

Einsatz einer Expanded Bed Adsorptionsanlage am Bioreaktor zur direkten Abtrennung von Malariavakzinen aus Fermentationsbrühen

Im ersten Teil des Projektes wurde das Set-up eines sequentiell integrierten Bioprozesses zur Produktion artifizierender Malariavakzin-Kandidaten mit einer schnellen In-situ-Aufarbeitung über eine EBA-Expanded Bed Adsorption durchgeführt. Im Anschluss wurde ein DoE - Design of Experiments (statistische Versuchsplanung) für die Optimierung des Aufarbeitungsprozesses angewendet.

Im Department of Parasitology des BPRC-Biomedical Primate Research Center der Niederlande in Rijswijk wurden geeignete artifizierender Malariavakzine konstruiert und deren Einbringung in das Hostsystem *Pichia pastoris* vorgenommen. Dabei handelt es sich um Multikomponentenvakzine, denen eine breite Immunantwort zugeschrieben wird. Sie bestehen aus künstlich hergestellten Sequenzen zweier Antigene des asexuellen Malariaparasiten, des PfAMA1 - *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 und des 19 kDa Fragments des MSP1₁₉-Merozoite Surface Protein 1, zur Abdeckung der Diversität der natürlich vorkommenden Allele [1, 2].

Die Herstellung dieser Proteine in Bioreaktoren stellt eine bioverfahrenstechnische Herausforderung dar, da Proteingrößen bis 150 kDa eine geringe Expressionsrate und große proteolytische Angriffsmöglichkeiten mit sich bringen. Die Sekretion des Produktes begünstigt die Verknüpfung des Kultivierungsablaufes mit einem primären Aufreinigungsschritt in einem integrierten Bioprozess.

Für die Forschungsarbeiten stand ein hochinstrumentierter BIOSTAT® ED5 (Sartorius Stedim Biotech) Laborbioreaktor mit 5.5 l Arbeitsvolumen zur Verfügung, mit dem vollautomatische sequentiell ablaufende Produktionszyklen gefahren werden konnten. Für die in-situ Zellabtrennung des Produktes mit einer EBA wurde der in Abb. 1 gezeigte integrierte Bioprozess aufgebaut.



Abb. 1: Hochinstrumentierte Integrierte Bioprocessanlage

Die Prozessstrategie sah zunächst ein zweiphasiges Wachstum mit einer Batch und Fed Batch-Phase auf Glycerin vor, wobei letztere unter Substratlimitierung mit geringerer zellspezifischer Wachstumsrate erfolgte. Zur Induktion der Proteinexpression folgt ein Wechsel des zugefütterten Substrats von Glycerin zu Methanol, wie in Abb. 2 gezeigt ist.

Zur Überwachung und Automatisierung des laufenden Prozesses war eine Inline-Trübungsmessung vorhanden, die den Verlauf der Zelldichte zeigte. Zur Beobachtung des Produktverlaufs als wichtigste Information eines Herstellungsprozesses wurde eine HPLC-Anlage zur IMAC - Immobilisierten Metallchelat Affinitätschromatographie entwickelt, die online an den Kultivierungsprozess angebunden wurde.

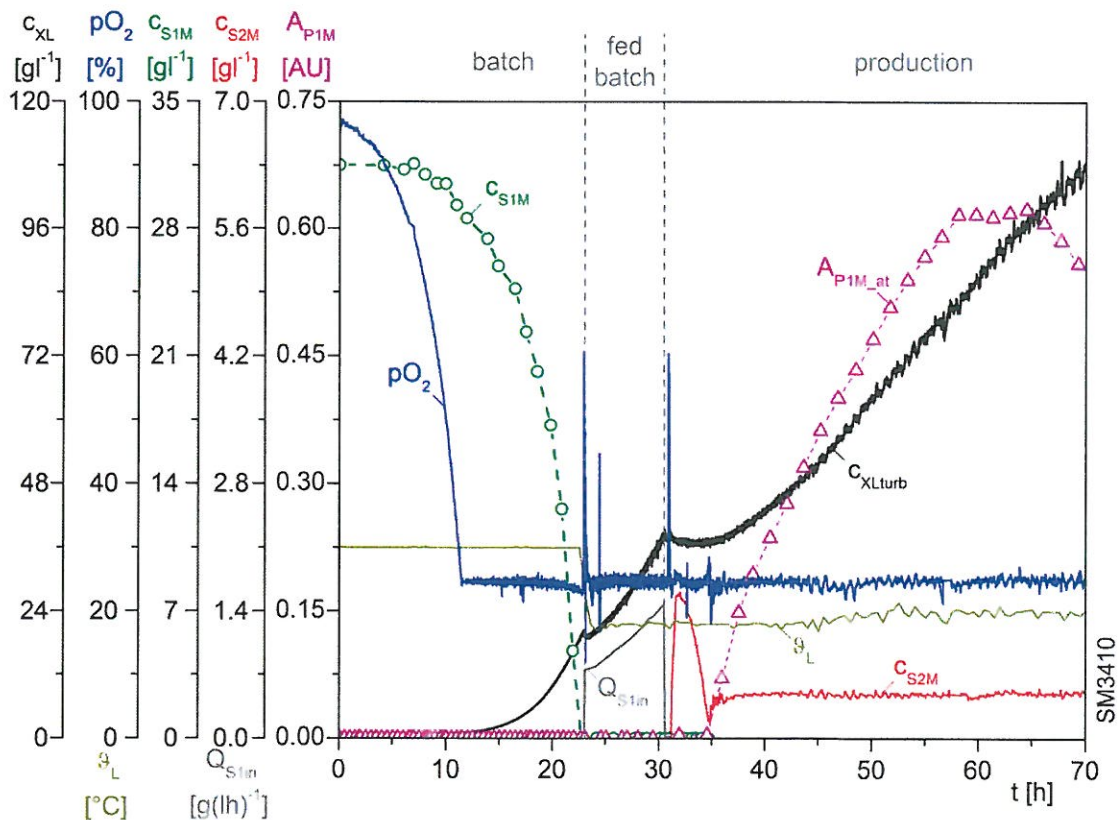


Abb. 2: Vollautomatisierter Langzeit-Produktionsprozess

Ein Langzeitprozess führte zu einer Abnahme des Zielproteingehalts, wie ebenfalls in Abb. 2 gezeigt ist. Somit war eine schnelle In-situ-Abtrennung des sensitiven Produkts erforderlich und eine zyklische Produktion sinnvoll. Zur Durchführung mehrerer Produktionsphasen innerhalb eines Prozesses wurde ein Repeated Fed Batch-Prinzip mit Zellernte und Medienrefresh zwischen den Produktionszyklen etabliert. Hierbei folgte einer Fed Batch-Produktion des Zielproteins eine Teilentleerung des Bioreaktors in einen Konditionierungstank. Ein Medienrefresh und eine Fed Batch-Phase auf Glycerin leiteten dann im Fermenter eine neue Produktionsphase ein. In dieser Phase wurde erneut die Produktexpression mit Methanol induziert bis die Zellbrühe wiederum geerntet wurde, wie in Abb. 3 gezeigt ist.

Die sequenzielle Kultivierungs- und Ernteprozeduren bestanden aus bis zu 12 Produktionszyklen, die jeweils 24 h andauerten. In diesen Experimenten konnten reproduzierbare Produktionszyklen realisiert werden, in denen keine Abnahme der Produktbildung über den Langzeitproduktionsprozess zu verzeichnen war.

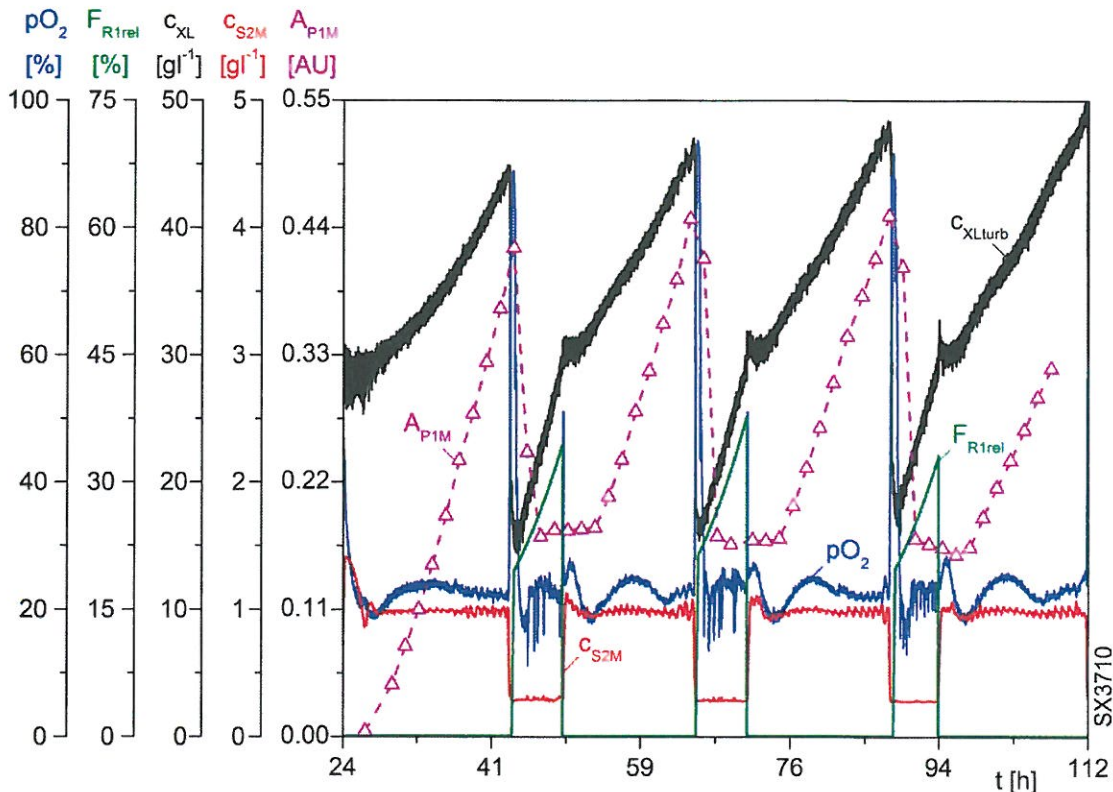


Abb. 3: Repeated Fed Batch Produktionsprozess

Parallel zur Produktion erfolgte die Konditionierung der zuvor geernteten Zellbrühe mit anschließender Primäraufreinigung durch eine EBA-IMAC. Dafür wurde eine STREAMLINE 50 Säule (GE Healthcare) mit 300 ml STREAMLINE Chelating Media (GE Healthcare) befüllt und mit Kupfer aktiviert.

Der erste Schritt der Aufreinigung war die Equilibrierung, bei der das Säulenmaterial durch den Upflow ein stabiles fluidisiertes Bett ergab. Dies erhöhte die Porosität und ermöglichte die ungehinderte Passage der Zellen bei der Aufgabe der konditionierten Kulturbrühe, wobei das extrazellulär vorliegende Zielprodukt an die Oberfläche der Partikel gebunden hat. Die folgenden Waschschriffe erfolgten sowohl im Up- als auch im Downflow. Die Elution des Zielproduktes erfolgte ebenfalls im sedimentierten Bett. Zur weiteren Analyse wurden Fraktionen des Eluats aufgefangen. Ein Chromatogramm der Aufreinigung der produzierten Malariavakzinkandidaten ist in Abb. 4 exemplarisch gezeigt.

Die Verknüpfung von Up- und Downstream im Integrierten Bioprozess wird in Abb. 5 veranschaulicht. Auf der linken Seite ist ein Produktionszyklus als Ausschnitt einer mehrstufigen Kultivierung gezeigt. Eine SDS-PAGE - Analyse der Endprobe zeigt eine Auftrennung der im Fermentationsüberstand enthaltenen Proteine. Neben dem Zielprotein sind mehrere Verunreinigungen sichtbar.

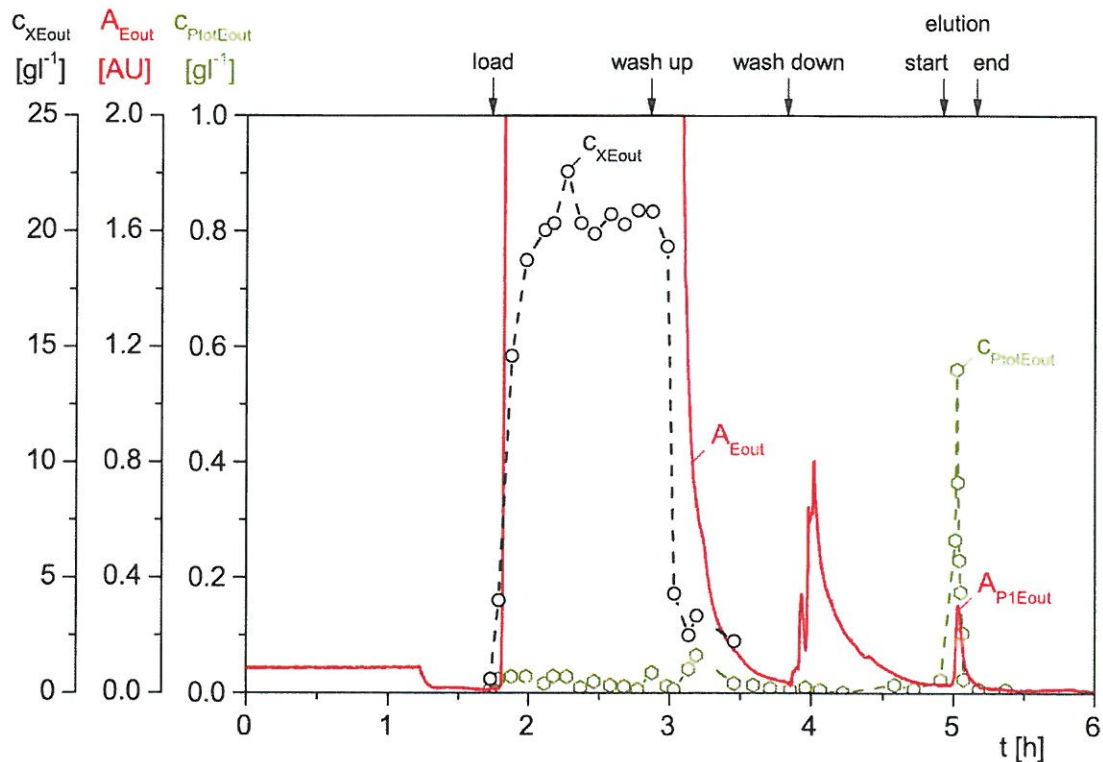


Abb. 4: Ablauf einer Primärreinigung mit der EBA

Die Zellsuspension wurde geerntet und das enthaltene Zielprodukt über die angekoppelte EBA-Anlage aufgereinigt, was im rechten Teil der Abbildung zu sehen ist. Neben dem Elutionspeak des Zielproteins ist die Gesamtproteinkonzentration und SDS-PAGE - Analyse der aufgefängenen Fraktionen gezeigt.

In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass ein Capture des Zielproteins durch eine EBA-IMAC im Integrierten Bioprozess prinzipiell möglich ist. Die Qualität der Aufreinigung dieser Experimente war jedoch noch unzureichend. Es wurden neben dem Zielprodukt auch alle Verunreinigungen auf der Säule angereichert und mit dem Zielprotein eluiert.

Zur Optimierung des Aufarbeitungsprozesses wurde in dem zweiten Förderabschnitt des Projektes die Statistische Versuchsplanung angewendet, um den Einfluss mehrerer Betriebsparameter auf die Güte der Aufreinigung hin zu untersuchen.

DoE ist eine Methode zur Planung und Auswertung von Versuchsreihen. Mit DoE kann der Einfluss mehrerer Eingangsgrößen (Faktoren) auf eine oder mehrere Systemantworten (Responses) untersucht werden. Mit Hilfe der Systemantworten lassen sich gute von schlechten Systemen eindeutig unterscheiden, daher werden diese auch Qualitätsmerkmale oder Gütekriterien genannt. Die Wirkung eines Faktors ist oft nicht unabhängig von den Einstellungen der anderen Faktoren. Orthogonale Versuchspläne stellen sicher, dass trotz gleichzeitiger Variation mehrerer Faktoren eine eindeutige Zuordnung der Effekte möglich ist. Zur Beschreibung der Faktor-Response-Zusammenhänge werden einfache mathematische Modelle mit der Form eines Polynoms verwendet [3].

Zu Beginn der Optimierung des Aufarbeitungsprozesses mit DoE wurden in einem Fractional Factorial Design zunächst in einem Screeningdurchlauf die Faktoren, der pH-Wert pH_C , die Leitfähigkeit σ_C , die Tween-20-Konzentration C_{T20C} , die Imidazol-Konzentration C_{ImB1} und der Flux J_E auf ihre Signifikanz hin untersucht. Als Gütekriterien für die Bewertung des Aufreinigungsschrittes wurden die Produktreinheit P_{P1F} ,

$$P_{P1F} = \frac{A_1}{\sum_{j=1}^n A_j}, \quad (1)$$

mit

$$\begin{aligned} A_1 &= \text{Fläche der Produktbande} && [\text{Pixel}] \\ A_j &= \text{Fläche der Bande } j && [\text{Pixel}] \end{aligned}$$

und die Produktwiederfindung R_{P1E} ,

$$R_{P1E} = \frac{m_{P1F}}{m_{P1C}} = \frac{P_{P1F} \cdot V_F \cdot c_{PtotF}}{P_{P1C} \cdot V_C \cdot c_{PtotC}}, \quad (2)$$

mit

$$\begin{aligned} F &= \text{Teilsystem Eluat} && [-] \\ C &= \text{Teilsystem Konditionierungstank} && [-] \\ P_{P1} &= \text{Produktreinheit} && [-] \\ V &= \text{Volumen} && [\text{ml}] \\ c_{Ptot} &= \text{Gesamtproteinkonzentration} && [\text{mg/ml}] \\ m_{P1} &= \text{Produktmasse} && [\text{mg}] \end{aligned}$$

definiert.

Die Reinheit des Zielproduktes einer Probe wurde über eine SDS-PAGE ermittelt. Für die Analyse des Proteinprofils einer Probe wurde die Bildanalyse Software Total Lab Quant verwendet. Die Software bestimmte für jede Bande j einer Bahn eine relative Fläche A_j . Die Produktreinheit konnte dann über Gl. 1 bestimmt werden. Abb. 5

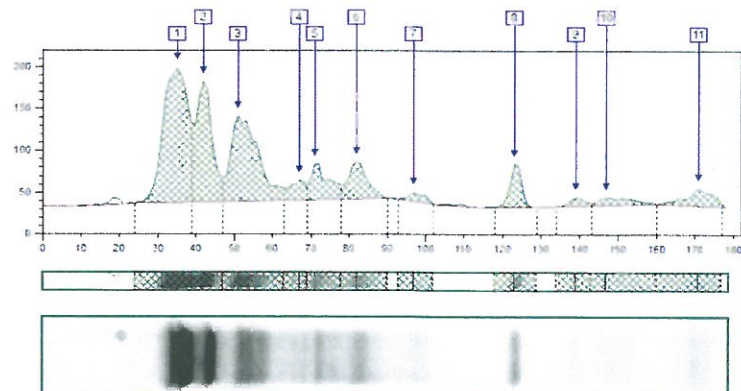


Abb. 5: Auswertung eines Bandenprofils mit Total Lab Quant

zeigt eine Bahn aus einer SDS-PAGE und das von der Software erzeugte Chromatogramm mit Nummerierten Peaks von 1 bis j .

Die Gesamtproteinkonzentration einer Probe wurde mit dem Bradford-Assay analysiert. Aus dem Volumen, der Gesamtproteinkonzentration und der Produktreinheit einer Probe konnte die enthaltene Produktmasse m_{P1} berechnet werden. Der Quotient aus Produktmasse der Eluatsprobe und Produktmasse der Auftragsprobe aus dem Konditionierungstank wurde als die Massewiederfindung der EBA definiert (Gl. 2).

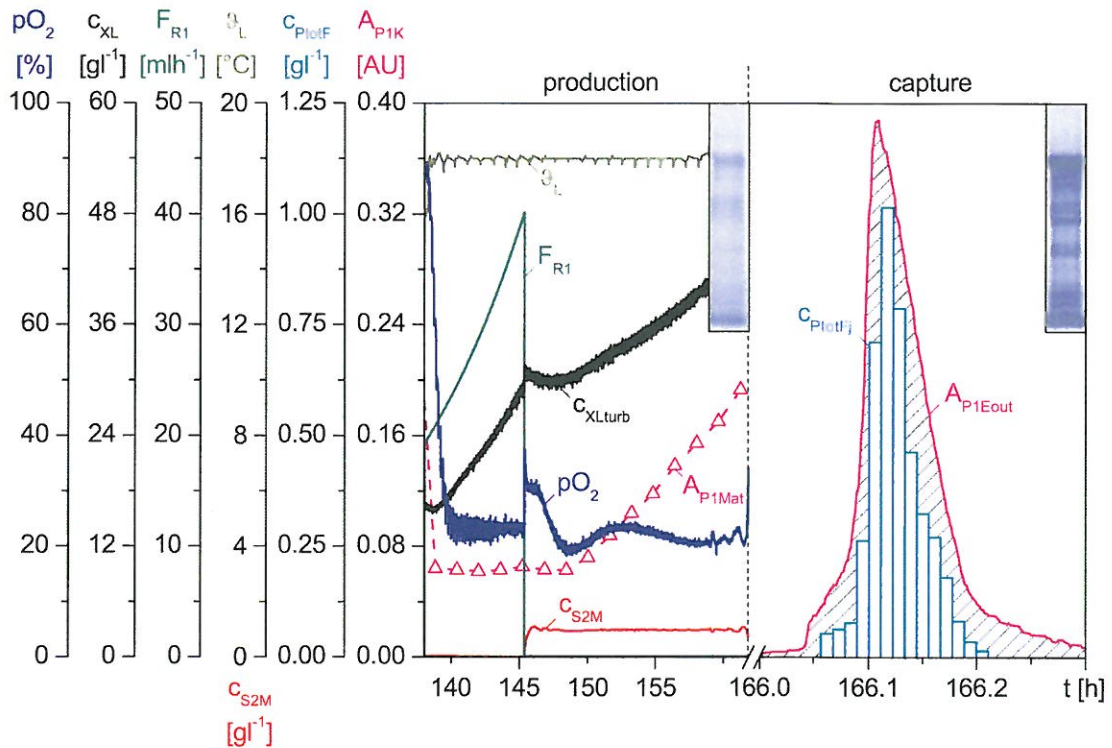


Abb. 5: Produktionsablauf und nachfolgende Elution von der EBA

Um den zeitlichen, experimentellen und wirtschaftlichen Aufwand gering zu halten, fand die Durchführung der einzelnen Screening-Versuche in einem Scale-down-Verfahren mit einem ÄKTA™ purifier 100 (GE Healthcare) statt.

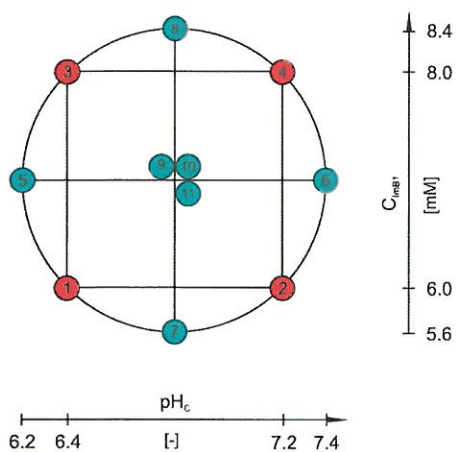


Abb.6: CCC-Optimierungsdesign

Die Faktoren pH_C und C_{ImB1} wurden als signifikante Einflüsse identifiziert. Zusätzlich wurden Informationen über den Bereich gewonnen, in dem ein Optimum zu erwarten war und damit der Suchraum eingeschränkt. Die Optimierung beider Faktoren fand nachfolgend im präparativen Maßstab mit der EBA statt. Das verwendete CCC-Central Composite Circumscribed Design mit drei Center Point Experimenten ist in Abb. 6 dargestellt.

Um das Design zu erfüllen, waren mindestens 11 Sequenzen des Integrierten Bioprozesses notwendig. Abb. 7 zeigt die zugehörigen Fermentationszyklen.

Jeder Zyklus lieferte Ausgangsmaterial für ein DoE-Experiment der In-situ-Aufarbeitung mit der EBA.

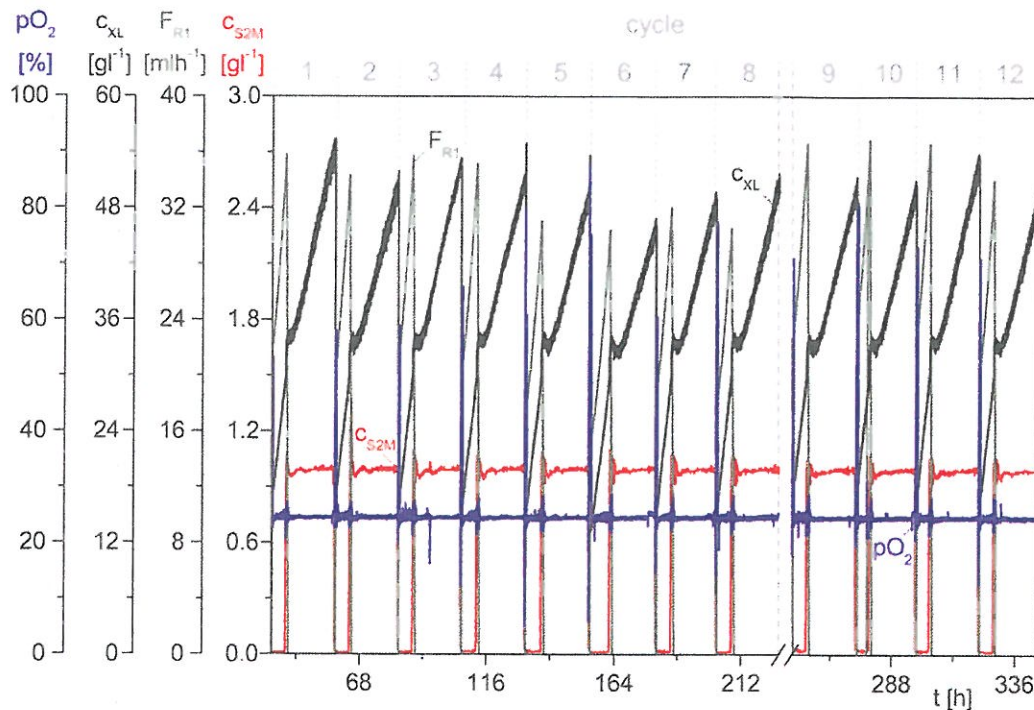


Abb. 7: Kultivierungssequenzen der In-situ Optimierung

Das Eluat des integrierten Chromatographieschrittes wurde auf seine Produktreinheit P_{P1F} und die Massenwiederfindung m_{P1E} hin untersucht. Die Analyseergebnisse wurden mit der Software MODDE®9.0 (MKS Umetrics AB, Sweden) ausgewertet. In Abb. 8. sind untereinander sind jeweils die Koeffizienten-, Summary of Fit- und Kontur-plots beider Gütekriterien zu sehen. In beiden Fällen wurden quadratische Modelle für die Anpassung an die Ergebnisse mittels Multi Linearer Regression (MLR) verwendet.

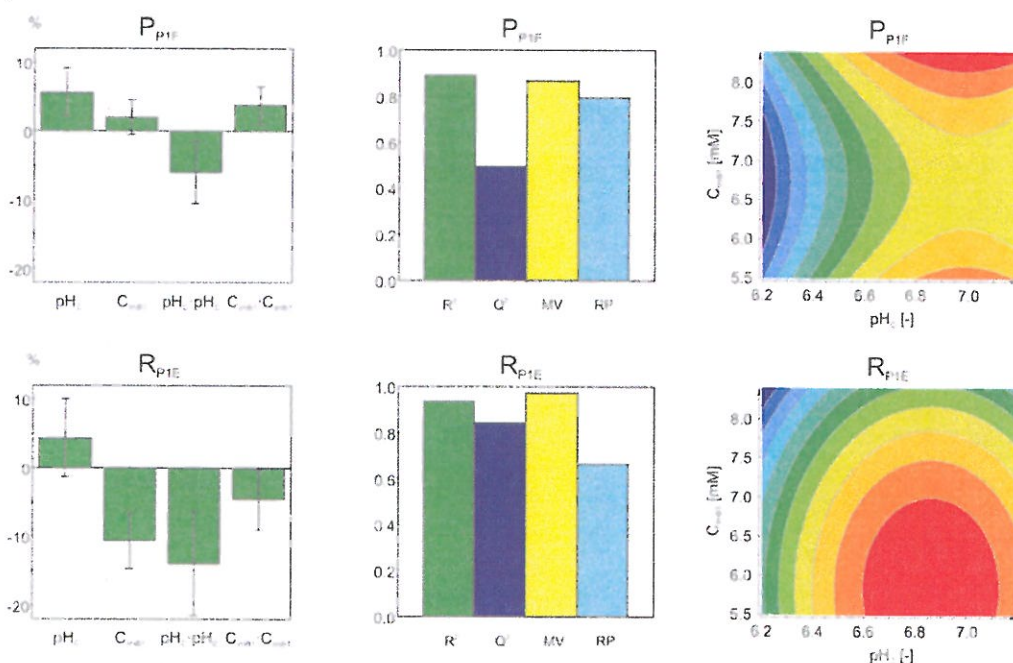


Abb. 8: Ergebnisse der Modellanpassung mit MODDE®

Für die Bestimmung eines Optimums mussten beide Kriterien gemeinsam betrachtet werden. Dazu wurde ein MATLAB Programm entwickelt, das für jede mögliche Kombination von pH-Wert und Imidazolkonzentration innerhalb des Faktorraums eine Normierung der Modellantworten durchführte. Nach der Normierung erfolgte an jedem Punkt des Faktorraums eine Addition der beiden normierten Modellantworten. Es entstand eine Gesamtantwort, deren Maximum sich an dem Punkt des Faktorraumes befand, an dem beide Modellantworten gemeinsam den höchsten Wert bildeten. Mit diesen Koordinaten für pH_C und C_{ImB1} ließen sich die Modellgleichungen für P_{P1F} und m_{P1E} separat lösen und optimale Systemantworten berechnen. Eine Normierung ist notwendig, um die Einheiten der Systemantworten zu eliminieren. Es bestand zusätzlich die Möglichkeit, jede Antwort vor der Normierung zu gewichten, da je nach Anwendungsbereich oder Produkttyp, Massewiederfindung oder Reinheit des Produktes unterschiedliche Wertschätzungen zukommen könnten. Die resultierende Gesamtantwort ist als Response Surface Plot in Abb. 9 dargestellt.

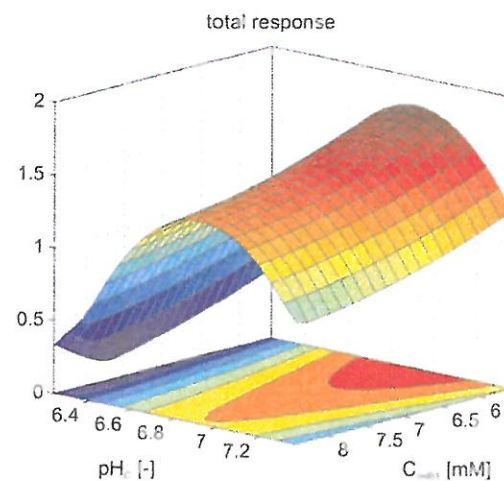


Abb. 9: Response Surface Plot der berechneten Gesamtantwort

Eine Normierung ist notwendig, um die Einheiten der Systemantworten zu eliminieren. Es bestand zusätzlich die Möglichkeit, jede Antwort vor der Normierung zu gewichten, da je nach Anwendungsbereich oder Produkttyp, Massewiederfindung oder Reinheit des Produktes unterschiedliche Wertschätzungen zukommen könnten. Die resultierende Gesamtantwort ist als Response Surface Plot in Abb. 9 dargestellt.

Tab. 1 beinhaltet die optimalen Einstellungen für pH und Imidazolkonzentration und die theoretischen Antworten P_{P1Fopt} und R_{P1Eopt} . Im Anschluss an die Optimierung wurden sechs Versuche unter den kalkulierten optimalen Bedingungen durchgeführt, um die Ergebnisse zu verifizieren. Mit diesem Robustheitstest wurde geprüft, wie sensitiv der Prozess auf eine geringfügige Änderung in den Faktoreinstellungen reagiert.

Tab. 1: Ermittelte optimale Faktoreinstellungen und Systemantworten

Factor		Response	
pH_{Copt}	6.90	R_{P1Eopt}	0.51
$C_{\text{ImB1}opt}$	5.80 mM	P_{P1Fopt}	0.87

Abb. 10 zeigt einen optimalen Produktionsprozess. Im Laufe dieses Projektes wurden zur Verbesserung des Gesamtprozesses Optimierungsergebnisse der Kultivierung eines *Pichia pastoris*-Stammes zur Herstellung des Vakzinkandidaten D1 übernommen und auf den Kultivierungsprozess angewendet. Diese Abb. zeigt den zeitlichen Verlauf relevanter Prozessparameter der Kultivierung. Eine SDS-PAGE Analyse der Endprobe zeigt eine Auftrennung der im Fermentationsüberstand enthaltenen Proteine. Es sind deutlich weniger Verunreinigungen bei gleichem bis höherem Zielproduktanteil, verglichen mit der früheren Kultivierung aus Abb. 5, im Überstand vorhanden. Das integrierte Produkt-Capture konnte ebenfalls erheblich verbessert werden.

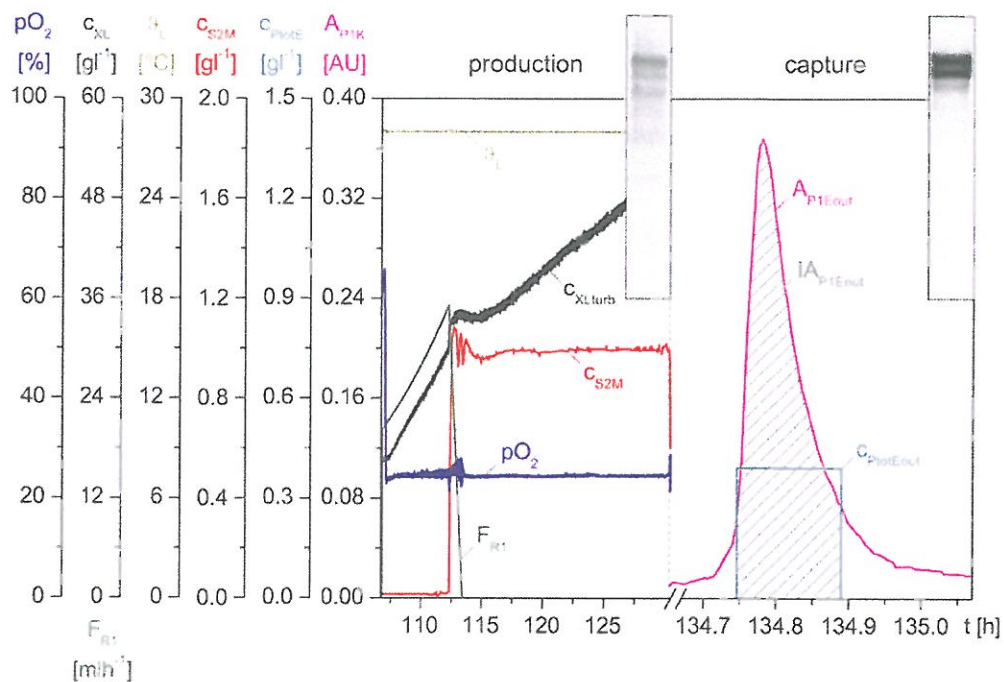


Abb. 10: Optimaler Produktionsablauf und nachfolgende Elution von der EBA

Die SDS-PAGE Analyse aller sechs Experimente ist in Abb. 11 gezeigt. Die Gele beinhalten die Proben N1 bis N6 des Kultivierungsüberstandes L, der konditionierten Zellbrühe C und des EBA Eluats F. Die Produktreinheit der Versuche lag mit 0.72 im Mittel leicht unterhalb der durch das Modell vorhergesagten Reinheit von 0.87. Die Wiederfindung lag mit 0.64 oberhalb der berechneten Wiederfindung von 0.51. Insgesamt verliefen alle Experimente sehr reproduzierbar.

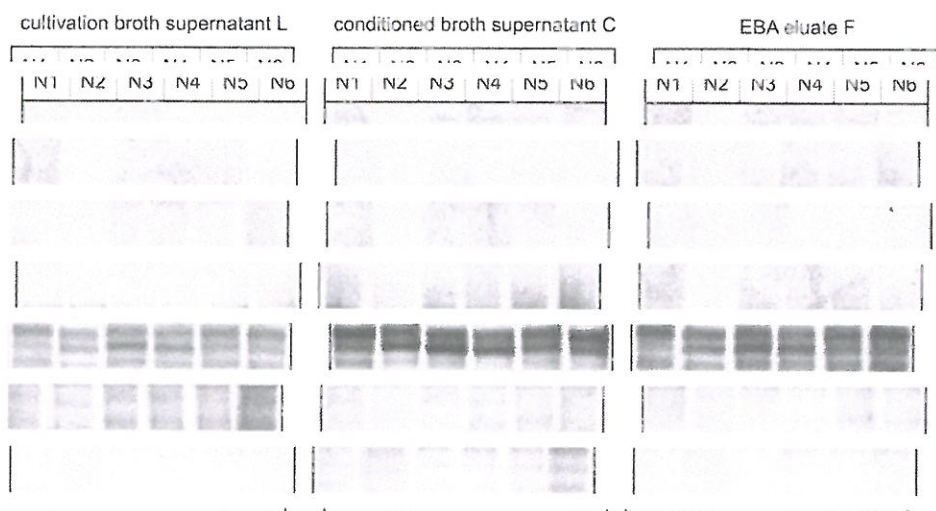


Abb. 11: SDS-PAGE Analyse sechs reproduzierbarer Produktionsprozesse

Ein sequenzieller Produktionsprozess in Integrierter Prozessführung ermöglicht durch die effektive Kombination von Up-Stream und Down-Stream Unitoperationen eine schnelle In-situ-Abtrennung von sensitiven Produkten und eine beständige Produktqualität in reproduzierbaren Produktionszyklen. Design of Experiments hat sich als effektives Tool für die Optimierung eines integrierten Produkt-Capture mit einer EBA erwiesen.

Teile dieser Arbeit wurden unter <http://doi.wiley.com/10.1002/elsc.201000163> mit dem Titel *Fully automated production of potential Malaria vaccines with Pichia pastoris* in einer Sonderausgabe des Journals *Engineering in Life Sciences* (Eng. Life Sci. 2011, 11, No.3) publiziert. Eine weitere Veröffentlichung ist geplant.

- [1] Faber, B. W., E. J. Remarque, W. D. Morgan, C. H. M. Kocken, A. A. Holder and A. W. Thomas: Malaria-Related Benefits of a Single Protein Comprising *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 Domains I and II Fused to a Modified Form of the 19-Kilodalton C-Terminal Fragment of Merozoite Surface Protein 1. *Infect. Immun.*, 2007, 75 (12), 5947-5955
- [2] Remarque, E. J., B. W. Faber, C. H. M. Kocken and A. W. Thomas: A Diversity-Covering Approach to Immunization with *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 Induces Broader Allelic Recognition and Growth Inhibition Responses in Rabbits. *Infect. Immun.*, 2008, 76 (6), 2660-2670
- [3] Siebertz, K.; van Bebber, D.; Hochkirchen, T.: *Statistische Versuchsplanung. Design of Experiments (DoE)*, 2010 Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag