chemistry* 85 (2013) 6469–6476.
- [119] S. Ippoliti, A. Schmudlach, M. A. Lauber, Y. Q. Yu, Online IEX-MS of mAb charge variants using a BioResolve SCX mAb column, IonHance CX-MS pH concentrates, and BioAccord system, *Waters Application Note* (2019) 1–6.
- [120] F. Helfferich, B. J. Bennett, Weak electrolytes, polybasic acids, and buffers in anion exchange columns I. Sodium acetate and sodium carbonate systems, *Reactive Polymers, Ion Exchangers, Sorbents* 3 (1984) 51 – 66.
- [121] S. Ghose, T. Mcnerney, B. Hubbard, PH transitions in ion-exchange systems: Role in the development of a cation-exchange process for a recombinant protein, *Biotechnology Progress* 18 (2002) 530–537.
- [122] M. L. Jansen, G. W. Hofland, J. Houwers, A. J. J. Straathof, L. A. M. van der Wielen, K. C. A. M. Luyben, W. J. J. van den Tweel, Effect of pH and concentration on column dynamics of weak electrolyte ion exchange, *AIChE Journal* 42 (1996) 1925–1937.
- [123] P. Singare, Studies of uni-univalent ion exchange reactions using strongly acidic cation exchange resin Amberlite IR120, *Natural Science* 01 (2009) 124–128.
- [124] D. Muraviev, A. Gonzalo, M. Valiente, Ion exchange on resins with temperature-responsive selectivity: III. influence of complex formation stoichiometry on temperature dependence of resin selectivity, *Journal of Chromatography A* 868 (2000) 143 – 152.
- [125] P. Singare, D. R. Lokhande, V. Pattebahadur, Ion exchange equilibrium study using strongly acidic cation exchange resins indion-225, *International Journal of Chemical Sciences* 7 (2009) 722–730.

- [126] F. Helfferich, B. Bennett, Weak electrolytes, polybasic acids, and buffers in anion exchange columns. II. Sodium acetate chloride system, *Solvent Extraction and Ion Exchange* 2 (1984) 1151–1184.
- [127] S. Golshan-Shirazi, G. Guiochon, *The Equilibrium-Dispersive Model of Chromatography*, Springer Netherlands, Dordrecht, 1992, pp. 35–59.
- [128] T. Ahamed, B. Kungah Nfor, P. Verhaert, G. Dedem, L. Wielen, M. Eppink, E. Sandt, M. Ottens, PH-gradient ion-exchange chromatography: An analytical tool for design and optimization of protein separations, *Journal of Chromatography. A* 1164 (2007) 181–188.
- [129] S. Fekete, A. Beck, J. Fekete, D. Guillarme, Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, part I: Salt gradient approach, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 102 (2015) 33 – 44.
- [130] L. R. Snyder, J. W. Dolan, *High-Performance Gradient Elution: Ion-Exchange Chromatography*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, 2007.
- [131] B. Pirok, S. R.A. Molenaar, R. E. van Outersterp, P. J. Schoenmakers, Applicability of retention modelling in hydrophilic-interaction liquid chromatography for algorithmic optimization programs with gradient-scanning techniques, *Journal of Chromatography A* 1530 (2017) 104–111.
- [132] J. E. Madden, P. R. Haddad, Critical comparison of retention models for optimisation of the separation of anions in ion chromatography: I. non-suppressed anion chromatography using phthalate eluents and three different stationary phases, *Journal of Chromatography A* 829 (1998) 65–80.
- [133] M. Zafari, M. Panjepour, M. Emami, M. Meratian, 3D numerical investigation of fluid flow through open-cell metal foams using micro-tomography images, *Journal of Porous Media* 17 (2014) 1019–1029.
- [134] A. Trappe, F. Füssl, S. Carillo, I. Zaborowska, P. Meleady, J. Bones, Rapid charge variant analysis of monoclonal antibodies to support lead candidate biopharmaceutical development, *Journal of Chromatography B* 1095 (2018) 166 – 176.
- [135] K. Ohta, K. Tanaka, B. Paull, P. R. Haddad, Retention behavior of alkali, alkaline earth and transition metal cations in ion chromatography with an unmodified silica gel column, *Journal of Chromatography A* 770 (1997) 219 – 227.

Tézispontok

1. A kereskedelmi forgalomban kapható pH-gradiens pufferrendszerek alternatívájaként 2-(N-morfolino)-etánszulfonsav (MES) és 1,3-diamino-2-propanol (DAP), valamint a citromsav, 2-ciklohexilamino-etánszulfonsav (CHES) és nátrium-hidroxid (NaOH) tartalmú mozgófázis rendszert dolgoztam ki monoklonális antitestek (mAb-ok) kationcserés elválasztására. A pH-gradienst sógradienssel kiegészítve az optimalizálható paraméterek körét kibővítettem és meghatároztam a megfelelő körülményeket daratumumab és cetuximab alegységeinek elválasztásához.
2. Ammónium-acetát és ammónium-karbonát alapú mozgófázis rendszert fejlesztettem ki és optimalizáltam tömegspektrométer-kompatibilis kationcserés elválasztásokhoz. A legjobb elválasztás 10 mM ammónium-acetát és 10 mM ecetsav tartalmú A-eluens és 50 mM ammónium-acetát és 50 mM ammónium-karbonát tartalmú B-eluens esetén érhető el. A kidolgozott eluens rendszer alkalmazhatóságát inzulin ioncserekromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (IEX-MES) analízisével igazoltam.
3. A kationcserélő oszlopok szisztematikus összehasonlításával értékeltem a kereskedelmi forgalomban kapható kationcserélő oszlopok retenciós tulajdonságát és hatékonyságát. Megállapítottam, hogy a módszer kidolgozásakor az álló- és a mozgófázis együttes vizsgálata szükséges az optimális körülmények kialakításához. Ezek figyelembevételével gyors (< 4 perc) analízist dolgoztam ki emésztett mAb-ok töltésvariánsainak elválasztására.
4. Az álló- és mozgófázisok különböző kombinációja során az oszlopot elhagyó effluens pH-jának online monitorozásával megállapítottam, hogy a mozgófázis mellett az állófázis is jelentős szerepet játszik a pH-válasz kialakításában. A citromsav/CHES alapú mozgófázis esetében igazoltam, hogy a pH-válasz függvényen tapasztalható meredeken emelkedő szakaszokon az ebbe a tartományba eső izoelektromos pontú fehérjék elválasztása nem valósítható meg. A lineáris pH-választ nyújtó MES/DAP eluens rendszer alkalmazásával a mAb-ok jó szelektivitással elválaszthatók.

Theses

1. I have developed mobile phases containing 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)/1,3-diamino-2-propanol (DAP) and the citric acid (CA)/2-(cyclohexylamino)-ethanesulfonic acid (CHES)+sodium hydroxyde (NaOH) as alternative pH gradient buffer systems for the cation exchange separation of monoclonal antibodies (mAbs). The pH gradient supplemented with salt gradient the repository of the parameters can be expanded. I have determined the optimal parameters for the separation of daratumumab and cetuximab subunits.
2. I have developed ammonium acetate and ammonium carbonate based volatile buffer system and optimized for mass spectrometry compatible ion exchange chromatography (IEX-MS). The best separation can be achieved applying 10 mM ammonium acetate and 10 mM acetic acid as eluent A and 50 mM ammonium acetate and 50 mM ammonium carbonate as eluent B. I have proved the applicability of this method by the analysis of insulin.
3. I have evaluated the recent cation exchanger stationary phases by the systematic comparison of their retention properties and efficiency. I have ascertained, that the combination of mobile and stationary phases should be considered when developing a method. Taking the observations into consideration I have developed a fast analytical method (< 4 min) for the separation of mAb charge variants.
4. I studied the pH of the effluent using different combination of mobile and stationary phases. During the online monitoring of the effluent steeply rising ranges can be observed in the pH response. I proved for the case of CA/CHES system that the separation of mAbs with isoelectric points close to this pH range is not feasible. On the example of the MES/DAP system I have presented the importance of the proper choice of the phases. I have justified that beside the mobile phase the stationary phase impacts the generation of pH response as well.

A szerző tudományos munkássága

I. Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó publikációk

1. **Evelin Farsang**, Amarande Murisier, Krisztián Horváth, Alain Beck, Róbert Kormány, Davy Guillarme, Szabolcs Fekete: Tuning selectivity in cation-exchange chromatography applied for monoclonal antibody separations, part 1: Alternative mobile phases and fine tuning of the separation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 168 (2019) 138-147, DOI:10.1016/j.jpba.2019.02.024, IF:2,831
2. **Evelin Farsang**, Amarande Murisier, Krisztián Horváth, Olivier Colas, Alain Beck, Davy Guillarme, Szabolcs Fekete: Optimization of MS-Compatible Mobile Phases for IEX Separation of Monoclonal Antibodies, *LCGC Europe* 32 (2019) 29-34
3. **Farsang Evelin**, Fekete Szabolcs, Horváth Krisztián: Tömegspektrométer-barát mozgófázis alkalmazása terápiás fehérjék ioncserés elválasztásához, *Kromatográfus* VI. évfolyam 1. szám, 24-27
4. Amarande Murisier, **Evelin Farsang**, Krisztián Horváth, Matthew Lauber, Alain Beck, Davy Guillarme, Szabolcs Fekete: Tuning selectivity in cation-exchange chromatography applied for monoclonal antibody separations, part 2: Evaluation of recent stationary phases, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 172 (2019) 320-328, DOI:10.1016/j.jpba.2019.05.011, IF:2,831
5. **Evelin Farsang**, Krisztián Horváth, Alain Beck, Qi Wang, Matthew Lauber, Davy Guillarme, Szabolcs Fekete: Impact of the column on effluent pH in cation exchange pH gradient chromatography, a practical study, *Journal of Chromatography A* 1626 (2020) 461350, DOI: /10.1016/j.chroma.2020.461350, IF: 3.858
6. **Evelin Farsang**, Davy Guillarme, Jean-Luc Veuthey, Alain Beck, Matthew Lauber, Andrew Schmudlach, Szabolcs Fekete: Coupling non-denaturing chromatography to mass spectrometry for the characterization of monoclonal antibodies and related products, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 185 (2020) 113207, DOI: /10.1016/j.jpba.2020.113207, IF:2.983

II. Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó konferencia előadások és poszterek

Nemzetközi konferencián bemutatott előadások és poszterek

1. **Evelin Farsang**, Amarande Murisier, Krisztián Horváth, Alain Beck, Róbert Kormány, Davy Guillarme, Szabolcs Fekete: Screening of Alternative Mobile Phases

and Fine Tuning of Cation-exchange Separation of Monoclonal Antibodies, *Ninth International Symposium on the Separation and Characterization of Natural and Synthetic Macromolecules (SCM-9)*, Amsterdam, The Netherlands, 30 January - 1 February, 2019

2. **Evelin Farsang**, Amarande Murisier, Krisztián Horváth, Alain Beck, Róbert Kormány, Davy Guillaume, Szabolcs Fekete: Alternative mobile phases in cation-exchange chromatography applied for separation of monoclonal antibodies, *48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC-2019)*, Milan, Italy, 16-20 June, 2019
3. **Evelin Farsang**, Szabolcs Fekete, Krisztián Horváth: Cation-exchange chromatography for the separation of monoclonal antibodies, *International Conference on Advances in Pharmaceutical Drug Development, Quality Control and Regulatory Sciences (DDRS 2021)*, Margaret Island, Budapest, 15-17 November, 2021 ["Abstract accepted"]

Hazai konferencián bemutatott előadások és poszterek

1. **Farsang Evelin**, Fekete Szabolcs, Horváth Krisztián: Terápiás antitestek ioncserés elválasztásának lehetőségei (szóbeli előadás), *Műszaki Kémiai Napok 2019*, Veszprém, 2019. április 16-18.
2. **Farsang Evelin**: Kromatográfiai oszlopok és eluensek a terápiás fehérjék szolgáltatásban (szóbeli előadás), *Pannon Tudományos Nap 2020*, Online konferencia, 2020. november 16-17.

III. Az értekezés tématerületét érintő publikációk

1. Peter Hajos, Diana Lukacs, **Evelin Farsang**, Krisztian Horvath: High Performance Anion Chromatography of Gadolinium Chelates, *Journal of Chromatographic Science*, 10 (2016) 1752-1760, DOI: 10.1093/chromsci/bmw133, IF:0.984
2. **Evelin Farsang**, Violetta Gaál, Ottó Horváth, Erzsébet Bárdos, Krisztián Horváth: Analysis of Non-Ionic Surfactant Triton X-100 Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography and Mass Spectrometry, *Molecules*, 24 (2019) 1223, DOI: 10.3390/molecules24071223, IF: 3.098

IV. Az értekezés tématerületét érintő konferencia előadások és poszterek

Nemzetközi konferencián bemutatott előadások és poszterek

1. **Evelin Farsang**, Szabolcs Horvath, Krisztian Horvath: Study of retention behavior of bioactive macromolecules in ultrahigh pressure liquid chromatography (poster presentation), *47th International symposium on high performance liquid phase separations and related techniques (HPLC 2017)*, Prága, Csehország, 2017. június 18-22.
2. **Evelin Farsang**, Abhijit Tarafder, Miklos Surguta, Krisztian Horvath, Fabrice Gritti: Estimation of axial variation of eluent properties using isenthalpic plots (poster presentation), *47th International symposium on high performance liquid phase separations and related techniques (HPLC 2017)*, Prága, Csehország, 2017. június 18-22.
3. **Evelin Farsang**, Abhijit Tarafder, Miklós Surguta, Krisztián Horváth, Fabrice Gritti: Effect of pressure-generated axial temperature gradient on the eluent properties in chromatography (poster presentation), *24th International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2018)*, Jasna, Szlovákia, 2018. június 17 - 20.
4. **Evelin Farsang**, Szabolcs Horváth, Krisztián Horváth: The effect of axial temperature and pressure gradients on the separation efficiencies of macromolecules (poster presentation), *24th International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2018)*, Jasna, Szlovákia, 2018. június 17 - 20.
5. **Evelin Farsang**, Szabolcs Horváth, Regina Töröcsik, Márton Szigeti, András Guttman, and Krisztián Horváth: Development of HILIC Method for Liquid Chromatographic Separation of Maltodextrins with UV Detection (poster presentation), *Ninth International Symposium on the Separation and Characterization of Natural and Synthetic Macromolecules (SCM-9)*, Amsterdam, Hollandia, 2019. január 30. február 1.
6. Szabolcs Horváth, **Evelin Farsang**, Krisztián Horváth: Theoretical study of the efficiency of HPLC columns with particle size gradient (poster presentation), *48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC-2019)*, Milano, Olaszország, 2019. június 16-20.
7. **Evelin Farsang**, Krisztián Horváth, Szabolcs Fekete: Possibilities of Cation-Exchange Chromatography in Separation of Monoclonal Antibodies (oral presentation), *12th*

Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods 2019, Siófok, 2019. szeptember 11-13.

Hazai konferencián bemutatott előadások és posztterek

1. Horváth Krisztián, Horváth Szabolcs, **Farsang Evelin**, Surguta Miklós, Lukács Diána: Axiális hőmérséklet gradiens hatása kromatográfias elválasztások hatékonyságára (poszter), *Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2016*, Kecskemét, 2016. november 9-11.
2. Horváth Krisztián, Szakács Máté, **Farsang Evelin**: Numerikus módszer fejlesztése folyadékkromatográfias izoterma meghatározására inverz módszer alkalmazásával (poszter), *Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2016*, Kecskemét, 2016. november 9-11.
3. **Farsang Evelin**, Horváth Krisztián: A mozgófázis fizikai-kémiai tulajdonságainak meghatározása folyadékkromatográfias oszlopokban (poszter), *Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2018*, Tapolca, 2018. november 8-10.
4. **Farsang Evelin**: Nemionos felületaktív anyagok vizsgálata UHPLC-MS módszerrel (szóbeli előadás), *XIV. Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai Konferencia 2019*, Balatonszárszó, 2019. november 11–13.

Függelék

1. táblázat. Az 1 mg/mL intakt mAb minták elkészítése 100 μ L térfogathoz

	Kereskedelmi név	Konc. (mg/mL)	V_{mAb} μ L	V_{vz} μ L
Bevacizumab	Avastin	25	4	96
Cetuximab	Erbitux	5	20	80
Daratumumab	Darzalex	20	5	95
Eculizumab	Soliris	10	10	90
Infliximab	Remicade	10	10	90
NIST mAb	NIST mAb RM 8671	10	10	90
Obinutuzumab	Gazyvaro	25	4	96
Panitumumab	Vectibix	20	5	95
Pembrolizumab	Keytruda	25	4	96
Pertuzumab	Perjeta	30	3,3	96,7
Ramucirumab	Cyramza	10	10	90
Reslizumab	Cinquaero	10	10	90
Rituximab	MabThera	10	10	90
Trastuzumab	Herceptin	21	4,7	95,3

2. táblázat. A mAb-ok retenciós ideje a B-eluens összetételének függvényében az ammónium-acetát/ammónium-karbonát rendszer alkalmazásával.

Ammónium-acetát	Ammónium karbonát	Bevacizumab	Daratumumab	Rituximab
10	10	10,374	10,75	10,447
10	25	10,11	10,118	10,786
10	50	8,132	8,189	9,499
10	100	5,319	5,115	6,47
25	10	10,305	10,518	10,786
25	25	10,079	10,009	10,808
25	50	7,736	7,25	8,855
25	100	5,169	4,752	5,979
50	10	10,377	10,223	10,54
50	25	8,507	8,319	9,723
50	50	6,856	6,213	7,553
50	100	4,636	4,416	5,235
100	10	10,011	9,600	10,856
100	25	8,731	8,07	9,505
100	50	6,992	6,359	7,679
100	100	4,958	4,563	5,612

3. táblázat. Az intakt és emésztett mAb-ok sógradiens és szimultán pH- és sógradiens módban történő elválasztásakor kapott csúcskapacitás értékek a különböző oszlopokon.

Komponens	BioPro SP-F		BioZen WCX		BioResolve SCX		ProPac Elite WCX	
	Sógrad	MES/DAP	Sógrad	MES/DAP	Sógrad	MES/DAP	Sógrad	MES/DAP
Bevacizumab	153	94	108	103	124	147	105	143
Daratumumab	127	85	73	92	129	123	87	129
Rituximab	144	50	97	77	146	59	113	40
Trastuzumab	121	84	77	47	140	164	92	74
NIST mAb	152	54	86	67	167	63	120	86
Daratumumab scFc	199	191	134	118	163	183	142	134
Daratumumab Fab'2	84	70	64	61	88	72	61	88
Infliximab Fab'2	84	61	64	44	94	66	68	69
NIST mAb scFc	182	164	120	95	132	168	138	118
NIST mAb Fab'2	121	70	88	40	142	102	113	106
Átlag	137	92	91	74	133	115	104	99

Köszönetnyilvánítás

Gyakori jelenségnek tűnik, hogy a doktoranduszok vért izzadva jutnak el a disszertációjuk benyújtásáig. Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Horváth Krisztiánnak**, hogy nekem ezt nem kellett átélnem. Köszönöm neki, hogy anno felhívott, hogy jelentkezsek a PhD képzésre, és hogy szakmailag és emberileg támogatást nyújt azóta is.

Köszönöm **Dr. Fekete Szabolcsnak**, hogy bevezetett a monoklonális antitestek világába és hogy a Genfben töltött hónapok alatt mindenben számíthattam a segítségére.

Köszönettel tartozom kollégáimnak, **Dr. Lukács Diánának** és **Dr. Simon Józsefnek** a szakmai kérdésekben nyújtott segítségükért. Köszönöm **Gaal Violettnak** a Tritonos méréseket, valamint hogy mindig meghallgatta a panaszaimat.

Köszönöm édesapámnak, **Farsang Róbertnek**, hogy mindig mindenben támogatott és hogy biztos háttérrel könnyíti meg mindennapjaimat, valamint páromnak, **Tóth Andrásnak**, hogy elvisel, szeret és van kihez hazamenni. Köszönöm öcsémnek, **Farsang Róbertnek** a szakmai beszélgetéseket és hogy lehet menni hozzá tarhálni, ha valami kell. Köszönöm anyukám, **Kamondy Renáta** lelkes támogatását.

Köszönöm **Tóthné Stupián Anikónak** a belém vetett rendületlen bizalmát és hogy megtestesíti az "erős nő" mintaképét az életemben.

Köszönöm a **Mókuscsoportnak** a sok kalandot és a töretlen lelkesedést. Külön szeretném megköszönni **Felsőőri-Nagy Péternek** a folyamatos energiautánpótlást, valamint **Vétek Bencének** a villámgyorsan megírt olasz nyelvű absztraktot.

Köszönettel tartozom továbbá a Nemzeti Kiválósági Program többszöri támogatásáért és a Campus Hungary Program ösztöndíjáért, melynek köszönhetően külföldi szakmai tapasztalatokkal is gazdagodhattam doktoranduszi tanulmányaim alatt.