

PROTEINTHERAPEUTIKA

Zwischen Plattformtechnik und individuellem Prozess

Bei der Herstellung von Proteintherapeutika sind heute mehr denn je zeit- und kostengünstige Techniken gefragt. Von Dr. Alexander Faude, Dr. Dethardt Müller, Dr. Stefan Schmidt, Dr. Birgit Schwab, Rentschler Biotechnologie GmbH.

Innovative Proteintherapeutika stehen heute im Fokus vieler Biotech- und Pharmafirmen. Eine wichtige Rolle spielen dabei monoklonale Antikörper und Fc-Fusionsproteine. Diese Substanzklassen sind bereits vielfach am Markt erfolgreich und dominieren auch die klinischen Biopharma-Entwicklungspipelines. Sie werden gewöhnlich als einfache Antagonisten und meistens in der Tumorthherapie eingesetzt. Um ein größeres Spektrum von Wirkmechanismen zu realisie-

ren, werden zunehmend weitere Proteinformate entwickelt. Dazu gehören zum Beispiel multispezifische und multifunktionale Antikörper-Fragmente oder neuartige Fusionsproteine. Sie können simultan mehrere Zelloberflächenrezeptoren hemmen oder verschiedene Liganden gleichzeitig blockieren, aber auch unterschiedliche Rezeptoren vernetzen oder T-Zellen in unmittelbarer Nähe von Tumorzellen rekrutieren [1]. Dem zugrunde liegt eine große Bandbreite ver-

schiedener Molekültypen, denen ein gleichartiges Element wie der Fc-Teil fehlt.

Für die Herstellung dieser Therapeutika, die zum großen Teil mit Hilfe von Zellkulturen produziert werden, sind heute mehr denn je kosten- und zeiteffiziente Technologien gefragt. Dies gilt insbesondere für die Aufreinigung solcher komplexen Produkte, in die nach wie vor ein Großteil der Herstellungskosten fließt. Da die Kosten im Falle eines Prozessausfalls rasant steigen, je näher man dem reinen Wirkstoff kommt, ist neben der Effizienz vor allem eine verlässliche Robustheit in allen Prozessschritten gefordert.

Aufreinigung monoklonaler Antikörper und Fc-Fusionsproteine

Bei der Aufreinigung von Proteinen aus dem Zellkulturüberstand ist die Frage nach dem Vorhandensein eines Fc-Teils entscheidend. Für monoklonale Antikörper und Fc-Fusionsproteine lassen sich auf Grund dieser strukturellen Gemeinsamkeit Plattformprozesse etablieren, in denen die verwendeten Trennmedien, Filter, Prozesslösungen und Anlagen weitestgehend standardisiert und charakterisiert sind. Dadurch reduziert sich die Prozessentwicklungszeit. Die Vorbereitung und Durchführung einer Produktion unter Good Manufacturing Practice (GMP)-Bedingungen sind schnell und kosteneffizient zu realisieren.

Die bei Rentschler etablierte Prozessplattform umfasst verschiedene Chromatographie- und Filtrationsschritte (Abbildung 1A). Zur Ankonzentrierung des Wirkstoffes und Reduzierung prozessbedingter Verunreinigungen wie Wirtszellproteine, -DNA, Produktionsmedienbestandteile und Metabolite wird die Affinitätschromatographie mittels Protein A eingesetzt. Mit diesem Capture-Schritt wird ein Großteil der nötigen Aufreinigungsarbeit geleistet.

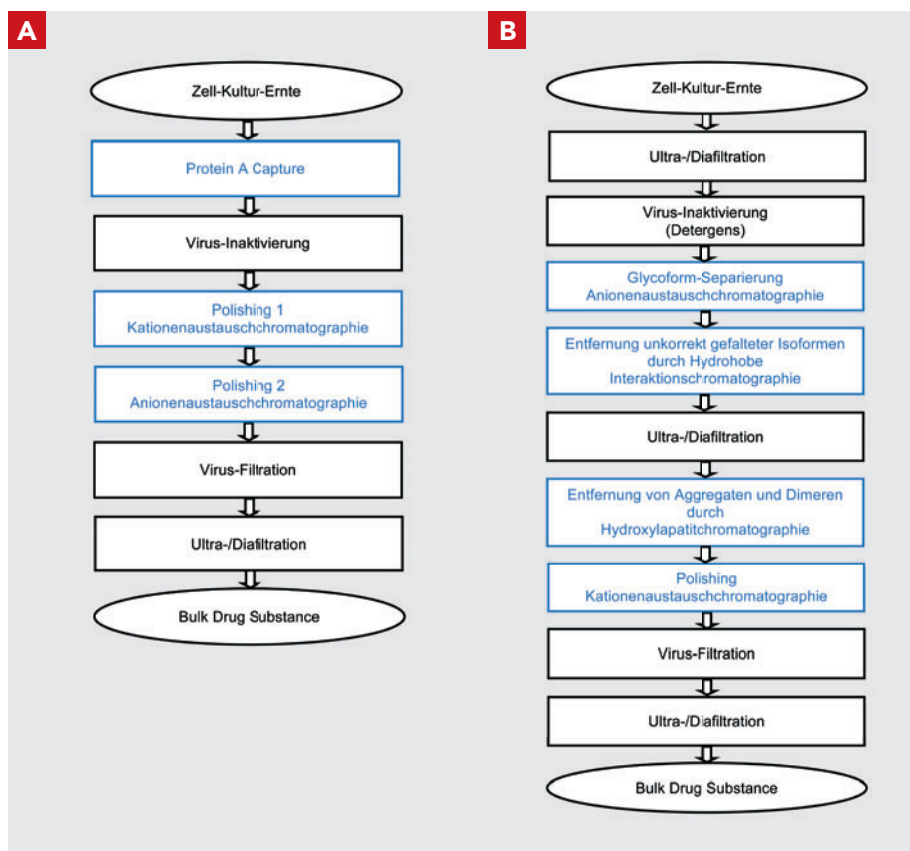


Abb. 1: Vergleich von Downstream-Processing-Varianten. A: Plattformprozess für monoklonale Antikörper und Fc-Fusionsproteine mit drei Chromatographieschritten. B: Individueller Aufreinigungsprozess für ein glykosyliertes non-Fc-Fusionsprotein mit vier Chromatographieschritten. Die Chromatographieschritte sind blau dargestellt.

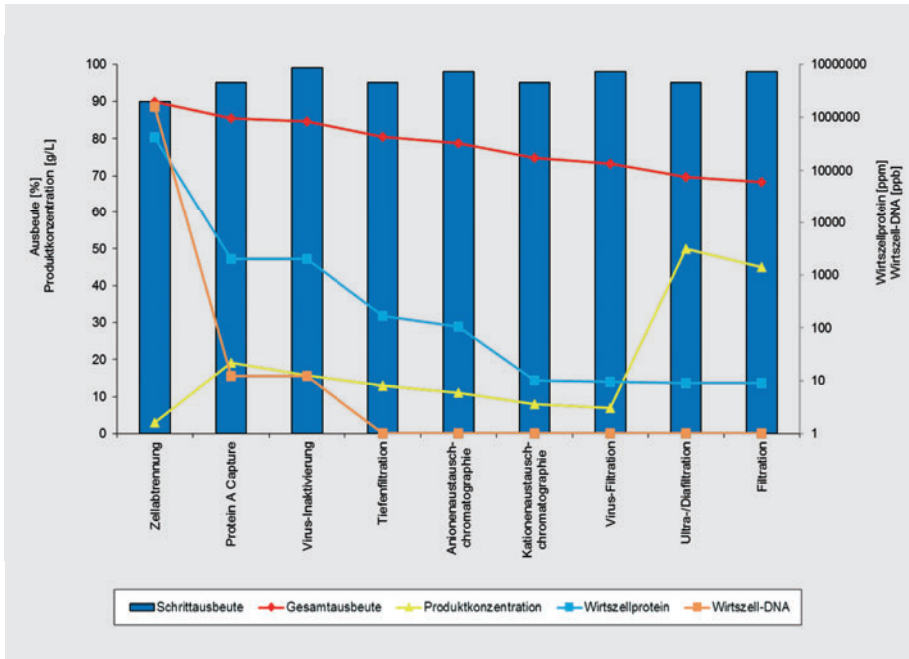


Abb. 2: Produktionsübersicht über den Plattformprozess

Nach Virusinaktivierung über pH-Absenkung und anschließender Tiefenfiltration zur Abtrennung ausgefallter Substanzen und unerwünschter Partikel erfolgt die weitergehende sequenzielle Aufreinigung über Anionenaustausch- und Kationenaustauschchromatographie. Hierbei liegt der Fokus vor allem auf der Reduzierung von produktbezogenen (Aggregate, Fragmente) und prozessbezogenen Verunreinigungen (Wirtszellproteine, DNA). Neben der sich anschließenden Nanofiltration tragen die Virusinaktivierung und die Anionenaustauschchromatographie zur Virussicherheit des Wirkstoffes bei. Durch die finale Ultra-/Diafiltration wird das Produkt konzentriert und durch Umpufferung in eine geeignete Matrix überführt. Nach einer Keimreduktionsfiltration kann es stabil gelagert werden. Mit diesem Prozess wird in den meisten Fällen eine Ausbeute von mehr als 70% erzielt (Abbildung 2).

Die bei Rentschler vorhandenen Anlagen ermöglichen eine Aufreinigung von bis zu 3.600 Litern Zellkultur-Ernte. Dabei sind sowohl Systeme auf Einweg- oder Edelstahlbasis als auch Hybridlösungen im Einsatz. Ein besonderer Vorteil der Plattformtechnologie ist – neben der Standardisierung – der Erhalt einer hohen Anpassungsflexibilität, die ausreichend Freiräume für produktspezifische Anforderungen bietet. Bereits durch geringfügige Änderungen (zum Beispiel in der Reihenfolge der Prozessschritte) lassen sich neue stabile Prozesszustände generieren, die die gewünschte Robustheit sowie Produktausbeute und -qualität erzielen.

Aufreinigung rekombinanter Proteine ohne Fc-Teil

Ist im Protein kein Fc-Teil enthalten, ergeben sich aus dieser Molekülstruktur besondere Anforderungen an den Aufreinigungsprozess. In vielen Fällen können keine Vorerfahrungen genutzt werden, so dass die Entwicklung eines individuellen Prozesses notwendig ist. Für die meisten Proteine ohne Fc-Teil existiert kein spezifischer Capture-Schritt, der auf einer besonderen Affinität beruht. Diese Problematik lässt sich durch die klassische Ionenaustauschchromatographie umgehen. Sie bietet die nötige Kapazität, weist aber einen deutlich niedrigeren Reinigungsfaktor als die traditionelle Protein-A-Chromatographie für Antikörper auf. Auch die typische Virusinaktivierung bei niedrigem pH-Wert ist aufgrund geringer Stabilität im sauren Milieu häufig nicht durchführbar. Eine Lösung dieses Problems ist der Einsatz organischer Lösungsmittel oder Detergenzien. Im Fall von Detergenzien muss im weiteren Verlauf ein analytischer Nachweis zu ihrer Abwesenheit erbracht werden. Ebenso muss für jedes Protein eine spezifische Quantifizierungsmethode etabliert und validiert werden, da die sonst übliche Protein-A-HPLC-Methode nicht anwendbar ist.

Bei Fusionsproteinen kann die künstliche Verknüpfung von nicht miteinander verwandten Proteinen mit unterschiedlichen Charakteristika zur verstärkten Aggregatbildung führen. Zur Lösung dieser Problematik kann auf bewährte Methoden wie die Hydroxylapatit-Chromatographie zurückge-

griffen werden. Zusätzlich entstehen bei Proteinen, die aus multiplen Kopien ähnlicher Untereinheiten aufgebaut sind (zum Beispiel multivalente Einzelketten-Antikörper-Fragmente (scFV)), häufig auch falsch gefaltete Varianten. Diese müssen von den Molekülen mit der korrekten Konformation abgetrennt werden. Dabei kommt zum Beispiel die hydrophobe Interaktionschromatographie zum Einsatz, die nicht korrekt gefaltete Moleküle, welche hydrophobe Stellen exponieren, selektiv bindet.

Eine weitere Herausforderung von non-Fc-Proteinen ist die Einhaltung eines spezifischen Glykosilierungsmusters. Das ist zum Beispiel bei Erythropoietin oder Enzymen zur Behandlung von lysosomalen Erkrankungen essenziell, da hier einige Isoformen pharmakologisch besonders aktiv sind. In diesen Fällen ist beispielsweise die Ionenaustauschchromatographie eine Methode der Wahl.

Generell benötigen non-Fc-Proteine durchschnittlich mindestens einen Reinigungsschritt mehr als der Plattformprozess (Abbildung 1B). Dennoch kann man bei ihrer Aufreinigung vom Erfahrungsschatz der Plattformprozesse profitieren, denn moderne Methoden zur Prozessentwicklung wie beispielsweise Design of Experiments (DoE) bleiben gleich. Einzig analytische Tests sind anzupassen oder neu zu etablieren.

Ob Plattformtechnik oder individuell entwickelter Aufreinigungsprozess – Rentschler verfügt über ein umfangreiches Know-How im Bereich der Proteinaufreinigung. Das wurde bisher in einer Vielzahl von Prozessen für die GMP-gerechte Herstellung von monoklonalen Antikörpern und Fc-Fusionsproteinen erfolgreich unter Beweis gestellt. Auch bei Projekten, die sich durch die Suche nach einem geeigneten Affinitätsschritt, durch Aggregationsprobleme oder anspruchsvolle Glykanprofile herausfordernd gestalten, ist Rentschler seit vielen Jahren ein erfahrener Spezialist. Ausgehend von der Pionierarbeit an Interferon-beta konnte die Expertise im Bereich der non-Fc-Proteine durch die Herstellung von weit über zwanzig völlig unterschiedlichen Molekülen (zum Beispiel Fusionsproteine, Enzyme, Blut- und Wachstumsfaktoren) in den vergangenen Jahren immer weiter ausgebaut werden.

Literatur

- [1] The New Generation of Antibody Therapeutics: Current Status and Future Prospects, K.J.Morrow, Insight Pharma Reports 2012

Kontakt

www.rentschler.de