

Software für die automatisierte Pufferherstellung



Das Biochemie-Team:

v.l.: Miriam Iten, Reto Gianotti, Christiane Zaborosch,
Roland Weibel, Romina Dörig, Angelika Koller, Patrizia Sebegondi
Kontakt: christiane.zaborosch@zhaw.ch

Verfahren im Downstream Processing von Biopharmazeutika werden heutzutage mit Design of Experiments und automatisierten Systemen entwickelt, um effizient die optimalen Bedingungen für die Aufreinigung zu bestimmen. Ein zeit- und arbeitsintensiver Schritt war dabei bisher die manuelle Herstellung der zahlreichen Puffer mit verschiedenen Ionenstärken und pH-Werten. Wir haben deshalb eine Software entwickelt, die es erlaubt, definierte Puffer mit Hilfe eines Liquid-Handling-Systems in wenigen Minuten herzustellen.

Screening-Anwendungen

Im Downstream Processing werden Systeme im 96-Well-Format verwendet, die ein effizientes Screening von Bedingungen für die Aufreinigung erlauben. Hierzu sind kommerziell 96-Well-Platten mit Chromatographie-Material (Atoll-Säulen, Atoll; PreDicator-Platten, GE-Healthcare) oder mit Membranadsorbentien (Vivawell, Sartorius Stedim) verfügbar. Das Screening kann automatisiert mit Liquid-Handling-Systemen durchgeführt werden. Für die Aufreinigung ist die geeignete Zusammensetzung des Lade-, des Wasch- und des Elutionspuffers zu bestimmen; in allen Puffern spielen dabei die exakte Ionenstärke als auch der genaue pH-Wert eine wesentliche Rolle.

BufferCalc96 Software

Erstaunlicherweise gibt es – unseres Wissens nach – auf dem Markt kein System, das eine automatisierte Pufferherstellung mit definierten pH-Werten und Ionenstärken für die High-Throughput-Prozessentwicklung anbietet. Wir haben deshalb in der Fachstelle Biochemie ein solches System entwickelt. Der Kern des Systems liegt dabei in der BufferCalc96 Software, welche die zu verwendenden Volumina der Stammlösungen berechnet. Die Software verwendet dazu Gleichungen aus der Debye-Hückel-Theorie in einem iterativen Verfahren, um die Zusammensetzung eines Puffers mit definierter Ionenstärke und definiertem pH-Wert zu berechnen.

In der BufferCalc96 Software muss der Experimentator das Plattenlayout, das Puffersystem und die Eingabeparameter wie Pufferkonzent-

ration, pH-Wert, Ionenstärke und Temperatur definieren und vier Stammlösungen, bestehend aus der sauren und der basischen Komponente des Puffers, einer Salzlösung und Wasser, festlegen. Die Software berechnet die exakte Pufferzusammensetzung, übergibt die zu pipettierenden Volumina an die Software des Liquid-Handling-Systems, welches die Puffer aus den bereitgestellten Stammlösungen herstellt.

Im Rahmen der Entwicklung der Software wurden die pH-Werte und die Ionenstärken der vom Liquid-Handling-System hergestellten Puffer verifiziert. Die Software lieferte für alle getesteten Puffer (Phosphat, Tris-HCl, Acetat, Formiat, MES und CAPS) sehr gute Übereinstimmungen mit den Sollwerten (Abb. 1).

Praktische Umsetzung

Die BufferCalc96 Software wurde zum Screening der Aufreinigungsbedingungen für einen monoklonalen Antikörper mit einer Membranadsorber-96-Well-Platte getestet. Dabei wurden mit Hilfe der Software aus 48 verschiedenen Pufferbedingungen, welche vier Ionenstärken und 12 pH-Werte abdeckten, in Doppelbestimmungen die optimalen Bedingungen ermittelt. Abbildung 2 zeigt die Menge des Ziel-

proteins im Eluat in Abhängigkeit von pH-Wert und Ionenstärke.

Fazit

Mit Hilfe der von der ZHAW entwickelten Software ist es möglich, 96 verschiedene Puffer mit definierten Ionenstärken und pH-Werten in nur 9 Minuten herzustellen. Eine erste Lizenz der Software wurde dem Liquid-Handling-System-Hersteller Tecan erteilt; die Software ist seit Oktober 2011 unter dem Namen Buffer Creation Wizard kommerziell erhältlich.

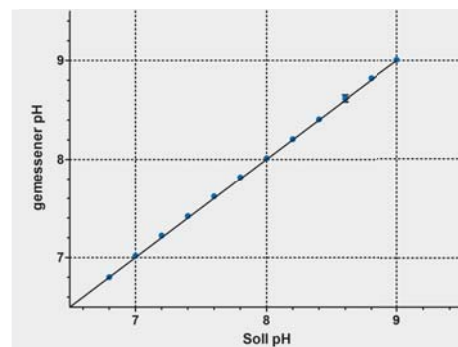


Abb. 1: Verifizierung eines mit der BufferCalc96 Software hergestellten Tris-HCl-Puffers. Gemessene pH-Werte stimmen sehr gut mit den Soll-pH-Werten überein ($R=0.9997$).

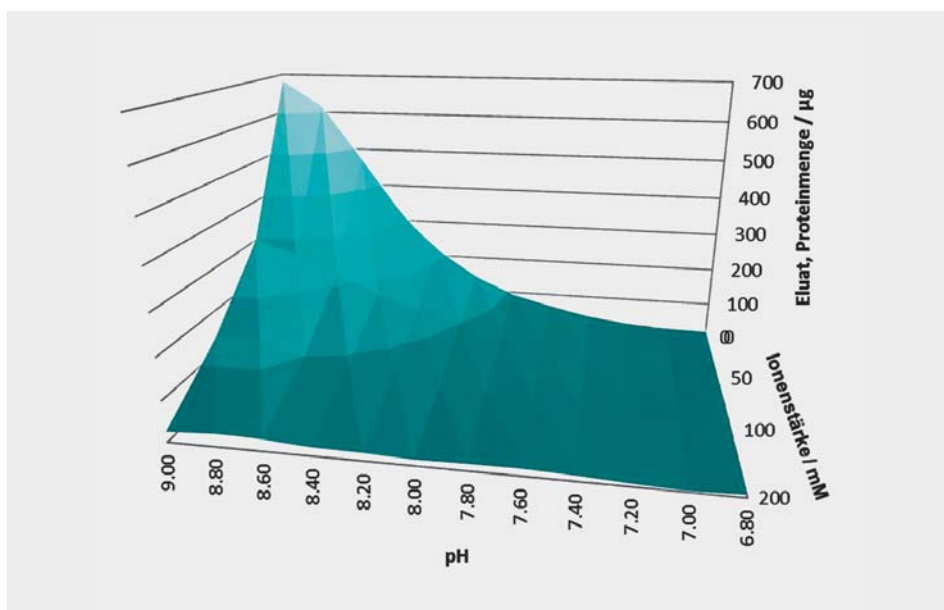


Abb. 2: Ermittlung der optimalen Bedingung zur Reinigung eines monoklonalen Antikörpers mit einer Membranadsorber-96-Well-Platte.