

1 Einleitung

1.1 Proteinchromatographie und anschließende Analysemethoden in der pharmazeutischen Biotechnologie

Im Bereich der biotechnologischen Industrie spielt die pharmazeutische Biotechnologie bezogen auf die Wertschöpfung die bedeutendste Rolle. Die in diesem Industriezweig produzierten Biopharmazeutika, überwiegend Proteine und deren Derivate, erzielten im Jahr 2005 einen Verkaufserlös von mehr als 30 Milliarden US-\$. Neben den weniger als 100 zugelassenen Produkten befanden sich über 500 in den klinischen Studien [Walsh 2005]. Unter den Proteinen nahmen die monoklonalen Antikörper den größten Anteil ein.

Bedingt durch die extrem hohen Qualitätsanforderungen an diese Pharmazeutika, insbesondere im Bezug auf ihre Reinheit, spielt die Aufreinigung, bzw. Aufarbeitung, eine der wichtigsten Rollen im Produktionsprozess. Innerhalb der Aufreinigungsmethoden nimmt die Proteinchromatographie die zentrale Rolle ein, wobei es sich bei ausnahmslos jedem Aufreinigungsprozess um eine Kombination, bzw. Hintereinanderschaltung von Chromatographiesäulen zu einer Kaskade handelt. Diese Kaskade besteht mindestens aus zwei Säulen unter Verwendung verschiedener Trennprinzipien, wobei eine Anzahl von drei bis fünf Säulen üblich ist.

1.1.1 Die Hydrophobe Wechselwirkungschromatographie als Trennprinzip in der Proteinchromatographie

Der Hydrophoben Wechselwirkungschromatographie (engl. Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC) kommt innerhalb einer Säulen-kaskade als einfach einsetzbarer und wirkungsvoller Sekundär- oder Tertiärschritt eine sehr wichtige Rolle zu. Durch die Entwicklung einer ganzen Bandbreite von Affinitätsliganden auf Anikörper(-fragment)basis, Peptidbasis oder synthetischer

Basis (z.B. [Roque et al. 2004]) wird fast ausnahmslos jedes pharmazeutische Protein mit einem Affinitätschromatographieschritt (engl. Affinity Chromatography, AC) als Primär- oder Sekundärschritt in der Säulenkaskade aufgereinigt. Die HIC erlangt ihre große strategische Bedeutung dadurch, dass sie als Folgeschritt sehr gut geeignet ist. Die produktschonenden Elutionsbedingungen, besonders für nicht Antikörper-basierte Produkte, von einer AC Säule umfassen zumeist eine hohe Salzkonzentration, die generell für die Beladung einer HIC-Säule benötigt wird. Dies schlägt sich auch in Patenten nieder, welche i.d.R. den Produktionsprozess eines pharmazeutischen Proteins bei seiner Zulassung patentrechtlich schützen. So wurde z.B. der generelle Einsatz eines HIC Schrittes für die Aufreinigung des betrachteten pharmazeutischen Proteins als Folgeschritt nach einer AC patentiert, vgl. *Smeds et. al.* [Smeds 1999].

1.1.2 Analysemethoden in der Proteinchromatographie

Für die Bewertung, bzw. die Analyse der Reinheit und der physiologischen Intaktheit der Pharmazeutika für die Prozessentwicklung wird ein ganzes Spektrum an physikalischen und biochemischen Analysemethoden eingesetzt. Diese unterscheiden sich durch die Messgröße sowie die benötigte Analysezeit.

Die für das Produkt spezifischsten Methoden sind biochemischer Natur und liefern Aussagen über Produktmenge und (spezifische) Aktivität, benötigen allerdings für die vollständige Analyse eines Säulenlaufs in der Praxis Analysezeiten von mehr als 24 h.

Als weniger produktspezifische Analysemethoden, bei denen das Messergebnis allerdings dafür praktisch in Echtzeit erhalten wird, kommen zwei optische Methoden in Frage. Die Absorption von monochromatischem Licht erfolgt bei Proteinen und Polypeptiden bei charakteristischen Wellenlängen ebenso wie die Fluoreszenz (vgl. Kapitel 2.4.1 und 2.4.2). Diese beiden optischen Messmethoden kommen sowohl als Echtzeit-Messverfahren mit einem Detektor direkt am Ausgang der Produktionssäulen zum Einsatz als auch bei separat erfolgenden chromatographischen Analysemethoden. Bei den letztgenannten ergeben sich reale Prozessierungszeiten zwischen 2 h und 24 h für die Charakterisierung eines Aufreinigungsansatzes.

Die zuvor genannten Analysemethoden lassen sich als indirekte Analysemethoden klassifizieren, da die Trennleistung der Chromatographiesäule aus den Daten der Flüssigphasenanalyse gewonnen wird. Wichtige Größen, wie z.B. die zeit- und ortsabhängige Beladung der Säule sowie deren maximale Kapazität werden indirekt aus den Daten der Flüssigphase gewonnen.

1.1.3 Konfokale Laser Raster Mikroskopie als Analysemethode

Ergänzend zu den zuvor beschriebenen indirekten Analysemethoden eröffnet die Konfokale Laser Raster Mikroskopie (engl. Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) die Möglichkeit, den Beladungsverlauf im Inneren von Referenzpartikeln des Trennmaterials direkt zu messen. Das Fluoreszenzsignal aus der Partikelebene liefert dabei relative Fluoreszenzintensitätswerte, welche mittels der Massenbilanzen aus der Flüssigphasenanalyse in absolute Werte für die Beladungsverteilung innerhalb der Adsorbentien umgerechnet werden können.

Bei dem verwendeten 1-Photonenmikroskop ist für den Erhalt eines auswertbaren Fluoreszenzsignals die Markierung einer Minderheit der analysierten Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen, auch Fluorophore genannt, notwendig. Die Fluoreszenzmessung im Inneren des Trennmaterials unterliegt dem experimentellen System immanenten Lichtabschwächungseffekten, die bedingt durch den Aufbau des 1-Photonenmikroskops unter Anwendung von trigonometrischen Funktionen quantifiziert werden können (vgl. Kapitel 3.3.2). Diese Daten können für die Signalkorrektur verwendet werden. Weitere Angaben zu Hintergrund und Funktionsweise der CLSM finden sich in Kapitel 2.4.3.

1.1.4 Das Konzept des ‚Design Space‘ und der ‚Quality by Design‘ (QbD)-Zulassung von Biopharmazeutika

Neben den traditionell gewünschten detaillierten Kenntnissen über das physiologische Wirkungsspektrum des neu zu zulassenden Pharmazeutikums werden von den Zulassungsbehörden zunehmend detailliertere Kenntnisse über den so genannten ‚Design Space‘ gefordert. Dieser Begriff wird in den international harmonisierten Richtlinien für pharmazeutische Prozessentwicklung

(ICH, International Conference on Harmonisation) definiert: Es ist der Prozessparameterraum, in dem der funktionale Zusammenhang zwischen den hinreichenden und notwendigen Prozessparametern und den kritischen Qualitätseigenschaften des Pharmazeutikums lückenlos definiert sein muss (ICH Q8, [Moheb Nasr 2008]). Im Vergleich zu den traditionellen Vorgaben, in dem das Prozessverhalten und damit die Produktqualität um die identifizierten Optima plusminus eines Sicherheitsfaktors definiert sein muss, erhöhen sich die Anforderungen bezüglich der Anzahl der benötigten Experimente, der Auswertung eines wesentlich größeren Datenvolumens, sowie der modellbasierten Beschreibung des Prozesses. Typische Prozessparameter in diesem Spektrum sind physikalisch-chemische Eigenschaften der Laufmittel, der Trennmaterialien sowie des zu trennenden Materials, auch in Abhängigkeit von ihrem jeweiligen Alter.

Neben den zuvor beschriebenen höheren Anforderungen für die Entwicklung des eigentlichen Prozesses ergeben sich noch weitere Forderungen von Seiten der Zulassungsbehörden bezüglich einer verbesserten Prozesskontrolle des eigentlichen Produktionsprozesses (ICH Q9, [Joneckis 2006]). Diese Kontrollmethoden müssen ebenfalls während der Prozessentwicklungsphase mitentwickelt werden.

Beide Anforderungsfelder bieten den Entwicklungsabteilungen die Möglichkeit, mit diesen detaillierteren Prozesskenntnissen die Einhaltung der Qualitätsanforderungen an das Produkt bei Prozessänderungen innerhalb dieses Parameterraumes zu garantieren. Damit entfällt auch die Notwendigkeit, den Qualitätsstandard bei Prozessänderungen in klinischen Studien erneut bestätigen zu müssen. Eine solche ‚Quality by Design (QbD)‘ Zulassung ist erstrebenswert, da aufgrund des hohen Entwicklungstempos und des hohen ökonomischen Risikos eines prä-klinischen Produktes oft großes Verbesserungspotential in den neu entwickelten Prozessen steckt.

Die Erfassung des ‚Design Space‘ eines proteinchromatographischen Trennungsschrittes wird durch die Anwendung statistischer Modelle zur experimentellen Planung und Datenauswertung gestützt. Soweit möglich komplementieren und erweitern Mechanistische Modelle oder Bilanzmodelle die Beschreibung der Trennprozesse. Durch die Anwendung automatisierter Hochdurchsatztechniken wird die Anzahl an untersuchbaren Parametern innerhalb eines vorgegebenen Zeitrahmens erhöht.

Automatisierte Hochdurchsatztechniken in der proteinchromatographischen Prozessentwicklung

Relevante Prozessparameter in der Proteinchromatographie, wie statische und dynamische Verteilungskoeffizienten des Produktes und dessen Verunreinigungen zwischen mobiler und stationärer Phase sowie maximale Kapazitäten der letztgenannten, können anstatt in Säulen auch in anderen experimentellen Systemen bestimmt werden. Als Betriebsweisen kommen hier sowohl der Finite Bath Modus als auch der Shallow Bed Modus in Frage, die in Kapitel 2.1.2 dargestellt sind.

Bedingt durch den hohen Arbeitsaufwand waren diese Messweisen bis dato lediglich auf den akademischen Bereich beschränkt, finden aber aufgrund der mittlerweile einfachen Verfügbarkeit von Laborrobotern zunehmend in miniaturisierter und automatisierter Form in der industriellen Prozessentwicklung Verwendung [Bensch et al. 2005; Staby et al. 2007].

Mathematische Modelle zur Unterstützung der Prozessentwicklung

Für die chromatographische Prozessentwicklung werden mathematische Modelle für zwei Aufgabenfelder verwendet:

Statistische Modelle werden zur experimentellen Planung (engl. Design of Experiment, DoE) und Datenauswertung eingesetzt. Hierbei ist ein detailliertes mechanistisches Verständnis der untersuchten Vorgänge nicht notwendig, da die vorgebenen Faktoren einzig anhand ihres Typs auf rein statistischer Basis untersucht werden. Zwei Typen von Faktoren, kategorische oder kontinuierliche, können auftreten. Im ersten Fall haben sie fest definierte, oftmals qualitative Eigenschaften, im zweiten Fall sind es numerische Werte innerhalb vorgegebener Grenzen. Diese Faktoren und deren Produkte werden durch iterative Variation bezüglich einer Zielfunktion optimiert. So können diese Modelle z.B. für die Optimierung eines Assays zur Analyse von chromatographischen Trennschritten oder als Testmethode für die Robustheit eines chromatographischen Trennschrittes eingesetzt werden. Im letzteren Fall wird auch oft das Maß der Beeinflussbarkeit von bereits optimierten Parametern durch bestimmte Prozessparameter untersucht (engl. Surface Response Mapping, SRM).

Im Gegensatz dazu bilden Chromatographiemodelle den eigentlichen Trennprozess ab. Ein Überblick über die verschiedenen Modelle ist bei *Susanto et. al.* zu finden [Susanto 2006].

Mechanistische Retentionsmodelle simulieren den in der Chromatographie gebräuchlichen Retentionsfaktor, der in (53) dargestellt ist. Im linearen Chromatographiebereich, d.h. bei sehr kleinen Konzentrationen des Adsorptivs und bei Vernachlässigung der Adsorptionskinetik lässt sich der Retentionsfaktor durch die Anfangssteigung der Isothermen ausdrücken. Durch diese direkte Ableitung aus den Isothermen beruhen diese Modelle auf den rein thermodynamischen Grundlagen der Phasenverteilung zwischen mobiler und stationärer Phase und sind somit für eine relativ große Anzahl von Proteinen gültig. Aufgrund der notwendigen Linearität beschränken sich diese Modelle allerdings auf analytische Trennprozesse.

Im Gegensatz zu den Retentionsmodellen bilden Bilanzmodelle die Chromatographieranlage basierend auf differentiellen Massenbilanzen ab. Sie können somit je nach Modelltiefe die Fluidynamik der Anlage, den Stofftransport an der Phasengrenzfläche und im Partikelinneren, sowie die zeitabhängige Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts abbilden. Mit den daraus abgeleiteten Größen lassen sich wesentliche Parameter eines chromatographischen Trennschritts, wie dynamische Kapazität, Selektivität und Ausbeute simulieren. Prinzipiell können für diese Modelle physikalische Korrelationen verwendet werden, oft werden aufgrund fehlender Verfügbarkeit allerdings empirische Korrelationen verwendet. Dies ist auch bei dem Einzelpartikelmodell von *Susanto et. al.* der Fall, das in dieser Arbeit verwendet wurde und in Kapitel 2.2 dargestellt ist.

1.2 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Anwendbarkeit der CLSM als Analysetechnik für HIC Systeme zu evaluieren und adäquate experimentelle Methoden für die Analyse und Klassifizierung von HIC Systemen zu etablieren und zu optimieren.

Desweiteren sollten der Nutzen und die Aussagekraft der zusätzlich erhaltenen Informationen aus der CLSM Analyse für die Entwicklung eines HIC Schrittes als Trennstufe eines Aufreinigungsprozesses abgewägt werden.

Für die Etablierung der CLSM als Analysetechnik für HIC Systeme standen folgende Fragestellungen im Vordergrund:

Die HIC ist durch die Verwendung von hohen Salzkonzentrationen in der Flüssigphase ein schwerer beherrschbares System als z.B. die Ionenaustauschchromatographie (engl. Ion Exchange Chromatography, IEC), die bereits Gegenstand von umfangreichen Studien mit der CLSM war. Bedingt durch die hohen Salzkonzentrationen kommt es bei der HIC sehr häufig zu Produktverlusten bedingt durch unterschiedliche Phänomene, wie Proteinagglomeration, unspezifische Adsorption abseits der Adsorbentien sowie Präzipitation auf den Adsorbentien. Die vorhandenen experimentellen Methoden wurden bezüglich ihrer Anwendbarkeit auf diese komplexen HIC Systeme hin untersucht.

Bei der Benutzung eines 1-Photonen-CLSM ist die Markierung der zu untersuchenden Proteine mit Fluorophoren notwendig. Bei der IEC sind Effekte der Markierung in Abhängigkeit von der Art und Größe des Proteins, der Nettoladung des Fluorophors sowie der Position der Markierung innerhalb der Peptidsequenz eines Proteins untersucht worden. Diese Effekte sind zum Teil sehr stark ausgeprägt. Der Effekt der Markierung auf die hier untersuchten Proteine in der HIC musste in dieser Fragestellung adressiert werden.

Für die Beurteilung der Aussagekraft der CLSM-Analyse bei der Klassifizierung von chromatographischen Systemen stand folgende Fragestellung im Vordergrund:

Durch die Kombination von hohen Salzkonzentrationen und hydrophoben Adsorbentien in der HIC kann es zu einer potentiellen Veränderung der Proteinstruktur bei der Adsorption kommen. Mit der Anwendung eines Einzelpartikelmodells zur Simulation der Adsorptionsvorgänge im Partikelinneren sollte untersucht werden, ob Behinderungen des Massentransports durch adsorbierte Proteine in Abhängigkeit von zwei strukturellen Zuständen plausibel erscheinen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Grundlagen der Proteinchromatographie

2.1.1 Definition

Die Chromatographie ist ein thermisches Trennverfahren, bei dem die zu trennenden Stoffe in einer mobilen gasförmigen oder flüssigen Phase durch eine stationäre Phase befördert werden. Die Stofftrennung erfolgt durch unterschiedlich stark ausgeprägte Verteilung der verschiedenen Stoffe zwischen den Phasen [Nic 2006]. In der Proteinchromatographie ist das zu trennende Proteingemisch in einem wässrigen Puffersystem gelöst. Die stationäre Phase, oft auch Festphase genannt, besteht in der industriellen Anwendung im häufigsten Fall aus porösen Partikeln [Flickinger 1999].

2.1.2 Betriebsweisen

Es existieren unterschiedliche Betriebsweisen um das in wässriger Lösung befindliche Ausgangsmaterial mit der stationären Phase in Kontakt zu bringen. Wie schon an der grundlegenden Definition der Chromatographie ersichtlich, findet die Durchströmung eines gepackten Betts, der Säulenmodus, die häufigste Anwendung. In dieser Arbeit fanden zwei weitere Betriebsweisen ebenfalls Verwendung, der Homogene Suspensionsmodus (engl.: Finite Bath Mode) und der Miniatursäulen-Betriebsmodus (engl.: Shallow Bed Mode). Alle drei Betriebsweisen, Säulenmodus, Finite Bath Modus und Shallow Bed Modus sind in **Bild 2.1** skizziert.

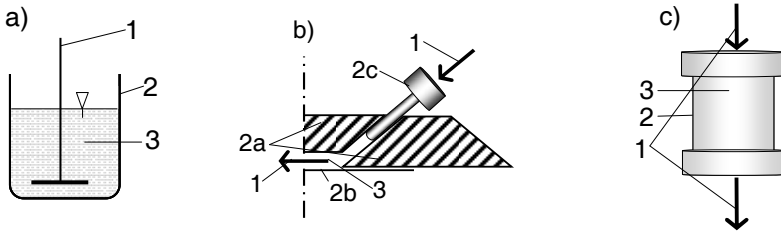


Bild 2.1: Schematische Darstellung der häufigsten Betriebsweisen in der Proteinchromatographie. Im Homogenen Suspensionsmodus (a) (engl.: Finite Bath Mode) wird die Festphase (a3) mittels eines Mischwerkzeugs (a1) homogen in der Flüssigphase (a3) suspendiert. Das ganze System befindet sich in einem geschlossenen Behälter (a2), die Proteinkonzentration in der Flüssigphase wird als örtlich konstant angenommen. Im Säulenmodus (c) ist die Festphase (c3) in einem zylinderförmigen Behälter (c2) gepackt, die von der Flüssigphase (c1) durchströmt wird. Der Miniatursäulenbettmodus (b) nutzt ebenfalls ein gepacktes Bett bestehend aus der Festphase (b3), welches sich in einem geometrisch komplexeren Behälter (b2a-b2c) befindet, der den analytischen Gegebenheiten, z.B. einem Mikroskopisch, angepasst ist. Das Bett wird ebenfalls von der Flüssigphase (b1) durchströmt.

Säulenmodus

Proteinchromatographische Trennprozesse im präparativen Maßstab laufen unter niedrigen linearen Fließgeschwindigkeiten von $240 - 400 \text{ cm h}^{-1}$ mit Reynoldszahlen im laminaren Bereich ab (Sheehan 1996; Janson 1997). Hier können sowohl kompressible als auch inkompressible Festphasen auf Kunststoff oder Silica Basis Verwendung finden. Das Strömungsprofil in einer solchen Niederdruck-Säule wurde mittels Magnetic Resonance Imaging visualisiert [Holland et al. 2004].

Proteintrennungen unter höheren linearen Fließgeschwindigkeiten mit höherem Druckabfall, also unter Bedingungen einer so genannten „High Performance Liquid Chromatography (HPLC)“, benötigen rigide, inkompressible Festphasen und finden weniger in der Produktion als in der Analytik Anwendung (Wisniewski 1992; Nageswara Rao et al. 2003).

Die größten Einflussfaktoren auf das Strömungsverhalten in Säulen sind physikalische Parameter wie Lösungsmittelviskosität und Temperatur sowie

geometrische Eigenschaften des gepackten Betts. Dazu zählen Packungsdichte der Partikel, Frittengeometrie, Partikelgröße sowie der Säulendurchmesser und das Verhältnis der beiden [Suzuki et al. 1972; Shalliker et al. 1998; Shalliker et al. 1999; Guiochon et al. 2003].

Finite Bath Modus

Beim Finite Bath Modus wird die Festphase durch ein Mischwerkzeug, i. d. R. ein Rührer oder ein horizontaler Orbitalschüttler, homogen in der Flüssigphase suspendiert. Bei idealer Durchmischung entfällt damit der konvektive Stofftransport in der experimentellen Betrachtung und es wird lediglich die Phasenverteilung des Adsorptivs analysiert und damit bei Einstellung eines Verteilungsgleichgewichtes die Trennleistung eines Theoretischen Bodens approximiert (vgl. Kapitel 2.1.1). Durch Messung von Adsorptionskinetiken und reine Flüssigphasenanalyse können effektive Porendiffusionskoeffizienten ermittelt werden.

Einen Überblick über Modellierungsansätze zur Bestimmung der Porendiffusionskoeffizienten sowie über die möglichen Versuchsaufbauten gibt *Carta et. al.* [Carta et al. 2005]. Komplexere Systeme im Milliliter-Labormaßstab verwenden zudem eine kontinuierlich betriebene Probenschleife für die Quasi-Online-Flüssigphasenanalyse; bei Bedarf mit vorgeschalteter analytischer Trennsäule vor dem Detektor [Anspach et al. 1996; Weaver et al. 1996; Hunter et al. 2000; J. A. Wesselingh 2001]. Bei miniaturisierten Systemen im Mikrolitermaßstab, wie sie auf Laborrobotern eingesetzt werden, finden einfache Reaktionsgefäße auf einem Orbitalschüttler Verwendung.

Finite Bath Experimente werden selten für die eigentliche präparative Trennung eingesetzt, Ausnahmen finden sich in der Lebensmittelindustrie, z.B. bei Molkereiprodukten [Scopes 1994]. Vielmehr dienen sie für eine erste Charakterisierung des chromatographischen Systems, d.h. für die Auswahl geeigneter stationärer Phasen und Prozessparameter für die Optimierung der Trennleistung. Für die Charakterisierung der Adsorptionskinetik eines HIC Systems wurde der Finite Bath Modus bereits erfolgreich eingesetzt [Conder et al. 2000; Tscheliessnig et al. 2005].