

## EndoGrade™ Ovalbumin

# Produktion von endotoxinfreiem Ovalbumin für die Asthmaforschung

MAIKE SCHÜTT UND STEPHANIE STECK  
PROFOS AG, REGENSBURG

Kontaminationen von Proteinlösungen stellen seit langer Zeit sowohl für die forschende als auch für die produzierende Industrie ein großes Problem dar. Das Augenmerk liegt hierbei besonders auf der Vermeidung von Verunreinigungen durch Bakterien, Mykoplasmen, Hefen oder Pilzen. Für Unternehmen, die Substanzen für therapeutische Anwendungen entwickeln, stehen heute Endotoxine (Lipopolysaccharide, LPS) im Vordergrund.

■ Endotoxine sind biologisch aktive, strukturelle Bestandteile Gram-negativer Bakterien und folglich untrennbar mit rekombinant in Gram-negativen Bakterien exprimierten Proteinen verbunden. LPS-Verunreinigungen können aber auch anderweitig, z. B. durch verschmutztes Wasser, verschmutzte Glas- oder Plastikwaren entstehen. Kontaminationen biologischer Lösungen mit Endotoxinen führen bei Stimulationsexperimenten in Zellkulturen oder in Tiermodellstudien zu Artefakten und Fehlinterpretationen. Dadurch erlangt die Vermeidung bzw. Entfernung von Endotoxinen in der heutigen Zeit immer größere Bedeutung.

### Endotoxin-Entfernung

Entfernung von Endotoxinen ist einer der schwierigsten Prozesse in der Proteinreinigung. Viele auf dem Markt erhältliche Produkte sind nicht imstande, LPS zufrieden stellend zu entfernen oder erfordern zeitintensive und komplizierte Arbeitsschritte. Oft kann

eine ausreichende LPS-Entfernung nur mit massivem Substratverlust erzielt werden. Die Entfernung von LPS auf weniger als 1 ng/mg (10 EU/mg) stellt daher eine besonders anspruchsvolle Aufgabe dar. Nur Methoden mit höchster LPS-Entfernungskapazität, vereint mit ausgezeichneter Wiederfindungsrate der Zielsubstanz, sind akzeptierbar und führen zu den gewünschten Ergebnissen. Um diesen schwierigsten Anforderungen zu entsprechen, hat die Profos AG eine Endotoxinfalle für den *lab scale*- und *pilot scale*-Bereich entwickelt: EndoTrap®.

### Endotoxine und das Immunsystem

Endotoxine gehören zu den Pyrogenen, d. h. sie können bei Kontakt mit Schleimhäuten und bei Übertritt ins Blut bei Menschen und Tieren Fieber erzeugen. LPS verursacht eine sehr starke Stimulation verschiedener Zellen des Immunsystems, wie beispielsweise von Monozyten, Makrophagen, B-Zellen, polymorphen Kernzellen und endothelialen Gefäß-

zellen. Die Immunogenität von LPS ist dabei auf die Polysaccharidkomponente, die Toxizität, welche stark konzentrations- und zeitabhängig ist<sup>[1]</sup>, auf Lipid A zurückzuführen.

### Asthma-Modell

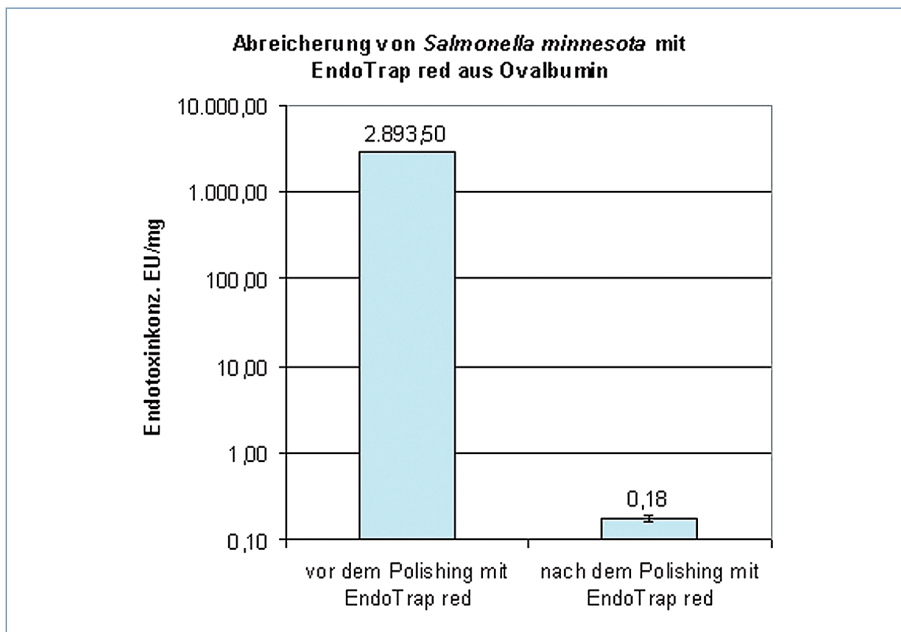
„Ein Viertel der Deutschen leidet unter allergischem Asthma, unter Heuschnupfen, Neurodermitis oder anderen Allergien“<sup>[2]</sup>. Mausmodelle eignen sich besonders gut für die Aufklärung der Pathomechanismen des allergischen Asthmas, da ihre Atemwege denen des Menschen sehr ähnlich sind. Für die Asthmainduktion werden Mäuse mit Ovalbumin, einem etablierten Modellallergen, sensibilisiert. Nach wenigen Wochen werden die Mäuse inhalativ mit den zu untersuchenden Allergenen provoziert und die Lungenfunktion zur Erfassung der Asthmareaktion untersucht. Daran anschließend wird die Atemwegsreaktion gemessen und einige Stunden später die einsetzende Atemwegsveränderung (Spätreaktion) analysiert. Nach ein bis zwei Tagen kann schließlich die bronchiale Überempfindlichkeit (Hyperreaktivität) der Atemwege erfasst werden<sup>[3]</sup>.

### LPS-Kontaminationen bei Ovalbumin

Kommerziell erhältliches Ovalbumin ist stark mit LPS kontaminiert, sodass es bei der Verwendung als Modellallergen zu einer Aktivierung von endothelialen Zellen führt. Dieses wurde von Watanabe und Kollegen 2003<sup>[4]</sup> ausführlich beschrieben. Dagegen hat endotoxinfreies Ovalbumin keine aktivierende Wirkung mehr. Es ist effektiver und führt zu einer stärkeren Stimulation der IgE-Produktion und respiratorischen Dysfunktion im murinen AHR (*airway hyperresponsiveness*)-Modell. Es konnte weiter gezeigt werden, dass die Anti-Ovalbumin-Antikörperproduktion bei LPS-verunreinigtem Ovalbumin im Vergleich zu endotoxinfreiem Ovalbumin unterdrückt war. Von Watanabe und Kollegen<sup>[4]</sup> wurde gefolgert, dass mit LPS kontaminiertes Ovalbumin einen Toleranzzustand im AHR-Mausmodell erzeugt. Da Menschen durch organische Stäube Antigene und Endotoxine aufnehmen, reflektieren die Mausmodelle,

Tab. 1: Testung verschiedener Rohstofflieferanten (LPS-Gehalt vor und nach der Aufreinigung mit EndoTrap® red).

Rohstofflieferant	LPS-Kontamination [EU/mg]	LPS-Gehalt nach Polishing mit EndoTrap® red [EU/mg]	LPS-Entfernungseffizienz [%]
A	723	13,61	98,12%
B	1038	0,26	99,97%
C	257	0,29	99,89%
D	342	0,45	99,87%



▲ **Abb. 1:** Abreicherung von *Salmonella minnesota*-LPS aus Ovalbumin mit EndoTrap® red: EndoGrade™ Ovalbumin (< 1 EU/mg) gelöst in EndoTrap® Low Salt Equilibration Buffer, mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurde mit Re-LPS (LPS von *S. minnesota* R595 (Re); Alexis Corporation) auf ca. 3.000 EU/mg (= Arbeitslösung) angereichert. Das Auftragsvolumen betrug 1 ml. Es wurden zur Aufreinigung 1 ml EndoTrap® red-Säulen nach Protokoll des Herstellers verwendet. Die Endotoxin-Konzentration wurde mit einem kinetisch-chromogenen LAL-Test bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde mittels Absorption bei 280 nm berechnet. Die Grafik zeigt die Mittelwerte aus drei Versuchen (bzw. drei verschiedene EndoTrap®-Säulen). Es konnte eine Endotoxin-entfernung von jeweils vier Log-Stufen erreicht werden.

bei denen mit LPS-verunreinigtem Ovalbumin gearbeitet wurde, zum Teil die klinische Situation – sie berücksichtigen aber nicht die alleinige Wirkung des Proteinantigens auf die Physiologie<sup>[4]</sup>.

Des Weiteren wurde von Watanabe und Kollegen<sup>[4]</sup> gezeigt, dass unterschiedlichste Endotoxin-Entfernungsmethoden (*endotoxin-affinity resin END-X®*, *polymyxin B beads*, *Extrac-ti-Gel® D detergent-removing gel*) nicht geeignet sind, die LPS-Kontamination, die von *Salmonella minnesota* herrührt, aus einer Ovalbuminlösung zu entfernen<sup>[3]</sup>.

Profos hat im Rahmen der biotechnologischen Produktion von endotoxinfreiem Ovalbumin verschiedene Rohstofflieferanten getestet. Alle diese Ovalbumin-Präparationen (> 98 % Reinheit) waren mit LPS verunreinigt. Die LPS-Kontaminationen reichten von

über 1.000 bis 250 EU/mg (Tab. 1) und wurden mit einem kinetisch-chromogenen LAL-Assay bestimmt. Die Ovalbumin-Konzentration lag jeweils bei 10 mg/ml.

Die Produktqualität wurde zudem u. a. auf einem SDS-Gel überprüft. Dabei zeigte sich, dass der Rohstoff von Lieferant A die schlechteste Qualität hatte (mehrere Banden im SDS-Gel). Der Versuch machte damit auch deutlich, dass die LPS-Entfernungseffizienz von EndoTrap® vom generellen Reinheitsgrad des Rohstoffs abhängig ist.

Allgemein kann man sagen, dass die Anzahl der bis zur gewünschten Restkontamination notwendigen Reinigungsschritte von den biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften der Proben abhängt. Parameter wie pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur, Kontaktzeit etc. können jedoch bei jeder Anwen-

dung optimiert werden, sodass eine maximale LPS-Entfernung mit minimalem Produktverlust erreicht werden kann.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die patentierte Endotoxin-Entfernungstechnologie EndoTrap® auch geeignet ist, LPS-Verunreinigungen, die von *Salmonella minnesota* stammen, aus Ovalbuminlösungen zu entfernen (**Abb. 1**).

Endotoxinfreies Ovalbumin wird mittlerweile von Profos in Form von EndoGrade™ Ovalbumin (Endotoxin-Konzentration < 1 EU/mg) angeboten. Nähere Informationen dazu finden Sie auf [www.endograde.de](http://www.endograde.de)

## Literatur

- [1] Tsi, C. J., Chao, Y., Chen, C. W., Lin, W. W. (2002): Aurintricarboxylic acid protects against cell death caused by lipopolysaccharide in macrophages by decreasing inducible nitric-oxide synthase induction via IkappaB kinase, extracellular signal-regulated kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase inhibition. *Mol. Pharmacol.* 62: 90–101.
- [2] FOCUS-Online, 14.02.2006, Asthma und Allergien, Erste Impfung in Sicht ([www.focus.de/gesundheitsratgeber/asthma/-und-allergien\\_aid\\_104890.html](http://www.focus.de/gesundheitsratgeber/asthma/-und-allergien_aid_104890.html))
- [3] Lungenfunktionsmessungen im Asthma-Mausmodell. Fraunhofer ITEM Homepage ([www.item.fraunhofer.de/de/medien/newsreports/Mai\\_2002/7.html](http://www.item.fraunhofer.de/de/medien/newsreports/Mai_2002/7.html)), Zugriff am 18.09.2007.
- [4] Watanabe, I., Miyazaki, Y., Zimmerman, G. A., Albertine, K. H., McIntyre, T. M. (2003): Endotoxin contamination of ovalbumin suppresses murine immunologic responses and development of airway hyper-reactivity. *J. Biol. Chem.* 278: 42361–42368.



## Korrespondenzadresse:

Dr. Stephanie Steck<sup>1</sup>  
Maïke Schütt<sup>2</sup>  
Profos AG  
Josef-Engert-Straße 11  
D-93053 Regensburg  
Tel.: 0941-942 62 26  
Fax: 0941-942 62 20  
[stephanie.steck@profos.de](mailto:stephanie.steck@profos.de)  
[www.endograde.de](http://www.endograde.de)