

MediaScout® RoboColumn® - Automatisierte Parallelchromatographie

Dipl.-Ing. Tim Schröder, Produkt Manager für Parallelchromatographie

Atoll GmbH, Weingarten, Germany, www.repligen.com



Der Bedarf an pharmazeutischen Wirkstoffen, die mit Hilfe von biotechnologischen Verfahren hergestellt werden, insbesondere monoklonaler Antikörper (mAb), hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Die Notwendigkeit der Pharmaunternehmen entsprechende Wirkstoffe so schnell und so kosteneffektiv wie möglich zu entwickeln, um als erster den Absatzmarkt bedienen zu können, macht die Anwendung von Hochdurchsatz-Technologien interessant und unvermeidbar.

Vor allem die Entwicklung geeigneter chromatographischer Aufreinigungsverfahren (*Downstream Process Development*), zur Isolierung der aktiven Wirkstoffe aus entsprechenden Fermentationsüberständen, verschlingt einen erheblichen Teil der Entwicklungszeit und -kosten. Daher besteht großes Interesse daran, vor allem für die Entwicklung dieser Verfahren, innovative Hochdurchsatz-Technologien verwenden zu können.

Für diesen Zweck entwickelt, produziert und vermarktet die Atoll GmbH innovative MediaScout® Chromatographiesäulen für die hohen Anforderungen der modernen biopharmazeutischen Industrie. Die Verwendung von MediaScout® RoboColumns® ermöglicht erstmals Parallelchromatographie im 96er Format für vollautomatisiertes und robustes Arbeiten mit Laborrobotern von Tecan (Abbildung 1B).



Abbildung 1A: 96 MediaScout® RoboColumn® array. Stack™ für die



Abbildung 1B: Laborroboter Tecan Freedom EVO® bestückt mit Te-Chrom™ und Te-Stack™ für die Verwendung von MediaScout® RoboColumns®.

Das spezielle Design der MediaScout[®] RoboColumns[®] ermöglicht es, alle kommerziell erhältlichen Trennmedien verschiedenster Anbieter in einheitliche Säulenformate zu packen, was einen direkten Vergleich chromatographischer Kenngrößen wie Selektivität und Kapazität ermöglicht.

Die Anordnung von 96 individuellen Miniatursäulen bietet unerreichte Flexibilität im Versuchsaufbau (Abbildung 1A). Das Arbeiten im kontinuierlichen Chromatographie-Modus ermöglicht eine maßstabsgerechte Übertragung (*Scale-Up*) der relevanten Parameter in größere Säulenformate.

Für schnelle Ergebnisse und drastische Einsparungen:

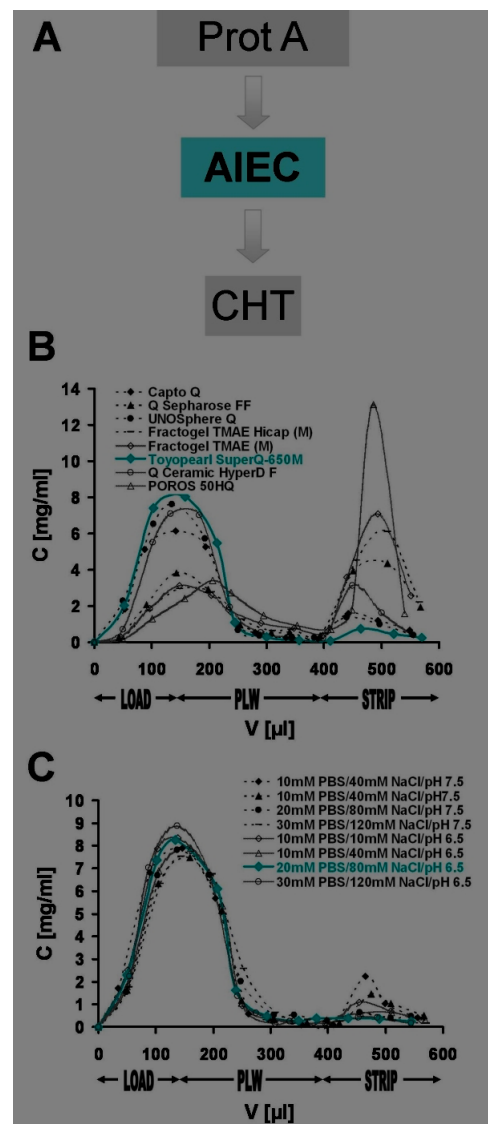
- □□□□□□ 30% Arbeitsstunden
- □□□□□□ 80% Projektlaufzeit
- □□□□□□ 70 % Verbrauchsmittel

Geeignet für Trennmedien-Screening, Methodenentwicklung, Prozessanalyse und Protein Drug Discovery. Dieser Fachbeitrag beschreibt die Entwicklung und Optimierung eines Aufreinigungsverfahrens für einen monoklonalen Antikörper unter Verwendung von MediaScout[®] RoboColumns[®].

Downstream Process Development

Die chromatographische Aufreinigung monoklonaler Antikörper ist in der Regel sehr gut optimiert und basiert auf einem Plattformprozess mit bis zu drei Stufen. Die erste Stufe dient dazu, den Antikörper mit Hilfe von hoch spezifischen Affinitätsmedien (Protein A) zu konzentrieren und wird deshalb auch *Capture-Step* genannt. Um unerwünschte Nebenprodukte wie Antikörperaggregate abzureichern und einen völlig reinen Antikörper zu erhalten, wird der Protein A Capture-Step in der Regel mit anderen Chromatographiemodi wie Anionenaustausch (AIEC), Kationenaustausch, hydrophobe Interaktion und oder Hydroxyapatit (CHT) in weiteren Schritten kombiniert (Abbildung 2A).

Abbildung 2: **A** Aufreinigungsschema (3-Stufen-Plattform) für einen monoklonalen Antikörper (mAb); **B** Negativ- (Durchfluss-)Chromatographie: Elutions-Profil von aufkonzentriertem Antikörper (nach Protein A) für 8 verschiedene Anionenaustauscher. Toyopearl[®] SuperQ-650 M zeigt die geringste Proteinbindung; **C** Optimierung der Proteinbindung für Toyopearl[®] SuperQ-650 M durch Variation der Salzkonzentration und pH von Bindungs- (LOAD) und Waschpuffer (PLW). Mit 20 mM PBS, 80 mM NaCl, pH 6.5 wurde die geringste Proteinbindung erzielt.



Die Verwendung von Anionenaustauschchromatographie für den Zwischenschritt (*Intermediate-Step*) ist weit verbreitet; neu im Trend liegt allerdings, diesen im Durchfluss-Modus (Negativ-Chromatographie) zu betreiben. Dabei werden die Verunreinigungen gebunden und nicht das Zielprotein (Antikörper), welches die Säule unbeeinflusst passieren kann. Diese Betriebsweise bietet vor allem den Vorteil, dass ein geringeres Säulenvolumen sowie weniger prozessrelevante Flüssigkeiten und Ressourcen benötigt werden und der bereits hochkonzentrierte Antikörper fast nicht verdünnt wird.

Um das am besten geeignete Chromatographiemedium für diesen Intermediate-Step zu finden, wurde ein Screening-Experiment mit **MediaScout[®] RoboColumns[®]** 5 mm ID x 2.5 mm H (CV = 50 µl), gepackt mit acht verschiedenen Anionenaustauschern diverser Hersteller, durchgeführt. Der bereits durch den vorhergehenden Protein A Capture-Step aufkonzentrierte Antikörper wurde dafür unter nicht bindenden Bedingungen auf die Säulen gegeben (LOAD), gefolgt von einem anschließenden Wasch- (PLW) und Elutions-Schritt (STRIP, Abbildung 2B).

In einem weiteren Screening-Experiment wurde der Anionenaustauscher (Toyopearl[®] SuperQ-650 M), der die geringste Konzentration an Antikörper in der Elutionsfraktion (STRIP) aufwies, diesbezüglich optimiert. Dazu wurden die Salzkonzentration und der pH von Bindungs- (LOAD) und Waschpuffer (PLW) variiert (Abbildung 2C).

Abschließend wurde der Aufreinigungsschritt in den Labormaßstab übertragen (*Up-Scale*). Dafür wurde eine **MediaScout[®] MiniChrom** 11.3 mm ID x 100 mm H (CV = 10.0 ml) gepackt mit Toyopearl[®] SuperQ-650 M unter optimierten Bedingungen an einer Äkta™ Chromatographieanlage betrieben. Es konnte eine Antikörperausbeute von 98% erreicht werden.

Zusammenfassung

Die Verwendung von **MediaScout[®] RoboColumns[®]** in Kombination mit einem Tecan Freedom EVO[®] Laborroboter ermöglicht die Durchführung von voll automatisierten Hochdurchsatz-Experimenten für die Entwicklung und Optimierung von chromatographischen Aufreinigungsverfahren und führt zu erheblichen Einsparungen in Entwicklungszeit und -kosten.