

Streszczenie

Niniejsza praca doktorska dotyczy procesu oczyszczania i regulacji składu rekombinowanych przeciwciał monoklonalnych (tzw. mAbs – *ang. monoclonal antibodies*) stosowanych jako leki biologiczne. Ze względu na wysoki koszt oraz rygorystyczne wymagania dotyczące czystości leków procesy te nadal wymagają udoskonalenia.

Istotnym problemem technologicznym w produkcji przeciwciał jest mikro-heterogeniczność otrzymanywanego produktu, czyli niejednorodność strukturalna białka, która może wpływać na jego aktywność biologiczną, stabilność oraz własności biofizyczne. Mikro-heterogeniczność przejawia się w powstawaniu wariantów mAbs, które różnią się masą cząsteczkową, ładunkiem lub hydrofobowością cząsteczki. Głównym źródłem mikro-heterogeniczności mAbs są tzw. warianty ładunkowe, które różnią się od siebie punktem izoelektrycznym (pI). Doniesienia literaturowe wskazują, że warianty ładunkowe o niższej wartości pI, tj. tzw. warianty kwasowe, zazwyczaj wykazują niższą aktywność biologiczną niż pozostałe warianty przeciwciała. Podobieństwo struktury chemicznej i ładunku wariantów powoduje, że są one bardzo trudne do rozdzielenia.

W cyklu przeprowadzonych badań opracowano metodę regulacji zawartości wariantów kwasowych przeciwciał monoklonalnych z udziałem chromatografii jonowymiennej, która jest jedną z najczęściej stosowanych technik izolacji i oczyszczania przeciwciał. Pracę zrealizowano w kilku etapach.

W pierwszym etapie pracy zbadano zjawisko agregacji przeciwciał na złożach do chromatografii jonowymiennej. Opracowano metodę przesiewowej oceny stabilności przeciwciał na złożach chromatograficznych przy użyciu różnicowej fluorymetrii skaningowej oraz aparatury do PCR (*ang. polymerase chain reaction*). Pomiary wartości temperatury przejścia fazowego (tzw. temperatury topnienia) umożliwiły ocenę stabilności przeciwciał na złożach. Wykonano je dla dwóch przeciwciał w różnych warunkach adsorpcyjnych, a poziom destabilizacji ich struktury zależał od rodzaju złoża i warunków wiązania. Ponadto ustalono, że spadek wartości temperatury topnienia poniżej wartości krytycznej (ok. 30°C) świadczy o niekorzystnych zmianach w strukturze białek zaadsorbowanych na złożu. Metoda ta może służyć zarówno do badań stabilności zaadsorbowanych przeciwciał, jak i do szybkich badań przesiewowych złożów oraz dostosowywania warunków operacyjnych procesu.

W kolejnym etapie badań zbadano wpływ przestrzeni pozakolumnowych (ECV – *Extra Column Volume*) na elucję białek w układzie chromatograficznym. Badania wstępne nad opracowaniem rozdzielania chromatograficznego prowadzi się przy zastosowaniu min-kolumn o bardzo małych wymiarach. Powoduje to wzrost udziału ECV w stosunku do zasadniczej objętości złoża w chromatograficznym układzie aparaturowym. Powyższe pociąga za sobą deformację kształtu profili stężenia przeciwciał w układzie chromatograficznym w postaci „ogonowania” pików i asymetrii krzywych wyjścia. Utrudnia to prawidłową interpretację otrzymanych danych eksperymentalnych i przenoszenie skali procesu.

W niniejszej pracy przeanalizowano wpływ występowania ECV na retencję kilku mało-i-wielkocząsteczkowych związków modelowych oraz ich mieszanin. Zjawisko deformacji profili stężenia wynikało z nierównomiernego rozkładu prędkości w ECV i zależało od masy cząsteczkowej badanego związku. Ponadto typ układu iniekcyjnego wpływał na kształt otrzymanych chromatogramów. Do opisu tego zjawiska zastosowano model matematyczny, który odtwarzał profile stężenia w zakresie stosunkowo niskich prędkości fazy ruchomej charakterystycznych dla chromatografii białek.

W końcowym etapie badań opracowano metodę optymalizacji zawartości wariantów ładunku przeciwciał monoklonalnych na złożach do chromatografii jonowymiennej. Badania prowadzono w warunkach silnego przeładowania kolumny chromatograficznej masą białka w gradiencie pH. W wyniku tego procesu otrzymano dwie frakcje, w których jedna, w zależności od ładunku wypadkowego złoża, wzbogacona była o warianty kwasowe (frakcja odpadowa), natomiast druga zubożona w te warianty (frakcja produktu). Zastosowanie chromatografii jonowymiennej pozwoliło na regulację zawartości wariantów kwasowych we frakcji produktu, a zastosowanie recyklu frakcji odpadowej pozwoliło na zwiększenie wydajności prowadzonego procesu. Do ilościowego opisu procesu wykorzystano model dynamiki kolumny chromatograficznej, w którym uwzględniono wpływ ECV na przebieg rozdzielania.

Praca doktorska opiera się na cyklu trzech spójnych tematycznie artykułów, które zostały opublikowane w renomowanym czasopiśmie „Journal of Chromatography A”. Wyniki przeprowadzonych badań uzupełniają obecny stan wiedzy na temat oczyszczania przeciwciał monoklonalnych, a zaprezentowane metody mogą być wykorzystane w przemyśle biofarmaceutycznym.

Summary

This dissertation concerns the process of purification and regulation of the composition of recombinant monoclonal antibodies (mAbs) used as biological drugs. Due to high cost and stringent requirements for drug purity, purification processes still need to be improved.

A significant technological problem in antibody production is micro-heterogeneity of the obtained product, i.e., the structural heterogeneity of the protein, which can affect its biological activity, stability, and biophysical properties. Micro-heterogeneity is manifested in the formation of variants of mAbs that differ in molecular weight, charge, or hydrophobicity of the molecule. The main source of micro-heterogeneity of mAbs is formation of the charge variants, which differ in their isoelectric point. The similarity of the chemical structure and charge of the variants makes them very difficult to separate. Literature reports indicate that variants with a lower isoelectric point, i.e., the so-called acid variants, usually show lower biological activity than the other antibody variants.

In this work, a method for regulation of the content of acid variants of monoclonal antibodies with the use of ion-exchange chromatography was developed. Ion exchange chromatography is one of the most widely used techniques for the isolation and purification of antibodies. The research was performed in a few stages.

In the first stage of the work, the phenomenon of mAb aggregation in ion-exchange chromatography media was investigated. A method for high-throughput screening of the mAb stability on the chromatographic resins using differential scanning fluorimetry and PCR (*ang. polymerase chain reaction*) equipment has been developed. Measurements of the phase transition temperature, known as the melting point, enabled the evaluation of mAb stability adsorbed on the resins. The method was verified for two mAbs adsorbed under different conditions, and the level of destabilization of their structure depended on the type of the resin and the bonding conditions. Moreover, it was found that the drop in the melting point, below the critical value (approx. 30°C), indicated unfavorable changes in the structure of adsorbed proteins. This method can be used both for research on the stability of adsorbed mAbs, as well as for fast screening of the resins and adjusting the operating conditions of the process.

In the next stage of the work, the effect of extra column volumes (ECV) on the elution of proteins in the chromatographic system was investigated. Preliminary development of chromatographic separation is performed using mini-columns of very small dimensions. It results in increase in the ratio of ECV to the bed volume in the column and

is a cause of deformations of mAb profiles in the chromatographic system in the form of peak tailing and asymmetry of breakthrough curves. This makes difficult to interpret the obtained experimental data and transfer the scale of the process.

Therefore, in this stage, the influence of the presence of ECV on the retention of several low- and high-molecular model compounds and their mixtures were analyzed. The phenomenon of deformation of the concentration profiles resulted from the uneven velocity distribution in the ECV and depended on the molecular weight of the tested compound. Moreover, the type of the injection system influenced the shape of the obtained chromatograms. A mathematical model was used to describe that phenomenon. The model reproduced the concentration profiles in the range of relatively low mobile phase velocities, characteristic for the protein chromatography.

Finally, a method for optimization of the content of mAb charge variants has been developed using ion-exchange chromatography. The experiments were carried out under strong mass-overloading conditions using pH gradient. As a result, two fractions of column effluent were obtained, one of which was enriched with acidic variants (the wasted fraction), and another one depleted with these variants (the product fraction). The use of ion exchange chromatography made possible to adjust the content of acidic variants in the product fraction, whereas recycling of the wasted fraction allowed increase in the efficiency of the process.

The doctoral thesis is based on a cycle of three thematically coherent articles published in a renowned journal „Journal of Chromatography A”. The results of the performed research supplement the state of the art in the purification of mAbs and the methods presented have the potential to be applied in biopharmaceutical industry.