YMC EUROPE GMBH
The Selectivity Company

WHITEPAPER

Grundlagen der Chromatographie für die Analyse und Aufreinigung von Biologika

ChromaCon
A YMC Company

Grundlagen der Chromatographie für die Analyse und Aufreinigung von Biologika

Einleitung

Arzneimittel unterliegen strengen Auflagen, deshalb ist eine entsprechend aufwendige Aufreinigung wichtig. Dies gilt auch für biotechnologische Arzneistoffe, die zumeist mit gentechnisch veränderten Zellen in Bioreaktoren hergestellt werden. Diese Fermentationslösungen enthalten viele Verunreinigungen, so dass deren Aufarbeitung eine Herausforderung darstellt. Um eine entsprechend hohe Reinheit und Produktivität zu erzielen, haben sich chromatographische Methoden in diesen Prozessen etabliert.

Beispielsweise startet die Aufreinigung monoklonaler Antikörper typischerweise mit Affinitätschromatographie gefolgt von Ionenaustauschchromatographie (IEX). Oftmals wird anschließend noch ein Schritt mit hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) durchgeführt.
In der Qualitätskontrolle und für Stabilitätstest wird analog dazu (U)HPLC eingesetzt. Häufig kommen quantitative Größenauschlusschromatographie (SEC), IEX, HIC oder Reversed-Phase Chromatographie (RP) zum Einsatz.

Affinitätschromatographie

Affinitätschromatographie nutzt die spezifische und reversible Bindung zwischen einem Harz und der zu trennenden Biomoleküle. Typischerweise genutzte Wechselwirkungen sind Antikörper-Antigen, Enzym-Substrat und Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungen.
Für die Antikörperaufreinigung werden häufig Harze mit immobilisiertem Protein A verwendet. Protein A, welches in der Zellwand von Staphylococcus aureus zu finden ist, bindet eine große Vielfalt von monoklonalen Antikörpern stark und reversibel. Es bindet den Zielantikörper während Verunreinigungen die Säule durchlaufen und dabei vom Harz gespült werden. Durch Einstellen eines niedrigen pH-Werts löst sich der Antikörper vom Harz und kann somit von der Säule eluieren.
Schon seit den 50er Jahren wird Affinitätschromatographie für die Aufreinigung von Antikörpern eingesetzt. Die heute verfügbaren Produkte und vor allem die Technik haben sich selbstverständlich weiterentwickelt. Ein Trend in der pharmazeutischen Industrie ist die kontinuierliche Produktion. Ziel der kontinuierlichen Produktion ist es, Biologika in nur einem einzigen mehrstufigen Schritt herzustellen. Die traditionelle Chargenproduktion von Biologika beinhaltet im Gegensatz dazu viele eigenständige Schritte, die oft auch mit Unterbrechungen und Standortwechseln einhergehen. Schätzungen variieren, aber weitestgehend wird vermutet, dass die kontinuierliche Produktion die Kosten der Biologikaherstellung mindestens halbieren wird (1). Auch die FDA unterstützt Biologikaproduzenten, die kontinuierliche Herstellung zu verwenden, um Kosten zu sparen sowie die Verfügbarkeit der Arzneimittel und die Konsistenz der Produktqualität zu erhöhen.
Dennoch gibt es viele technische und logistische Herausforderungen bei solch einem signifikanten Wechsel der Produktionsmethode. Mittlerweile werden kontinuierliche Prozesse für vorgeschaltete Stufen in der Biologikaherstellung wie Zellwachstum und –gewinnung angewendet (2). Die Entwicklung in nachgeschalteten Prozessen wie der Aufreinigung ist langsamer. Die Anpassung von Affinitätschromatographie an einen kontinuierlichen Prozess hat sich als eine besondere Herausforderung herausgestellt. Affinitätssäulen binden das Zielmolekül nur mit einer Effizienz von 40–60 %. Wenn höhere Ladungen auf die Säule gebracht werden, neigen die Zielmoleküle dazu die Säule zu durchlaufen, ohne eine Bindung einzugehen. Moderne Systeme wie das YMC Contichrom Twin Capture SMB mit Dual-Affinitäts-Säulentechnologie erhöhen die Effizienz signifikant.



Abbildung 1: YMC Contichrom Twin Capture SMB ist ein Zwillingssäulensystem geeignet für die Antikörperaufreinigung.

Dazu setzt YMC Contichrom Twin Capture SMB zwei in Reihe geschaltete Affinitätssäulen ein. Dabei werden die Moleküle, die die erste Säule ungebunden durchlaufen, auf der zweiten Säule gebunden. Dadurch erreicht die erste Säule eine Effizienz von 95 % oder mehr!

Die erste Säule wird aus der Schaltung herausgenommen und das Produkt eluiert von der Säule. Die zweite Säule wird dabei weiter beladen. Wenn das Produkt von der Säule gespült wurde, kann die Säule wieder beladen werden und die zweite Säule wird aus der Schaltung genommen. Diese Schritte können kontinuierlich weitergeführt werden. Durch dieses Zwillingssäulensystem kann die Produktivität auf das dreifache gesteigert werden.

Dabei wird nur die Hälfte des Puffers und des Protein A Harzes konventioneller Prozesse verbraucht. Diese innovative Systemlösung wird für die Aufreinigung von Antikörpern im Labor- bis hin zum Produktionsmaßstab eingesetzt. Pharmazeutische Firmen, die die YMC Technologie schon erfolgreich anwenden, sind unter anderem Bristol-Myers Squibb, die das YMC Contichrom Twin Capture SMB System für die klinische Produktion einiger Antikörpertherapien eingeführt haben (3).

Für die Aufreinigung anderer Biotherapeutika wie Peptide, Antikörper-Wirkstoff-Konjugate und Oligonukleotide bietet YMC auch eine ähnliche Technologie, Contichrom Twin MCSGP HPLC, an.

Größenausschlusschromatographie (SEC)

Bei der SEC werden die Biomoleküle nach der Größe getrennt. Es ist eine beliebte Methode, um in der Qualitätskontrolle Aggregatbildung zu bestimmen. Biomoleküle tendieren während der Produktion und Lagerung dazu zu aggregieren. Es bilden sich Dimere und Trimere oder sogar größere Aggregate. „Diese Aggregate können Immunogenizität verursachen“, sagt Cinzia Stella, führende Wissenschaftlerin im analytischen Bereich für Proteine bei Genentech (F. Hoffmann- La Roche). „Wir verwenden Größenauschlussmethoden, um den Grad der Größenvarianz zu beobachten, damit die Konsistenz und Produktqualität der freigegebenen Chargen abgesichert sind.“

Das für SEC eingesetzte Material ist hochporös. Die Größe eines Biomoleküls bestimmt ob und wie weit es in die Pore eindringt. Das wiederum bestimmt wie schnell das Molekül von der Säule eluiert. „Größere Moleküle können nicht in die Pore eindringen und durchlaufen einfach die Säule, während kleine Moleküle tief in die Poren eindringen und später eluieren“, sagt Takashi Sato, Sales und Marketing Manager bei YMC Co., Ltd. in Japan.

YMC bietet zwei SEC Phasen für Biomoleküle an: YMC-Pack Diol und YMC-SEC MAB. Die erste ist mit vier Porengrößen erhältlich. YMC-Pack Diol-60 mit der 60 Å Pore ist für kleine Biomoleküle geeignet.

Die Porengrößen 120, 200 und 300 Å eignen sich für die Trennung von Proteinen. YMC-SEC MAB hat eine Porengröße von 250 Å und ist speziell für die Bestimmung von Aggregaten und Fragmenten von monoklonalen Antikörpern und Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten konzipiert.

In der Produktion werden häufig Plattformstrategien angewendet, die einen Satz fest etablierter Prozesse beinhalten, die sich für verschiedene Produkte eignen. Diese Plattformtechnologien sind sehr beliebt für die meisten Ebenen in der Herstellung von Biopharmazeutika, einschließlich der SEC. Zum Beispiel kann eine SEC-Plattformmethode, welche die gleiche Säule und mobile Phase verwendet, routinemäßig für alle anwendbaren monoklonalen Antikörper implementiert werden. „Wir arbeiten seit langer Zeit mit Immunoglobulin G Antikörpern und wir versuchen so oft wie möglich Plattformmethoden zu verwenden, die für die meisten unserer Moleküle geeignet sind“, sagt Cinzia Stella. „Es macht die Qualitätskontrolle deutlich einfacher, wenn die gleiche Methode für so viele Immunoglobulin G Antikörper wie möglich eingesetzt werden kann, anstatt jedes Mal eine neue zu entwickeln und zu validieren.“

Trotzdem sind Plattformmethoden nicht starr. Sie können angepasst werden, wenn verbesserte Säulen oder neue Methoden angeboten werden, die besser geeignet sind.

Ionenaustauschchromatographie (IEX)

Ionenaustauschchromatographie ist sowohl für die analytische Trennungen als auch für die Aufreinigungen von biotechnologischer Arzneistoffe nützlich. IEX wird häufig für die präparative Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern als zweiter Schritt nach der Affinitätschromatographie verwendet.

IEX Chromatographie trennt Biomoleküle anhand ihrer unterschiedlichen Oberflächenladung. Das Harz enthält geladene Gruppen, die reversibel mit geladenen Aminosäureseitenketten auf der Oberfläche des Biomoleküls wechselwirken. Die Biomoleküle werden durch einen Salz- oder pH-Gradienten von der Säule eluiert.

Die Ionen der Salze konkurrieren mit den Biomolekülen um die geladenen Gruppen des Harzes. Das bedeutet, dass die Biomoleküle vom Harz gelöst und von der Säule gespült werden, wenn die Salzkonzentration in der mobilen Phase erhöht wird. Proteine mit der geringsten Ladung eluieren zuerst, die mit der höchsten als letztes.

Bei einem pH-Gradienten bestimmt der isoelektrische Punkt der Analyten die Elutionsreihenfolge.

Der isoelektrische Punkt ist der pH-Wert, an dem sich alle Ladungen im Molekül gegenseitig aufheben, sodass das Molekül neutral vorliegt. Bei Kationenaustauschern wird das Biomolekül gebunden, wenn die Ladung des Moleküls positiv ist. Dies geschieht, wenn der pH-Wert niedriger als der isoelektrische Punkt ist. Wenn der pH-Wert den isoelektrischen Punkt übersteigt, ist die Ladung des Biomoleküls negativ, das Molekül wird vom Harz abgestoßen und eluiert von der Säule.

BioPro IEX von YMC basiert auf hydrophilen Polymerharzen und ist speziell für die Analyse von Proteinen, Peptiden und Nukleinsäuren konzipiert. BioPro IEX ist als Kationen- und Anionenaustauscher sowie in einer porösen und einer unporösen Variante erhältlich. Takashi Sato zufolge bieten poröse Harze die Möglichkeit einer besseren Trennung unter dem Kompromiss langsamerer Flussraten. „Das unporöse Harz ist besonders gut für schnelle analytische Applikationen“, sagt er.

Die porösen BioPro IEX Harze sind sowohl als analytische Säulen sowie als Bulk Material für Trennungen im präparativen Maßstab jeweils mit verschiedenen Partikelgrößen erhältlich.



Abbildung 2: BioPro IEX Säulen für die Ionenaustauschchromatographie von Proteinen, Peptiden und Nukleinsäuren.

Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

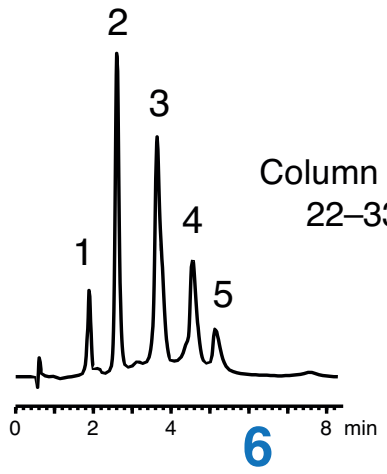
HIC trennt Biomoleküle aufgrund unterschiedlicher Hydrophobizität und wird in Produktionsprozessen nach einer Affinitäts- und IEX Chromatographie eingesetzt.

Das Harz für HIC enthält hydrophobe Gruppen, die reversible Wechselwirkungen mit hydrophoben Seitenketten von Aminosäuren an der Oberfläche der Biomoleküle eingehen. Ein Salzgradient wird für die Trennung verwendet. Hohe Salzkonzentrationen stärken die Wechselwirkungen zwischen Biomolekül und Säule, während niedrige Salzkonzentrationen diese schwächen. Je hydrophober das Biomolekül ist desto weniger Salz wird benötigt, um die Bindung zu begünstigen. Die Salzkonzentration verläuft während der Trennung von hoch zu niedrig, sodass das am wenigsten hydrophobe Biomolekül zuerst von der Säule eluiert und das hydrophobste zuletzt.

HIC ist im analytischen Maßstab vor allem für die Qualitätskontrolle von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (ADC) von Bedeutung. Ein ADC basiert auf einem monoklonalen Antikörper (MAb), an dem ein zytotoxischer Wirkstoff durch einen Linker kovalent gebunden ist. Das gewünschte Wirkstoff-zu-Antikörper-Verhältnis variiert je nach Therapeutikum. Durchschnittlich sind drei oder vier gebundene Moleküle eines Wirkstoffs ein typisches Verhältnis (4). Wenn das durchschnittliche Verhältnis zu niedrig ist, kann die Wirksamkeit reduziert sein. Ein zu hohes Verhältnis jedoch kann zu einer Überdosis führen. Deshalb ist die Bestimmung dieses Verhältnisses ein entscheidender Schritt in der Qualitätskontrolle während der Produktion aller ADCs.

„Wir verwenden routinemäßig HIC, um das Wirkstoff-zu-Antikörper-Verhältnis von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten zu bestimmen“, sagt Cinzia Stella. Genentech produziert Kadcyla® (Trastuzumab-Emtansin), ein Medikament gegen HER2-positiv metastatischen Brustkrebs, das 2013 die Genehmigung der FDA erhielt und so eines der ersten Antikörper-Wirkstoff-Konjugate auf dem Markt wurde. HIC ist gut für die Analyse von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten geeignet, da die Hydrophobizität der ADCs mit steigender Beladung ebenfalls steigt. Ein Antikörper ohne gebundenen Wirkstoff eluiert zuerst von der Säule, während der Antikörper mit der höchsten Beladung als letztes eluiert. Das Verhältnis kann über einen Vergleich der Peakflächen bestimmt werden.

BioPro HIC HT



Column Pressure
22–33 MPa

1. DAR 0
2. DAR 2
3. DAR 4
4. DAR 6
5. DAR 8

Column size:	100 x 4.6 mm ID
Part No:	BHH00SQ3-1046PTH
Eluent:	A) 20 mM NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 (pH 7.0) containing 1.0 M $(NH_4)_2SO_4$
	B) 20 mM NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 (pH 7.0)/2-propanol (85/15)
Temperature:	25 °C
Detection:	UV at 280 nm
Injection:	10 µL
Sample:	Brentuximab vedotin (2.5 mg/mL)

Abbildung 3: BioPro HIC HT und BioPro HIC BF eignen sich durch die hohe Auflösung für die Bestimmung des Wirkstoff-zu-Antikörper Verhältnisses von ADCs.

2018 hat YMC die BioPro HIC BF Phase eingeführt, welche für die Analyse und Aufreinigung im Labormaßstab von ADCs, Antikörpern und anderen Proteinen optimiert wurde.

Außerdem konnte YMC 2020 eine neue HIC Phase für eine schnellere Trennung einführen. BioPro HIC HT mit einer Partikelgröße von 2,3 µm ist für schnelle Analysen konzipiert und ist ideal für die Bestimmung des Wirkstoff-zu-Antikörper-Verhältnisses.

Reversed-Phase Chromatographie (RP)

Die Grundzüge der RP-Chromatographie sind die gleichen wie für HIC. Hydrophobe Gruppen der stationären Phase binden die hydrophoben Biomoleküle reversibel. Die Elutionskraft der mobilen Phase richtet sich nach ihrer Hydrophobizität. Die Analyten eluieren schneller je apolarer der Eluent ist.
Für RP-Chromatographie werden typischerweise hydrophobere Materialien verwendet als für HIC. Diese führen zu einer stärkeren Wechselwirkung zwischen stationärer Phase und Biomolekül, sodass unpolare organische Lösungsmittel wie Acetonitril benötigt werden, damit die Biomoleküle eluieren.
Historisch bedingt wurde RP-Chromatographie üblicherweise nicht für die Trennung von großen Biomolekülen verwendet. Die Elution von Biomolekülen benötigt harsche Bedingungen, die klassische RP-Säulen (reines Silika) nicht tolerieren. Die Einführung von Hybrid-Silika-Partikeln mit hoher chemischer Stabilität macht diese Trennung möglich. Zum Beispiel ist die kürzlich eingeführte YMC-Triart Bio C4 Phase, ein Hybridpartikel mit 300 Å Porengröße, speziell für die RP-Trennung intakter monoklonaler Antikörper und anderer großer Proteine entwickelt worden.
Für kleinere Proteine hat YMC ebenfalls eine Hybrid-Silika-Phase mit großer Pore entwickelt: YMC-Triart Bio C18. Diese Säulen sind auch gut für Peptid-Mapping geeignet, was eine wichtige Methode für die Strukturaufklärung darstellt. Beide Phasen sind sowohl für die (U)HPLC, als auch für den semipräparativen Maßstab geeignet.

Zusammenfassung

Biologika gewinnen weiter an Bedeutung in der Pharmaindustrie, da sie sehr selektive Therapiemöglichkeiten eröffnen. Schon jetzt ist das meist verkaufte Arzneimittel ein monoklonaler Antikörper und weitere befinden sich in späten präklinischen Phasen. Dabei werden die eingesetzten Biologika immer komplexer wie Antikörper-Wirkstoff-Konjugate, Antikörper-Chimären oder Nanobodies. Währenddessen steigen die Anforderungen an die Freigabe stetig weiter. Hier leistet in der Analyse und Aufreinigung von biologischen Pharmazeutika die Chromatographie einen wertvollen Beitrag, sowohl in der Qualitäts- und Stabilitätskontrolle, als auch in der Produktion.
Für die Herstellung hat sich in den letzten Jahren der Trend des kontinuierlichen Prozesses durchgesetzt: vor allem für vorgeschaltete Stufen wie Zellwachstum und –gewinnung wird dies angewendet. Die Entwicklung in nachgeschalteten Prozessen wird maßgeblich durch SMB mit Dual-Affinitäts-Säulentechnologie vorangetrieben. Damit entwickelt sich die Biologikaherstellung von der Chargenproduktion hin zu kontinuierlichen Prozessen, für die ebenfalls schon Lösungen wie YMC Contichrom Twin Capture SMB bestehen. Besonders dieser Ansatz hat gezeigt, dass enorme Produktivitätssteigerungen in der Aufreinigung möglich sind. Um auch in Zukunft geeignete Materialien und Systeme für komplexe Biologika zu bieten, entwickeln Chromatographiehersteller wie YMC immer neue Lösungsansätze.

Literatur:

1. Randi Hernandez, “Supplement: Integrated Continuous Manufacturing of Biologics,” Genetic Engineering and Biotechnology News, Sept. 14, 2017, https://www.genengnews.com/magazine/300/supplement-integrated-continuous-manufacturing-of-biologics/.
2. Ned Pagliarulo, “Pharma’s Slow Embrace of Continuous Manufacturing,” BioPharma Dive, Sept. 24, 2018, https://www.biopharmadive.com/news/pharmas-slow-embrace-of-continuous-manufacturing/532811/.
3. James Angelo et al., “Scale-Up of Twin-Column Periodic Countercurrent Chromatography for MAb Purification,” BioProcess International, April 20, 2018, https://bioprocessintl.com/2018/april-2018/scale-up-of-twin-column-periodic-countercurrent-chromatography-for-mab-purification/.
4. Xiuxia Sun et al., “Effects of Drug-Antibody Ratio on Pharmacokinetics, Biodistribution, Efficacy, and Tolerability of Antibody-Maytansinoid Conjugates,” Bioconjugate Chem. 28, no. 5 (2017): 1371–81, https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00062.
5. Sarah Houlton, “Back to Basics,” Chemistry World, Dec. 12, 2019, https:// www.chemistryworld.com/news/pharmaceuticals-roundup-2019/4010812. article.