

LP-TIPP Typen von Laborwasser

Man unterscheidet im Labor drei verschiedene Kategorien von Wasser:

- **Typ I** (oft als „Reinstwasser“ bezeichnet): Diese Qualität ist für besonders kritische Anwendungen erforderlich. Wasser des Typs I wird speziell für die Analytik und die Molekularbiologie benötigt.
- **Typ II** (so genanntes „Reinwasser“ oder „DI-Wasser“): Diese Wasserqualität wird für allgemeinere und weniger kritische Laboranwendungen eingesetzt. Wasser des Typs II wird benötigt zum Herstellen von Reagenzien oder Pufferlösungen und zum Speisen von Laborsystemen mit speziellen Anforderungen.
- **Typ III** (so genanntes „RO-Wasser“): Diese Wasserqualität ist für Standardanwendungen vorgesehen, die zur Speisung von Laborsystemen dienen, wie Autoklaven, Geschirrspüler etc. sowie zur Herstellung unkritischer Puffer.



Reinstwasser für die HPLC-SEC-Analytik

Aggregatzustände eines monoklonalen Antikörpers bestimmen

Um die Reinheit von Biopolymeren zu bestimmen, wird oftmals die Size Exclusion Chromatography (SEC) eingesetzt. Lesen Sie, wie die SEC für die qualitative Untersuchung eines monoklonalen Antikörpers während eines Downstream-Prozesses genutzt wird.

KATRIN TÖPPNER*, DIRK HANSEN** UND ELMAR HERBIG***

Die HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ist ein analytisches Verfahren zur Trennung, Identifizierung und Quantifizierung mittels Flüssigkeitschromatographie. Im Gegensatz zu anderen Varianten der HPLC von Biopolymeren (Ionenaustausch-, hydrophobe Interaktions-, Umkehrphasen-Chromatographie), die alle im Gradientenmodus betrieben werden, ist die SEC (Size Exclusion Chromatography = Größenausschlusschromatographie) gemeinhin eine isokratische Methode [1].

In der Größenausschlusschromatographie (SEC), wozu die Gelpermeationschromatographie (Gel Permeation Chromatography = GPC) und die Gelfiltration (eine spezielle Form der SEC unter wässrigen Bedingungen) zählen, arbeitet man mit porösen Partikeln als stationäre Phase. Kleine Moleküle können in die Poren eindringen und werden deshalb retentiert, wogegen sehr große Moleküle ausgeschlossen werden und mit der Lineargeschwindigkeit die Säule durchströmen. Die Trennung erfolgt also nach der Molekülgröße, wobei große Moleküle zuerst und kleine Moleküle später die Säule verlassen [2].

Bei dieser Methode wird mit konstanter Fließmittelzusammensetzung gearbeitet. Um enthalpische Effekte in der SEC minimal zu halten, wird ein starkes Fließmittel entsprechend einer hohen Fließmittel-

stärke (Elutionsstärke) benutzt. In der SEC ist dies in aller Regel ein Puffer mit eingestelltem pH-Wert und Salzzusatz. Um die Methode erfolgreich anzuwenden, ist eine SEC-Säule zu wählen, die zur Lösung des entsprechenden Problems geeignet ist. Der Weg zum Erfolg liegt dann in der Auswahl eines geeigneten Fließmittels, eines optimalen Flusses, des Injektionsvolumens und der Dosierkonzentration sowie in der Behandlung der Säule, sowohl beim Betrieb als auch der „außerbetrieblichen“ Handhabung (Regeneration und Aufbewahrung) [1].

SEC – bioanalytisch häufig eingesetzt

Die SEC ist eine häufig angewandte Trennmethode für Biopolymere. Aktuelle Anwendungsfelder sind:

- Bestimmung des Molekulargewichtes z.B. von Antikörpern (Immunglobulin G, s. Bild S. 38), Peptiden und Proteinen,
- Werkzeug zum Studium von Konformitätsänderungen,
- nachgelagerte Produktaufbereitung und -reinigung (downstream processing) und eine spezielle Anwendung von SEC-Säulen mit eingeschränkter Zugänglichkeit, so genannte Restricted-Access-Säulen für die automatisierte Probenaufbereitung von Peptid- und Proteingemischen [1].

Proteinarzneistoffe haben in den letzten Jahrzehnten eine wichtige Position auf dem Arzneimittelmarkt erreicht. Zu diesen Biopharmazeutika gehören unter anderem therapeutische Enzyme, Gerinnungsfaktoren, zahlreiche Hormone wie Insulin, Epoetin oder Wachstumshormone, monoklonale Antikörper (mAB), sowie biotechnologisch hergestellte Impfstoffe [3].

Bei der rekombinanten Herstellung therapeutischer Proteine und Antikörper in der biotechnologischen Produktion ist die SEC-Analytik im Downstream-Prozess (Aufreinigung) eine Standardmethode zur Bestimmung von Reinheit und Aggregatzuständen des Zielmoleküls.

Die Bestimmung von Molekulargewichtsunterschieden zum Nachweis von Verunreinigungen und Aggregaten basiert auf der Nutzung von hochreinen Laufmitteln (mobile Phase), die keinerlei Wechselwirkung mit der stationären Phase eingehen.

Wasser speziell zur SEC mit der entsprechenden Qualität kann bei diversen Herstellern gekauft werden oder durch ein Wasseraufbereitungssystem z.B. dem Arim Pro VF-System direkt vor Ort und nach Bedarf kostengünstig hergestellt werden.

Als Beispiel für den Einsatz der SEC-Analytik ist hier die qualitative Untersuchung eines rekombinant hergestellten monoklonalen Antikörpers aufgeführt. Die verwendete Lösung stammt aus hauseigener Produktion. Die während des Upstream-Prozesses (Herstellung von Lösungen) entstehenden Verunreinigungen aus dem Fermentationsmedium (Host Cell DNA, Host Cell Proteine, Komponenten des Mediums wie Albumine, Insulin und Transferrin), sowie Keime und Endotoxine müssen im Verlauf des Downstream-Prozesses verringert werden. Hierbei ergeben sich Verunreinigungen (Zugabe von Proteasen, Leakage Protein A). Das Produkt selbst bildet Verunreinigungen in Form von gespaltenen, aggregierten Antikörpern, deamidierten oder oxidierten Formen des Antikörpers oder nicht korrekt gefalteten Molekülen [4], die beobachtet werden müssen.

* K. TÖPPNER:

Sartorius Stedim Biotech GmbH, 37079 Göttingen

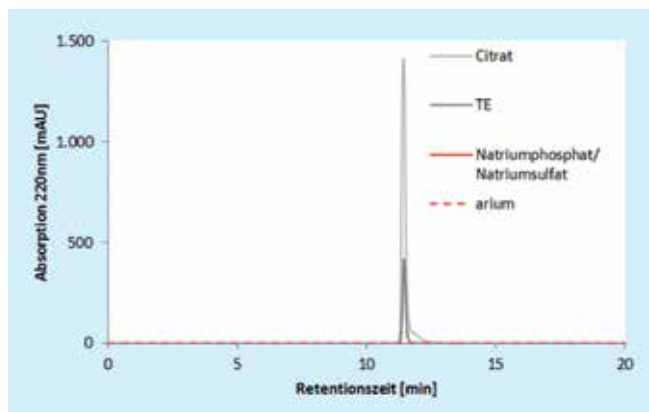
DR. D. HANSEN:

Phenomenex Ltd., 63741 Aschaffenburg

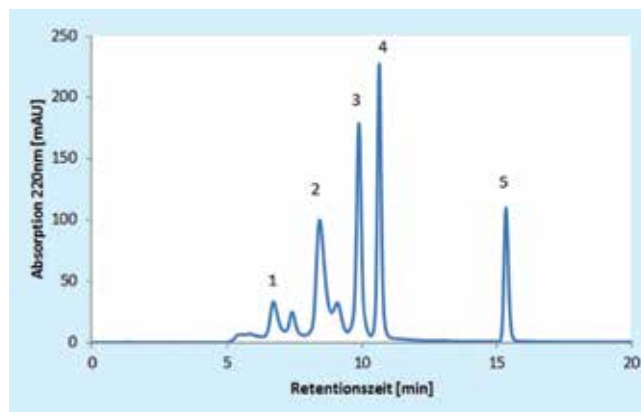
DR. E. HERBIG:

Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, 37075 Göttingen, Tel. +49-551-308-0

Bilder: Sartorius



1 HPLC-SEC-Analyse verschiedener Pufferlösungen und Arium Pro VF-Reinstwasser. Mobile Phase: 0,1 M Natriumphosphat/Natriumsulfat pH 6,6, Leitfähigkeit 23 mS/cm in Arium Pro VF-Reinstwasser



2 HPLC-SEC-Analyse eines Proteingemisches (Standardproteine, s. Tabelle 3)

Zur Qualitätskontrolle der Reinheit des Zielproteins wird unter anderem die SEC-Analytik zum Nachweis von aggregierten Antikörpern über Molekulargewichtstrennung verwendet.

Vorversuche mit Reinstwasser und Puffersubstanzen

In Vorversuchen wurde die Brauchbarkeit des eingesetzten Reinstwassers für die SEC-Analytik überprüft. Das Reinstwasser wurde wie in [5] beschrieben hergestellt und sowohl für die Vorversuche als auch für die weiteren Tests zur Bestimmung von Aggregatzuständen von monoklonalen Antikörpern verwendet. In den Vorversuchen sollte geklärt werden, ob das verwendete Arium Pro VF (ein Vorgängermodell mit den gleichen technischen Spe-

zifikationen zur Reinstwasserproduktion wie das aktuelle System, s. Seite 38) für die SEC-Analytik bei der Bestimmung von Aggregaten und Monomer eines monoklonalen Antikörpers eingesetzt werden kann. Weiterhin wurde der Einfluss verschiedener Puffersubstanzen getestet.

Die eingesetzten Geräte und Materialien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die verwendete Phenomenex-Säule Yarra SEC 3000 (3 µm), ist eine mit modifiziertem Kiesel gefüllte SEC-Säule. Die Modifizierung des hochreinen Kieselgels neuer Generation sorgt für eine minimierte Adsorption von Proteinen, was für eine sehr gute Wiederfindung und verlässliche Quantifizierung unabdingbar ist. Das Material in der verwendeten Yarra-Säule hat eine Porengröße von 290 Å. Dies ermöglicht einen linearen Bereich für native Proteine zwischen 5 und 700 kDa [6].

Zur Bestimmung der Reinheit des Reinstwassers wurde dieses mit und ohne Zugabe von Puffersubstanzen injiziert. Die Puffersubstanzen wurden wie folgt in Reinstwasser angesetzt:

- TE=1% 1 M TRIS, 0,2% 0,5 M EDTA, 0,01% SDS pH 8, Leitfähigkeit 1,4 mS/cm
- Citrat=20 mM Citronensäure Monohydrat pH 3,6 Leitfähigkeit 1,7 mS/cm
- Natriumphosphat/Natriumsulfat=0,1 M Natriumphosphat/Natriumsulfat pH 6,6 Leitfähigkeit 23 mS/cm sowie
- Arium VF-Reinstwasser ohne Zusätze als Kontrolle.

Die Chromatogramme der SEC-Analytik wurden aufgenommen (s. Abb. 1) und zeigen, dass das verwendete Reinstwasser keinerlei Wechselwirkung mit der stationären Phase eingeht.

Die Zugabe von 0,1 M Natriumphosphat/Natriumsulfat für die mobile Phase zeigt ebenfalls einen geraden Basislinien-

verlauf ohne Peaks. Im Gegensatz dazu zeigt die Zugabe von Citrat und TE, dass hier Verunreinigungen beziehungsweise Substanzen enthalten sind, die Wechselwirkungen mit der Säule eingehen und sich in Peaks äußern und dadurch das eigentliche Chromatogramm verfälschen können.

Nachdem mit Vorversuchen geklärt wurde, dass das Arium Pro VF-Reinstwasser als Lösemittel für die Puffersubstanzen des Laufpuffers verwendet werden kann, wurde die eigentliche Analytik der Proben durchgeführt. Um bei der SEC-Analyse reproduzierbare Resultate zu erzielen, sind stets frisch hergestellte Fließmittel zu verwenden. Der pH-Wert und die Ionenstärke müssen auf die vorliegenden Proben optimiert werden [1]. Vor dem Aufbewahren der Säule sollte man diese zunächst mit Laufpuffer und dann mit Wasser, das 0,05% Natriumazid enthält, spülen und die Säule in diesem Zustand aufbewahren [1]. Die für die Säule verwendete mobile Phase (0,1 M Natriumphosphat/0,1 M Natriumsulfat, pH 6,6, Leitfähigkeit 23 mS/cm) ist in Arium Pro VF-Reinstwasser, das eine ursprüngliche Leitfähigkeit von 0,05 µS/cm oder 18,2 MOhm, kompensiert auf 25 °C hatte, angesetzt. Die SEC-HPLC wird mit den in Tabelle 2 aufgelisteten Einstellungen/Parametern gefahren. Zum Spülen nach Gebrauch und zur Lagerung der Säule wird Arium Pro VF-Reinstwasser+0,05% Azid eingesetzt. Beide Lösungen werden zur Vorbereitung für die HPLC-SEC durch Filtration über eine Sartolab BT 500 bottle top 0,2 µm Vakuumfiltrationseinheit entgast. Zur Probenvorbereitung werden die zu injizierenden Proben über Sartorius Minisart RC4 (17821, 0,2 µm) vorfiltriert und in Vials (Wicom WIC 42000) abgefüllt.

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Materialien

	Material
HPLC	Dionex (Pumpe/Probennehmer/Säulenofen/UV-Detektor)
Säule	Phenomenex Yarra SEC 3000 (00H-4513-KO 300x7,8 mm)
Vorsäule	Phenomenex Securityguard GFC 3000 (4x3 mm Artikelnr. AJO-4488)
Mobile Phase	0,1 M Natriumphosphat/0,1 M Natriumsulfat pH 6,6, Leitfähigkeit 23 mS/cm in Arium Pro VF-Reinstwasser

Tabelle 2: SEC-HPLC-Parameter

Parameter	Wert
Fluss	1 ml/min
Zeit	20 min
Maximaldruck	180 bar
Temperatur Säulenofen	25 °C
Injektionsvolumen	5 µl
UV-Detektor	220, 260, 280 nm

Durchführung des Tests und Ergebnisse

Säule und Vorsäule werden mit der mobilen Phase bei 1 ml/min bis zum Erreichen der Basislinie gespült. Mittels UV-Detektor wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 220, 260 und 280 nm in Milli-Absorptionseinheiten (mAU) aufgenommen. Die Trennleistung der Säule wird mit Proteinen bekannter Größe getestet (s. Abb. 2 und Tab. 3). Anhand der logarithmierten Molekülgrößen der Standardproteine und der ermittelten Retentionszeiten lässt sich eine Standardgerade erstellen, die die Berechnung unbekannter Proben anhand ihrer Retentionszeiten zulässt.

Die Trennleistung der Säule wird regelmäßig mit dem Standardproteingemisch überprüft. Beeinflusst wird die Trennleistung durch die Reinheit der Pufferzusätze des Laufmittels, Wechselwirkung des Laufmittels mit der Säule sowie der Zusammensetzung der zu analysierenden Proben. Die eingesetzten Puffer dürfen keine Wechselwirkung mit der stationären Phase eingehen. Die SEC-Analytik findet ihren Einsatz in der Qualitätskontrolle und wird ebenso bei der Optimierung und Entwicklung von Aufreinigungsprozessen eingesetzt.

Im Folgenden werden SEC-Chromatogramme während des Downstream-Prozesses gezeigt. In einer Reihe aufeinander folgender Schritte wird der monoklonale Antikörper gereinigt. Zunächst erfolgt eine Zellernte mit Klärung und Konzentrie-

Tabelle 3: Verwendete Standardproteine

Peak	Protein	Hersteller	Bestellnummer	MW [kDa]	Ret. [min]
1	Thyroglobulin (Monomerpeak)	Sigma	T 1126	670	6,73
2	γ Globulin (Monomerpeak)	Sigma	G 5009	150	8,44
3	OV Albumin (Monomerpeak)	Sigma	A 5503	45	9,89
4	Ribonuklease	Sigma	R 5000	14	10,65
5	Adenin	Sigma	A 8626	0,14	15,35

Tabelle 4: Anteile an Aggregaten eines mAB während des Aufreinigungsprozesses

	mAB Aggregate [%]	mAB Monomer [%]
nach Ernte und erster Klärung	10	90
nach Protein A-Affinitätschromatographie	3	97

rung. Im Anschluss daran wird ein Capture-Schritt (Protein A-Affinitätschromatographie), gefolgt von einem Zwischenschritt zur Entfernung von Kontaminanten (z.B. Kationenaustauscher) sowie ein Aufreinigungsschritt zum Polishing (Anionenaustauscher) durchgeführt. Anschließend folgt eine Virusfiltration und eine finale Ultrafiltration [vergleiche auch 7].

Um die Reinheit des Antikörpers zu bestimmen, wird eine SEC-Analytik von Proben während des Prozesses durchgeführt. Gezeigt werden Chromatogramme nach der ersten Klärung der Zellernte (s. Abb. 3) und nach der Protein A-Affinitätschromatographie (s. Abb. 4).

Die HPLC-Analyse nach der ersten Klärung der Ernte (s. Abb. 3) zeigt eine Vielzahl an Kontaminationen, z.B. Host-Cell-DNA, Host-Cell-Proteine, Endotoxine, Komponenten des Mediums, produktbedingte Verunreinigungen, sowie Aggrega-

te. Diese gilt es in den nachfolgenden Schritten zu entfernen. Im folgenden Schritt, der Protein A-Chromatographie wird die gezielte Affinität von Protein A zu Immunglobulin G (IgG) genutzt. Eingesetzt wird ein Sartorius Sartobind Protein A-Adsorber (93PRAP06HB-12-A). Die Probe nach der ersten Klärung (s. Abb. 3) wird über die Protein A-Einheit filtriert. Das IgG bindet an den Protein A-Adsorber, während die Kontaminanten den Adsorber durchlaufen. Die Elution von Protein A wird per HPLC-SEC-Analyse untersucht (s. Abb. 4). Die analysierte Elutionsprobe der Protein A-Affinitätschromatographie zeigt eine deutliche Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers. Der Anteil der Aggregate und der Kontaminanten wird stark vermindert. Die Auftrennung mittels HPLC-SEC-Analyse zeigt zwei Peaks (s. Abb. 4). Diese lassen sich anhand ihrer Retentionszeiten mittels des

Wave goodbye



SPECTRO

**ED
RFA**

Das ED-RFA-Spektrometer mit der Leistung eines WD-RFA-Geräts zu deutlich geringeren Kosten.

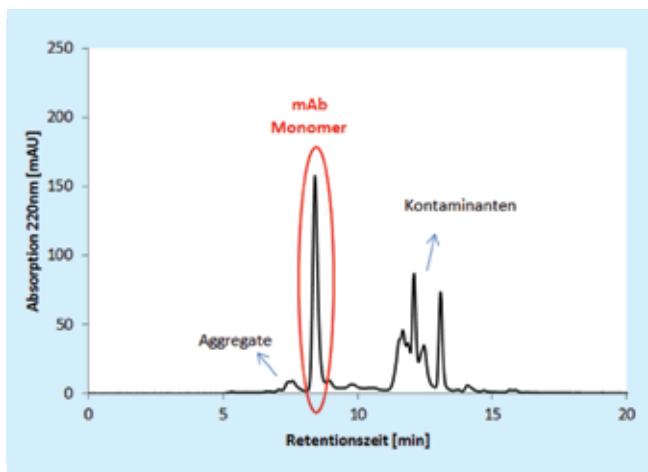
Das neue ED-RFA Spektrometer SPECTRO XEPOS stellt wellenlängendispersive RFA-Spektrometer klar in den Schatten. Denn das preisgünstige Gerät bietet selbst bei kritischen Anwendungen vergleichbare oder bessere Leistungen.

Durch neue Entwicklungen bei Anregung und Detektor erreicht das SPECTRO XEPOS außergewöhnliche Werte für Messempfindlichkeit und Nachweisgrenzen. Und mit der einzigartigen TurboQuant-II-Software lassen sich auch unbekannte Flüssigkeiten, Pulver und Feststoffe schnell und präzise analysieren.

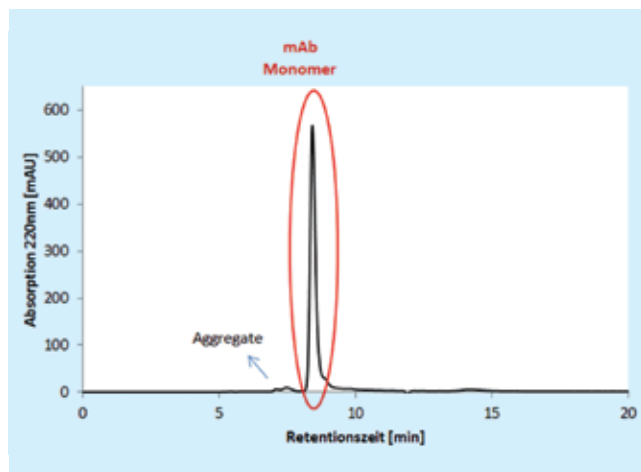
www.spectro.de/xepos

AMETEK®
MATERIALS ANALYSIS DIVISION

► Besuchen Sie uns auf der Analytica 2016, 10.-13. Mai, München, Halle 2, Stand 201



3 HPLC-SEC-Analyse eines monoklonalen Antikörpers nach Ernte und erster Klärung im Downstream-Prozess



4 HPLC-SEC-Analyse eines monoklonalen Antikörpers nach Protein A-Affinitätschromatographie im Downstream-Prozess

Standards in molekulare Größen berechnen. Die Peakflächen der erhaltenen Peaks geben Aufschluss über den Anteil von Aggregaten und Monomer in den mAb-Lösungen (s. Tab. 4). Die SEC-Analyse der Anteile von Aggregaten und Monomer des mAb nach Ernte und erster Klärung (s. Abb. 3) zeigt noch 10% an verunreinigenden mAb-Aggregaten (s. Tab. 4). Der weitere Aufreinigungsschritt mittels Protein A-Affinitätschromatographie zeigt in der SEC-Analyse (s. Abb. 4) eine Verringerung des Aggregatanteils auf 3% (s. Tab. 4). Weitere Kontaminanten sind in der SEC-Analyse nicht mehr nachweisbar. Die erzielten Ergebnisse belegen eindeutig die Brauchbarkeit der eingesetzten Methode.

Fazit: Reinstwasser für HPLC-SEC geeignet

Die HPLC-SEC-Analytik ist ein wichtiges Werkzeug zum Nachweis der Reinheit therapeutischer Proteine, und wird im Herstellprozess von monoklonalen Antikörpern als Standardmethode zur Bestimmung des Aggregatgehaltes und dem Anteil an Verunreinigungen weltweit eingesetzt. Da die Integrität der Proteine (hier des monoklonalen Antikörpers) durch Temperaturänderungen, mechanische Effekte sowie durch pH-Wert-Änderungen und UV-Licht während seiner Produktion und des gesamten Lebenszyklus gefährdet ist (siehe auch [3]), ist es von hoher Wichtigkeit, eine verlässliche Methode zur Bestimmung der Reinheit eines mAb zu etablieren. Im Rahmen der hier gezeigten Methodik ließen sich die Aggregatzustände der monoklonalen Antikörper sehr gut bestimmen, zudem konn-



DIGITAL: Mehr zu diesem Thema finden Sie unter dem Stichwort „Sartorius Reinstwasser“ auf www.laborpraxis.de.

EVENTS: Sartorius ist auf der Analytica vom 10. bis 13. Mai (Halle B2, Stand 407).

te eine sehr gute Aufreinigung nachgewiesen werden. Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Durchführung der Methodik ist die Sauberkeit der eingesetzten Substanzen/Lösungen und vor allem der des eingesetzten Wassers als Basis der Lösungen. Wie in den Vorversuchen gezeigt (s. Abb. 1) eignet sich das von Arium Pro VF-produzierte Reinstwasser als Ansatzmittel für die Puffersubstanzen und Salze der mobilen Phase während der SEC. Bei Verwendung dieses Reinstwassers sind keine Geisterpeaks [8] durch Wechselwirkung zwischen mobiler und stationärer Phase und keine UV-aktiven Verunreinigungen oder Peakverschiebungen nachzuweisen. Starke organische Verunreinigungen (ausgedrückt in Form von hohen TOC-Werten) könnten sich in Peakverschiebungen äußern, da die Säule unpolarer wird. Schwermetallsalze (Komplexbildner) könnten Ladungen in der Säule abschirmen, was zu Faltungen der Proteine führen könnte (vermehrte Aggregatbildung der Antikörper). Diese Annahmen müssen in weiteren Versuchen abgeklärt werden.

Über den erfolgreichen Einsatz von Arium Pro-Reinstwasser bei der HPLC zur Zuckanalytik wurde bereits berichtet [9]. Die dabei und bei der hier gezeigten Analytik gemachten guten Erfahrungen hinsichtlich der Nutzbarkeit als mobile Phase sollen in Zukunft auf andere Trenn-

techniken z.B. der UHPLC ausgedehnt werden. ■

Literatur

- [1] Quaglia M., Machtejevas E., Hennessy T. und Unger K.K.: Gelfiltration-Größenausschluss-Chromatographie von Biopolymeren-Optimierungsstrategien und Fehlersuche. Aus HPLC richtig optimiert. Ein Handbuch für Praktiker. Herausgeber Stavros Kromidas. Wiley-VCH, Weinheim (2006)
- [2] Schmid Thomas: Vorlesung ETH Zürich. Analytische Chemie (für Biol./Pharm. Wiss.) Teil "Chromatographische und elektrophoretische Trennverfahren" Seite 58, (2011)
- [3] Frieß W. u. Ruberg E.-M.: Proteinanzneistoffe – Sensibel und stressanfällig; Pharm. Ztg., 156 JG., 50. AUSG., (2011)
- [4] Richter A., Jostameling M., Müller K., Hermann A. and Pitschke M.: Quality control of antibodies for human use. Aus: Antibodies volume 1, Production and Purification edited by G. Subramanian, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (2004)
- [5] Nitzki F., Herbig E.: In situ Hybridisierung – Die Bedeutung von Reinstwasser für RNA Technologien. GIT Labor-Fachzeitschrift 57. Jahrgang, 3, (2013)
- [6] Phenomenex Chromatography Product Guide S.311 (2015/16)
- [7] Fish Brendan: Concepts in development of manufacturing strategies for monoclonal antibodies. Aus: Antibodies volume 1, Production and Purification edited by G. Subramanian, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (2004)
- [8] Gottwald, W.: RP-HPLC für Anwender. Reihe: Die Praxis der instrumentellen Analytik, Herausgeber Gruber, U. und Klein, W., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Seite 7-8 (1993)
- [9] Töppner K. und Herbig E.: Reinstwasser für die HPLC, Labo, Juni (2013)