

Aspekte der Produktaufreinigung und -analytik in der Tierzellkultivierung

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Alina Gonzalez Salcedo (geb. Mehl), M. Sc.

2020

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Dr. Janina Bahnemann

Tag der Promotion: 17.09.2020

„ First, think. Second, dream. Third, believe. And finally, dare. “

Walt Disney

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat meine Dissertation am Institut für Technische Chemie anzufertigen.

Frau Dr. Janina Bahnemann danke ich vielmals für die Übernahme des Korreferats und Herrn PD Dr. Ulrich Krings für den Prüfungsvorsitz.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Dörte Solle und Dr. Janina Bahnemann bedanken: Für den stetigen Rat zu allen Belangen während meiner Promotion.

Ganz besonders danke ich Martina Weiß für die zahlreiche Hilfe im Labor! Ebenfalls danke ich Thorleif Hentrop und Kai Patzer für die Unterstützung bei allen Fragen zum Thema Technik. Ulrike Dreschel, Cornelia Alic und Christiane Hellwig möchte ich außerdem für die Hilfe bei allen bürokratischen Angelegenheiten danken.

Für ihre tatkräftige Mitarbeit an meinem Promotionsthema während ihrer Bachelor- und Masterarbeiten danke ich Lea Zurborg und Carlotta Kortmann.

Ein großer Dank an das komplette TCI für eine wundervolle und unvergessliche Zeit. Besonders aber an das Büro 163 (Semra, Jan, Jana, Lisa, Ole, Taieb und unseren Dauergast Svenja), in dem man immer für den anderen da ist und andauernd Kuchen mitbringt. Danke für jede Hilfe beim Korrigieren, PC-Dingen, gemeinsame Unternehmungen, ein offenes Ohr und Zeit für einen Kaffee!

Meiner Familie, besonders meinen Eltern und meinem Bruder, sowie meinen Freunden danke ich für die bedingungslose Unterstützung in den letzten Jahren – ohne euch hätte ich es niemals geschafft!

Der größte Dank gilt meinem Mann Sascha, für den starken emotionalen Rückhalt und die niemals endende Geduld!

Kurzfassung

Monoklonale Antikörper (mAk) werden in der modernen Medizin für therapeutische und diagnostische Anwendungen eingesetzt. Durch ihre hohe spezifische Bindung an krankheitsauslösende Antigene können diese identifiziert und unschädlich gemacht werden. Für den Einsatz in Medikamenten muss der hergestellte mAk hohe Reinheitsanforderungen erfüllen die nur durch einen optimalen Aufreinigungsprozess nach der Produktion erreicht werden können. Außerdem sind sehr spezifische Analysen für jeden Antikörper notwendig, um die biologische Wirksamkeit des Produktes nachweisen zu können.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein mAk, der in chinesischen Zwerghamsteroovarien (CHO)-Zellen produziert wurde, als Modellprotein verwendet. Zunächst wurden analytische Methoden zur Quantitätsbestimmung verglichen und Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt. Außerdem wurden die verschiedenen Schritte der Aufreinigung eines mAk von der Zellabtrennung bis hin zu den Polishing-Schritten optimiert und durchgeführt. Dabei eignet sich für die Zellabtrennung vor allem die Zentrifugation. Für die Durchführung des chromatographischen Protein A-Capture-Schritts besitzt eine Säule im Vergleich zu einem Membranadsorber eine höhere dynamische Bindungskapazität. Für die folgenden Polishing-Schritte wurden drei verschiedene chromatographische Methoden getestet: Die Anionenaustauschchromatographie (AEX), die Kationenaustauschchromatographie (CEX) und die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC). Dabei wurde mit der AEX die höchste Ausbeute sowie Reinheit erzielt. Durch die HIC konnte hingegen die meisten Wirtszellproteine entfernt werden. Bei der Kombination zweier Polishing-Schritte ergab die Reihenfolge aus AEX und anschließend CEX sowohl die höchste Ausbeute als auch die größte Reinheit. Für die Qualitätskontrolle wurde ein Bioaktivitätsassay etabliert, bei dem die Bindungen des mAks zu seinem Antigen genutzt wurde, um die Apoptose-auslösende Wirkung des Antigens zu unterdrücken. Es konnte gezeigt werden, dass der mAk über die jeweiligen verschiedenen Aufreinigungsschritte bioaktiv blieb.

Schlagwörter: monoklonaler Antikörper, Quantität, Stabilität, Aufreinigung, Capture-Schritt, Polishing-Schritte, Bioaktivität

Abstract

One of the greatest achievements in the field of therapeutics is the use of monoclonal antibodies (mAb). Due to their specific binding to their respective antigen, antibodies can be used for medical applications in a targeted manner. After binding to disease-causing antigens, these antigens can subsequently be made harmless. For use in drugs, mAbs have to be biologically active and highly purified. Both requires highly specific analytical methods and an optimal purification process.

In this work, a mAb produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells was used as a model protein. First, analytical methods for quantity determination were compared and stability studies were performed. Further, different types of cell separation and chromatographic purification steps were tested and optimized. It was determined that centrifugation was the most suitable method for cell separation and a Protein A column chromatography as a capture step. The column chromatography was more applicable than a membrane adsorber due to their higher dynamic binding capacity. In addition, three different chromatographic methods were tested as polishing steps: anion exchange chromatography (AEX), cation exchange chromatography (CEX) and hydrophobic interaction chromatography (HIC). The highest yield and purity were achieved with AEX. With HIC on the other hand, most of the host cell proteins were removed. By connecting two polishing steps, the efficiency of the purification can be increased. Different combinations were tested and the combination of AEX and CEX resulted in the highest yield and purity. As a quality control, a bioactivity assay was established to determine the remaining bioactivity of the mAb after purification. The mAb stayed bioactive over all purification steps.

Keywords: monoclonal antibody, quantity, stability, purification, capture step, purification steps, bioactivity

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Danksagung | II |
| Kurzfassung | III |
| Abstract | IV |
| Abkürzungsverzeichnis..... | IX |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 2 Zielsetzung | 3 |
| 3 Theoretische Grundlagen | 4 |
| 3.1 Antikörper | 4 |
| 3.1.1 Therapeutische Antikörper | 6 |
| 3.2 Herstellungsprozess monoklonaler Antikörper | 10 |
| 3.2.1 Kultivierung von Zellen zur Produktion von Antikörpern..... | 10 |
| 3.2.2 Aufreinigung von Antikörpern..... | 11 |
| 3.3 Bioaktivitätsassay..... | 13 |
| 4 Experimentelle Arbeiten..... | 16 |
| 4.1 Analytische Methoden und Stabilitätsexperimente | 16 |
| 4.1.1 Protein A-Chromatographie zur Quantitätsbestimmung | 18 |
| 4.1.2 Vergleich SEC- und Protein A-Chromatographie | 24 |
| 4.1.3 Stabilität des mAks | 26 |
| 4.1.4 Fazit der analytischen Methoden und Stabilitätsexperimente..... | 30 |
| 4.2 Aufarbeitung des mAks | 31 |
| 4.2.1 Vergleich verschiedener Zellabtrennungsschritte | 31 |
| 4.2.2 Optimierung des Capture-Schritts für IgG1-Systeme..... | 35 |
| 4.2.3 Durchführung des Capture-Schritts für IgG1-Systeme..... | 40 |
| 4.2.4 Vergleich von Säulen- und Membranadsorberchromatographie für den Capture-Schritt | 42 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 4.2.4.1 | Durchführung des Capture-Schritts..... | 43 |
| 4.2.4.2 | Durchbruchskurve der Säule und des MA..... | 45 |
| 4.2.4.3 | Produktivität, Pufferverbrauch und Effizienz..... | 48 |
| 4.2.5 | Polishing-Schritte..... | 50 |
| 4.2.5.1 | Anionenaustauschchromatographie | 51 |
| 4.2.5.2 | Kationenaustauschchromatographie | 55 |
| 4.2.5.3 | Hydrophobe Interaktionschromatographie | 59 |
| 4.2.5.4 | Hintereinanderschaltung verschiedener Polishing-Schritte..... | 63 |
| 4.2.6 | Entfernung von Wirtszellproteinen | 65 |
| 4.2.7 | Fazit der Aufreinigung des mAks | 68 |
| 4.3 | Bioaktivität des mAks | 69 |
| 4.3.1 | Animpfzellzahl..... | 71 |
| 4.3.2 | Additiv Actinomycin D | 72 |
| 4.3.3 | Wirkung des Antigens | 74 |
| 4.3.4 | Dosis-Wirkungs-Kurve des mAks | 75 |
| 4.3.5 | Bioaktivität der Aufreinigungsproben | 77 |
| 4.3.6 | Fazit des Bioaktivitätsassays | 79 |
| 5 | Zusammenfassung und Ausblick | 81 |
| 6 | References..... | 86 |
| 7 | Zusätzliche experimentelle Daten..... | 99 |
| 7.1 | Stabilität des mAks im sauren pH | 99 |
| 7.2 | AEX-Chromatogramm vor der Salzoptimierung des Äquilibrationpuffers..... | 99 |
| 7.3 | Bioaktivitätstest mit den hintereinander geschalteten Polishing-Schritten..... | 100 |
| A | Material..... | 101 |
| A.1 | Verwendete Chemikalien, Antibiotika und Kits..... | 101 |
| A.2 | Medien, Puffer und weitere Lösungen..... | 103 |
| A.3 | Verbrauchsmaterialien..... | 105 |

| | | |
|-------|--|-----|
| A.4 | Geräte, Säulen und Software | 106 |
| B | Methoden | 110 |
| B.1 | Kultivierung der CHO-Zellen | 110 |
| B.2 | Gradientengel | 110 |
| B.3 | HPLC..... | 111 |
| B.3.1 | Protein A..... | 111 |
| B.3.2 | SEC | 114 |
| B.4 | Stabilitätstest des mAbs | 116 |
| B.5 | Zellabtrennung | 116 |
| B.5.1 | Zentrifugation..... | 116 |
| B.5.2 | Tiefenfiltration | 117 |
| B.5.3 | Dynamic Body Feed..... | 117 |
| B.6 | FPLC | 117 |
| B.6.1 | Protein A..... | 118 |
| B.6.2 | Polishing-Schritte..... | 120 |
| B.6.3 | AEX..... | 120 |
| B.6.4 | CEX..... | 121 |
| B.6.5 | HIC..... | 122 |
| B.6.6 | Hintereinanderschaltung der Polishing-Schritte..... | 123 |
| B.7 | Immunoenzymatischer Assay für den Nachweis von CHO HCPs..... | 124 |
| B.8 | Bioaktivitätsassay..... | 125 |
| B.8.1 | Revitalisierung | 125 |
| B.8.2 | Passagieren und Bestimmung der Zellzahl | 125 |
| B.8.3 | Durchführung des Bioaktivitätsassay | 126 |
| B.8.4 | Mikroskopie..... | 127 |
| B.8.5 | Berechnung der mittleren effektiven Konzentration..... | 127 |
| 8 | Publikationsliste..... | 129 |

| | | |
|----|-------------------------------|-----|
| 9 | Unterstützende Arbeiten | 130 |
| 10 | Abbildungsverzeichnis | 131 |
| 11 | Tabellenverzeichnis..... | 134 |
| 12 | Lebenslauf..... | 135 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| AEX | Anionenaustauschchromatographie |
| CAD | Caspase-aktivierte DNase |
| CAM | Camptothecin |
| CEX | Kationenaustauschchromatographie |
| CHO | Chinese hamster ovary, Ovarien des chinesischen Zwerghamsters |
| CIP | Cleaning-in-place, ortsgebundene Reinigung |
| CTB | CellTiter-Blue® |
| CV | Column volume, Säulenvolumen |
| DBC | Dynamische Bindungskapazität |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DoE | Design of Experiment |
| EC ₅₀ | halbmaximale effektive Konzentration |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| Fab | Fragment antigen binding |
| FADD | Fas-assoziierte Todesdomäne |
| Fc | Fragment crystallizable |
| FDA | U.S. Food and Drug Administration |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| FPLC | Fast Protein Liquid Chromatography |
| HC | Heavy chain, schwere Kette |
| HCP | Host cell protein, Wirtszellprotein |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HER2 | Humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2 |
| HIC | Hydrophobe Interaktionschromatographie |
| HPLC | Hochleistungsflüssigchromatographie |
| IC ₅₀ | halbmaximale Inhibitorkonzentration |
| ICH | International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use |
| Ig | Immunoglobulin |
| kDa | Kilodalton |

| | |
|---------------|---|
| LC | Light chain, leichte Kette |
| LOD | Limit of Detection |
| LOQ | Limit of Quantification |
| MA | Membranadsorber |
| mAk | Monoklonaler Antikörper |
| MES | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure |
| min | Minute |
| MTX | Methotrexat |
| MV | Membranadsorbervolumen |
| NaCl | Natriumchlorid |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin |
| pH | <i>Potential hydrogenii</i> |
| pI | Isoelektrischer Punkt |
| PCC | Periodische Gegenstromverteilungschromatographie |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| SBC | Statische Bindungskapazität |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| SEC | Größenausschlusschromatographie |
| SODD | Silencer der Todesdomäne |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor α |
| TNFR-1 | Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 |
| TRADD | TNF-assoziierte Todesdomäne |
| Tris-Puffer | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Puffer |
| UV | Ultraviolett |
| WHO | World Health Organisation |

1 Einleitung

In der Corona-Pandemie des Jahres 2020 sind Antikörper die Wunderwaffe der Medizin. Sie werden bei Schnelltests eingesetzt, um nachzuweisen ob ein Patient infiziert war. Dabei dienen sie in immobilisierter Form als Fängermoleküle und weisen die gegen den Virus gebildeten Antikörper im Blut nach [1]. Der wichtigere Einsatz von Antikörpern in der Corona-Krise ist der in Therapeutika. Zum einen können Antikörper von immunen oder schon geheilten Patienten als Medikament eingesetzt werden, um die Erkrankung zu bekämpfen. Zum anderen beruht die Entwicklung neuer Medikamente gegen den Virus ebenfalls auf dem Einsatz von monoklonalen Antikörpern [2].

Bei der Corona-Pandemie spielt der zeitliche Faktor eine erhebliche Rolle, um die Pandemie effizient einzudämmen. Bevor Antikörper allerdings als Therapeutika zugelassen werden, geht eine lange Forschungs- und klinische Entwicklungszeit voran. Neben der Identifikation und Validierung des Target-Moleküls, wird nach der Produktion und Aufreinigung des Antikörpers dessen molekularbiologische Wirkung sowie die des Antigens untersucht. Außerdem wird die Pharmakokinetik betrachtet und die erforderliche Dosis beim Einsatz als Medikament bestimmt. Oft verstreichen mehrere Jahre bis ein neu erforschtes Antikörper-Medikament alle klinischen Studien durchlaufen hat [3]. Sowohl ausführliche Studien an gesunden sowie kranken Probanden werden durchgeführt, bevor der Herstellungsprozess der mAk in den Produktionsmaßstab übergeht [4, 5]. Durch behördliche Priorisierung, Zulassungsanträge die kapitelweise eingereicht werden können, neue Technologien und Vorerfahrungen mit Impfstoffprojekten wird versucht die Zeitspanne bis zur Zulassung eines Corona-Medikaments zu verkürzen [2, 6].

Therapeutische Antikörper sind die am schnellsten wachsende Gruppe an Medikamenten der letzten 25 Jahre [7, 8], allein 2017 konnte ein globaler Umsatz von 95,1 Billionen USD erzielt werden [9]. Der Grund dafür liegt in der Spezifität mit der therapeutisch eingesetzte Antikörper bestimmte Moleküle binden können und so deren krankheitsauslösende Wirkung blockieren. Das heißt, es werden gezielt krankheitsverursachende Antigene gefunden und anschließend unschädlich gemacht [10]. Bereits 1986

wurde der erste mAk auf den Markt gebracht. Das Präparat Orthoclone OKT3, mit seinem murinen IgG-Antikörper, wurde und wird immer noch zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen bei Nierentransplantationen eingesetzt [11, 12].

Bei der Produktion von monoklonalen Antikörpern kommen vor allem Säugetierzellen zum Einsatz, die den mAk mit humanähnlichen Glykosylierungsmustern herstellen, was zu einer besseren Verträglichkeit und einer höheren Wirksamkeit führt [13]. Der Aufreinigungsprozess wird für jeden mAk vor allem hinsichtlich Produktreinheit und Produktausbeute beurteilt und optimiert [14]. Nach der Produktion und Aufreinigung des Antikörpers muss außerdem dessen molekularbiologische Wirkung, zum Beispiel über einen Bioaktivitätsassay, nachgewiesen werden. Erst dann kann der monoklonale Antikörper als Therapeutikum auf dem Markt zugelassen werden [4, 5].

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Dissertation ist zum einen die qualitative und quantitative Produktanalytik eines monoklonalen Antikörpers. Zum anderen soll das durch die Tierzellkultivierung erhaltene Produkt aufgereinigt werden. Dabei kommt als Modellprodukt ein IgG-Antikörper zum Einsatz. Über die Kultivierung von chinesischen Hamster-Ovarienzellen wurde der für die Versuche nötige Zellkulturüberstand generiert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen verschiedenen analytische Methoden zur Quantitätsbestimmung des monoklonalen Antikörpers (mAk) etabliert und miteinander verglichen werden. Außerdem soll die Stabilität des mAks bei unterschiedlichen pH-Werten und Salzkonzentrationen untersucht werden.

Bei der Aufreinigung des Antikörpers sollen die Zellabtrennung sowie die unterschiedlichen chromatographischen Schritte analysiert werden. Dabei kommt als Capture-Schritt eine Protein A-Chromatographie zum Einsatz, bei der ein Vergleich zwischen einer Protein A-Säule und einem Protein A-Membranadsorber durchgeführt wird. Für die anschließenden Polishing-Schritte sollen drei verschiedene Methoden getestet werden: Die Anionenaustauschchromatographie, die Kationenaustauschchromatographie und die hydrophobe Interaktionschromatographie. Diese sollen hinsichtlich der Produktreinheit, der Ausbeute sowie der Konzentration an Wirtszellproteinen beurteilt werden. Zusätzlich soll die optimale Kombination an Aufreinigungsschritten bestimmt werden.

Außerdem soll über einen *in vitro* Assay die Bioaktivität des mAks bestimmt werden. Dazu wird zunächst ein Bioaktivitätsassay etabliert und die Bioaktivität zu verschiedenen Zeitpunkten der Aufreinigung überprüft.

3 Theoretische Grundlagen

Zur Einführung in diese Arbeit wird der theoretische Hintergrund zu monoklonalen Antikörpern erläutert. Es werden sowohl ihr schematischer Aufbau als auch ihr Einsatz in Therapeutika beschrieben. Außerdem wird der Herstellungsprozess monoklonaler Antikörper, welcher in Up- und Downstream unterteilt ist, aufgezeigt. Im Bereich der Qualitätskontrolle wird als letztes ein Einblick in die Überprüfung der Bioaktivität von Antikörpern gegeben.

3.1 Antikörper

Antikörper, auch Immunglobuline (Ig), sind Proteine der Klasse der Globuline, die bei der Immunabwehr des Menschen eine entscheidende Rolle spielen. Sie werden durch B-Lymphozyten produziert und binden hoch spezifisch an Antigene. Antigene sind für den Organismus Fremdkörper wie Giftstoffe oder Krankheitserreger. Die Bindung zwischen Antikörper und Antigen löst eine Immunantwort aus, die zur Bekämpfung der Fremdkörper führt [15]. Diese Bindung erfolgt zwischen dem Epitop des Antigens und dem Paratop des Antikörpers, welche die jeweils bindenden Abschnitte darstellen.

Es werden zwei Arten von Antikörpern unterschieden, die monoklonalen und die polyklonalen. Natürlich vorkommende Antikörper, wie bei einer Immunantwort, werden von unterschiedlichen B-Lymphozyten hergestellt und sind polyklonal. Sie können die verschiedenen Epitope des gleichen Antigens binden. Ein Antigen besitzt mehrere Epitope, die auf unterschiedliche Oberflächenstrukturen zurückzuführen sind. Polyklonale Antikörper sind im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern in kleinen Mengen einfacher herzustellen, da die Produktion in weniger Schritten stattfindet. Außerdem ist dabei, im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern, keine Immortalisierung von einzelnen B-Zellen nötig. Sowohl ihre Angriffsziele als auch ihre Zusammensetzung kann variieren, da sich die produzierten Antikörper-Populationen gegen verschiedene Epitope des Ziel-Antigens richten. Aus diesem Grund sind sie in der therapeutischen oder forschungsorientierten Anwendung schlechter einsetzbar. Anders verhält es sich bei den monoklonalen Antikörpern (mAk), diese werden aus einem einzigen Zellklon produziert, der auf einen einzigen B-Lymphozyten zurückgeht. Deswegen richten sie

sich nur gegen ein bestimmtes Epitop. Genau hier liegt auch ihr Vorteil, sie können sehr gezielt gegen bestimmte Targets eingesetzt werden [16, 17].

Antikörper werden in fünf Klassen unterteilt: IgG, IgA, IgM, IgD und IgE. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihres Aufbaus und ihrer Funktion im Immunsystem. Die wichtigste Klasse stellen die IgG-Antikörper dar, diese machen 80 % der menschlichen Antikörper aus [18]. Der Aufbau eines IgG ist in Abbildung 3.1 gezeigt.

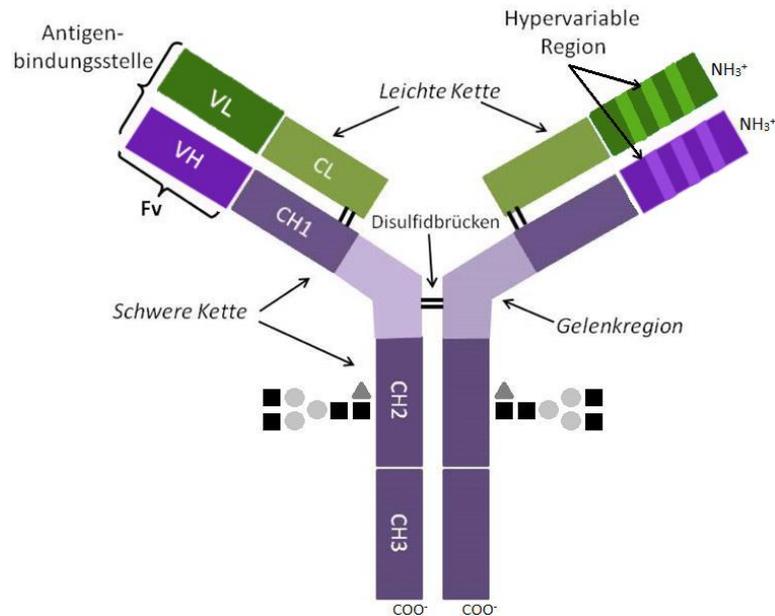


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau eines IgG-Antikörpers. Dargestellt sind die beiden schweren Ketten (violett) und die beiden leichten Ketten (grün). Ebenfalls gezeigt sind die konstanten Regionen (CL, CH1, CH2 und CH3), die variablen Regionen (VH und VL) und die Glykosylierung an CH2 (modifiziert nach [19]).

Ein IgG-Antikörpermonomer besteht aus vier Polypeptidketten, zwei identischen schweren (HC, heavy chain) sowie zwei identischen leichten (LC, light chain) Ketten, die jeweils über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Alle vier aneinander gebundenen Ketten geben dem IgG-Antikörper seine typische Y-Form.

Die Polypeptidketten lassen sich in verschiedene Domänen unterteilen. Dabei besitzt die HC eine variable und drei konstante Domänen, wohingegen die LC aus je einer variablen und einer konstanten Domäne besteht. Die variablen Domänen der beiden Ketten bilden zusammen die Antigenbindungsstelle, das Paratop, und sind für den jeweiligen Antikörper spezifisch. Die konstanten Regionen hingegen sind bei allen Antikörpern einer Klasse gleich aufgebaut und interagieren mit Zelloberflächenrezeptoren

und Proteinen des eigenen Komplementsystems, was zur Aktivierung des Immunsystems führt [19].

Die schweren Ketten weisen zusätzlich zwei Besonderheiten auf. Zum einen besitzen sie eine flexible, zwölf Aminosäure lange Gelenkregion, welche als Scharnier bezeichnet wird. Diese Gelenkregion sorgt für eine Drehbarkeit der kurzen Enden des Antikörpers und erhöht damit dessen Flexibilität. Zum anderen wird bei Säugetierzellen jeweils post-translational eine Oligosaccharid-Gruppe kovalent an die zweite konstante Region (CH₂) gebunden. Während der Synthese können mehrere Zuckerreste hinzugefügt und dadurch verschiedene Glykoformen gebildet werden. Die Glykosylierung ist zelltypspezifisch, in verschiedenen Wirtszellen produzierte Antikörper weisen unterschiedliche Muster von Oligosacchariden auf [20]. Die Glykosylierung spielt eine wichtige Rolle bei der Zytotoxizität der Antikörper, da sie zur funktionellen Fähigkeit des Antikörpers beiträgt. Da nur ein funktionsfähiger Antikörper wirksam ist, wird insbesondere beim Einsatz als Therapeutika auf ein korrektes Glykosylierungsmuster geachtet [21]. Neben der biologischen Aktivität, nimmt die Glykosylierung auch Einfluss auf die Konformation, die Stabilität sowie die Löslichkeit des mAks [22].

Monoklonale Antikörper können auf Grund ihrer spezifischen Bindung zu Antigenen vielfältig in der Labordiagnostik eingesetzt werden. Wird der Vorgang der Bindungsbildung mit leicht zu detektierbaren Liganden wie Fluoreszenzfarbstoffen, radioaktiven Isotopen oder Enzymen ergänzt, werden charakteristische (Farb-)Reaktionen ausgelöst. Mittels dieser ist wiederum ein spezifischer Nachweis der Antigene sowie deren Quantifizierung möglich. Diese Vorgehensweise wird bei dem Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA), dem Western Blot oder der Affinitätschromatographie eingesetzt [23–25]. Antikörper sind in ihrer Verwendung aber nicht auf Labordiagnostik beschränkt. Sie finden zusätzlich in Form von therapeutischen Antikörpern vermehrt Einsatz in der Medizin.

3.1.1 Therapeutische Antikörper

Die Anfänge der therapeutischen Antikörper lagen bei murinen Antikörpern, die aus Mäusen extrahiert wurden. Diese wirkten allerdings selbst als Antigene im Menschen und lösten somit eine Immunantwort aus [26]. Diese immunogenen Reaktionen führ-

ten zur Entwicklung von verschiedenen künstlichen Antikörperkonstrukten mit geringerem Risiko einer Immunantwort. Bei den zuerst getesteten chimären Antikörpern wurden die konstanten Regionen der Maus durch konstante Regionen des Menschen ersetzt, was zu einer Reduzierung der Immunogenität führte, aber für einen zuverlässigen Einsatz nicht ausreichte, da sie im Menschen weiterhin eine Immunantwort hervorriefen. Als nächster Schritt folgte die Humanisierung der mAk, bei der nur noch der komplementaritätsbestimmende Teil der variablen Domäne, die für die Bindung des Epitops verantwortlich sind, aus der Maus stammen. Im Gegensatz zum chimären Antikörper, bei dem die komplette variable Domäne aus der Maus stammt, war es hier nur noch ein Teil der variablen Domäne. Den derzeitigen Stand der Technik stellen vollständig humane Antikörper dar, die über Phagen-Display oder über transgene Technologien erzeugt werden. Verglichen mit den anfänglichen murinen Antikörpern, ist sowohl die Wirksamkeit als auch die sichere und einfache Anwendung als Therapeutika somit deutlich verbessert worden [27–31]. Beim Phagen-Display werden die Gene, die aus Antikörper-produzierenden B-Zellen gewonnenen werden, in einen Phagen-Vektor aus *Escherichia coli* transformiert. Die Bakterien exprimieren die jeweiligen Antikörperfragmente passend zu den eingesetzten Genen. Bei jedem Zusammenbau eines neuen Phagen wird ein anderes Antikörperfragment gebildet und auf dessen Außenhülle eingebaut. Neben dem auf der Oberfläche gebundenen Antikörperfragmenten besitzt auch jeder Phage die genetische Information für dieses. Über die spezifische Wechselwirkung der exponierten Antikörperfragmente mit ihren Antigenen können die relevanten Phagen identifiziert werden. Aus diesen Phagen werden wiederum die passenden Gene zum Antikörperfragment isoliert. Nach der Isolation der Antikörper-Gene, können diese sequenziert und anschließend die Antikörperfragmente produziert werden [32].

Monoklonale Antikörper sind die am schnellsten wachsende Gruppe von Medikamenten der letzten 25 Jahre [7, 8]. Der Grund dafür liegt zum einen an der Spezifität mit der therapeutisch eingesetzte Antikörper bestimmte Moleküle binden können und so deren krankheitsauslösende Wirkung blockieren. Das heißt, im gezielten Einsatz werden krankheitsverursachende Antigene gefunden und können anschließend unschädlich gemacht werden. Zum anderen können mAks in großen Mengen produziert werden [10]. Der erste durch die U.S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassene mAk

wurde bereits 1986 auf den Markt gebracht. Das Präparat Orthoclone OKT3, mit seinem murinen IgG-Antikörper, wurde und wird immer noch zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen bei Nierentransplantationen eingesetzt [11, 12]. Seitdem ist die Anzahl der mAbs für den therapeutischen Einsatz beim Menschen stetig gestiegen. Während im Jahr 2017 bereits zehn Antikörper entweder in der Europäischen Union oder in den Vereinigten Staaten zugelassen wurden, wurde im Jahr 2018 eine Rekordzahl von zwölf verschiedenen Antikörpern erreicht [33, 34]. Dabei sind die Einsatzgebiete der im Jahr 2018 zugelassenen Antikörper sehr verschieden. Sie werden unter anderem zur Migräne-Prävention, bei HIV Infektionen oder bei Haarzell-Leukämie verwendet [34]. Die bereits erschlossenen Einsatzgebiete von therapeutischen mAbs sind breit gefächert, sie finden unter anderem in der Gastroenterologie, der Onkologie, der Rheumatologie, der Kardiologie und bei Infektionen oder Transplantationen Anwendung [16]. Besonders hervorzuheben ist dabei ihr Einsatz als eine der erfolgreichsten therapeutischen Strategien gegen Krebserkrankungen. Dabei gibt es drei verschiedene Mechanismen zur Abtötung der Tumorzellen die durch Antikörper hervorgerufen werden. Zum einen eine direkte Abtötung der Tumorzellen, dabei bindet der Antikörper beispielsweise an einen Oberflächenrezeptor der Tumorzelle und kann dadurch die Apoptose auslösen. Zum anderen eine immunvermittelte Abtötung der Tumorzellen, bei der das Komplementsystem aktiviert oder die Phagozytose induziert wird. Als drittes kann eine Reaktionen auf das Gefäßsystem und das Stroma der Tumore bewirkt werden [35]. Bei der Bekämpfung von Brustkrebs wird beispielsweise Trastuzumab, ein humanisierter mAk, eingesetzt. Bei dem durch den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2) ausgelösten Brustkrebs kommen diese Rezeptoren vermehrt auf der Zelloberfläche der Tumorzellen vor. Durch die hohe Anzahl dieser Rezeptoren wird ein erhöhtes Wachstumssignal ins Innere der Zelle weitergeleitet, wodurch es zu einer häufigen Teilung der Tumorzellen kommt. Trastuzumab bindet an die Rezeptoren und inhibiert so die Proliferation und damit das Wachstum von HER2-abhängigen Tumorzellen [36].

Im Jahr 2002 wurde Adalimumab als erster Antikörper aus Phagen-Display auf dem Markt zugelassen. Abbvie's Humira® ist eines der Medikamente die Adalimumab enthalten und seit es auf dem Markt ist, ist es eines der erfolgreichsten Therapeutika. Aus

pharmazeutischer Sicht ist dieser Antikörper ein Blockbuster: So erzielte das Medikament im Jahr 2018 einen weltweiten Umsatz von über 19 Milliarden US-Dollar und ist damit das umsatzstärkste Medikament gewesen [37]. Es kann gegen eine Vielzahl von immunvermittelten Erkrankungen wie Morbus Crohn, rheumatoide Arthritis oder Psoriasis (Schuppenflechte) eingesetzt werden [38]. Krankheitsauslösend ist bei allen diesen Erkrankungen der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), der das Antigen für Adalimumab darstellt. Die genaue Apoptose-auslösende Wirkung des Antigens ist im Kapitel 3.3 näher beschrieben. Auf Grund der Einsetzbarkeit gegen eine Vielzahl von Krankheiten, sind weitere Medikamente, die gegen TNF- α wirken, entwickelt worden [39]. Neben dem bereits genannten Adalimumab, zeigt Tabelle 3.1 weitere therapeutische Antikörper und ihre Zusammensetzung gegen dieses Antigen, dabei wurden Biosimilars bei dieser Betrachtung nicht berücksichtigt.

Tabelle 3.1: Therapeutische Anti-TNF- α -Antikörper, die bereits auf dem Markt sind. Ausgeschlossen sind Biosimilars der einzelnen Medikamente. TNFR2 = Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2, Fc = Fragment crystallizable, PEG = Polyethylenglycol, Fab = Fragment antigen binding [38–42].

| Antikörper | Antikörperkonstrukt | Medikament | Therapeutischer Einsatz |
|--------------------|--|------------|--|
| Adalimumab | Vollständig humaner IgG | Humira® | Morbus Crohn, rheumatoide Arthritis, Psoriasis-Plaques, Spondylitis ankylosans, Colitis ulcerosa, Akne inversa |
| Infliximab | Chimärer IgG | Remicade® | Morbus Crohn, rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Spondylitis ankylosans, Colitis ulcerosa |
| Etanercept | Dimeres TNFR2-Fusionsprotein mit einem IgG-Fc-Fragment | Enbrel® | rheumatoide Arthritis, Psoriasisarthritis |
| Golimumab | Vollständig humaner IgG | Simponi® | rheumatoide Arthritis, Psoriasisarthritis, Spondylitis ankylosans |
| Certolizumab pegol | PEGyliertes Fab-Fragment eines humanisierten mAk | Cimizia® | Morbus Crohn, rheumatoide Arthritis |

3.2 Herstellungsprozess monoklonaler Antikörper

Der Herstellungsprozess für monoklonale Antikörper lässt sich in zwei Teile unterteilen: Den Upstream- und den Downstream-Prozess. Hierbei stellt der Upstream-Prozess die Kultivierung von Zellen dar und somit die Produktion des Antikörpers. Früher wurden Antikörper häufig aus tierischem Serum gewonnen. Dies hat zwei entscheidende Nachteile: Zum einen müssen viele komplexe Komponenten des Serums abgetrennt werden und zum anderen besteht ein ethisches Problem bei der Verwendung von Versuchstieren. Beiden Problemen wird mit der biotechnologischen Produktion von mAks entgegengewirkt [43]. Im Downstream-Prozess wird die Aufreinigung des Antikörpers durchgeführt.

3.2.1 Kultivierung von Zellen zur Produktion von Antikörpern

Heutzutage werden therapeutische Antikörper in verschiedenen rekombinanten Zelllinien produziert. Dazu gehören sowohl Bakterien (z.B. *Escherichia coli*), Hefezellen oder die am häufigsten verwendeten Säugetierzellen [44]. Säugetierzellen werden bevorzugt zur Produktion von Antikörpern genutzt, da sie in der Lage sind, den mAk mit einem humanähnlichen Glykosylierungsmuster zu produzieren [13]. Zu den Säugetierzellen zählen z.B. die Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen, welche sich auf Ovarienzellen eines weiblichen Hamsters zurückführen lassen. Aus diesen Zellen hat T. Puck 1957 eine immortalisierte Zelllinie abgeleitet, die später für die Suspensionskultur adaptiert wurde [45].

Im Upstream-Prozess wurden bereits signifikante Optimierungsfortschritte erzielt, Zelldichten und Produkttiter sind im Laufe der Jahre enorm gestiegen [46, 47]. So wurden in den Anfängen der Bioprozesse zur Herstellung von Antikörpern Konzentrationen von gerade einmal 100 mg/L erreicht, bereits ein paar Jahrzehnte später waren Antikörpertiter von 1 – 5 g/L auf Grund höherer Zelldichten, neuer Medien und längerer Prozesszeiten der Standard. Durch weitere Entwicklungen von spezifischen Feed-Strategien zu definierten Zeitpunkten der Kultivierung können mit einer Zelldichte von über $20 \cdot 10^6$ Zellen/mL Antikörperkonzentrationen von 10 g/L erreicht werden [48]. Durch die aktuelle Forschung im Bereich von kontinuierlichen Prozessen, wie z.B. Perfusionskultivierungen, werden weitere Produktsteigerungen angestrebt und erreicht.

Hierbei werden konstant Nährstoffe hinzugegeben und Nebenprodukte entfernt, während die Zellen im Bioreaktor verbleiben [49]. Kuczweski *et al.* (2011) konnten mit dieser Prozessweise einen Produktiter von 27 g/L erreichen [50].

Monoklonale Antikörper werden von den CHO-Zellen ins Medium sekretiert und liegen im Überstand der Kultivierung vor [51]. Der letzte Schritt des Produktionsprozesses ist die Zellernte, bei der die Abtrennung der Zellen vom Zellkulturüberstand erfolgt. Eine im Labormaßstab viel verwendete und kostengünstige Methode ist die Zentrifugation, bei der die Zellen und Zelltrümmer sedimentieren und der mAk im Überstand verbleibt. Alternativ kann die Tiefenfiltration eingesetzt werden, bei der der Zellkulturüberstand auf aus Cellulose bestehende Filtersysteme gegeben wird, welche als Filterhilfsmittel Kieselgur enthalten können [52, 53]. Hierbei werden die Zellen sowie Zelltrümmer durch die Filter zurückgehalten und vom mAk enthaltenen Zellkulturüberstand getrennt. Mit dem jeweils erhaltenen Zellkulturüberstand wird die Aufreinigung des Antikörpers gestartet.

3.2.2 Aufreinigung von Antikörpern

Der klassische Downstream-Prozess monoklonaler Antikörper ist in Abbildung 3.2 gezeigt. Er kann typischerweise in sechs Schritte unterteilt werden und stellt einen Referenzrahmen dar, der je nach Antikörper und deren späterer Verwendung angepasst werden kann [54].

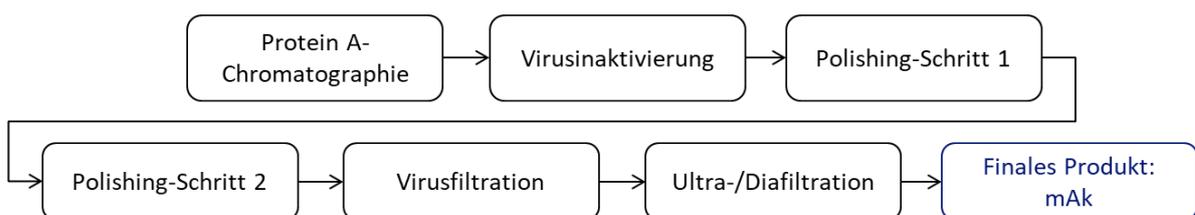


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung zur Gewinnung eines mAk (Abbildung nach [14]).

Der erste Schritt der Aufreinigung, auch Capture-Schritt genannt, eines mAk ist im Regelfall der Protein A-Chromatographieschritt. Hierbei kommt es zu einer Bindung zwischen dem Fc-Fragment (Fragment crystallizable) des Antikörpers und des an das Säulenmaterial immobilisierten Protein A [55, 56]. Das Fc-Fragment wird durch die konstanten Regionen CH2 und CH3 der schweren Kette des Antikörpers gebildet (Abbildung 3.1). Protein A ist ein kleines Zellwandprotein, das aus *Staphylococcus aureus*

stammt. Protein A bindet spezifisch an das Fc-Fragment von Antikörpern, da dieses eine hoch konservierte Struktur darstellt. Die Bindung ist reversibel und kann durch einen geeigneten Elutionspuffer mit niedrigem pH-Wert wieder gelöst werden. In diesem Schritt findet eine Aufkonzentrierung des Antikörpers statt [57]. Das Säulenmaterial dieses chromatographischen Schritts ist im Vergleich zu den weiteren chromatographischen Schritten kostenintensiver. Auch ist die Protein A-Chromatographie in Bezug auf technische Aspekte wie Säulenabmessungen, Durchflussraten und dynamische Bindungskapazitäten unproduktiver als die folgenden chromatographischen Polishing-Schritte [14, 58]. Aufgrund des Fehlens tragfähiger Alternativen, die eine vergleichbare Reinigungsleistung gewährleisten, bleibt die Affinitätschromatographie jedoch der am weitesten verbreitete Capture-Schritt und damit ein wichtiger Schritt der Antikörperaufreinigung. Allerdings sind alternative Ansätze, wie die Kationenaustauschchromatographie, derzeit in der Entwicklung [44, 59]. Durch den Protein A-Schritt kann bereits eine Reinheit von über 95 % erreicht werden [60].

Dem Protein A-Schritt folgt als zweiter Schritt eine virale Inaktivierung im sauren Elutionspuffer der Protein A-Chromatographie. Durch die saure Umgebung werden die auf der Oberfläche von Viren sitzenden Glykoproteine chemisch verändert, wodurch eventuell vorhandene Viren nicht mehr in der Lage sind andere Zellen zu infizieren [61]. Anschließend folgen zwei chromatographische Polishing-Schritte, um zurückgebliebene Verunreinigungen aus dem Herstellungsprozess wie DNA oder Wirtszellproteine zu entfernen. Dabei kommt vermehrt die Kombination von zwei der drei folgenden Säulen zum Einsatz. Eine ist die hydrophobe Interaktionschromatographie, mit der Aggregate mit hohem Molekulargewicht wie nicht aktive Antikörperaggregate entfernt werden können. Bei den anderen beiden handelt es sich um die Kationen- und Anionenaustauschchromatographie. Die Kationenaustauschchromatographie wird verwendet, um Wirtszellproteinverunreinigungen und ausgewaschenes Protein A zu entfernen. Bei der Anionenaustauschchromatographie wird hauptsächlich DNA aus den Proben entfernt [14, 62]. Ein folgendes virales Filtrationsverfahren zur Komplementierung der Virusinaktivierung wird durchgeführt, um die biologische Sicherheit für spätere Anwendungen zu gewährleisten [63]. Als letzter Schritt folgt eine Ultrafiltration/Diafiltration um den mAk in seinen Formulierungspuffer zu überführen [14]. Die

Endkonzentration bei kommerziellen mAKs bewegt sich in einem Bereich von 2 bis 200 mg/mL [64].

Künftige Herausforderungen der industriellen Antikörperaufreinigung werden in weiter steigenden Zellkulturtitern liegen, da mit Hochzelldichtekultivierung und Perfusionskultivierung der Grundstein für höhere Antikörperkonzentrationen gelegt wurde. Der Downstreambereich muss sowohl den hohen Aufreinigungsanspruch erfüllen als auch mit steigenden Kultivierungsgrößen umgehen [65]. Dabei ist der Einsatz von kontinuierlichen Chromatographien statt der konventionellen Batch-Chromatographie Gegenstand aktueller Forschung. Vor allem die Nachteile des Batch-Prozesses, der kostenintensiver ist, langsamer abläuft und nicht die volle Ausnutzung der Gesamtkapazität gewährleistet, sollen dabei überwunden werden [65].

3.3 Bioaktivitätsassay

Für den Einsatz in Medikamenten muss der Antikörper seine biologische Aktivität im Menschen wirksam und zuverlässig ausüben. Daher muss zum einen ein biologisch aktiver Antikörper hergestellt werden, und zum anderen darf der mAK seine Aktivität nicht durch einen Aufreinigungsschritt verlieren. Bioaktivitätstest werden verwendet, um die Bioaktivität von Antikörpern nach ihrer Produktion zu untersuchen.

Als Beispiel für einen Bioaktivitätstest für einen mAK wird hier als Antigen der Tumornekrosefaktor (TNF)- α betrachtet. Eine erhöhte Konzentration des Zytokins TNF- α ist der Auslöser bei verschiedenen chronischen immunvermittelten Entzündungskrankheiten, wie Morbus Crohn oder rheumatoider Arthritis [66, 67]. Bei diesen Krankheiten wirkt das 17 kDa große Protein als Initiator des physiologischen Prozesses des programmierten Zelltods, der Apoptose. TNF- α bindet an einen sogenannten Todesrezeptor, den Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR-1), und löst dadurch die molekulare Kaskade für die Apoptose aus. Der Signalweg ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

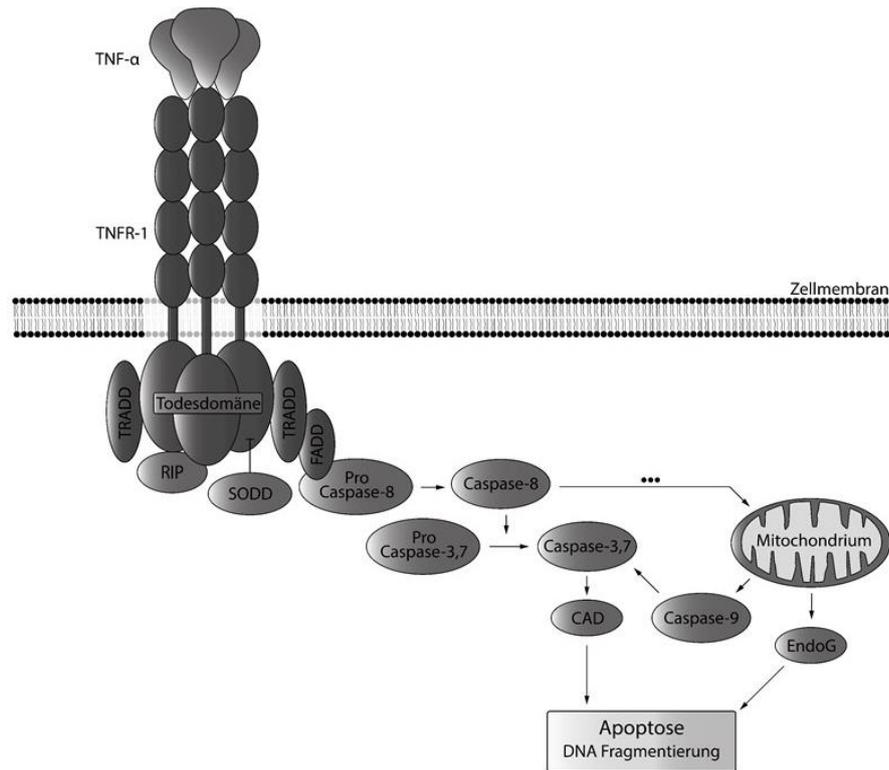


Abbildung 3.3: Molekulare Kaskade der Apoptose, ausgelöst durch TNF- α , welches an TNFR-1 bindet. Es sind die beteiligten Proteine und deren Wirkung aufeinander dargestellt (modifiziert nach [68]).

Im Normalfall ist die Todesdomäne des Rezeptors TNFR-1 durch ein Silencerprotein (Silencer der Todesdomäne, SODD) blockiert. Kommt es aber zur Bindung von TNF- α an diesen Rezeptor wird eine Reaktionskaskade in der Zelle ausgelöst. Sie beginnt mit der Bindung von zwei Adapterproteinen (TNF-assoziierte Todesdomäne, TRADD und Fas-assoziierte Todesdomäne, FADD), welche weitere Proteine binden und aktivieren. Zum einen wird über die Caspase-8 im Mitochondrium die Caspase 9 ausgelöst, welche wiederum einen aktivierenden Einfluss auf die Caspasen 3 und 7 hat. Zum anderen wird die Nuclease EndoG, ebenfalls über das Mitochondrium, angeregt. Die Caspasen 3 und 7 aktivieren ihrerseits die Nuclease Caspase-aktivierte DNase (CAD). Beide Nucleasen (EndoG und CAD) können DNA-Fragmentierungen oder Chromatinkondensationen und damit den Tod der Zelle hervorrufen [69].

Bei der Zugabe von TNF- α auf eine TNF- α -sensitive Zelllinie wird die Apoptose der Zellen ausgelöst. Durch parallele Zugabe eines Neutralisators wird das freie TNF- α gebunden und der Signalweg damit nicht ausgelöst. Durch dieses Abfangen des Zytokins bleiben die Zellen viabel. Einige bereits als Therapeutika eingesetzt mAbs zählen zu den

TNF- α -Neutralisatoren (Tabelle 3.1, Kapitel 3.1.1). Ihr Fab-Fragment (Fragment antigen binding), bindet an das freie TNF- α und verhindert so dessen Bindung an den TNFR-1-Rezeptor. Beim Fab-Fragment handelt es sich jeweils um die variablen Regionen einer schweren sowie einer leichten Kette, die in Kombination die Antigenbindungsstelle darstellen. Die Bioaktivität des Antikörpers ist bei erfolgreicher Bindung an das Antigen nachgewiesen, da die Apoptose-auslösende Wirkung blockiert ist und die Zellen viabel bleiben. Sterben die Zellen trotz Zugabe des Antikörpers ab, so ist dieser nicht biologisch aktiv.

4 Experimentelle Arbeiten

Ziel dieser Arbeit ist die Aufreinigung und Analytik eines in chinesischen Zwerghamsteroovarien (CHO)-Zellen produzierten monoklonalen Antikörpers (mAk). Der mAk ist 150 kDa groß, wobei die schwere Kette 50 kDa und die leichte Kette 25 kDa ausmachen. Er gehört zum Typ der IgG1-Antikörper und richtet sich gegen den Tumornekrosefaktor (TNF)- α . Die experimentellen Daten können in drei Bereiche unterteilt werden: Zum einen die analytischen Methoden und Stabilitätsexperimente (Kapitel 4.1). Hierbei wurden verschiedene chromatographische Methoden an der Hochleistungsflüssigchromatographie getestet, um die Quantität des Antikörpers zu bestimmen. Außerdem wurden diese Methoden verwendet, um die Stabilität des mAks bei unterschiedlichen pH-Werten und verschiedenen Salzkonzentrationen zu untersuchen. Ebenfalls stellt die Aufarbeitung des mAks (Kapitel 4.2) ein Kapitel dar, wobei sowohl die Zellabtrennung als auch die folgenden verschiedenen chromatographischen Schritte betrachtet wurden. Dabei wurden Optimierungen des Capture-Schritts sowie der Polishing-Schritte durchgeführt. Der dritte Teil beschäftigte sich mit der Etablierung eines Bioaktivitätsassays und dem Nachweis der Bioaktivität des mAks (Kapitel 4.3). Dieser Abschnitt stellt im Gegensatz zum ersten Teil die Qualitätskontrolle dar.

4.1 Analytische Methoden und Stabilitätsexperimente

Die Kultivierung der CHO-Zellen wurde im Rahmen weiterer Doktorarbeiten (Tamanna Nagraik und Jana Schellenberg, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen in verschiedenen Bioreaktoren (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE) zur Herstellung des mAks kultiviert. Nach einer Vorkultur bis zur fünften Passage, wurde die Hauptkultur mit einer Zellzahl von $0,3 \times 10^6$ Zellen·mL⁻¹ angeimpft. Die Kultivierung verlief bei 36,8°C, einem pH-Wert von 7,1 und 60 % pO₂ über zwölf Tage (siehe Kapitel B.1, Material und Methoden). Der mAk wurde hierbei in den Überstand sekretiert. Es wurde jeden Tag während einer 2 L Kultivierung eine Probe entnommen. Die Zellen und Zelltrümmer der Proben wurden mittels Zentrifugation vom Überstand separiert und der Überstand

mittels Gradientengel (4 – 20 %), eine Variation der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert und densitometrisch ausgewertet (Abbildung 4.1).

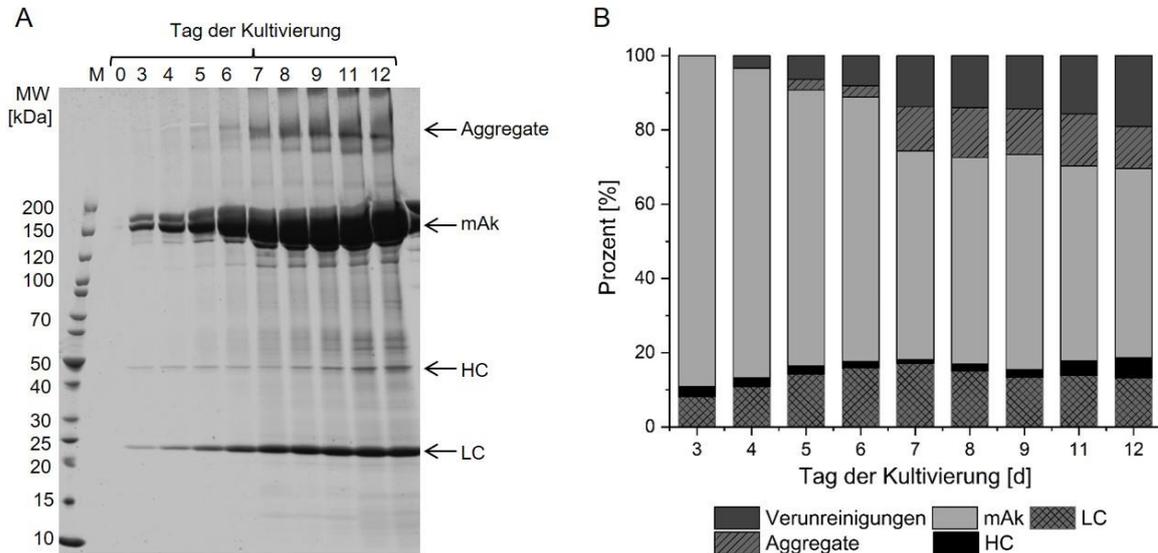


Abbildung 4.1: Proteinzusammensetzung einer 2 L CHO-Kultivierung zur Produktion eines mAk. A: Gradientengel (4 – 20 %) der Kultivierung, M = Größenstandard (Unstained Protein Ladder), 0-12 = Kultivierungstage; nicht-reduzierende Bedingungen. **B:** Densitometrische Bestimmung der über das Gradientengel bestimmten Proteinzusammensetzung, Prozentzahl der Verunreinigungen, der Aggregate, des kompletten mAk sowie der einzelnen schweren (HC) und der einzelnen leichten Kette (LC).

Abbildung 4.1, A zeigt ab Tag 3 intensive Banden bei etwa 150 kDa, welche dem Antikörper zugeordnet werden können. Mit steigender Kultivierungsdauer stieg auch die Intensität der mAk-Bande, was für eine steigende Produktion des Antikörpers spricht. Die Banden mit einem Molekulargewicht größer als 150 kDa, deuten auf Aggregate des mAks hin, da CHO-Zellen keine zelleigenen Proteine mit einer solchen molekularen Masse besitzen [70]. Ebenfalls trat eine schwache Bande bei etwa 50 kDa auf, welche der schweren Kette (HC, heavy chain) zugeordnet werden kann, und eine intensivere Bande bei 25 kDa, welche wiederum der leichten Kette (LC, light chain) des Antikörpers zugeordnet werden kann. Dies stimmt mit der Literatur überein, da die LC im Verhältnis zur HC in größerer Menge produziert werden muss, damit die Menge an gebildetem mAk maximal wird [71, 72]. Bei allen weiteren im Gel erkennbaren Banden handelt es sich um Verunreinigungen durch Wirtszellproteine.

Über eine densitometrische Bestimmung kann das Verhältnis der einzelnen nachgewiesenen Komponenten zueinander bestimmt werden (Abbildung 4.1, B). Ab Tag 5 können Aggregate nachgewiesen werden, die zum Ende der Kultivierung etwa 14 % ausmachen, wobei sich ihre prozentuale Menge ab Tag 7 nicht weiter erhöht. Die Erhöhung der Verunreinigungen auf bis zu 20 % am Ende der Kultivierung ist auf absterbende Zellen zurück zu führen. Sterben die CHO-Zellen während der Kultivierung ab, setzen sie ihre Wirtszellproteine frei. Über die Dauer der Kultivierung sinkt der Prozentanteil der mAk-Bande von anfänglich 90 auf 50 %, wobei der Rückgang zwischen Tag 7 und 12 niedriger ausfällt als zwischen Tag 3 und 7. Der prozentuale Anteil des mAks spiegelt aber nicht die absolute Menge des mAks wider. Für eine erfolgreiche Kultivierung ist nicht der prozentuale Anteil des mAks entscheidend, sondern die Konzentration des mAks im Überstand.

4.1.1 Protein A-Chromatographie zur Quantitätsbestimmung

Um die Konzentration des mAks zu bestimmen, wurde eine Protein A-Chromatographie an der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) optimiert und durchgeführt. Ziel der Etablierung dieser Methode ist die genaue und reproduzierbare Bestimmung der Antikörperkonzentration im Überstand einer Probe. Für diese Versuche wurde eine Protein A-Säule (POROS® A 20 μm) von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) verwendet. Das Prinzip der Protein A-Affinitätschromatographie beruht auf einem Zwei-Puffer-System. Der Äquilibrierungspuffer soll optimale Bindungsbedingungen für den mAk an die Säule schaffen, während über einen pH-Shift in den sauren Bereich der mAk mittels Elutionspuffer wieder von der Säule gelöst werden soll.

Zu Beginn wurde der Elutionspuffer optimiert, da erst nach einer optimierten Elution die Bindungsbedingungen untersucht werden können [73]. Es wurde ein Puffersystem verwendet, das Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) für diese Säule empfiehlt, bestehend aus Natriumphosphat (gemischt aus Natriumdihydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat) als Äquilibrierungspuffer und einem salzsäurehaltigem Elutionspuffer [74]. Dem Elutionspuffer wurde Glycin beigelegt, da Aminosäuren in wässrigen Phasen eine stabilisierende Wirkung auf Proteine aufweisen. Glycin konkurriert mit dem mAk um die vorhandenen Wassermoleküle des Puffers. So wird die durch

die Salzsäure katalysierte Hydratisierung des mAKs herabgesetzt. Die Bindung zwischen dem Protein A und dem mAK kann besser gelöst werden [75].

Über ein Design of Experiment (DoE) wurde zunächst der Elutionspuffers und anschließend der Äquilibrationpuffer optimiert. Bei einem DoE werden mehrere Variablen gleichzeitig systematisch verändert und ihr Einfluss auf festgelegte Zielgrößen untersucht. Der Versuchsraum zeichnet sich durch Zentral- sowie Eckexperimente aus. Die Ergebnisse liefern Aussagen über den gesamten Versuchsraum zu der optimalen Ausprägung der Variablen. Die mehrfach durchgeführten Zentralexperimente stellen dabei die Reproduzierbarkeit des Versuchs dar. Die Eckexperimente hingegen testen verschiedene Ausprägungskombinationen der Variablen [76].

Optimierung des Elutionspuffers

Das vollfaktorielle Versuchsdesign, sieben Versuche, über die getesteten Bedingungen des Elutionspuffers wurde mit Hilfe des Programms MODDE® (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE) erstellt. Die zu untersuchenden Faktoren waren dabei zum einen der pH-Wert und zum anderen die Flussrate. Der pH-Wert beeinflusst die Ladung, die für die Bindung zwischen Antikörper und den Liganden der Säule sorgen [77]. Die Flussrate hingegen beeinflusst die Trenneffizienz und die Zeit, die für die Bindung zur Verfügung steht [78]. Die Zielgrößen dieses DoE waren zum einen die Retentionszeit des Antikörperpeaks und zum anderen die Antikörperpeakfläche welche proportional zur Antikörpermenge ist. Die Peakfläche spiegelt folglich die Konzentration des Antikörpers wider. Über die Retentionszeit hingegen lässt sich ermitteln, ob der Antikörperpeak erst in der Elutionsphase detektiert wird. Eine von Sartorius Stedim Biotech GmbH (Göttingen, DE) zur Verfügung gestellte gereinigte Antikörperlösung wurde für jeden der Versuche auf $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ verdünnt und jeweils $100 \mu\text{L}$ pro Messung injiziert. Es wurden sieben Experimente, von denen drei Zentralexperimente darstellen, durchgeführt. Die genaue Durchführung ist unter B.3.1 (Material und Methoden) beschreiben. Die Ergebnisse der einzelnen Messungen wurden statistisch mit MODDE® aufbereitet und daraus ein Modell zur Beschreibung der Zielgrößen in Abhängigkeit der Flussrate und des pH-Wertes gebildet (Abbildung 4.2). Die Reproduzierbarkeit der Retentionszeit lag bei 83 % und die der Antikörperpeakfläche bei 97 %.

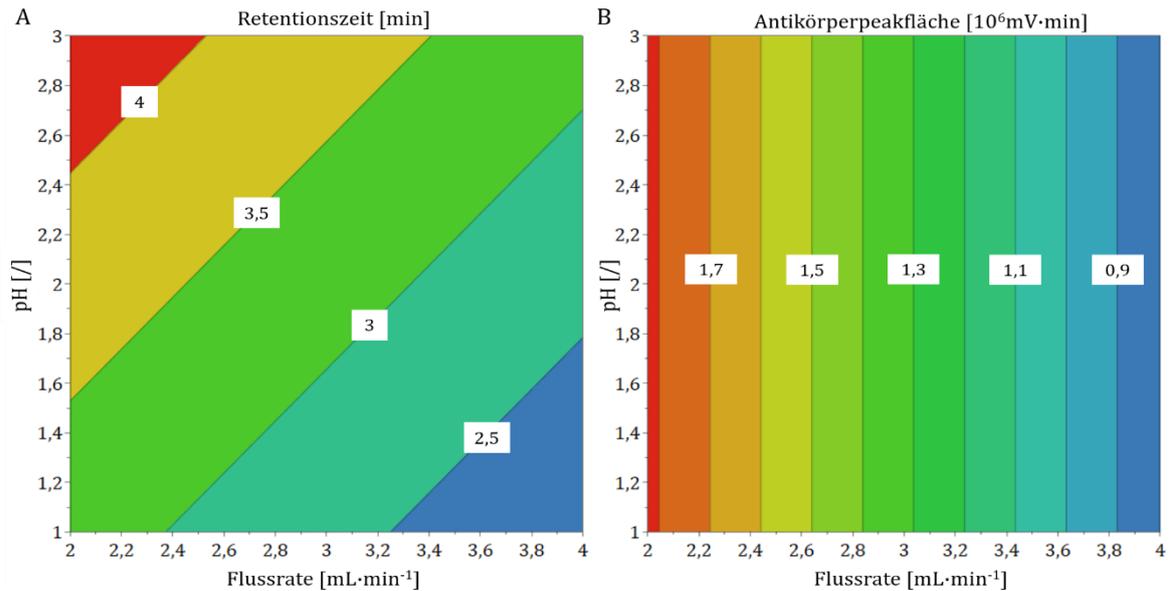


Abbildung 4.2: Contour-Plots der Optimierung des Elutionspuffers mittels DoE. A: Retentionszeit in Abhängigkeit von der Flussrate und dem pH-Wert. **B:** Peakfläche in Abhängigkeit von der Flussrate und dem pH-Wert (modifiziert nach [79]).

Sowohl die Flussrate als auch der pH-Wert sind signifikante Einflussfaktoren für die Retentionszeit (Abbildung 4.2, A). Durch eine höhere Flussrate in Verbindung mit einem niedrigen pH-Wert wurde eine schnellere Elution erreicht. Bei schnelleren Flussraten ist im Vergleich zu langsameren Flussraten die Interaktionszeit des mAk mit dem Säulenmaterial verkürzt. Außerdem stehen die Säuremoleküle mit dem mAk in direkter Konkurrenz um die Bindungsdomäne des Protein A, wodurch bei geringerem pH-Wert der mAk besser verdrängt werden kann. Der pH-Wert hatte auf die Antikörperpeakfläche keinen signifikanten Einfluss (Abbildung 4.2, B), die Flussrate hingegen schon. Je kleiner die Flussrate ist, desto größer ist die Antikörperpeakfläche. Die Fläche des Antikörperpeaks sollte maximal sein, da somit gewährleistet war, dass der mAk komplett von der Säule eluiert wurde. Je geringer die Flussrate umso größer die Peakfläche, wodurch sich zwar die Retentionszeit verlängert, was aber durch einen möglichst niedrigen pH-Wert ausgeglichen werden konnte. Entsprechend der Van-Deemter-Gleichung führen geringe Flussraten zu einer höheren Trenneffizienz [78]. Dabei ist allerdings auch zu beachten, dass die Flussrate nicht unendlich klein werden kann, da sonst Diffusion die Trennschärfe der Chromatographie wieder verschlechtert. Bei einer Flussrate von 1 mL·min⁻¹ kam es entsprechend der Van-Deemter-Gleichung zu

einer weiteren Erhöhung der Antikörperpeakfläche auf $2,3 \cdot 10^6 \text{mV}\cdot\text{min}$. Daher wurde die Flussrate auf $1 \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ festgelegt und der pH-Wert des Elutionspuffers auf 2.

Ebenfalls getestet wurde Natriumchlorid (NaCl) als Additiv im Elutionspuffer, da es die Aggregatbildung von Antikörpermolekülen verhindert, indem intermolekulare Wechselwirkungen unterdrückt werden [80, 81]. Außerdem verhindert es hydrophobe Wechselwirkungen der Probe mit dem Säulenmaterial selbst. Die Probenvorbereitung sowie der Äquilibrierungspuffer entsprachen den Bedingungen des vorangegangenen DoE. Getestet wurden NaCl-Konzentrationen zwischen 0 und 1500 mM. In Abbildung 4.3 sind die ermittelten Peakflächen gegen die getesteten Salzkonzentrationen im Elutionspuffer aufgetragen.

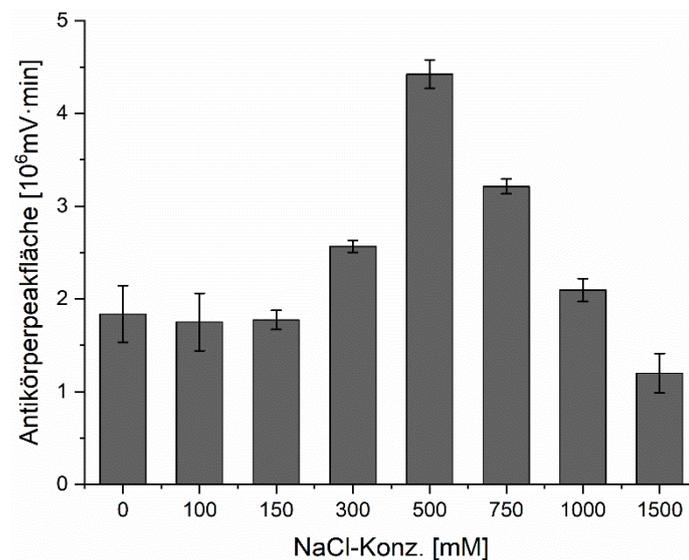


Abbildung 4.3: Ermittelte Antikörperpeakflächen an der HPLC mittels Protein A-Chromatographie aufgetragen gegen die NaCl-Konzentration des Elutionspuffers.

Bei einer Salzkonzentration von 500 mM NaCl konnte die größte Peakfläche erreicht werden. Die größte Peakfläche entspricht auf Grund des proportionalen Zusammenhangs auch der größten Antikörpermenge, die eluiert wurde. Sowohl niedrigere als auch höhere Salzkonzentrationen ergaben eine geringere Antikörperpeakfläche. Für alle weiteren Experimente wurde der Elutionspuffer mittels Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und neben dem Zusatz von 100 mM Glycin wurden 500 mM NaCl beigefügt. Außerdem wurde die Flussrate von $1 \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ verwendet.

Optimierung des Äquilibrierungspuffers

Nach der Optimierung der Elution folgte die Optimierung des Äquilibrierungspuffers für die Protein A-Affinitätschromatographie. Die zuvor untersuchte Flussrate wurde hierbei übernommen. Für den vollfaktoriellen DoE, sieben Versuche, wurden die NaCl-Konzentration sowie der pH-Wert als Variablen festgelegt, da sich ihr Einfluss bereits bei der Optimierung des Elutionspuffers als relevant erwies. Die pH-Wert-Grenzen entsprachen dabei dem Pufferbereich von Natriumphosphatpuffer in der Mischung von Dinatriumhydrogenphosphat und Natriumdihydrogenphosphat (pH-Werte 6 bis 8). Außerdem wurde eine NaCl-Konzentration von 0 bis 500 mM untersucht. Als Zielgrößen diente erneut die Antikörperpeakfläche, da diese proportional zur Antikörpermenge ist. Die Antikörperpeakfläche sollte dementsprechend möglichst groß sein. Außerdem wurde die Fläche des Durchflusspeaks betrachtet. Diese sollte möglichst klein sein, da sie die Menge an nicht gebundenem Antikörper repräsentiert [82].

Es wurde jeweils gereinigte Antikörperlösung mit einer Antikörper-Konzentration von $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ verwendet und jeweils $100 \mu\text{L}$ pro Messung injiziert. Mit den unterschiedlichen Äquilibrierungspuffern wurden sieben Experimente, von denen drei Zentralexperimente darstellten, durchgeführt. Die Ergebnisse der einzelnen Messungen wurden statistisch mit MODDE® aufbereitet. Abbildung 4.3 zeigt die Ergebnisse des DoE des Äquilibrierungspuffers. Die Reproduzierbarkeit der Fläche des Durchflusspeaks lag bei 80 % und die der Antikörperpeakfläche bei 92 %.

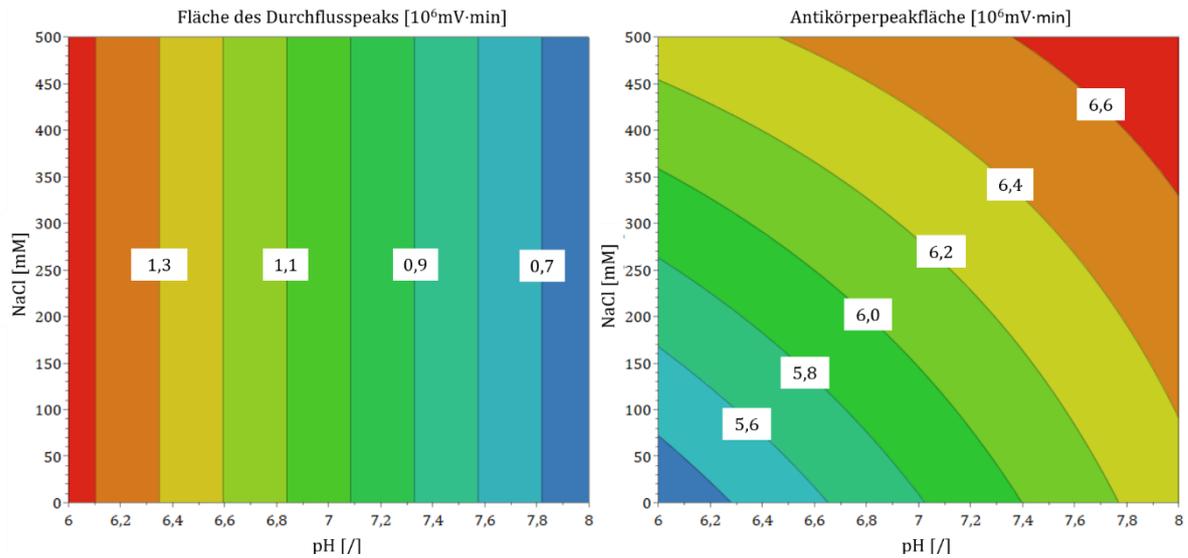


Abbildung 4.4: Contour-Plots der Optimierung des Äquilibrierungspuffers mittels DoE. A: Fläche des Durchflusspeaks in Abhängigkeit vom Salzgehalt und dem pH-Wert. **B:** Fläche des Antikörperpeaks in Abhängigkeit vom Salzgehalt und dem pH-Wert (modifiziert nach [83]).

Die NaCl-Konzentration hat keinen Einfluss auf die Peakfläche des Durchflusses (Abbildung 4.4, A). Der pH-Wert hingegen sollte möglichst hoch sein, da die Peakfläche und damit die nicht gebundene Antikörpermenge mit steigendem pH-Wert kleiner wurde. Auf den Antikörperpeak haben sowohl der pH-Wert als auch die Salzkonzentrationen einen Einfluss (Abbildung 4.4, B). Die Fläche dieses Peaks soll maximal sein, was sowohl durch eine Erhöhung des pH-Wertes als auch durch eine Erhöhung der Salzkonzentration erreicht wird. Als optimaler pH-Wert wurde 7,9 festgelegt, da er eine große Antikörperpeakfläche ergab und das Mischungsverhältnis bei der Puffervorbereitung leicht herzustellen ist. Außerdem wurde der Salzgehalt für alle zukünftigen Experimente auf 500 mM NaCl festgelegt.

Für die Protein A-Chromatographie an der HPLC konnten für einen schnellen und präzisen Nachweis des Antikörpers und seiner Konzentrationsbestimmung folgenden Bedingungen festgelegt werden: 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,9 sowie 500 mM NaCl im Äquilibrierungspuffer und 100 mM Glycin, pH 2 sowie 500 mM NaCl im Elutionspuffer. Außerdem wurde eine Flussrate von $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ für die ganze Methode festgelegt.

4.1.2 Vergleich SEC- und Protein A-Chromatographie

Bei der Protein A-Chromatographie weisen die eingesetzten Liganden eine hohe Bindungsaffinität zum mAk auf, wodurch ein spezifischer Nachweis des mAk stattfindet. Zusätzlich sind Protein A-Säulen sehr robust, es kommt selten zu Verblockungen der Säule und sie können bei extremen pH-Werten eingesetzt werden [84, 85]. Neben der Protein A-Affinitätschromatographie kann aber auch eine Größenausschlusschromatographie (SEC, size exclusion chromatography) verwendet werden, um die Antikörperkonzentration an der HPLC zu bestimmen. Die SEC trennt im Gegensatz zur Protein A-Chromatographie eine Probe nach der unterschiedlichen Größe der enthaltenen Bestandteile auf, ohne spezifische Bindung an das Säulenmaterial. Dabei basiert diese Trennung auf den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der Komponenten durch ein feinporiges Gel, dementsprechend eluieren große Moleküle zuerst [86]. Ihre poröse stationäre Phase ist im Vergleich zur Protein A-Säule anfälliger für Verblockungen. Ein Vergleich beider Methoden wurde durchgeführt, da das Injektionsvolumen der SEC nur 5 μL betrug, bei der Protein A-Methode waren es 100 μL . Während einer Kultivierung mit einem geringen Kultivierungsvolumen, ist das Volumen der Proben ebenfalls beschränkt. Mit der genommenen Probe werden neben der mAk-Quantität aber auch die Glucose-, Lactose-, Glutamin- und Glutamatkonzentration sowie die Zelldichte und Viabilität der Zellen bestimmt. Ein geringeres Probenvolumen für die HPLC ist demnach zu bevorzugen. Außerdem kann mittels SEC die prozentuale Menge an Aggregaten in einer Probe bestimmt werden. Die zuvor optimierte Methode der Protein A-Chromatographie (Kapitel 4.1.1) wurde für den Vergleich verwendet. Für die eingesetzte SEC-Säule (Yarra™ 3 μm SEC-3000, Phenomenex Inc., Torrance, USA) wurde eine bereits optimierte Methode von Sartorius Stedim Biotech GmbH (Göttingen, DE) zur Verfügung gestellt [87].

Die SEC Methode setzte, im Gegensatz zur Protein A-Chromatographie, nur einen Puffer voraus, da es zu keiner Bindung mit dem Säulenmaterial kommt. Hierbei wurde ein 100 mM Natriumphosphatpuffer mit 0,1 M Natriumsulfat bei einem pH-Wert von 6,6 verwendet. Bei der Protein A-Methode wurde als Äquilibrierungspuffer der 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,9 und 500 mM NaCl und als Elutionspuffer 100 mM Glycin, pH 2 mit 500 mM NaCl verwendet. Eine Messung dauerte genau wie bei der Protein A-Säule 20 min und wurde ebenfalls mit einer Flussrate von 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ durchgeführt.

Der direkte Vergleich der beider Methoden wurde mit Kultivierungsproben einer 2 L Reaktorkultivierung von Tag 2 bis Tag 12 durchgeführt (Abbildung 4.5).

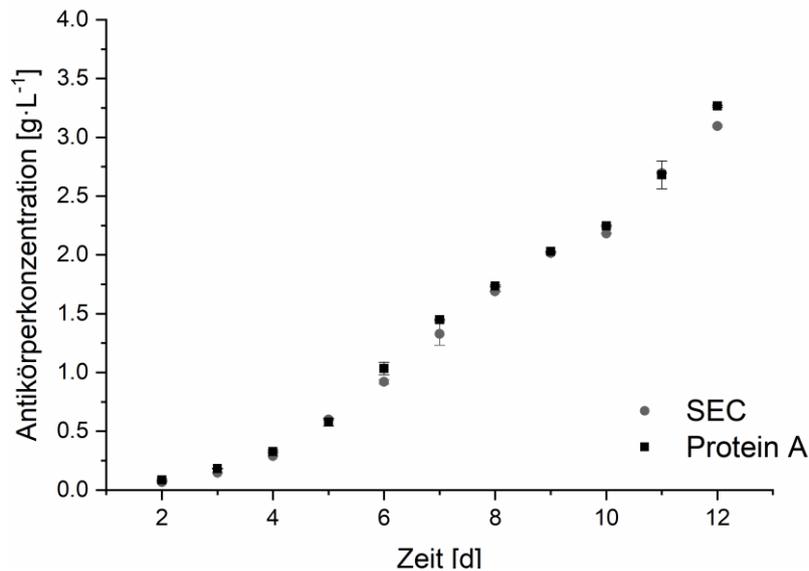


Abbildung 4.5: Antikörperkonzentration einer 2 L Kultivierung mittels Protein A- und SEC-Säule, aufgetragen über die Dauer der Kultivierung.

Abbildung 4.5 zeigt, dass sich die Konzentration des Antikörpers für beide Methoden im Laufe der Kultivierung mit jedem Tag stetig erhöht. An Tag 12 wurden Antikörperkonzentrationen von über $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ erreicht. Ebenfalls stimmt die Konzentration des mAbs mit beiden Methoden, für alle Kultivierungsproben an allen Tagen gut überein. Lediglich an Tag 6, 7 und 12 wies die Protein A-Säule eine leicht höhere Antikörperkonzentration auf. Beide Methoden sind geeignet die Antikörperkonzentration zu bestimmen. Die Dauer einer Messung war für beide Methoden gleich. Hingegen bietet die SEC methodisch den Vorteil, dass nur ein Puffer hergestellt werden musste und das Injektionsvolumen mit $5 \mu\text{L}$ viel kleiner war als bei der Protein A-Chromatographie mit $100 \mu\text{L}$. Ein weiterer Vorteil lag in der Auswertung der SEC, mit ihr konnte nicht nur die Antikörperkonzentration bestimmt werden. Zusätzlich kann eine eindeutige Zuordnung aller Peaks des Chromatogramms erfolgen, da alle Moleküle einer Probe nacheinander eluieren. Über verschiedene Proteine mit bekanntem Molekulargewicht, die zu bestimmten Zeitpunkten eluieren, kann so eine Zuordnung der Peaks zu einem Molekulargewicht erfolgen. So konnten beispielsweise Antikörper-Dimere zugeordnet

werden, genau wie Verunreinigungen, die entweder ein großes oder kleines Molekulargewicht besitzen. Damit lieferte die SEC eine zusätzliche qualitative Aussage, die mit der Protein A-Chromatographie nicht getroffen werden konnte.

4.1.3 Stabilität des mAks

Für die Aufreinigung des mAks, bei der verschiedene chromatographische Methoden und damit verschiedene Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten und Salzkonzentrationen verwendet werden, ist es wichtig zu wissen, bei welchen Bedingungen der mAk intakt und stabil bleibt. Ebenfalls können diese Informationen hilfreich sein, wenn der Antikörper auf Grund längerer Wartezeiten gelagert werden soll. In diesem Kapitel werden die verschiedenen Faktoren (pH-Wert und Salzkonzentration) untersucht und mittels SEC-Säule an der HPLC die Stabilität des mAks beurteilt.

Einfluss des pH-Wertes

Zuerst wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität des mAks untersucht und anschließend die Kombination mit NaCl als Salz. Der Antikörper wurde bei verschiedenen pH-Werten in 1 mL 0,1 M Phosphat-Citrat-Puffer bei 50°C über sieben Tage inkubiert. Dieser Puffer wurde gewählt, weil er durch unterschiedliches Mischen seiner beiden Komponenten einen breiten pH-Bereich von 2,2 bis 8,7 abdeckt. Bei der Auswahl der Temperatur wurde sich an den Extrembedingungen bei Stabilitätsuntersuchungen der ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)-Guideline orientiert, unter denen ein Antikörper getestet wird, wenn er als Medikament zugelassen werden soll [88]. Für die Experimente wurde eine durch Protein A-Chromatographie gereinigte Antikörperlösung mit einer mAk-Konzentration von $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ verwendet. Analysiert wurden die Proben mit der in Kapitel B.3.2 (Material und Methoden) beschriebenen SEC-Methode, da sie den Vorteil hat, neben der Antikörperkonzentration auch den Aggregat-Anteil oder die Menge an Verunreinigungen aufzuzeigen (siehe auch Kapitel 4.1.2, Vergleich SEC- und Protein A-Chromatographie). Nach der einwöchigen Inkubation wurde die Antikörpermenge in mg, die Aggregatmenge in % sowie die Reinheit in % bestimmt. Die Reinheit kann hierbei als Qualitätsmerkmal der Probe gesehen werden. Sie wurde als

Menge der Antikörperpeakfläche im Vergleich zu allen Peakflächen des SEC-Chromatogramms berechnet. Alle Peaks neben dem Antikörperpeak, stellen Verunreinigungen wie z.B. Wirtszellproteine, DNA, Antikörperfragmente oder Aggregate mit hohem Molekulargewicht dar [14, 89, 90]. Abbildung 4.6 zeigt die Ergebnisse der Stabilitätstests des Antikörpers bei unterschiedlichen pH-Werten.

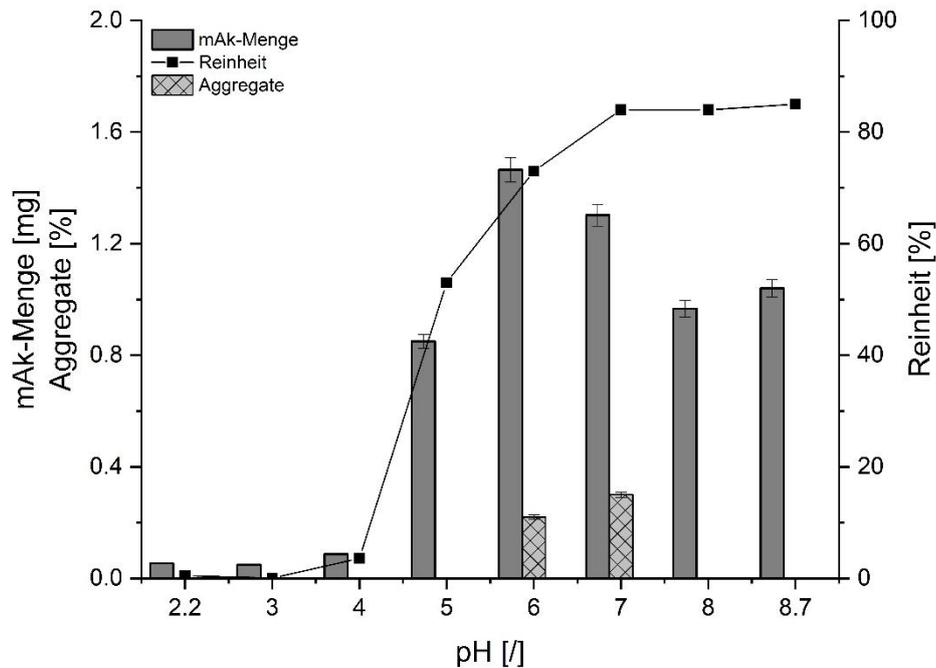


Abbildung 4.6: SEC-HPLC-Ergebnisse nach Inkubation des mAks bei 50°C für eine Woche bei verschiedenen pH-Werten, von 2,2 bis 8,7.

Die höchste mAk-Menge wurde bei den pH-Werten 6 und 7 mit einer zugehörigen Aggregatkonzentration von 0,2 bis 0,3 % beobachtet. Wobei bei einem pH-Wert von 6 die Antikörpermenge höher und der Prozentsatz an Aggregaten niedriger ist, somit ist hier die Qualität der inkubierten Antikörperlösung höher. Die Formulierungspuffer für mAks, die derzeit als Medikamente auf dem Markt sind, wie Humira®, Rituxan®, Herceptin® und Avastin®, geben pH-Werte von 5 bis 6 an [91–94]. Dieser pH-Bereich entspricht dem oben gezeigten Ergebnis beim pH-Wert 6. Auf Grund der niedrigen mAk-Menge ist von einem pH-Wert von 5 für eine Lagerung abzusehen.

Für höheren pH-Werte (pH 8 und 8,7) konnten keine Aggregate mehr nachgewiesen werden und diese Proben zeigten die höchste Reinheit. Diese hohen pH-Bereiche fallen im Hinblick auf die Aufreinigung des Antikörpers allerdings weg, da die Menge an mAk

deutlich geringer war als bei den pH-Werten 6 und 7. Außerdem liegen sie für die Polishing-Schritte wie Ionenaustauschchromatographie zu nah am Isoelektrischen Punkt (pI) des Antikörpers von 8,25. Bei pH-Werten unter 5 hingegen war nur noch eine geringe Menge an mAk zu detektieren. Das bedeutet, dass wenig intakter Antikörper vorhanden war, hier hat ein hoher Abbau des Antikörpers stattgefunden. Trotz der Aggregatbildung sind daher pH-Werte im Bereich von 6 bis 7 für die weiteren Aufreinigungsschritte und die Lagerung des Antikörpers zu bevorzugen.

Einfluss der Salzkonzentration

Zusätzlich zum pH-Wert wurde auch der Einfluss der Salzkonzentration, in Form von NaCl, auf die Antikörperstabilität untersucht. Salz wird in den meisten Aufreinigungsschritten zugesetzt und ist daher sowohl beim chromatographischen Prozess aber auch bei der Lagerung des Antikörpers von Bedeutung [90].

Es wurden zwei verschiedene pH-Bereiche untersucht. Zum einen wurden neutrale pH-Werte und zum anderen saure pH-Werte untersucht. Da sowohl der Äquilibrierungspuffer für die Protein A-Säule bei der Aufreinigung als auch der Formulierungspuffer für IgG-Antikörper neutrale pH-Werte erfordern, wurde der Einfluss von drei NaCl-Konzentrationen (0; 0,5 und 1 M) mit den pH-Werten 5, 6 und 7 getestet. Höhere pH-Werte konnten auf Grund der geringen mAk-Menge bereits beim vorherigen Versuch, der ausschließlichen Betrachtung des pH-Wertes, ausgeschlossen werden. Die Versuchsdurchführung entspricht der einwöchigen Inkubation bei 50°C des vorangegangenen Versuches mit einer mAk-Konzentration von $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in 1 mL 0,1 M Phosphat-Citrat-Puffer. Die Auswertung erfolgte abermals über eine SEC-Messung (Abbildung 4.7).

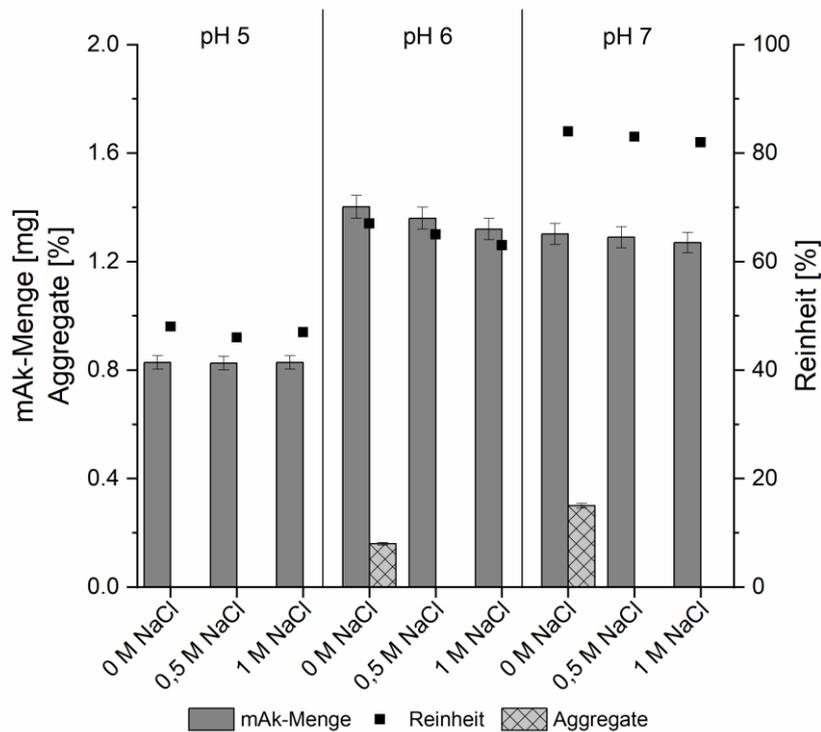


Abbildung 4.7: SEC-HPLC-Ergebnisse nach Inkubation des mAKs bei 50°C für eine Woche bei den pH-Werten von 5 bis 7, sowie verschiedenen NaCl-Konzentrationen.

Die Messungen an der HPLC ergaben bei einem pH von 5 mit der Zugabe von NaCl keine Veränderung der gemessenen Parameter. Sowohl die mAk-Menge als auch die Reinheit und der Aggregatanteil haben sich nicht verändert. Ohne Zugabe von Salz lag bei den pH-Werten 6 und 7 die höchste Antikörperkonzentration und die höchste Reinheit vor, allerdings konnten gleichzeitig auch jeweils Aggregate nachgewiesen werden. Die Zugabe von Salz senkte zwar die mAk-Menge und damit die Reinheit leicht, eliminierte aber auch die Bildung von Aggregaten komplett. Dabei führte die Zugabe von 1 M NaCl zu einem etwas größeren Verlust der mAk-Menge und der Reinheit als die Zugabe von 0,5 M NaCl. Demzufolge ist die Zugabe von 0,5 M NaCl bei diesen pH-Werten von 6 und 7 sowohl möglich als auch hilfreich.

Für die Aufreinigung und Analytik mit der Protein A-Säule ist ein niedriger pH-Wert nötig. Deswegen wurden zusätzlich die pH-Werte 2,5; 3 und 4 mit denselben NaCl-Konzentrationen (0; 0,5 und 1 M) untersucht. Die Durchführung entsprach hierbei ebenfalls der einwöchigen Inkubation bei 50°C mit einer mAk-Konzentration von 1 g·L⁻¹ in 1 mL 0,1 M Phosphat-Citrat-Puffer. Die Auswertung erfolgte über eine SEC-Messung an der HPLC (siehe Kapitel 7.1, zusätzliche experimentelle Daten). Die bereits erwähnten

negativen Auswirkungen des niedrigen pH-Wertes (Abbildung 4.6) konnten mit keiner der zugegebenen Salzkonzentrationen verringert werden. Die Addition von Salz ergab weder für die mAk-Menge noch die Aggregatmenge oder die Reinheit eine nennenswerte Verbesserung.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der mAk in einem pH-Bereich von 5 bis 8,7 sehr stabil ist, mit einem deutlichen Qualitätsverlust bei pH-Werten unter 4. Da der mAk während der Aufreinigung sowohl bei der Elution von der Protein A-Säule als auch bei der Virusinaktivierung niedrigen pH-Werten ausgesetzt ist, sollten diese Schritte so kurz wie möglich gehalten werden. Bei neutralen pH-Werten verhindert die Zugabe von Salz die Bildung von Aggregaten.

4.1.4 Fazit der analytischen Methoden und Stabilitätsexperimente

Bei der Protein A-Chromatographie konnte für die Äquilibration ein 500 mM Natriumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,9 und einer Zugabe von 500 mM NaCl als optimaler Puffer eingesetzt werden. Beim Elutionspuffer stellten sich 100 mM Glycin und 500 mM NaCl bei einem pH-Wert von 2 als optimal dar. Für die ganze Methode konnte eine Flussrate von $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ festgelegt werden, was einer Versuchsdauer von 20 min pro Probe entspricht. Die Affinitätschromatographie konnte erfolgreich verwendet werden, um die mAk-Konzentration in Kultivierungsproben zu bestimmen.

Beim Vergleich mit der SEC haben beide Methoden dieselben Ergebnisse geliefert, hinsichtlich der mAk-Konzentrationsbestimmung unterschieden sie sich nicht. Die SEC bietet allerdings verschiedene Vorteile gegenüber der Protein A-Chromatographie. Es wird nur ein Puffer benötigt, was in der Vorbereitung eine Zeitersparnis darstellt. Außerdem ist das Probenvolumen mit nur $5 \mu\text{L}$, gegenüber den $100 \mu\text{L}$ für die Protein A-Säule, viel geringer. Damit ist die SEC sowohl für kleinere Reaktions- als auch Probenvolumina von Vorteil. Des Weiteren können durch eine Zuordnung der Retentionszeit von Proteinen mit bekannten Molekulargewichten alle Peaks des Chromatogramms einem bestimmten Molekulargewicht zugeordnet werden. So lassen sich z.B. mAk-Aggregate genau identifizieren.

Die Stabilitätsuntersuchung hat ergeben, dass der mAk ist bei pH-Werten unter 4 nicht mehr stabil ist. Die nachgewiesene mAk-Menge ist bei den pH-Werten 6 und 7 am größten, allerdings bilden sich auch nur bei diesen pH-Werten Aggregate. Die Aggregatbildung kann wiederum durch Zugabe von 0,5 M NaCl verhindert werden. Somit wurde die quantitative Analytik für den mAk erfolgreich etabliert und die optimalen Lagerungsbedingungen identifiziert.

4.2 Aufarbeitung des mAks

Zur Aufarbeitung von monoklonalen Antikörpern zählt die Zellabtrennung, der Capture-Schritt mittels Protein A-Affinitätschromatographie und verschiedene Polishing-Schritte (vergleiche Kapitel 3.2.2, Theorie). Alle diese Verfahren wurden vergleichend untersucht und die chromatographischen Verfahren optimiert. Zusätzlich wurde die optimale Kombination der Polishing-Schritte bestimmt.

Der Zellkulturüberstand, der für die Aufreinigungsexperimente verwendet wurde, wurde im Zuge weiterer Promotionsarbeiten generiert (Tamanna Nagraik und Jana Schellenberg, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover). Die Kultivierungen wurden dabei in CHO-Zellen der Zelllinie DG44 durchgeführt. Eine Fed-Batch-Kultivierung wurde über 12 Tage durchgeführt (Kultivierungsbedingungen in Kapitel 4.1, experimentelle Arbeiten oder Kapitel B.1, Material und Methoden). Nach der Kultivierung sollte der Antikörper im Überstand vorliegen. Zur Überprüfung dieser Annahme und um einen Verlust an mAk zu vermeiden, wurde ein Zellaufschluss durchgeführt. Dabei wurde die mAk-Konzentration über eine SEC-HPLC-Messung vor und nach der Durchführung des Zellaufschlusses verglichen. Der Zellaufschluss wurde je zweimal 1 min mittels Ultraschall durchgeführt. Die mAk-Konzentration vor dem Zellaufschluss lag bei $2,04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und nach dem Zellaufschluss bei $2,07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Der Unterschied der beiden Konzentrationen ist minimal und wird als vernachlässigbar betrachtet, der Großteil des mAks wird somit direkt in den Überstand sekretiert.

4.2.1 Vergleich verschiedener Zellabtrennungsschritte

Nach der erfolgreichen Kultivierung der Zellen müssen diese, sowie Zelltrümmer aus der Zellkulturbrühe entfernt werden, um mit der daraus resultierenden Lösung die chromatographischen Aufreinigungsschritte durchführen zu können. Die Anforderung

an den Zellabtrennungsschritt ist enorm gestiegen, da über Hochzelldichte- oder Perfusionskultivierungen immer größere Zellkonzentrationen abgetrennt werden müssen. Allerdings können mit diesen Kultivierungsstrategien auch deutlich höhere Antikörpertiter erreicht werden [48–50].

Für den Zellabtrennungsschritt können verschiedene Techniken eingesetzt werden, bei der Aufreinigung von mAks kommen vor allem die Zentrifugation und die Filtration zum Einsatz [52, 53, 90]. Die Zentrifugation ist eine kostengünstige Methode und wird häufig im Labormaßstab verwendet. Im Prozessmaßstab hingegen wird oft die Tiefenfiltration eingesetzt, da sie zusätzlich zur Zellabtrennung zur Abreicherung von Kontaminanten führt [53]. Über Flokkulation kann eine weitere Abtrennungssteigerung der Zentrifugation oder Filtration stattfinden [56]. Hierbei werden die Zellen und Zelltrümmer über ein Flockungsmittel zu größeren Flocken vereint und anschließend aus der Zellkulturbrühe entfernt. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Verfahren für diesen Schritt im Hinblick auf ihren Abtrennungseffekt sowie den mAks-Gehalt im Überstand miteinander verglichen: Die Zentrifugation, die Tiefenfiltration und die Dynamic Body Feed Filtration.

Die Zentrifugation erfolgte bei 4700 x g für eine Stunde bei 4°C.

Die Tiefenfiltration erfolgte mit Sartoclear MaxiCap® Filtern von Sartorius Stedim Biotech GmbH (Göttingen, DE), der Aufbau der Tiefenfiltration ist in Abbildung 4.8 dargestellt.

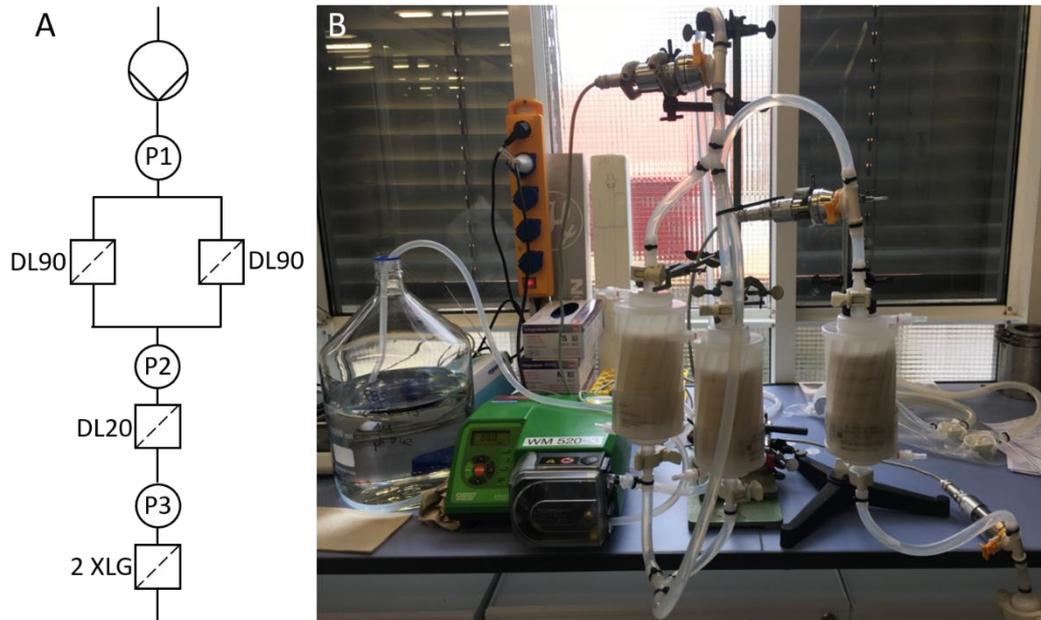


Abbildung 4.8: Aufbau der Tiefenfiltration. A: Schematische Darstellung des Aufbaus. B: Foto des Aufbaus.

Für die Tiefenfiltration wurden zuerst zwei Sartoclear MaxiCap® DL90 Filter (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE) mit einer Porengröße von $15\ \mu\text{m}$ parallel geschaltet. Dahinter folgte ein in Reihe geschalteter Sartoclear MaxiCap® DL20 Filter (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE) mit einer geringeren Porengröße von $0,8\ \mu\text{m}$, und anschließend ein Sterilfilter (Sartopore 2 XLG, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE, Porengröße $0,2\ \mu\text{m}$). Der Sterilfilter wurde eingesetzt, um das große Volumen Zellkulturbrühe, welches aufgereinigt wurde hinterher sicher lagern zu können. Vor den jeweiligen Filtereinheiten wurde der Druck kontrolliert (Abbildung 4.8 P1 – P3).

Bei der Dynamic Body Feed Filtration wurde die Zellkulturbrühe mit befeuchtetem, γ -sterilisiertem Kieselgur gemischt und anschließend über einen Sartolab® Flaschenaufsatzfilter (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE) filtriert.

Für den Vergleich der drei Zellabtrennungsmethoden wurde derselbe Überstand am Ende einer Kultivierung von Tag 12 verwendet. Die Lebendzellzahl in der Zellkulturbrühe betrug $15,75\ \text{Mio. Zellen}\cdot\text{mL}^{-1}$, bei einer Viabilität von $45,3\ \%$ und einer Trübung von $5568\ \text{NTU}$. Die geringe Zellviabilität bedeutete, dass viele Zellen bereits abgestorben waren, wodurch sich im Überstand viele Zelltrümmer befanden, was wiederum die

hohe Trübung erklärt. Tabelle 4.1 fasst die Ergebnisse der einzelnen Methoden im Vergleich zur Zellkulturbrühe zusammen. Die mAk-Konzentration sowie die Reinheit wurde über eine SEC-HPLC-Messung bestimmt.

Tabelle 4.1: Ergebnisse des Zellabtrennungsvergleichs mittels Tiefenfiltration, Dynamic Body Filtration und Zentrifugation.

| | Zellkultur- brühe | Tiefen- filtration | Dynmaic Body Feed Filtration | Zentrifu- gation |
|--|------------------------------|-------------------------------|---|-----------------------------|
| Aufreinigungsvolumen [L] | - | 4 | 0,25 | 1 |
| Dauer [min/L] | - | ~180 | ~20 | 60 |
| Trübung [NTU] | 5568 | 3,9 | 37,9 | 119 |
| mAk-Konz. [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$] | 3,17 | 2,18 | 2,88 | 3,12 |
| Reinheit [%] | 18,3 | 19,66 | 15,08 | 14,66 |

Bei den unterschiedlichen Methoden wurden auf Grund technischer Gegebenheiten unterschiedliche Volumina aufgereinigt. Über die Tiefenfiltration konnten 4 L Zellkulturbrühe aufgereinigt werden. In die Zentrifuge passt pro Ansatz 1 L Zellkulturbrühe und bei der Dynamic Body Feed Filtration waren es 250 mL. Die Dynamic Body Feed Filtration ist allerdings nur durch den Flaschenaufsatzfilter beschränkt und kann bis zu 1 L hochskaliert werden. Die Dynamic Body Feed Methode ist mit nur etwa 20 Minuten Durchführungszeit die schnellste.

Die Trübung wies vor der Zellabtrennung mit 5568 NTU einen weitaus höheren Wert auf als nach den jeweiligen Zellabtrennungsmethoden. Die Trübung dient als Maß für den Abtrennungseffekt, je mehr Zellen und Zelltrümmer vorhanden sind, desto höher die Trübung. Dabei ergab sich mit nur 3,9 NTU bei der Tiefenfiltration der geringste Wert. Hier war der Abtrennungseffekt am größten.

Über die SEC-HPLC-Methode wurde zusätzlich die mAk-Konzentration der Zellkulturbrühe und des jeweiligen Überstandes bestimmt. Die Zellkulturbrühe wies eine mAk-Konzentration von $3,17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ auf. Die mAk-Konzentration nach der Zellabtrennung war bei der Zentrifugation mit $3,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ am größten, was bei den anderen beiden Metho-

den auf einen zum Teil erheblichen Verlust des Antikörpers hindeutet. Bei der Tiefenfiltration kann Antikörper an den Membranen hängen geblieben sein. Genauso kann bei der Dynamic Body Feed Methode mAk in dem Kieselgur-Zellen-Gemisch zurückgehalten werden.

Zusätzlich zur mAk-Konzentration, wurde ebenfalls die Reinheit bestimmt. Wie in Kapitel 4.1.3 bereits beschrieben, gibt sie den prozentualen Anteil der Fläche des mAk-Peaks zur Gesamtfläche aller Peaks des Chromatogramms an. Verunreinigungen, wie Wirtszellproteine oder Aggregate, haben einen Einfluss auf diesen Wert. Die Reinheit der Zellkulturbrühe von 18,3 % zeigt einen hohen Anteil an Wirtszellproteinen an. Der Grund liegt vermutlich an der großen Menge verstorbener Zellen, deren Proteine nach der Apoptose freigesetzt werden. Prozentual ist die Reinheit des mAks nach der Tiefenfiltration am größten. Eine hohe Reinheit kann eine leichtere weitere Aufreinigung der Probe bedeuten. Bei der Dynamic Body Feed Filtration und der Zentrifugation ist dieser Wert etwas geringer.

Alle drei getesteten Methoden hatten unterschiedliche Vorteile. Die Tiefenfiltration erzielte den größten Abtrennungseffekt, die Dynamic Body Feed Methode erforderte den geringsten zeitlichen Aufwand und die Zentrifugation ergab die höchste Antikörperkonzentration. Keine der Methoden hebt sich in mehreren Punkten deutlich von den anderen ab. Auf Grund der hohen Antikörperkonzentration im Überstand und des geringen apparativ Aufwands wird für zukünftige Aufreinigungen die Zentrifugation als Zellabtrennungsschritt verwendet.

4.2.2 Optimierung des Capture-Schritts für IgG1-Systeme

Der erste Schritt der Aufreinigung, auch Capture-Schritt genannt, eines mAk ist eine Protein A-Chromatographie (siehe Abbildung 3.2, Theorie). Für diesen Schritt wurde eine HiTrap™ Protein A HP Säule (GE Healthcare, Chicago, USA) mit einem Säulenvolumen von 1 mL und einer maximalen Bindungskapazität von 20 mg IgG-Antikörper verwendet. Für diese Säule wurde eine Optimierung der Pufferzusammensetzungen durchgeführt und sowohl der Äquilibrierungs- als auch der Elutionspuffer im Hinblick auf den pH-Wert und die Salzkonzentration optimiert. Zusätzlich zum Bindungs- und Elutionsschritt wurde ein Cleaning-in-place (CIP)-Schritt in die Methode integriert. Dieser gewährleistet, dass zuvor nicht eluierter mAk von der Säule gelöst wird, um ihre

Kapazität für den nächsten Durchlauf zu erhalten. Hierfür wurden 10 Säulenvolumen 0,1 M Tris-Puffer, pH 8,5 mit 500 mM NaCl als CIP-Schritt in die Methode integriert. Genau wie bei der HPLC-Methodenoptimierung (Kapitel 4.1.1) der Protein A-Säule, wurde auch hier zuerst die Elution optimiert und anschließend die Bindungsbedingungen untersucht. Die Bindung erfolgt im neutralen pH-Bereich, während die Elution bei einem niedrigen pH-Wert (pH 2 – 4) durchgeführt wird. Als Elutionspuffer wurde auf Grund der Herstellerempfehlung eine 0,1 M Citronensäure verwendet [95]. Dass die Faktoren pH-Wert und Salzkonzentration einen Einfluss auf die Protein A-Chromatographie haben konnte bereits bei der Anwendung an der HPLC nachgewiesen werden. Es erfolgte deswegen an der Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) eine Optimierung, bei der die Faktoren nacheinander betrachtet worden sind. Zu Beginn wurde der pH-Wert untersucht und mit optimalem pH-Wert der Einfluss der Salzkonzentration.

Optimierung des Elutionspuffers

Es wurden für die Elution pH-Werte zwischen 2,5 und 4 getestet. Bei niedrigeren pH-Werten als 2,5 kann die Säule laut Herstellerangaben nicht eingesetzt werden [95]. Höhere pH-Werte hingegen wurden nicht getestet, da der nachfolgende Schritt bei der Aufreinigung eine Virusinaktivierung ist. Ein pH-Wert <4 ist für die erfolgreiche Inaktivierung von Viren nötig [96], um einen weiteren Prozessschritt zu vermeiden wird hierbei der mAk im Elutionspuffer des Protein A-Schrittes inkubiert. Auf die Säule aufgegeben wurden jeweils 3 mL Antikörperlösung mit einer mAk-Konzentration von $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Zur Auswertung wurde die Fläche des Elutionspeaks betrachtet, da diese proportional zur eluierten Antikörpermenge ist. Bei der größten Peakfläche ist also von der effizientesten Elution auszugehen. In Abbildung 4.9 sind die jeweiligen Peakflächen gegen den pH-Wert aufgetragen.

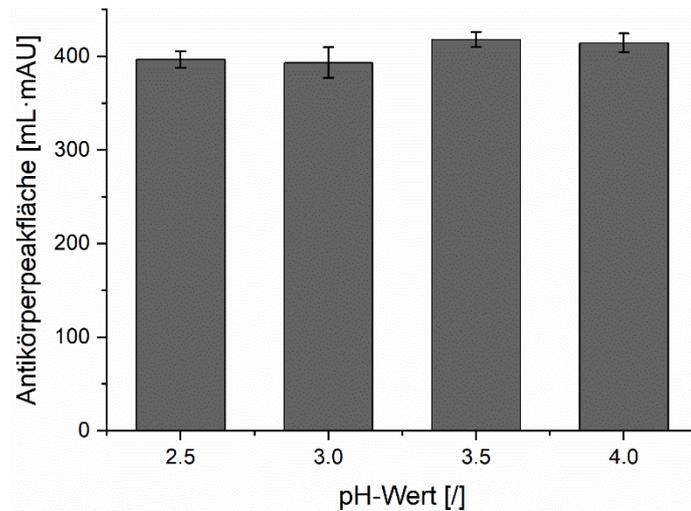


Abbildung 4.9: Flächen der an der FPLC mittels Protein A-Chromatographie ermittelten Antikörperpeaks aufgetragen gegen den pH-Wert des Elutionspuffers.

Die Peakflächen der verschiedenen pH-Werte unterschieden sich nur geringfügig, bei einem pH-Wert von 3,5 wurde die größte Fläche ermittelt. Es konnte bei keinem pH-Werte ein Peak im CIP-Schritt nachgewiesen werden, was für eine vollständige Elution des Antikörpers im Elutionsschritt steht. Ein pH-Wert von 3,5 wurde für alle folgenden Experimente als optimal festgelegt und mit diesem weitergearbeitet.

Für diesen pH-Wert wurde die optimale NaCl-Konzentration im Elutionspuffer bestimmt. Das Salz verhindert die Aggregatbildung von Antikörpermolekülen, indem intermolekulare Wechselwirkungen unterdrückt werden [80, 81]. Bereits bei der Optimierung der quantitativen Protein A-Methode an der HPLC (Kapitel 4.1.1), sowie bei den Stabilitätstests (Kapitel 4.1.3) konnte der positive Einfluss von Salz festgestellt werden. Für die präparative Protein A-Methode an der FPLC wurden im Elutionspuffer Salzkonzentrationen zwischen 0 und 750 mM NaCl getestet. Die Peakflächen sind in Abbildung 4.10 aufgetragen.

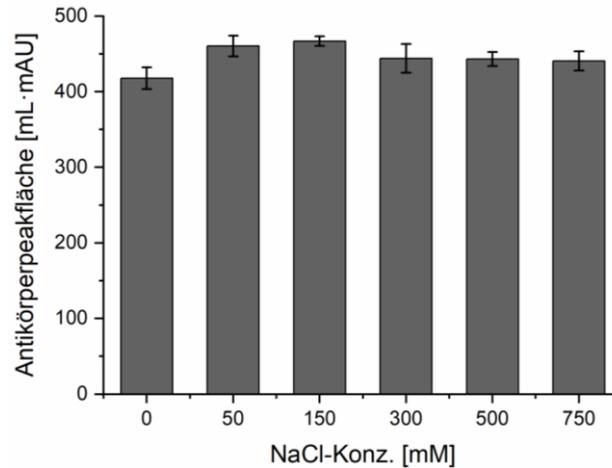


Abbildung 4.10: Flächen der an der FPLC mittels Protein A-Chromatographie ermittelten Antikörperpeaks aufgetragen gegen die NaCl-Konzentration des Elutionspuffers.

Die Antikörperpeakfläche lag für allen getesteten NaCl-Konzentrationen nah beieinander. Die Elution läuft bei kleineren NaCl-Konzentrationen, zwischen 50 und 150 mM, effizienter ab als ohne Salzzugabe, da hier größere Peakflächen ermittelt worden sind. Die Peakfläche wird ab 300 mM NaCl und höheren Salzkonzentrationen allerdings wieder kleiner. Für die Elution mit 0,1 M Citronensäure und einem pH-Wert von 3,5 wird eine Salzzugabe von 150 mM NaCl für alle weiteren Experimente verwendet. Mit diesen Bedingungen konnte die größte Peakfläche und damit auch die größte eluierte Antikörpermenge nachgewiesen werden. Ebenfalls war bei dieser Konzentration an NaCl kein Peak im CIP-Schritt der Methode nachzuweisen.

Optimierung des Äquilibrierungspuffers

Nach der Optimierung des Elutionspuffers, wurde ebenfalls der Äquilibrierungspuffer hinsichtlich des pH-Wertes und der Zugabe von Salz optimiert. Als Äquilibrierungspuffer wurde ein 20 mM Natriumphosphatpuffer verwendet. Der pH-Wert wurde in einem Bereich von 6 – 8 untersucht, weil für eine stabile Bindung ein neutraler pH-Wert relevant ist [85, 97, 98]. Die Versuche wurden ebenfalls mit 3 mL Antikörperlösung mit einer Konzentration von $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ und dem optimierten Elutionspuffer durchgeführt. Die ermittelten Peakflächen sind in der folgenden Abbildung 4.11 gegen den pH-Wert im Äquilibrierungspuffer aufgetragen.

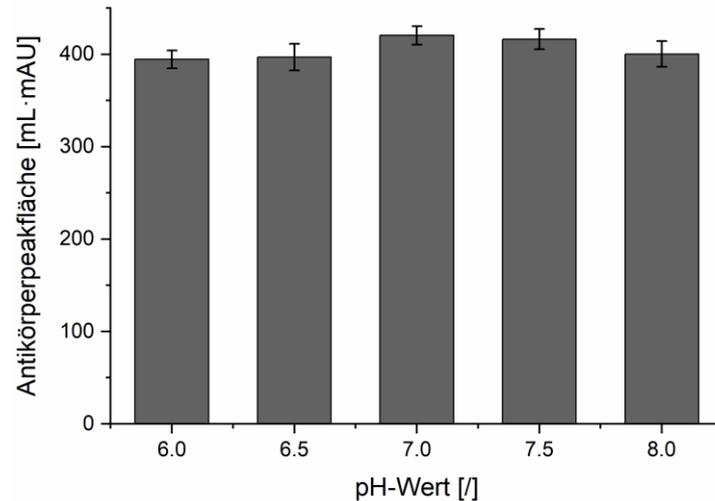


Abbildung 4.11: Flächen an der FPLC mittels Protein A-Chromatographie der ermittelten Antikörperpeaks aufgetragen gegen den pH-Wert des Äquilibrierungspuffers.

Abbildung 4.11 zeigt, dass die Peakflächen für alle getesteten pH-Werte, genau wie beim Elutionspuffer, nah beieinander liegen. Hierbei ergibt sich mit einem pH-Wert von 7 die größte Peakfläche des mAk und damit auch die größte Menge an zuerst gebundenem und dann eluiertem mAk. Dieser pH-Wert wird für die nachfolgende NaCl-Optimierung verwendet.

Es wurden Salzkonzentrationen von 0 – 500 mM NaCl getestet, die Durchführung entspricht den Durchführungen der vorangegangenen Experimente (Probenaufgabe: 3 mL, $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ mAk). Auf die Testung höherer NaCl-Konzentrationen wurde auf Grund der Ergebnisse des Elutionspuffers verzichtet, zusätzlich sollten beide Puffer einen ähnlichen Salzgehalt aufweisen [99]. In der folgenden Abbildung 4.12 sind die Ergebnisse dieser Versuche gezeigt.

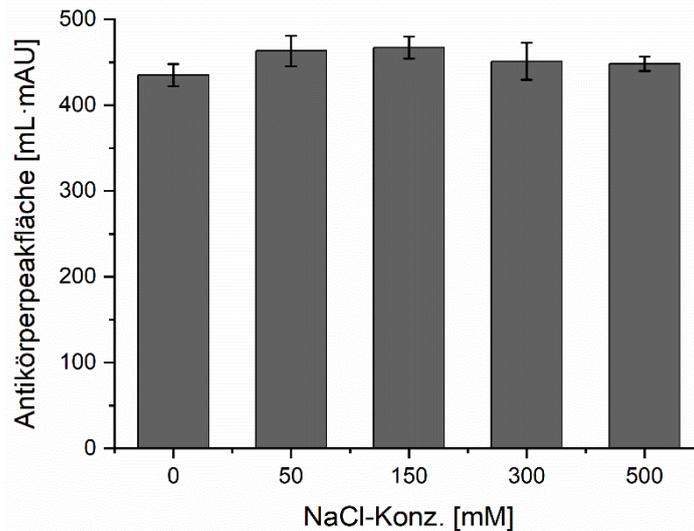


Abbildung 4.12: Flächen an der FPLC mittels Protein A-Chromatographie der ermittelten Antikörperpeaks aufgetragen gegen die NaCl-Konzentration des Äquilibrierungspuffers.

Die in Abbildung 4.12 dargestellten Antikörperpeakflächen lagen alle nah beieinander. Die NaCl-Konzentrationen 50 und 150 mM NaCl ergaben die größten Peakflächen. Am geringsten war die Peakfläche ohne Salzzugabe, was den positiven Effekt von Salz zusätzlich zu den bisherigen Ergebnissen bestätigt. Die größte Peakfläche konnte mit einer NaCl-Zugabe von 150 mM ermittelt werden, was ebenfalls der als optimal ermittelten Salzkonzentration für den Elutionspuffer entspricht. Für alle weiteren Experimente wurde für den Äquilibrierungspuffer der Protein A-Chromatographie an der FPLC (20 mM Natriumphosphatpuffer) ein pH-Wert von 7 und eine Zugabe von 150 mM NaCl verwendet.

4.2.3 Durchführung des Capture-Schritts für IgG1-Systeme

Nach der Optimierung der beiden Puffer für den Capture-Schritt bei der mAk-Aufreinigung, wurde die Protein A-Methode mit zentrifugiertem Zellkulturüberstand durchgeführt. Der Zellkulturüberstand wurde in Äquilibrierungspuffer auf eine mAk-Konzentration von $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ verdünnt und 17 mL des verdünnten Überstandes wurden auf die Säule aufgegeben, um die Herstellerangabe der maximalen Bindungskapazität von 20 mg IgG-Antikörper nicht zu überschreiten [95]. Für die Äquilibrierung wurde ein 20 mM Natriumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7 und 150 mM NaCl, für die Elution ein 0,1 M Citronensäure-Puffer mit einem pH-Wert von 3,5 und 150 mM NaCl

verwendet. Abbildung 4.13 zeigt den typischen Verlauf der Protein A-Chromatographie an der FPLC.

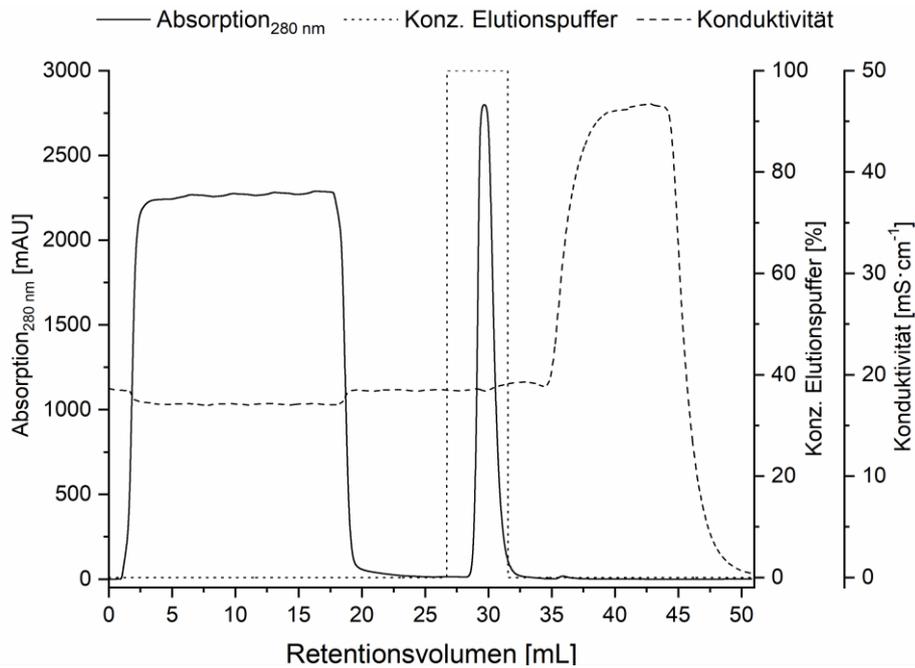


Abbildung 4.13: Typisches Chromatogramm der Protein A-Methode bei der Aufreinigung des mAks.

Der erste Absorptionspeak mit Plateau, welcher während der Probenaufgabe startet, stellt alle nicht bindenden Bestandteile des Zellkulturüberstands dar. Hier werden vor allem Wirtszellproteine detektiert, die nicht mit dem Protein A der Säule interagieren können. Es folgt ein Waschschrift der Säule mit Äquilibrierungspuffer bevor die Elution startet. Während der Elution, bei der die Konzentration des Elutionspuffers auf 100 % gesetzt wurde, wurde ein einziger Absorptionspeak detektiert. Dieser entspricht dem Antikörper, da er durch die sauren Bedingungen des Elutionspuffers von der Säule gelöst wurde. Bei dem anschließend CIP-Schritt ist ein Anstieg der Konduktivität auf Grund des höheren Salzgehaltes mit 500 mM NaCl im Vergleich zu den anderen beiden Puffern mit 150 mM NaCl detektiert worden. Allerdings wurde im CIP-Schritt kein Peak an der FPLC detektiert, was für eine erfolgreiche und komplette Elution des Antikörpers im Elutionsschritt steht.

Nach der Durchführung der Aufreinigung mittels Protein A-Chromatographie wurde über die SEC-HPLC-Methode die Antikörperkonzentration der Probe bestimmt und mit diesem Wert anschließend die Ausbeute. Es wurden 17 mg Antikörper auf die Säule gegeben, von denen 15,08 mg in der Elution nachgewiesen worden sind, das entspricht

einer Ausbeute von 88,7 %. Diese Ausbeute entspricht den in der Literatur angegebenen Werten von 85 – 95 % Produkterhalt nach dem ersten Aufreinigungsschritt. Ebenfalls wurde die Reinheit der Probe über das Verhältnis der Antikörperpeakfläche zu allen in der SEC-HPLC-Methode detektierten Peakflächen bestimmt. Je weniger Peaks neben dem Antikörperpeak detektiert wurden, desto weniger Verunreinigungen befanden sich in der Probe. In der Literatur werden Reinheiten des Produktes von 90 – 98 % angegeben [54, 57, 100, 101]. Es wurde eine Reinheit von 90 % bestimmt, diese lag damit im Bereich der in der Literatur zu findenden Angaben.

Bei der industriellen Aufreinigung des mAks folgt nach dem Protein A-Schritt eine Virusinaktivierung im Elutionspuffer der Protein A-Chromatographie erfolgen (Kapitel 3.2.2, Theorie). Um den Abbau des mAks zu verhindern, sollte dieser Schritt so kurz wie möglich gehalten werden, aber trotzdem die komplette Virusinaktivierung sicherstellen. Typisch sind dabei Inkubationszeiten von 30 – 60 min [102]. Die Elution der Protein A-Säule und die Virusinaktivierung können bei pH-Werten im Bereich 3 bis 4 durchgeführt werden [61, 96, 103]. Der für diese Arbeit optimierte Elutionspuffer mit einem pH-Wert von 3,5 ist damit für die Virusinaktivierung geeignet. Da keine Möglichkeit zur Überprüfung der Virusinaktivierung zur Verfügung stand, wurde dieser Schritt bei der weiteren Betrachtung des Aufreinigungsprozesses des mAks vernachlässigt.

4.2.4 Vergleich von Säulen- und Membranadsorberchromatographie für den Capture-Schritt

Im Aufreinigungsprozess von mAks stellt der Einsatz von chromatographischen Säulen sowohl für den Capture-Schritt als auch für die folgenden Polishing-Schritte den aktuellen Stand der Technik dar [104, 105]. Mit der Verwendung einer Säule sind verschiedene Vor- und Nachteile verbunden. Auf der einen Seite sind Säulen auf Grund ihrer weit verbreiteten Anwendung in vielen Größen mit unterschiedlichen Säulenmaterial und Funktionalitäten kommerziell erwerblich. Auf der anderen Seite werden bei dieser Methode hohe Volumina an Puffer sowie Lösungsmittel verbraucht und wegen geringer Flussraten ist der zeitliche Aufwand einer Trennung von Stoffen oft groß.

Andere Systeme als Alternativen zu Säulen befinden sich bereits in der Entwicklung, dazu gehören auch die Protein A-Membranadsorber (MA). Im Gegensatz zur Säule und ihrem Säulenmaterial ist ein MA mit einer funktionalisierten und gefalteten Membran

gefüllt, an der die Liganden gekoppelt werden [106]. Obwohl der MA Prozess generell eine niedrigere Kapazität aufweist als Säulen, können Modifikationen wie Oberflächenveredelung oder Porenfüllung diese Lücke schließen [107, 108]. Außerdem können sie mit höheren Durchflussraten betrieben werden, was zu einem schnelleren Prozess führt. MA haben einen geringeren Pufferverbrauch, sind leichter skalierbar und haben eine effektivere Aufkonzentrierung als Säulen [109]. Knudsen *et al.* publizierte bei der Protein A-Chromatographie höhere Durchsätze bei Verwendung von Membranadsorber [110, 111]. Ziel dieses Kapitels ist der direkte Vergleich eines Protein A-Säulensystems und eines Protein A-MA-Systems für den ersten Reinigungsschritt eines mAk, um die verschiedenen Vor- und Nachteile beider Systeme zu untersuchen.

4.2.4.1 Durchführung des Capture-Schritts

In diesem Abschnitt wurde der Capture-Schritt, die Protein A-Chromatographie sowohl mit einer Säule als auch einem MA durchgeführt. Über die Reinheit, die Ausbeute und den Aggregatanteil wurden beide Systeme anhand der Effizienz und der Produktqualität direkt miteinander verglichen.

Ein Sartobind® Protein A-MA (2 mL, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE) wurde verwendet sowie die bereits im vorherigen Kapitel beschriebene Protein A-Säule (HiTrap™ Protein A HP Säule, 1 mL, GE Healthcare, Chicago, USA). Um den Einfluss unterschiedlicher Puffer auf die Ergebnisse auszuschließen, wurde der gleiche PBS-Puffer (pH 7,4) als Äquilibrierungspuffer eingesetzt. Als Elutionspuffer wurde eine 0,1 M Citronensäure, pH 3,5 und 150 mM NaCl eingesetzt. Es wurden jeweils 2 mL Probe eines auf 1 g·L⁻¹ mAk verdünnten Zellkulturüberstandes aufgegeben. Die Chromatogramme der beiden Systeme sind in Abbildung 4.14 dargestellt.

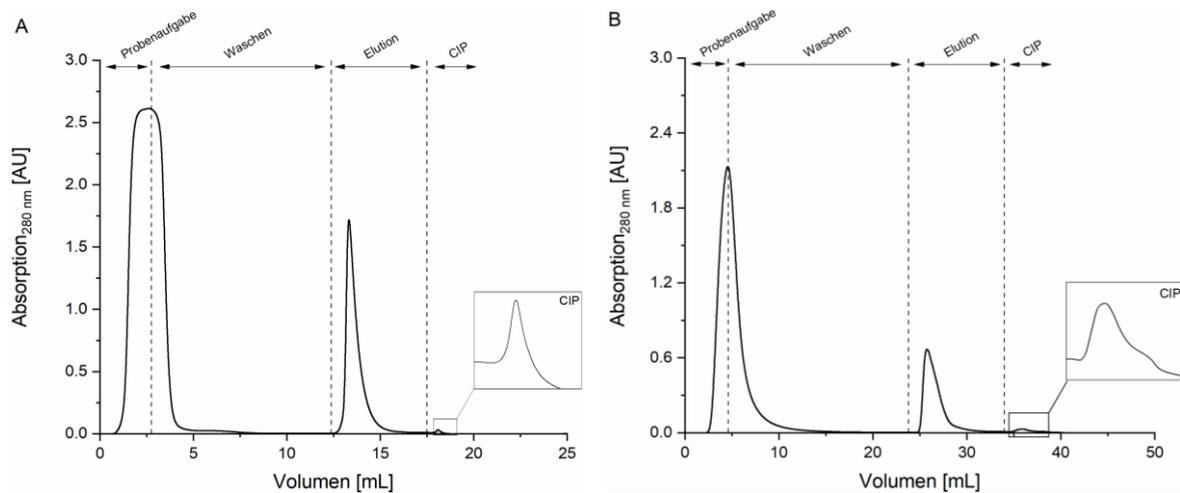


Abbildung 4.14: Protein A-Chromatogramme der Säule und des MA. A: Säule. B: MA.

Der erste detektierte Peak bei beiden Methoden stellt den Durchfluss aller Proteine dar, die nicht an Protein A binden (Phasen: Probenaufnahme und Waschschrift). Das UV-Signal der Probenaufnahme für den MA ist niedriger als für die Säule und zeigt auf Grund der für MA typischen Rückvermischung durch ihre Kapselform kein typisches Plateau. Nach dem Waschschrift folgt die Elution bei der der Antikörperpeak detektiert wird. Hierbei ist das UV-Signal des Peaks für die Säule ebenfalls höher als für den MA. Die Peakformen sind zwar unterschiedlich, die Peakfläche allerdings ist gleich groß. Die letzte Phase eines jeden Chromatogramms ist der CIP-Schritt. Sowohl für den MA als auch für die Säule, konnte ein sehr kleiner CIP-Peak detektiert werden, der auf Antikörper hinweist, der zuvor nicht eluiert wurde. Ein kompletter Durchlauf mit dem MA dauerte auf Grund der höheren Durchflussraten, mit denen er betrieben werden konnte, nur 12,5 min. Im Vergleich dazu dauerte ein Durchlauf der Säule 31 min.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wird das Verhältnis der Elutionspeakflächen zur Summe der CIP-Peak- und Elutionspeakflächen bestimmt. Die Wiederfindungsrate für die Säule lag bei 99,4 %. Für den MA fiel der Werte mit 94,2 % etwas geringer aus.

Zusätzlich wurden die Ausbeute, die Reinheit und die Aggregatmenge über eine SEC-HPLC-Messung bestimmt. Es wurden jeweils 5 μ L der Elutionsfraktionen aus Abbildung 4.14 auf die Säule gegeben. Tabelle 4.2 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 4.2: HPLC-SEC Ergebnisse des Vergleiches zwischen Protein A-Säule und -MA.

| | Ausbeute [%] | Reinheit [%] | Aggregate [%] |
|-------|--------------|--------------|---------------|
| Säule | 78 | 77,2 | 0,11 |
| MA | 78 | 76,9 | 0,26 |

Sowohl die Ausbeute mit 78 % als auch die Reinheit mit etwa 77 % beider Systeme sind vergleichbar. Der Anteil an Aggregaten war bei der Verwendung des MA etwas höher, aber die Menge an Aggregaten ist mit unter 1 % für beide Systeme sehr gering. Für einen effizienten Protein A-Schritt werden in der Literatur Aggregatmengen unter 1 % angegeben [112], womit beide Systeme geeignet wären.

Zusammengefasst waren die Ausbeute und die Reinheit beider Systeme vergleichbar, lediglich die Aggregatmenge war beim MA etwas höher. Allerdings kann der MA mit höheren Flussraten betreiben werden und ermöglicht dadurch kürzere Durchlaufzeiten. Die Säule hingegen ergab mit 99,4 % eine höhere Wiederfindungsrate in der Elutionsfraktion.

4.2.4.2 Durchbruchskurve der Säule und des MA

Um die Bindungskapazitäten zwischen der Säule und dem MA bestimmen und vergleichen zu können, wurde für beide Systeme eine Durchbruchskurve aufgenommen. Dabei wurde das UV-Signal bei 280 nm sowohl vor der Säule oder dem MA als auch nach der Säule oder dem MA ermittelt. Es wurde so lange Probe aufgegeben bis beide Signale identisch waren. An diesem Punkt wird die Probe ohne jegliche Interaktion mit der Säule oder dem MA durch das System gespült. Nach dem Aufnehmen der Durchbruchskurve an der FPLC, wurde die jeweilige mAk-Konzentration mittels Protein A-Methode an der HPLC bestimmt (Abbildung 4.15). Es wurde zentrifugierter Zellkulturüberstand mit einer mAk-Konzentration von $360 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ aufgegeben.

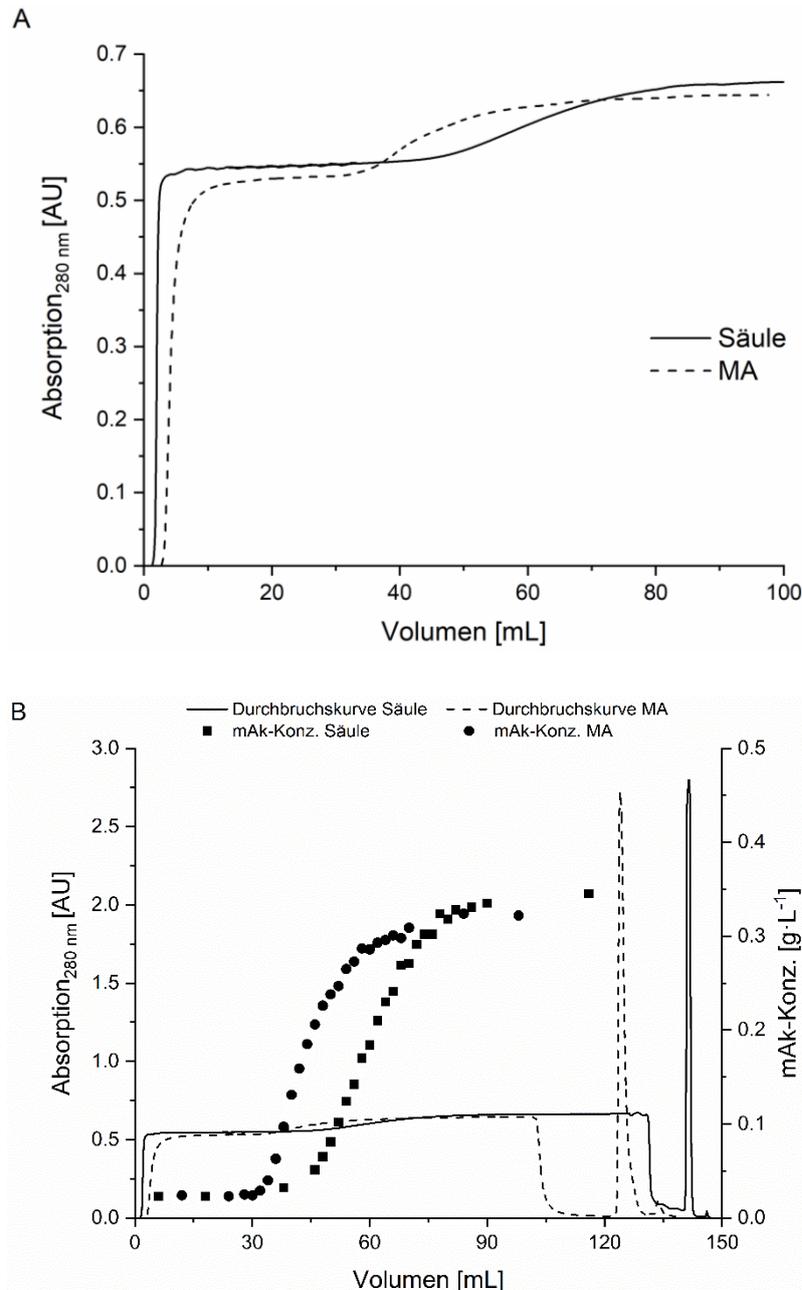


Abbildung 4.15: Durchbruchskurve für die Säule und den MA. A: Durchbruchskurve. B: Durchbruchskurven-Chromatogramm mit jeweiliger mAk-Konz. über die Dauer der Durchbruchskurve. Die mAk-Konz. wurde mittels Protein A-HPLC-Methode gemessen.

Abbildung 4.15, A zeigt zu Beginn den Durchbruch der nicht bindenden Verunreinigungen der Kultivierung in dem charakteristischen ersten Plateau unmittelbar nach dem ersten Anstieg der Kurve. Sobald das UV-Signal über diesen Durchbruch der nicht bindenden Verunreinigungen anstieg, sind die Säule und der MA mit Produkt gesättigt, es

folgte der Durchbruch des Produkts, in diesem Fall des mAks. Der Durchbruch des Produkts wurde beim MA nach 32 mL detektiert und damit früher als bei der Säule (nach 45 mL).

Abbildung 4.15, B zeigt das vollständige Chromatogramm der Durchbruchskurven sowie die zusätzlich bestimmte mAk-Konzentration über ihren Verlauf. Die mAk-Konzentration stieg von nahe null bis zur aufgegebenen Konzentration von $360 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ zwischen dem ersten und zweiten Plateau der Durchbruchskurve an. Erreichte das UV-Signal vor und hinter der Säule oder dem MA den gleichen Wert, wurde das Aufnehmen der Durchbruchskurve gestoppt. Nach Beendigung der Durchbruchskurve wurde der gebundene mAk von beiden Systemen eluiert, beim MA nach 125 mL und bei der Säule nach 143 mL.

Anhand der Durchbruchskurven kann sowohl die dynamische als auch die statische Bindungskapazität berechnet werden. Die dynamische Bindungskapazität (DBC) ist die Menge Antikörper, die unter operativen Bedingungen an die Säule oder Membran gebunden wird, bevor es zum signifikanten Durchbruch des ungebundenen Antikörpers kommt. Aus der Durchbruchskurve wird die DBC bei 10 % Antikörperdurchbruch bestimmt. Die statische Bindungskapazität (SBC) wird häufig im Batch-Modus gemessen, sie wird angegeben als die maximale Menge des gebundenen Proteins bei gegebener Lösemittel- und Proteinkonzentration. Der Begriff Batch-Prozess bedeutet hierbei, dass nur eine bestimmte Menge Probe aufgegeben und getrennt werden kann, bevor die nächste Probenmenge aufgegeben wird. Der Proteinverlust liegt bei der SBC oft bei 50 %. Die DBC und SBC werden nach folgenden Gleichungen berechnet:

$$\text{Dynamische Bindungskapazität (10\%)} = (V_{\text{DB10}} - V_0) \cdot c_0 \quad (1)$$

$$\text{Statische Bindungskapazität (50\%)} = (V_{\text{DB50}} - V_0) \cdot c_0 \quad (2)$$

Dabei stehen V_{DB10} und V_{DB50} für das aufgegebene Volumen bis zum Durchbruchspunkt, V_0 ist das Hohlraumvolumen der Säule oder des MA und c_0 ist die mAk-Konzentration der aufgegebenen Probe. Die nachfolgende Tabelle zeigt die berechneten Kapazitäten für beide Anwendungen, sowie die Herstellerspezifikationen [95, 113].

Tabelle 4.3: Dynamische und statische Bindungskapazitäten von Säule und MA.

| | Säule | MA |
|-------------------------------|---------|-----------|
| Dynamische Bindungskapazität | 17.0 mg | 11.7 mg |
| Statische Bindungskapazität | 21.8 mg | 14.9 mg |
| Spezifikation des Herstellers | 20 mg | 10 -15 mg |

Die DBC für den MA-Prozess lag im Bereich der Herstellerangabe und war höher verglichen mit Literaturangaben (6 – 10 mg) [112]. Im Gegensatz dazu lag die DBC der Säule unter der Herstellerangabe, war aber vergleichbar mit anderen Säulen von GE Healthcare, die ebenfalls mit einem Sepharose™-Material gefüllt sind [110]. Sowohl die DBC als auch die SBC lagen für die Säule höher als für den MA. Damit liegt die Kapazität der Säule um etwa 30 % über der des MA. Der MA wurde erstmals im Jahr 2006 von der Sartorius Stedim Biotech GmbH (Göttingen, DE) auf den Markt gebracht. Weitere Entwicklungen im Bereich der MA, um die Kapazitäten zu erhöhen werden in naher Zukunft erwartet [110].

4.2.4.3 Produktivität, Pufferverbrauch und Effizienz

In diesem Abschnitt wurde ein direkter Vergleich der Säule und des MA in Bezug auf die Produktivität des Batch-Prozesses, die Kapazitätsauslastung des Säulenmaterials oder der Membran und den Pufferverbrauch durchgeführt. Auch hier steht Batch-Prozess dafür, dass nur eine bestimmte Menge Probe aufgegeben und getrennt werden kann, bevor die nächste Probenmenge aufgegeben wird. Für Produktivitätsberechnungen wurden die Daten der voran gegangenen Experimente (Kapitel 4.2.4.2) genutzt. Die Produktivität ist definiert als die Menge an Säulenfüllmaterial und Zeit, um eine bestimmte Menge an Produkt zu produzieren. Kaltenbrunner *et al.* haben folgende Gleichungen zur Berechnung der Produktivität eines Säulen-Batch-Prozesses veröffentlicht [114]:

$$P = \frac{m_{\text{Zyklus}}}{V_{\text{Säule}} \cdot (t_L + t_T)} \quad (3)$$

Wobei m_{Zyklus} die Masse des Produkts definiert, dass vor der Elution an der Säule bindet und $V_{\text{Säule}}$ dem Säulenvolumen entspricht. t_L ist die Zeit der Beladung. Dabei wird bei der Produktivitätsberechnung die Zeit der Beladung bis zur DBC (10 % Produktverlust) betrachtet. T_T stellt die Zeit für einen Chromatographielauf dar (Gleichung 4).

$$t_T = \frac{t_W + t_{EL} + t_{SA} + t_{ST} + t_{EQ}}{N} \quad (4)$$

T_T ist die Summe der Zeiten für den Waschschriff (t_W), die Elution (t_{EL}), den Reinigungsschritt (t_{SA}), den CIP-Schritt (t_{ST}) sowie für die Äquilibration (t_{EQ}) geteilt durch die Anzahl der Säulen (N).

Die Zeit der Beladung bis zu DBC (t_L) lag bei der Säule bei 48,3 min, für den MA ergaben sich 6,9 min. Ebenfalls wurde die Zeit für einen Chromatographielauf berechnet, für die Säule waren es 30 min und für den MA 12 min. Die DBC gibt die Menge an Produkt an, die gebunden wurde (m_{Zyklus}). Mit Gleichung 3 kann ein direkter Vergleich von Säulen- und MA-Produktivität in mg aufgereinigtes Produkt pro mL (Säule oder MA) und h hergestellt werden. Die Produktivität in einem Batch-Prozess, für diesen Zweck definiert als Beladung bis zu einem Produktdurchbruch von 10 %, der Säule beträgt $13 \frac{\text{mg}}{\text{mL}\cdot\text{h}}$, während die Produktivität des MA $18,6 \frac{\text{mg}}{\text{mL}\cdot\text{h}}$ beträgt. Dieser Unterschied entsteht vor allem auf Grund der deutlich kürzeren Beladungs- und Chromatographielaufzeit des MA.

Der gesamte Pufferverbrauch, für Äquilibration, Elution und CIP-Schritt, beträgt für den MA 60 mL, für die Säule liegt dieser Pufferverbrauch bei 30 mL. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass der MA mit 2 mL ein größeres Hohlraumvolumen hatte als die Säule mit 1 mL. Ebenfalls kann zum Vergleich herangezogen werden, dass ein kompletter Chromatographielauf, bei dem bis zur DBC beladen wird, bei der Säule 78 min dauert, während der MA-Lauf nur 17 min braucht. Der zeitliche Unterschied entsteht, weil die Flussrate für den MA mit $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ deutlich höher war als für die Säule mit $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Die nachfolgende Tabelle 4.4 stellt noch einmal die wichtigsten Ergebnisse der Säule und des MA gegenüber.

Tabelle 4.4: Zusammenfassender Vergleich der Säule und des MA.

| | DBC [mg] | Produktivität [$\frac{\text{mg}}{\text{mL}\cdot\text{h}}$] | Pufferver- brauch [mL] | Durchlaufzeit bis DBC [min] | Flussrate [mL·min ⁻¹] |
|-------|-------------|---|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| Säule | 17 | 13 | 30 | 78 | 5 |
| MA | 11,7 | 18,6 | 60 | 17 | 1 |

Zusammenfassend besitzt die Säule eine höhere DBC und einen geringeren Pufferverbrauch. Der MA hingegen zeigte eine höhere Produktivität und hat auf Grund der höheren Flussrate mit der betrieben werden kann, niedrigere Durchlaufzeiten. Für industrielle Projekte könnte sich der Einsatz von MA auf Grund des geringeren Zeitfaktors sowie der höheren Produktivität für größere Mengen an aufzureinigendem Volumen eignen. Wird die Protein-A-Chromatographie im Labormaßstab mit geringen Proben volumina eingesetzt, so ist die Säule mit ihrer höheren dynamischen Bindungskapazität eine bessere Wahl.

4.2.5 Polishing-Schritte

Wie in der Theorie beschrieben (Kapitel 3.2.2), folgt nach dem Capture-Schritt, der Protein A-Chromatographie, eine Virusinaktivierung. Dieser Schritt wurde im Zuge dieser Arbeit nicht berücksichtigt, da keine Möglichkeiten zugänglich waren, eine erfolgreiche Inaktivierung der Viren nachzuweisen. Im Anschluss an die Virusinaktivierung folgen zwei chromatographische Polishing-Schritte, um verbliebene Verunreinigungen zu entfernen. Durch den Protein A-Chromatographieschritt konnte bereits eine Reinheit des Produktes von 90 % erzielt werden. Bei der weiteren Aufreinigung sollen vor allem Antikörperaggregate, DNA, Wirtszellproteine aus dem Kultivierungsorganismus sowie ausgewaschenes Protein A aus dem Capture-Schritt entfernt werden [14, 62]. Teile der praktischen Arbeiten wurden von Frau C. Kortmann in ihrer Masterarbeit (siehe Kapitel 9) durchgeführt.

Als Polishing-Schritte kommen für den mAk vor allem die Ionenaustauschchromatographie als Anionen- und Kationenaustauschchromatographie, sowie die Hydrophobe Interaktionschromatographie zum Einsatz [115].

Bei der Ionenaustauschchromatographie wird über den isoelektrischen Punkt eine Trennung des mAks von den Wirtszellproteinen erreicht. Der pI des mAks liegt laut Literatur bei 8,25 [116]. Im Gegensatz dazu liegt der pI der meisten Wirtszellproteinen von CHO-Zellen unter 7 [70]. Über die Einstellung des pH-Wertes des verwendeten Puffers, konnte die Nettoladung des mAks beeinflusst werden. Die Nettoladung des mAks ist am isoelektrischen Punkt Null. Bei pH-Werten oberhalb des pI ist die Nettoladung des mAks negativ, bei pH-Werten unterhalb des pI hingegen positiv. Bei einem pH-Wert von 9,25 oder größer bindet der mAk an den Anionenaustauscher und bei einem pH-Wert von 7,25 oder niedriger an den Kationenaustauscher [117].

Bei der hydrophoben Interaktionschromatographie hingegen kommt es zu Wechselwirkungen der hydrophoben Bereiche des mAks, welche durch Salz im Äquilibriumspuffer freigelegt werden, und der hydrophoben stationären Phase.

4.2.5.1 Anionenaustauschchromatographie

Als einer der Polishing-Schritte wurde die Anionenaustauschchromatographie (AEX) optimiert. Hierfür wurde eine HiTrap Q HP Säule (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA) mit einem Säulenvolumen von 1 mL verwendet. Diese Säule besitzt ein quaternäres Ammonium-Anionenaustauscherharz, an das negativ geladenen Moleküle binden. Die Optimierung der Methode wurde mit unterschiedlichen pH-Werten begonnen. Die AEX wird bei der Aufreinigung von mAks häufig im Flow-through-Modus verwendet, bei dem der mAk nicht an die Säule bindet. Negativ geladene Verunreinigungen, wie Nukleotide oder DNA-Fragmente hingegen binden an die Säule [90].

Optimierung des pH-Wertes

Da der Hersteller der Säule für bestimmte pH-Werte bestimmte Puffer empfiehlt, wurde sich an diesen orientiert und folgende Bedingungen untersucht: pH 6,5 (Bis-Tris-Puffer), pH 7,5 und 8,5 (Tris-Puffer) sowie pH 9,5 und 10 (Ethanolamin) [118]. Diese Puffer wurden für die Äquilibrierung in einer Konzentration von 20 mM eingesetzt, wohingegen der Elutionspuffer dem Äquilibrierungspuffer entsprach und zusätzlich mit 1 M NaCl versetzt worden ist. Für jeden Durchlauf wurden 3 mL einer durch Protein A-Chromatographie (siehe Kapitel 4.2.3, experimentelle Arbeiten) aufgereinig-

ten Antikörperlösung mit einer mAk- Konzentration von $0,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ aufgegeben. Zusätzlich zur Antikörperpeakfläche wurde der jeweilige Modus des Chromatographielaufes bestimmt. Dabei wird zwischen dem Bind-and-elute-Modus, bei dem der mAk als Zielprotein an die Säule bindet und später eluiert und dem Flow-through-Modus unterschieden, bei dem der mAk nicht mit den Liganden der Säule interagiert, sondern direkt im Durchfluss detektiert wird. Abbildung 4.16 zeigt den Einfluss des pH-Wertes auf die mAk-Peakfläche und den Modus der Chromatographie bei der AEX.

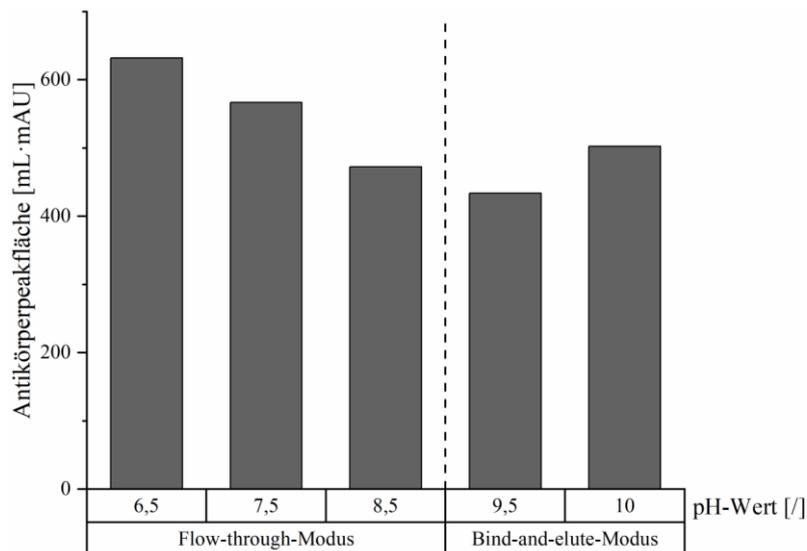


Abbildung 4.16: Einfluss des pH-Wertes auf die Peakfläche und den Modus bei der AEX an der FPLC [119].

Mit einem pH-Wert von 6,5 wurde die größte Peakfläche ermittelt, da diese proportional zur Antikörpermenge ist, wurde hier auch die größte Antikörpermenge im Durchfluss (Flow-through-Modus) nachgewiesen. Mit steigendem pH-Wert, bis 9,5, wurde die Peakfläche geringer. Wohingegen ein pH-Wert von 10 wieder eine erhöhte Peakfläche allerdings im Bind-and-elute-Modus hervorrief. Lag der pH-Wert (9,5 und 10) über dem pI des mAks, so lag der Ak negativ geladen vor und band an die Säule. Der Antikörperpeak wird in der Elution detektiert. War der pH-Wert hingegen kleiner (6,5 und 7,5) als der pI, so lag der Antikörper positiv geladen vor und band damit nicht an die Säule. Der Antikörperpeak wurde bereits im Durchfluss detektiert, wohingegen negativ geladenen Verunreinigungen binden können.

Eine Ausnahme stellt der pH-Wert von 8,5 dar, hier war ein Großteil des Antikörperpeaks ebenfalls im Durchfluss zu finden, allerdings hat auch ein geringer Teil der aufgegebenen mAk-Menge an die Säule gebunden. Etwa 10 % des mAks wurden erst in der Elution nachgewiesen. Dieser Effekt trat auf, weil der pH-Wert von 8,5 sehr nah am pI des mAks mit 8,25 lag.

Da die größte Peakfläche bei einem pH-Wert von 6,5 ermittelt worden ist und die AEX für die Aufreinigung von Antikörpern meist im Flow-through-Modus verwendet wird [104], wurde für die weitere Optimierung dieser pH-Wert gewählt.

Optimierung der NaCl-Konzentration

Der Antikörperpeak bei einem pH-Wert von 6,5 wies eine Asymmetrie auf (siehe Abbildung 7.2, zusätzliche experimentelle Daten), die Ursache kann in einem nicht ausreichend stabilisierten mAk liegen. Der stabilisierende Effekt von Salz wurde bereits bei der Optimierung der Protein A-Methoden, sowohl an der HPLC als auch an der FPLC, sowie bei der Stabilitätstestung gezeigt.

Für die AEX wurde der Einfluss der Zugabe von 0 M bis 0,5 M NaCl im Äquilibrierungspuffer zur Stabilisierung des mAks untersucht. Die Durchführung entspricht der für die pH-Wert Optimierung: 3 mL einer durch Protein A-Chromatographie aufgereinigten Antikörperlösung mit einer mAk-Konzentration von $0,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ wurden aufgegeben. Sobald Salz zugegeben wurde, konnte ein stärker fokussierter und damit symmetrischer Antikörperpeak detektiert werden. Außerdem wurden die Antikörperpeakflächen bestimmt, um die optimale Salzkonzentration zu ermitteln (Abbildung 4.17).

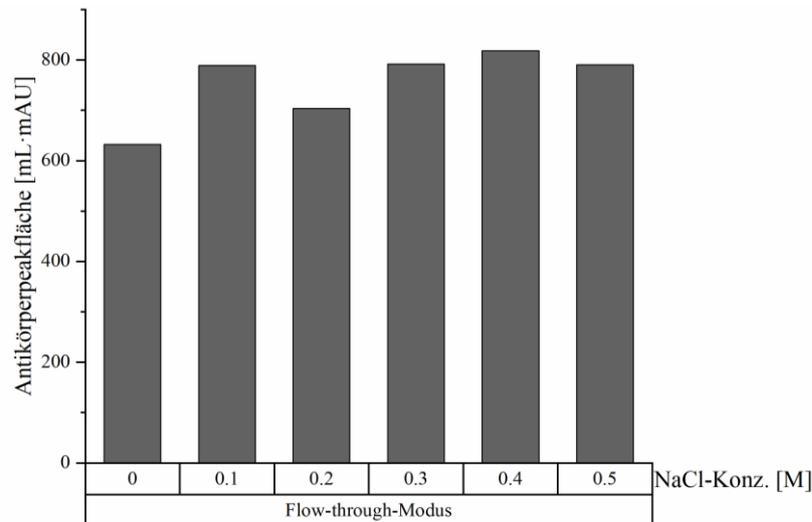


Abbildung 4.17: Einfluss der NaCl-Konzentration auf die Peakfläche bei der AEX an der FPLC [119].

Durch die Zugabe von NaCl in den Äquilibrierungspuffer erhöht sich die Antikörperpeakfläche. Bei 0,2 M NaCl blieb die Peakfläche niedriger als bei allen anderen Salzkonzentrationen. Der Unterschied bei den anderen eingesetzten NaCl-Konzentrationen ist relativ gering, dennoch konnte mit 0,4 M NaCl die höchste Peakfläche ermittelt werden. Für den AEX konnte damit als optimaler Äquilibrierungspuffer ein 20 mM Bis-Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 6,5 und einer Zugabe von 0,4 M NaCl bestimmt werden.

Durchführung der AEX

Unter den zuvor optimierten Bedingungen, ein 20 mM Bis-Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 6,5 und 0,4 M NaCl, wurde die AEX durchgeführt (Abbildung 4.18). Dabei wurden 3 mL einer durch Protein A-Chromatographie gereinigten Antikörperlösung mit einer Konzentration von $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ verwendet. Anschließend wurden die Ausbeute und Reinheit des Antikörpers über eine SEC-HPLC-Messung bestimmt.

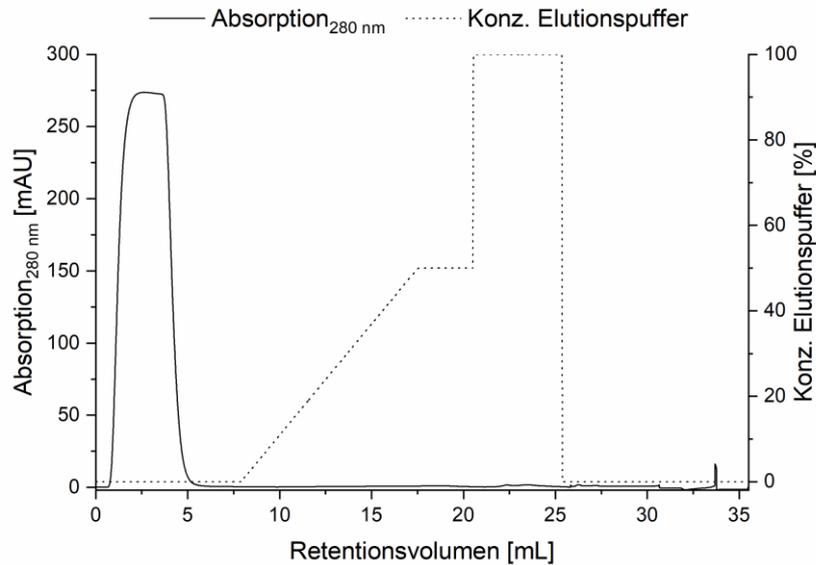


Abbildung 4.18: Chromatogramm der AEX-Methode bei der Aufreinigung des mAKs (modifiziert nach [119]).

Im Flow-through-Modus wird der mAK-Peak direkt zu Beginn während der Probenaufgabe detektiert. Während der Elutionsphase wird kein Peak detektiert, was bedeutet, dass unter den gewählten Bedingungen kein Antikörper an die Säule gebunden hat. Ein weiterer sehr kleiner Peak konnte nach 33 min detektiert werden, der auf einen Verlust des Antikörpers hindeutet.

Über die SEC-Methode an der HPLC wurde die Ausbeute des mAKs in diesem Lauf bestimmt. Dabei wurde eine Ausbeute von 91,5 % erzielt. Diese liegt leicht über den in der Literatur beschriebenen durchschnittlichen Produktausbeuten von 90 % [90]. Die ermittelte Reinheit liegt mit 99,4 % in dem zu erwarteten Bereich von >99 % nach dem zweiten Aufreinigungsschritt [104].

4.2.5.2 Kationenaustauschchromatographie

Neben der Anionen- wurde auch die Kationenaustauschchromatographie (CEX) als möglicher Polishing-Schritt bei der mAK-Aufreinigung untersucht. Hierfür wurde eine HiTrap SP HP Säule (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA) mit einem Säulenvolumen von 1 mL verwendet. Die Liganden des Säulenmaterials sind Sulfite, an die positiv geladenen Moleküle binden. Die CEX wird bei der Antikörperaufreinigung häufig im Bind-and-elute-Modus verwendet. Hierbei bindet der mAK an die Säule und Verunreinigungen wie Wirtszellproteine oder ausgewaschenes Protein A werden über den Durchfluss entfernt [14, 120].

Optimierung des pH-Wertes

Genau wie bei der AEX wurde mit einer Optimierung des pH-Wertes im Äquilibriumspuffer begonnen und sich an den Herstellerangaben hierzu orientiert [118]. Folgenden Puffer wurden getestet: pH 6 und 6,5 (MES-Puffer), pH 7 und 8 (HEPES-Puffer) sowie pH 9 (Bicin-Puffer). Alle Puffer wurden in einer 50 mM Konzentration hergestellt. Der Elutionspuffer entspricht dem Äquilibriumspuffer mit einer Zugabe von 1 M NaCl. Die Probenaufgabe waren 3 mL einer durch Protein A-Chromatographie (siehe Kapitel 4.2.3, experimentelle Arbeiten) aufgereinigten Antikörperlösung mit einer mAk-Konzentration von $0,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Zusätzlich wurde auch hier der Modus der Chromatographie bestimmt. Abbildung 4.19 zeigt den Einfluss des pH-Wertes auf die mAk-Peakfläche sowie die Modi, die sich jeweils ergaben.

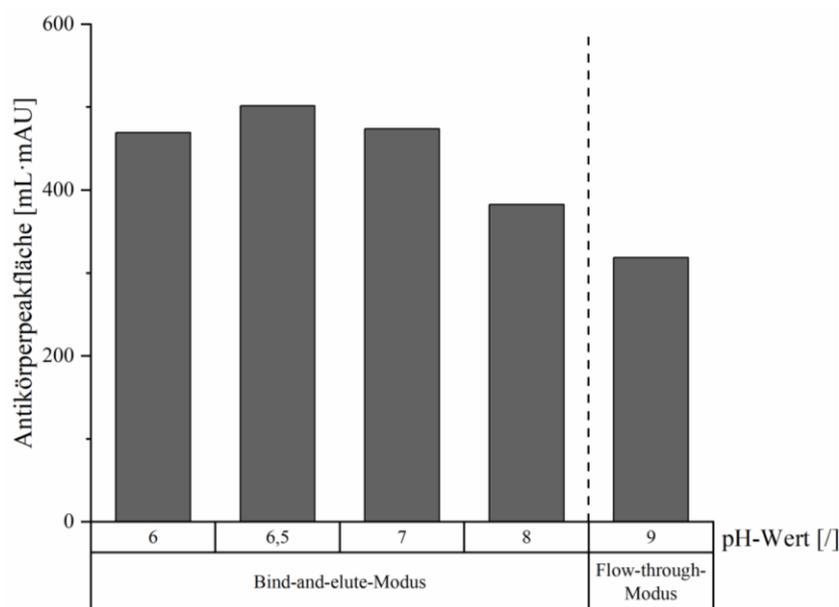


Abbildung 4.19: Einfluss des pH-Wertes auf die Peakfläche und den Modus bei der CEX an der FPLC [119].

Die größte mAk-Peakfläche und damit auch die größte Menge an Antikörper wurde mit einem pH-Wert von 6,5 erreicht. Sowohl bei einem pH-Wert von 6 als auch bei höheren pH-Werten waren die Peakflächen kleiner, wobei mit steigendem pH-Wert die Peakfläche immer kleiner wurde.

Bei den pH-Werten von 6 bis 7, welche unterhalb des pI des mAks liegen, war der mAk positiv geladen und band an die negative Säulenmatrix. Lag der mAk positiv geladen vor, wurde der mAk-Peak erst während der Elution detektiert, was als Bind-an-elute-

Modus bezeichnet wird. Bei einem pH-Wert von 9 hingegen lag der mAk negativ geladen vor und konnte nicht mit der Säule wechselwirken. Der Antikörperpeak wurde während des Durchflusses detektiert (Flow-through-Modus). Der pH-Wert 8 stellt hier, genau wie bei der AEX der pH-Wert 8,5 eine Ausnahme dar. Es wurde ein Antikörperpeak während der Elution detektiert. Aber da der pH-Wert sehr nah am pI des mAks (8,25) lag, wurden 30 % des Antikörpers bereits im Durchfluss als Peak nachgewiesen.

Für die weitere Optimierung des Äquilibrierungspuffers wurde ein pH-Wert von 6,5 gewählt, da hier die größte Peakfläche ermittelt worden ist. Die Anwendung im Bind-and-elute-Modus ist außerdem typisch für die CEX [62, 121].

Optimierung der NaCl-Konzentration

Auch wurde der Einfluss von NaCl als Additiv im Äquilibrierungspuffer zur Stabilisierung des mAks untersucht. Es wurden 0 bis 0,5 M NaCl getestet. Bei der Probenaufgabe wurden 3 mL einer durch Protein A-Chromatographie aufgereinigten Antikörperlösung mit einer mAk-Konzentration von $0,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ aufgegeben. Zusätzlich zur Antikörperpeakfläche wurde auch hier der Modus der Chromatographie bestimmt. Abbildung 4.20 zeigt die Ergebnisse des Einflusses der NaCl-Konzentration.

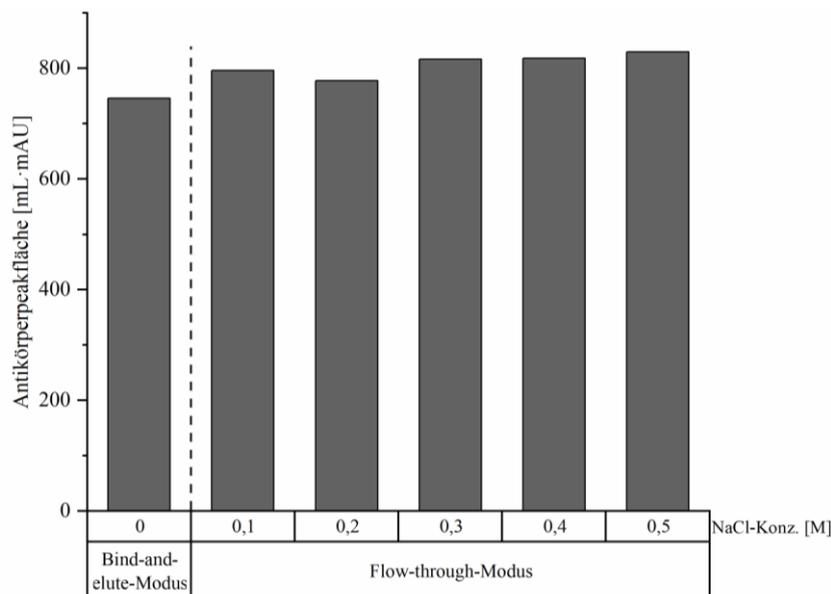


Abbildung 4.20: Einfluss der NaCl-Konzentration auf die Peakfläche und den Modus bei der CEX an der FPLC [119].

Die ermittelten Peakflächen des Antikörpers lagen bei allen getesteten Salzkonzentrationen nah beieinander (Abbildung 4.20). Die Antikörperpeakflächen bei Zugabe von Salz sind alle größer als die Peakfläche ohne Zugabe von Salz. Aber bereits bei einer Zugabe von 0,1 M NaCl wechselt der Modus der Chromatographie von Bind-and-elute zu Flow-through, der Antikörper hat nicht mehr an die Säule gebunden. Die Elution des mAks erfolgt bei der CEX auf Grund der Verdrängung durch Ionen des Salzes. Bei diesem Versuch ist die Affinität des Salzes zur Säulenmatrix höher als die Affinität des mAks zur Säulenmatrix, wodurch der mAk schon bei geringen Salzkonzentrationen nicht mehr binden kann. In der mAk-Aufreinigung wird die CEX typischerweise im Bind-and-elute-Modus verwendet [90]. Als optimaler Äquilibrierungspuffer wurde daher ein 50 mM MES-Puffer mit einem pH-Wert von 6,5 ohne Zugabe von Salz festgelegt.

Durchführung der CEX

Mit einem 50 mM MES-Puffer bei einem pH von 6,5 wurde die CEX durchgeführt (Abbildung 4.21). Es wurden 3 mL über Protein A-Chromatographie aufgereinigte Antikörperlösung (mAk-Konzentration $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) aufgegeben. Anschließend wurde mittels SEC-HPLC-Messung die Ausbeute und Reinheit des mAks bestimmt.

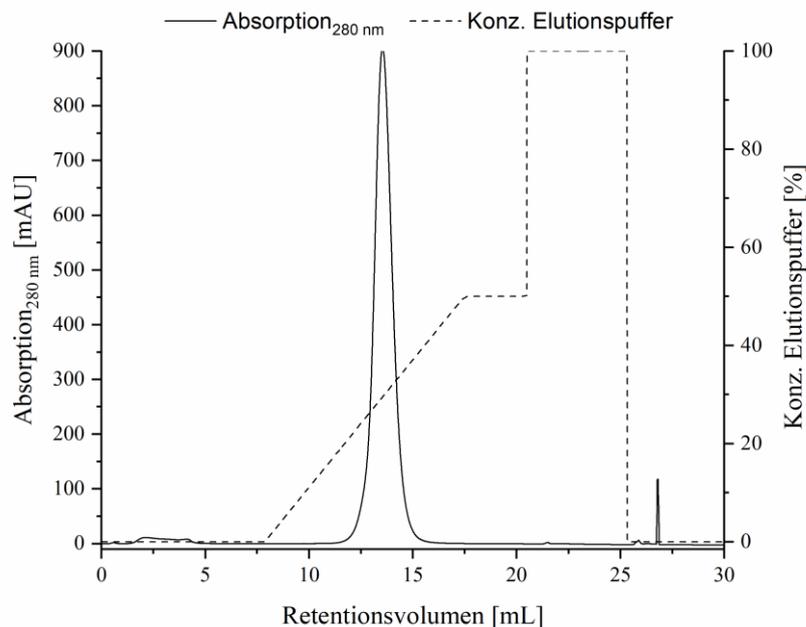


Abbildung 4.21: Chromatogramm der CEX-Methode bei der Aufreinigung des mAks (modifiziert nach [119]).

Zu Beginn des Chromatogramms in Abbildung 4.21 konnte eine leichte Erhöhung des UV-Signals bei der Probenaufgabe detektiert werden. Dies könnte auf einen minimalen Verlust des Antikörpers im Durchfluss hindeuten. Das Chromatogramm zeigt außerdem während der Elutionsphase den Antikörperpeak, welcher bei 280 nm detektiert worden ist, damit liegt der Bind-and-elute-Modus vor. Ein weiterer Peak konnte nach etwa 26 min detektiert werden, der für einen Verlust des mAks steht.

Über die SEC-Methode an der HPLC wurde die Ausbeute des mAks in diesem Lauf bestimmt. Dabei wurde eine Ausbeute von 84,9 % erzielt. Diese liegt unter der in der Literatur zu findenden Angabe von etwa 92 % [122]. Ein Verlust des mAks ist über den zweiten, kleineren Peak des Chromatogramms und über den Durchfluss zu erklären. Die bestimmte Reinheit von 98,6% entspricht nahezu der Angabe von einer 99 %igen Reinheit nach einem Polishing-Schritt [104].

4.2.5.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Neben den beiden genannten Ionenaustauschchromatographie-Verfahren kommt beim Polishing von mAks ebenfalls die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) zum Einsatz. Hierfür wurde eine HiScreen Phenyl HP Säule (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA) mit einem Säulenvolumen von 4,7 mL verwendet. Diese Säule hat als Liganden Phenyl-Reste, welche mit unpolaren Gruppen auf der Oberfläche von Proteinen wechselwirken können. Diese hydrophoben Wechselwirkungen können durch die Zugabe von Salz im Äquilibrierungspuffer verstärkt werden. Für die Optimierung des Puffers ist deswegen vor allem die Auswahl eines geeigneten Salzes und dessen Konzentration wichtig [123, 124]. Die HIC wird häufig im Bind-and-elute-Modus verwendet, um Wirtszellproteinverunreinigungen und Aggregate zu entfernen [90].

Testung verschiedener Salze

Als erstes wurden verschiedenen Salze im Äquilibrierungspuffer getestet: Natriumchlorid, Natriumsulfat und Ammoniumsulfat. Diese Salze sind in der Hofmeister-Reihe, welche sie nach kosmotrop und chaotrop einteilt, an unterschiedlichen Positionen zu finden. Kosmotrope Salze verstärken den hydrophoben Effekt, weswegen sie bevorzugt bei der HIC eingesetzt werden. Ammoniumsulfat ist das Salz, dem der höchste kosmotrope Effekt zugeordnet wird, gefolgt von Natriumsulfat und mit dem geringsten

kosmotropen Effekt Natriumchlorid [125]. Es wurden folgende Salz-Konzentrationen in einem 50 mM Natriumphosphatpuffer zur Äquilibrierung erzeugt: 2,6 M Natriumchlorid, 0,5 und 1 M Natriumsulfat oder 1 M Ammoniumsulfat. Laut Literatur besitzen 2,6 M NaCl und 1 M Ammoniumsulfat in etwa den selbe hydrophoben Effekt, während das kosmotropere Salz Natriumsulfat etwa den gleichen hydrophoben Effekt wie Ammoniumsulfat besitzt [126, 127]. Als Elutionspuffer wurde der 50 mM Natriumphosphatpuffer ohne Salz verwendet. Es wurden, wie bereits bei den Ionenaustauschchromatographien die Peakflächen des mAk, sowie der Modus der Chromatographie verglichen. Die Durchführung entsprach ebenfalls der der Ionenaustauschchromatographien, es wurden 3 mL einer bereits durch Protein A-Chromatographie aufgereinigte Antikörperlösung mit einer Konzentration von $0,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ aufgegeben. In Abbildung 4.22 sind die Ergebnisse dieser Versuche dargestellt.

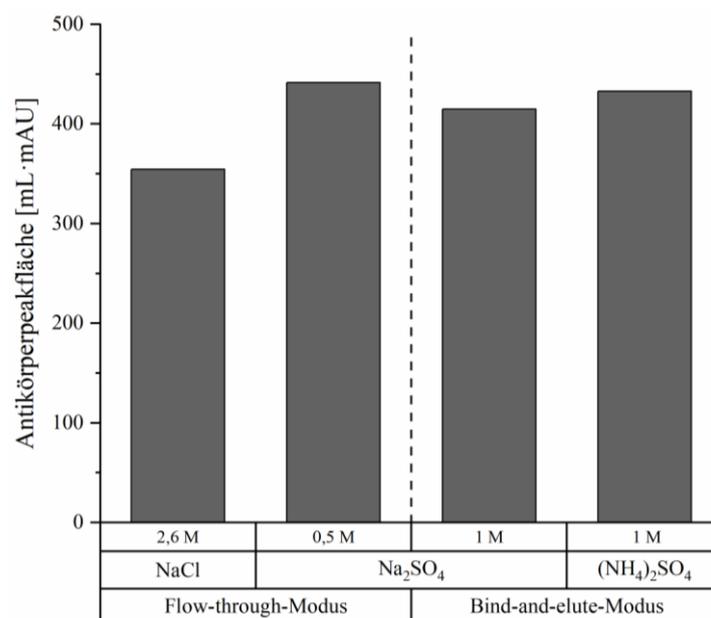


Abbildung 4.22: Einfluss des Salzes auf die Peakfläche und den Modus bei der HIC an der FPLC [119].

Die größten Peakflächen konnte mit 0,5 M Natriumsulfat sowie 1 M Ammoniumsulfat erzielt werden. Die kleinste Peakfläche wurde bei 2,6 M NaCl detektiert. Die erhöhte Konzentration des Salzes erzielte somit nicht den in der Literatur angegebenen gleichen hydrophoben Effekt wie 1 M Ammoniumsulfat. Eine weitere Erhöhung der Konzentration von NaCl war nicht möglich, da der mAk bei 3 M NaCl bereits sichtbar ausgefallen war. Ebenfalls wurden unterschiedliche Modi der Chromatographie festgestellt, bei 1 M Natriumsulfat sowie bei 1 M Ammoniumsulfat wurde der für die HIC oft

genutzte Bind-and-elute-Modus festgestellt [90]. Im direkten Vergleich hat Ammoniumsulfat im bevorzugten Modus der HIC die höchste Peakfläche erreicht, außerdem ist dieses Salz für die HIC ebenfalls oft in der Literatur zu finden und wird deswegen für weitere Optimierungen verwendet [128, 129].

Optimierung der Ammoniumsulfat-Konzentration

Als weiterführendes Experiment wurden verschiedene Konzentrationen, 0,5 bis 1,7 M, des Ammoniumsulfats im Äquilibriumspuffer untersucht. Es wurden 3 mL einer bereits durch Protein A-Chromatographie aufgereinigte Antikörperlösung mit einer Konzentration von $0,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ aufgegeben. Höhere Konzentrationen führten zum Ausfallen des mAk und wurden daher nicht weiter untersucht. Abbildung 4.23 zeigt sowohl die ermittelten Antikörperpeakflächen als auch den jeweiligen Modus der Chromatographie.

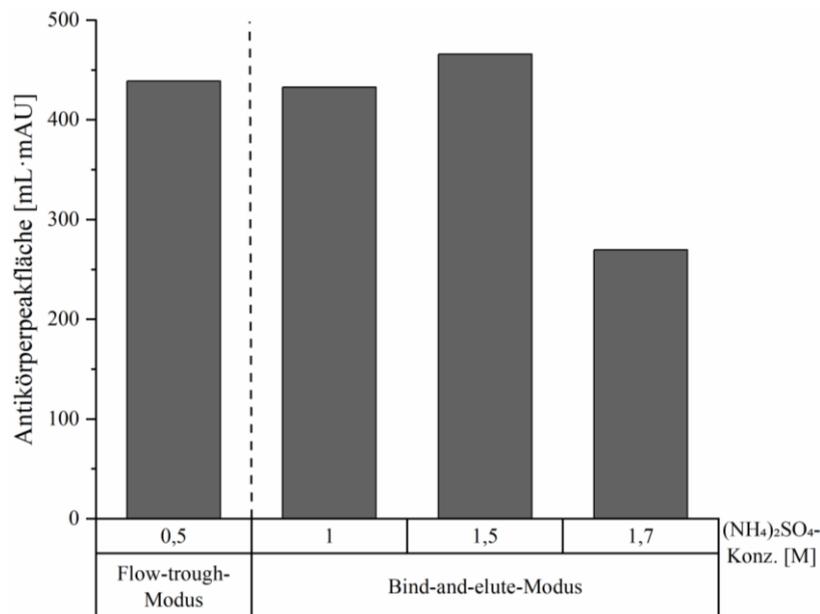


Abbildung 4.23: Einfluss der Ammoniumsulfatkonzentration auf die Peakfläche und den Modus bei der HIC an der FPLC [119].

Die resultierenden Peakflächen bei 0,5 und 1 M Ammoniumsulfat waren fast gleich groß, allerdings kam es hier zum Wechsel des Modus bei der Chromatographie. Die kleinere Konzentration reicht nicht aus, um den mAk mit dem nötigen hydrophoben Charakter für eine Bindung an die Säule zu versehen. Dies gelingt erst ab einer Zugabe

von 1 M Ammoniumsulfat. Die Peakfläche wurde bei einem Zusatz von 1,5 M Ammoniumsulfat im Vergleich zu den beiden niedrigeren Konzentrationen größer. Bei einer weiteren Erhöhung auf 1,7 M Ammoniumsulfat allerdings war die mAk-Peakfläche deutlich kleiner. Bei dieser relativ hohen Konzentration an Ammoniumsulfat kann bereits mAk ausgefallen sein, der über die Filtration der Probe nach der Verdünnung im Äquilibrierungspuffer abfiltriert worden ist. Die aufgegebene mAk-Menge war dementsprechend geringer und entsprechend auch die Peakfläche. Für die Äquilibrierung wurde auf Grund der höchsten resultierenden Antikörperpeakfläche ein 50 mM Natriumphosphatpuffer mit einer Zugabe von 1,5 M Ammoniumsulfat für alle weiteren Versuche als optimal festgelegt.

Durchführung der HIC

Mit dem 50 mM Natriumphosphatpuffer mit 1,5 M Ammoniumsulfat wurde die HIC durchgeführt. Dabei war die Probenaufgabe 3 mL bereits über die Protein A-Methode aufgereinigter Antikörperlösung mit einer mAk-Konzentration von $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Anschließend wurde mittels SEC-HPLC-Messung die Ausbeute und Reinheit des mAks bestimmt. Das Chromatogramm ist in Abbildung 4.24 dargestellt.

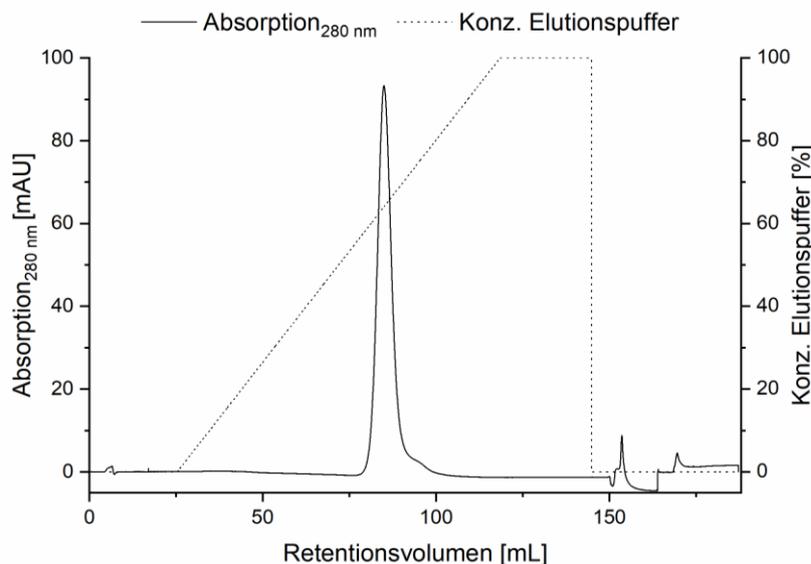


Abbildung 4.24: Chromatogramm der HIC-Methode bei der Aufreinigung des mAks [119].

Während der Elutionsphase ist bei 280 nm der detektierte Antikörperpeak aufgenommen worden, was dem Bind-and-elute-Modus entspricht. Während des CIP-Schrittes

mit 1 M NaOH konnte ein weiterer Peak detektiert werden, der für einen mAk-Verlust in dieser Phase spricht.

Über die SEC-Methode an der HPLC wurde die Ausbeute des mAks in diesem Lauf bestimmt. Dabei wurde eine Ausbeute von 73,8 % erzielt. In der Literatur hingegen werden Ausbeuten von bis zu 85 % erreicht [130]. Der Unterschied ist durch den mAk-Verlust im CIP-Schritt zu erklären. Die Reinheit wurde ebenfalls bestimmt, sie betrug 68 % und liegt damit weit unter der zu findenden Angabe von 99 % nach einem Polishing-Schritt [104]. Neben dem mAk-Monomer konnten 19 % Aggregate im Elutionspeak detektiert werden, die ein Grund für die geringe Reinheit sind. Diese wurden ebenfalls an die Säule gebunden und nicht vom mAk-Monomer abgetrennt. Diese Aggregate könnten sich auch erst durch den hohen Salzgehalt des Puffers gebildet haben.

4.2.5.4 Hintereinanderschaltung verschiedener Polishing-Schritte

Bei der Aufreinigung eines therapeutischen mAk werden zwei hintereinander geschaltete Polishing-Schritte eingesetzt (siehe Kapitel 3.2.2, Theorie). In diesem Kapitel wurden die zuvor optimierten Methoden der AEX, CEX und HIC hintereinander geschaltet. Es ergaben sich sechs FPLC-Läufe, bei denen alle Kombination dieser drei Chromatographien durchgeführt wurden.

Für die einzelnen Säulen wurden die bereits optimierten Puffer eingesetzt. Für die AEX wurde ein 20 mM Bis-Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 6,5 sowie einer Zugabe von 0,4 M NaCl verwendet. Die CEX wurde mit ein 50 mM MES-Puffer bei einem pH von 6,5 durchgeführt und bei der HIC kam ein 50 mM Natriumphosphatpuffer mit 1,5 M Ammoniumsulfat zum Einsatz. Da sich die einzelnen Puffer in ihrer Zusammensetzung, besonders hinsichtlich pH-Wert und Salz unterschieden, wurde jeweils zwischen den beiden Polishing-Schritten eine Umpufferung mittels Umpufferungssäule (HiPrep 26/10 Desalting, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA) durchgeführt. Die Übertragung des mAk-Peaks von der ersten Säule auf die Umpufferungssäule lief automatisch, wohingegen von der Umpufferungssäule auf die zweite Säule systembedingt eine manuelle Übertragung stattfand. Zur Beurteilung der Experimente wurde sowohl die Ausbeute als auch die Reinheit des mAks über die SEC-HPLC-Methode bestimmt. Ta-

belle 4.5 zeigt jeweils die Ausbeute und die Reinheit zweier hintereinander durchgeführter Polishing-Schritte. Zum Vergleich sind die Ausbeute und Reinheit der einzelnen durchgeführten Polishing-Schritte aufgeführt.

Tabelle 4.5: Ausbeute und Reinheit des mAks nach der Durchführung einzelner oder zweier hintereinander geschalteter Polishing-Schritte. AEX = Anionenaustauschchromatographie, CEX = Kationenaustauschchromatographie, HIC = Hydrophobe Interaktionschromatographie.

| Säulenkombination | Ausbeute [%] | Reinheit [%] |
|--------------------------|---------------------|---------------------|
| AEX | 91,5 | 99,4 |
| CEX | 84,9 | 98,6 |
| HIC | 73,8 | 68 |
| AEX – CEX | 81,7 | 99,8 |
| AEX – HIC | 69,2 | 98,6 |
| CEX – AEX | 79,9 | 99,6 |
| CEX – HIC | 71,3 | 97,7 |
| HIC – AEX | 70,4 | 97 |
| HIC – CEX | 70,8 | 97,5 |

Sowohl die höchste Ausbeute (81,7 %) als auch die größte Reinheit (99,8 %) konnte mit der Kombination AEX – CEX erreicht werden. Die umgekehrte Reihenfolge der beiden Polishing-Schritte (CEX – AEX) zeigte etwas niedrigere, aber vergleichbare Werte. Dabei liegt die Ausbeute im Bereich der niedrigeren Ausbeute der einzeln durchgeführten CEX. Der geringe Verlust an Antikörper im Vergleich zur einzelnen Säule, ist durch die manuelle Übertragung der Antikörperfraktionen nach der Umpufferungssäule auf die zweite Säule zu erklären. Wohingegen die Reinheit nahezu der einzelnen AEX entspricht.

Bei den jeweiligen Kombinationen der Säulen, bei denen eine HIC involviert war, lagen die Ausbeuten zwischen 69,2 und 71,3 %. Die geringste Ausbeute wurde bei der Durchführung von AEX – HIC erzielt. Die geringste Reinheit mit 97,5 % wurde bei der Durchführung HIC – CEX erzielt. Bei der gleichen Säulenkombination in unterschiedlichen Reihenfolgen ergaben sich auch hier annähernd gleiche Ergebnisse.

Die AEX zeigte als einzelner Polishing-Schritt die höchste Ausbeute und Reinheit. Durch Kombination mit der CEX konnte die Reinheit weiter erhöht werden, allerdings war dies nur mit einem Verlust an Antikörper einhergehend. In der Literatur werden Ausbeuten von 85 – 95 % sowie Reinheiten von über 99 % angegeben [104, 131, 132]. Diese Reinheiten konnten mit der Kombination der beiden Ionenaustauschchromatographien erzielt werden (AEX – CEX, CEX – AEX). Und auch die Ausbeuten dieser Säulenkombinationen liegen nur knapp unter den Literaturangaben.

4.2.6 Entfernung von Wirtszellproteinen

Bei der Aufreinigung eines mAk müssen Verunreinigungen wie Wirtszellproteine (Host cell proteins, HCP) entfernt werden. Die Entfernung der HCPs bei der Aufreinigung eines therapeutischen Antikörpers ist essenziell, da HCPs unerwünschte Immunreaktionen beim Menschen hervorrufen können. Für die Quantifizierung der HCPs wurde ein ELISA-Test eines Kits von Cygnus Technologies (Southport, USA) genutzt. Die genaue Durchführung des Kits zur HCP-Konzentrationsbestimmung ist unter Kapitel B.7 im Material-und-Methoden-Teil zu finden. In Abbildung 4.25 sind die Konzentrationen an HCPs nach den verschiedenen Aufreinigungsschritten dargestellt. Dabei wurde zusätzlich die HCP-Menge vor und nach der Protein A-Chromatographie bestimmt.

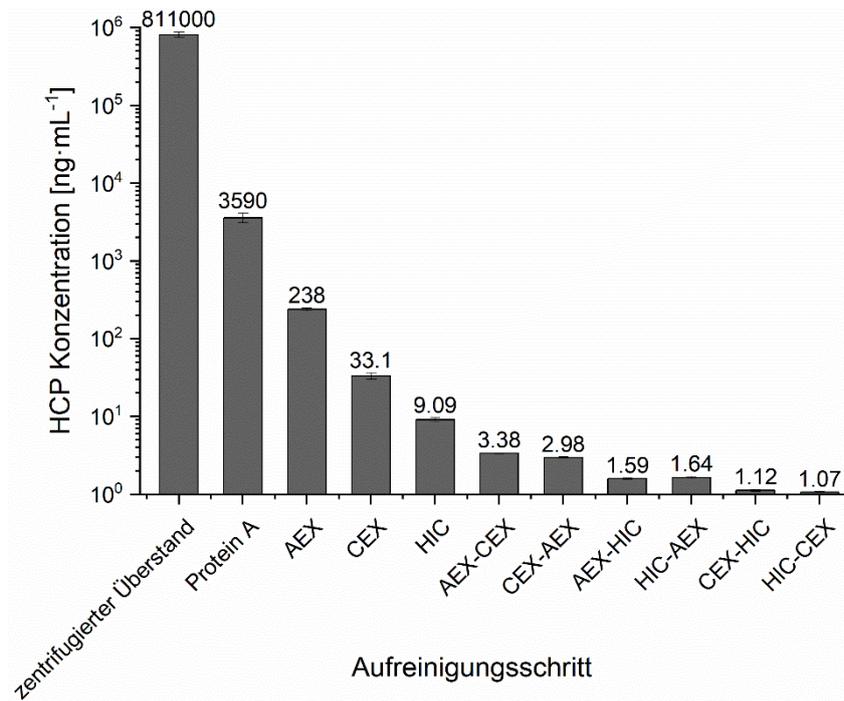


Abbildung 4.25: Konzentration der HCPs während der Aufreinigung des mAks.

Im zentrifugierten Überstand lag die HCP-Konzentration bei $811 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Bereits durch den ersten chromatographischen Schritt der Protein A-Affinitätschromatographie wurde die Konzentration auf $3,59 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ verringert. Durch die jeweils folgenden Polishing-Schritte konnten weitere HCPs entfernt werden. Über die HIC wurde die größte Menge entfernt, gefolgt von der CEX und der AEX. Bezogen auf die HCP-Konzentration nach dem Capture-Schritt wurden bei der AEX noch 6,6 % der HCPs detektiert, wohingegen es bei der CEX nur knapp 1 % war und bei der HIC nur noch 0,25 % waren.

Diese unterschiedlichen Werte lassen sich durch die verschiedenen Betriebsweisen der Säulen erklären. Sowohl bei der CEX als auch bei der HIC wurde der Antikörper spezifisch gebunden. Die Bindungsbedingungen wurden hinsichtlich der mA_k-Bindung optimiert und sind für die HCPs ungeeignet. Diese werden über die Waschschritte entfernt. Bei der AEX wurde hingegen im Flow-through-Modus gearbeitet. Da der optimierte pH-Wert des Äquilibrierungspuffers hierbei mit 6,5 unter dem pI einiger HCPs lag, lagen diese ebenfalls positiv vor und haben nicht an die Säule gebunden [70, 133]. Die Vielfältigkeit der HCPs ist zu groß, um nur mit der AEX alle HCPs aus der Probe zu entfernen.

Durch die Kombination zweier Polishing-Schritte hintereinander konnte die HCP-Konzentration weiter herabgesetzt werden. Bei der AEX – CEX ergab sich eine HCP-Konzentration von $3,38 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ und bei der CEX – AEX $2,98 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Die Reihenfolge der Säule hat keinen signifikanten Einfluss auf die Entfernung der HCPs. Die niedrigste HCP-Konzentration ($1,07 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) wurde mit der HIC – CEX erreicht.

Gesetzliche Höchstgrenzen für HCPs im Endprodukt gibt es nicht. Sowohl von der biotechnologischen Industrie als auch von Gesundheitsbehörden werden Grenzwerte von HCPs in therapeutischen Produkten von 1-100 ng bezogen auf 1 mg Wirkstoff geduldet. Dieser Wert beruht vor allem auf der limitierten Sensitivität der Detektionsmethoden [134]. Die Ergebnisse aus der Aufreinigung in Relation zur Antikörpermenge sind in Tabelle 4.6 zusammengefasst.

Tabelle 4.6: HCP-Konzentration der verschiedenen Aufreinigungsschritte pro mg mAk.

| Aufreinigungsschritt | ppm (HCP [ng] auf mAk [1 mg]) |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| zentrifugierter Zellkulturüberstand | $262\cdot 10^3$ |
| Protein A | 626,13 |
| AEX | 261,82 |
| CEX | 62,93 |
| HIC | 42,7 |
| AEX – CEX | 36,82 |
| CEX – AEX | 37,72 |
| AEX – HIC | 22,62 |
| HIC – AEX | 26,03 |
| CEX – HIC | 10,57 |
| HIC – CEX | 11,51 |

Bezogen auf 1 mg mAk, ließ sich schon mit der Protein A-Chromatographie die Menge an ursprünglich in der Probe enthaltenen HCPs auf unter 1 % reduzieren. Sowohl mit der CEX als auch mit der HIC konnten HCP-Konzentrationen nachgewiesen werden, die unterhalb des tolerierten Grenzwertes von bis zu 100 ng liegen. Wird die AEX allein als

Polishing-Schritt durchgeführt, so liegt der Gehalt der HCPs noch oberhalb der zugelassenen Grenze. Werden mehrere Polishing-Schritte miteinander kombiniert liegen alle dazugehörigen HCP-Werte unter den 100 ng. Dabei wurde der höchste Wert mit 37,72 ng HCP auf 1 mg mAk bei der Kombination CEX – AEX ermittelt und der niedrigste Wert mit 10,57 ng HCP auf 1 mg mAk bei der Kombination CEX – HIC.

4.2.7 Fazit der Aufreinigung des mAks

Zur Aufreinigung des mAks wurden die verschiedenen einzelnen Schritte optimiert und durchgeführt. Als erstes wurde der Übergangsschritt des Upstream-Prozesses zum Downstream-Prozess, die Zellabtrennung, untersucht. Dabei wurden drei Verfahren zur Zellabtrennung verglichen: Die Zentrifugation, die Tiefenfiltration und die Dynamic Body Feed Filtration. Mittels Zentrifugation konnte die höchste mAk-Konzentration im Überstand mit $3,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte mit dieser Methode mit einem geringen apparativen Aufwand eine vergleichsweise große Menge Zellkulturbrühe aufgereinigt werden. Die Zentrifugation stellt somit für die am Institut durchgeführte Zellabtrennung die optimale Methode dar.

Der erste Schritt der mAk-Aufreinigung ist die Protein A-Affinitätschromatographie an der FPLC. Neben der Optimierung des Elutionspuffers wurde auch der Äquilibrierungspuffer optimiert. Zur Äquilibrierung wurde ein 20 mM Natriumphosphatpuffer mit 150 mM NaCl und einem pH-Wert von 7 ermittelt. Für die Elution ergab sich eine 0,1 M Citronensäure mit 150 mM NaCl und einem pH-Wert von 3,5. Mit der Protein A-Chromatographie konnte eine mAk-Ausbeute von 88,7 % bei einer Reinheit von 90 % erzielt werden, beide Angaben entsprechen der Literatur.

Für den Capture-Schritt bei der Aufreinigung des mAks wurde außerdem ein Vergleich der Protein A-Säule zu einem Protein A-Membranadsorber anhand von Kapazität und Produktivität durchgeführt. Dabei war die DBC der Säule mit 17 mg größer als die des MA mit 11,7 mg. Hingegen zeigte der MA mit $18,6 \frac{\text{mg}}{\text{mL}\cdot\text{h}}$ eine höhere Produktivität als die Säule mit $13 \frac{\text{mg}}{\text{mL}\cdot\text{h}}$. Aufgrund der höheren DBC ist die Säule für den Labormaßstab mit geringen Probenvolumina die bessere Wahl. Werden größere Mengen aufgereinigt,

sollte ein MA eingesetzt werden, da er sowohl produktiver ist als auch mit einer höheren Flussrate betreiben werden kann und somit weniger Zeit für einen Durchlauf in Anspruch nimmt.

Die beiden folgenden Polishing-Schritte, die sich dem Capture-Schritt bei der Aufreinigung eines mAk anschließen, wurden ebenfalls untersucht. Dabei kommen vor allem AEX, CEX und HIC zum Einsatz. Für alle drei Methoden wurde einzeln eine Optimierung der Puffer durchgeführt. Dabei ergab sich für die AEX zur Äquilibrierung ein 20 mM Bis-Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 6,5 und einer Zugabe von 0,4 M NaCl. Die Säule wurde im Flow-through-Modus betrieben, es konnte eine Ausbeute des mAks von 91,5 % und eine Reinheit von 99,38 % erreicht werden. Die CEX hingegen wurde im Bind-and-elute-Modus mit 20 mM MES-Puffer, pH-Wert 6,5 und ohne Zugabe von Salz verwendet. Dabei konnte eine Ausbeute von 84,9 % und eine Reinheit von 98,57 % erzielt werden. Bei der HIC ergab sich als optimal ein 50 mM Natriumphosphatpuffer mit einer Zugabe von 1,5 M Ammoniumsulfat. Auch diese Säule wurde im Bind-and-elute-Modus betrieben und erreichte eine Ausbeute von 73,8 % und eine Reinheit von 68 %. Durch Kombination von AEX und CEX ergaben sich die höchste Reinheit mit 99,8 % und die größte Ausbeute mit 81,7 %. Auch die Reihenfolge CEX – AEX erzielte annähernd gleiche Werte. Beim Einsatz der HIC waren sowohl die Reinheiten als auch die Ausbeuten etwas geringer.

Über die verschiedenen durchgeführten Aufreinigungsschritte, Zellabtrennung, Protein A-Chromatographie und die verschiedenen Polishing-Schritte, wurde die Konzentration an HCPs bestimmt. Bereits mit dem Capture-Schritt konnte die HCP-Konzentration auf unter 1 % reduziert werden. Mit der CEX und der HIC wurde außerdem der maximal tolerierte Grenzwert von 100 ng unterschritten. Bei der Hintereinanderschaltung der Säulen erwies sich die Kombination CEX – HIC als diejenige, bei der pro mg mAk die größte Menge HCPs entfernt worden ist.

4.3 Bioaktivität des mAks

Neben der Aufreinigung spielt beim Einsatz eines therapeutischen Antikörpers auch die Qualität dieses mAk eine entscheidende Rolle. Eines dieser Qualitätsmerkmale ist

die Bioaktivität. Diese muss gegeben sein, damit der mAk in seiner Funktion als Medikament wirksam ist. Der in dieser Arbeit verwendete mAk ist ein Anti-TNF- α -Antikörper. Um die Bioaktivität des mAks zu überprüfen, wurde ein Bioaktivitätsassay etabliert, der auf der Bindung zum Antigen TNF- α beruht. Das Konzept dieses Bioaktivitätsassays ist in Abbildung 4.26 dargestellt.

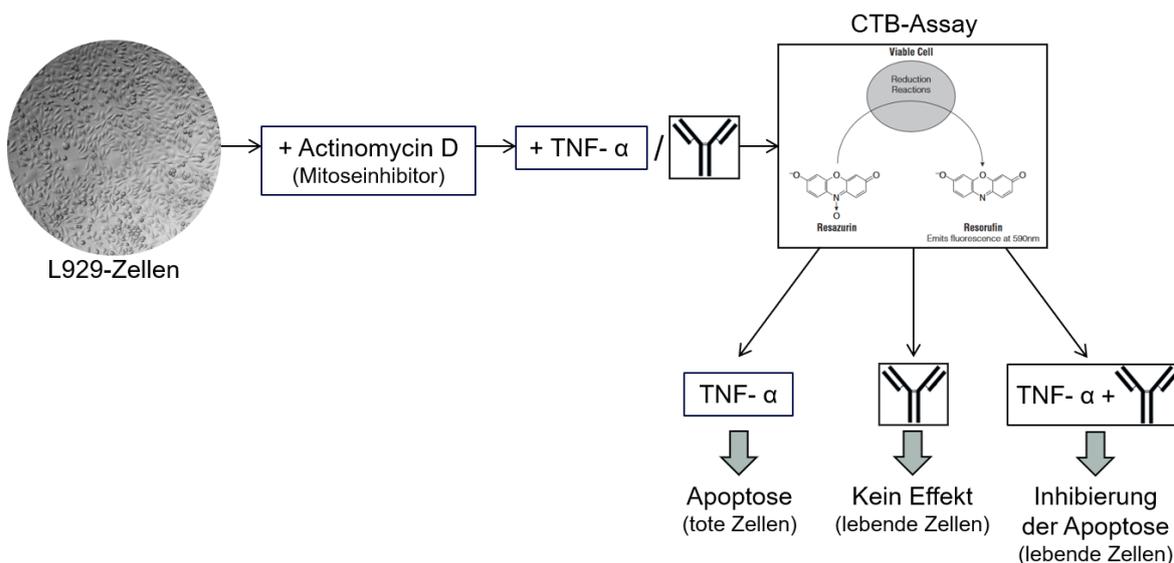


Abbildung 4.26: Ablauf des Bioaktivitätsassay. Auf konfluent wachsende Zellen wird der Mitoseinhibitor Actinomycin D gegeben, gefolgt von der Probenaufgabe (Antigen und/oder Antikörper). Die Zellviabilität wird über einen CTB-Assay bestimmt (modifiziert nach [119]).

Für den Bioaktivitätsassay wurde eine murine Fibroblasten-Zelllinie verwendet, L929-Zellen. Diese wurden bereits zur Überprüfung der Zytotoxizität von TNF- α verwendet [135, 136]. L929-Zellen wurden im Monolayer bis zur Konfluenz angezüchtet. Dies bedeutet, dass die zur Verfügung stehende Fläche vollständig bewachsen ist. Anschließend wurde Actinomycin D hinzugegeben, welches einen Mitoseinhibitor darstellt. Es sollte das Wachstum der Zellen stoppen, eine Vergleichbarkeit der Proben ermöglichen und so falsch-positive Ergebnisse auf Grund von vereinzelt stärkerem Wachstum verhindern.

Es folgte die Zugabe von sowohl Antigen als auch Antikörperproben einzeln, um die Wirkung dieser Lösung auf die Zellen zu bestimmen. Da TNF- α die Zellapoptose auslöst (siehe Kapitel 3.3), sollte bei reiner Zugabe des Antigens ein Absterben der Zellen zu beobachten sein. Wird hingegen nur der mAk zu den Zellen gegeben, sollte keine Veränderung in der Viabilität feststellbar sein, da der Antikörper selbst keinen Einfluss auf

das Wachstum der Zellen hat. Bei Zugabe beider Komponenten, dem Antigen sowie dem mAk, sollte die Apoptose-auslösende Wirkung des Antigens blockiert sein. Da der mAk das Antigen bindet, soll hierbei seine Bioaktivität nachgewiesen werden. Es wurde mittels CellTiter-Blue®-Assay (CTB) von Promega Corporation (Madison, USA) jeweils die Viabilität der Zellen überprüft. Bei diesem Test wird die metabolische Aktivität der Zellen bestimmt.

Die Etablierung des Bioaktivitätsassays berücksichtigt die Bestimmung der optimalen Animpfzellzahl und die Inkubationsdauer von Actinomycin D als Additiv. Nach der Etablierung wird der Bioaktivitätsassay verwendet, um die Bioaktivität des Antikörpers nach jedem Aufreinigungsschritt nachzuweisen.

4.3.1 Animpfzellzahl

Der erste Schritt des Bioaktivitätsassays ist das Anzüchten der Zellen bis zur Konfluenz. Dabei spielt die Animpfzellzahl eine wichtige Rolle. Als Grundlage dienten hierbei bereits in der Literatur veröffentlichte Zellzahlen für ähnliche Assays [136–138]: 4000, 8000, 15.000 sowie 30.000 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten mit vollsupplementiertem Medium, Duplecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE) mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep), für 24 h inkubiert. Nach dieser Inkubation sollte ein Well zu etwa 95 % bewachsen sein. Die Konfluenz wurde optisch mittels Mikroskop beurteilt.

Bei den beiden niedrigeren Animpfzellzahlen konnte keine Konfluenz beobachtet werden, da die zeitliche Dauer der Inkubation für diese Zellkonzentrationen zu gering war. Eine längere Dauer der Inkubation wurde nicht getestet, um den zeitlichen Aufwand des Assays nicht zu vergrößern. Bei 15.000 sowie 30.000 Zellen pro Well wurde die Konfluenz nach 24 h Inkubation erreicht.

Um die größte Aussagekraft des Assays zu erreichen, wurde die Reproduzierbarkeit für beide Animpfzellzahlen bestimmt. Hierfür wurden verschiedene TNF- α -Konzentrationen (1000; 100; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001 und 0,0001 ng·mL⁻¹) in DMEM-Basalmedium

(ohne FKS, ohne Pen/Strep) angesetzt und die beiden Animpfzellzahlen in Dreifachbestimmung nach dem Anwachsen für weitere 24 h mit diesen inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen über einen CTB-Assay bestimmt.

Die Standardabweichung dieses Experiments zeigte die Präzision und die Reproduzierbarkeit der Methode mit der jeweiligen Animpfzellzahl. Mit 30.000 Zellen pro Well liegt die mittlere Standardabweichung der Dreifachbestimmung bei nur 3,89 % Zellviabilität, während sie bei 15.000 Zellen pro Well mit 5,21 % deutlich höher ausfällt. Für den Test wurde im weiteren Verlauf eine Animpfzellzahl von 30.000 Zellen pro Well verwendet.

Ebenfalls wurde der Einfluss der Passagenzahl auf das Wachstum getestet. Als Passage wird dabei das Ablösen und Überführen der Zellen in ein neues Kulturgefäß zur kontinuierlichen Kultivierung bezeichnet [139]. Sowohl eine Passage 6 als auch eine Passage 13 erbrachte die gleichen Ergebnisse, bis zur 13. Passage ist also ein Einfluss der Passagenzahl auszuschließen.

4.3.2 Additiv Actinomycin D

Nach dem Anwachsen der Zellen bis zur Konfluenz folgt im Bioaktivitätsassay die Zugabe von Actinomycin D, welches ein Mitoseinhibitor ist. Als solcher liegt sein Einsatz in einem Bioaktivitätstest darin, ein einheitliches Stoppen des Wachstums der Zellen auszulösen, ein Überwachsen der Zellen zu verhindern und so die Vergleichbarkeit der Proben untereinander zu gewährleisten [137].

Bei der Beschreibung vergleichbarer Assays wird oftmals die Zugabe von Actinomycin D genannt, jedoch ohne nähere Versuchsbedingungen zu beschreiben. Auch der Hersteller des rekombinanten TNF- α bezieht sich bei der Bestimmung der IC₅₀-Konzentration auf die Anwesenheit von Actinomycin D [140]. Um den Effekt des Actinomycin D auf das Zellwachstum zu visualisieren, wurden die Zellen nach dem konfluenten Anwachsen für weitere 36 h mit 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Actinomycin D in DMEM-Basalmedium versetzt. Diese Inkubationszeit wurde gewählt, um den Effekt des Actinomycins deutlich erkennen zu können. Als Vergleich wurden ebenfalls Zellen ohne Actinomycin D über die gleiche Dauer inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden mittels Mikroskop Aufnahmen erstellt (Abbildung 4.27).

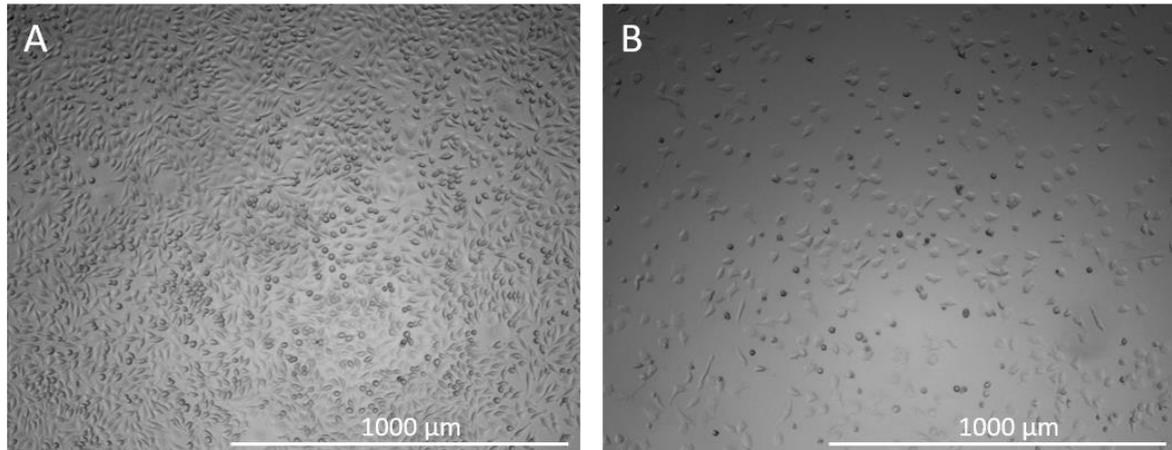


Abbildung 4.27: Mikroskopie-Aufnahmen von L929-Zellen in 4-facher Vergrößerung nach 36 h Inkubation.
A: Unbehandelte Zellen, B: Mit $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Actinomycin D behandelte Zellen [119].

Die unbehandelten Zellen zeigten nach der 36 h Inkubation eine vollständige Konfluenz (Abbildung 4.27 A). Ebenfalls kamen vereinzelt runde Zellen vor, deren Morphologie deutet darauf hin, dass sie als Monolayer nicht mehr adhären waren. Normalerweise zeigen adhärenente L929-Zellen eine länglichere und spitz zulaufende Morphologie. Im Fall der unbehandelten Zellen kann dieses Phänomen auf den Beginn eines Überwachsens der Zellen hindeuten.

Nach der Behandlung mit Actinomycin D (Abbildung 4.27 B) lagen die Zellen stark vereinzelt, aber zum Großteil adhäreniert, vor. Das Zellwachstum wurde also durch das Additiv gestoppt. Um sicher zu gehen, dass das Actinomycin keine Abtötung der Zellen bei der Verwendung im Bioaktivitätsassay induziert, wurden ein Vergleich mit dem alkaloiden Topoisomerasehemmer Camptothecin (CAM) gemacht [141]. Nach Zugabe von $25 \mu\text{M}$ CAM zu den Zellen für 24 h, wurde deren Viabilität über einen CTB-Assay bestimmt. Dabei ergaben sich Zellviabilitäten von unter 2 %, was einer vollständigen Abtötung der Zellen entspricht. Da die Viabilitäten der Zellen nach Behandlung mit Actinomycin D bei gleicher Inkubationszeit viel größer waren (65 %), ist davon auszugehen, dass dieses keine abtötende Wirkung auf die Zellen hat. Da beim Aufnehmen einer Dosis-Wirkungs-Kurve der Einfluss von Actinomycin D auf die Zellviabilität ausgeschlossen werden soll, wurde die zeitliche Inkubation angepasst.

4.3.3 Wirkung des Antigens

Auf Grund des Einflusses von Actinomycin D auf die Viabilität der Zellen bei längeren Einwirkzeiten, wurde von der gleichzeitigen Inkubation des Actinomycin D mit dem Antigen abgesehen. Zuerst wurde auf die Zellen das Actinomycin D gegeben und dieses nach 2 h Inkubation wieder entfernt. Dabei wurde $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Actinomycin D eingesetzt. Anschließend wurde die Antigenlösung in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben und für 24 h inkubiert. Es wurde mit Antigenkonzentrationen von 1000 bis $0,0001 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ eine Antigenkonzentrationskurve aufgenommen (Abbildung 4.28). Die Zellviabilitäten wurden über einen CTB-Test bestimmt. Als Vergleich wurden Zellen nach der Behandlung mit Actinomycin D für 2 h nur mit Medium anstatt mit einer Antigenlösung versetzt.

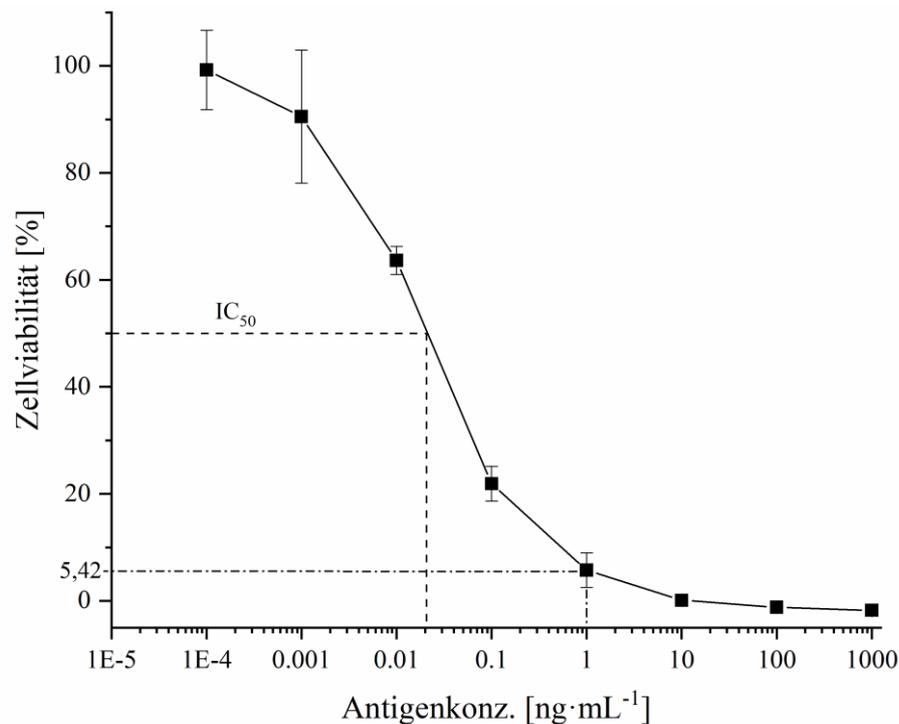


Abbildung 4.28: Dosis-Wirkungs-Kurve des Antigens (modifiziert nach [119]).

Die Kurve zeigt den erwarteten sigmoidalen Verlauf einer Dosis-Wirkungs-Kurve, sie endet bei hohen Antigenkonzentrationen in einem Plateau. Die Zellviabilität liegt bei der niedrigsten Antigenkonzentration ($0,0001 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) bei 100 %. Die Zellviabilität lag bei den nur mit Actinomycin D für 2 h und anschließend mit reinem Medium be-

handelten Zellen ebenfalls bei 100 %. Hier kann ein negativer Effekt des Mitoseinhibitors auf die Zellviabilität ausgeschlossen werden. Die niedrigen Zellviabilitäten bei hohen Antigenkonzentrationen können somit auf den Effekt des Antigens zurückgeführt werden. Anhand dieser Kurve wurde die halbmaximale Inhibitor-dosis (IC_{50}) des Antigens bestimmt (Berechnung siehe Kapitel B.8.5, Material und Methoden). Sie betrug $0,02 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ und entsprach damit der Angabe des Herstellers von einer $IC_{50} < 0,05 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ [140]. Für weitere Versuche wurden folgende Bedingungen festgelegt: Animpfen mit 30.000 Zellen pro Well, wobei Zellen bis zur 13. Passage verwendet werden können. Inkubation mit $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ Actinomycin D für 2 h und anschließendes Entfernen des Additivs. Außerdem wurde anhand der aufgenommenen Dosis-Wirkungs-Kurve die Konzentration des Antigens bestimmt, die für weitere Experimente mit Antikörperproben eingesetzt werden soll. Hierbei wurde $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ festgelegt, weil ein eindeutig negativer Effekt des Antigens auf die Zellviabilität vorliegt (Zellviabilität von 5,42 %), aber noch keine vollständige Abtötung aller Zellen stattgefunden hat.

4.3.4 Dosis-Wirkungs-Kurve des mAks

Bevor die Dosis-Wirkungs-Kurve des am Institut hergestellten und über Protein A-Chromatographie aufgereinigten mAk aufgenommen wurde, ist getestet worden, ob der Antikörper selbst keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen hat. Bei der Inkubation des mAks für 24 h auf den Zellen konnte keine Veränderung in der Zellviabilität festgestellt werden, sie lag weiterhin bei 100 %.

Für die Dosis-Wirkungs-Kurve des mAks wurde als Vergleich ein Biosimilar, ein kommerziell erworbener mAk (Amgen Inc, Thousand Oaks, USA) eingesetzt, welcher als Positivkontrolle für die Bioaktivität diente.

Nach Vorbereitung der Zellen wurden diese mit $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TNF- α und verschiedenen Antikörperkonzentrationen (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 und $1000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) in DMEM-Baselmedium versetzt. Hierfür wurden die Antikörperprobe und das Antigen vor der Zugabe auf die Zellen vermischt, es folgte eine Inkubation für 24 h. Anschließend wurden die Zellviabilitäten über einen CTB-Test ermittelt. Abbildung 4.29 zeigt den Vergleich der beiden Dosis-Wirkungs-Kurven.

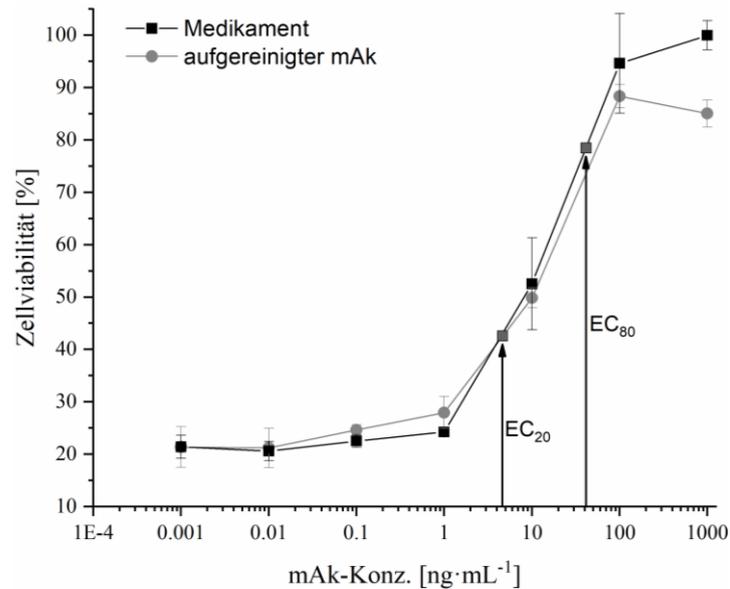


Abbildung 4.29: Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurve zwischen dem über Protein A-Chromatographie aufgereinigten Antikörper und dem kommerziell erworbenen mAk (Medikament) [119].

Beide Dosis-Wirkungs-Kurven des mAks zeigen einen ähnlichen und sigmoidalen Verlauf, welcher gegenläufig zu der Dosis-Wirkungs-Kurve des Antigens ist. Bei niedrigen Antikörperkonzentrationen wurden niedrige Zellviabilitäten ermittelt. Es ist für beide Kurven ein unteres Plateau bis etwa $0,1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ mAk erkennbar. Selbst mit diesen geringen mAk-Konzentrationen liegen die Viabilitäten der Zellen mit etwa 20 % deutlich über den Vergleichsproben mit unter 5 %, die nur dem Antigen ausgesetzt waren (Abbildung 4.28). Bereits bei diesen geringen Dosierungen zeigt der mAk für beide Präparate, eine TNF- α hemmende Wirkung.

Mit steigender Konzentration des mAks steigt auch die Zellviabilität an. Ein weiteres Plateau wird bei hohen mAk-Konzentration ab $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ erreicht. Da sich der Verlauf der Kurven so stark ähnelt, ist davon auszugehen, dass der am Institut hergestellte und über Protein A-Chromatographie aufgereinigte mAk bioaktiv ist.

Aus der Dosis-Wirkungs-Kurve des Medikaments wurde sowohl die EC₂₀ (EC, effektive Konzentration) als auch die EC₈₀ für den mAk bestimmt (Berechnung siehe Kapitel B.8.5, Material und Methoden). Diese geben die effektive Dosis an, bei der 20 % bzw. 80 % mehr Zellen beim Einsatz dieser Konzentration des mAks viabel sind als ohne Zugabe des mAks. Die EC₂₀ für den mAk lag bei $4,74 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ und die EC₈₀ bei

41,36 ng·mL⁻¹, was Zellviabilitäten von 37,3 und 84,6 % entspricht. Für weitere Versuche mit Antikörperproben wurden diese jeweils auf eine mAk-Konzentration entsprechend der EC₂₀ und der EC₈₀ verdünnt.

Für den Bioaktivitätsassay wurde die im Folgenden beschriebene Durchführung etabliert. Die adhärennten L929-Zellen wurden mit einer Zellzahl von 30.000 Zells pro Well in einer 96-Well-Platte angeimpft und 24 h inkubiert. Es folgte eine Sensibilisierung der Zellen für 2 h mit 1 µg·mL⁻¹ Actinomycin D. Anschließend wurden die Proben auf die Zellen gegeben. Dabei wurden vorab 1 ng·mL⁻¹ Antigen und der in den Proben enthaltene Antikörper jeweils in den Konzentrationen 4,74 ng·mL⁻¹ sowie 41,36 ng·mL⁻¹ vermischt. Nach erneuter Inkubation für 24 h wurde ein CTB-Test zur Bestimmung der Zellviabilität durchgeführt.

4.3.5 Bioaktivität der Aufreinigungsproben

Nach erfolgreicher Etablierung des Bioaktivitätsassays wurde dieser verwendet, um die Bioaktivität und damit die Produktqualität nach den einzelnen Aufreinigungsschritten aus Kapitel 4.2 zu überprüfen. Die jeweils den Antikörper enthaltenen Fraktion wurden dabei in zwei mAk-Konzentrationen (4,74 ng·mL⁻¹ und 41,36 ng·mL⁻¹) eingesetzt, die der EC₂₀ und EC₈₀ des Medikaments entsprechen. Die weiteren Versuchsbedingungen entsprachen den zuvor optimierten Assaybedingungen: Es wurde mit einer Zellzahl von 30.000 Zellen pro Well angeimpft und diese für 24 h inkubiert. Für 2 h wurden die Zellen mit 1 µg·mL⁻¹ Actinomycin D sensibilisiert. Es folgte die Inkubation der Antikörperproben mit jeweils 1 ng·mL⁻¹ Antigen für weitere 24 h. Anschließend wurde mittels CTB-Test die Viabilität der Zellen bestimmt. Es wurden vom zentrifugierten Überstand bis zu den Polishing-Schritten alle einzelnen Aufreinigungsschritte untersucht. Dabei ist zu beachten, dass nach der Protein A-Chromatographie diese Probe aufgeteilt und für alle drei Polishing-Schritte als Grundlage diente. Als Positivkontrolle wurde ebenfalls das Medikament in seiner EC₂₀ und EC₈₀-Konzentration vermessen, als Negativkontrolle dient die alleinige Zugabe von Antigen. Die Zellviabilitäten der einzelnen Aufreinigungsschritte sind in Abbildung 4.30 dargestellt.

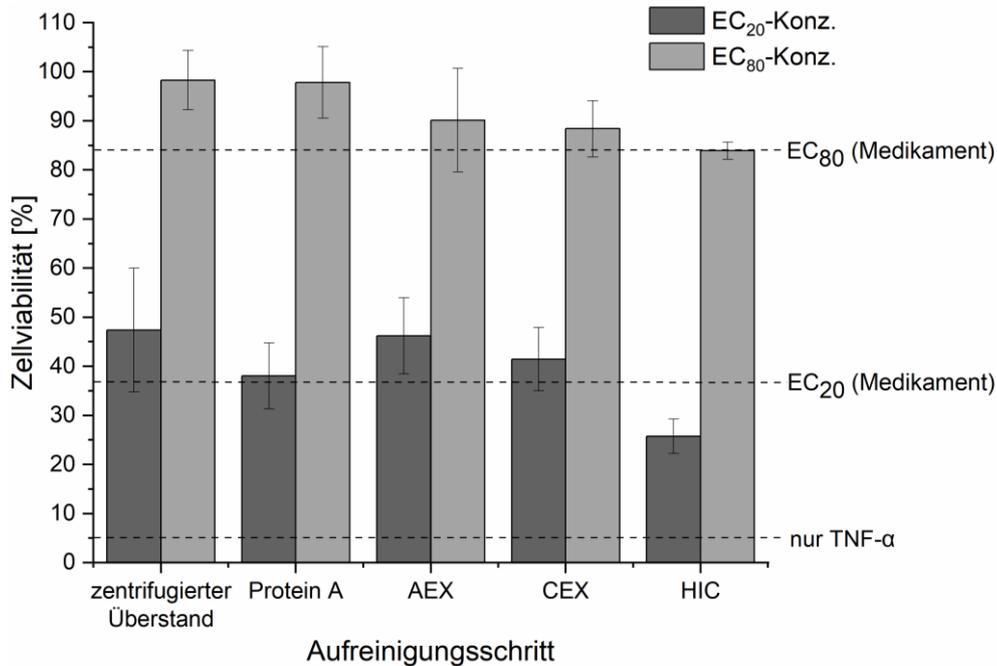


Abbildung 4.30: Bioaktivität des mAks nach den verschiedenen Aufreinigungsschritten bei Zugabe von $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TNF- α , zusammen mit den EC₂₀- und EC₈₀-Konzentrationen des Medikaments [119].

Im Durchschnitt lag die Zellviabilität der Zellen, die nur dem Antigen ausgesetzt waren (Negativkontrolle) bei etwa 5 %. Mit allen vermessenen Proben konnten höhere Viabilitäten der Zellen bestimmt werden. Das Medikament erzielte mit seiner EC₂₀ eine Zellviabilität von 37,3 %, welcher als Referenzwert für die Aufreinigungsproben diene. Alle Proben außer der HIC-Polishing-Probe konnten in der geringen Antikörperkonzentration eine höhere Zellviabilität als das Medikament erzielen. Dabei war diese beim zentrifugierten Überstand mit 47,4 % am höchsten, gefolgt von der AEX.

Bei der Betrachtung der höheren eingesetzten Antikörperkonzentration (EC₈₀) erzielte das Medikament eine Viabilität von 84,6 %. Alle Proben, außer die des HIC-Polishing-Schritts lagen über dem Wert des Medikaments. Dabei erzielte die HIC mit 83,8 % den niedrigsten Wert, aber verglichen mit der niedrigen Antikörperkonzentration (EC₂₀) doch im Bereich des Medikaments. Der höchste Wert wurde mit einer Viabilität von 98,3 % beim zentrifugierten Überstand erreicht.

Der mAk war in allen getesteten Aufreinigungsschritten bioaktiv. Nur die niedrige mAk-Konzentration der HIC-Probe liegt deutlich unterhalb des Medikamentenwertes. Allgemein sind die Schwankungen der niedrigeren Antikörperkonzentrationen größer,

was auf die größere Verdünnung der Proben zurück zu führen ist. Der Abfall der Zellviabilität vom zentrifugierten Überstand zu den einzelnen Aufreinigungsschritten ist so gering, dass er nicht auf Prozessbedingungen der Aufreinigung zurückgeführt werden kann.

Neben den einzelnen Chromatographie-Schritten wurde der Bioaktivitätsassay auch genutzt, um zu untersuchen, ob eine Hintereinanderschaltung der Polishing-Schritte eine Auswirkung auf die Bioaktivität hat. Dabei wurde wieder das Medikament als Vergleich gemessen sowie der Überstand und eine Probe nach Protein A. Es wurden die sechs verschiedenen Polishing-Säulenkombinationen auf Bioaktivität untersucht (siehe Kapitel 7.3, zusätzliche experimentelle Daten). Die Ergebnisse waren denen aus Abbildung 4.30 in Bezug auf die hohe Antikörperkonzentration sehr ähnlich. Bei den niedrigen Antikörperkonzentrationen liegen die Werte hingegen alle unter der des Medikaments. Die Viabilität des EC₂₀-Wertes des Medikaments war bei diesem Versuch allerdings auch um 6,2 % höher als beim vorangegangenen Versuch. Auf Grund der Ergebnisse der EC₈₀-Werte, konnte bei der Kombination der Polishing-Schritte ebenfalls kein Verlust der Bioaktivität festgestellt werden.

4.3.6 Fazit des Bioaktivitätsassays

Der Bioaktivitätsassay beruht auf der Apoptose-auslösenden Wirkung des Antigens TNF- α . Wird dieses durch den mAk gebunden, kann es keine Apoptose auslösen und die Bioaktivität des Antikörpers ist bestätigt.

Bei der Etablierung des Bioaktivitätsassays wurden verschiedene Faktoren untersucht und optimiert. Dabei ergab sich als Animpfzellzahl der L929-Zellen 30.000 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte. Die Inkubation dieser Zellen in DMEM-Vollmedium dauerte 24 h, bis eine vollständige Konfluenz der adhärennten Zellen erreicht war. Durch die Zugabe des Mitoseinhibitors Actinomycin D soll ein Überwachsen der Zellen verhindern und so die Vergleichbarkeit der Proben untereinander gewährleisten werden. Eine 2 h Inkubation von 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Actinomycin D in DMEM-Basalmedium wurde als optimal ermittelt.

Unter diesen Voraussetzungen wurde anschließend eine sigmoidale Dosis-Wirkungskurve des Antigens aufgenommen. Die Zellen wurden nach Entfernen der Actinomycin

D-Lösung für 24 h mit verschiedenen TNF- α -Konzentrationen (0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 und 1000 ng·mL⁻¹) in DMEM-Basalmedium inkubiert. Es ergab sich mit steigender TNF- α -Konzentration eine immer niedrigere Zellviabilität. Die Zellviabilitäten wurden jeweils über einen CTB-Assay ermittelt. Anhand dieser Kurve wurde die IC₅₀-Konzentration des Antigens mit 0,02 ng·mL⁻¹ bestimmt. Für die Überprüfung der Bioaktivität des mAks wurde die TNF- α -Konzentration auf 1 ng·mL⁻¹ festgelegt.

Bei der Dosis-Wirkungskurve sowohl für den selbst aufgereinigten mAk als auch ein kommerzielles Biosimilar mit unterschiedlichen mAk-Konzentrationen (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 und 1000 ng·mL⁻¹) ergab sich für beide Kurven der gleiche Verlauf. Mit einer steigenden mAk-Konzentration wurde die Zellviabilität größer. Das bedeutet, je mehr mAk hinzugegeben wurde, desto mehr Antigen konnte dieser binden und dadurch in seiner Wirkung unschädlich machen. Für alle folgenden Bioaktivitätstestungen des mAks wurden zwei verschiedene Verdünnungen bestimmt, die aus der sigmoidalen Kurve ermittelte EC₂₀ sowie EC₈₀ des Medikaments. Die EC₂₀ für den mAk lag bei 4,74 ng·mL⁻¹ und die EC₈₀ bei 41,36 ng·mL⁻¹.

Bei der Bestimmung der Bioaktivität über die verschiedenen Aufreinigungsschritte, zentrifugierten Überstand, Protein A-Chromatographie, die einzelnen Polishing-Schritte sowie die Kombination zweier Polishing-Schritte ergaben sich kein Unterschiede hinsichtlich der Bioaktivität des mAks. Über alle Aufreinigungsschritte hinweg blieb der Antikörper unverändert bioaktiv.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden beispielhaft die Analytik und Aufreinigung eines in Tierzellkultivierung produzierten Proteins anhand eines IgG-Antikörpers entwickelt. Die Ziele der Arbeit können in drei Bereiche geteilt werden: Die quantitative Analytik sowie die Stabilität des monoklonalen Antikörpers (mAk), die Aufreinigung des mAks und die Etablierung eines Bioaktivitätsassays als Qualitätskriterium.

Die Protein A-Chromatographie an der HPLC als quantitative Analytik wurde hinsichtlich der eingesetzten Puffer optimiert. Dabei wurden die Optima für den pH-Wert, die Salzkonzentration als auch für die Flussrate bestimmt. In einem Vergleich dieser Affinitätschromatographie zu einer Größenausschlusschromatographie (SEC) konnten mit beiden Methoden die gleichen mAk-Konzentrationen einer Kultivierung bestimmt werden. Die SEC bietet allerdings den Vorteil des geringeren Probenvolumens von nur 5 μL und der zusätzlichen Möglichkeit zur Bestimmung von Aggregaten. Für die weitere Untersuchungen zur Stabilität und der Aufreinigung kam deswegen die SEC-Methode für die quantitative Analytik des mAks zum Einsatz.

Sowohl für die spätere Aufreinigung als auch die Lagerung des Produkts, spielt die Stabilität eine entscheidende Rolle. Nur ein stabiles Produkt eignet sich für weiterführende Experimente und für den medizinischen Einsatz. Aus diesem Grund wurde die Stabilität hinsichtlich des pH-Wertes und der Salzkonzentration untersucht. Die Stabilität des mAks ist bei den pH-Werten 6 und 7 am größten sowie bei einer Salzzugabe von 0,5 M NaCl. Salz als Additiv verhinderte dabei die Bildung von Aggregaten. In weiterführenden Experimenten könnte auch der Einfluss der Temperatur auf die Lagerung des mAks untersucht werden. Hierbei wären insbesondere die Auswirkung des Einfrierens und Auftauens auf die Bildung von Aggregaten und den Abbau des mAks von Bedeutung.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die verschiedenen Schritte der Antikörperaufreinigung durchgeführt. Als erstes wurde der Übergangsschritt des Upstream-Prozesses zum Downstream-Prozess, die Zellabtrennung, untersucht. Wegen der höchsten Antikörperkonzentration von $3,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und dem geringsten apparativen Aufwand, wird in dieser Arbeit die Zentrifugation für diesen Schritt verwendet. Eine andere untersuchte

Methode, die Tiefenfiltration, ist eher für den industriellen Einsatz geeignet, weil der größte Abtrennungseffekt, also die geringste Trübung, hiermit erzielt worden ist. Mit dieser Methode kann außerdem eine große Menge Kulturbrühe in kurzer Zeit aufgereinigt werden.

Der erste Schritt der mAk-Aufreinigung, der Capture Schritt, ist die Protein A-Affinitätschromatographie. Nach der Optimierung des Elutions- sowie des Äquilibriumspuffers ergab sich durch diesen Schritt eine mAk-Ausbeute von 88,7 % mit einer Reinheit von 90 %. Alternativ zu einer Säule können auch Membranadsorber (MA) für diesen Capture-Schritt genutzt werden. Der Vergleich zwischen einer Säule und einem MA zeigte eine dynamische Bindungskapazität der Säule von 17 mg und des MA von nur 11,7 mg. Hingegen zeigte der MA mit $18,6 \frac{mg}{mL \cdot h}$ eine 43 % höhere Produktivität als die Säule mit $13 \frac{mg}{mL \cdot h}$. Beide Anwendungen haben unterschiedliche Vor- und Nachteile. Der MA kann mit höheren Durchflussraten betrieben werden, was bedeutet, dass die Reinigung von Zellkulturüberständen größerer Mengen in kürzerer Zeit als mit einer Säule durchgeführt werden kann. Für den Betrieb im industriellen Maßstab mit wesentlich höheren Durchsätzen kann der Einsatz von MA bevorzugt werden, wenn die geringe Kapazität in Kauf genommen oder durch weitere Entwicklungen erhöht wird [112]. Im Labormaßstab mit geringen Probenvolumina ist die Säule mit ihrer höheren dynamischen Bindungskapazität die bessere Wahl.

Dem Capture-Schritt folgen bei der Aufreinigung eines mAk zwei Polishing-Schritte, bei denen vor allem eine Kombination von Anionenaustausch- (AEX), Kationenaustausch- (CEX) und hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) eingesetzt wird. Für alle drei Methoden wurden jeweils Optimierungen der eingesetzten Puffer durchgeführt. Dabei wurde die AEX im Flow-through-Modus betrieben, während die CEX und die HIC im Bind-and-elute-Modus betrieben worden sind. Die Polishing-Schritte wurden sowohl einzeln aber auch hintereinandergeschaltet durchgeführt und jeweils die Ausbeute, die Reinheit sowie die verbliebene Konzentration an Wirtszellproteinen (HCP) bestimmt. Dabei ergab sich für die AEX sowohl die größte Ausbeute von 91,5 % als auch die höchste Reinheit mit 99,38 %. Gefolgt von der CEX mit einer Ausbeute von 84,9 % und einer Reinheit von 98,57 % sowie der HIC mit einer Ausbeute von 73,8 %

und einer Reinheit von nur 68 %. Um eine effiziente Aufreinigung über die HIC zu ermöglichen, müssten weitere Versuche zur Optimierung der Methode durchgeführt werden. Dabei spielen das verwendete Salz und dessen Konzentration im Puffer eine Rolle, aber auch der pH-Wert, die Temperatur, die Zugabe von Additiven oder die Wahl des Liganden können Einfluss auf die Effektivität der HIC haben [129].

Bei der Hintereinanderschaltung der Polishing-Schritte ergab die Kombination AEX – CEX mit 86,2 % die größte Ausbeute sowie mit 99,8 % die höchste Reinheit. Von dem Einsatz der HIC ist ohne weitere Optimierung für die Aufreinigung dieses Antikörpers abzusehen.

Chromatographische Aufreinigungsschritte werden hauptsächlich im Batch-Betrieb (diskontinuierlich) durchgeführt. Aufgrund des Kostendrucks bei der Aufreinigung von Biopharmazeutika rückt die Produktivitätssteigerung immer weiter in den Vordergrund. Für die Produktivitätssteigerung wiederum ist der kontinuierliche Betrieb besonders interessant. Die Vorteile liegen in zusätzlicher Kapazitätsnutzung, Vermeidung von Batch-zu-Batch-Schwankungen sowie Senkung der Prozesszeit und damit der Prozesskosten [142, 143]. Für die Protein A-Chromatographie beispielsweise führte eine kontinuierliche Betriebsweise zu einer Steigerung der Bindungskapazität um 20 % [144]. Eine Anwendung der kontinuierlichen Betriebsweise auf die Polishing-Schritte könnte ebenfalls zu einer Kapazitätssteigerung führen.

Zusätzlich zur Ausbeute und Reinheit wurde die Wirtszellprotein (HCP)-Konzentration für die Aufreinigungsschritte bestimmt. Die HCP-Konzentration konnte bereits durch den Protein A-Schritt ($3590 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) auf unter 1 % der Konzentration im Überstand verringert werden. Bei den Polishing-Schritten wurde mit der HIC die niedrigste verbleibende HCP-Konzentration von $9,09 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ erreicht. Wohingegen mit einer alleinigen AEX ($261,82 \text{ ng pro mg mAk}$) der maximale Grenzwert von $100 \text{ ng HCP pro mg mAk}$ noch überschritten wurde. Bei der Hintereinanderschaltung zweier Polishing-Schritte wurde der Grenzwert bei allen Kombinationen unterschritten. Die geringste Menge HCPs auf 1 mg mAk ergab sich bei der Kombination CEX – HIC. Da von der HIC allerdings auf Grund der geringen Ausbeute und Reinheit abzusehen ist, ist der Kombination AEX – CEX weiterhin der Vorzug zu geben.

Neben der Konzentration der HCPs spielt bei der Aufreinigung von mAKs auch die Konzentration an DNA eine entscheidende Rolle. DNA stellt eine prozessabhängige Verunreinigung dar. Derzeit liegt die aktuelle Empfehlung der WHO zum Verbleib von DNA-Resten in einem als Therapeutikum eingesetzten Protein bei maximal 10 ng pro Dosis [145]. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wird häufig eine Polymerasekettenreaktion (PCR) genutzt, bei der Primer gegen bestimmte Housekeeping-Gene des Produktionsstammes eingesetzt werden [146, 147]. Der Nachweis der DNA könnte ein zusätzliches Entscheidungskriterium bei der Auswahl der Polishing-Schritte darstellen.

Beim Einsatz von mAKs in Therapeutika muss deren Wirksamkeit gegeben sein. Deswegen wurde im letzten experimentellen Teil die Etablierung eines Bioaktivitätsassays durchgeführt, der auf der Bindung des mAKs zu seinem Antigen beruht. Das Antigen, der Tumornekrose-Faktor (TNF)- α , besitzt eine Apoptose-auslösende Wirkung. Es wurde ein Assay etabliert, bei dem die Bindung des Antigens durch den intakten Antikörper die Apoptose blockiert. Dabei wurde die Animpfzellzahl sowie die Zugabe eines Mitoseinhibitors Actinomycin D optimiert. Anschließend wurde eine Dosis-Wirkungskurve des Antigens aufgenommen. Mit steigender TNF- α -Konzentration ergab sich eine immer niedrigere Zellviabilität. Für die Dosis-Wirkungskurve des mAKs sowie eines kommerziellen Biosimilars wurde die Antigenkonzentration auf $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ festgelegt. Mit steigender mAK-Konzentration wurde für beide Produkte die Zellviabilität größer, weil mehr Antigen gebunden und unschädlich gemacht werden konnte. Die EC_{20} für das Biosimilar lag bei $4,74 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ und die EC_{80} bei $41,36 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Es wurden Proben aller Aufreinigungsschritte, von der Zellabtrennung bis zu den Polishing-Schritten, untersucht. Die Proben wiesen allesamt bioaktiven mAK auf, somit verliert der mAK durch die Aufreinigung nicht an Wirksamkeit.

Der Bioaktivitätsassay könnte neben der Kontrolle der Aufreinigung auch zur Prozesskontrolle verwendet werden, um beispielsweise die Bioaktivität bei veränderter Kultivierung unter Stressbedingungen zu überprüfen. Ebenfalls wäre der Einsatz des Assays zur Überprüfung der Bioaktivität des mAKs nach verschiedenen Stabilitätstest möglich. Untersuchungen zu diesen Anwendungen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt und bedürfen einer Aufklärung in weiterführenden Studien. Neben

dem Qualitätsmerkmal Bioaktivität spielt auch das Glykosylierungsmuster der schweren Kette eine entscheidende Rolle bei der Verträglichkeit und Wirksamkeit des mAk im menschlichen Körper. Über eine massenspektrometrische Untersuchung könnten die Zucker nach der Ablösung von der schweren Kette sowohl identifiziert als auch quantifiziert werden und hierdurch das Glykosylierungsmuster charakterisiert werden [148].

Es wurden sowohl quantitative als auch qualitative Methoden zur Untersuchung des hier modellhaft eingesetzten mAk getestet und etabliert. Dabei konnte mittels SEC sowohl die mAk-Konzentration als auch die Reinheit und die Menge an Aggregaten einer Probe bestimmt werden. Der etablierte Bioaktivitätsassay stellt ein entscheidendes Bewertungskriterium zur Qualitätsbeurteilung für diesen mAk dar. Auf Basis der entwickelten Analytik konnten verschiedene Schritte der Aufreinigung durchgeführt und bewertet werden. Dabei erwies sich nach Zentrifugation die Nutzung einer Säule beim Capture-Schritt als optimal. Über die Kombination AEX – CEX als Polishing-Schritte konnte der mAk am Ende mit einer Ausbeute von 86,2 % sowie einer Reinheit von 99,8 % aufgearbeitet werden und lag bioaktiv vor. Die Ergebnisse lassen sich nicht direkt auf andere Antikörper übertragen, aber die Erkenntnisse und Herangehensweisen erleichtern die Etablierung der notwendigen Analytik und Aufreinigung für zukünftige Therapeutika auf Basis monoklonaler Antikörper.

6 Literaturverzeichnis

1. Mintz J. COVID-19 Antibody Test (ELISA) for Those Already Infected With Coronavirus. <https://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=229579>. Accessed 17 Apr 2020.
2. Verband forschender Arzneimittelhersteller. Therapeutic medicines against the coronavirus infection Covid-19. 2020. <https://www.vfa.de/de/arzneimittel-forschung/woran-wir-forschen/therapeutic-medicines-coronavirus-covid-19>. Accessed 17 Apr 2020.
3. Natanson L. New Report Shows Monoclonal Antibody Development Times Are Lengthening. <https://archive.bio.org/articles/new-report-shows-monoclonal-antibody-development-times-are-lengthening>. Accessed 20 May 2020.
4. Mould DR, Meibohm B. Drug Development of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *BioDrugs*. 2016;30:275–93. doi:10.1007/s40259-016-0181-6.
5. Weinberg WC, Frazier-Jessen MR, Wu, W J et al. Development and regulation of monoclonal antibody products: Challenges and opportunities. *Cancer and Metasis Reviews*. 2005;569–84. doi:10.1007/s10555-005-6196-y.
6. Verband forschender Arzneimittelhersteller. Impfstoffe zum Schutz vor Covid-19, der neuen Coronavirus-Infektion. 2020. <https://www.vfa.de/de/arzneimittel-forschung/woran-wir-forschen/impfstoffe-zum-schutz-vor-coronavirus-2019-ncov>.
7. Chiu ML, Gilliland GL. Engineering antibody therapeutics. *Curr Opin Struct Biol*. 2016;38:163–73. doi:10.1016/j.sbi.2016.07.012.
8. Elgundi Z, Reslan M, Cruz E, Sifniotis V, Kayser V. The state-of-play and future of antibody therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017;122:2–19. doi:10.1016/j.addr.2016.11.004.
9. PR Newswire. Monoclonal Antibodies: Global Market Size, Demand Forecasts, Company Profiles, Industry Trends and Updates (2017-2023). 2018. <https://markets.businessinsider.com/news/stocks/monoclonal-antibodies-global-market-size-demand-forecasts-company-profiles-industry-trends-and-updates-2017-2023-1027344776>. Accessed 17 Apr 2020.
10. Ansar W, Ghosh S. Monoclonal Antibodies: A Tool in Clinical Research. *Indian Journal of Clinical Medicine*. 2013;4:IJCM.S11968. doi:10.4137/IJCM.S11968.

11. Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs*. 2015;7:9–14. doi:10.4161/19420862.2015.989042.
12. Kuhn C, Weiner HL. Therapeutic anti-CD3 monoclonal antibodies: from bench to bedside. *Immunotherapy*. 2016;8:889–906. doi:10.2217/imt-2016-0049.
13. Chmiel H. Bioprozesstechnik. 3rd ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011.
14. Shukla AA, Hubbard B, Tressel T, Guhan S, Low D. Downstream processing of monoclonal antibodies--application of platform approaches. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;848:28–39. doi:10.1016/j.jchromb.2006.09.026.
15. Rink L, Kruse A, Haase H. Immunologie für Einsteiger. 2nd ed. Berlin: Springer Spektrum; 2018.
16. Drewe E, Powell R. J. Clinically useful monoclonal antibodies in treatment. *J Clin Pathol*. 2002:81–5.
17. Leenaars M, Hendriksen CFM. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR J*. 2005;46:269–79. doi:10.1093/ilar.46.3.269.
18. Little M. Antikörper in der Krebsbekämpfung: Grundlagen, Prinzipien und Anwendungsmöglichkeiten. Berlin: Springer; 2015.
19. Hufnagel A, Brettschneider K. Rekombinante Antikörper - Eine vollkommen neue Ära für Therapie und Diagnostik. *Die Aktuelle-Wochenschau der GDCh-Fachgruppe Biochemie*. 2013.
20. Raju TS, Briggs JB, Borge SM, Jones AJ. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology*. 2000;10:477–86. doi:10.1093/glycob/10.5.477.
21. Zheng K, Bantog C, Bayer R. The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. *MAbs*. 2011;3:568–76. doi:10.4161/mabs.3.6.17922.
22. Mimura Y, Katoh T, Saldova R, O'Flaherty R, Izumi T, Mimura-Kimura Y, et al. Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: challenges for the safety, functionality and efficacy. *Protein Cell*. 2018;9:47–62. doi:10.1007/s13238-017-0433-3.

-
23. Maskill WJ, Crofts N, Waldman E et al. An evaluation of competitive and second generation ELISA screening tests for antibody to HIV. *Journal of Virological Methods*. 1988;61-73.
 24. Borrebaeck CAK. Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips. *Immunology Today*. 2000;379-82.
 25. Reinard T. Molekularbiologische Methoden. 1st ed. Stuttgart: Ulmer; 2010.
 26. Harding FA, Stickler MM, Razo J, DuBridges RB. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. *MAbs*. 2010;2:256-65. doi:10.4161/mabs.2.3.11641.
 27. Lonberg N. Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms. *Curr Opin Immunol*. 2008;20:450-9. doi:10.1016/j.coi.2008.06.004.
 28. Hoogenboom HR. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol*. 2005;23:1105-16. doi:10.1038/nbt1126.
 29. Lonberg N. Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol*. 2005;23:1117-25. doi:10.1038/nbt1135.
 30. Green LL. Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods*. 1999;231:11-23. doi:10.1016/S0022-1759(99)00137-4.
 31. Weiner LM. Fully human therapeutic monoclonal antibodies. *J Immunother*. 2006;29:1-9. doi:10.1097/01.cji.0000192105.24583.83.
 32. Bazan J, Całkosiński I, Gamian A. Phage display--a powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications. *Hum Vaccin Immunother*. 2012;8:1817-28. doi:10.4161/hv.21703.
 33. Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2018. *MAbs*. 2018;10:183-203. doi:10.1080/19420862.2018.1415671.
 34. Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2019. *MAbs*. 2019;11:219-38. doi:10.1080/19420862.2018.1556465.
 35. Scott AM, Allison JP, Wolchok JD. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immunity*. 2012;14.
 36. Nuti M, Bellati F, Visconti V. Immune Effects of Trastuzumab. *Journal of Cancer*. 2011;317-23.

37. AbbVie. AbbVie Reports Full-Year and Fourth-Quarter 2018 Financial Results. 2019. <https://news.abbvie.com/news/abbvie-reports-full-year-and-fourth-quarter-2018-financial-results.htm>. Accessed 17 Mar 2020.
38. Gils A, Vande Castele N, Poppe R, van de Wouwer M, Compernelle G, Peeters M, et al. Development of a universal anti-adalimumab antibody standard for interlaboratory harmonization. *Ther Drug Monit.* 2014;36:669–73. doi:10.1097/FTD.0000000000000074.
39. Monaco C, Nanchahal J, Taylor P, Feldmann M. Anti-TNF therapy: past, present and future. *Int Immunol.* 2015;27:55–62. doi:10.1093/intimm/dxu102.
40. Haraoui B, Bykerk V. Etanercept in the treatment of rheumatoid arthritis. *Ther Clin Risk Manag.* 2007;3:99–105. doi:10.2147/tcrm.2007.3.1.99.
41. Mazumdar S, Greenwald D. Golimumab. *MAbs.* 2009;1:422–31. doi:10.4161/mabs.1.5.9286.
42. Goel N, Stephens S. Certolizumab pegol. *MAbs.* 2010;2:137–47. doi:10.4161/mabs.2.2.11271.
43. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie.* 4th ed. Berlin: Springer Spektrum; 2014.
44. Mehta A, Lovato Tse M, Fogle J, Len A, Shrestha R, Fontes N, et al. Purifying Therapeutic Monoclonal Antibodies. *CEP- SBE Special Section, Bioprocessing.* 2008:14–20.
45. Tjio JH, Puck T. Genetics of somatic mammalian cells: II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J Exp Med.* 1958:259–68. doi:10.1084/jem.108.2.259.
46. Kelley B. Industrialization of mAb production technology. *MAbs.* 2009:43–52.
47. Gronemeyer P, Ditz R, Strube J. Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. *Bioengineering (Basel).* 2014;1:188–212. doi:10.3390/bioengineering1040188.
48. Li F, Vijayasankaran N, Shen AY, Kiss R, Amanullah A. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs.* 2010;2:466–79. doi:10.4161/mabs.2.5.12720.
49. Kunert R, Reinhart D. Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100:3451–61. doi:10.1007/s00253-016-7388-9.

-
50. Kuczewski M, Schirmer E, Lain B, Zarbis-Papastoitsis G. A single-use purification process for the production of a monoclonal antibody produced in a PER.C6 human cell line. *Biotechnol J*. 2011;6:56–65. doi:10.1002/biot.201000292.
51. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Löffler G. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9th ed. Berlin: Springer; 2014.
52. Maybury JP, Hoare M, Dunnill P. The use of laboratory centrifugation studies to predict performance of industrial machines: Studies of shear-insensitive and shear-sensitive materials. *Biotechnol Bioeng*. 2000;67:265–73. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(20000205)67:3<265::AID-BIT2>3.0.CO;2-J.
53. Reif O-W, Scheper T. Aufreinigung. In: Angewandte Mikrobiologie. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; 2006. p. 427–443. doi:10.1007/3-540-29456-2_25.
54. Huse K, Böhme H-J, Scholz G H. Purification of antibodies by affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2002:217–31.
55. Choe W, Durgannavar TA, Chung SJ. Fc-Binding Ligands of Immunoglobulin G: An Overview of High Affinity Proteins and Peptides. *Materials (Basel)* 2016. doi:10.3390/ma9120994.
56. Kang Y, Ludwig DL, Balderes P. What can cell culture flocculation offer for antibody purification processes. *Pharmaceutical Bioprocessing*. 2014;2:483–5. doi:10.4155/pbp.14.33.
57. Hober S, Nord K, Linhult M. Protein A chromatography for antibody purification. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;848:40–7. doi:10.1016/j.jchromb.2006.09.030.
58. Gagnon P. Technology trends in antibody purification. *J Chromatogr A*. 2012;1221:57–70. doi:10.1016/j.chroma.2011.11.003.
59. Pabst TM, Thai J, Hunter AK. Evaluation of recent Protein A stationary phase innovations for capture of biotherapeutics. *J Chromatogr A*. 2018;1554:45–60. doi:10.1016/j.chroma.2018.03.060.
60. Gagnon P. Purification tools for monoclonal antibodies. Tucson, Ariz.: Validated Biosystems; 1996.
61. Chinniah S, Hinckley P, Connell-Crowley L. Characterization of operating parameters for XMuLV inactivation by low pH treatment. *Biotechnol Prog*. 2016;32:89–97. doi:10.1002/btpr.2183.

-
62. Fahrner RL, Knudsen HL, Basey CD, Galan W, Feuerhelm D, Vanderlaan M, Blank GS. Industrial purification of pharmaceutical antibodies: development, operation, and validation of chromatography processes. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2001;18:301–27. doi:10.1080/02648725.2001.10648017.
63. Marques BF, Roush DJ, Göklen KE. Virus filtration of high-concentration monoclonal antibody solutions. *Biotechnol. Prog.* 2009:483-491.
64. Kang J, Lin X, Pender J. Rapid Formulation Development for Monoclonal Antibodies. *BioProcess International.* 2016.
65. Girard V, Hilbold N-J, Candy KSNea. Large-scale monoclonal antibody purification by continuous chromatography, from process design to scale-up. *Journal of Biotechnology.* 2015:67–73.
66. Chernajovsky Y, Nissim A. Therapeutic Antibodies. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2008.
67. Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, Cominelli F, Kollias G. Impaired On/Off Regulation of TNF Biosynthesis in Mice Lacking TNF AU-Rich Elements. *Immunity.* 1999;10:387–98. doi:10.1016/s1074-7613(00)80038-2.
68. van Horssen R, Hagen TLM, Eggermont AMM. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist.* 2006;11:397–408. doi:10.1634/theoncologist.11-4-397.
69. Grütter MG. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol.* 2000;10:649–55. doi:10.1016/S0959-440X(00)00146-9.
70. Kozlowski LP. Proteome-pI: proteome isoelectric point database. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:D1112-D1116. doi:10.1093/nar/gkw978.
71. Schlatter S, et al. On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells. *Biotechnol. Prog.* 2005:122–33.
72. Bhoskar P, Belongia B, Smith R, Yoon S, Carter T, Xu J. Free light chain content in culture media reflects recombinant monoclonal antibody productivity and quality. *Biotechnol Prog.* 2013;29:1131–9. doi:10.1002/btpr.1767.
73. Kromidas S. HPLC richtig optimiert: Ein Handbuch für Praktiker. Hoboken: Wiley-VCH; 2008.
74. Thermo Fisher Scientific. POROS™ A and G Affinity Columns and POROS™ CaptureSelect™ Affinity Columns: Product Information Sheet. 2017.

-
75. Platts L, Falconer RJ. Controlling protein stability: Mechanisms revealed using formulations of arginine, glycine and guanidinium HCl with three globular proteins. *Int J Pharm.* 2015;486:131–5. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.03.051.
76. Park G-J. Analytic Methods for Design Practice. London: Springer London; 2007.
77. Zheng JY, Janis LJ. Influence of pH, buffer species, and storage temperature on physicochemical stability of a humanized monoclonal antibody LA298. *Int J Pharm.* 2006;308:46–51. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.024.
78. van Deemter JJ, Zuiderweg FJ, Klinkenberg A. A Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chemical Engineering Science*;1956:271–89.
79. Peppermüller PP. Aufreinigung und Analytik eines monoklonalen Antikörpers. *Bachelorarbeit.* 2018.
80. Tsumoto K, Ejima D, Senczuk AM, Kita Y, Arakawa T. Effects of salts on protein-surface interactions: applications for column chromatography. *J Pharm Sci.* 2007;96:1677–90. doi:10.1002/jps.20821.
81. Arakawa T, Philo JS, Tsumoto K, Yumioka R, Ejima D. Elution of antibodies from a Protein-A column by aqueous arginine solutions. *Protein Expr Purif.* 2004;36:244–8. doi:10.1016/j.pep.2004.04.009.
82. Meyer VR. Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie: Wiley; 2004.
83. Zurborg L. Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers und vergleichende Analytik mittels Protein A- und Größenausschlusschromatographie. 2018.
84. Agilent Technologies, Inc. Titer Determination: Application Compendium. 2018.
85. Satzer P, Jungbauer A. High-capacity protein A affinity chromatography for the fast quantification of antibodies: Two-wavelength detection expands linear range. *J Sep Sci.* 2018;41:1791–7. doi:10.1002/jssc.201701481.
86. Lottspeich F, Engels JW, editors. Bioanalytik. 3rd ed. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2012.
87. Sartorius Stedim Biotech GmbH, Steinbrecher U. Size Exclusion Chromatography (SEC). Überprüfung der Trennleistung von HPLC- SEC Säulen (0.14-700kDa). Bestimmung molekularer Größen in unbekanntenen Proben. 2015.

88. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Stability testing of new drug substances and products - Q1A(R2). 2003.
89. Shukla AA, Hinckley P. Host cell protein clearance during protein a chromatography: Development of an improved column wash step. *Biotechnol. Prog.* 2008;1115–21.
90. Liu HF, Ma J, Winter C, Bayer R. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *MAbs.* 2010;2:480–99. doi:10.4161/mabs.2.5.12645.
91. Abbott Laboratories. Humira label: full prescribing information. 2008.
92. I. Genentech, Biogen Idec Inc. Rituxan label: full prescribing information. 2012.
93. I. Genentech. Herceptin label: full prescribing information. 2010.
94. I. Genentech. Avastin label: full prescribing information. 2011.
95. GE Healthcare Bio-Sciences. Operating Instructions for HiTrap Protein A HP 1mL: Instructions 71-7002-00 AP. 2009.
96. Klutz S, Lobedann M, Bramsiepe C, Schembecker G. Continuous viral inactivation at low pH value in antibody manufacturing. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification.* 2016;102:88–101. doi:10.1016/j.cep.2016.01.002.
97. Krepper W, Satzer P, Beyer BM, Jungbauer A. Temperature dependence of antibody adsorption in protein A affinity chromatography. *J Chromatogr A.* 2018;1551:59–68. doi:10.1016/j.chroma.2018.03.059.
98. Mazzer AR, Perraud X, Halley J, O'Hara J, Bracewell DG. Protein A chromatography increases monoclonal antibody aggregation rate during subsequent low pH virus inactivation hold. *J Chromatogr A.* 2015;1415:83–90. doi:10.1016/j.chroma.2015.08.068.
99. Melander W, Horváth A. Salt Effects on Hydrophobic Interactions in Precipitation and Chromatography of Proteins: An Interpretation of the Lyotropic Series. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1977:200–15.
100. Ayyar BV, Arora S, Murphy C, O'Kennedy R. Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods.* 2012;56:116–29. doi:10.1016/j.y-meth.2011.10.007.

-
101. Shukla AA, Thömmes J. Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends Biotechnol.* 2010;28:253–61. doi:10.1016/j.tibtech.2010.02.001.
 102. Gillespie C, Holstein M, Mullin L, Cotoni K, Tuccelli R, Caulmare J, Greenhalgh P. Continuous In-Line Virus Inactivation for Next Generation Bioprocessing. *Biotechnol J.* 2019;14:e1700718. doi:10.1002/biot.201700718.
 103. G. Sofer, D.C. Lister, J.A. Boose. Virus Inactivation in the 1990s - and into the 21st Century. *BioPharm International.* 2003:42–68.
 104. Mendiratta SK. Patent WO2014207763A1: Purification process for monoclonal antibodies. 2014.
 105. Morton J. U.S. Pat No. 20160333365A1: Method of purifying monoclonal antibodies.
 106. Gosh R. Protein separation using membrane chromatography: Opportunities and challenges. *Journal of Chromatography A.* 2002:13–7.
 107. Beutel S, Villain L, Scheper T. Industrial Application of Membrane Chromatography for the Purification of Enzymes. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2016.
 108. Yang Q, Adrus N, Tomicki F, Ulbricht M. Composites of functional polymeric hydrogels and porous membranes. *J. Mater. Chem.* 2011;21:2783–811. doi:10.1039/C0JM02234A.
 109. Gieseler G, Pepelanova I, Meyer A, Villain L, Beutel S, Rinas U, Scheper T. Considerations on the flow configuration of membrane chromatography devices for the purification of human basic fibroblast growth factor from crude lysates. *Eng. Life Sci.* 2016;16:697–705. doi:10.1002/elsc.201600006.
 110. Bolton GR, Mehta KK. The role of more than 40 years of improvement in protein A chromatography in the growth of the therapeutic antibody industry. *Biotechnol Prog.* 2016;32:1193–202. doi:10.1002/btpr.2324.
 111. Knudsen HL, Fahrner RL, Xu Y, Norling LA, Blank GS. Membrane ion-exchange chromatography for process-scale antibody purification. *Journal of Chromatography A.* 2001:145–54. doi:10.1016/S0021-9673(00)01041-4.

-
112. Mothes B, Pezzini J, Schroeder-Tittmann K, Villain L. Accelerated, Seamless Antibody Purification: Process Intensification with Continuous Disposable Technology. *BioProcess Technical*. 2016:34–58.
113. Sartorius Stedim Biotech GmbH. Operating Instructions for Sartobind Protein A 2 mL. https://www.sartoriusglobal.com/_ui/images/hf3/h63/8881347723294.pdf. Accessed 1 Oct 2019.
114. Kaltenbrunner O, Diaz L, Hu X, Shearer M. Continuous bind-and-elute protein A capture chromatography: Optimization under process scale column constraints and comparison to batch operation. *Biotechnol Prog*. 2016;32:938–48. doi:10.1002/btpr.2291.
115. O'Connor E, Aspelund M, Bartnik F, Berge M, Coughlin K, Kambarami M, et al. Monoclonal antibody fragment removal mediated by mixed mode resins. *J Chromatogr A*. 2017;1499:65–77. doi:10.1016/j.chroma.2017.03.063.
116. DrugLib.com. Active ingredient: Adalimumab - Chemistry and Biological Activity. <http://www.druglib.com/activeingredient/adalimumab/chembio/>. Accessed 26 Mar 2020.
117. Cummins PM, Dowling O, O'Connor BF. Ion-exchange chromatography: basic principles and application to the partial purification of soluble mammalian prolyl oligopeptidase. *Methods Mol Biol*. 2011;681:215–28. doi:10.1007/978-1-60761-913-0_12.
118. GE Healthcare Bio-Sciences. Operating Instructions for HiTrap SP HP, Q HP, 1 mL and 5 mL: Instructions 71-7149-00 AP. 2018.
119. Kortmann C. Polishing-Schritte bei der Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers und dessen Qualitätskontrollen. *Masterarbeit*. 2019.
120. Li Y. Effective strategies for host cell protein clearance in downstream processing of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Protein Expr Purif*. 2017;134:96–103. doi:10.1016/j.pep.2017.04.006.
121. Hunt S, Larsen T, Todd RJ. Modeling Preparative Cation Exchange Chromatography of Monoclonal Antibodies. In: *Preparative Chromatography for Separation*. p. 399–427. doi:10.1002/9781119031116.ch13.

122. Xu Z, Li J, Zhou JX. Process development for robust removal of aggregates using cation exchange chromatography in monoclonal antibody purification with implementation of quality by design. *Prep Biochem Biotechnol.* 2012;42:183–202. doi:10.1080/10826068.2012.654572.
123. Rippel G, Bede A, Szepesy L. Systematic method development in hydrophobic interaction chromatography I. Characterization of the phase system and modelling retention. *Journal of Chromatography A.* 1995;697:17–29. doi:10.1016/0021-9673(94)01031-9.
124. Xia F, Nagrath D, Cramer SM. Effect of pH changes on water release values in hydrophobic interaction chromatographic systems. *J Chromatogr A.* 2005;1079:229–35. doi:10.1016/j.chroma.2005.04.005.
125. Zhang Y, Cremer PS. Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series. *Curr Opin Chem Biol.* 2006;10:658–63. doi:10.1016/j.cbpa.2006.09.020.
126. Fekete S, Veuthey J-L, Beck A, Guillarme D. Hydrophobic interaction chromatography for the characterization of monoclonal antibodies and related products. *J Pharm Biomed Anal.* 2016;130:3–18. doi:10.1016/j.jpba.2016.04.004.
127. GE Healthcare Bio-Sciences. Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography. Principles and Methods. 2006.
128. Herigstad MO, Rich LE, Lu, S.M., Ramasubramanian, N. Patent No. US9249182B2: Purification of antibodies using hydrophobic interaction chromatography. 2015.
129. Queiroz JA, Tomaz CT, Cabral JMS. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Biotechnology.* 2001;87:143–59. doi:10.1016/S0168-1656(01)00237-1.
130. Damp S, Reichert JM. Handbook of Therapeutic Antibodies. 2nd ed. s.l.: Wiley-Blackwell; 2014.
131. GE Healthcare Bio-Sciences. Three-step monoclonal antibody purification processes using modern chromatography media: Application note, 29132569 AA. 2015.

132. Ichihara T, Ito T, Gillespie C. Polishing approach with fully connected flow-through purification for therapeutic monoclonal antibody. *Eng. Life Sci.* 2019;19:31–6. doi:10.1002/elsc.201800123.
133. Levy NE, Valente KN, Lee KH, Lenhoff AM. Host cell protein impurities in chromatographic polishing steps for monoclonal antibody purification. *Biotechnol Bioeng.* 2016;113:1260–72. doi:10.1002/bit.25882.
134. Zhu-Shimoni J, Yu C, Nishihara J, Wong RM, Gunawan F, Lin M, et al. Host cell protein testing by ELISAs and the use of orthogonal methods. *Biotechnol Bioeng.* 2014;111:2367–79. doi:10.1002/bit.25327.
135. Mishra S. A spin decay assay for tumor necrosis factor cytotoxicity. *Indian J Biochem Biophys.* 1995;32:254–60.
136. Flick DA, Gifford GE. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *Journal of Immunological Methods.* 1984;68:167–75. doi:10.1016/0022-1759(84)90147-9.
137. Thermo Scientific. Biological Activity Assay for Gibco™ Recombinant Proteins. Cytotoxicity Assay. 2015. <https://www.thermofisher.com/content/dam/Life-Tech/Documents/PDFs/Cytotoxicity-Assay.pdf>. Accessed 3 Dec 2019.
138. Yan L, Hu R, Tu S, Cheng W-J, Zheng Q, Wang J-W, et al. Establishment of a cell model for screening antibody drugs against rheumatoid arthritis with ADCC and CDC. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8:20065–71.
139. Hu W-S, Zhou W. Cell culture bioprocess engineering. Minnesota, Minn.: University of Minnesota; 2013.
140. PeproTech GmbH. Recombinant Human TNF- α : Certificate of Analysis. 2019.
141. Li Q-Y, Zu Y-G, Shi R-Z, Yao L-P. Review camptothecin: current perspectives. *Curr Med Chem.* 2006;13:2021–39. doi:10.2174/092986706777585004.
142. Chatterjee S. FDA perspective on continuous manufacturing. *IFPAC Annual Meeting.* 2012.
143. Mahajan E, George A, Wolk B. Improving affinity chromatography resin efficiency using semi-continuous chromatography. *J Chromatogr A.* 2012;1227:154–62. doi:10.1016/j.chroma.2011.12.106.
144. Brämer C, Tünnermann L, Gonzalez Salcedo A, Reif O-W, Solle D, Scheper T, Beutel S. Membrane Adsorber for the Fast Purification of a Monoclonal Antibody Using

- Protein A Chromatography. *Membranes (Basel)* 2019. doi:10.3390/membranes9120159.
145. World Health Organization. Guidelines on the quality, safety, and efficacy of bi-
otherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology. *Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series*. 2013.
146. Stone MC, Borman J, Ferreira G, Robbins PD. Effects of pH, conductivity, host cell
protein, and DNA size distribution on DNA clearance in anion exchange chromato-
graphy media. *Biotechnol Prog*. 2018;34:141–9. doi:10.1002/btpr.2556.
147. Mohamed VP. Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells expressed native insulin-
like growth factor-1 (IGF-1) gene towards efficient mammalian cell culture host
system. *Afr. J. Biotechnol*. 2011. doi:10.5897/AJB11.2743.
148. Bandyopadhyay S, Mahajan M, Mehta T, Singh AK, Gupta AK, Parikh A, et al. Phy-
sicochemical and functional characterization of a biosimilar adalimumab ZRC-
3197. *BS*. 2014;1. doi:10.2147/BS.S75573.
149. Valdés R, Gómez L, Padilla S, Brito J, Reyes B, Álvarez T, et al. Large-scale purifi-
cation of an antibody directed against hepatitis B surface antigen from transgenic
tobacco plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
2003;308:94–100. doi:10.1016/s0006-291x(03)01335-4.
150. Cygnus Technologies. CHO Host Cell Proteins 3rd Generation. Immunoenzy-
metric Assay for the Measurement of CHO Host Cell Proteins. 2018.
151. AAT Bioquest. Quest Graph™ IC50 Calculator. 2019. <https://www.aat-bio.com/tools/ic50-calculator>. Accessed 1 Apr 2020.
152. GraphPad. How can I determine an EC90 (or any EC value other than EC50)?
2009. <https://www.graphpad.com/support/faqid/169/>. Accessed 1 Apr 2020.

7 Zusätzliche experimentelle Daten

7.1 Stabilität des mAks im sauren pH

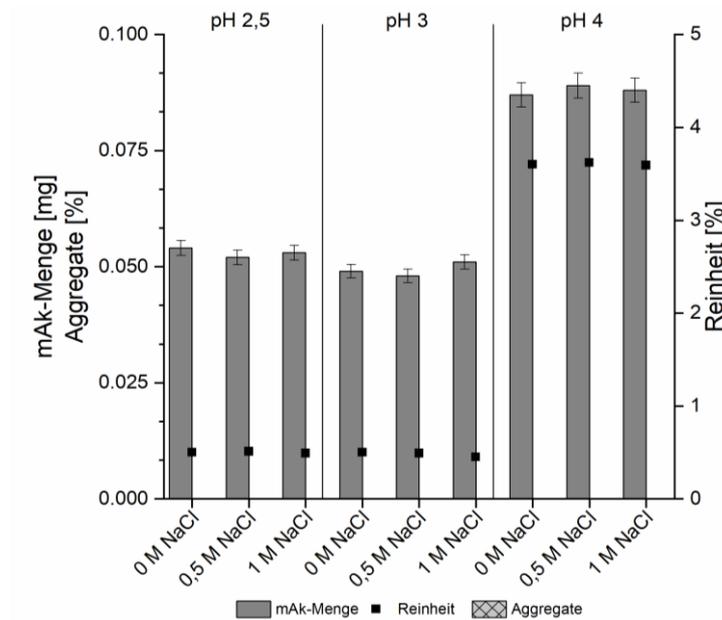


Abbildung 7.1: SEC-HPLC-Ergebnisse nach Inkubation des mAks bei 50°C für eine Woche bei den pH-Werten von 2,5 bis 4, sowie verschiedenen NaCl-Konzentrationen.

7.2 AEX-Chromatogramm vor der Salzoptimierung des Äquilibriumspuffers

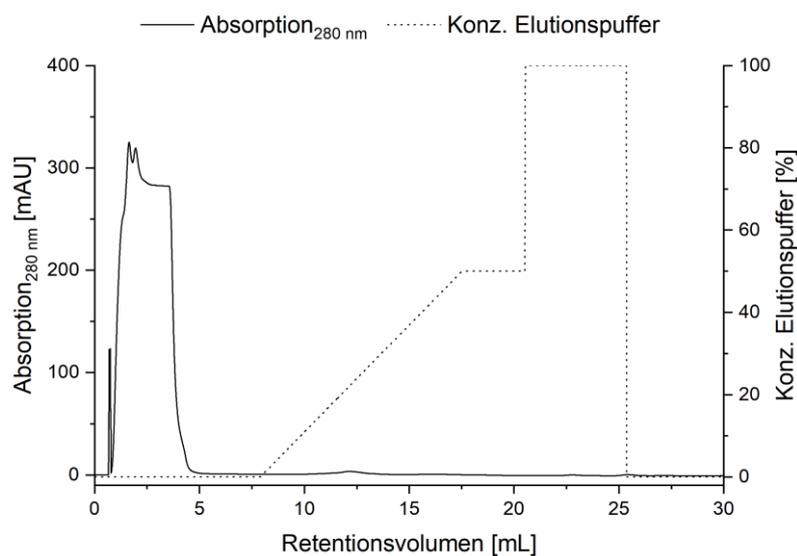


Abbildung 7.2: Chromatogramm der AEX-Methode bei der Aufreinigung des mAks vor der Salz-Optimierung.

7.3 Bioaktivitätstest mit den hintereinander geschalteten Polishing-Schritten

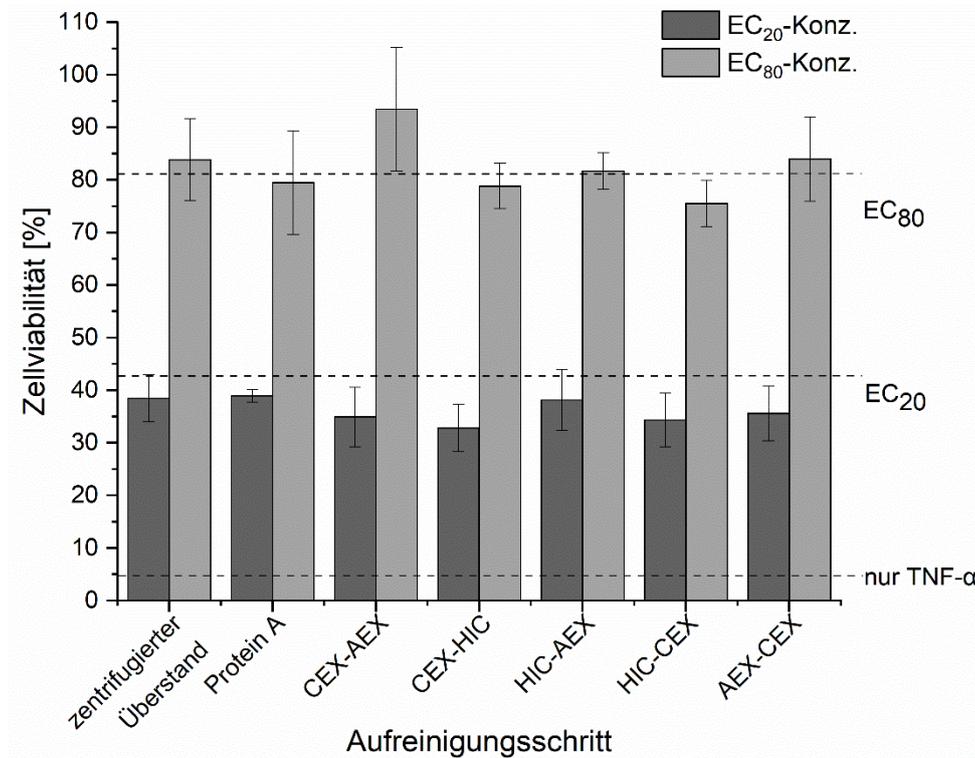


Abbildung 7.3: Zellviabilitäten nach verschiedenen Aufreinigungsschritte inklusive der Hintereinanderschaltung der Polishing-Schritte. Zugabe von 1 ng/mL TNF- α und Antikörper in den EC₂₀- und EC₈₀-Konzentrationen des Medikaments.

A Material

Im Folgenden wird für doppelt-deionisierte Wasser die Bezeichnung H₂O verwendet, welches aus dem Reinstwassersystem arium® 611 stammt. Die pH-Werte wurden bei Raumtemperatur eingestellt.

A.1 Verwendete Chemikalien, Antibiotika und Kits

Tabelle 7.1: Verwendete Chemikalien und Antibiotika.

| Chemikalie | Hersteller |
|--|--|
| (S)-(+)-Camptothecin | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| 10x Trypsin/EDTA (0,5 %/0,2 %) | Biochrom GmbH, Berlin, DE |
| Aceton | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE |
| Actinomycin D | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Ammoniumsulfat | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE |
| Anti-TNF- α -Biosimilar | Amgen Inc., Thousand Oaks, USA |
| APS | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO |
| Bicin | AppliChem GmbH, Darmstadt, DE |
| Bis-Tris | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE |
| Bromphenolblau | Fluka, Buchs, Schweiz |
| Citronensäure | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| CHOKO Stock Culture Medium | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| CHOKO Stock Production Medium | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| CHOKO FMA | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| CHOKO FMB | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Coomassie Brilliant Blau G250 | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Dinatriumhydrogenphosphat | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Dinatriumhydrogensulfat | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Dithiothreitol | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| DMSO | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (DMEM) | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Essigsäure | AppliChem, Darmstadt, DE |
| Ethanol (96%) | Merck KgaA, Darmstadt, DE |

| | |
|--|--|
| Ethanolamin | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Fetales Kälberserum (FKS) | PAA Laboratories GmbH, Cölbe, DE |
| Glycerin | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Glycin | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Kaliumhydrogenphosphat | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Kaliumchlorid | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| L-Glutamin | Lonza, Basel, Schweiz |
| Methanol | Merck KGaA, Darmstadt, DE |
| MTX | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Natriumaurylsulfat (SDS) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE |
| Natriumcarbonat | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Natriumdihydrogenphosphat | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Natriumhydroxid | AppliChem, Darmstadt, DE |
| Natriumhydroxid-Pellets | Merck KGaA, Darmstadt, DE |
| Natriumchlorid | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Natriumsulfat | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE |
| ortho-Phosphorsäure, 85 % | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE |
| Rotiphorese 40 (37,5:1) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE |
| Salzsäure (37%) | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE |
| TNF- α | PeptoTech, Inc., Rocky Hill, USA |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE |
| Tris-HCl | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE |
| Antibiotikum | Hersteller |
| Penicillin/Streptomycin | Merck KGaA, Darmstadt, DE |

Tabelle 7.2: Verwendete Kits.

| Kit | Zweck | Hersteller |
|--|----------------|-------------------------------------|
| Immunoenzymetric Assay zur Messung von CHO Host Cell Protein | HCP-Nachweis | Cygnus Technologies, Southport, USA |
| CTB-Assay | Zellviabilität | Promega Corporation, Madison, USA |

A.2 Medien, Puffer und weitere Lösungen

Tabelle 7.3: Verwendete Medien und weitere Lösungen.

| Medien | Menge/Konzentration | Chemikalie/Bestandteil |
|--|--|--|
| Vorkulturmedium, pH 6,9 – 7,3 (nach Zugabe Natriumcarbonat), 1 L | 970 mL 20,04 g 0,88 g 1,8 g 200 nM 500 µM | ddH ₂ O CHOKO Stock Culture Medium NaOH Pellets NaHCO ₃ Ad 1000 mL ddH ₂ O L-Glutamin MTX (bis Passage 3) |
| Produktionsmedium, pH 6,9 – 7,3 (nach Zugabe Natriumcarbonat) | 970 mL 22,31 g 6,3 mL 1,8 g 200 nM | ddH ₂ O CHOKO Production Medium 5 M NaOH NaHCO ₃ Ad 1000 mL ddH ₂ O L-Glutamin |
| Feed Medium A, pH 6,5 – 6,8 | 850 mL 154,12 g 3,148 mL | ddH ₂ O CHOKO FMA NaOH Pekkets Ad 1000 mL ddH ₂ O |
| Feed Medium B, pH 11,0 – 11,4 | 850 mL 94,6 g 32,1 mL | ddH ₂ O CHOKO FMB 5 M NaOH Ad 1000 mL ddH ₂ O |
| DMEM-Basalmedium | 13,3 g·L ⁻¹ 3,7 g·L ⁻¹ | DMEM-Pulver NaHCO ₃ |
| Vollmedium | 89 % 10 % 1 % | DMEM-Basalmedium FKS Pen/Strep |
| Kryomedium | 70 % 20 % 10 % | DMEM FKS DMSO |
| CTB-Medium | 90 % 10 % | DMEM-Basalmedium CTB-Lösung |
| Weitere Lösungen | Menge/Konzentration | Zusammensetzung |
| 10 x Trypsin/EDTA | 0,5 % 0,2 % | Trypsin EDTA (w/v) in PBS |
| Fixierlösung (Gradientengel) | 50 % 20 % | Ethanol Essigsäure |

| | | |
|-----------------------|--------------------------------|--|
| Coomassie-Färbelösung | 0,15 % 10 % 10 % 20 % | Coomassie Brilliant G-250 Ammoniumsulfat ortho-Phosphorsäure Methanol |
|-----------------------|--------------------------------|--|

Tabelle 7.4: Verwendete Puffer.

| Puffer | Menge/Konzentration | Zusammensetzung |
|---|--------------------------------|---|
| AEX, Äquilibrierung, pH 6,5 | 20 mM 0,4 M | bis-Tris NaCl |
| AEX, Äquilibrierung (Optimierung), pH 7,5 und 8,5 | 20 mM | Tris |
| AEX, Äquilibrierung (Optimierung), pH 9,5 und 10 | 20 mM | Ethanolamin |
| AEX, Elution, pH 6,5 | 20 mM 1 M | bis-Tris NaCl |
| CEX, Äquilibrierung, pH 6,5 | 50 mM | MES |
| CEX, Äquilibrierung (Optimierung), pH 7 und 8 | 50 mM | HEPES |
| CEX, Äquilibrierung (Optimierung), pH 9 | 50 mM | Bicin |
| CEX, Elution, pH 6,5 | 50 mM 1 M | MES NaCl |
| HIC, Äquilibrierung, pH 7,0 (1 L) | 610 mL 390 mL 1,5 M | 50 mM Dinatriumhydrogenphosphat 50 mM Natriumdihydrogenphosphat Ammoniumsulfat |
| HIC, Elution, pH 7,0 (1 L) | 610 mL 390 mL | 50 mM Dinatriumhydrogenphosphat 50 mM Natriumdihydrogenphosphat |
| HIC, CIP | 1 M | NaOH |
| PBS-Puffer, 10x (1 L) | 80 g 2 g 14,4 g 2,4 g | Natriumchlorid Kaliuchlorid Dinatriumhydrogenphosphat Kaliumhydrogenphospaht |

| | | |
|--|--|---|
| Protein A, Äquilibration, HPLC, pH 7,9 (1 L) | 70 mL 930 mL 500 mM | 50 mM Natriumdihydrogenphosphat 50 mM Dinatriumhydrogenphosphat NaCl |
| Protein A, Elution, HPLC, pH 2 | 100 mM 500 mM | Glycin NaCl |
| Protein A, Äquilibration, FPLC, pH 7,5 (1 L) | 16 mL 84 mL 900 mL 150 mM | 0,2 M Natriumdihydrogenphosphat 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat ddH ₂ O NaCl |
| Protein A, Elution, FPLC, pH 3,5 | 0,1 M 150 mM | Citronensäure NaCl |
| Protein A, CIP, FPLC, pH 8,5 | 0,1 M 500 mM | Tris NaCl |
| Protein A, Äquilibration, MA, pH 7,4 | 8 g 0,2 g 0,24 g 1,42 g | NaCl KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ |
| Protein A, Elution, MA, pH 3 | 0,1 M 300 mM | Citrat-Phosphat NaCl |
| Protein A, CIP, MA | 50 mM 1 M | NaOH NaCl |
| SEC, pH 6,6 (1 L) | 100 mL 50 mL 50 mL 800 mL | 1 M Natriumsulfat 1 M Natriumdihydrogenphosphat 1 M Dinatriumhydrogenphosphat ddH ₂ O |
| SDS-Probenpuffer | 20 mM 2 mM 5 % 0,02 % 10 % | Tris-HCl, pH 8 EDTA SDS Bromphenolblau Glycerin |
| TGS-Puffer, 10x, pH 8,3 (1 L) | 30,3 g 144,1 g 10 g | Tris-Base Glycin SDS |

A.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7.5: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

| Verbrauchsmaterial | Hersteller |
|--------------------|---------------------|
| 96-Well-Platte | Brand, Wertheim, DE |

| | |
|--|---|
| Combipipettenspitzen, 5 mL, 10 mL | Eppendorf AG, Hamburg, DE |
| Einmalhandschuhe | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE |
| Einwegspritzen, 1 – 50 mL | B. Braun AG, Melsungen, DE |
| Filter, 0,2 µm, 47 mm, Cellulose-Acetat | Sartorius AG, Göttingen, DE |
| Filter, 0,22 µm, Cellulose-Acetat | Merck KGaA, Darmstadt, DE |
| Filterpapier | Bio-Rad, München, DE |
| Filter/Filterpumpenaufsatz | Sartorius, Göttingen, DE |
| Glaspasteurpipetten, 145 mm, 250 mm | Brand, Wertheim, DE |
| Gradientengel, 4 – 20 % | Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA |
| Kryoröhrchen | Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE |
| Mikroreaktionsgefäße; 1,5 mL; 2 mL und 5 mL | Eppendorf AG, Hamburg, DE |
| Pipettenspitzen | Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE |
| Schnappringkappe, 11 mm | VWR International LLC, Radnor, USA |
| Schnappring-Mikroflaschen, 0,3 mL | VWR International LLC, Radnor, USA |
| Serologische Pipetten, verschiedene Größen | Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE |
| Spritzen-Vorsatzfilter, 0,2 µm, 4 mm, PVDF, unsteril | ThermoFisher Scientific Inc., Wal- tham, USA |
| Spritzen-Vorsatzfilter, 0,45 µm, 25 mm, PVDF, unsteril | Sartorius AG, Göttingen, DE |
| T25/ T75/ T175 Schräghalszellkulturflasche | Sartstedt, Nümbrecht, DE |
| Zentrifugengefäße, 15 mL und 50 mL | Corning Inc., Corning, NY |

A.4 Geräte, Säulen und Software

Tabelle 7.6: Verwendete Geräte.

| Gerät | Bezeichnung | Firma |
|-------------|------------------|---|
| Chip-Reader | Bioanalyzer 2100 | Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA |

| | | |
|--|-------------------------------------|---|
| CO ₂ -Inkubator | HERA Cell 240 | Thermo Electron Corporation, Waltham, USA |
| Eismaschine | Scotsman AF103 | Hubbard Systems, Ipswich, UK |
| FPLC-Anlage | Äkta-pure 25 L | GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA |
| Gel/WB-Scanner | Epson Perfection V750 Pro | Epson, Meerbusch, DE |
| HPLC-Anlage | VWR Hitachi Chromaster | VWR International, Radnor, USA |
| Inkubationsschüttler | KS 4000 I control | IKA, Staufen, DE |
| Kryotank | Orion ET-44 | Chart Industries, Ball Ground, USA |
| Laborgefrierschrank (- 80 °C) | Forma™ 900 series | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Magnetrührer (1) | IKA® RH basic 2 | IKA®-Werke, Staufen, Deutschland |
| Magnetrührer (2) | D-6010 | neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE |
| Mehrkanalpipette | Explorer, 8 Kanal, 5 µL-1200 µL | Eppendorf AG, Hamburg, DE |
| Multi-Detektionsreader für Zellbilder | Cytation 5 | BioTek Instruments, Winooski, USA |
| Multipipette | Multipipette E3 | Eppendorf AG, Hamburg, DE |
| Neubauer Zählkammer | Neubauer Zählkammer; 0,1 mm Tiefe | Brand, Wertheim, Deutschland |
| pH-Meter | SevenCompact | Mettler Toledo, USA |
| Photometer | Genesys 10S UV-Vis | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Pipettierhilfe | Accu-jet pro | Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE |
| Platereader (1) | Fluoroskan Ascent | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Platereader (2) | Multiskan Go | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Reinstwasseranlage | Arium 611 | Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE |
| Schüttler (1) | 3006 | GFL, Burgwedel, DE |
| Schüttler (2) | IKA VIBRAX | VWR International LLC, Radnor, USA |
| SDS-Gel-Gießstation und Gelelektrophoreseapparatur | Mini-Protein® Tetra Handcast System | Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA |
| Sicherheitswerkbank | MSC-Advantage | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |

| | | |
|-----------------------|---------------------------|---|
| Sterilwerkbank | HERAsafe KS 18 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Temperaturschüttler | ThermoMixer® comfort | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Tischzentrifuge | Minizentrifuge | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE |
| Ultraschall-Wasserbad | Sonorex Super RK 510 H | Bandelin electronic, Berlin, Deutschland |
| Vortexer (1) | Genius 3 | IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, DE |
| Vortexer (2) | Reax 1R | Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, DE |
| Waage (1) | Analytic AC 210 S | Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE |
| Waage (2) | LP-Serie | VWR International LLC, Radnor, USA |
| Wasserbad | WNB 45 | Memmert, Schwabach, DE |
| Zentrifuge (1) | Heraeus™ Multifuge™ X3 FR | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Zentrifuge (2) | Heraeus™ Biofuge™ pico | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Zentrifuge (3) | Heraeus™ Fresco™ 21 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Zentrifuge (4) | Zentrifuge 5702 | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |

Tabelle 7.7: Verwendete Säulen/MA

| Säulen | Artikel | Hersteller |
|--------------------------|-----------------------------------|--|
| Vorsäulenhalter | SecurityGuard™ Vorsäulenhalter | Phenomenex Inc., Torrance, USA |
| Protein A, HPLC | POROS® A 20 µm | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Vorsäule Protein A, HPLC | SecurityGuard™, GFC3000, 4 x 3 mm | GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, SE |
| SEC, HPLC | Yarra 3 µm SEC-2000 | Phenomenex Inc., Torrance, USA |
| Vorsäule SEC, HPLC | SecurityGuard™, GFC3000, 4 x 3 mm | Phenomenex Inc., Torrance, USA |
| Protein A, Säule, FPLC | HiTrap Protein A HP, 1 mL | GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, SE |

| | | |
|---------------------|------------------------------|--|
| Protein A, MA, FPLC | Sartobind® Protein A 2 mL | Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE |
| AEX, FPLC | HiTrap Q HP, 1 mL | GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, SE |
| CEX, FPLC | HiTrap SP HP, 1 mL | GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, SE |
| HIC, FPLC | HiScreen Phenyl HP, 4,7 mL | GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, SE |
| Umpufferung, FPLC | HiPrep 26/10 Desalting | GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, SE |

Tabelle 7.8: Verwendete Software.

| Anwendung | Software | Hersteller |
|---------------------------------------|------------------------------|---|
| Chromatographiekontroll-einheit, HPLC | Open Lab Control Panel | Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA |
| Chromatographiekontroll-einheit, FPLC | Unicorn™ | GE Healthcare, Chicago, USA |
| Datenanalyse | MS Excel (Office 365) | Microsoft Corporation, Redmond, USA |
| Datenanalyse | OriginPro® | OriginLab Corporation, Northampton, USA |
| Densitometrische Auswertung | GelAnalyzer | Istvan Lazar Jr., PhD |
| Design of Experiments | MODDE® | Sartorius, Göttingen, Deutschland |
| IC50-Konzentration bestimmen | Quest Graph™ IC50 Calculator | AAT Bioquest, Inc., USA |
| Literaturverwaltung | Citavi 6 | Swiss Academic Software, CH |
| Maßstab bei Mikroskopie | Gen 5 2.0 | BioTek Instruments, Inc., USA |
| Photometer (Plate Reader) Software | Skani™ RE for Multiskan Go | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| SDS-PAGE Gel Scanner Software | Adobe® Photoshop CS2 | Adobe Inc., San José, USA |
| Verfassen der Dissertation | MS Word (Office 365) | Microsoft Corporation, USA |

B Methoden

B.1 Kultivierung der CHO-Zellen

Der Zellkulturüberstand, der für die Experimente verwendet wurde, wurde im Zuge weiterer Promotionsarbeiten nach der folgenden Methode generiert. Chinesische Hamster-Ovarienzellen (CHO DG44) wurden zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers (mAk) in einem chemisch serumfreien Medium von Sigma-Aldrich Fine Chemicals (St. Lois, USA) kultiviert. Die Kultivierungsbedingungen der Vorkultur waren 36,8 °C, 7,5 % CO₂, 80 % Luftfeuchtigkeit und eine Schüttelrate von 120 rpm in 0,5 L Schüttelkolben. Es wurde mit einer Zelldichte von 0,2 x 10⁶ Zellen·mL⁻¹ angeimpft und für 3 – 4 Tage bis zur fünften Passage in Vorkultur-Medium kultiviert. Nach der Vorkultur wurde die Hauptkultur mit einer Zellzahl von 0,3 x 10⁶ Zellen·mL⁻¹ angeimpft. Die Kultivierungsbedingungen waren 36,8 °C, pH 7,1 (kontrolliert mit CO₂), 60 % pO₂ und eine Rührerdrehzahl von 433 Umdrehungen pro Minute (Dreiblattrührer in einem Winkel von 30°) in Produktionsmedium. Die Gesamtdauer der Fed-Batch-Kultivierung betrug 12 Tage. Zwei Arten von Feed-Medien - Feed Medium A (FMA) für Makronährstoffe und Feed Medium B (FMB) für Mikronährstoffe (Sartorius Stedim Cellca GmbH, Göttingen, DE) - wurden alle 24 Stunden, beginnend nach 72 Stunden Kultivierungszeit, zugeführt. Nach der Kultivierung lag der mAk im Überstand vor.

B.2 Gradientengel

Ein 4 – 20 %iges Criterion™ Tris-HCl Gradientengel von Bio-Rad Laboratoeires (Hercules, USA) wurde verwendet, um die Proteine in Kultivierungsproben nachzuweisen. Es wurde der Aufbau für Criterion-Gele von Bio-Rad verwendet. 10 µL der Kultivierungsproben wurden mit 10 µL SDS-Probenpuffer (genaue Zusammensetzung Tabelle 7.4) versetzt. In die Geltaschen wurden 7,5 µL des Größenstandards und jeweils 15 µL der Proteinprobe gegeben. Die Gele wurden in die dafür vorgesehene Kammer eingesetzt und diese mit 1x TGS gefüllt. An die Apparatur wurde zuerst eine Spannung von 85 V für 5 min angelegt, dann 150 V für weitere 65 min. Anschließend folgte die Färbung des Gels.

Färbung

Nach dem Gellauf wurde das Gel für 30 min auf dem Schüttler in Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde es dreimal mit H₂O gewaschen und über Nacht in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Über Nacht werden alle Proteine im Gel durch das kolloidale Coomassie angefärbt, um nun den Hintergrund zu entfärben wurde das Gel abermals in H₂O gewaschen. Nach dem Einscannen des Gels erfolgte die densitometrische Auswertung.

Densitometrische Auswertung

Für die densitometrische Auswertung wird die Software GelAnalyzer verwendet. Das eingescannte Gel wurde in das Programm importiert und die einzelnen Laufstrecken jeder Probe markiert. Über die Intensität der einzelnen Proteinbanden zu der Intensität der Gesamtheit aller Banden wurde der jeweilige prozentuale Anteil der betrachteten Bande bestimmt.

B.3 HPLC

B.3.1 Protein A

Bei der Protein A-Methode zur Bestimmung der Antikörperkonzentration wurde mit einer kommerziellen HPLC-Anlage (Chromaster, VWR International, Radnor, USA) gemessen. Die HPLC-Protein-A-Säule wurde von Thermo Fisher (POROS™ A 1,7 mL, Waltham, USA) gekauft. Die HPLC-Methode (20 Minuten) bestand aus drei getrennten Phasen: 2 Minuten Äquilibrierung, gefolgt von 8 Minuten Elution und schließlich 10 Minuten Säulenregeneration. Zu Beginn wurden die beiden eingesetzten Puffer zur Äquilibrierung und Elution optimiert. Alle verwendeten Puffer wurden über einen Cellulose-Acetat-Filter mit 0,22 µm Porengröße filtriert und im Ultraschallbad entgast. Folgende Bedingungen wurden zusätzlich eingestellt: Die Flussrate wurde auf 1 mL·min⁻¹ eingestellt, die Säulenofentemperatur betrug 30°C, die Temperatur des Autosamplers 10°C und das Injektionsvolumen waren 100 µL. Vor der Injektion in die HPLC wurden die Proben, falls erforderlich, in Äquilibrierungspuffer verdünnt und durch eine 0,22 µm Celluloseacetatmembran filtriert.

Optimierung der Puffer

Die folgenden Tabelle 7.9 und Tabelle 7.10 zeigen die durchgeführten DoE-Experimente für den Elutions- bzw. Äquilibrierungspuffer der Protein A-Säule. Bei der Optimierung des Elutionspuffers wurde als Äquilibrierungspuffer ein 50 mM Natriumphosphat-Puffer mit 0,15 M Natriumchlorid (NaCl), pH 7, eingesetzt. Zum einen empfiehlt der Hersteller der Säule einen neutralen pH-Bereich [74], zum anderen werden in der Literatur 150 mM NaCl häufig eingesetzt [77, 149]. Es wurden jeweils 100 μL Probe mit einer mAk-Konz. von 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ auf die Säule gegeben. Die Zielgrößen dieses Versuchen waren die Retentionszeit des Antikörperpeaks sowie die Antikörperpeakfläche.

Tabelle 7.9: Durchführung des DoE für den Elutionspuffer der Protein A-Säule.

| Reihenfolge | Experiment | Flussrate [$\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$] | pH [/] |
|-------------|-------------------|---|----------|
| 1 | Zentralexperiment | 3 | 2 |
| 2 | Eckexperiment | 4 | 1 |
| 3 | Eckexperiment | 2 | 1 |
| 4 | Zentralexperiment | 3 | 2 |
| 5 | Eckexperiment | 2 | 3 |
| 6 | Eckexperiment | 4 | 3 |
| 7 | Zentralexperiment | 3 | 2 |

Der Zusatz von NaCl wurde nachfolgend ebenfalls getestet, hierbei wurde die gleiche Probenmenge mit der gleichen Konzentration aufgegeben und jeweils folgende NaCl-Konzentrationen dem Elutionspuffer hinzugefügt: 0, 100, 150, 300, 500, 750, 1000, 1500 mM.

Nachdem der Elutionspuffer erfolgreich optimiert wurde, wurde dieser eingesetzt, um ebenfalls den Äquilibrierungspuffer zu optimieren. Es wurden auch hier jeweils 100 μL Probe mit einer mAk-Konz. von 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ auf die Säule gegeben. Die Zielgrößen bei diesem Versuch waren die Antikörperpeakfläche und die Durchflusspeakfläche.

Tabelle 7.10: Durchführung des DoE für den Äquilibrationspuffer der Protein A-Säule.

| Reihenfolge | Experiment | NaCl-Konz. [mM] | pH [°] |
|-------------|-------------------|-----------------|--------|
| 1 | Zentralexperiment | 250 | 7 |
| 2 | Eckexperiment | 0 | 6 |
| 3 | Eckexperiment | 0 | 8 |
| 4 | Zentralexperiment | 250 | 7 |
| 5 | Eckexperiment | 500 | 6 |
| 6 | Eckexperiment | 500 | 8 |
| 7 | Zentralexperiment | 250 | 7 |

Optimierte Methode

Bei der optimierten Methode wurde für die Äquilibration ein 50 mM Natriumphosphat-Puffer (genaue Zusammensetzung Tabelle 7.4) mit 0,5 M NaCl und einem pH-Wert von 7,9 verwendet. Der Elutionspuffer bestand aus 100 mM Glycin mit 0,5 M NaCl, eingestellt auf einen pH-Wert von 2. Die Flussrate wurde auf 1 mL·min⁻¹ festgelegt. Die Detektion erfolgte über einen Diodenarraydetektor bei 280 nm. Die Kalibrationskurve wurde mit verschiedenen Konzentrationen (50 – 500 µg·mL⁻¹) einer aufgereinigten Antikörperlösung gemessen. Die folgende Abbildung 7.4 zeigt eine beispielhafte Kalibration, diese wurde etwa alle drei Monate wiederholt.

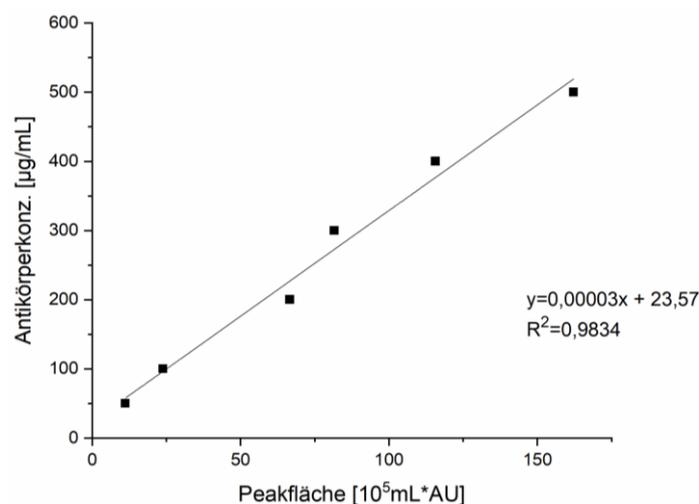


Abbildung 7.4: Kalibration der Protein A-Methode an der HPLC.

B.3.2 SEC

Bei der Größenausschlusschromatographie (SEC)-Messung wurde ein kommerzielles HPLC-System (Chromaster, VWR International, Radnor, PA, USA) verwendet. Die SEC-Säule war eine Yarra™ 3 µm SEC-3000 (Phenomenex, Torrance, USA). Die Assayzeit betrug 20 Minuten. Es wurde ein 100 mM Natriumphosphat-Puffer (genaue Zusammensetzung Tabelle 7.4) mit 100 mM Na₂SO₄ mit einem pH-Wert von 6,6 verwendet. Der Puffer wurde über einen Cellulose-Acetat-Filter mit 0,22 µm Porengröße filtriert und im Ultraschallbad entgast. Die Flussrate wurde auf 1 mL·min⁻¹ eingestellt, die Temperatur des Säulenofens betrug 25°C, die Temperatur des Autosamplers 10°C und das Injektionsvolumen 5 µL.

Die Kalibrationskurve wurde mit einer aufgereinigten Antikörperlösung (50 – 500 µg·mL⁻¹) gemessen. Die folgende Abbildung 7.5 zeigt eine beispielhafte Kalibration, diese wurde etwa alle drei Monate wiederholt.

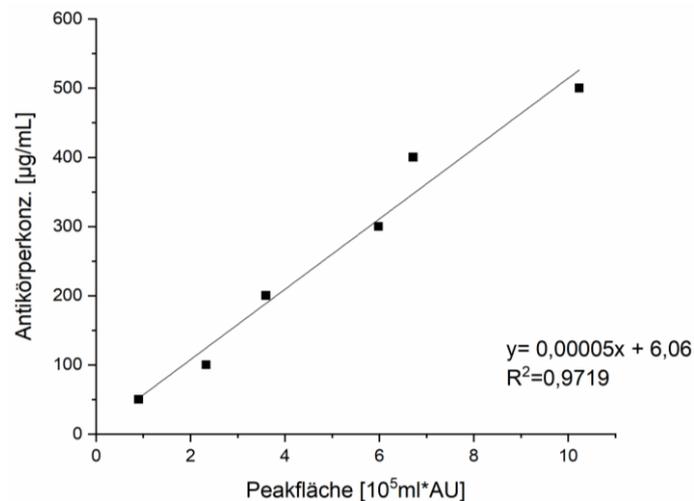


Abbildung 7.5: Kalibration der SEC-Methode an der HPLC.

Mit der Kalibrierkurve wurden die Nachweisgrenze (LOD) und die Bestimmungsgrenze (LOQ) mit Hilfe der folgenden Gleichungen berechnet:

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot \text{Standardabweichung der niedrigsten Konzentration}}{\text{Steigung der Kalibrationskurve}} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot \text{Standardabweichung der niedrigsten Konzentration}}{\text{Steigung der Kalibrationskurve}} \quad (2)$$

Die folgenden Grenzwerte dieser Messungen wurden aus der Kalibrierkurve bestimmt: Die LOD für den mAk betrug 0,005 g·L⁻¹ und die LOQ 0,016 g·L⁻¹. Falls erforderlich,

wurden die Proben in Äquilibrationpuffer verdünnt und dann durch eine 0,22 µm Celluloseacetat-Membran filtriert. Die Detektion erfolgte über einen Diodenarraydetektor bei 280 nm. Ein beispielhaftes Chromatogramm ist in Abbildung 7.6 gezeigt.

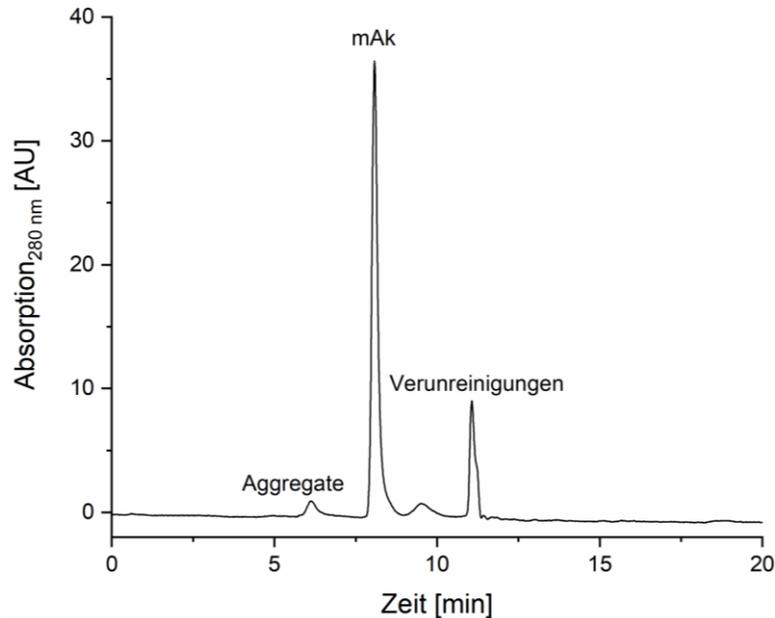


Abbildung 7.6: Chromatogramm einer SEC-Messung an der HPLC.

Zuerst eluierten die Aggregate des Antikörpers, mit einer Retentionszeit von etwa 7,5 min der Antikörper selbst und alle Peaks mit größeren Retentionszeiten stellen Verunreinigungen dar. Die Aggregatmenge wurde bestimmt, indem das Verhältnis des Aggregatpeaks zu allen Peakflächen berechnet wurde. Bei der Bestimmung der Reinheit des Antikörpers wurde hingegen das Verhältnis der Antikörperpeakfläche zu der Summe aller Peakflächen berechnet.

Nach der Konzentrationsbestimmung des mAks durch die SEC-Methode, konnte diese Angabe im Fall der Aufreinigungproben auf deren Volumen bezogen werden. So konnte die absolute Menge an mAk sowohl für die einzelnen Fraktionen als auch für die aufgereinigte Menge an mAk für einen Lauf an der FPLC bestimmt werden. Wurde die absolute Menge an aufgereinigtem mAk auf die zuvor aufgegeben Menge bezogen, ergab sich die Ausbeute des mAks nach einem Lauf an der FPLC. Die Berechnung ist im Folgenden für die Ausbeute eines CEX-Laufs erklärt: Gemäß des SEC enthielten zwei Elutionsfraktionen des CEX-Laufs mAk mit Konzentrationen von $624,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ bzw.

649,3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Da beide Fraktionen ein Volumen von 2 mL hatten, lag die absolute Antikörpermenge bei 1248,2 μg bzw. 1298,6 μg , was eine Gesamtmenge von 2546,8 μg ergibt. Dies entspricht einem Anteil der aufgetragenen Menge (3000 μg) und damit einer Ausbeute von 84,89 %.

B.4 Stabilitätstest des mAks

Um die Stabilität des mAks bei verschiedenen pH-Werten zu testen, wurde der mAk über eine Woche hinweg extremen Bedingungen, 50°C und einem pH-Bereich von 2,2 bis 8,7, ausgesetzt. Dabei wurden folgende pH-Werte eingestellt: 2,2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 8,7. Für dieses Experiment wurde eine gereinigte Antikörperlösung (nach Protein-A-Chromatographie, mAk-Konzentration 13 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) verwendet. Der Pufferaustausch wurde mit einer Umpufferungssäule HiPrep™ 26/10 (0,1 M Phosphat-Citrat-Puffer mit einem pH-Wert von 5) durchgeführt. Die Antikörperlösung wurde in 1 mL 0,1 M Phosphat-Citrat-Puffer auf eine Endkonzentration von 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ mit dem gewünschten pH-Wert verdünnt. Die Auswertung erfolgte über die SEC-HPLC-Messung. Ebenfalls wurde die Stabilität bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen betrachtet. Hierfür wurden zwei verschiedene pH-Bereiche betrachtet. Einmal ein neutraler pH-Bereich (pH 5, 6 und 7), jeder pH-Wert wurde mit 0; 0,5 und 1 M NaCl getestet. Es wurde dieselbe mAk-Lösung eingesetzt und dieselbe Versuchsdurchführung verwendet, wie beim Stabilitätstest zum pH-Wert. Zusätzlich wurde ein saurer pH-Bereich (pH 2,5; 3 und 4) mit denselben NaCl-Konzentrationen (0; 0,5 und 1 M) untersucht.

B.5 Zellabtrennung

Der Zellaufschluss wurde folgendermaßen in einem 5 mL Reaktionsgefäß durchgeführt: Zweimal je 1 min 100 %/ 0,6 Zyklus mittels Ultraschall. Hierbei wurde Zellkulturbrühe von Tag 12 einer Schüttelkolbenkultivierung verwendet.

B.5.1 Zentrifugation

1 L Zellkulturbrühe einer 50 L Kultivierung wurde in 250 mL Zentrifugengefäßen für eine Stunde bei 4700g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei der Aufreinigung des mAks weiterverwendet.

B.5.2 Tiefenfiltration

Bei der Tiefenfiltration wurden zwei Sartoclear MaxiCap® DL90 Filter (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE) mit einer Porengröße von $15 + 2 \mu\text{m}$ parallel geschaltet. Dahinter folgte zuerst ein in Reihe geschalteter Sartoclear MaxiCap® DL20 Filter (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE) mit einer geringeren Porengröße von $0,8 + 0,4 \mu\text{m}$, gefolgt von einem Sterilifilter (Sartopore 2 XLG, Porengröße $0,2 \mu\text{m}$, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE). Zwischen den jeweiligen Filtereinheiten wurde der Druck kontrolliert. Nach einem Vorspülen aller Filter mit 6 L PBS, wurden 4 L Zellkulturbrühe einer 50 L Kultivierung über alle Filter direkt in einen FlexBoy® Bag (Fassungsvolumen 10 L) filtriert. Nachdem bei den parallel geschalteten Filtereinheiten ein Druck von 1,5 bar hinter diesen erreicht wurde, wurde ein Nachspülen mit PBS gestartet.

B.5.3 Dynamic Body Feed

Bei der Dynamic Body Feed Filtration wurden 10 g befeuchtetes, γ -sterilisiertes Kieselgur mit 250 mL Zellkulturbrühe einer 50 L Kultivierung vermischt. Über einen Flaschenaufsatzfilter Sartolab® (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE) wurde dieses Gemisch anschließend filtriert.

B.6 FPLC

Die folgenden Angaben beziehen sich auf alle nachfolgenden Kapitel zu Messungen an der FPLC (Protein A, AEX, CEX, HIC): Alle chromatographischen Aufreinigungsschritte wurden mit einer kommerziellen FPLC-Anlage (ÄKTA™ pure von GE Healthcare, Chicago, IL, USA) durchgeführt. Alle verwendeten Puffer wurden über einen Cellulose-Acetat-Filter mit $0,22 \mu\text{m}$ Porengröße filtriert und im Ultraschallbad entgast. Nach dem Durchlauf einer Methode wurden alle erhaltenen Fraktionen von Durchfluss und Elution in wiederverwendbaren Deep-Well-Platten mit 96 Vertiefungen mittels eines automatischen Fraktionssammlers aufgefangen. Es wurde jeweils die Absorption bei 280 nm gemessen.

B.6.1 Protein A

Säule

Der erste chromatographische Aufreinigungsschritt des mAKs erfolgte über eine Protein A-Chromatographie, hierbei wurde Zellkulturüberstand (Kapitel B.1) eingesetzt. Für den Capture-Schritt wurde eine HiTrap™ Protein A HP (Säulenvolumen 1 mL, GE Healthcare, Chicago, USA) verwendet.

Der eingesetzte Zellkulturüberstand wurde über einen 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter filtriert. Die maximale Aufgabemenge betrug 17 mg über eine 10 oder 50 mL Proben- schleife. Das System wurde vollständig mit Äquilibriumspuffer gespült und die weiteren Schritte wie in Tabelle 7.11 durchgeführt.

Tabelle 7.11: Methode der Protein A-Chromatographie an der FPLC für die Säule.

| Schritt | Volumen | Flussrate [mL/min] | Puffer |
|--------------------------|-------------|-----------------------|--------------------|
| Spülen des Systems | Min. 15 mL | 5 | Äquilibriumspuffer |
| Äquilibriumierung | 5 CV | 1 | Äquilibriumspuffer |
| Probenaufgabe | Max. 17 mg | 1 | |
| Waschen | 10 CV | 1 | Äquilibriumspuffer |
| Elution | 5 CV 100% B | 1 | Elutionspuffer |
| Waschen | 10 CV | 1 | CIP-Puffer |
| Ggf. Reäquilibriumierung | 5 CV | 1 | Äquilibriumspuffer |
| Ggf. Lagerung | 5 CV | 1 | 20 % Ethanol |

Die Reinigung wurde über einen CIP-Puffer (Cleaning-in-Place) mit 0,1 M Tris und 0,5 M NaCl bei einem pH-Wert von 8,5 durchgeführt. Bei der Protein A-Methode der Säule wurde eine Optimierung des Äquilibriumspuffers, hinsichtlich des pH-Wertes und der NaCl-Konzentration durchgeführt. Dabei wurden jeweils 3 mL Antikörperlösung mit einer mAK-Konzentration von 0,5 mg·mL⁻¹ aufgegeben. Zuerst wurden folgende pH-Werte getestet: 2,5; 3; 3,5 und 4. Mit einem optimalen pH-Wert von 3,5 wurden anschließend folgende NaCl-Konzentrationen untersucht: 0, 50, 150, 300, 500 und

750 mM. Nach der Optimierung des Äquilibrierungspuffers folgte mit gleicher Durchführung die Optimierung des Elutionspuffers. Dabei wurden zuerst der pH-Wert (6; 6,5; 7; 7,5 und 8) und anschließend die NaCl-Konzentration (0, 50, 150, 300, 500 mM) variiert.

Als optimal ergaben sich für die Äquilibrierung 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7 mit 150 mM NaCl. Die Elution erfolgte sauer mit einer 0,1 M Citronensäure, bei einem pH-Wert von 2,5 und 150 mM NaCl. Die genaue Zusammensetzung des Puffers ist in Tabelle 7.4 angegeben.

Vergleich Säule/MA

Für den Vergleich zwischen Säule und Membranadsorber wurde ein Sartobind® Protein A MA (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE) mit einem MA-Volumen (MV) von 2 mL verwendet. Der Zellkulturüberstand (Kapitel B.1) wurde auf 1 g·L⁻¹ verdünnt und jeweils 2 mL auf die Säule oder den MA gegeben. Der eingesetzte Zellkulturüberstand wurde über einen 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter filtriert. Für die Äquilibrierung der Säule und des MA wurde PBS (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,24 g KH₂PO₄, 1,42 g Na₂HPO₄) mit einem pH-Wert von 7,4 verwendet. Die Durchführung und weiteren Puffer für die Säule entsprachen dem vorherigen Kapitel. Die Elution des MA erfolgte mit einem 0,1 M Citratphosphat-Puffer, bei einem pH-Wert von 3 und 300 mM NaCl. Die Reinigung wurde über einen CIP-Puffer mit 50 mM NaOH und 1 M NaCl durchgeführt. Die genaue Zusammensetzung der Puffer ist in Tabelle 7.4 angegeben. Das System wurde vollständig mit Äquilibrierungspuffer gespült und die weiteren Schritte für den MA wie in Tabelle 7.12 durchgeführt.

Tabelle 7.12: Methode der Protein A-Chromatographie an der FPLC für den MA.

| Schritt | Volumen | Flussrate [mL/min] | Puffer |
|--------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|
| Spülen des Systems | Min. 15 mL | 5 | Äquilibrierungspuffer |
| Äquilibrierung | 5 MV | 5 | Äquilibrierungspuffer |
| Probenaufgabe | 2 mL | 5 | |
| Waschen | 10 MV | 5 | Äquilibrierungspuffer |
| Elution | 5 MV 100% B | 5 | Elutionspuffer |
| CIP | 5 MV | 5 | CIP-Puffer |

| | | | |
|----------------------|------|---|---------------------|
| Ggf. Reäquilibration | 5 MV | 5 | Äquilibrationpuffer |
|----------------------|------|---|---------------------|

Durchbruchskurven Säule/MA

Die FPLC wurde zur Aufnahme der Protein-Durchbruchskurven verwendet. Für beide Anwendungen (Säule und MA) wurde der Antikörperüberstand auf eine Konzentration von $360 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ verdünnt. Als Äquilibrationpuffer wurde PBS auf einen pH-Wert von 7,4 und als Elutionspuffer 0,1 M Zitronensäure mit 150 mM NaCl auf einen pH-Wert von 3,5 eingestellt. Die Messung wurde gestoppt, wenn die Höhe des UV-Signals vor der Säule (oder des MA) gleich dem UV-Signal hinter der Säule (oder dem MA) war. Die Gesamtprobeninjektion betrug 130 mL für die Säule und 100 mL für den MA. Es wurden Flussraten von $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ für die Säule und $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ für den MA verwendet. Ebenfalls wurde über die Dauer der Durchbruchskurve mittels SEC-HPLC-Messung die mAk-Konzentration bestimmt. Außerdem wurde anhand der Durchbruchskurven sowohl die statische als auch die dynamische Bindungskapazität für beide Systeme berechnet.

B.6.2 Polishing-Schritte

Für die Polishing-Schritte (AEX, CEX, HIC) gilt folgendes: Bei der Optimierung der Puffer für die jeweilige Säule wurde eine über Protein A-Chromatographie aufgereinigte Antikörperlösung verwendet, deren mAk-Konzentration $0,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ betrug. Alle verwendeten Proben wurden über einen $0,45 \mu\text{m}$ Spitzenvorsatzfilter filtriert und über eine 10 mL Probenschleife aufgegeben.

B.6.3 AEX

Nach der Protein A Chromatographie folgt ein Polishing-Schritt bei der Aufreinigung von mAk, in diesem Fall eine AEX. Es wurde eine HiTrap Q HP Säule (Säulenvolumen 1 mL, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) im Flow-trough-Modus verwendet. Das System wurde vollständig mit Äquilibrationpuffer gespült und die weiteren Schritte wie in Tabelle 7.13 durchgeführt.

Tabelle 7.13: Methode der AEX an der FPLC.

| Schritt | Volumen | Flussrate [mL/min] | Puffer |
|----------------------|----------------------------------|-----------------------|---------------------|
| Spülen des Systems | Min. 15 mL | 5 | Äquilibrationpuffer |
| Äquilibration | 5 CV | 1 | Äquilibrationpuffer |
| Probenaufgabe | 3 mL | 1 | |
| Waschen | 5 CV | 1 | Äquilibrationpuffer |
| Elution | Gradient über 10 CV auf 50% B | 1 | Elutionspuffer |
| CIP | 5 CV, 100 % B | 1 | Elutionspuffer |
| Ggf. Reäquilibration | 5 CV | 1 | Äquilibrationpuffer |
| Ggf. Lagerung | 5 CV | 1 | 20 % Ethanol |

Die Reinigung (CIP-Puffer) erfolgte über den 1 M NaCl-Elutionspuffer. Zuerst wurde eine Optimierung durchgeführt und folgende Bedingungen getestet: pH 6,5 (Bis-Tris-Puffer), pH 7,5 und 8,5 (Tris-Puffer) sowie pH 9,5 und 10 (Ethanolamin). Diese wurden jeweils als 20 mM Äquilibrationpuffer eingesetzt und die Peakfläche des Antikörpers bestimmt. Pro Durchlauf wurden 3 mL Antikörperlösung aufgegeben. Der Elutionspuffer entsprach dabei dem Äquilibrationpuffer mit 1 M NaCl. Nach der pH-Wert-Optimierung wurden unterschiedliche NaCl-Konzentrationen (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 M NaCl) getestet. Die Durchführung blieb die gleiche, wie bei der Optimierung des pH-Wertes. Für die Äquilibration wurden als optimal 20 mM bis-Tris-Puffer, pH 6,5 mit 0,4 M NaCl verwendet.

B.6.4 CEX

Nach der Protein A Chromatographie folgt ein Polishing-Schritt bei der Aufreinigung von mAk, in diesem Fall eine CEX. Es wurde eine HiTrap SP HP Säule (Säulenvolumen 1 mL, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) im Bind-and-elute-Modus verwendet. Das System wurde vollständig mit Äquilibrationpuffer gespült und die weiteren Schritte wie in Tabelle 7.14 durchgeführt.

Tabelle 7.14: Methode der CEX an der FPLC.

| Schritt | Volumen | Flussrate [mL/min] | Puffer |
|----------------------|----------------------------------|-----------------------|---------------------|
| Spülen des Systems | Min. 15 mL | 5 | Äquilibrationpuffer |
| Äquilibration | 5 CV | 1 | Äquilibrationpuffer |
| Probenaufgabe | 3 mL | 1 | |
| Waschen | 5 CV | 1 | Äquilibrationpuffer |
| Elution | Gradient über 10 CV auf 50% B | 1 | Elutionspuffer |
| CIP | 5 CV, 100 % B | 1 | Elutionspuffer |
| Ggf. Reäquilibration | 5 CV | 1 | Äquilibrationpuffer |
| Ggf. Lagerung | 5 CV | 1 | 20 % Ethanol |

Der CIP-Schritt erfolgte über den Äquilibrationpuffer versetzt mit 1 M NaCl. Zuerst wurde eine Optimierung durchgeführt und folgende Bedingungen getestet: pH 6 und 6,5 (MES-Puffer), pH 7 und 8 (HEPES-Puffer) sowie pH 9 (Bicin-Puffer). Diese wurden jeweils als 50 mM Äquilibrationpuffer eingesetzt und die Peakfläche des Antikörpers bestimmt. Pro Durchlauf wurden 3 mL Antikörperlösung aufgegeben. Der Elutionspuffer entsprach dabei dem Äquilibrationpuffer mit 1 M NaCl. Nach der pH-Wert-Optimierung wurden unterschiedliche NaCl-Konzentrationen (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 M NaCl) getestet. Hierbei wurden 3 mL Antikörperlösung mit einer Konzentration von $0,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ aufgegeben. Für eine optimale Äquilibration wurden 50 mM MES-Puffer, pH 6,5 ohne Zugabe von NaCl verwendet.

B.6.5 HIC

Nach der Protein A Chromatographie folgt ein Polishing-Schritt bei der Aufreinigung von mAk, in diesem Fall eine HIC. Es wurde eine HiScreen Phenyl HP Säule (Säulenvolumen 4,7 mL, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) im Bind-and-elute-Modus verwendet. Das System wurde vollständig mit Äquilibrationpuffer gespült und die weiteren Schritte wie in Tabelle 7.15 durchgeführt.

Tabelle 7.15: Methode der HIC an der FPLC.

| Schritt | Volumen | Flussrate [mL/min] | Puffer |
|----------------------|-----------------------------------|-----------------------|---------------------|
| Spülen des Systems | Min. 15 mL | 5 | Äquilibrationpuffer |
| Äquilibration | 10 CV | 0,6 | Äquilibrationpuffer |
| Probenaufgabe | 2 mL | 0,6 | |
| Waschen | 5 CV | 0,6 | Äquilibrationpuffer |
| Elution | Gradient über 20 CV auf 100% B | 0,6 | Elutionspuffer |
| Waschen | 5 CV, 100 % B | 0,6 | Elutionspuffer |
| CIP | 4 CV | 0,6 | 1 M NaOH |
| Ggf. Reäquilibration | 5 CV | 0,6 | Äquilibrationpuffer |
| Ggf. Lagerung | 5 CV | 0,6 | 20 % Ethanol |

Die Reinigung erfolgte über den 1 M NaOH-CIP-Puffer. Es wurden verschiedene Salze für den Äquilibrationpuffer untersucht: 2,6 M Natriumchlorid, 0,5 und 1 M Natriumsulfat und 1 M Ammoniumsulfat, welche jeweils in einem 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7, gelöst wurden. Es wurden jeweils 3 mL Antikörperlösung aufgegeben. Anschließend wurde die Konzentrationszugabe des optimalen Salzes, Ammoniumsulfat, getestet. Dabei wurden folgende Konzentrationen des Ammoniumsulfats eingesetzt: 0,5; 1; 1,5 und 1,7 M. Für eine optimale Äquilibration wurden 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7 mit 1,5 M Ammoniumsulfat verwendet.

B.6.6 Hintereinanderschaltung der Polishing-Schritte

Für die Hintereinanderschaltung der einzelnen Polishing-Schritte wurden die sechs möglichen Kombinationen zweier Schritte durchgeführt (AEX-CEX, AEX-HIC, CEX-AEX, CEX-HIC, HIC-AEX, HIC-CEX). Es wurden die jeweils zuvor optimierten Puffer für die einzelnen Säulen eingesetzt. Da sich diese in ihrer Zusammensetzung unterscheiden, wurde jeweils zwischen den einzelnen Schritten eine Umpufferung mittels Umpufferungssäule (HiPrep 26/10 Desalting, GE Healthcare Life Sciences, SE) durchgeführt. Auf die erste Säule wurde jeweils 1,8 mL einer bereits durch Protein A-Chromatogra-

phie gereinigten Antikörperlösung mit einer mAk-Konzentration von $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ aufgegeben. Über die FLPC wurde, außer bei den Kombinationen AEX-CEX und HIC-CEX, der Antikörperpeak der ersten Methode direkt auf die Umpufferungssäule gegeben und mit dem jeweiligen Äquilibriumspuffer der nächsten Säule eluiert. Da bereits geringe Salzkonzentrationen die Durchführung der CEX störten, wurde die Aufgabe des Antikörperpeaks hierbei manuell auf die Umpufferungssäule durchgeführt. Bei allen Durchläufen musste nach der Umpufferungssäule der Antikörperpeak manuell auf die zweite Säule aufgegeben werden.

B.7 Immunoenzymatischer Assay für den Nachweis von CHO HCPs

Für den Nachweis und die Quantifizierung von CHO Wirtszellproteinen wurde ein ELISA-Test von Cygnus Technologies, USA verwendet [150]. Dabei wurden $100 \mu\text{L}$ des anti-CHO-HRP-Reagenzes mit jeweils $50 \mu\text{L}$ der bereitgestellten Standardkonzentrationen, der Kontrolle oder der Probe in Doppelbestimmung in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Microtiterplatte wurde abgedeckt und für 2 h Stunden, bei Raumtemperatur ($24^\circ\text{C} \pm 4^\circ\text{C}$) und 400 rpm inkubiert. Das anti-CHO-HRP-Reagenz sollte an den Wellböden adsorbiert und die Probe gebunden haben, Restflüssigkeit wird entfernt. Es folgen drei Waschschritte mit je $350 \mu\text{L}$ Waschpuffer. Anschließend wurden $100 \mu\text{L}$ TMB-Substrat zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur, allerdings ohne Schütteln, inkubiert. Durch die Zugabe von $100 \mu\text{L}$ Stopp-Lösung wurde die Reaktion beendet. Der resultierende Farbumschlag von Blau zu Gelb konnte bei Anwesenheit von Wirtszellproteinen beobachtet werden. Es erfolgte eine Absorptionsbestimmung bei 450 nm.

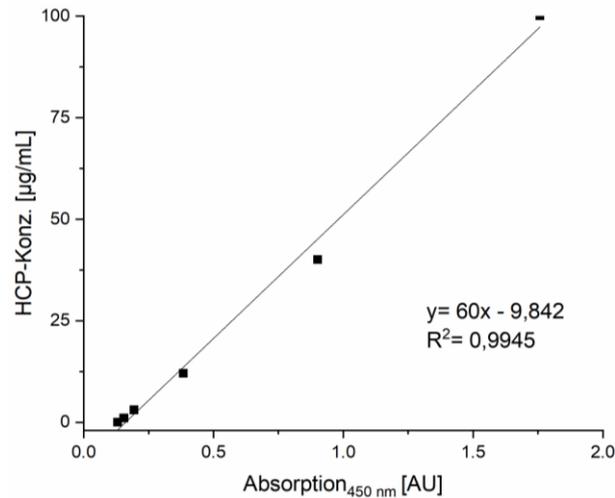


Abbildung 7.7: Kalibration des immunoenzymatischen Assays für den Nachweis von CHO HCPs.

B.8 Bioaktivitätsassay

B.8.1 Revitalisierung

Die L929-Zellen wurden einem Kryotank entnommen und im Wasserbad bei 37°C durch Schwenken aufgetaut. Die Suspension der aufgetauten Zellen wurde anschließend in eine T175-Zellkulturflasche überführt, in die zuvor erwärmte 24 mL Zellkulturmedium gefüllt worden sind. Über Nacht wurden die Zellen bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und am Folgetag ihr Anwachsen am Flaschenboden überprüft. Haben sich viele tote Zellen im Medium befunden, die nicht adhärirt sind, so wurde das Medium gewechselt.

B.8.2 Passagieren und Bestimmung der Zellzahl

Bevor es zum Überwachsen der Zellen kam, wurde eine Passage der Zellen vorgenommen. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 10 mL PBS gewaschen. Um die adhärirten Zellen zu lösen, wurden 4 mL Trypsin-Lösung hinzugegeben und bei 37°C und 5 % CO₂ für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Wirksamkeit des Trypsins durch Zugabe von 4 mL Zellkulturmedium gestoppt. Die komplette Flüssigkeit wurde in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 300 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 3 mL Zellkulturmedium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µL dieser Suspension mit 20 µL

Trypanblau gemischt. Mittels Neubauerzählkammer wurden die lebenden und die toten Zellen gezählt. Es wurden 3000 Zellen·cm² für eine neue Flasche passagiert.

B.8.3 Durchführung des Bioaktivitätsassay

Zur Durchführung des Bioaktivitätsassays wurden die L929-Zellen in eine 96-Well-Platten mit flachem Boden überführt. Dabei wurden zum Animpfen 30.000 Zellen pro Well in Vollmedium (Zusammensetzung Tabelle 7.4) verwendet. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ für 24 h in Vollmedium. Anschließend wurden die Zellen für 2 h (37°C, 5 % CO₂) mit 1 µg·mL⁻¹ Actinomycin D in DMEM-Basalmedium sensibilisiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, bevor die zu untersuchende Probe auf die Zellen gegeben worden ist. Die Messungen für die jeweiligen Proben wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Bei der Antigenkonzentrationsreihe wurden folgende Konzentrationen von TNF-α in DMEM-Basalmedium verdünnt und aufgegeben: 1000; 100; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001 und 0,0001 ng·mL⁻¹.

Bei der Aufnahme der Dosis-Wirkungs-Kurve wurde 1 ng·mL⁻¹ TNF-α mit den folgenden Konzentrationen des mAKs oder des Medikaments in DMEM-Basalmedium vermischt: 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 und 1000 ng·mL⁻¹.

Beim Vermessen der Antikörper-Proben wurden diese so in DMEM-Basalmedium verdünnt, dass die Antikörper in den Konzentrationen von 4,7 (EC₂₀) und 41,4 ng·mL⁻¹ (EC₈₀) vorlagen. Ebenfalls wurden diese mit 1 ng·mL⁻¹ TNF-α vermischt und dann auf die Zellen gegeben.

Alle Proben wurden für 24 h (37°C, 5 % CO₂) inkubiert. Als letzter Schritt folgte der CTB-Assay, um die Zellviabilität zu bestimmen. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und anschließend 100 µL CTB-Medium hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 1,5 h (37°C, 5 % CO₂) wurde die 96-Well-Platte bei 590 nm vermessen.

B.8.4 Mikroskopie

Die Auswirkung des Actinomycin D wurde mittels mikroskopischer Aufnahme der Zellen analysiert. Dafür wurde ein Imaging-Lesegerät Cytation 5 mit integriertem Mikroskop verwendet. Es wurden Phasenkontrastbilder in 4-facher und 20-facher Vergrößerung einzelner Wells erstellt. Der Maßstab wurde mit Hilfe der Analysesoftware Gen5 aufgebracht.

B.8.5 Berechnung der mittleren effektiven Konzentration

Um die halbmaximale effektive Konzentration des Antigens (IC_{50}) und des Antikörpers (EC_{50}) zu bestimmen, wurden die logarithmischen Konzentrationskurven (Antigenkonzentrationskurve sowie Dosis-Wirkungs-Kurve) verwendet. IC_{50} bezeichnet hierbei die halbmaximale Inhibitorkonzentration. Mittels Quest Graph™ IC_{50} Calculator von AAT Bioquest Inc. wurde anhand dieser Rohdaten eine sigmoidale Trendlinie erstellt. Als Grundlage diente ein symmetrisches logistisches Regressionsmodell mit vier Parametern. Diese vier Parameter sind in der Schlüsselgleichung wieder zu finden [151]:

$$Y = Min + \frac{Max - Min}{1 + \left(\frac{X}{EC_{50}}\right)^H} \quad (6)$$

Dabei sind Min und Max die minimale sowie die maximale Antwort als untere und obere Symptote. X und Y sind die gemessenen Werte, mit denen H (der Hill-Koeffizient) anhand der Trendlinie bestimmt wurde. Der Hill-Koeffizient ist bei der Inhibierung (IC_{50}) auf Grund der sinkenden Steigung positiv. Wohingegen er bei der EC_{50} aus Grund der steigenden Kurve negativ ist.

Ist die halbmaximale effektive Dosis berechnet (EC_{50}), können aus diesem Wert weitere effektive Konzentrationen nach folgender Formel berechnet werden [152]:

$$EC_F = \left(\frac{100 - F}{F}\right)^{\frac{1}{H}} \cdot EC_{50} \quad (7)$$

Dabei ist F die prozentuale Dosis, H der Hill-Koeffizient und EC_{50} die zuvor bestimmte halbmaximale effektive Konzentration. Der Hill-Koeffizient entspricht hierbei der Steigung der sigmoidalen Kurve. Für die Bestimmung der EC_{20} ergab sich beispielsweise folgende Rechnung:

$$EC_{20} = \left(\frac{100 - 20}{20} \right)^{\frac{1}{-1,28}} \cdot 14,003 \frac{ng}{mL} = 4^{-0,7813} \cdot 14,004 \frac{ng}{mL} = 4,74 \frac{ng}{mL}$$

In diesem Fall betrug die 20 %-ige effektive Dosis $4,74 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Dies bedeutet, dass 20 % mehr Zellen beim Einsatz dieser Konzentration des mAks viabel sein sollten als ohne Zugabe des Medikaments beziehungsweise, dass 20 % der maximalen Antwort erreicht werden sollten. Dementsprechend kann auch die EC_{80} -Konzentration des Antikörpers bestimmt werden.

8 Publikationsliste

Fachartikel

- **Alina Gonzalez Salcedo** (45 %), Carlotta Kortmann, Dörte Solle, Janina Bahnemann, Thomas Scheper: Assessing the bioactivity of a monoclonal antibody as a function of various process conditions, in Vorbereitung
- Taieb Habib, Chantal Brämer, **Alina Gonzalez Salcedo** (5 %), Jan Ebbecke, Sascha Beutel, Thomas Scheper, Janina Bahnemann: 3D-printed microfluidic platform for protein purification in preparative chromatography, in Vorbereitung
- Katharina V. Meyer, Ina G. Siller, Jana Schellenberg, **Alina Gonzalez Salcedo** (5 %), Dörte Solle, Jens Matuszczyk, Thomas Scheper, Janina Bahnemann: Monitoring cell productivity for the production of recombinant proteins by flow cytometry: an effective application using the cold capture assay, in Vorbereitung
- Tamanna Nagraik, **Alina Gonzalez Salcedo** (10 %), Dörte Solle, Thomas Scheper: Process Optimization using High Throughput Automated Micro-bioreactors in CHO cultivation. *Journal of Visualized Experiments* (Issue 159), 2020
- Chantal Brämer, Lisa Tünnermann, **Alina Gonzalez Salcedo** (10 %), Oscar-Werner Reif, Dörte Solle, Thomas Scheper, Sascha Beutel: Membrane adsorber for the fast purification of a monoclonal antibody using Protein A chromatography. *Membranes* (Vol. 9, Issue 12, 159) 2019.

Vorträge

- **Alina Mehl** (90 %), Dörte Solle, Thomas Scheper: Product purification and product analysis in mammalian cell cultivation. 14th PhD Seminar on Chromatographic Separation Science, Burghausen 2018

Posterbeiträge

- **Alina Mehl** (90 %), Dörte Solle, Janina Bahnemann, Thomas Scheper: Produktaufreinigung und Produktanalytik in der Tierzellkultivierung. ProcessNet-Jahrestagung und 33. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen 2018, Aachen.

9 Unterstützende Arbeiten

Mitarbeit an Experimenten

An einigen praktischen Experimenten waren neben der Autorin der vorliegenden Arbeit auch folgende Personen beteiligt:

- Kapitel 4.1.3 + 4.2.4: Gemeinsame experimentelle Durchführung der Versuche zur Antikörperstabilität und zum Vergleich der Säule mit dem Membranadsorber mit Dr. Chantal Brämer
- Kapitel 4.2.1: Gemeinsame experimentelle Durchführung der Tiefenfiltration mit Martin Saballus (Sartorius Stedim Biotech GmbH)

Betreute Arbeiten

Im Rahmen der Promotion wurden folgende Abschlussarbeiten von mir geplant und betreut:

- Pia Pascale Peppermüller: Aufreinigung und Analytik eines monoklonalen Antikörpers. Bachelorarbeit im Fach Life Science, Januar – März 2018. Teilergebnisse in Kapitel 4.1.1
- Lea Zurborg: Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers und vergleichende Analytik mittels Protein A- und Größenausschlusschromatographie. Bachelorarbeit im Fach Biochemie, April – Juni 2018. Teilergebnisse in Kapitel 4.1.1 und 4.1.2
- Carlotta Kortmann: Polishing-Schritte bei der Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers und dessen Qualitätskontrollen. Masterarbeit im Fach Life Science, April - Oktober 2019. Teilergebnisse in Kapitel 4.2.5 und 4.3
- Victoria Lynn Heibel: Optimierung der Kombination verschiedener Polishing-Schritte bei der Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers. Bachelorarbeit im Fach Life Science, Februar 2020 – Juni 2020. Teilergebnisse in Kapitel 4.2.5.4 und 4.3.5

10 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau eines IgG-Antikörpers..... | 5 |
| Abbildung 3.2: Schematische Darstellung zur Gewinnung eines mAk..... | 11 |
| Abbildung 3.3: Molekulare Kaskade der Apoptose, ausgelöst durch TNF- α , welches an TNFR-1 bindet..... | 14 |
| Abbildung 4.1: Proteinzusammensetzung einer 2 L CHO-Kultivierung zur Produktion eines mAk..... | 17 |
| Abbildung 4.2: Contour-Plots der Optimierung des Elutionspuffers mittels DoE..... | 20 |
| Abbildung 4.3: Ermittelte Antikörperpeakflächen an der HPLC mittels Protein A-Chromatographie aufgetragen gegen die NaCl-Konzentration des Elutionspuffers..... | 21 |
| Abbildung 4.4: Contour-Plots der Optimierung des Äquilibrierungspuffers mittels DoE..... | 23 |
| Abbildung 4.5: Antikörperkonzentration einer 2 L Kultivierung mittels Protein A- und SEC-Säule, aufgetragen über die Dauer der Kultivierung..... | 25 |
| Abbildung 4.6: SEC-HPLC-Ergebnisse nach Inkubation des mAks bei 50°C für eine Woche bei verschiedenen pH-Werten, von 2,2 bis 8,7..... | 27 |
| Abbildung 4.7: SEC-HPLC-Ergebnisse nach Inkubation des mAks bei 50°C für eine Woche bei den pH-Werten von 5 bis 7, sowie verschiedenen NaCl-Konzentrationen..... | 29 |
| Abbildung 4.8: Aufbau der Tiefenfiltration..... | 33 |
| Abbildung 4.9: Flächen der an der FPLC mittels Protein A-Chromatographie ermittelten Antikörperpeaks aufgetragen gegen den pH-Wert des Elutionspuffers..... | 37 |
| Abbildung 4.10: Flächen der an der FPLC mittels Protein A-Chromatographie ermittelten Antikörperpeaks aufgetragen gegen die NaCl-Konzentration des Elutionspuffers..... | 38 |
| Abbildung 4.11: Flächen an der FPLC mittels Protein A-Chromatographie der ermittelten Antikörperpeaks aufgetragen gegen den pH-Wert des Äquilibrierungspuffers..... | 39 |
| Abbildung 4.12: Flächen an der FPLC mittels Protein A-Chromatographie der ermittelten Antikörperpeaks aufgetragen gegen die NaCl-Konzentration des Äquilibrierungspuffers..... | 40 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 4.13: Typisches Chromatogramm der Protein A-Methode bei der Aufreinigung des mAks. | 41 |
| Abbildung 4.14: Protein A-Chromatogramme der Säule und des MA. A: Säule. B: MA. | 44 |
| Abbildung 4.15: Durchbruchskurve für die Säule und den MA. | 46 |
| Abbildung 4.16: Einfluss des pH-Wertes auf die Peakfläche und den Modus bei der AEX an der FPLC [118]..... | 52 |
| Abbildung 4.17: Einfluss der NaCl-Konzentration auf die Peakfläche bei der AEX an der FPLC [118]..... | 54 |
| Abbildung 4.18: Chromatogramm der AEX-Methode bei der Aufreinigung des mAks (modifiziert nach [118])...... | 55 |
| Abbildung 4.19: Einfluss des pH-Wertes auf die Peakfläche und den Modus bei der CEX an der FPLC [118]..... | 56 |
| Abbildung 4.20: Einfluss der NaCl-Konzentration auf die Peakfläche und den Modus bei der CEX an der FPLC [118]. | 57 |
| Abbildung 4.21: Chromatogramm der CEX-Methode bei der Aufreinigung des mAks (modifiziert nach [118])...... | 58 |
| Abbildung 4.22: Einfluss des Salzes auf die Peakfläche und den Modus bei der HIC an der FPLC [118]..... | 60 |
| Abbildung 4.23: Einfluss der Ammoniumsulfatkonzentration auf die Peakfläche und den Modus bei der HIC an der FPLC [118]. | 61 |
| Abbildung 4.24: Chromatogramm der HIC-Methode bei der Aufreinigung des mAks [118]..... | 62 |
| Abbildung 4.25: Konzentration der HCPs während der Aufreinigung des mAks..... | 66 |
| Abbildung 4.26: Ablauf des Bioaktivitätsassay..... | 70 |
| Abbildung 4.27: Mikroskopie-Aufnahmen von L929-Zellen in 4-facher Vergrößerung nach 36 h Inkubation. | 73 |
| Abbildung 4.28: Dosis-Wirkungs-Kurve des Antigens (modifiziert nach [118])..... | 74 |
| Abbildung 4.29: Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurve zwischen dem über Protein A-Chromatographie aufgereinigten Antikörper und dem kommerziell erworbenen mAk (Medikament) [118]. | 76 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 4.30: Bioaktivität des mAks nach den verschiedenen Aufreinigungsschritten bei Zugabe von $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TNF- α , zusammen mit den EC ₂₀ - und EC ₈₀ -Konzentrationen des Medikaments [118]. | 78 |
| Abbildung 7.1: SEC-HPLC-Ergebnisse nach Inkubation des mAks bei 50°C für eine Woche bei den pH-Werten von 2,5 bis 4, sowie verschiedenen NaCl-Konzentrationen. | 99 |
| Abbildung 7.2: Chromatogramm der AEX-Methode bei der Aufreinigung des mAks vor der Salz-Optimierung. | 99 |
| Abbildung 7.3: Zellviabilitäten nach verschiedenen Aufreinigungsschritte inklusive der Hintereinanderschaltung der Polishing-Schritte. | 100 |
| Abbildung 7.4: Kalibration der Protein A-Methode an der HPLC. | 113 |
| Abbildung 7.5: Kalibration der SEC-Methode an der HPLC. | 114 |
| Abbildung 7.6: Chromatogramm einer SEC-Messung an der HPLC. | 115 |
| Abbildung 7.7: Kalibration des immunoenzymatischen Assays für den Nachweis von CHO HCPs. | 125 |

11 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Tabelle 3.1: Therapeutische Anti-TNF- α -Antikörper, die bereits auf dem Markt sind. .9 | 9 |
| Tabelle 4.1: Ergebnisse des Zellabtrennungsvergleichs mittels Tiefenfiltration, Dynamic Body Filtration und Zentrifugation. 34 | 34 |
| Tabelle 4.2: HPLC-SEC Ergebnisse des Vergleiches zwischen Protein A-Säule und -MA. 45 | 45 |
| Tabelle 4.3: Dynamische und statische Bindungskapazitäten von Säule und MA..... 48 | 48 |
| Tabelle 4.4: Zusammenfassender Vergleich der Säule und des MA..... 50 | 50 |
| Tabelle 4.5: Ausbeute und Reinheit des mAKs nach der Durchführung einzelner oder zweier hintereinander geschalteter Polishing-Schritte. 64 | 64 |
| Tabelle 4.6: HCP-Konzentration der verschiedenen Aufreinigungsschritte pro mg mAK. 67 | 67 |
| Tabelle 7.1: Verwendete Chemikalien und Antibiotika.101 | 101 |
| Tabelle 7.2: Verwendete Kits.102 | 102 |
| Tabelle 7.3: Verwendete Medien und weitere Lösungen.....103 | 103 |
| Tabelle 7.4: Verwendete Puffer104 | 104 |
| Tabelle 7.5: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....105 | 105 |
| Tabelle 7.6: Verwendete Geräte.....106 | 106 |
| Tabelle 7.7: Verwendete Säulen/MA.....108 | 108 |
| Tabelle 7.8: Verwendete Software.109 | 109 |
| Tabelle 7.9: Durchführung des DoE für den Elutionspuffer der Protein A-Säule.112 | 112 |
| Tabelle 7.10: Durchführung des DoE für den Äquilibrierungspuffer der Protein A-Säule.113 | 113 |
| Tabelle 7.11: Methode der Protein A-Chromatographie an der FPLC für die Säule...118 | 118 |
| Tabelle 7.12: Methode der Protein A-Chromatographie an der FPLC für den MA.....119 | 119 |
| Tabelle 7.13: Methode der AEX an der FPLC.....121 | 121 |
| Tabelle 7.14: Methode der CEX an der FPLC.....122 | 122 |
| Tabelle 7.15: Methode der HIC an der FPLC.....123 | 123 |

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Alina Gonzalez Salcedo, geb. Mehl

Geburtsdatum/-ort 03.08.1991, Hannover

Akademischer Werdegang

07/2017-07/2020 Promotion, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover
Stipendiatin des Programms "New Concepts in Chemical Engineering"
Thema der Doktorarbeit: Produktaufreinigung und Produktanalytik in der Tierzellkultivierung

10/2014-06/2017 Masterstudium, M. Sc. im Fach Life Science, Leibniz Universität Hannover
Thema der Masterarbeit: Modellsystem zur Testung des Umsatzverhaltens immobilisierter Enzyme

10/2010-11/2013 Bachelorstudium, B.Sc. im Fach Life Science, Leibniz Universität Hannover
Thema der Bachelorarbeit: Aptamer-basierter Microarray zur Detektion von Ethanolamin

2003-2010 Allgemeine Hochschulreife, Johannes-Kepler-Gymnasium, Garbsen

Berufliche Erfahrungen

07/2017-07/2020 Promotionsstudentin, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover

11/2016-03/2017 Internationales Forschungspraktikum, Department of Biotechnology and Chemical Technology, Aalto-Universität, Helsinki, Finnland

01/2016-04/2016 Studentische Hilfskraft, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover

10/2015-11/2015 Studienbegleitendes Praktikum, Institut für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover

05/2013-06/2013 Praktikumsbetreuung, „Organische Chemie für den Studiengang Gartenbau“, Leibniz Universität Hannover