

# Säulenmaterialien in der Biochromatographie

## Welche Alternativen gibt es zu Protein A Trägern im Capture Schritt?

### Am Beispiel der Aufreinigung von therapeutischen monoklonalen Antikörpern (Mabs)



**Dietmar Hartmann**

Langjährige Tätigkeit im Process Development für Sanofi, Dozent für Bioanalytik und Biochromatographie für Provalidis NOVIA

Antikörper (Abbildung 1) gehören zur Proteingruppe der Immunglobuline (Ig) und sind Bestandteile des Immunsystems. Köhler und Milstein fanden 1975 eine Möglichkeit, unbegrenzte Mengen identischer Antikörpermoleküle herzustellen für die sie 1984 den Nobelpreis für Medizin erhielten.

*(Köhler, G. & Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. In: Nature. Bd. 256, S. 495–497)*

Antikörper dienen der Erkennung fremder Strukturen (Antigene) im Körper und markieren sie für das Immunsystem. Antigene sind z.B. molekulare Strukturen auf der Oberfläche von Körperzellen, Bakterien oder Viren.

1990 gelang es, die Zielgenauigkeit monoklonaler Antikörper auch in der Therapie zu nutzen. Therapeutische Antikörper können spezifisch an bestimmte Moleküle binden und dadurch deren krankheitsauslösende Wirkung blockieren, d.h. krankheitsverursachende Antigen-Strukturen werden gefunden und zerstört. Hauptanwendungsgebiete in der medizinischen Indikation ist die Therapie gegen Autoimmunerkrankungen, Krebs und hochspezifische „Transporter“ für Toxine in der Chemotherapie.

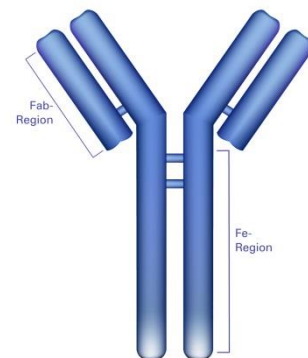


Abbildung 1

Was Indikationen und Umsatzzahlen betrifft, verzeichnen therapeutische monoklonale Antikörper (Mabs), laut Ärztezeitung die stärksten Zuwachsraten unter allen medizinischen Innovationen.

Zunehmende Bedeutung finden auch Fabs bzw. Antikörperfragmente (Abbildung 1)

In dem ersten chromatographischen Aufreinigungsschritt für monoklonale Antikörper, dem sogenannten Capture Step, findet in den meisten Fällen die Affinitätschromatographie (Protein A Träger) ihre Anwendung. Die Vorteile von diesem Plattformprozess liegen klar auf der Hand, Hier werden bereits im ersten Aufreinigungsschritt Ausbeuten von >90% erreicht. Ein weiterer Vorteil ist eine Volumenreduktion des feedstocks auf das ca. 1,5fache des eingesetzten Säulenvolumens (CV) und eine wesentliche Abreicherung des Zellkulturmediums. Da der Einsatz von Protein A-Trägern im Capture Step sehr kostenintensiv ist, lohnt es sich immer über geeignete Alternativen nach zudenken.

Im Rahmen eines Workshops anlässlich der HPLC-Tage in Bad Soden am Taunus im November 2013 wurden verschiedene Alternativen rege diskutiert.

Im Vordergrund der Überlegungen sollte immer eine Kosten/Nutzen Rechnung stehen und sich frühzeitig mit der Thematik, „WAS und WIE bzw. mit WELCHER Qualität will oder muss ich mein Produkt aufreinigen?“ -, auseinandersetzen.

Ebenso sinnvoll ist es, zu wissen mit welcher Methode ich im 2. Aufreinigungsschritt (intermediate step) arbeiten will, umso mein Eluat aus dem Capture Step als Auftrag (Load) für den intermediate step optimal „vorzubereiten“. So lassen sich aufwendige Umpufferungen, Entsalzungen oder pH-Shifts vermeiden.

Als mögliche Alternative könnte der Einsatz von Kationenaustauschern (CIEX) kommen, zum Beispiel Capto MMC oder Capto S sind unempfindlich gegen hohe Leitfähigkeiten (bis ca. 15mS). Rein theoretisch funktioniert Capto MMC mit E.coli Feeds und Capto S mit Zellkulturüberständen am besten. Nuvia S als starker Kationenaustauscher könnte zum Einsatz kommen, wenn hohe dynamische Beladungskapazitäten gefragt sind. Für die Aufreinigung von Proteinen und feedstocks mit hoher Leitfähigkeit lohnt es sich Toyopearl MX Trp-650-M als Multimodal CIEX zu testen.

Auf Anionenaustauscher (AIEX) sollte man im capture step wegen der DNA im feed verzichten, da vor allem bei E.coli und stark lysierten Zellkulturen die Säule sofort „verblockt“ oder geht zu Lasten der dynamischen Bindungskapazität (DBC). Der Einsatz von DNase oder „frenchpress“ erscheint für einen validen Herstellungsprozess als eher ungeeignet.

Für Antikörper-Titer > 3g/L im feed sind MabSelect Sure LX und MabSelect Xtra bestens geeignet. Durch die höhere Ligandendichte, wird eine höhere dynamische Bindungskapazität (DBC) erreicht. Diese kommt aber erst ab einer Kontaktzeit von 6 Minuten zum tragen.

Für die Aufreinigung der immer wichtiger werdenden „Fabs“ bzw. Antikörperfragmente, sind die Träger Capto L, KappaSelect und Lambda FabSelect bestens geeignet.

Eine weitere Alternative ist ProSep als Affinitätsträger, der relativ kostengünstig ist. Der Kationenaustauscher Eshmudo S ist für den Einsatz von high titer feeds geeignet. Er zeichnet sich ebenso durch seine hohe Selektivität sowie durch seine hohe HCP Reduktion aus.

Eine Vielzahl von Herstellern hat sich mittlerweile der Thematik angenommen. Ein wichtiger Aspekt, bei der Auswahl von Trägern für den capture step sind Herstellerinformationen sowie Erfahrungen und Expertisen im eigenen Hause. Die meisten Hersteller stellen kostenlose Testkits zur Verfügung. Mit modernen Chromatographieanlagen und dem eventuellen Einsatz von DoE, sind hier der „Fantasie“ (fast) keine Grenzen gesetzt und es lohnt sich auf jeden Fall über Alternativen nachzudenken und diese zu testen.

Veranstaltungstipp: Themenverwandte Seminare finden Sie unter [www.provadis-novia.de](http://www.provadis-novia.de). Besuchen Sie auch das Seminarspecial auf der analytica 2014 „Strategien zur Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern in der frühen Entwicklung“ mit Dietmar Hartmann am 03. April 2014.