

Sven Schubert
Charakterisierung der mischmodalen Interaktion von Antikörpern mit Apatitphasen
2014 / 210 Seiten / 29,80 € / ISBN 978-3-89574-862-2
Verlag Dr. Köster, Berlin / www.verlag-koester.de

1 Einleitung

Antikörper, insbesondere monoklonale Antikörper (MAbs), zählen derzeit zu den wertvollsten und vielversprechendsten Wirkstoffen der modernen Biotechnologie. Das große Potential und Interesse der pharmazeutischen Industrie an MAbs wird an der Zahl, der in klinischen und vorklinischen Studien befindlichen MAbs, von mehreren hundert deutlich (Gura, 2002; Dimitrov und Marks, 2009). In den letzten Jahren hat sich zum Beispiel der Wert des MAb-Marktes von $10,3 \cdot 10^9$ US-\$ im Jahr 2004 (Kim et al., 2005) auf $43,5 \cdot 10^9$ US-\$ im Jahr 2010 (Elvin et al., 2013) vervierfacht. Mit derzeit 28 aktiv vermarkteten Antikörpern und weiteren 25 in späten klinischen Phasen wird der Markt für Antikörper weiterhin anwachsen (Elvin et al., 2013). Trotz steter Fortschritte scheint die Entwicklung biotechnologischer Produkte immer noch mit einem finanziell hohem Aufwand verbunden zu sein. So sind auch die Kosten zur Herstellung monoklonaler Antikörper, aufgrund des Produktions-Uspcalings zur Befriedigung der klinischen Nachfrage, extrem hoch (Gura, 2002). Dabei ist und bleibt das "*Downstreaming*" mit 50 - 80 % der gesamten Produktionskosten der finanziell bestimmende Teil der Herstellung (Hunt et al., 2001; Roque et al., 2004; Pujar et al., 2009; Liu et al., 2014) und bedingt eine effiziente und schnelle Entwicklung des Aufreinigungsprozesses. Derzeit beruht die Separation von MAbs auf chromatographischen Techniken, wobei die Protein A Affinitätschromatographie die dominierende "*Capture*"-Prozedur darstellt (Hober et al., 2007; Marichal-Gallardo und Alvarez, 2012). Diese bringt neben der hohen Selektivität und Ausbeute, mit dem Ausbluten des Protein A Liganden und der Aggregat-Anreicherung, jedoch gleichzeitig zwei nicht unbedeutliche Herausforderungen mit sich. Demzufolge sind preiswertere Alternativen wünschenswert, zumal die Protein A basierenden stationären Phasen sehr kostenintensiv sind. Ein nicht unerheblicher Aufwand wurde unternommen, um die Nachteile dieses Affinitätsmaterials zu verringern bzw. neue Adsorber für die Aufreinigung von MAbs zu testen und zu entwickeln. Ne-

ben der, nicht auf chromatographischen Prinzipien basierenden, Zwei-Phasen-Extraktion (Rosa et al., 2009; Asenjo und Andrews, 2012; Rosa et al., 2013) wurde hauptsächlich auf Ionenaustauscher- und Hydrophobe-Interaktionschromatographie gesetzt. Diese berücksichtigen die komplexen Eigenschaften der Antikörper, also deren individuelle Ladung und Hydrophobizität. Neuere Materialien adressieren, mit ihren sowohl geladenen als auch hydrophoben Liganden, diese komplexen Eigenschaften in sog. mischmodalen Adsobfern (Kallberg et al., 2012). Dazu gehören unter anderem die *Hydrophobic Charge Induction Chromatography*(HCIC)-Phasen (Guerrier et al., 2000; Schwartz et al., 2001; Boschetti, 2002). Dennoch sind, wie bei der Verwendung der Protein A Affinitätschromatographie auch, nicht zuletzt aufgrund immer höherer Maßgaben der Regulationsbehörden (z.B. FDA (Food and Drug Administration)), meist mehrere unterschiedliche Separationsschritte zur Aufreinigung von Antikörpern notwendig (Abbildung 1.1).

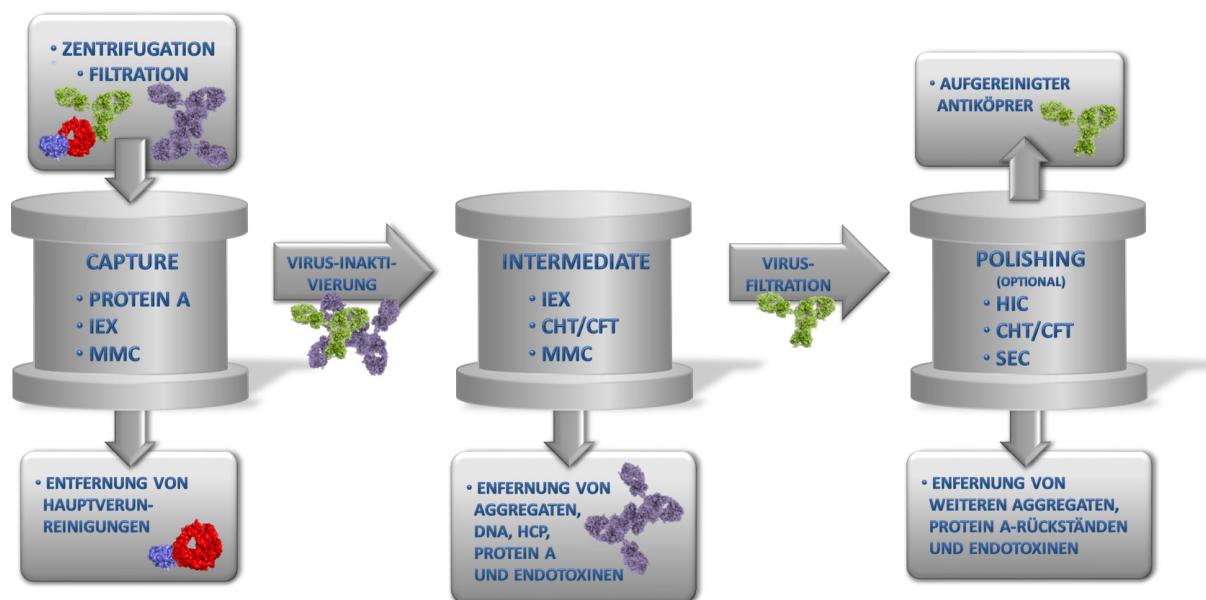


Abbildung 1.1: Allgemeines Flussbild des *Downstream Processing* von Antikörpern. IEX: Ionenaustausch, MMC: *Mixed-mode* Chromatographie, CHT/CFT: keramisches Hydroxyl-/Fluorapatit, HIC: Hydrophobe Interaktionschromatographie, SEC: Größenauschlusschromatographie.

Als chromatographische Aufreinigungsmethoden haben sich mit Ionenaustausch, hydrophober Interaktion, Größenausschluss und Affinität größtenteils die bereits genannten Techniken etablieren können und kommen in kombinierter Form zur Anwendung (Follman und Fahrner, 2004; Marichal-Gallardo und Alvarez, 2012). Diese werden je nach Zielsetzung im Capture-, der Intermediat-Aufreinigung oder dem sog. *Polishing* eingesetzt. Dies ist essentiell, um Proteine hoher Reinheit zu erhalten, die weder Kontaminations- noch DNA- und Endotoxinrückstände enthalten.

Neben den bereits erwähnten mischmodalen und konventionell verwendeten stationären Phasen, sind die bis dato seltener angewandten Apatitphasen ebenso eine echte Alternative. Hauptsächlich ist dies auf zwei dominierenden Adsorptionsmechanismen, elektrostatischen Ursprungs, zurückzuführen, welche einzigartige, über pH und Salzionenart steuerbare, Interaktionen zulassen. Aufgrund dieser Eigenschaften besteht, um nur Einige zu nennen, u.a. die Möglichkeit Antikörperaggregate, genauso wie Wirtszellproteine und eluiertes Protein A effizient abzureichern (Gagnon, 2009; Hilbrig und Freitag, 2012). Die dem Apatit zueigenen Fähigkeiten konnten bereits mehrfach bei der Antikörpераufreinigung, sowohl im kleinen Maßstab (Schubert und Freitag, 2007, 2009) als auch im industriellen Umfeld (Luellau et al., 1998; Boschetti und Jungbauer, 2000; Giovannini und Freitag, 2001), erfolgreich genutzt werden. Dennoch konnte der zugrundeliegende Interaktionsmechanismus, trotz intensiver Forschung und einem signifikanten Umfang an Arbeit, noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Nicht zuletzt ist dies der Komplexität der Wechselwirkung zwischen Proteinen und der Apatitphasen geschuldet.

Insbesondere im molekularen Maßstab ist bisher wenig zum initialen Adsorptionsvorgang in Protein-Apatit-Systemen bekannt. Erst in neuerlich durchgeführten Untersuchungen fanden, den Interaktionsmechanismus steuernde Kenngrößen, wie pH, verwendete Salzart und Ionenstärke Beachtung (Yamamoto, 2005; Schubert und Freitag, 2007, 2009; Gagnon, 2009). Deren Einfluss ist jedoch enorm, schließlich können bereits geringe Änderungen dieser Parameter zu dramatischen Änderung der Wechselwirkung führen. Eine wichtige Rolle spielt hier ebenfalls der Ladungszustand und die Ladungsverteilung, sowohl an der

Oberfläche des Proteins als auch an der Oberfläche der Apatitphase. Ein bedeutender Informationszuwachs zum Adsorptionsmechanismus an der Interphase Protein-Apatit ist durch die Verwendung neuer In-silico-Methoden zu erwarten. Da es sich um einen zunächst rein elektrostatischen Vorgang handelt, liefern hier vor allem kontinuumselektrostatische Berechnungen ein Werkzeug zur weiteren Interpretation des Adsorptionsprozesses.

Mit Einführung der PAT-Initiative (*Process Analytical Tool*) drängt die FDA pharmazeutische Hersteller ihren Produktionsprozess grundlegender zu verstehen. Folglich ist es auch in der Entwicklung und Optimierung des Separationsprozesses eines Proteins notwendig, ein detailliertes Verständnis des Adsorptionsvorgangs zu besitzen. Nicht zuletzt erst dadurch ist ein rationales Design des technischen Aufreinigungsprozesses möglich. Darüber hinaus führt die Kenntnis der Zusammenhänge zwischen den (Prozess-)Kenngrößen und dem Wechselwirkungsprinzip dazu, die stetig steigenden Anforderungen an ein biotechnologisches Produkt hinsichtlich Reinheit, Ausbeute und Funktionalität zu erfüllen, die Prozessplanung wesentlich zu verkürzen, sowie den Materialverbrauch zu reduzieren.

1.1 Struktur und Funktion von Antikörpern und deren Rolle im pharmazeutisch/diagnostischen Bereich

Immunglobuline (Ig), im Allgemeinen auch als Antikörper bekannt, bilden eine Proteinfamilie, welche sehr divers aber dennoch strukturell stark verwandt ist. Allen Antikörpern ist eine generelle Grundstruktur gemein. Sie bestehen aus mindestens zwei identischen leichten Ketten (L für *light*, ca. 25 kDa) und zwei identischen schweren Ketten (H für *heavy*, 53 - 75 kDa). Über Disulfidbrücken und nicht kovalente Wechselwirkungen sind diese miteinander assoziiert und bilden ein Y-förmiges Biomakromolekül der Formel $(LH)_{x \geq 2}$. Im wesentlichen existieren fünf Antikörperklassen mit gleichzeitig unterschiedlichen physiologischen Funktionen. So tritt IgM als Y-Pentamer um eine J-Untereinheit auf und wird als effektivste antimikrobielle Primärantwort auf ein Antigen im Serum sezerniert. Das Immunglobulin G ist von allen Antikörpern das häufigste im Blutserum und kommt als

Monomer vor. IgA ist andererseits als Mono-, Di- oder Trimer in äußereren Sekreten, wie Speichel, Tränen, sowie Darm- und Bronchialschleim präsent. Für den parasitären Schutz ist IgE bedeutsam, wogegen die Funktion von IgD derzeit noch nicht bekannt ist (Berg et al., 2003; Kyrtsonis et al., 2013).

Da im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich IgG-Antikörper Verwendung fanden, wird im Folgenden näher auf diese Immunglobulinklasse eingegangen. Unter den verschiedenen Ig-Isotypen stellen IgGs die am häufigsten sowohl diagnostisch als auch pharmazeutisch verwendeten Antikörper dar. In der Krebstherapie beruht dies unter anderem auf seinem akzeptierbaren molekularen Gewicht (≈ 150 kDa), der In-vivo-Stabilität, der hervorragenden Effektor-Funktion und der relativ einfachen Herstellung (Liu et al., 2008; Scott et al., 2012). Wie bereits erwähnt, bildet der intakte Antikörper eine Y-förmige Konformation der Formel $(LH)_2$ aus (Abbildung 1.2). Die Unterklassen der menschlichen IgGs umfassen die IgGs 1, 2, 3 und 4 mit entweder je zwei κ oder je zwei λ leichten Ketten pro Molekül. Jede leichte und schwere Kette wird sowohl in eine variable (V) als auch eine konstante Region (C) unterteilt. Im Fall der L-Ketten bestehen beide Regionen aus je einer Domäne, der C_L - und der V_L -Domäne. Analog dazu sind auch die H-Ketten in eine variable V_H -Domäne und in drei konstante Segmente, C_H1 , C_H2 und C_H3 unterteilt; alle sind zueinander und zu C_L homolog. Die variablen Regionen besitzen je drei hypervariable Bereiche in Form von Loops. Diese legen die Spezifität, Diversität und Affinität der Antigen-Bindung fest, während die konstanten Regionen für die Vermittlung der Effektorfunktionen sowie die Regulierung des eigenen Katabolismus maßgeblich sind.

Aufgrund ihrer sehr hohen Spezifität gegenüber einer Vielzahl von Antigenen finden IgGs unter anderem in vielen Nachweisen in der Biologie ein Anwendung. *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), Western Blot und Radioimmunoassay, um nur einige zu nennen, gehören dabei zu den bekanntesten Antikörper-basierenden analytischen Methoden. Neben dem diagnostischen Bereich stellen die monoklonalen Antikörper insbesondere in der pharmazeutischen Biotechnologie eine der vielversprechendsten und wertvollsten Biomolekülklasse dar (Vandevyver und Freitag, 2004; Tugcu et al., 2008; Buss et al., 2012). So