



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Entwicklung effizienter Aufreinigungsstrategien für therapeutische Biomoleküle

Autor: Michael Schmidt
Institut / Klinik: Institut für Molekular- und Zellbiologie der Hochschule Mannheim
Doktorvater: Prof. Dr. M. Hafner

Die Aufreinigung rekombinant hergestellter Biomoleküle wird vorwiegend durch chromatographische Prozesse durchgeführt. Die Anwendung dieser biotechnologischen Produkte liegt häufig in der pharmazeutischen Industrie, sie müssen daher ein Höchstmaß an Reinheit und gleichbleibender Qualität garantieren. Schwer abzutrennenden Kontaminationen wie *Host Cell* Proteine oder produktspezifische Verunreinigungen wie Ladungs- und Größenheterogenitäten des Zielproteins werden häufig durch chromatographische Trennungen auf Kationenaustauschern vom Endprodukt entfernt. Um die bestmögliche Qualität des Produktes gewährleisten zu können ist ein verbessertes Verständnis der Aufreinigungsprozesse sowie die Entwicklung neuer Reinigungsmethoden notwendig. Zu diesem Zweck wurde das von Yamamoto und Kollegen entwickelte LGE-Modell um die pH-Wertabhängigkeiten der Modellparameter A und B erweitert. Die so erhaltene nicht-analytische Lösung des LGE-Modells erlaubt nicht nur die Vorhersage des Elutionsverhaltens von Proteinen in der linearen Salzgradientenelution, sondern auch in der linearen pH-Gradientenelution. Anhand des Modells ist es zudem möglich, die Auflösung zwischen zwei Proteinen multidimensional in Abhängigkeit der Gradientensteigung, des pH-Wertes, der Ionenstärke, der Säulenlänge, der Ligandendichte und der linearen Flussrate zu berechnen. Da die Auftrennung zwischen zwei Proteinen hinsichtlich ihrer Einflussfaktoren mathematisch charakterisiert wurde, kann diese durch gezielte Veränderung der experimentellen Bedingungen optimiert werden. Dadurch sind signifikante Vereinfachungen in den komplexen Entwicklungsverfahren des *Downstream-Processings* möglich. Das entwickelte Gleichungssystem wurde durch die Modellmoleküle PTH 1-34 und Lysozym auf den Kationenaustauschern Fractogel SO₃ (S) bzw. SP Sepharose FF etabliert und nachfolgend zur Reinigung des monoklonalen Antikörpers MA04 auf verschiedenen Chromatographiematerialien genutzt.

Die mittels der B-pH-Wertabhängigkeit bestimmte Anzahl der verschiedenen in die Bindung involvierten Aminosäuregruppen lässt Rückschlüsse auf die elektrostatische Interaktion der Antikörperformen mit der stationären Phase sowie deren strukturelle Zusammensetzung zu. Weiterhin kann aus der Berechnung der Differenz der freien Gibbs Energie für die Proteine, ΔG° , eine Aussage über nicht-spezifische Interaktionen mit dem Harz getroffen werden. Zur Beschreibung der Peakweite σ^2 wurde eine neue Korrelation für den Diffusionskoeffizienten der stationären Phase eingeführt, wodurch dieser als Funktion der Retentionsionenstärke, des pH-Wertes und der Gradientensteigung wiedergegeben werden kann. Daher können Unterschiede zwischen den Antikörperformen hinsichtlich des Massentransports in der stationären Phase erfasst und die Auflösung zwischen zwei Proteinen vorhergesagt werden.

Die Arbeit zeigt, dass andere und zum Teil auch verbesserte Selektivitäten in der Abtrennung von produktspezifischen Verunreinigungen eines rekombinant hergestellten Proteins durch Verwendung der weniger etablierten linearen pH-Gradientenelution oder multimodalen Chromatographiematerialien erzielt werden können. Ebenso kann durch eine mathematische Charakterisierung des Elutionsverhaltens der Proteine in beiden Elutionsformen eine Trennung optimiert und dadurch eine höhere Qualität des Endproduktes erzielt werden. Für die Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers wurden diese produktspezifischen Verunreinigungen als saure oder basische Monomerformen (Ladungsheterogenität) bzw. als Fragmente der Monomerform, dimere oder multimeren Antikörperformen (Größenheterogenität) identifiziert. Die verschiedenen Aufreinigungen gewährleisten auch die Reduktion des HCP-Gehaltes im Endprodukt. Die dabei wirkenden Mechanismen bei der Abtrennung der *Host Cell* Proteine konnten besser verstanden werden.