

Protein-Aggregaten auf der Spur – mit statischer und dynamischer Lichtstreuung

Michelle Chen

Wyatt Technology Corporation

Auf jeder Stufe der Entwicklung protein-basierter Therapeutika kann es zur Bildung von Aggregaten kommen. Um diese aufzuspüren und näher zu charakterisieren, steht eine Reihe von Methoden zur Verfügung, die auf Basis von Lichtstreuung arbeiten. In diesem Beitrag werden sie vorgestellt.

Proteinaggregate können sich schon während des Herstellungsprozesses bilden, aber auch bei Lagerung oder Transport der Präparate – und sogar im Zuge der Verabreichung kann dies vorkommen. Aggregate stellen eine Bedrohung für die Stabilität und Wirksamkeit der Therapeutika dar und können bei der Anwendung am Patienten sogar zu einer ernsthaften Gefahr werden. Daher ist es unverzichtbar, dass man während sämtlicher Produktionsschritte die Aggregate entweder sicher ausschließen oder aber nachweisen und charakterisieren kann.

Proteinaggregate können in ihrer Größe stark variieren, und zwar von wenigen Nanometern bis zu einigen hundert Mikrometern. Gerade der Anteil an großen Partikeln, manche davon bereits im sichtbaren, andere noch im nicht sichtbaren Bereich, bestimmt maßgeblich die Qualität einer Präparation. Doch auch die kleineren Fragmente wirken sich auf die Stabilität und Haltbarkeit aus. Man findet sie während des gesamten Herstellungsvorgangs, und sie können wertvolle Aufschlüsse darüber liefern, wie sich die Konditionen bei Produktion und Lagerung optimieren und damit die Bildung von Aggregaten minimieren lassen.

Statische und dynamische Lichtstreuung (SLS und DLS)

Beide Lichtstreuungstechniken werden schon recht lange eingesetzt, um Proteinaggregate zu charakterisieren, und zwar sowohl die kleinen Oligomere im Nanometerbereich als auch die hochmolekularen, partikulären Aggregate, die bis zu einigen Mikrometern groß werden können und teilweise sogar mit bloßem Auge sichtbar sind. Hier erweist sich eine spezielle Eigenschaft dieser Detektionsmethode als besonders hilfreich: Das Lichtstreuungssignal, das der Detektor „sieht“, ist

das Produkt aus Molekulargewicht und Konzentration der zu messenden Molekülspezies. Daher können selbst Spuren sehr großer Aggregate problemlos nachgewiesen werden.

Moderne SLS- und DLS-Detektoren kann man gut mit Systemen koppeln, die für die Trennung von Substanzgemischen eingesetzt werden, so beispielsweise Größenausschluss-Chromatographie (SEC) oder auch Feldflussfraktionierung (FFF). Dadurch erhält man eine hervorragende Auflösung und kann eine umfassende Charakterisierung der Fraktionen durchführen – etwa im Hinblick auf ihr Molekulargewicht, die Partikelgröße, den Oligomer-Status oder auch die Partikeldichte („number density“). Beide Trenntechniken separieren die Probenbestandteile nach deren hydrodynamischem Volumen. Die SEC stellt sicher die bislang am weitesten verbreitete Methode dar und wird überwiegend für die Trennung von Proteinen eingesetzt. Gleichwohl bereitet die SEC bisweilen Probleme, etwa wenn es zu Wechselwirkungen der Probe mit dem Säulenmaterial kommt, starke Scherkräfte die empfindlichen Proteine fragmentieren oder große Aggregate die Säule atypisch schnell passieren. Aufgrund dieser Einschränkungen suchte man immer wieder nach orthogonalen Trennmethoden und wurde schließlich bei der Feldflussfraktionierung (FFF) fündig, die inzwischen auch allgemein (und von der amerikanischen FDA) als Alternative für die Separation von Proteinmonomeren, -fragmenten sowie -aggregaten anerkannt ist. Bei dieser Technik findet die Trennung in einem Kanal statt und wird alleine mithilfe von Strömungskräften bewerkstelligt, ohne dass die Proteine wie bei der SEC eine Trennmatrix passieren müssten. Dadurch sind bei der FFF auch die Wechselwirkungen zwischen Probe und Oberflächen des Systems - verglichen mit der Säulentrennung - drastisch reduziert. Ein weiterer Vorzug dieser Methodik liegt darin, dass sie über einen sehr weiten Größenbereich hinweg angewandt werden kann. Von kleinen Proteinen angefangen über Oligomere bis hin zu Partikeln oder riesigen Ag-

gregaten reicht hier die Spanne. All diese Strukturen können im gleichen Trennkanal bearbeitet werden, und man muss nicht wie bei der SEC mehrere unterschiedliche Säulen einsetzen.

Beiden Trennmethoden gemeinsam ist eine wesentliche Einschränkung: Sie liefern nur einen Schätzwert für das Molekulargewicht einer Probe, wenn dieses anhand eines mitgeführten externen Standards auf Grundlage des gemessenen Elutionsvolumens ermittelt wird, wie im Falle der SEC oder bei der FFF, der theoretische Diffusionskoeffizient als Basis der Berechnung dient. Solche semi-empirischen Ansätze führen immer wieder zu falschen Resultaten, vor allem dann, wenn sich Probe und Standard in Bezug auf ihre Konformation unterscheiden. Aus diesem Dilemma gibt es auch mit den raffiniertesten Annäherungsmodellen keinen wirklichen Ausweg, die Bestimmung bleibt lediglich eine relative.

Für dauerhafte, verlässliche Abhilfe kann hier allein eine absolute Messmethode sorgen. Neben den klassischen absoluten Ansätzen (Membran-Osmometrie, Sedimentations-Ultrazentrifugation und Massen-Spektrometrie) hat sich aufgrund ihrer einfachen Anwendung die Mehrwinkel-Lichtstreuung (MALS) für zahllose Anwendungen als Methode der Wahl etabliert. Sie ist die inzwischen am weitesten verbreitete Version der statischen Lichtstreuung und kann sowohl im Batch-Modus als auch gekoppelt an Trennsysteme wie SEC oder FFF betrieben werden. Ein MALS-Detektor kann über die absolute (d.h. ohne Standards arbeitende) Bestimmung von Molekulargewichten hinaus noch weitere wertvolle Informationen über die jeweilige Probe liefern. So erhält man beispielsweise Daten über das herrschende stöchiometrische Verhältnis zwischen Proteinen und ihren Konjugaten. Ab einer Größe von etwa 10 nm lässt sich auch der Radius von Molekülen, der so genannte Gyrationradius R_g , mit MALS bestimmen, außerdem die Partikeldichte bei Aggregatpartikeln, um nur einige Parameter zu nennen.

Strukturaufklärung bei Aggregatpartikeln

Möchte man einen Molekülradius unter 10 nm bestimmen, kann man zusätzlich zu einer anderen Art der Lichtstreuungsmessung greifen, der Dynamischen Lichtstreuung, DLS. Diese kann, ähnlich wie MALS, nach der Probentrennung angeschlossen werden und misst einen weiteren Molekülradius, den hydrodynamischen Radius R_h . Im Falle der Proteincharakterisierung liefert die Kombination aus den Daten von MALS und DLS wertvolle Einsichten in die molekulare Konformation und kann überdies Aussagen zum Faltungszustand des Moleküls ermöglichen. Hat man es mit größeren Spezies zu tun, gewinnt man mithilfe des Quotienten aus R_g und R_h einen Einblick in Form und Gestalt des betreffenden Partikels. Auch die Verteilung der Massen in seinem Inneren kann man damit analysieren und so beispielsweise nicht-invasiv eine Unterscheidung zwischen gefüllten und leeren Transportpartikeln wie etwa Liposomen treffen. An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass sowohl bei SEC als auch bei FFF die Proben während der Trennung in signifikantem Umfang verdünnt werden. Dieser Umstand kann sich in unvorhersehbarer Weise auf das Ergebnis der Analytik auswirken, indem sich zum Beispiel das Gleichgewicht reversibel assoziierter Proteinaggregate verschiebt. Um solche Effekte auszuschließen, führt man in einigen Fällen eine Batch-Messung ohne vorherige Separation durch. So kann diese Art der Messung in der Tat eine wichtige Option darstellen, wenn es darum geht, Aggregation als einen Effekt aus dem Zusammenspiel verschiedener Parameter wie etwa Konzentration, Pufferzusammensetzung, Temperatur und Zeit zu betrachten. Für eine DLS-Messung benötigt man im Gegensatz zu MALS auch nicht unbedingt genaue Angaben zur verwendeten Konzentration. Wenn man nun noch ins Kalkül zieht, dass eine DLS-Messung in weniger als einer Minute erledigt werden kann, so wird klar, welch wertvolles Werkzeug Batch-DLS beispielsweise für das Hochdurchsatz-Screening in Mikrotiterplatten ist, bei dem häufig große Messreihen zur Bestimmung der Stabilität von Proteinformulierungen durchgeführt werden. Obgleich die Methode ungeheuer empfindlich auch kleinste Mengen von Aggregaten nachweisen kann, ist es um die Auflösung zwischen den verschiedenen Spezies nicht ganz so gut bestellt. Will man unterschiedliche Populationen von Aggregaten klar differenzieren, sollten diese sich in ihrem Radius mindestens um den Faktor vier unterscheiden. Die Bildung von kleineren Oligomeren kann daher nur mit anderen Methoden festgestellt werden, etwa mit dem Polydispersitätsindex. Eine wirkliche Ein-

schränkung ist dies allerdings nicht, denn hier kann eine Batch-Messung mittels MALS die Lücke füllen. Zwar erhält man auch daraus einen Mittelwert der Parameter, aber MALS ist um ein Vielfaches empfindlicher als DLS, wenn es darum geht, Unterschiede zwischen den Chargen nachzuweisen. Unter optimalen Bedingungen kann diese Methode eine nur einprozentige Differenz im durchschnittlichen Molekulargewicht feststellen und damit kleinste Unterschiede bezüglich der Art und der Menge von Aggregaten in verschiedenen Präparationen aufspüren. Arbeitet man mit verschiedenen Konzentrationen eines Proteins, so erlaubt es die MALS-Batchmessung, Aussagen über seine reversible Selbstassoziation zu treffen oder auch das Vorkommen und die Bildungsdynamik unterschiedlicher Oligomer-Spezies über einen großen Konzentrationsbereich hinweg in den Blick zu nehmen.

Zusammenfassung

Für die Charakterisierung von biotherapeutischen Präparaten und Formulierungen stehen grundsätzlich zwei Arten der Lichtstreuung zur Verfügung: die statische, SLS, und die dynamische, DLS. Beide kann man zum einen im Rahmen von Batch-Messungen

anwenden, zum anderen erlauben diese Methoden aber auch die Kopplung an verschiedene hoch entwickelte Trenntechniken wie etwa SEC/GPC oder Feldflussfraktionierung (FFF). Gerade der Einsatz von Lichtstreuung im Anschluss an die Separation der Komponenten in der Probe ermöglicht aufschluss- und detailreiche Einblicke in den Prozess der Bildung von Oligomeren und Aggregaten. Wenngleich die Auflösung zwischen den Proteinspezies im Batch-Verfahren begrenzt ist, eignet sich dieser Ansatz doch sehr gut, in Hochdurchsatz-Untersuchungen zahlreiche verschiedene Formulierungen auf ihr Lösungsverhalten hin zu prüfen und diejenigen Bedingungen aufzuspüren, unter denen es besonders stark zur Aggregatbildung kommt. Auch zur detaillierten Betrachtung der spezifischen und nicht-spezifischen Wechselwirkungen zwischen Proteinen eignet sich die Lichtstreuung hervorragend. Als orthogonale Methode kann sie in all diesen Fällen wertvolle Einsichten liefern. In Kombination angewandt, steht mit MALS und DLS ein zuverlässiger, universell nutzbarer Werkzeugkasten für die umfassende Charakterisierung von Aggregationsphänomenen bei sämtlichen Proteinpräparationen bereit.



Die Trennung von Protein-Monomeren und Aggregaten kann entweder mittels Größenausschluss-Chromatographie (SEC) auf einer Säule erfolgen oder auch durch asymmetrisch Feldfluss-Fraktionierung (AF4 oder FFF). Die online-Analyse wird dann, je nach Fragestellung, mithilfe von Mehrwinkel-Lichtstreuung (MALS), dynamischer Lichtstreuung (DLS), UV-Absorptionsmessung und differentieller Refraktometrie (dRI) durchgeführt. Diese Abbildung zeigt eine optimale Gerätekonfiguration, die eine variable Nutzung der Trenntechniken mit den high-end Detektoren verbindet.