

08 May 2018

**Stichwörter:**

Säugetierzellen, mAbs, Klärung, Kieselgur, Zentrifugation, Proteinaufreinigung

# Schnelle Ernte von Säugetierzellen ohne Zentrifugation zur Antikörperaufreinigung mit dem Sartoclear Dynamics® Lab Filtrationssystem

James Stephenson, Catherine Bladen and Ian Wilkinson\*

Absolute Antibody Ltd, Wilton Centre, Redcar, TS10 4RF, United Kingdom  
[www.absoluteantibody.com](http://www.absoluteantibody.com)

\* Correspondence

E-mail: [wilkinson@absoluteantibody.com](mailto:wilkinson@absoluteantibody.com), Tel: +44.1865.920810

## Zusammenfassung

Expressionssysteme für monoklonale Antikörper benötigen in der Regel ein Signalpeptid, um die Antikörpersekretion in die Zellkulturmedien zu ermöglichen. Obwohl dadurch die Komplexität der Aufreinigung reduziert wird und die Notwendigkeit des Zellaufschlusses entfällt, müssen dabei kostenaufwändige und/oder zeitraubende Verfahren eingesetzt werden, um die Zellen von der Antikörper enthaltenden Zellkulturflüssigkeit abzutrennen. Die vorliegende Untersuchung beschreibt unsere Tests mit Sartoclear Dynamics® Lab V, einem neuartigen System zur schnellen Klärung von Zellkultursuspensionen ohne Zentrifugationsschritt oder andere kostenintensive Geräte.

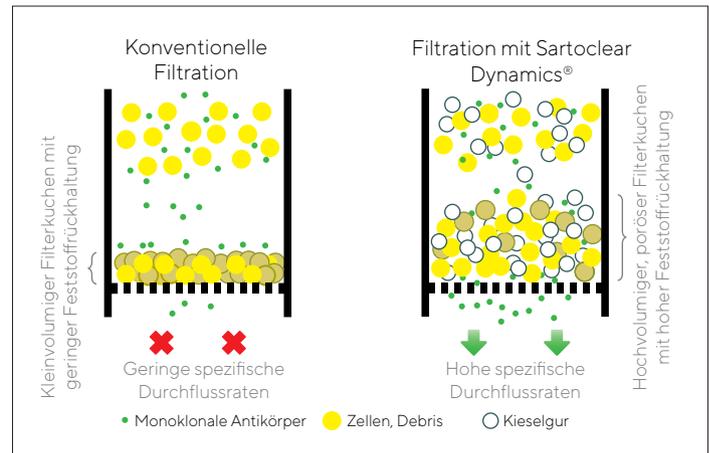
# Einleitung

Monoklonale Antikörper werden für ein breites Anwendungsspektrum z.B. in der biopharmazeutischen Entwicklung, Grundlagenforschung und In-vitro-Diagnostik verwendet. Die Produktion von Antikörpern mittels Säugetierzellen, ob standardmäßige Produktion mit Hybridomazellen oder rekombinante Produktion in Zelllinien chinesischer Hamsteroovarien (CHO) sowie menschlicher embryonaler Nierenzellen (HEK), erfordert einen Prozess zur Abtrennung der Zellen von der antikörperhaltigen Zellkulturflüssigkeit. Im Bioreaktor-Maßstab, der normalerweise über 50 Liter umfasst, werden dazu Verfahren eingesetzt wie kontinuierliche Zentrifugation und Tiefenfiltration.<sup>1,2</sup>

Im Forschungsmaßstab (normalerweise weniger als 10 Liter Zellkultur pro Antikörper) erweisen sich diese Verfahren hingegen als unpraktikabel und kostspielig. Bei der am häufigsten zitierten Methode zur Klärung im Forschungsmaßstab kommt ein initialer Zentrifugationsschritt mit anschließender Filtration des geklärten Überstands durch ein 0,2-, 0,22- oder 0,45-µm-Filter zur Anwendung, und zwar entweder mit einem handbetriebenen Spritzenvorsatzfilter oder einem Vakuum-Flaschenaufsatzfilter. Diese Lösungen sind preisgünstig und einfach zusammen mit Standardgeräten zu handhaben, die in den meisten biotechnologischen Laboratorien vorhanden sind. Wegen des flachen Designs verblocken diese Filter jedoch leicht durch gelöste Partikel im Submikrometerbereich.<sup>2</sup>

Bei Absolute Antibody exprimieren wir transient rekombinante Antikörper in HEK293- und CHO-K1-Zellen, wobei wir normalerweise, bei einer wöchentlichen Gesamtproduktion von etwa 100 Litern Zellen, mit ca. 50 Antikörpern pro Woche in einer Größenordnung von 30 ml bis zu 20 Litern arbeiten. In den letzten sechs Jahren haben wir für alle Antikörper Zentrifugation und anschließend Flaschenaufsatzfilter verwendet. Mit steigender Produktionskapazität ist auch der Bedarf an Zentrifugen gestiegen. Im Laufe der Zeit haben wir nach alternativen Lösungen Ausschau gehalten, einschließlich der Verwendung von Filtern für Homebrewing und Ausflockungsmitteln wie Chitosan.<sup>3</sup> Diese Methoden haben sich als langsam, anfällig für Verblockungen, durchsatzschwach und qualitativ minderwertig (z. B. mit Endotoxinen kontaminiert) erwiesen.

Das Filtrationssystem Sartoclear Dynamics® Lab V wurde entwickelt, um den mit der Klärung von Säugetierzellkulturen verbundenen Zeit- und Arbeitsaufwand zu reduzieren. Die Zugabe von Kieselgur (DE) zur Zellkultur unterstützt die Bildung eines porösen Filterkuchens, der das Verblocken des Filters verhindert und gleichzeitig die schnelle Abtrennung von Zellen und Zelldebris aus der Probe ermöglicht (Abbildung 1). Auf diese Weise lässt sich der Zentrifugationsschritt vermeiden, Probleme mit der Zentrifugenkapazität und -verfügbarkeit werden umgangen und die Filter verblocken nicht. Wir haben das Filtrationssystem Sartoclear Dynamics® Lab V getestet und mit unserem Standardprozess verglichen.



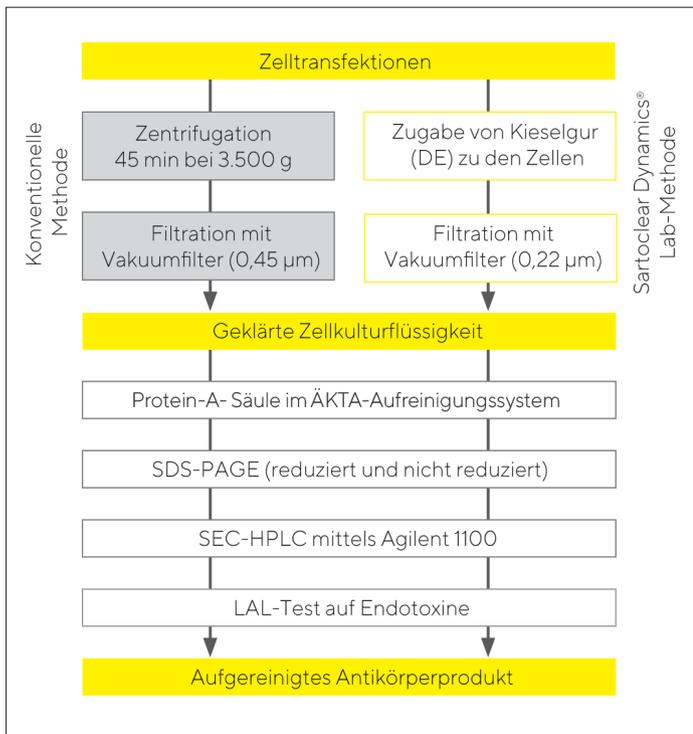
**Abbildung 1: Methoden zur Zellkulturklärung mittels konventioneller Filtration und Filtration mit Sartoclear Dynamics® Lab.**

## Materialien und Methoden

Suspensionsadaptierte HEK293- oder CHO-Zellen werden in serumfreien Medien kultiviert, die mit DNA-Plasmiden zur Codierung der schweren und leichten Kette des monoklonalen Antikörpers transfiziert werden. 6 bis 14 Tage nach der Transfektion erfolgt die Zellernte zur Aufreinigung. Bei einer normalen Expressionscharge von 1 Liter würde unser ursprünglicher Klärungsprozess eine 45-minütige Zentrifugation mit 3.500 g in einer Tischzentrifuge (2 x 500 ml) und anschließende Filtration durch mindestens einen Vakuum-Flaschenaufsatzfilter mit 0,45-µm-PES-Membran erfordern. Der filtrierte Überstand wird zur Antikörperbindung und -elution bei niedrigem pH in ein ÄKTA-Aufreinigungssystem mit einer 5-ml-Protein-A-Säule gefüllt. Der Antikörper wird neutralisiert und entweder weiteren Aufreinigungsschritten unterzogen (z. B. Kationenaustausch

oder Größenausschluss-Chromatographie) oder gelangt je nach Anforderungen der Antikörpercharge direkt in die Qualitätskontrolle. Die Qualitätskontrolle wird mittels SDS-PAGE (unter nicht reduzierenden und reduzierenden Bedingungen), SECHPLC, LAL-Test und ggf. ELISA für die Messung der Bindungsaktivität durchgeführt (Abbildung 2).

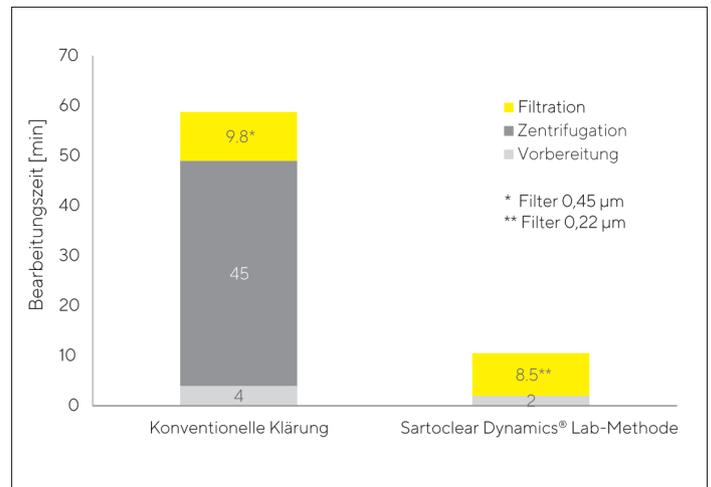
Im modifizierten Downstream-Prozess werden die Schritte Zentrifugation und Filtration durch Sartoclear Dynamics® Lab V ersetzt. Bei einer 1-Liter-Kultur wurden einem Liter Zellen 20 g Kieselgur-Filtrierhilfe hinzugegeben. Zellen und Kieselgur werden kräftig gemischt und anschließend direkt in eine im Sartoclear Dynamics® Lab Kit enthaltene Vakuumfiltereinheit Typ Sartolab® RF mit einem Aufnahmevermögen von 1000 ml und 0,22-µm-PES-Membran gegossen. Nach Anlegen eines Vakuums wird die geklärte Zellkulturflüssigkeit in einer 1-Liter-Flasche aufgefangen. Danach durchläuft das Filtrat den oben beschriebenen Aufreinigungs- und Qualitätskontrollprozess.



**Abbildung 2: Workflow des Downstream-Prozesses in der Produktion rekombinanter Antikörper bei Absolute Antibody.** Die grauen Felder veranschaulichen den ursprünglichen Klärungsprozess mit Zentrifugation und Filtration. Die mit gelben Linien umrandeten Felder zeigen den neuen Arbeitsablauf mit Sartoclear Dynamics® Lab V.

## Ergebnisse und Diskussion

Zur Evaluierung des Sartoclear Dynamics® Lab V im Vergleich zu unserem Standardprozess wurde eine Zweiliterkultur eines IgG1 Anti-EGFR-Humanantikörpers (Cetuximab; Absolute Antibody-Katalognummer Ab00279-10.0) in HEK293-Zellen vorbereitet. Sechs Tage nach der Transfektion wurde die Kultur in zwei gleiche Volumina aufgeteilt. Zum Zeitpunkt der Ernte betrug die Zelldichte  $2,4 \times 10^6$  Zellen/ml mit einer Viabilität von 65 %. Für den ersten Liter haben wir auf unseren konventionellen Prozess zurückgegriffen. Dies erforderte einen 45-minütigen Zentrifugations-schritt und anschließende Filtration durch drei 500-ml-Flaschenaufsatzfilter mit einer 0,45 µm PES-Membran. Diese Filter sind normalerweise nach Filtration von 400 ml Überstand verblockt, sodass im Schnitt pro Liter Zellkultur drei Filter benötigt werden. Um das Überstandsvolumen zu erhöhen, das vor dem Verblocken filtriert werden kann, werden keine Filter mit einer Porengröße 0,22 µm, sondern 0,45 µm verwendet. Die Filtration von 1 Liter Zellen erforderte eine Arbeitszeit von 9 Minuten und 48 Sekunden. Dies entspricht einer Gesamtbearbeitungszeit von ca. 55 Minuten. Der zweite Liter durchlief den Sartoclear Dynamics® Lab V-Prozess. Den Zellen wurden zwei 10-Gramm-Beutel Kieselgur zugegeben. Anschließend wurde kräftig gemischt. Danach wurden die Zellen in einen 1000 ml/0,22 µm Sartolab® RF Filter gegossen und Vakuum angelegt. Die Filtration wurde ohne Verblocken abgeschlossen und dauerte insgesamt 8 Minuten und 27 Sekunden ab Kieselgurzugabe bis zur Beendigung des Filtrationsvorgangs. Die benötigte Zeit entspricht ca. 15 % der Zeit, die unsere konventionelle Methode (siehe Abbildung 3) erfordert.



**Abbildung 3: Vergleich der Klärmethoden anhand der Bearbeitungszeit.** Jeder Liter der Zellkultur mit einer Dichte von  $2,4 \times 10^6$  Zellen/ml wurde nach der konventionellen Methode und mit Sartoclear Dynamics® Lab geklärt. Sartoclear Dynamics® Lab erfordert keinen Zentrifugations-schritt und reduziert die zur Klärung von Säugetierzellkulturen notwendige Zeit in beachtlichem Umfang.

Zur Bestätigung, dass der Prozess mit Sartoclear Dynamics® Lab V die Qualität der Antikörper nicht beeinträchtigte, durchliefen die beiden Proben separat die Aufreinigungs- und Qualitätskontrollprozesse. Die final aufgereinigten Antikörper wiesen keine erkennbaren Unterschiede in der Produktqualität auf. Dies konnte anhand SDS-PAGE (Abbildung 4) bzw. SEC-HPLC (Abbildung 5) gezeigt werden. Für jede Probe wurde der Endotoxin-Gehalt bestimmt, der jeweils einen Messwert von < 0,05 EU/mg ergab. Dies entspricht der unteren Detektionsgrenze des routinemäßig von uns verwendeten Test-Kits.

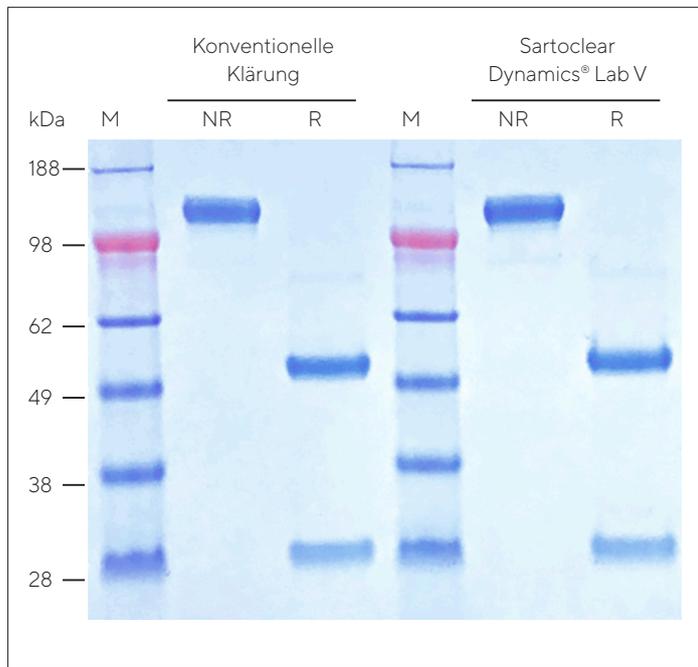


Abbildung 4: Darstellung des SDS-PAGE Gels (NR – nicht reduzierend, R – reduzierend, M – Marker) des mit Protein A aufgereinigten Anti-EGFR-Antikörpers (Cetuximab; Absolute Antibody Katalognummer Ab00279-10.0) nach konventioneller Klärung mittels Zentrifugation und Filtration sowie Klärung mit Sartoclear Dynamics® Lab V.

Zur Bestätigung, dass der modifizierte Prozess keinen Einfluss auf die Funktion des Antikörpers ausübte, wurde ein indirekter ELISA-Test durchgeführt, der die Bindung an Human-EGFR-Fc (Absolute Antibody Katalognummer Pr00117-10.9) zeigen konnte. Wie in Abbildung 6 veranschaulicht, hatte die Methode der Zellklärung keine Auswirkungen auf die Bindungsaktivität. Überdies war die Endausbeute der beiden Prozesse annähernd identisch. Dies verdeutlicht, dass Kieselgur weder in qualitativer noch in quantitativer Hinsicht Einfluss auf den Antikörper hat.

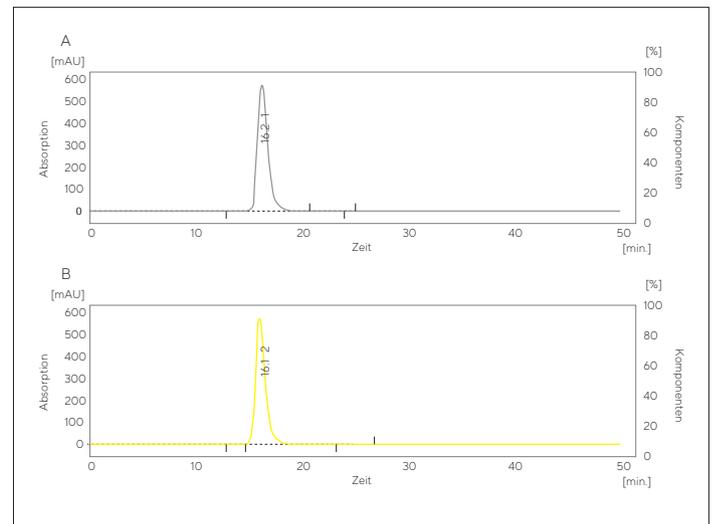


Abbildung 5: SEC-HPLC des mit Protein A aufgereinigten Anti-EGFR-Antikörpers (Cetuximab; Absolute Antibody Katalognummer Ab00279-10.0) nach konventioneller Klärung mit Zentrifugationsschritt und Filtration (A) und nach Klärung mittels Sartoclear Dynamics® Lab V (B). Beide Proben weisen identische Profile auf.

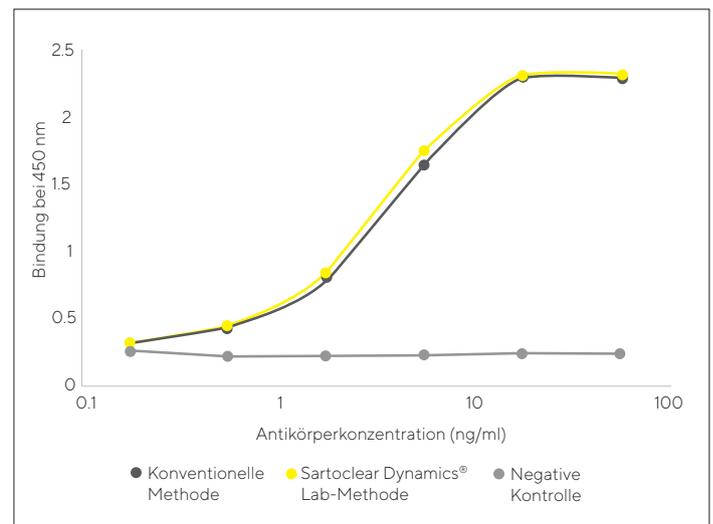


Abbildung 6: Indirekter ELISA-Test zum Nachweis der Bindung der Antikörper an EGFR-Fc. Anti-EGFR-Antikörper (Cetuximab) wurden mit unserem konventionellen Prozess und mittels Sartoclear Dynamics® Lab V aufgereinigt. Es besteht kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Bindungsaktivität.

## Schlussfolgerung

Wir konnten zweifelsfrei nachweisen, dass Sartoclear Dynamics® Lab V die schnelle Klärung von Säugetierzellkulturen ohne Zentrifugationsschritt ermöglicht. Dazu haben wir zwei Liter einer mit einem Antikörper transient transfizierten Zellkultur verwendet und einen standardmäßigen Zentrifugations-Klärprozess mit dem auf Kieselgur basierten Sartoclear Dynamics® Lab V Prozess verglichen. Wir konnten mit zahlreichen Messungen (SDS-PAGE, SEC-HPLC, ELISA und Endotoxine) keinerlei signifikante Unterschiede in Menge und Qualität des Endprodukts feststellen. Damit ist nachgewiesen, dass das auf Kieselgur basierte System keinen Einfluss auf die Produktqualität ausübt. Vor allem ergab der Sartoclear Dynamics® Lab V-Prozess eine eindrucksvolle Zeiteinsparung von ca. 85 %. Damit stellt Sartoclear Dynamics® Lab V eine attraktive Option zur Steigerung der Produktivität und des Durchsatzes für den Klärschritt bei Expressions- und Aufreinigungssystemen für sekretierte Proteine dar.

## Literatur

1. Kempken, R., Preissmann, A., and Berthold, W. (1995). Clarification of animal cell cultures on a large scale by continuous centrifugation. *J. Ind. Microbiol.* 14, 52-57.
2. Liu, H.F., Ma, J., Winter, C., and Bayer, R. (2010). Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *MAbs* 2, 480-499.
3. Riske, F., Schroeder, J., Belliveau, J., Kang, X., Kutzko, J., and Menon, M.K. (2007). The use of chitosan as a flocculant in mammalian cell culture dramatically improves clarification throughput without adversely impacting monoclonal antibody recovery. *J. Biotechnol.* 128, 813-823.

## Abkürzungen

CHO	Chinese Hamster Ovary
HEK	Human Embryonic Kidney
DE	Diatomaceous Earth
PES	Polyethersulfon
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC-HPLC	Size Exclusion Chromatography-High Performance Liquid Chromatography
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor

**Germany**

Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG  
Otto-Brenner-Strasse 20  
37079 Goettingen, Germany  
Phone +49 551 308 0

**USA**

Sartorius Corporation  
565 Johnson Avenue  
Bohemia, NY 11716  
Phone +1 631 254 4249  
Toll-free +1 800 635 2906

 For further contacts, visit  
[www.sartorius.com](http://www.sartorius.com)