

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Bachelorarbeit

Im Studiengang Biotechnologie

**Eignung von Membran-Ionenaustauschern in der
Verdrängungschromatographie am Beispiel der Trennung des
Proteinmonomers und Proteinaggregaten von bovinem Gammaglobulin**

vorgelegt von

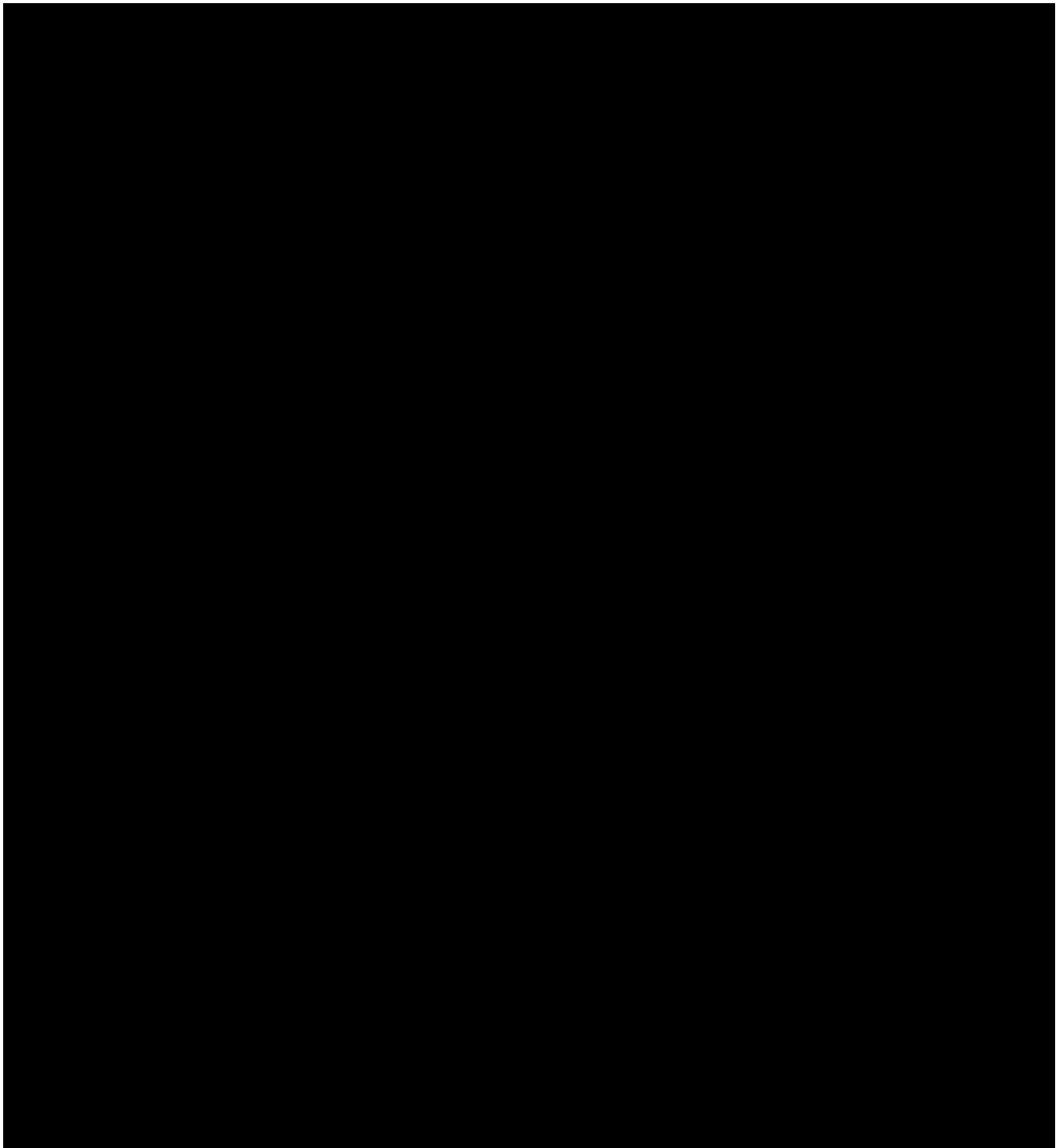
Verena Diana Fechter

[REDACTED]

Hamburg, 17. Dezember 2020

Erstgutachter: Prof. Dr. Birger Anspach (HAW Hamburg)

Zweitgutachter: Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker (HAW Hamburg)



Zusammenfassung

Immunglobuline werden zunehmend als Arzneimittel eingesetzt. Diese werden in biotechnologischen Verfahren hergestellt. Dabei stellen Downstreamprozesse häufig eine zeitliche Begrenzung für den Gesamtprozess dar. Chromatographiemembranen können eingesetzt werden, um Aufreinigungsprozesse zu optimieren und zeitlich zu verkürzen. Durch die netzartige Struktur einer Membran sind die Bindungsstellen für große Moleküle besser zugänglich als bei partikulären Trägern. Außerdem erlauben Chromatographiemembranen höhere Fließgeschwindigkeiten, da innerhalb der Membran kaum Diffusion stattfindet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Verdrängung der Antikörpermonomere durch Aggregate an Membran-Ionenaustauschern stattfindet. Das Ziel war es, die Monomere von deren Aggregaten zu trennen und dabei möglichst hohe Monomeranteile zu erzeugen. Dies wurde anhand der Aufreinigung von bovinem Gammaglobulin bewerkstelligt. In den Hauptversuchen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Membran-Kationaustauscher, ein partikulärer Kationaustauscher und ein Membran-Anionenaustauscher eingesetzt. Die Säulen wurden im Frontalmodus betrieben. Die Eluate der Ionenaustauschchromatographie wurden hinsichtlich ihrer Monomer- und Aggregatanteile analysiert. Dafür wurde die Größenausschlusschromatographie eingesetzt. In dieser Arbeit konnte ein Verdrängungseffekt an den Membran-Ionenaustauschern beobachtet werden. Dabei konnten Monomeranteile von 79 % bis 89 % erzielt werden. Der Monomeranteil des unbehandelten Gammaglobulins betrug 72 %. Der Monomeranteil lag dabei zu Beginn des Durchbruchpeaks am höchsten und ist mit zunehmender Peakhöhe gesunken. Somit konnte diese Arbeit demonstrieren, dass die Trennung von Antikörpermonomeren und Aggregaten mit der Verdrängungschromatographie an Membranadsorbern möglich ist. Zudem konnten ähnliche Verläufe hinsichtlich der Monomerausbeute an verschiedenen Chromatographiemembranen beobachtet werden. Dies spricht für die Reproduzierbarkeit des Verdrängungseffektes an Chromatographiemembranen. Allerdings konnte bisher keine effektivere Verdrängung an Membranen als an partikulären Trägern bezüglich der Monomerausbeute festgestellt werden.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	I
Zusammenfassung.....	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
2. Theoretischer Hintergrund.....	3
2.1. Proteine und Immunglobuline.....	3
2.2. Chromatographie	6
2.2.1. Chromatographie in der Praxis.....	8
2.2.2. Ionenaustauschchromatographie	12
2.2.3. Größenausschlusschromatographie.....	14
2.2.4. Zonenchromatographie.....	15
2.2.5. Frontal- und Verdrängungschromatographie	16
2.2.6. Membranadsorber als stationäre Phase	20
3. Material und Methoden	24
3.1. Geräte und Chemikalien	24
3.2. Puffer- und Probenvorbereitung	27
3.2.1. Puffervorbereitung	27
3.2.2. Probenvorbereitung	28
3.3. Trennung der Proteinaggregate und dem Monomer	29
3.3.1. Vorversuche.....	29

3.3.2. Hauptversuche.....	30
3.4. Analytik mit Größenausschlusschromatographie.....	33
3.5. Auswertung.....	35
4. Ergebnisse und Diskussion	36
4.1. Vorversuche	36
4.2. Hauptversuche	40
4.3. Analytik	46
5. Fazit und Ausblick.....	52
Quellenverzeichnis	VIII
Eidesstattliche Erklärung	XII
Anhang A	XIII
Anhang B.....	XIV

Abkürzungsverzeichnis

Ig	Immunglobulin
SEC	engl. <i>size exclusion chromatography</i> ; Größenausschlusschromatographie
SDC	engl. <i>sample displacement chromatography</i> ; Verdrängungschromatographie
BSA	bovines Serumalbumin
γ-Glob	Gammaglobulin
FPLC	engl. <i>fast protein liquid chromatography</i>
CV	engl. <i>column volume</i> ; Säulenvolumen
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
μm	Mikrometer
cm	Centimeter
mg	Milligramm
min	Minute
l	Liter; ml $\triangleq$ milli Liter
M	Stoffmengenkonzentration [mol/l]; m $\triangleq$ milli [mmol/l]
mS	Millisiemens
mAU	engl. <i>milli Absorption Units</i> ; Milli Absorptionseinheiten
σ	Standardabweichung
°C	Grad Celsius

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Peptids.....	3
Abbildung 2: Schematische Abbildung der verschiedenen Antikörperklassen.....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ablaufs einer Flüssigkeitschromatographie.	7
Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines typischen FPLC Systems.....	9
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Ventilstellungen LOAD und INJECT des Injektionsventils.....	11
Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines Superloops.....	12
Abbildung 7: Theoretischer Verlauf eines Chromatogramms einer Zonenchromatographie als Adsorptionschromatographie.	16
Abbildung 8: Theoretischer Verlauf eines Chromatogramms einer Frontalchromatographie mit einer Adsorptionschromatographie.....	17
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Massentransports außer- und innerhalb eines porösen Partikels sowie in einer Membran.	21
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Ventilstellungen des Injektionsventils mit angeschlossenem Probenventil und Probenpumpe an der Chromatographieanlage ÄKTA explorer.....	34
Abbildung 11: Chromatogramm der Säule Sartobind S im Binden-Elution-Modus mit einer Salzelution.	37
Abbildung 12: Chromatogramm der Säule Sartobind S im Binden-Elution-Modus mit einer pH- Elution.....	38
Abbildung 13: Chromatogramme der Kationaustauscher GigaCap, Sartobind S und Mustang S im Frontalmodus, beim pH-Wert 4,5.	41
Abbildung 14: Chromatogramme der Kationaustauscher GigaCap, Sartobind S und Mustang S im Frontalmodus, beim pH-Wert 5,0.	43
Abbildung 15: Chromatogramm des Anionenaustauschers Sartobind Q im Frontalmodus, beim pH-Wert 8,5.	44
Abbildung 16: Chromatogramm des Anionenaustauschers Sartobind Q im Frontalmodus, beim pH-Wert 8,5.	45

Abbildung 17: Chromatogramm einer SEC vom unbehandelten Gammaglobulin zur Bestimmung des Monomer- und Aggregatanteils.	47
Abbildung 18: Graphische Darstellung der ermittelten Monomeranteile gegenüber der Peakhöhe des Durchbruchs in Prozent.	49

Anhang:

Abbildung 19: Chromatogramme der Zonenchromatographien mit den Säulen GigaCap, Sartobind S und Mustang S bei einem pH-Wert von 4,5.....	XIII
Abbildung 20: Chromatogramme der Zonenchromatographien mit den Säulen GigaCap, Sartobind S und Mustang S bei einem pH-Wert von 5,0.....	XIII
Abbildung 21: Chromatogramm des Anionenaustauschers Sartobind Q in der Zonenchromatographie beim pH-Wert 8,5.....	XIV
Abbildung 22: Chromatogramm des Anionenaustauschers Sartobind Q in der Zonenchromatographie beim pH-Wert 9,0. Dieser Versuch fand direkt vor der entsprechenden Frontalchromatographie statt.....	XIV

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Ionenaustausch- und Größenausschlusssäulen.....	24
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Verbrauchmaterialien.....	25
Tabelle 3: Verwendete Geräte	26
Tabelle 4: Verwendete Puffersysteme für die Experimente und Analytik mit der entsprechenden Pufferkonzentration, der Salzkonzentration und dem pH-Wert	27
Tabelle 5: Elutionsbedingungen der Vorversuche	29
Tabelle 6: Verschiedene Parameter der Hauptversuche mit vier verschiedenen Säulen.....	32

1. Einleitung

Antikörper sind weit verbreitet in der pharmazeutischen Industrie. Unter anderem kommen Antikörper in der Behandlung verschiedener Krebsarten und rheumatoider Arthritis zum Einsatz (Clark & Pazdernik, 2009). Unter den zehn umsatzstärksten Arzneimitteln im Jahr 2018 waren sechs monoklonale Antikörper (Statista, 2019).

Therapeutische Antikörper werden meistens biotechnologisch hergestellt (Clark & Pazdernik, 2009). Dabei lässt sich ein biotechnologisches Verfahren im Allgemeinen in drei wesentliche Prozessschritte unterteilen. Es wird zwischen *Up*-, *Mid*-, und *Downstream* Prozessen unterschieden. Bei einem Upstream-Prozess findet die Vorbereitung der Wirtszellen statt. Oftmals beinhaltet dies die genetische Veränderung der Zellen. In einem Midstream-Prozess werden die Zellen oder der Organismus kultiviert. Der Downstream-Prozess beinhaltet die Isolierung und die Aufreinigung des Zielprodukts. Die Prozesskosten steigen bei einem Up- und Midstream-Prozess mit zunehmenden Produktkonzentrationen nur wenig. Dagegen verhalten sich die Aufreinigungskosten proportional zu der Produktkonzentration. Dies stellt vor allem eine Problematik dar, da die Produktmengen aus den Midstream-Prozessen in den vergangenen Jahren gestiegen sind (Freitag, 2014). Darüber hinaus sind Downstream-Prozesse zeitaufwändig, so dass dieser Schritt oftmals den gesamten Bioprozess zeitlich limitiert (Kelley, 2009). Daher ist es von zunehmender Bedeutung, in der Aufreinigung von biotechnologischen Produkten Alternativen zu finden, die eine Kosten- und Zeitersparnis erwirken, ohne dass die Produktqualität sinkt.

Einen vielversprechenden Ansatz liefern Chromatographiemembranen (Brämer, et al., 2019). Diese können in chromatographischen Prozessen statt herkömmlicher partikulärer Träger eingesetzt werden. Sie zeichnen sich besonders durch die bessere Zugänglichkeit an die Adsorberoberfläche aus. Darüber hinaus können Chromatographiemembranen kostengünstig hergestellt und bei hohen Fließgeschwindigkeiten betrieben werden. Chromatographiemembranen kamen in der Vergangenheit weniger zum Einsatz, da poröse, partikuläre Träger eher zu Verfügung standen. Daher müssen Arbeitsschritte mit Membranen erforscht und optimiert werden.

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin die Eignung der Verdrängungschromatographie mit Chromatographiemembranen als stationäre Phase zu untersuchen. Dabei sollen Antikörpermonomere von deren Aggregaten verdrängt werden. Dieser Effekt konnte bereits an partikulären Trägern beobachtet werden. Dazu wird in dieser Arbeit bovines Gammaglobulin verwendet. Ferner sollen möglichst hohe Monomerausbeuten mit niedrigen Aggregatanteilen erzeugt werden. Darüber hinaus soll überprüft werden, ob Chromatographiemembranen eine effektivere Verdrängung als partikuläre Träger bezüglich der Monomerausbeute erlauben.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1. Proteine und Immunglobuline

Proteine sind aufgebaut aus Aminosäuren (Stryer, et al., 2015). Diese bestehen aus einem zentralen Kohlenstoffatom, an dem eine Carboxylgruppe, eine Aminogruppe, ein Wasserstoffatom und eine charakteristische Seitenkette gebunden sind. Die Carboxylgruppe einer Aminosäure wird über eine Peptidbindung an die Aminogruppe der benachbarten Aminosäure gebunden. Es werden mehrere hundert Aminosäuren aneinandergeknüpft (s. Abbildung 1). Die daraus entstehende Kette wird Peptid genannt. Ein Peptid bildet die Primärstruktur eines Proteins. Durch die verschiedenen Interaktionen der Aminosäureseitenketten untereinander bildet ein planares Peptid über einer Sekundär- und Tertiärstruktur eine dreidimensionale Quartärstruktur. In diesem Fall wird von einem Protein gesprochen.

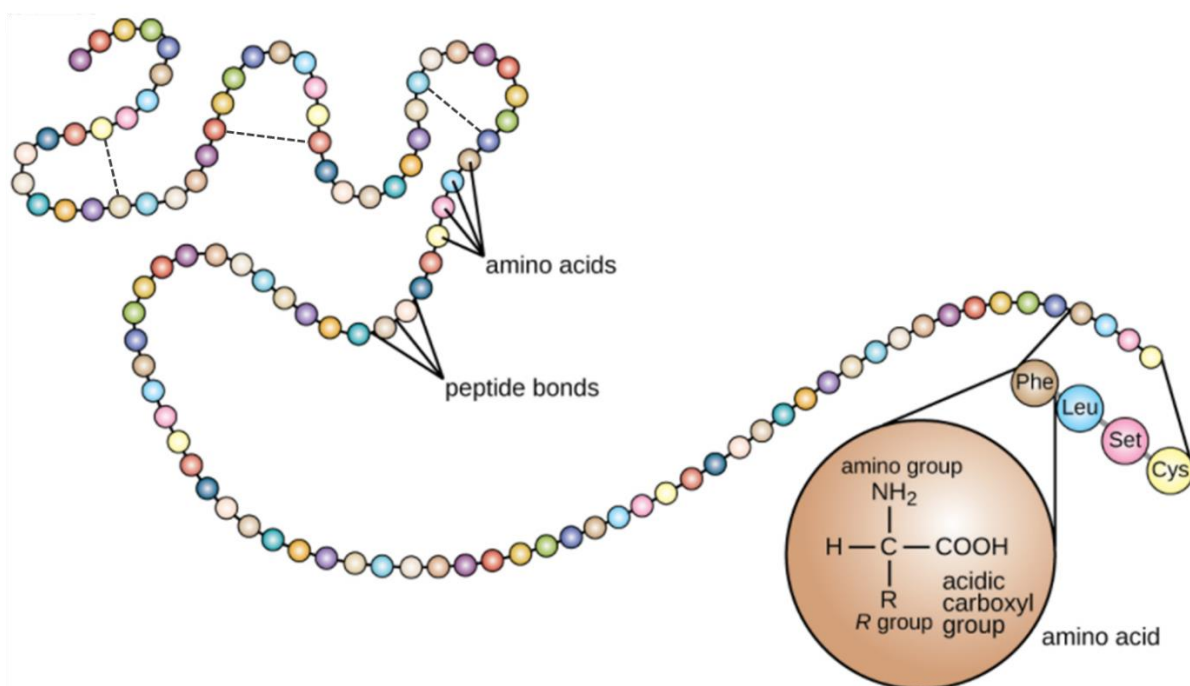


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Peptids. Abgebildet ist die chemische Struktur einer Aminosäure. R steht für die charakteristische Seitenkette. Eine Aminosäure wird über die Carboxylgruppe an die Aminogruppe der nächsten Aminosäure gebunden. Es entsteht eine lange Kette aus Aminosäuren, die Peptid genannt wird. Die Seitenketten der Aminosäuren interagieren ebenfalls miteinander, so dass aus der Peptidkette eine 3-dimensionale Struktur entsteht. Die entstandene Struktur wird Protein genannt. Verändert nach creative proteomics, 2020.

Die Seitenketten der Aminosäuren unterscheiden sich in Größe, Form, Ladung, Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und Hydrophobizität (Stryer, et al., 2015). Daraus entstehen insgesamt 20 verschiedene Aminosäuren. Jedes Protein hat in Abhängigkeit seiner Aminosäuren eine unterschiedliche Anzahl an positiven und negativen Ladungen aus denen sich die Nettoladung eines Proteins ergibt. Der pH-Wert, an dem die Nettoladung eines Proteins null beträgt, wird isoelektrischer Punkt oder pI-Wert genannt. Liegt der pH-Wert der Proteinlösung unter dessen pI-Wert, so liegen die Aminosäuren zunehmend protoniert vor und die Nettoladung des Proteins ist positiv. Befindet sich der pH-Wert der Lösung oberhalb des pI-Wertes, liegen die Aminosäuren vermehrt deprotoniert vor und die Nettoladung des Proteins ist negativ.

Immunglobuline (Ig), auch genannt Antikörper, sind globuläre Proteine, die im Blutserum von Wirbeltieren vorkommen (Kaufmann, 2016). Sie sind Teil des adaptiven Immunsystems. Dabei können sie sowohl Antigene erkennen als auch eine Immunantwort auslösen. Es wird unterschieden zwischen IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. Dabei macht IgG mit knapp 75% den größten Anteil im Blutserum aus (Clark & Pazdernik, 2009). Der Aufbau eines Antikörpers unterteilt sich in zwei leichte und zwei schwere Ketten sowie in ein Fc- und Fab-Fragment. Die schwere Kette variiert je nach Ig-Klasse. Immunglobuline der Ig-Klassen IgA und IgM lagern sich von Natur aus zu Dimeren bzw. Pentameren zusammen. Sie erfüllen biologische Funktionen wie beispielsweise die Verklumpung von Mikroorganismen. Die Strukturen der verschiedenen Antikörperklassen und den Polymeren werden in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

Zur Bildung von Antikörperpolymeren kann es auch während der Produktion und Aufreinigung von Antikörpern kommen (Cromwell, et al., 2006). Diese werden auch Aggregate genannt. Antikörperaggregate können bei diagnostischen Tests zu Fehlern führen. Des Weiteren können sie bei Verabreichung therapeutischer Antikörper eine nicht beabsichtigte Immunantwort auslösen (Rosenberg, 2006).

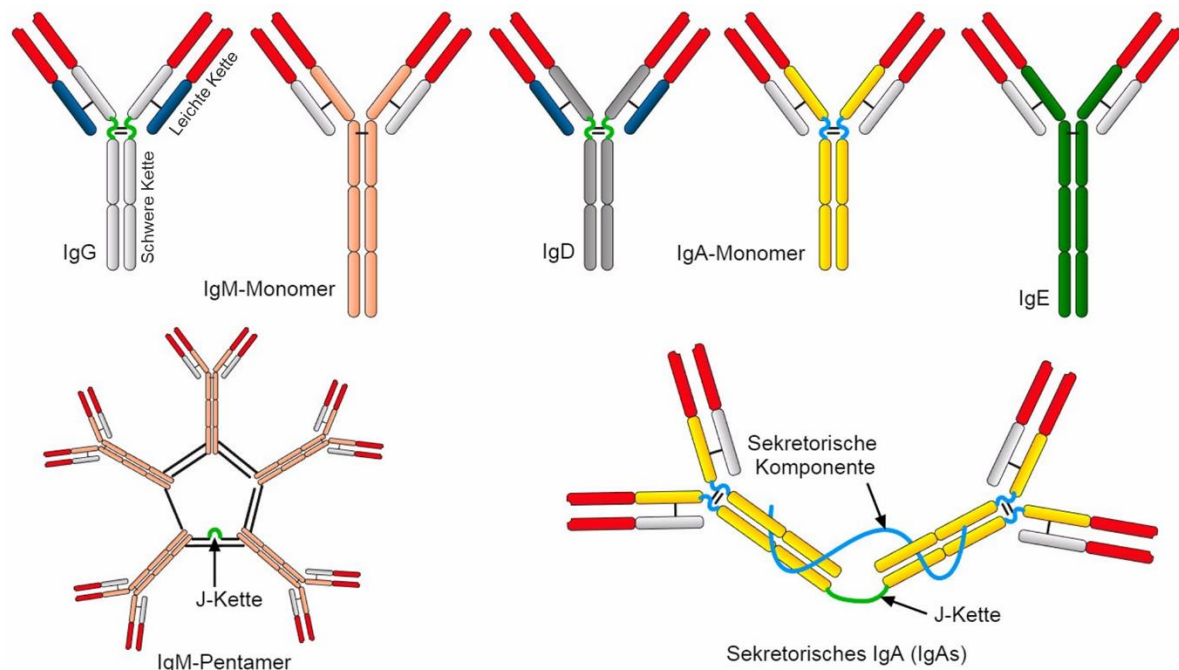


Abbildung 2: Schematische Abbildung der verschiedenen Antikörperklassen. Antikörper bestehen aus einer schweren und einer leichten Kette. Die schwere Kette variiert je nach Ig-Klasse. Antikörper der Klassen IgM und IgA lagern sich natürlich zu Polymeren zusammen. Verändert nach University of Parma, 2017.

Aggregate weisen wegen ihrer Größe und Konformation eine höhere Nettoladung als ihre Monomere auf (Wan & Wang, 2001). Diese Eigenschaft kann bei der Ionenaustauschchromatographie genutzt werden, um unerwünschte Aggregate von den Monomeren zu trennen.

Des Weiteren wird zwischen poly- und monoklonalen Antikörpern differenziert. Während monoklonale Antikörper ein Epitop eines Antigens erkennen, detektieren polyklonale Antikörper mehrere Epitope eines Antigens. Der Unterschied entsteht durch die Herstellung. Monoklonale Antikörper werden mit der Hybridomtechnik produziert (Clark & Pazdernik, 2009). Dabei wird das Antigen beispielsweise in eine Maus injiziert. Diese bildet daraufhin antikörperproduzierende B-Lymphozyten (B-Zellen), welche nachfolgend isoliert werden. Anschließend kann eine einzelne B-Zelle mit jeweils einer immortalen Myelomzelle fusioniert werden. Aus den fusionierten Zellen wird eine Zellkultur erstellt. Aus dieser werden wiederum die Antikörper isoliert. Die produzierten Antikörper sind identisch, da jede Zellkultur aus einem einzelnen Klon entstanden ist. Bei der Herstellung polyklonaler Antikörper wird Tieren ebenfalls das Antigen injiziert. Bei dieser Methode werden die Antikörper direkt aus dem Blutserum isoliert und

aufgereinigt (Thermo Scientific Pierce, 2020). Das in dieser Arbeit verwendete bovine Gammaglobulin wird ebenso aus tierischem Blutserum gewonnen (Fey, et al., 1975). In diesem Fall von Rindern. Dabei wird das Blutserum aus mehreren Tieren gepoolt. Die Tiere wurden vorher nicht einem bestimmten Antigen ausgesetzt. Daher variiert die Zusammensetzung der verschiedenen Immunglobulinen einer Charge dieses Produktes.

Monoklonale Antikörper finden in der Medizin einige Anwendungsmöglichkeiten (Clark & Pazdernik, 2009). Beispielsweise werden sie für diagnostische Verfahren eingesetzt, wie immunbasierte Assays, aber auch für therapeutische Behandlungen, wie die Bekämpfung verschiedener Krebserkrankungen. Der erste arzneimedizinisch eingesetzte Antikörper ist Rituximab. Er wurde im Jahr 1998 von der amerikanischen Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde (FDA) zugelassen. Rituximab wird vorwiegend bei der Behandlung von malignen Lymphomen und rheumatoider Arthritis eingesetzt (U.S. Food and Drug Administration, 2015). Sechs der zehn umsatzstärksten Arzneimittel aus dem Jahr 2018 waren therapeutische Antikörper (Statista, 2019). Den größten Umsatz erzielte der monoklonale Antikörper Adalimumab mit 20 Milliarden US-Dollar. Dieser ist gegen diverse Arthritis- und Darmerkrankungen zugelassen (MedlinePlus, 2018). Da monoklonale Antikörper so ein hohes Potential als Arzneimittel haben, ist es somit von immer größerer werdender Bedeutung, weitere Lösungen für die Produktion und Aufreinigung dieser zu finden.

2.2. Chromatographie

Die Chromatographie ist ein Verfahren, bei dem ein Stoffgemisch in seine Einzelbestandteile aufgetrennt wird (aprentas, 2017). Die Bestandteile des Stoffgemisches verteilen sich dabei zwischen einer stationären und mobilen Phase. Es wird zwischen der analytischen und der präparativen Chromatographie unterschieden. Das Ziel der analytischen Chromatographie ist im Allgemeinen, die Inhaltsstoffe eines Stoffgemisches zu identifizieren und zu quantifizieren. Bei der präparativen Chromatographie steht die Isolierung oder Aufreinigung eines Zielprodukts im Vordergrund. Diese kommt häufig in der Biotechnologie zum Einsatz.

Chromatographische Verfahren lassen sich hinsichtlich des Aggregatzustands der mobilen und stationären Phase einteilen (aprentas, 2017). Dabei wird zwischen der Gas- und Flüssigkeitschromatographie unterschieden. Da die Flüssigkeitschromatographie in dieser Arbeit zum Einsatz kam, wird sie im Folgenden näher beschrieben. Bei der Flüssigkeitschromatographie ist die mobile Phase, auch Eluent oder Fließmittel genannt, flüssig. Diese bewegt sich durch eine feste stationäre Phase. Das aufzutrennende Stoffgemisch befindet sich in einer kontinuierlich fließenden mobilen Phase und bewegt sich mit ihr an der stationären Phase entlang. Dabei können die Bestandteile des Stoffgemisches unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit der stationären Phase haben. Folglich trennen sich die Bestandteile des Stoffgemisches auf. Dieser Vorgang wird in Abbildung 3 dargestellt.

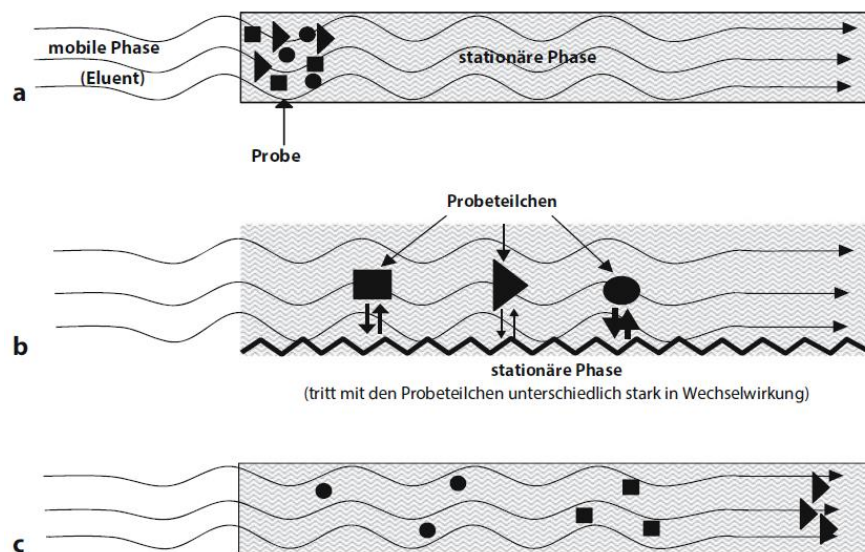


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ablaufs einer Flüssigkeitschromatographie. Bei diesem chromatographischen Verfahren bewegt sich eine flüssige mobile Phase über eine feste stationäre Phase (a). Die in der mobilen Phase gelösten Probenbestandteile treten mit der stationären Phase unterschiedlich stark in Wechselwirkung (b). Das Fließmittel, welches mit konstanter Geschwindigkeit weiter fließt, schiebt die Probenbestandteile, je nach Wechselwirkung, unterschiedlich schnell weiter. Folglich kommt es zur Auftrennung der Einzelbestandteile der Probe (c). (aprentas, 2017)

Als stationäre Phasen werden in der Praxis hauptsächlich partikuläre Träger eingesetzt (Anspach, 2017). Dies sind kleine, poröse Kügelchen mit einem Durchmesser von etwa 20 bis 100 μm . Partikuläre Träger bestehen häufig aus Agarose, Cellulose, Dextran oder Kieselgel (Siliziumoxid). Die Partikel werden meist in einem zylindrischen Behälter untergebracht, welches auch als Säule bezeichnet wird.

Zwischen den Partikeln entsteht in der gepackten Säule ein sogenanntes Zwischenkornvolumen. Zusätzlich entsteht aufgrund der Porosität der Partikel ein weiteres Volumen, das als Porenvolumen bezeichnet wird. Die mobile Phase bewegt sich durch das Zwischenkorn- sowie das Porenvolumen. Durch den Zwischenraum erfolgt der Massentransport durch die Strömung, auch bekannt als Konvektion. Da die Poren deutlich kleiner sind als der Durchmesser der Partikel, erfolgt der Massentransport in die Poren hauptsächlich durch Diffusion und Filmdiffusion. Der Massentransport durch Diffusion ist verhältnismäßig langsam. Dem entsprechend werden in der Praxis generell geringe Fließmittelgeschwindigkeiten gewählt. Dies wiederum führt zu verlängerten Prozesszeiten.

2.2.1. Chromatographie in der Praxis

Es besteht die Möglichkeit ein chromatographisches Verfahren zu automatisieren. Dies hat den Vorteil, dass die Versuche reproduzierbar sind und zum Teil unbeaufsichtigt ablaufen können (Madadlou, et al., 2011). Chromatographische Systeme zur Aufreinigung von Proteinen werden als FPLC (engl. *fast protein liquid chromatography*) bezeichnet. Im Folgenden wird ein typischer Aufbau zur Durchführung einer Chromatographie beschrieben. Ein FPLC System besteht meist aus einer speicherprogrammierbaren Steuerung, zwei Hauptpumpen, einer Mischzelle, einem Injektionsventil, einer Chromatographiesäule, mehreren Detektoren, einem Fraktionierer und einem Abfallbehälter. Die Komponenten sind über Schläuche und Kapillaren miteinander verbunden. Eine schematische Darstellung mit einem Detektor ist in Abbildung 4 abgebildet. An die Pumpen werden die benötigten Fließmittel, z.B. Puffersysteme angeschlossen. Die Pumpen können das Fließmittel mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit durch das System befördern. Dabei können in der Mischzelle verschiedene Fließmittel gemischt werden.

Über das Injektionsventil wird das Probengemisch in das System eingeführt. Von da aus passiert das Probengemisch die Chromatographiesäule. Am Säulenausgang befinden sich Detektoren zur qualitativen oder quantitativen Analyse des Eluenten. Typische Detektoren sind etwa ein UV-Detektor, ein Leitfähigkeitsmessgerät und eine pH-Sonde. Anschließend kann noch ein Fraktioniergerät verwendet werden, um die aufgetrennten Probenbestandteile in Fraktionen mit definierten Volumen aufzufangen (Bio-Rad, 2020). Die Messwerte der Detektoren können in einem Chromatogramm dargestellt werden. In diesem werden die gemessenen Signalstärken gegen die Zeit oder das Volumen des Fließmittels aufgetragen (aprentas, 2017).

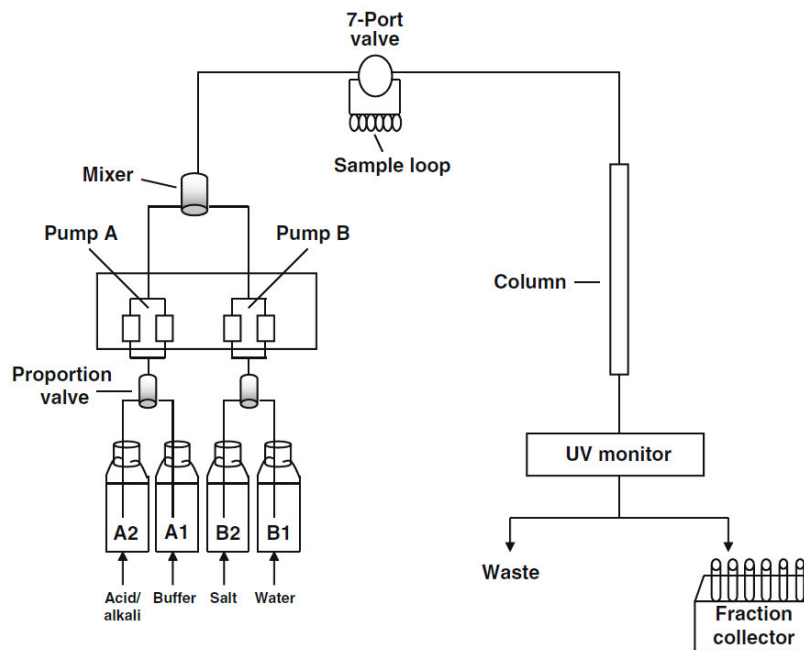


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines typischen FPLC Systems. Die Hauptkomponenten eines FPLC Systems umfassen eine speicherprogrammierbare Steuerung, zwei Hauptpumpen, eine Mischzelle, ein Injektionsventil, eine Chromatographiesäule, mehrere Detektoren, ein Fraktioniergerät und ein Abfallbehälter. (Madadlou, et al., 2011)

Über die Steuerung des Systems können verschiedene Verfahrensparameter eingestellt werden. Dazu gehören beispielweise die Fließgeschwindigkeit oder die Ventilstellungen. Über die Steuerung kann auch eingestellt werden wie lange welches Fließmittel durch das System befördert werden soll. Eine häufig herangezogene Einheit ist dabei das *column volume* (CV). Diese Einheit bezieht sich auf das Volumen der an das System angeschlossenen Chromatographiesäule. (Bio-Rad, 2020)

Der Probenauftrag über das Injektionsventil kann über unterschiedliche Techniken erfolgen (Amersham Biosciences, 2003). Diese werden im weiteren Fortgang beschrieben. Anschließend wird die allgemeine Funktionsweise des Injektionsventils erläutert. Zum einen kann an das Injektionsventil eine Probenschleife angeschlossen werden. Diese eignet sich für kleine Probenvolumina von etwa 50 µl bis 5 ml. Zum anderen kann statt einer Probenschleife eine sogenannter Superloop angeschlossen werden. Damit ist die Probenaufgabe mit einem Volumen bis zu 150 ml möglich. Der Superloop wird im Anschluss hieran genauer erläutert. Sind Probenvolumina höher als 150 ml vorhanden, werden in der Regel spezielle Probenpumpen eingesetzt. Die Probenschleife oder der Superloop können manuell oder über eine Probenpumpe befüllt werden. Bei der manuellen Befüllung wird an das Injektionsventil eine Spritze mit dem Probengemisch angeschlossen. Anschließend wird diese manuell betätigt. Wird eine Probenpumpe zur Befüllung eingesetzt, wird diese mit dem Injektionsventil und dem Behälter des Probengemisches verbunden. Es besteht zudem die Möglichkeit die Probenschleife oder den Superloop mit mehreren Proben hintereinander zu befüllen. Dazu wird ein Probenventil benötigt. An dieses können verschiedene Proben angeschlossen werden. In diesem Falle wird das Probenventil mit dem Injektionsventil verbunden.

Im Folgenden wird die allgemeine Funktionsweise des Injektionsventils beschrieben (Amersham Pharmacia Biotech, 1998). Für die Erläuterung wird beispielhaft eine Probenschleife verwendet. Diese wird an die Positionen (2) und (6) des Injektionsventil angeschlossen. Das Injektionsventil kann von der Steuerung in die Ventilstellungen LOAD, INJECT und WASTE überführt werden. Die Ventilstellungen LOAD und INJECT werden in Abbildung 5 veranschaulicht. In der Ventilstellung LOAD kann die Probenschleife befüllt werden. In dieser Ventilstellung ist die Probenschleife nicht mit dem Rest des Systems verbunden. Das Fließmittel wird über Position (7) und (1) direkt zur Säule befördert. Die Probenschleife wird über die Position (3) des Injektionsventils befüllt. Überschüssiges Probenvolumen gelangt über die Position (4) in das Abfallbehälter. In der Ventilstellung INJECT wird die Probe auf die Säule injiziert. Die Ventilpositionen (1) und (7) werden mit den Positionen (2) und (6), an der die Probenschleife hängt, verbunden. Gemeinsam mit dem Fließmittel wird das Probengemisch zur Säule befördert.

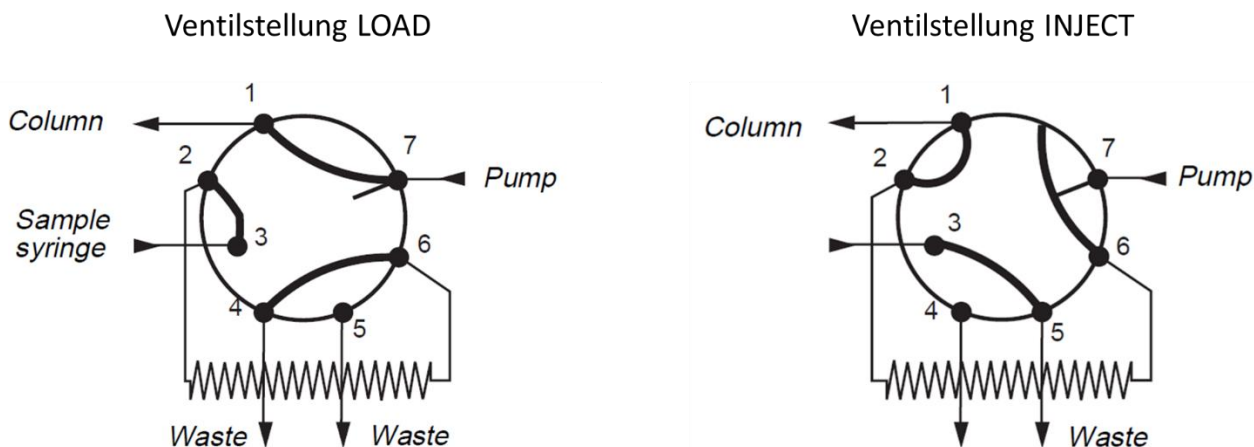


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Ventilstellungen LOAD und INJECT des Injektionsventils. Die Probenschleife wird an die Ventilpositionen (2) und (3) angeschlossen. In der Ventilstellung LOAD kann die Probenschleife über die Position (3) befüllt werden. Überschüssiges Volumen gelangt über die Position (4) in ein Abfallbehälter. Über die Position (7) und (1) wird das Fließmittel von den Pumpen zur Säule befördert. In der Ventilstellung INJECT werden die Positionen (2) und (6) mit den Positionen (1) und (7) verbunden. Somit kann das Probengemisch gemeinsam mit dem Fließmittel zur Säule befördert werden. Verändert nach amersham pharmacia biotech, 1998.

Im Weiteren wird der Aufbau und die Funktionsweise eines Superloops erklärt (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2007). In Abbildung 6 ist ein schematischer Aufbau eines Superloops dargestellt. Ein Superloop besteht aus einer Glasröhre mit einem Volumen von bis zu 150 ml. An den beiden Öffnungen der Glasröhre wird jeweils ein Endstück befestigt. In der Glasröhre befindet sich ein Stopfen, der sich je nach Fließrichtung auf oder ab bewegt. Dadurch entstehen innerhalb der Röhre zwei Kammern. Am unteren Endstück befindet sich eine Rille. Diese muss beim Zusammenbau des Superloops mit einer Nut ausgerichtet werden, die sich am unteren Ende der Glasröhre befindet. Daraus folgt, dass die Flüssigkeit in der oberen Kammer am Stopfen vorbeifließt, wenn dieser am unteren Endstück angekommen ist. Der Superloop wird an die Positionen (2) und (6) des Injektionsventil angeschlossen. Befindet sich das Injektionsventil in der Ventilstellung LOAD, kann der Superloop mit dem Probengemisch beladen werden. Dabei wird die untere Kammer des Superloops befüllt. Der Stopfen bewegt sich in dieser Ventilstellung nach oben. In der Ventilstellung INJECT wird das Probengemisch aus dem Superloop zur Säule befördert. Dazu wird von den Hauptpumpen Fließmittel in die obere Kammer gepumpt.

Folglich bewegt sich der Stopfen nach unten und der Inhalt der unteren Kammer wird in das System entleert.

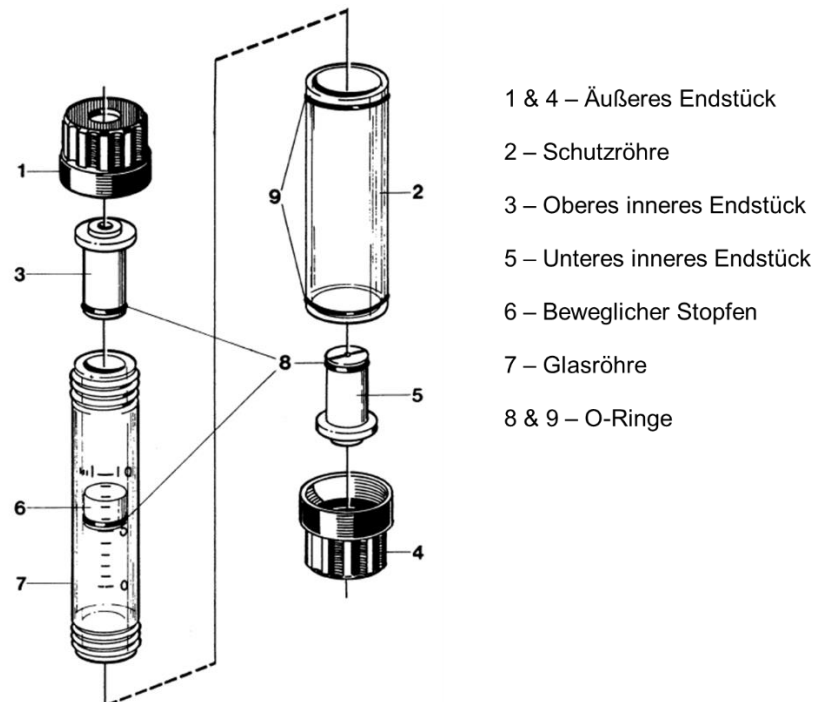


Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines Superloops. Dieser besteht aus einer Glasröhre mit einem Endstück an beiden Öffnungen. Innerhalb des Superloops befindet sich ein Stopfen, der sich je nach Fließrichtung auf oder ab bewegt. Die Glasröhre kann von einer weiteren Schutzröhre umschlossen werden. Verändert nach GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2007.

2.2.2. Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenchromatographie gehört zu der Adsorptionschromatographie. Bei der Adsorptionschromatographie findet eine Grenzflächenreaktion zwischen der stationären Phase und den gelösten Stoffen der mobilen Phase statt (Gauglitz & Reichert, 2016). Der Adsorptionschromatographie werden noch die Affinitäts-, Hydrophobe Interaktions-, und Reversed-Phase-Chromatographie zugeteilt (Anspach, 2017). Die Ionenchromatographie wiederum wird in die Ionenaustausch-, Ionenausschluss-, und Ionenpaarchromatographie unterteilt (Weiss, 2004). In dieser Arbeit kam die Technik der Ionenaustauschchromatographie zum Einsatz, weshalb sie im Folgenden näher beschrieben wird. Mit dieser Chromatographietechnik können geladene

Moleküle, wie Proteine, Nukleinsäuren oder Salze aufgereinigt und aufkonzentriert werden. An der Oberfläche der stationären Phase sind ladungstragende Liganden über einen Abstandshalter gebunden. Moleküle mit entgegengesetzter Ladung werden von den Liganden angezogen und somit zurückgehalten. Im Gegensatz dazu fließen Moleküle mit schwächerer oder gleicher Ladung weiter und eluieren schneller. Ein Kationaustauscher verfügt negativ geladene Bindungsstellen und kann dadurch Kationen binden. Umgekehrt verfügen Anionenaustauscher positive geladene Bindungsstellen und wechselwirken dadurch mit Anionen.

Zur Charakterisierung eines Ionenaustauschers wird häufig das Maß der Bindungskapazität herangezogen. Diese indiziert, wie viel Molekülmasse pro Säulenvolumen gebunden werden kann. Die Bindungskapazität ist für jedes Molekül und Ionenaustauscher spezifisch. Zugleich ist sie abhängig von den Umgebungsbedingungen. In den Produktspezifikationen der Chromatographiesäulen ist die Bindungskapazität generell in Bezug auf ein Modellprotein angegeben. Die Bindungskapazitäten von Ionenaustauschern liegen zwischen 100 – 200 mg/ml. Andere Adsorptionsträger, wie z.B. bei der hydrophobe Interaktionschromatographie, verfügen Bindungskapazitäten bis zu 60 mg/ml (Müller, 2005). Entsprechend ist die Bindungskapazität bei Ionenaustauschern vergleichsweise hoch. Daher kann das Probenvolumen ein Vielfaches des Säulenvolumens betragen.

Im Folgenden wird das allgemeine Vorgehen zur Durchführung einer Ionenaustauschchromatographie erläutert (Anspach, 2017). In der Ionenaustauschchromatographie besteht die mobile Phase aus einer Pufferlösung. Ein Puffer ist ein Stoffgemisch aus einem konjugierten Säure-Basen-Paar, bei dem sich bei der Zugabe einer Säure oder Base der pH-Wert nur minimal ändert (Dingeldein, et al., 2016). Bei Kationenaustauschern muss der pH-Wert des Puffers unter dem pI-Wert des zu trennenden Proteins liegen, um eine Wechselwirkung zu erzielen. Bei Anionenaustauschern hingegen, muss der pH-Wert des Puffers über dem pI-Wert des Proteins liegen (Anspach, 2017). Zu Beginn wird die chromatographische Säule equilibriert. Dazu wird die Säule mit einem definierten Volumen eines Equilibrierungspuffer gespült. Durch den Equilibrierungspuffer wird die stationäre Phase in ihre Ausgangslage versetzt, an der die entsprechenden Probenbestandteile binden sollen. Auf die Equilibrierungsphase folgt der Probenauftrag. Dafür muss der Probenpuffer die gleiche Zusammensetzung wie der Equilibrierungspuffer

haben. Anschließend wird durch Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase die Elution der gebundenen Probenbestandteile hervorgerufen. Gängige Methoden zur Elution werden im Folgenden vorgestellt. Zum einen kann die Elution durch Erhöhung der Salzkonzentration der mobilen Phase hervorgerufen werden. Dabei kommt es zu einer Konkurrenz zwischen den Salzionen und den Proteinen. Bei ausreichend hoher Salzkonzentration ersetzen die Salzionen die gebundenen Moleküle, die dadurch ebenfalls eluieren. Die benötigte Salzkonzentration hängt von der Bindungsstärke der Proteine mit der stationären Phase ab. Zum anderen kann die Elution durch die Veränderung des pH-Wertes des Puffers hervorgerufen werden. Der pH-Wert des Puffers bestimmt die Nettoladung des Proteins. Infolgedessen kann die Ladung des Proteins umgekehrt werden, so dass es nicht mehr an die stationäre Phase gebunden werden kann. Die Zusammensetzung der mobilen Phase kann linear verändert werden. Alternativ kann ein Stufengradient gewählt werden, bei dem sich die Zusammensetzung der mobilen Phase nahezu sprunghaft ändert.

2.2.3. Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie erfolgt eine Trennung der Probenbestandteile anhand ihrer Größe bzw. Molekülmasse (cytvia life sciences, 2018). Sie wird auch als Gelchromatographie oder SEC (*engl. size exclusion chromatography*) bezeichnet. Bei dieser Technik werden poröse Trägermaterialien verwendet. Moleküle, die eine bestimmte Größe des Porensystems unterschreiten, können das Porensystem passieren und legen daher innerhalb der Säule eine längere Strecke zurück. Sie eluieren später als größere Moleküle. Die größeren Moleküle werden vom Porensystem ausgeschlossen und haben dadurch eine geringere Retentionszeit.

Ein häufig herangezogener Parameter der SEC-Säule ist der Trennbereich. Dieser gibt ein Intervall für die Molekülmasse vor, die von der jeweiligen SEC-Säule getrennt werden kann (cytvia life sciences, 2018). Die Molekülmasse steht im direkten Zusammenhang mit der Größe eines Proteins (Winiwarter, et al., 2007). Der Trennbereich einer SEC-Säule wird vom Hersteller im Datenblatt der jeweiligen Säule angegeben.

Um eine hinreichende Trennung der Probenbestandteile zu erreichen, wird bei der SEC generell mit einem geringen Probenvolumen gearbeitet (cytvia life sciences, 2018). Ausgehend von empirischen Untersuchungen werden in der SEC ein Probenvolumen von 0,5 bis 4 % des Säulenvolumens empfohlen. Außerdem wird im Allgemeinen mit kleinen Fließgeschwindigkeiten gearbeitet, da die kleinen Moleküle sonst keine Möglichkeit haben, in das Porensystem zu diffundieren. Diese Faktoren führen dazu, dass die SEC derzeit für einen größeren Maßstab ungeeignet ist (Vazquez-Rey & Lang, 2011). Daher wird sie in der Industrie für die Aufreinigung von Bioprodukten selten eingesetzt. In dieser Arbeit wurde die SEC als Offline-Analysemethode verwendet. Die aufgereinigten Proben wurden dabei bezüglich ihrer Monomer- und Aggregatanteile analysiert.

2.2.4. Zonenchromatographie

Die Zonenchromatographie zeichnet sich durch einzelne Peaks im Chromatogramm aus. Dafür werden zunächst kleine Probenvolumina auf eine Adsorptionssäule gegeben (Anspach, 2017). Die Probenmasse bleibt jedoch unterhalb der Bindungskapazität der Säule. Beim Passieren der Säule trennt sich das Probengemisch in seine Einzelbestandteile auf, die anschließend nacheinander eluieren. Diese werden am Ausgang von Detektoren erfasst, die im Chromatogramm als sogenannte Peaks zu erkennen sind. Ein idealer Peak hat die Form einer Gaußschen Normalverteilung. Bei der Adsorptionschromatographie werden die Probenbestandteile mit Affinität zur stationären Phase zurückgehalten, sobald die Probe aufgetragen wird. Bestandteile ohne Bindung an die stationäre Phase werden mit der mobilen Phase von der Säule gespült. Sie gehören zum Durchbruch. Anschließend werden gebundene Substanzen mit Hilfe eines Elutionspuffers eluiert. In Abbildung 7 ist ein Beispiel eines Chromatogramms der Zonenchromatographie aufgeführt. In der englischsprachigen Literatur ist die Zonenchromatographie auch bekannt als *bind-elute-chromatography* (Brown, et al., 2010). Daher wird im Rahmen dieser Arbeit der Begriff „Binden-Elution-Modus“ als Synonym für die Zonenchromatographie verwendet.

Eine bedeutende Kenngröße der Zonenchromatographie ist die Auflösung (Anspach, 2017). Diese beschreibt wie gut zwei Komponenten voneinander getrennt sind. Die Auflösung kann quantifiziert werden, wird im Rahmen dieser Arbeit jedoch nur qualitativ beschrieben. Je höher die Auflösung, desto besser sind zwei Stoffe voneinander getrennt. Von einer hohen Auflösung wird gesprochen, wenn die Peaks bis auf die Basislinie voneinander getrennt sind.

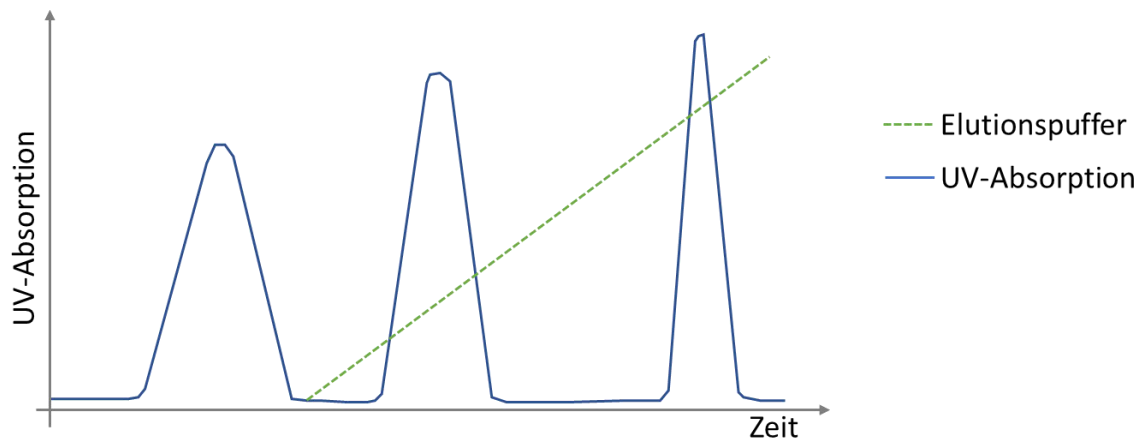


Abbildung 7: Theoretischer Verlauf eines Chromatogramms einer Zonenchromatographie als Adsorptionschromatographie. Die blaue Linie bildet die UV-Absorption über die Zeit ab. Die grüne Linie zeigt den Anteil des Elutionspuffers in der mobilen Phase über die Zeit. Der erste Peak tritt auf, bevor die Elution beginnt. Alle Substanzen, die an dieser Stelle eluieren, wurden von der stationären Phase nicht zurückgehalten und gehören somit zum Durchbruch. Der zweite Peak tritt bei einem kleinen Anteil an Elutionspuffer auf. Hierbei handelt es sich um Komponenten, die nur schwach von der stationären Phase gebunden wurden. Der dritte Peak tritt bei einem hohen Anteil an Elutionspuffer auf. Es handelt sich hierbei um Substanzen mit hoher Affinität zur stationären Phase. Quelle: Eigene Darstellung.

2.2.5. Frontal- und Verdrängungschromatographie

Bei der Frontalchromatographie wird im Gegensatz zur Zonenchromatographie ein kontinuierlicher Probenaustrag durchgeführt (Zhou & Tressel, 2006). In der englischsprachigen Literatur wird dieses Verfahren daher oftmals als *flow-through-chromatography* oder *overload-chromatography* bezeichnet. Die Frontalchromatographie wird hauptsächlich bei der Adsorptionschromatographie angewendet. Das Volumen der Probe übersteigt das Säulenvolumen deutlich und die Probenmasse grenzt an oder übersteigt die Bindungskapazität der stationären Phase. Es entsteht eine Durchbruchskurve mit einem sigmoidalen Verlauf (s. Abbildung 8). Am Plateau

der Kurve entspricht die Ausgangskonzentration der Eingangskonzentration der Probe (Anspach, 2017). Im Eluat der Plateauphase können auch Probenbestandteile enthalten sein, die normalerweise an die Säule binden würden, dies wegen belegter Bindungsplätze jedoch nicht können.

Dieses Verfahren wird häufig eingesetzt, um die Bindungskapazität einer Säule zu bestimmen. Darüber hinaus wird die Frontalchromatographie oftmals als letzter Reinigungsschritt in industriellen Downstreamprozessen eingesetzt, um verbliebende Verunreinigungen zu entfernen (Zhou & Tressel, 2006).

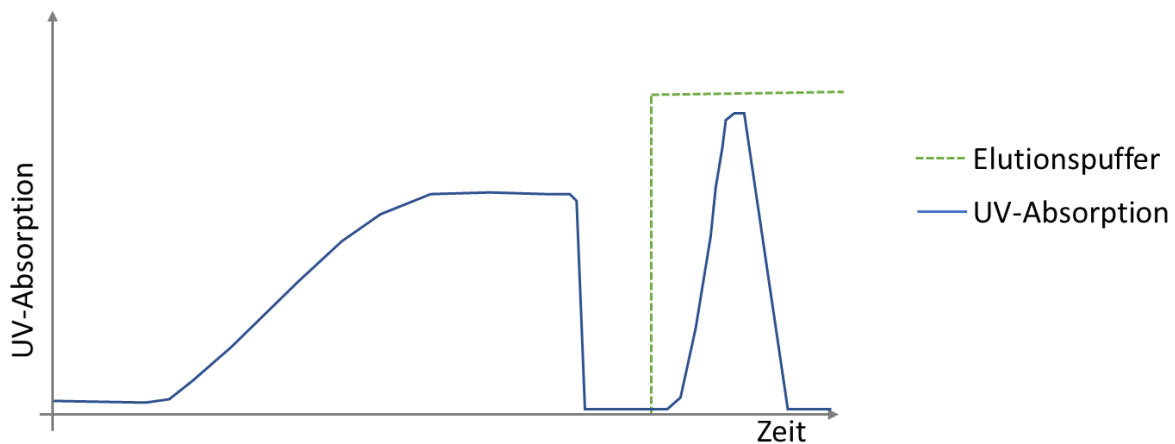


Abbildung 8: Theoretischer Verlauf eines Chromatogramms einer Frontalchromatographie mit einer Adsorptionschromatographie. Die blaue Linie bildet die UV-Absorption über die Zeit ab. Die grüne Linie zeigt den Anteil des Elutionspuffers in der mobilen Phase über die Zeit. In der Frontalchromatographie erfolgt ein kontinuierlicher Probenauftrag, bis die Probenmasse die Bindungskapazität übersteigt. Es entsteht eine Durchbruchskurve mit sigmoidalen Verlauf. Am Plateau der Kurve entspricht die Probenkonzentration am Ausgang der am Eingang. Quelle: Eigene Darstellung

Die Frontalchromatographie kann mit der Technik der Verdrängungschromatographie (engl. *displacement chromatography*) kombiniert werden. Das Prinzip dieses Verfahrens wird im Folgenden beschrieben (Carta & Jungbauer, 2010). Im Anschluss daran werden einige Anwendungen der Verdrängungschromatographie vorgestellt. Bei der Verdrängungschromatographie ist die relative Bindungsaffinität der einzelnen Probenbestandteile mit der stationären Phase wichtig. In dem Probengemisch befindet sich eine hochmolekulare Substanz mit hoher

Affinität zur stationären Phase, die während des Probenauftrags bereits gebundene Moleküle verdrängt. Wird in der Literatur von *displacement chromatography* gesprochen, handelt es sich bei der hochmolekularen Substanz meistens um ein fremdzugesetztes Biopolymer. Es sind jedoch zunehmend Applikationen erschienen, bei der probeneigene Substanzen für die Verdrängung genutzt werden können. In der englischsprachigen Literatur ist dieses Verfahren als *sample displacement chromatography* (SDC) bekannt (Gajdosik, et al., 2012).

Im Folgenden sind einige Anwendungen der SDC dargestellt. Das Verfahren wurde 1988 das erste Mal von der Forschungsgruppe von Hodges *et al.* beschrieben und durchgeführt (Hodges, et al., 1988). Dabei wurden Peptide mit der *Reversed-Phase* Chromatographie im Sample-Displacement Modus aufgereinigt. Die Peptide wurden von Verunreinigungen mit unterschiedlicher Hydrophobizität getrennt. Eingesetzt wurde eine partikuläre Säule mit einem Partikeldurchmesser von 11-12 µm. Hodges *et al.* Ergebnisse ließen den Rückschluss zu, dass ein kontinuierlicher Probenauftrag mit unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der Bestandteile zur Auftrennung dieser führt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Verdrängungseffekt mit zunehmender Fließgeschwindigkeit abnimmt.

Auf dieser Basis hat die Forschungsgruppe von Veeraragavan *et al.* diese Arbeitstechnik das erste Mal auf Ionenaustauschern übertragen (Veeraragavan, et al., 1991). Dabei war der Vorteil, dass mit Proteinen gearbeitet werden konnte. Denn die *Reversed-Phase* Chromatographie eignet sich nur bedingt zur Aufreinigung von Proteinen. Aufgrund der organischen Lösungsmittel in der *Reversed-Phase* Chromatographie werden die Proteine denaturiert. In der Arbeit von Veeraragavan *et al.* wurde mit einem partikulären Anionenaustauscher (Partikeldurchmesser 10 µm) bovines Serumalbumin (BSA) und Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (STI) aufgereinigt. Auch an dieser Stelle konnten erste Anzeichen eines Verdrängungseffektes sichtbar gemacht werden. Eine gute Aufreinigung mehrerer Probenbestandteile konnte jedoch nur mit mehreren Säulen in einer Reihenschaltung erzielt werden. Die Autoren geben zwei Situationen an, die eine Aufreinigung in der Verdrängungschromatographie begünstigen. In der ersten Situation sollte dafür das Zielprodukt eine niedrigere Bindungsaffinität als die unerwünschten Bestandteile vorweisen. Zusätzlich muss das Zielprodukt den größten Bestandteil des Probengemisches ausmachen. Als zweite Situation wird angeführt, dass das Zielprodukt die höchste

Bindungsaffinität des Probengemisches haben sollte und dementsprechend die Bindungskapazität der stationären Phase mengenmäßig nicht übersteigen darf.

Weitere Forschungsergebnisse bestätigten, dass sich die Verdrängungschromatographie für Ionenaustausch-, Reversed-Phase-, Affinitäts- und hydrophobe Interaktionschromatographie eignet (Gajdosik, et al., 2012). Die Verdrängungschromatographie stellt somit ein großes Potential für die Peptid- und Proteinaufreinigung dar.

In der Arbeit von Stone *et al.* wurde die Trennung von monoklonalen Antikörpermonomeren und den Aggregaten mit der Verdrängungstechnik untersucht (Stone, et al., 2019). Einer Hypothese zufolge müssten die Monomere von den stärker bindenden Aggregaten verdrängt werden. Stone *et al.* verglichen verschiedene partikuläre Kationaustauscher hinsichtlich der Bindungskapazität und der Ionendichte miteinander. Außerdem wurde herausgearbeitet, ob eine Abhängigkeit gegenüber dem pH-Wert und Leitfähigkeit des Probenpuffers, der Fließgeschwindigkeit, der Probenkonzentration und dem Aggregatanteil besteht. Die Ergebnisse bestätigten, dass eine niedrige Fließgeschwindigkeit, Ionendichte, pH-Wert, Probenkonzentration und Leitfähigkeit zu einer höheren Monomerausbeute führen. Die Bindungskapazität der Säulen hatte keinen Einfluss auf die Ausbeute.

Basierend auf dieser Publikation wurden von Steffens die partikulären Kationaustauscher Eshmuno® CPX und GigaCap® S-650 M miteinander verglichen (Steffens, 2020). Zudem wurde mit zwei verschiedenen pH-Werten und Puffersystem gearbeitet. Im Gegensatz zu der Arbeit von Stone *et al.* wurde in der Arbeit von Steffens, bovines Gammaglobulin aufgereinigt. Hierbei konnte ein Monomeranteil von 98 % erreicht werden. Der Monomeranteil vom unbehandelten Gammaglobulin lag bei 91 %.

Möglicherweise tritt der Verdrängungseffekt an Chromatographiemembranen deutlicher hervor als bei partikulären Trägern. Die Hypothese wird gestellt, da Membranen einen besseren Zugang zur Adsorberoberfläche ermöglichen (vgl. Kapitel 2.2.6). Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft. Die erzielten Ergebnisse wurden dabei mit den Ergebnissen von Steffens und Stone *et al.* verglichen.

2.2.6. Membranadsorber als stationäre Phase

Als Alternative zu porösen Partikeln können umfunktionierte Mikrofiltrationsmembranen eingesetzt werden (Anspach, 2017). Die Struktur einer Membran ähnelt der eines Netzes. Gewöhnlich werden Membranen zum Filtrieren verwendet. Ähnlich wie bei partikulären Trägern, kann eine Membran mit funktionellen Gruppen chemisch modifiziert werden. Damit kann diese als stationäre Phase in der Chromatographie eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit bezeichnet der Begriff *Membran*, solche, die in der Chromatographie eingesetzt werden. Daneben werden auch die Begriffe *Membranadsorber* und *Chromatographiemembranen* verwendet.

Die meisten Chromatographiemembranen bestehen aus Cellulose (Zhong, et al., 2013). Daneben werden auch Membranen aus Chitosan oder Polyethersulfon verwendet. Darüber hinaus kommen Membranmodule für chromatographische Zwecke in verschiedenen Bauweisen vor (Haupt & Bueno, 2015). Zum einen können flache Membranscheiben innerhalb eines Moduls gestapelt werden. Dabei entsteht ein Modul, welches ein kleines Verhältnis von Höhe zu Durchmesser hat. Die Membran wird in dieser Konstruktion axial durchströmt. Zum anderen können die Membranscheiben um einen zylindrischen Kern gewickelt werden. Dabei findet eine radiale Strömung von innen nach außen statt. Letztere Bauform wird vermehrt in industriellen Maßstäben eingesetzt oder wenn der Zustrom sehr viele Verunreinigungen enthält. Wird in der Literatur von einer *Säule* gesprochen, ist meistens ein Chromatographiemodul mit porösen Partikeln als stationäre Phase gemeint. Im Rahmen dieser Arbeit schließt der Begriff *Säule* auch die Module mit Membranen als stationäre Phase ein.

Durch die unporöse Netzstruktur einer Membran findet der Massentransport der mobilen Phase durch die Membran hauptsächlich durch Konvektion statt (Ghosh, 2002). In kleinen Anteilen tritt auch Filmdiffusion auf. In partikulären Trägern hingegen kommt hauptsächlich die Porendiffusion vor (vgl. Kapitel 2.2.). Eine schematische Darstellung des Massentransports in einer Membran und einem porösen Teilchen wird in Abbildung 9 dargestellt. In einem partikulären Träger ist die Zugänglichkeit an die Bindungsstellen im Porensystem begrenzt (Anspach, 2017). Zum einen ist die Porendiffusion verhältnismäßig langsam. Somit haben einige

Biomoleküle nicht genügend Zeit in die Poren zu diffundieren. Zum anderen werden einige Biomoleküle wegen ihrer Größe vom Porensystem ausgeschlossen. Bei Membranen hingegen besteht aufgrund der porösen Netzstruktur ein besserer Zugang zu den Bindungsstellen (Ghosh, 2002). Mikrofiltrationsmembranen besitzen eine Porengröße von 0,1 bis 3 μm . Somit erhalten auch größere Moleküle Zugang zu der Adsorberoberfläche. Dazu zählen vor allem Immunglobuline, Plasmid-DNA und Viren (Chye Lim, et al., 2007). Zudem ermöglicht der Massentransport durch Konvektion bei Membranen, dass die Moleküle die Bindungsstellen zügiger erreichen (Ghosh, 2002).

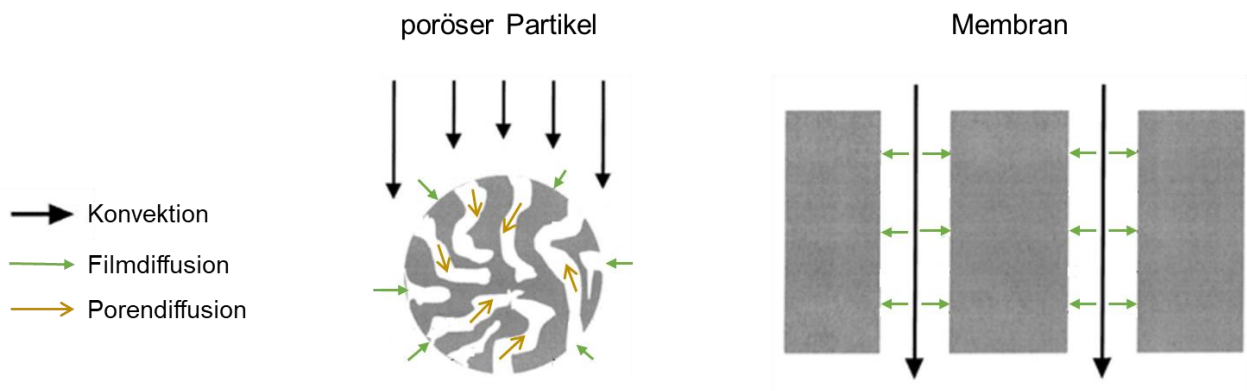


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Massentransports außer- und innerhalb eines porösen Partikels (links) sowie in einer Membran (rechts). In partikulären Trägern findet der Massenstrom im Zwischenraum durch Konvektion und in den Poren durch Diffusion und Filmdiffusion statt. In Membranen kommt hauptsächlich Konvektion vor, zu kleinen Anteilen auch Filmdiffusion. Verändert nach Ghosh, 2002

Ein weiterer Vorteil von Membranmodulen ist, dass mit höheren Fließgeschwindigkeiten gearbeitet werden kann, ohne dass es zu einer schlechteren chromatographischen Auflösung kommt (Chye Lim, et al., 2007). Dadurch können Prozesszeiten verkürzt werden. Darüber hinaus kann durch den Einsatz von Membranen der Verbrauch an Puffer und Chemikalien gesenkt werden. Da bei partikulären Trägern die Fließgeschwindigkeit nicht erhöht werden kann, werden oftmals die Module vergrößert, um trotzdem ein bestimmtes Volumen an Produkt in kurzer Zeit verarbeiten zu können. Dies führt zu einem deutlich höheren Pufferverbrauch beim Einsatz von partikulären Trägern. Des Weiteren gibt es Membranen auch als Einmalartikel und somit können aufwendige Regenerationsschritte zur Reinigung weggelassen werden.

Dennoch stehen Chromatographiemembranen vor Herausforderungen. Wegen der geringen Oberfläche einer Membran besitzen diese eine niedrige Bindungskapazität. Um dieses Problem zu lösen wird an das Hauptnetz der Membran ein zweites Polymernetz angebracht, an dem sich ebenfalls Bindungsstellen befinden (Anspach, 2017). Dadurch wird die Bindungskapazität von Membranen erhöht. Gängige Ionenaustauschermembranen besitzen eine Bindungskapazität von bis zu 50 mg/ml (Sartorius-Stedim, 2018). Damit erreichen kommerzielle Chromatographiemembranen trotz sekundärer Matrix bis heute nicht die gleiche Bindungskapazität wie partikuläre Träger (Lalli, et al., 2019).

Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass Membranen kombiniert mit der Frontalchromatographie viele Vorteile bieten (Zhou & Tressel, 2006). In der Frontalchromatographie wird ein größeres Volumen an Produkt verarbeitet, daher ist es von Nutzen, wenn mit höheren Fliegeschwindigkeiten gearbeitet werden kann. Im Folgenden werden zwei Studien beschrieben, bei denen die Frontalchromatographie an Membranen erfolgreich zum Einsatz kam.

In der Arbeit von Brown *et al.* wurden monoklonale Antikörper aus dem Zellüberstand von CHO-Zellen (engl. *chinese hamster ovary*) aufgereinigt (Brown, et al., 2010). Dabei wurden die Antikörper zunächst mit einer Protein-A-Chromatographie isoliert und grobe Verunreinigungen anschließend mit herkömmlichen Kationaustauschern entfernt. Diese beiden Schritte sind in der Industrie üblich verwendete Verfahren zur Aufreinigung von Antikörpern. Protein-A ist ein Oberflächenprotein aus Bakterien, welches von dem Fc-Fragment der Immunglobuline gebunden werden kann. In der Chromatographie wird Protein-A an die stationäre Phase geheftet, womit dann Immunglobuline isoliert werden. Dieser Schritt stellt den ersten Schritt von mehreren Schritten in chromatographischen Verfahren dar. Verbliebene Verunreinigungen, wie Wirtszellproteine wurden mit Membran-Kationaustauschern im Frontalmodus entfernt. Die Arbeitsbedingungen wurden so gewählt, dass die Wirtszellproteine binden konnten, während das Zielprodukt eluiert ist. Dabei wurde eine Produktreinheit von $\geq 99\%$ erreicht. Brown *et al.* heben hervor, dass sich die Membranchromatographie als letzter Aufreinigungsschritt gut eignet. An dieser Stelle sind die meisten Verunreinigungen bereits entfernt, wodurch die geringe Bindungskapazität der Membran irrelevant wird.

Seit den Ergebnissen von Brown *et al.* konnten Brämer *et al.* zeigen, dass Membranen auch in der Protein-A-Chromatographie eingesetzt werden können (Brämer, et al., 2019). In dieser Arbeit wurden monoklonale Antikörper aus dem Zellüberstand von CHO-Zellen mit Protein-A-Membranen isoliert. Es konnte eine Produktreinheit von über 95 %, mit einem Aggregatanteil von 0,26 %, erreicht werden. Die Autoren beschreiben, dass trotz der geringeren Bindungskapazität die verarbeitete Menge pro Zeiteinheit größer war als mit herkömmlichen Protein-A-Säulen. Es wurde jedoch nicht angegeben, mit welchen Werten bzw. Säulen die Membranen verglichen wurden.

Die Verdrängungschromatographie, ein Sonderfall der Frontalchromatographie, wurde an Membranen bisher noch nicht beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Eignung von Chromatographiemembranen in der Verdrängungschromatographie untersucht. Dabei liegt es nahe, dass Membranen als stationäre Phase eine effektivere Verdrängung als bei porösen Partikeln ermöglichen könnten. Wie bereits erwähnt, erlauben Membranen einen besseren Zugang an die Bindungsstellen. Dies könnte den Verdrängungseffekt begünstigen.

3. Material und Methoden

3.1. Geräte und Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Ionenaustausch- und Größenausschlussssäulen. Die technischen Daten wurden den entsprechenden Datenblättern der Hersteller entnommen.

Bezeichnung	Hersteller und Katalog-nummer	Beschreibung
Sartobind® S 75	Sartorius 85030-520-84	Typ: Kationaustauscher (Membran) Volumen: 2,1 ml Bindungskapazität: 29 mg/ml (Lysozym) Material: Quervernetzte Cellulose Ligand: Sulfonsäure Porengröße: > 3 µm
Sartobind® Q 75	Sartorius 92IEXQ42BC-12	Typ: Anionenaustauscher (Membran) Volumen: 2,1 ml Bindungskapazität: 60 mg (BSA) Material: Quervernetzte Cellulose Ligand: Quaternäres Ammonium Porengröße: > 3 µm
Mustang® S XT Acro-disc® Unit	Pall Life Sciences MSTGXT25S16	Typ: Kationaustauscher (Membran) Volumen: 0,86 ml Bindungskapazität: 30 mg/ml (Lysozym) Material: - Ligand: - Porengröße: 0,65 µm
TOYOPEARL Gi-gaCap® S-650M	Tosoh Corporation	Typ: Kationaustauscher (partikulär) Volumen: 1 ml Bindungskapazität: 156 mg/ml (IgG) Material: Methacrylpolymer Ligand: Sulfonsäure Porengröße der Partikel: 0,1 µm
Superdex® 200 HR 10/30	Cytiva (ehem. GE Healthcare)	Typ: Größenausschluss (partikulär) Volumen: 24 ml Trennbereich: 10 – 600 kDa Material: Zusammensetzung aus quervernetzter Agarose und Dextran

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Lieferant	Artikelnummer	CAS	Verwendung
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG	T134.1	7647-01-0	pH-Wert einstellen
Natronlauge	VWV Chemicals	28244.295	1310-73-2	pH-Wert einstellen, Reinigung ÄKTA
Demineralisiertes Wasser	Laboranschluss	-	-	Ansetzen von Puffern und Lösungen
Ethanol 96%, vergällt	-	-	-	Reinigung Säulen und ÄKTA
Natriumacetat-Trihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG	3856.1	6131-90-4	Acetatpuffer
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG	9265.1	7647-14-5	Puffer
TRIS (PUFFERAN®)	Carl Roth GmbH & Co. KG	4855.1	77-86-1	Trispuffer
Di-Natrium-hydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG	4984.1	10028-24-7	Phosphatpuffer
Natrium-dihydrogen-phosphat - Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG	T879.2	13472-35-0	Phosphatpuffer
γ-Globulins from bovine blood (bovines Gammaglobulin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	G5009-G		Probenmaterial

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Beschreibung	Verwendung
Chromatographiesystem	ÄKTA® <i>purifier</i> ÄKTA® <i>explorer</i>	Cytiva (ehem. GE Healthcare)	+ Pumpe P-960	Durchführung Chromatographie
Software (Chromatographiesystem)	Unicorn	Cytiva (ehem. GE Healthcare)	Version: 5.31	Durchführung Chromatographie
Probenschleife (Kapillaren)	-	-	250 µl & 100 µl	Probenaufgabe Analyse
Probenschleife (Glas)	Superloop®	Cytiva (ehem. GE Healthcare)	max. 50 ml	Probenaufgabe Experimente
pH-Meter	766 Calimatic®	Knick		Einstellung pH-Wert Puffer
Vakuumpumpe	Laboport®	KNF Neuberger		Entgasung Puffer
Filterpapier	Cellulose Acetate	Sartorius	0,45 µm	Entgasung Puffer
Ultraschallbad	Sonorex digitec	Bandelin		Entgasung Puffer
Präzisionswaage	BP221S	Sartorius		Einwiegen Protein
Oberschalenwaage	Entris 323i-1S	Sartorius		Einwiegen Puffersalz

3.2. Puffer- und Probenvorbereitung

3.2.1. Puffervorbereitung

Für die Versuche wurden als Fließ- und Elutionsmittel Puffersysteme verwendet. Die Puffer wurden mit demineralisiertem Wasser angesetzt. Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter gemessen und anschließend mit Salzsäure oder Natronlauge eingestellt.

Das pH-Meter wurde vor Benutzung mit der Zweipunktkalibrierung kalibriert. Nach dem Ansetzen der Puffer wurden die Puffer mit einer Vakuumpumpe und einem Filter entgast. Die Puffer wurden alle zwei bis drei Tage neu angesetzt und vor der jeweiligen Benutzung nochmal in einem Ultraschallbad entgast. Die verwendeten Puffersysteme mit den entsprechenden Konzentrationen und pH-Werten sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Verwendete Puffersysteme für die Experimente und Analytik mit der entsprechenden Pufferkonzentration, der Salzkonzentration und dem pH-Wert

Puffer	Konzentration	Konzentration Natriumchlorid	pH-Wert
TRIS	20 mM	-	9,0
TRIS	20 mM	-	8,5
TRIS	20 mM	1 M	9,0
Natrium-Phosphat	50 mM	150 mM	7,0
Natrium-Acetat	100 mM	-	5,0
Natrium-Acetat	100 mM	1 M	5,0
Natrium-Acetat	100 mM	-	4,5
Natrium-Acetat	100 mM	1 M	4,5

3.2.2. Probenvorbereitung

Das bovine Gammaglobulin wurde bei 2 bis 8 °C im Kühlschrank gelagert. Vor der Probenaufbereitung wurde das Behältnis an der Luft auf Raumtemperatur erwärmt, um Kondensation zu vermeiden. Als Referenz für die Analytik wurde jeweils 1 mg/ml und 2 mg/ml Protein in einem Phosphatpuffer gelöst. Für die Ionenaustauschchromatographie der Vorversuche wurde das Gammaglobulin mit 1 mg/ml in dem jeweiligen Puffer des Versuches gelöst. Für die Hauptversuche des Frontalmodus wurde das Gammaglobulin mit 2 mg/ml in dem jeweiligen Puffer des Versuches gelöst. Die gesammelten Fraktionen aus der Ionenaustauschchromatographie wurden am selben Versuchstag und ohne weitere Vorbehandlung mit der SEC analysiert.

3.3. Trennung der Proteinaggregate und dem Monomer

3.3.1. Vorversuche

In den Vorversuchen wurden Trennvorgänge mit den Säulen Sartobind S, Mustang S und Sartobind Q und jeweils zwei verschiedenen Elutionspuffern durchgeführt. Dafür wurden die Säulen zunächst mit einem Equilibrierungspuffer für 5 CV (engl. *column volume*) equilibriert. Anschließend wurde über eine Probenschleife 400 µl Gammaglobulin mit einer Konzentration von 1 mg/ml injiziert. Die Probenschleife wurde mit weiteren 4 ml Puffer gespült. Danach wurden die Säulen mit weiteren 2 CV gespült. Die Elutionspuffer, die Art des Gradienten und die Elutions- sowie Waschdauer sind in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5: Elutionsbedingungen der Vorversuche

Säule	Sartobind S		Mustang S		Sartobind Q	
Equilibrierungspuffer	Natrium-Acetat, pH = 4,5		Natrium-Acetat, pH = 4,5		TRIS, pH = 9	
Elutionspuffer	Natrium-Acetat & Natrium-chlorid, pH = 4,5	TRIS, pH = 9,0	Natrium-Acetat & Natrium-chlorid, pH = 4,5	TRIS, pH = 9,0	TRIS, pH = 9 & Natrium-chlorid	Natrium-Acetat, pH = 4,5
Gradient	Linear	1 Stufe 100%	Linear	1 Stufe 100%	Linear	1 Stufe 100 %
Länge Elution in CV	15	5	15	5	15	5
Länge Waschschritt in CV	5	2	5	2	5	2

3.3.2. Hauptversuche

In den Hauptversuchen kamen vier verschiedene Säulen mit jeweils zwei verschiedenen pH-Werten zum Einsatz. Verwendet wurden die Membranen Sartobind S, Sartobind Q und Mustang S und der partikuläre Träger GigaCap. Im Folgenden ist das generelle Vorgehen der acht Versuche beschrieben. Die Unterschiede der einzelnen Versuche sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Für die Hauptversuche wurde das Chromatographiesystem *ÄKTA purifier* eingesetzt. Die Probenaufgabe fand über einen Superloop statt. Das Befüllen der unteren Kammer des Superloops wurde mit der Probenpumpe P-960 durchgeführt. Dazu wurde der Pumpenausgang mit der Position (3) des Injektionsventils verbunden. Die Kapillare am Pumpeneingang wurde in das Probengefäß gehängt. Da die Flüssigkeit in der oberen Kammer des Superloops ab einem bestimmten Punkt am Stopfen vorbeifließen kann, musste in diese Kammer der Equilibrierungspuffer eingefüllt werden. Daher wurde vor jedem pH- oder Pufferwechsel die Flüssigkeit in der oberen Kammer des Superloops ausgetauscht. Um dies zu bewerkstelligen wurde mit der Probenpumpe P-960 demineralisiertes Wasser mit einer Fließgeschwindigkeit von 4 ml/min in die untere Kammer gepumpt, bis der Stopfen am oberen Ende angekommen ist und der Puffer über die Position (4) des Injektionsventils in den Abfallbehälter befördert wurde. Anschließend wurde das Injektionsventil in die Position INJECT überführt und der Equilibrierungspuffer in die obere Kammer des Superloops gepumpt. Danach wurde die entsprechende Säule an das Chromatographiesystem angeschlossen.

Pro Versuch wurden drei Chromatographievorgänge durchgeführt. Zuerst wurde eine Zonenchromatographie, anschließend ein Versuch im Frontalmodus und zum Schluss ein Waschschritt ohne Probeninjektion durchgeführt. Diese sind im Anschluss hieran ausführlicher beschrieben. Die Versuche wurden jeweils direkt hintereinander ausgeführt. Daher wurde für jeden Vorgang eine Methode mit der Software *Unicorn* erstellt, die über ein Programmskript miteinander verknüpft und nacheinander durchgeführt wurden.

Für die Zonenchromatographie wurde die Säule mit 5 CV equilibriert. Die Fließgeschwindigkeit richtete sich dabei nach den verschiedenen Säulen und sind der Tabelle 6 zu entnehmen. Danach wurde der Superloop mit einer Fließgeschwindigkeit von 3 ml/min mit dem gesamten

Probenvolumen beladen (s. Tabelle 6). Anschließend wurde 1 ml Probe injiziert und mit 2 CV Equilibrierungspuffer nachgespült. Die Elution wurde mit Umschalten auf einen Elutionspuffer eingeleitet. Bei der Elution basierend auf einem pH-Wechsel wurde 6 CV lang mit 100 % Elutionspuffer eluiert. Elutionspuffer mit hoher Salzkonzentration wurden 5 CV lang mit 70 % Elutionspuffer und 5 CV mit 100 % Elutionspuffer eingesetzt.

Für den Versuch im Frontalmodus wurde die Säule ebenfalls mit 5 CV equilibriert. Danach wurde die restliche Probe aus dem Superloop auf die Säule gepumpt. Nach dem Probenauftrag wurde mit Equilibrierungspuffer für 2 bis 5 CV gespült. Anschließend wurde mit 100 % Elutionspuffer für 6 CV eluiert. Während des Probenauftrages wurde das Eluat mit einem Fraktionierer in Glasröhrchen aufgefangen und zur späteren Analyse bereitgestellt. Pro Versuch wurden drei bis sechs Fraktionen ausgewählt. Die Auswahl der Fraktionen fand in Bezug auf die Höhe der Durchbruchkurve statt. Es wurden Fraktionen bei ungefähr 10 %, 50 % und 80 % der Plateauhöhe ausgesucht. Das Plateau des Durchbruchs galt dabei als 100 % und die UV-Absorption 0 mAU als 0 %. Da innerhalb einer Fraktion ein weiterer Anstieg erfolgt ist, wurde die Höhe für den Beginn und das Ende einer Fraktion bestimmt. Zur Ermittlung der Höhe wurden die Chromatogramme in die Software *Microsoft Powerpoint* eingefügt und die Höhen nach Augenmaß abgeschätzt.

Als letzter Vorgang wurde ein Reinigungsschritt durchgeführt. Dabei wurde keine Probe injiziert, jedoch mit 100 % Elutionspuffer für 6 CV gespült, um verbliebene Probe von der Säule zu entfernen.

Tabelle 6: Verschiedene Parameter der Hauptversuche mit vier verschiedenen Säulen

	Mustang S		Sartobind S		GigaCap S - 650 M		Sartobind Q	
Fließmittelgeschwindigkeit	3 ml/min		3 ml/min		1 ml/min		3 ml/min	
Probenvolumen	37 ml		47 ml		47 ml		47 ml	
Equilibrierungspuffer	Natrium-Acetat		Natrium-Acetat		Natrium-Acetat		TRIS	
pH-Wert	4,5	5,0	4,5	5,0	4,5	5,0	8,5	9,0
Fraktionsgröße	4 ml	1 ml	4 ml	1 ml	4 ml	4 ml	1 ml	1 ml
Elutionspuffer	Natrium-Acetat + NaCl		TRIS; pH = 9,0		Natrium-Acetat + NaCl		Natrium-Acetat; pH = 4,5	
Spülen nach dem Proben-auftrag	5 CV		5 CV		5 CV		2 CV	

3.4. Analytik mit Größenausschlusschromatographie

Die gesammelten Fraktionen der Versuche wurden mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie hinsichtlich ihrer Monomer- und Aggregatanteile analysiert. Als Referenz wurde der Monomer- und Aggregatanteil des unbehandelten Gammaglobulins in einer Doppelbestimmung gemessen.

Die Säule Superdex 200 HR 10/30 wurde an die Chromatographieranlage *ÄKTA explorer* angeschlossen. Die Anlage besitzt ein Probenventil mit acht verschiedenen Ventilstellungen. Damit können bis zu sieben Proben angeschlossen werden, die nacheinander automatisch injiziert werden, (Amersham Biosciences, 2003). Für jeden Probenauftrag wurde eine Methode erstellt, die über eine Programmskript miteinander verknüpft wurden. Somit konnten die Versuche über Nacht unbeaufsichtigt ablaufen. Da ein SEC-Vorgang bis zu zwei Stunden dauern kann, konnte so Zeit eingespart werden.

Es wurde eine Probenschleife an die Position (2) und (6) des Injektionsventils angeschlossen. Zunächst wurde ein Schleifenvolumen von 100 µl eingesetzt, welches im späteren Verlauf durch ein Volumen von 250 µl ersetzt wurde. Der Eingang der Probenpumpe P-960 wurde an die Position (4) des Injektionsventils angeschlossen. Der Pumpenausgang wurde in ein Abfallbehältnis gehängt. (s. Abbildung 10) Durch diesen Aufbau wurde die Probe über das Probenventil und die Probenschleife von der Pumpe angesaugt, statt zuerst durch die Pumpe zu fließen. Somit ist das Totvolumen weggefallen, welches durch die Pumpe entstanden wäre. Dabei war wichtig zu beachten, dass der Ausgang der Probenpumpe nicht niedriger als die Proben positioniert wurde. Ansonsten könnte es aufgrund des hydrostatischen Drucks zu einem Siphon-Effekt kommen, so dass vor Beginn des Versuchs die Probe bereits angesaugt werden würde. Der Ausgang des Probenventils wurde mit einer Kapillare an Position (3) des Injektionsventils verbunden. An Position (8) des Probenventils wurde der Equilibrierungspuffer angeschlossen. Damit wurde die Probenschleife zwischen den einzelnen Probenauftragungen mit 2 ml Puffer gespült. Die Probenpumpe wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min betrieben. Eine höhere Fließgeschwindigkeit würde zu Kavitationen in den Kapillaren führen.

Als Equilibrierungspuffer wurde ein Phosphatpuffer verwendet (s. Tabelle 4). Vor jedem Probenauftrag wurde die Säule mit 1 CV Equilibrierungspuffer equilibriert. Anschließend wurde die Probe injiziert und erneut mit 1 CV Equilibrierungspuffer gespült. Die Hauptpumpen wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min betrieben.

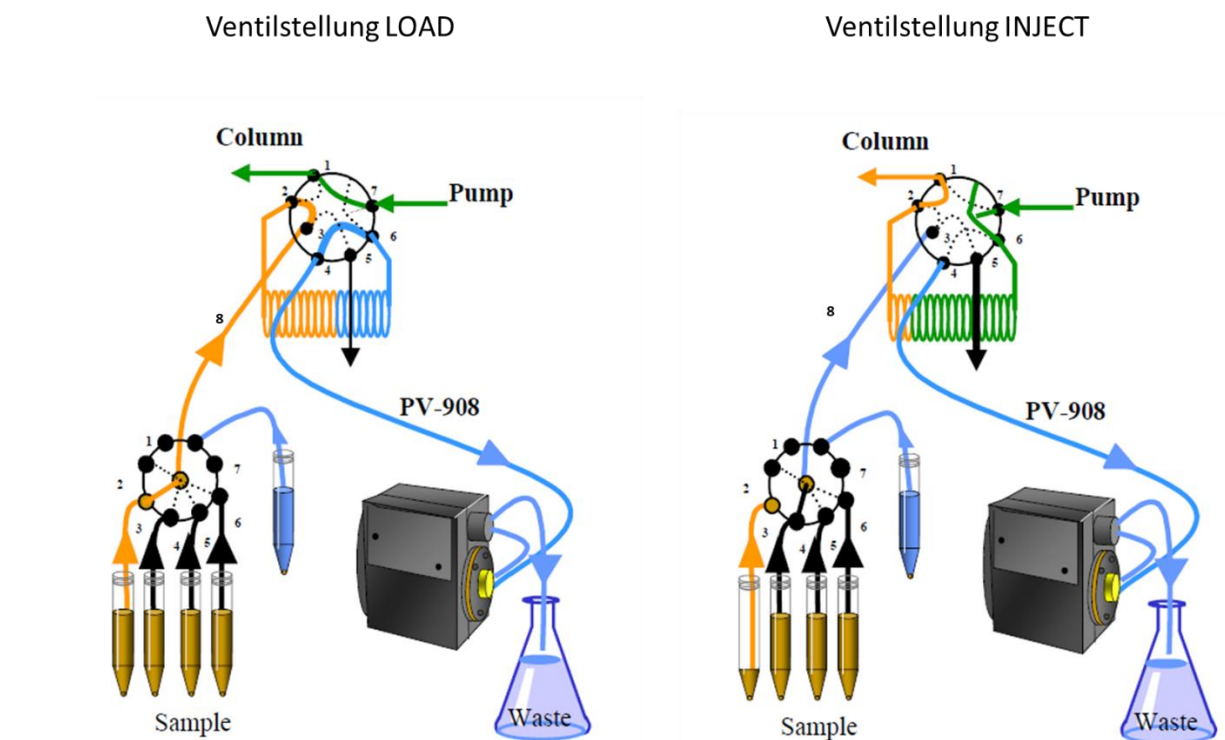


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Ventilstellungen des Injektionsventils mit angeschlossenem Probenventil und Probenpumpe an der Chromatographieanlage ÄKTA explorer. Eine Probenschleife wurde an die Position (2) und (6) des Injektionsventils angeschlossen. Der Ausgang der Probenpumpe wurde an die Position (4) des Injektionsventils angeschlossen und der Ausgang in ein Abfallbehältnis gehängt. An das Probenventil wurden an den Positionen (1) bis (7) die Proben und an Position (8) Equilibrierungspuffer zum Spülen der Probenschleife angeschlossen. Das Probenventil wurde mit Position (3) des Injektionsventils verbunden. In der Ventilstellung LOAD des Injektionsventils kann die Probenschleife über die Probenpumpe beladen werden. In der Ventilstellung INJECT des Injektionsventils wird der Inhalt der Probenschleife zur Säule hin befördert. Verändert nach dem Handbuch von Amersham Biosciences (Amersham Biosciences, 2019).

3.5. Auswertung

Um die Monomeranteile zu bestimmen, wurden die gesammelten Fraktionen mit Hilfe der SEC analysiert. Die daraus entstandenen Peaks im Chromatogramm wurden mit der Software *Unicorn* integriert. Dafür wurde mit der Software in die Chromatogramme eine Nulllinie (*zero base line*) gelegt, auf die sich die Integration bezog. Die Peakanfänge wurden von der Software zunächst vorgegeben und danach manuell verschoben. Dabei wurden die Peakanfänge auf die Nulllinie gelegt. Anschließend wurden die ermittelten Peakflächen addiert und die Gesamtpeakfläche mit den einzelnen Peakflächen ins Verhältnis gesetzt. Das Verhältnis zwischen dem Integral des Monomerpeaks und dem Integral der gesamten Peaks gibt den Monomeranteil an.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Vorversuche

In den Vorversuchen wurde zunächst überprüft, ob das Gammaglobulin an die Membranen bindet. Anschließend wurden Optimierungen der Trennvorgänge durchgeführt.

In Abbildung 11 ist das Chromatogramm der Säule Sartobind S im Binden-Elution-Modus mit einer Salzelution dargestellt. Dabei wurden die UV-Absorption und Leitfähigkeit über das Volumen der mobilen Phase aufgetragen. Mit steigendem Elutionspuffer erhöht sich die Leitfähigkeit. Es ist zu erkennen, dass bereits bei einem niedrigen Anteil an Elutionspuffer ein Großteil des Proteins eluiert ist. Außerdem ist deutlich zu erkennen, dass weiteres Protein eluierte, nachdem die Leitfähigkeit ihr Maximum bei ca. 75 mS/cm erreicht hatte. Dieser Verlauf ist ungewöhnlich. Die gebundenen Substanzen müssten spätestens beim Erreichen der maximalen Elutionspufferkonzentration eluieren, oder gar nicht, wenn die maximale Konzentration nicht ausreicht um stark gebundene Substanzen zu eluieren.

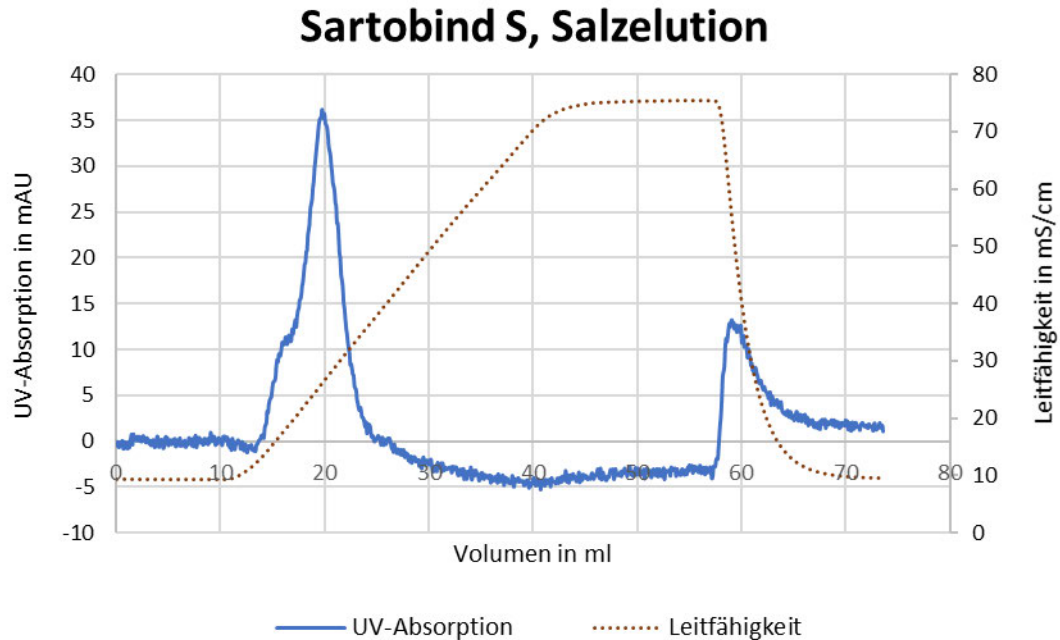


Abbildung 11: Chromatogramm der Säule Sartobind S im Binden-Elution-Modus mit einer Salzelution. Es wurde Gammaglobulin mit einer Konzentration von 1 mg/ml aufgereinigt. Als Equilibrierungspuffer wurde ein Natrium-Acetatpuffer mit einer Konzentration von 100 mM und einem pH-Wert von 4,5 verwendet. Zum eluieren wurde der Equilibrierungspuffer mit 1 M Natriumchlorid verwendet. Eluiert wurden mit einem, linearen Gradienten über 15 CV. UV-Absorption – blau; Leitfähigkeit - braun.

Eine Hypothese zur Ursache für dieses Phänomen wird im Folgenden anhand der sekundären Matrix der Membran begründet (Anspach, 2020). Die Polymere der sekundären Matrix ragen in den Porenraum hinein. An dieser sind die Liganden gebunden, die die Proteine binden sollen, die im Falle eines Kationaustauschers negativ geladen sind. Liegt eine niedrige Ionenstärke vor, stoßen sich die Polymere wegen der gleichen Ladung voneinander ab und richten sich gerade in den Porenraum. Steigt die Ionenstärke der mobilen Phase, zum Beispiel durch einen Elutionspuffer mit hoher Salzkonzentration, so fallen die Ketten ineinander zusammen. Dabei kann es passieren, dass gebundenes Protein im Netz hängen bleibt wird. Erst wenn die Ionenstärke wieder sinkt, kann das Protein eluieren.

Um dieser Hypothese nachzugehen wurde mit der Säule Sartobind S eine pH-Elution durchgeführt. Dabei wird für den Elutionspuffer ein Puffer mit einem anderen pH-Wert als der Equilibrierungspuffer gewählt, bei dem sich die Ladungen der Proteine umkehren und somit nicht mehr an die stationäre Phase binden können (s. Kapitel 2.1.). In dem Falle des Kationaustauschers Sartobind S wurde als Elutionspuffer ein TRIS-Puffer mit einem pH-Wert von 9,0 eingesetzt. Das Chromatogramm zu diesem Versuch ist in Abbildung 12 dargestellt.

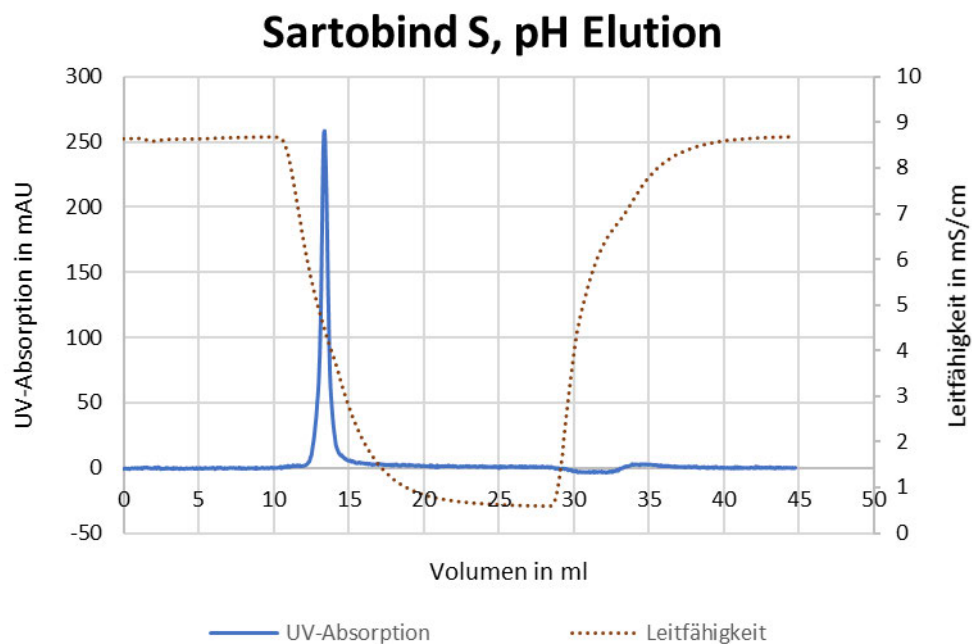


Abbildung 12: Chromatogramm der Säule Sartobind S im Binden-Elution-Modus mit einer pH-Elution. Es wurde Gammaglobulin mit einer Konzentration von 1 mg/ml aufgereinigt. Als Equilibrierungspuffer wurde ein Natrium-Acetatpuffer mit einer Konzentration von 100 mM und einem pH-Wert von 4,5 verwendet. Zum eluieren wurde ein 20 mM TRIS-Puffer verwendet. Eluiert wurden mit einem Stufengradienten über 7 CV. UV-Absorption – blau; Leitfähigkeit – braun.

In Abbildung 12 ist das Chromatogramm mit der Säule Sartobind S im Binden-Elution-Modus mit einer pH-Elution dargestellt. Die Leitfähigkeit sinkt mit steigendem Anteil an Elutionspuffer deshalb, weil der Elutionspuffer mit 20 mM geringer konzentriert ist als der Equilibrierungspuffer mit 100 mM. Zu erkennen ist, dass ausschließlich bei etwa 50 % des Elutionspuffers Protein eluiert ist. Daraus kann geschlossen werden, dass bei der pH-Elution kein Protein

zurückgehalten wurde. Da die Leitfähigkeit während der pH-Elution niedrig gehalten wurde, war somit auch die Ionenstärke gering. Somit konnte die sekundäre Matrix der Membran kein Protein zurückhalten. Daher wurde angenommen, dass sich die pH-Elution im Rahmen dieser Arbeit für die Säule Sartobind S besser eignet.

Darauffolgend wurden Versuche unter gleichen Versuchsbedingungen mit der Säule Mustang S durchgeführt. Das oben diskutierte Phänomen konnte bei dieser Membran nicht beobachtet werden (s. Anhang A). Daher wurde bei der Säule Mustang S die Salzelution beibehalten. Bei der Säule Sartobind Q konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen der pH- und der Salzelution festgestellt werden (nicht in dieser Arbeit dargestellt). Dennoch wurde sich hier für die pH-Elution entschieden, da es sich bei den Membranen Sartobind S und Sartobind Q um Module des gleichen Herstellers handelt. Dazu muss erwähnt werden, dass die in dieser Arbeit verwendete Säule Sartobind S bereits seit ungefähr 20 Jahren im Besitz der Hochschule ist. Möglicherweise wurden seitdem die Eigenschaften der sekundären Matrix an der Membran von dem Hersteller optimiert.

4.2. Hauptversuche

In den Hauptversuchen wurden Chromatographien im Frontalmodus mit vier verschiedenen Säulen und jeweils zwei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Die Chromatogramme der Versuche mit gleichem pH-Wert wurden jeweils in einem Diagramm zusammengeführt. Diese sind im Folgenden in den Abbildungen 13 bis 16 dargestellt. Vor jeder Frontalchromatographie wurde eine Zonenchromatographie mit gleichen Pufferbedingungen durchgeführt. Die Chromatogramme sind im Anhang dieser Arbeit dargestellt.

In Abbildung 13 sind die Chromatogramme der Kationaustauscher GigaCap, Sartobind S und Mustang S bei einem pH-Wert von 4,5 dargestellt. Zu erkennen ist, dass bei der Säule GigaCap kein Durchbruch stattgefunden hat. Das bedeutet, dass die ganze Probenmasse von der Säule gebunden wurde. Dies ist zunächst nicht überraschend, denn die Bindungskapazität dieser Säule liegt bei 156 mg für IgG. Eingesetzt wurde 94 mg Probe, daher lag die Probenmasse unter dem der Bindungskapazität, trotz des Frontalmodus. Der Versuch wurde dennoch mit dem geringen Volumen durchgeführt, da oftmals nicht die volle Bindungskapazität einer partikulären Säule ausgenutzt werden kann.

Bei den Säulen Mustang S und Sartobind S ist jeweils ein Durchbruch zu erkennen. Dabei fällt auf, dass bei der Säule Mustang S der Anstieg auf das Plateau steiler ist als bei der Säule Sartobind S. Da die Probenkonzentration und die Fließgeschwindigkeit bei beiden Säulen gleich war, liegt es nahe, dass die Bindungsstellen bei der Säule Mustang S besser zugänglich sind als bei der Säule Sartobind S.

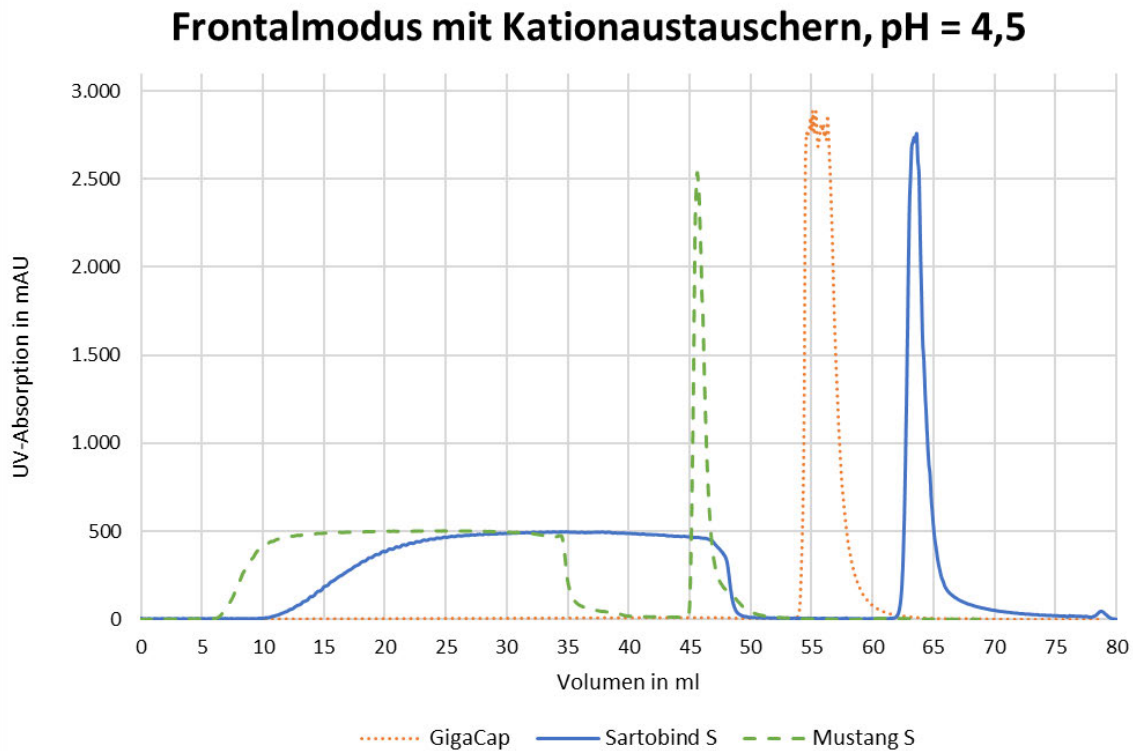


Abbildung 13: Chromatogramme der Kationaustauscher GigaCap, Sartobind S und Mustang S im Frontalmodus, beim pH-Wert 4,5. Es wurde Gammaglobulin mit einer Konzentration von 2 mg/ml aufgereinigt. Aufgezeichnet wurde die UV-Absorption über dem Volumen des Fließmittels. Als Equilibrierungspuffer wurde ein Natrium-Acetatpuffer mit einer Konzentration von 100 mM und einem pH-Wert von 4,5 verwendet. Der Elutionspuffer wurde bei der Säule GigaCap ab 52 ml, bei Sartobind S ab 57 ml und bei Mustang S ab 42 ml, dazugeschaltet. GigaCap – orange; Sartobind S – blau; Mustang S – grün.

In Abbildung 14 sind die Chromatogramme der Kationaustauscher GigaCap, Sartobind S und Mustang S bei einem pH-Wert von 5,0 zu sehen. Diesmal ist zu erkennen, dass bei der Säule GigaCap ein Durchbruch stattgefunden hat, obwohl die Proteinmasse unter der Bindungskapazität liegt. Da dies bei dem pH-Wert von 4,5 nicht aufgetreten ist, kann davon ausgegangen werden, dass es an dem höheren pH-Wert liegt. Beim bovinen Gammaglobulin handelt es sich um eine Mischung aus verschiedenen Antikörperklassen, deren mengenmäßige Zusammensetzung je nach Charge variieren können. Daher ist der tatsächliche pI-Wert nicht bekannt. Die Antikörperklasse IgG hat den größten Anteil im Blutserum, dessen theoretischer pI-Wert laut Literatur zwischen 6,6 und 8,2 liegt (Yang, et al., 2019). Es könnte also sein, dass bei einem pH-

Wert von 5,0 einige Komponenten des Immunglobulins nicht an einen Kationaustauscher binden.

Dieser Effekt wurde ebenfalls in dem Chromatogramm der Säule GigaCap im Binden-Elution-Modus beobachtet (s. Anhang A). Dies lässt vermuten, dass die Monomere, die im Durchbruch eluiert sind, nicht durch Aggregate verdrängt wurden. Es ist wahrscheinlicher, dass die Monomere bei dem höheren pH-Wert gar nicht erst von der stationären Phase gebunden wurden. In so einem Fall wird von einem negativen chromatographischen Modus gesprochen. In diesem Modus werden die Verunreinigungen gebunden, während mit dem Produkt keine Wechselwirkung stattfindet (Anspach, 2017).

Die Chromatogramme der Säulen Mustang S und Sartobind S im Frontalmodus bei dem pH-Wert 5,0 verhalten sich ähnlich wie bei dem pH-Wert von 4,5. Jedoch hat bei den Chromatogrammen im Binden-Elution-Modus ein Durchbruch stattgefunden (s. Anhang A). Dies spricht ebenfalls dafür, dass bei den Membranen bei einem pH-Wert von 5,0 die Verdrängung nicht mehr als stärkster Effekt auftritt. Daraus lässt sich schließen, dass für einen optimalen Verdrängungseffekt, die Wechselwirkungen mit der stationären Phase möglichst hoch sein müssen. Dies wird erreicht, indem der pH-Wert des Puffers möglichst weit vom pI-Wert des Zielproteins entfernt ist. Allerdings wird die Entfernung zum pI-Wert dadurch begrenzt, dass die Proteine bei einem zu hohen oder zu niedrigen vermehrt aggregieren (Vazquez-Rey & Lang, 2011).

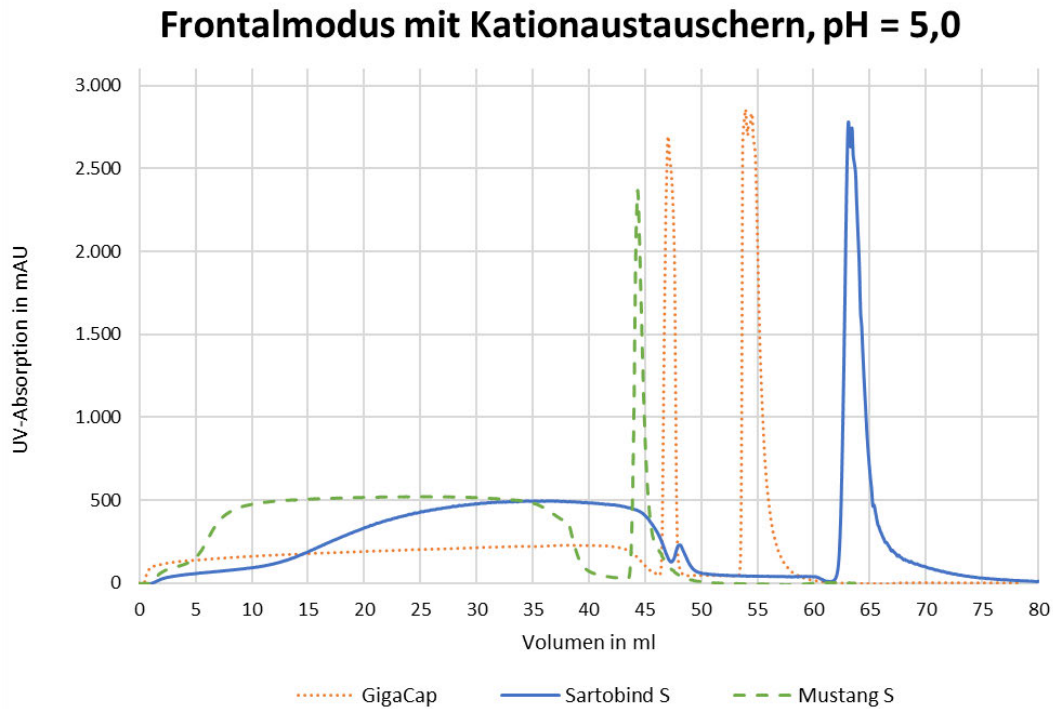


Abbildung 14: Chromatogramme der Kationaustauscher GigaCap, Sartobind S und Mustang S im Frontalmodus, beim pH-Wert 5,0. Es wurde Gammaglobulin mit einer Konzentration von 2 mg/ml aufgereinigt. Aufgezeichnet wurde die UV-Absorption über dem Volumen des Fließmittels. Als Equilibrierungspuffer wurde ein Natrium-Acetatpuffer mit einer Konzentration von 100 mM und einem pH-Wert von 5,0 verwendet. Der Elutionspuffer wurde bei der Säule GigaCap ab 52 ml, bei Sartobind S ab 57 ml und bei Mustang S ab 42 ml, dazugeschaltet. GigaCap – orange; Sartobind S – blau; Mustang S – grün.

In Abbildung 15 und Abbildung 16 sind die Chromatogramme der Säule Sartobind Q bei den pH-Werten 8,5 und 9,0 dargestellt. In beiden Chromatogrammen ist ein Durchbruch zu erkennen. Auch sind die Verläufe hinsichtlich der Retentionszeiten und der Steigung der Kurve sehr ähnlich. Daher scheint bei den pH-Werten 8,5 und 9,0 kein großer Unterschied vorzuliegen. Das Chromatogramm der Zonenchromatographie von dem pH-Wert 8,5 zeigt nur einen minimalen Durchbruch (s. Anhang B). Somit liegt die obere Grenze des pI-Werts des vorliegenden Gammaglobulins vermutlich niedriger als 8,5.

Die Durchbruchskurve des Anionenaustauschers Sartobind Q weist eine ähnlich flache Steigung wie der Kationaustauscher Sartobind S auf. Somit sind die Anstiege der Durchbruchskurven der Säulen Sartobind Q und S flacher als die Durchbruchskurve des Kationaustauschers Mustang S. Die Membranen Sartobind Q und S stammen vom gleichen Hersteller. Daher scheint der Unterschied zum Kationaustauscher Mustang S herstellerbedingt vorzuliegen.

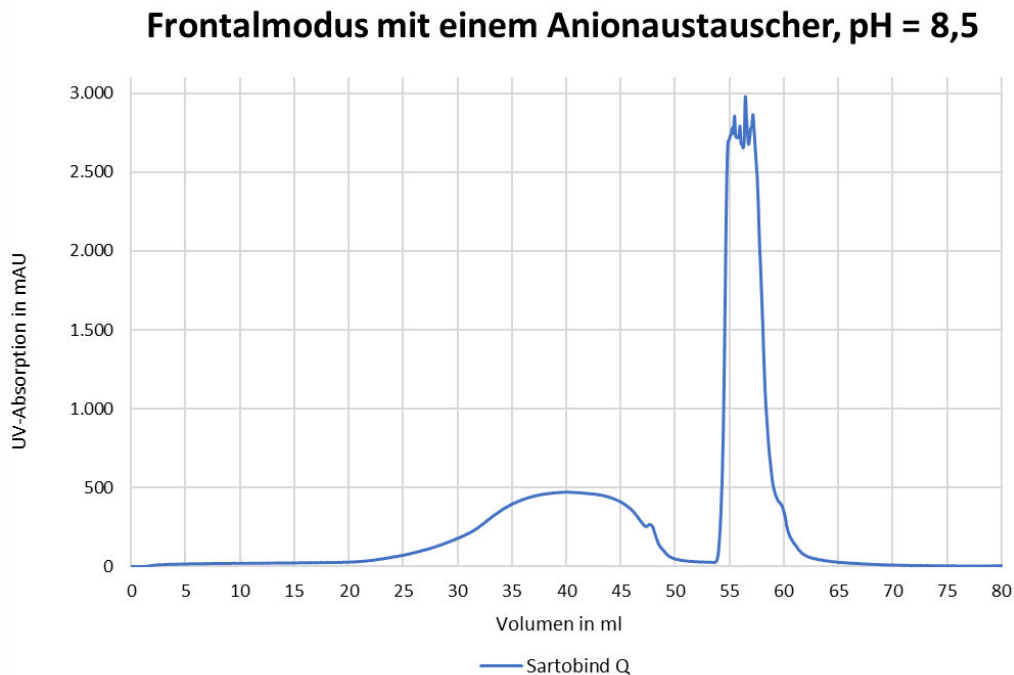


Abbildung 15: Chromatogramm des Anionenaustauschers Sartobind Q im Frontalmodus, beim pH-Wert 8,5. Es wurde Gammaglobulin mit einer Konzentration von 2 mg/ml aufgereinigt. Aufgezeichnet wurde die UV-Absorption über dem Volumen des Fließmittels. Als Equilibrierungspuffer wurde ein TRIS-Puffer mit einer Konzentration von 20 mM und einem pH-Wert von 8,5 verwendet. Der Elutionspuffer wurde ab 51 ml dazugeschaltet.

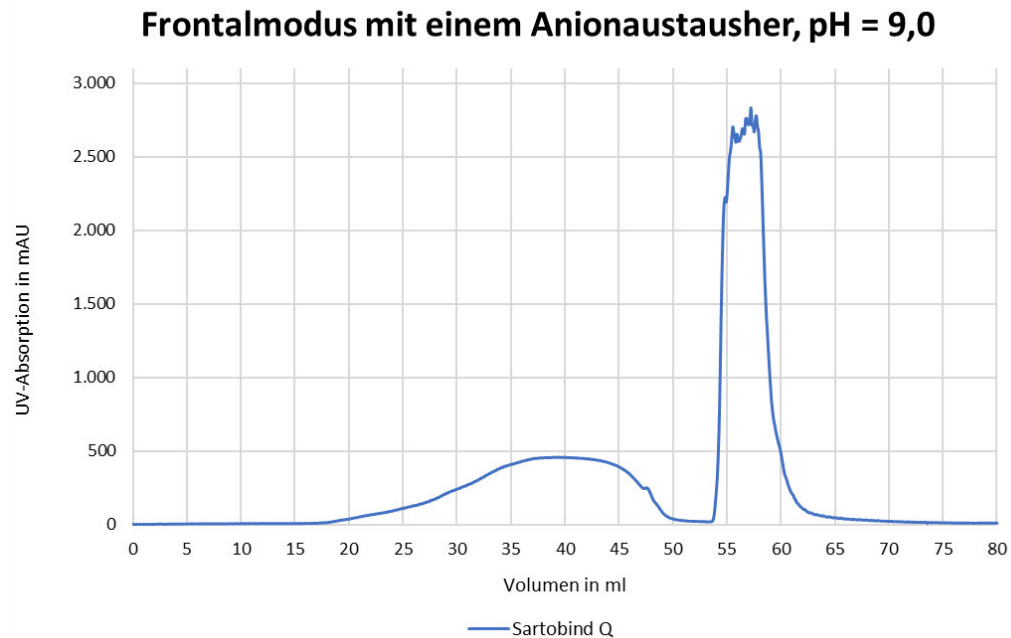


Abbildung 16: Chromatogramm des Anionenaustauschers Sartobind Q im Frontalmodus, beim pH-Wert 8,5. Es wurde Gammaglobulin mit einer Konzentration von 2 mg/ml aufgereinigt. Aufgezeichnet wurde die UV-Absorption über dem Volumen des Fließmittels. Als Equilibrierungspuffer wurde ein TRIS-Puffer mit einer Konzentration von 20 mM und einem pH-Wert von 9,0 verwendet. Der Elutionspuffer wurde ab 51 ml dazugeschaltet.

4.3. Analytik

Die Proben aus den Ionenaustauschchromatographien der Hauptversuche wurden mit Hilfe der SEC analysiert. Dabei wurden die Monomer- und Aggregatanteile der gesammelten Fraktionen aus den Frontalchromatographien ermittelt. Zum Vergleich wurde der Monomer- und Aggregatanteil des unbehandelten Gammaglobulins bestimmt. Dieser Versuch ist im Folgenden als Beispielergebnis der SEC in Abbildung 17 dargestellt. Im Anschluss sind die gemessenen Monomeranteile von sechs der acht Hauptversuche in Abbildung 18 abgebildet.

Als Referenzwert wurde zunächst der Monomer- und Aggregatanteil des unbehandelten Gammaglobulins mit der SEC bestimmt. Von diesem Versuch wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. In Abbildung 17 ist eine der Bestimmungen als Beispielergebnis abgebildet. Zu erkennen sind drei unterschiedlich hohe Peaks. Der höchste Peak befindet sich ganz rechts. Bei diesem Peak wird es sich höchstwahrscheinlich um die Monomere handeln, da diese als kleinste Moleküle der Probe am spätesten eluieren. Die Peaks links davon stellen vermutlich die Aggregate dar. Dabei könnte es sich bei dem mittleren Peak um Dimere handeln, da die beiden rechten Peaks dicht beieinander liegen. Weiter links ist ein weiterer kleiner Peak zu erkennen, bei dem es sich um höhere Polymere handeln könnte, da diese am frühesten eluiert sind.

Aus den ermittelten Monomeranteilen der Doppelbestimmung des unbehandelten Gammaglobulins wurde der Mittelwert gebildet. In dem unbehandelten Gammaglobulin wurde ein Monomeranteil von 72,3 % ($\sigma = 0,5$ %) ermittelt.

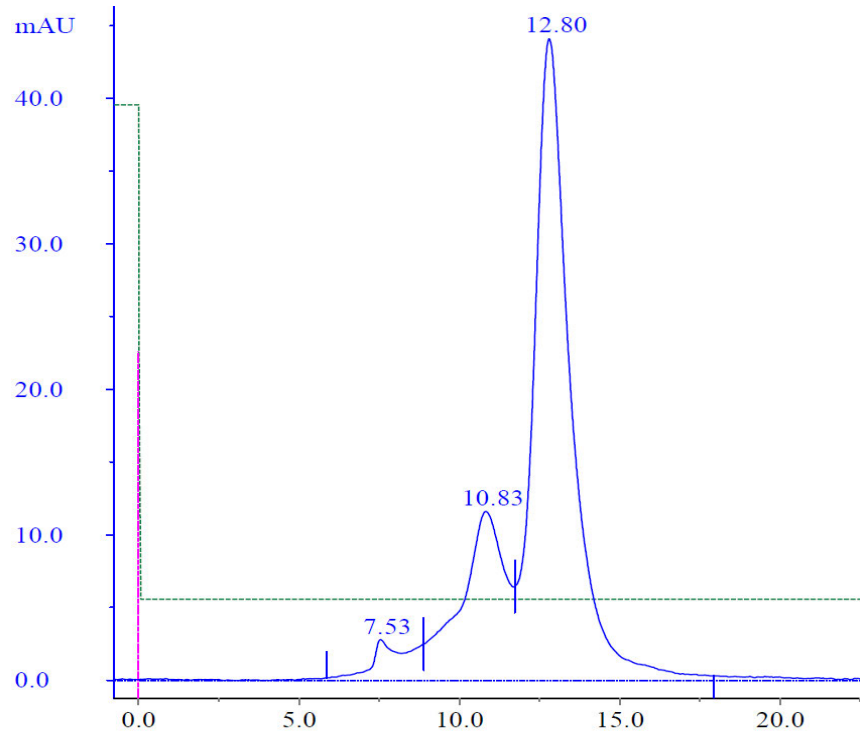


Abbildung 17: Chromatogramm einer SEC vom unbehandelten Gammaglobulin zur Bestimmung des Monomer- und Aggregatanteils. Abgebildet ist die UV-Absorption in mAU über dem Volumen der mobilen Phase in ml. Der Versuch wurde mit 2 mg/ml Gammaglobulin und einer 250 μ l Probenschleife, bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min durchgeführt. Als Puffer wurde ein 50 mM Phosphatpuffer mit 150 mM Natriumchlorid eingesetzt. Zum Ermitteln der Monomer- und Aggregatanteile wurden die Peaks integriert. Die Integration wurde auf eine Nulllinie bezogen. UV-Absorption – blau.

In Abbildung 18 sind die ermittelten Monomeranteile gegenüber der Peakhöhe des Durchbruchs abgebildet. Dargestellt sind die Monomeranteile der Säulen Sartobind S und Mustang S bei den pH-Werten 4,5 und 5,0, sowie der Säule GigaCap beim pH-Wert 5,0 und der Säule Sartobind Q beim pH-Wert 8,5. Als Referenz dient der ermittelte Monomeranteil des unbehandelten Gammaglobulins. Zu erkennen ist, dass die Verläufe der einzelnen Säulen teilweise unterschiedlich aussehen. Dies liegt unter anderem daran, dass die Volumina der gesammelten Fraktionen unterschiedlich groß waren. Zu Beginn des Durchbruchs liegt der Monomeranteil der aufgereinigten Proben etwa 7 % bis 17 % höher als beim unbehandelten Gammaglobulin. Somit ist es im Anfangsbereich des Durchbruchs zu einer Aufkonzentrierung der Monomere gekommen.

Dazu muss ergänzt werden, dass bei den ermittelten Monomeranteilen eine gewisse Unsicherheit besteht. Die Ursache hierfür liegt in der Integration der Peaks, mit der die Monomeranteile bestimmt wurden. Die Integration wurde mit Hilfe einer Software durchgeführt. Diese hat die Peakanfänge für die Integration zunächst vorgegeben. Die Peakanfänge wurden anschließend manuell verschoben, damit sich diese möglichst nah an der Nulllinie befinden (vgl. Kapitel 3.5). Dies geschah jedoch nur nach Augenmaß. Zum Beispiel ergibt eine Monomerpeakfläche von 58 mAU und eine Gesamtpeakfläche von 79 mAU ein Monomeranteil von 73 %. Bei einer Monomerpeakfläche von 65 mAU und einer Gesamtpeakfläche von 86 mAU beträgt der Monomeranteil gleich 76 %. So eine Änderung kann bereits durch die minimale Verschiebung der Peakanfänge erreicht werden. Dies erklärt auch, warum beispielsweise bei dem Verlauf der Säule Sartobind S bei einem pH-Wert 5,0 in Abbildung 18 der Monomeranteil bei einer Durchbruchshöhe von 100 % leicht steigt. Dennoch ist bei allen Verläufen ein allgemeiner Trend zu erkennen: Die Monomeranteile liegen zu Beginn des Durchbruchs höher als bei der unbehandelten Probe und sinken mit zunehmender Durchbruchshöhe ab. Da sich dies mit den Erwartungen deckt und auch auf alle Versuche zutrifft, kann dieses Ergebnis als vertrauenswürdig angesehen werden.

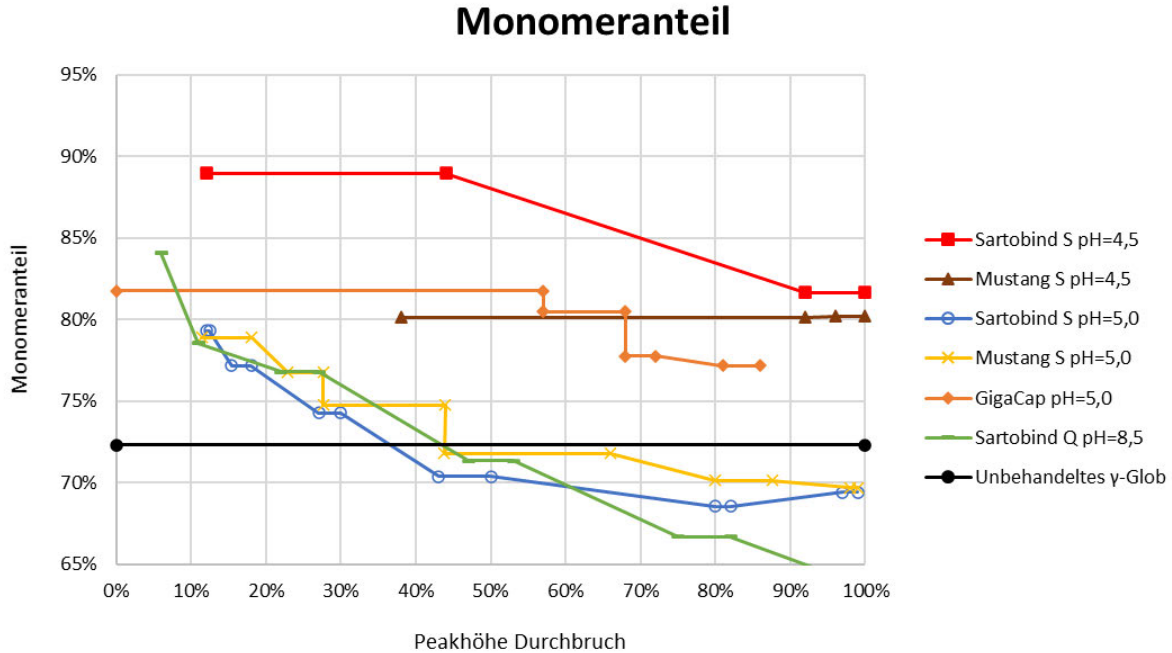


Abbildung 18: Graphische Darstellung der ermittelten Monomeranteile gegenüber der Peakhöhe des Durchbruchs in Prozent. Dargestellt sind die Monomeranteile von sechs der acht Frontalchromatographien. Der Monomeranteil wurde mit Hilfe der SEC bestimmt und die gemessenen Peaks anschließend integriert. Dabei wurde zunächst die Gesamtpeakfläche bestimmt und nachfolgend mit der Einzelpeakfläche ins Verhältnis gesetzt. Mit der Peakhöhe ist der Anstieg des Durchbruchs gemeint. Dabei entspricht 100 % dem Plateau des Durchbruchs. Als Referenz ist der Monomeranteil des unbehandelten Gammaglobulins (schwarz) mit angegeben.

Im Folgenden wird diskutiert, ob tatsächlich ein Verdrängungseffekt stattgefunden hat. Theoretisch sollten während des Probenauftrags die Monomere gebunden werden, die danach von den Aggregaten verdrängt werden und somit eluieren. Anschließend sollten zunehmend Aggregate eluieren, da immer mehr Bindungsplätze von Aggregaten besetzt werden. Es fällt auf, dass der Monomeranteil mit steigender Durchbruchshöhe sinkt. Bei den Verläufen Sartobind S (pH = 5,0), Mustang S (pH = 5,0) und Sartobind Q (pH = 8,5) sinkt der Monomeranteil sogar unter den des unbehandelten Gammaglobulins. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine Verdrängung stattgefunden hat. Wie bereits in Kapitel 4.2. diskutiert, ist es möglich, dass bei einem pH-Wert von 5,0 der Verdrängungseffekt zurückgetreten ist und eher eine negative Chromatographie stattgefunden hat. Dies lässt sich aus der Analyse der Monomeranteile weder bestätigen noch widerlegen. Dennoch lässt sich sagen, dass zumindest bei einem pH-Wert von 4,5 und 8,5 mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Verdrängung stattgefunden hat.

Zudem galt zu untersuchen ob hersteller- oder ladungsbedingte Unterschiede bezüglich der Monomerausbeute aufgetreten sind. In Abbildung 18 ist zu erkennen, dass die Verläufe bezüglich der Änderung des Monomeranteils ähnlich sind. So liegen die Monomeranteile zu Beginn über dem des unbehandelten Immunglobulins und sinken mit zunehmender Durchbruchhöhe ab. Dies trifft auch auf die beiden Membran-Kationaustauscher Sartobind S und Membran S und den Membran-Anionenaustauscher Sartobind Q zu. Die Membran-Kationaustauscher Sartobind S und Mustang S stammen von unterschiedlichen Herstellern. Die Membranen Sartobind S und Q vereint zwar der gleiche Hersteller, sie besitzen jedoch entgegengesetzte Ladungen. Somit scheinen die hersteller- und ladungsbedingten Unterschiede bezüglich der Monomerausbeute eher gering auszufallen. Dies spricht für die Reproduzierbarkeit des Verdrängungseffektes an Membranadsorbern.

Des Weiteren wurde untersucht, ob Unterschiede zwischen dem partikulären Kationaustauscher GigaCap und den Membranen hinsichtlich der Monomerausbeute bestehen. Laut der Hypothese sollte an den Membranen eine effektivere Verdrängung stattfinden als mit partikulären Trägern (vgl. Kapitel 2.2.6.). Anhand der Versuchsergebnisse lässt sich darüber keine Aussage treffen. Zum einen hat bei der Säule GigaCap mit einem pH-Wert von 4,5 kein Durchbruch stattgefunden. Zum anderen wurde bei dem Versuch mit der Säule GigaCap und einem pH-Wert von 5,0 eine andere Fraktionsgröße eingesetzt. Daher lassen sich die Verläufe des Monomeranteils nicht vergleichen. Mit den Membranen konnte ein Monomeranteil von 79 % bis 89 % erreicht werden. Optimal wäre jedoch ein noch höherer Anteil an Monomeren. In der Arbeit von Stone *et al.* wurden Antikörpermonomere mit partikulären Trägern aufgereinigt (Stone, et al., 2019). An der Stelle konnten am Anfangsbereich des Durchbruchs Monomeranteile bis zu 100 % generiert werden. Jedoch betrug der Monomeranteil der unbehandelten Antikörper in der Arbeit von Stone *et al.* bereits etwa 90 %. Hinzu kommt, dass in der Arbeit von Stone *et al.* mit monoklonalen Antikörpern gearbeitet wurde. Bei diesen ist der genaue pI-Wert bekannt, daher konnte eine selektivere Verdrängung durchgeführt werden. Außerdem ist bei diesem Produkt die Zusammensetzung immer gleich, somit sind die Versuche besser reproduzierbar. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Aufreinigung bovines Gammaglobulin verwendet. Dies ist ein Gemisch aus verschiedenen Immunglobulinen, dessen Zusammensetzung

ja nach Charge variiert. Eine bessere Vergleichbarkeit könnte die Arbeit von Steffens bieten. Dabei wurde der Verdrängungseffekt an partikulären Trägern mit bovinem Gammaglobulin untersucht (Steffens, 2020). In der Arbeit von Steffens wurden Monomeranteile bis zu 98 % erreicht. Doch auch hier betrug der Monomeranteil des unbehandelten Immunglobulins bereits 91 %. Daher lässt sich auch an dieser Stelle keine Aussage darüber treffen, ob ein Vorteil durch die Verwendung von Membranen gegenüber partikulären Trägern besteht. Möglicherweise könnte die Verdrängung an Membranen noch deutlicher zum Vorschein kommen, wenn monoklonale Antikörper eingesetzt werden.

Im Folgenden werden weitere Versuche beschrieben, die durchgeführt werden könnten, um weitere Erkenntnisse zu erlangen. Zum Beispiel könnten Versuche mit gleichgroßen Fraktionen durchgeführt werden, um die Ergebnisse besser vergleichen zu können. Außerdem könnten weitere Versuche mit partikulären Trägern und Membranen unter gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt werden, um eventuelle Unterschiede aufzudecken. Des Weiteren wurde in zahlreichen Publikationen gezeigt, dass die Fließgeschwindigkeit bei dem Einsatz von Chromatographiemembranen keinen Einfluss auf den Trennprozess hat (Zhong, et al., 2013). Im Rahmen weiterer Versuche könnte untersucht werden, ob dies auch auf die Verdrängungschromatographie zutrifft.

5. Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ermittelt, ob eine Verdrängung der Antikörpermonomere durch Aggregate an Membran-Ionenaustauschern stattfindet. Das Ziel war es die Monomere von deren Aggregaten zu trennen und dabei möglichst hohe Monomeranteile zu generieren. Dies wurde anhand der Aufreinigung von bovinem Gammaglobulin realisiert. Des Weiteren wurde untersucht, ob Unterschiede bezüglich des Herstellers und zwischen Kation- und Anionenaustauschern bestehen. Außerdem wurde überprüft, ob es an Membranen zu einer effektiveren Verdrängung, als an porösen, partikulären Trägern, kommt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Trennung von Antikörpermonomeren und den Aggregaten an Membranen durch den Verdrängungseffekt möglich ist. Es konnten Monomeranteile von 79 % bis 89 % erzielt werden. Der Monomeranteil des unbehandelten Gammaglobulins lag bei 72 %. Dabei lag der Monomeranteil zu Beginn des Durchbruchspeaks am höchsten. Mit zunehmender Peakhöhe ist der Monomeranteil abgesunken. Um möglichst hohe Monomeranteile zu erzielen, sollte somit im Anfangsbereich des Durchbruchs fraktioniert werden.

Darüber hinaus wurde beobachtet, dass der pH-Wert für den Verdrängungseffekt entscheidend ist. Je näher der pH-Wert des Puffers an dem pI-Wert der Proteine liegt, desto eher wird der Verdrängungseffekt von einer negativen Chromatographie überlagert. Bei dieser werden nur die Aggregate gebunden, während die Monomere ohne Wechselwirkung mit der stationären Phase eluieren. Daher sollte für eine effektive Verdrängung die Wechselwirkung zwischen den Proteinen und der stationären Phase möglichst hoch sein.

Des Weiteren konnten zwischen den Membranen unterschiedlicher Hersteller bezüglich der Monomerausbeute nur geringe Unterschiede beobachtet werden. Zwar waren die Anstiege der unterschiedlichen Membranen unterschiedlich steil, dies hat sich jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht auf die Monomerausbeute ausgewirkt. Es sollte in weiteren Versuchen überprüft werden, inwiefern der Anstieg der Durchbruchskurve tatsächlich einen Einfluss auf die Monomerausbeute hat. Dies könnte bedeutend für die Auswahl der Fraktionen und ihrer Größe im Bereich des Durchbruchanstiegs sein. Überdies konnte der Vergleich zwischen Membran-

Anion- und Kationaustauschern keine Unterschiede hinsichtlich der Monomerausbeute aufweisen. Die geringen Unterschiede zwischen den verschiedenen Herstellern und Ladungen könnte auf eine gute Reproduzierbarkeit des Verdrängungseffektes an Membranadsorbern deuten.

Zuletzt wurde untersucht, ob ein Unterschied zwischen dem partikulären Kationaustauscher GigaCap und den Membran-Ionaustauschern besteht. Darüber konnte keine Aussage gemacht werden. Daher ist in weiteren Versuchen zu prüfen, inwiefern Membranen eine effektivere Verdrängung als bei porösen Partikeln ermöglichen. Dabei würde es sich empfehlen, die Versuche unter möglichst gleichen Bedingungen durchzuführen, um eine aussagekräftige Vergleichbarkeit zu erzielen.

Ferner hat die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Literaturrecherche gezeigt, dass Chromatographiemembranen zunehmend in Forschungsprojekte und industrielle Verfahren eingebunden werden. Besonders die Abwesenheit von Diffusion innerhalb der Membranen bietet einen großen Vorteil. Folglich können höhere Fließgeschwindigkeiten eingesetzt werden und somit Prozesszeiten verkürzt werden. Außerdem können dadurch große Mengen an Fließmittel eingespart werden. Darüber hinaus sind die Bindungsstellen in Membranen für große Moleküle besser zugänglich. Somit sollten auch Substanzen wie Immunglobuline, Plasmid-DNA und Viren eher an die Bindungsstellen binden können (Chye Lim, et al., 2007). Dazu kommt, dass Chromatographiemembranen auch als Einwegartikel zu Verfügung stehen. Dadurch könnten aufwendige Reinigungsverfahren wegfallen.

Dennoch stehen Chromatographiemembranen vor einigen Herausforderungen. Eines der größten Problematiken stellt die geringe Bindungskapazität von Membranen dar, die sich besonders bei kleineren Proteinen bemerkbar macht. Bei größeren Proteinen kompensiert die Zugänglichkeit an den Liganden die geringe Bindungskapazität. (Zhong, et al., 2013). Zur Erhöhung der Bindungskapazität wird an die Membranen eine sekundäre Matrix gebunden. Doch auch Versuche dieser Arbeit haben gezeigt, dass der Einsatz einer sekundären Matrix zu Komplikationen führen kann. Werden diese Hindernisse überwunden, ist es gut vorstellbar, dass Chromatographiemembranen in der Zukunft partikuläre Träger in einigen

chromatographischen Verfahren ersetzen könnten (Zhong, et al., 2013). Auch die Versuchsergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Membranen in der Zukunft vermehrt eingesetzt werden könnten.

Quellenverzeichnis

Amersham Biosciences, 2003. *Optional Configurations ÄKTA FPLC - User Manual*. s.l.:s.n.

Amersham Biosciences, 2019. *physiology.case.edu*. [Online]

Available at:

https://physiology.case.edu/media/eq_manuals/eq_manual_amersham_akta_explorer_100_fplc_user_guide.pdf

[Zugriff am 6 November 2020].

amersham pharmacia biotech, 1998. *Valve INV-907*. s.l.:s.n.

Anspach, B., 2017. *Deutsches Skript zur Vorlesung Protein Purification/ Preparative Chromatography*, HAW Hamburg: s.n.

Anspach, B., 2020. *persönliche Mitteilung*. s.l.:s.n.

aprentas Hrsg., 2017. *Laborpraxis Band 3: Trennungsmethoden*. 6. Hrsg. Schweiz: Springer International Publishing.

Bio-Rad, 2020. *Bio-Rad*. [Online]

Available at: <https://www.bio-rad.com/de-de/applications-technologies/fast-protein-liquid-chromatography?ID=MWHBF4CZF>

[Zugriff am 1 Oktober 2020].

Brämer, C. et al., 2019. Membrane Adsorber for the Fast Purification of a monoclonal antibody using protein A chromatography. *Membranes*, p. 159.

Brown, A. et al., 2010. Overloading ion-exchange membranes as a purification step for. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, pp. 59-70.

Carta, G. & Jungbauer, A., 2010. *Protein Chromatography*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA.

Chye Lim, J. A., Sinclair, A., Kim, D. S. & Gottschalk, U., 2007. Economic Benefits of Single-Use Membrane Chromatography in Polishing. *BioProcess Interntional*, Februar, pp. 48-56.

Clark, D. P. & Pazdernik, N. J., 2009. *Molekulare Biotechnologie - Grundlagen und Anwendungen*. Burlington: Elsevier Inc..

creative proteomics, 2020. *creative-proteomics.com*. [Online]

Available at: <https://www.creative-proteomics.com/blog/index.php/protein-sequencing-of-edman-degradation/>

[Zugriff am 30 November 2020].

Cromwell, M. E., Hilario, E. & Jacobson, F., 2006. Protein Aggregation and Bioprocessing. *The AAPS Journal*, 15 September.

- cytiva life sciences, 2020. *cytivalifesciences.com*. [Online]
Available at:
<https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=11607>
[Zugriff am 1 November 2020].
- cytiva life sciences, 2018. *Size Exclusion Chromatography - Principles and Methods*. s.l.:s.n.
- Dingeldein, T., Schunk, A. & Maelicke, A., 2016. *Chemgapedia*. [Online]
Available at:
http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/chem_grundlagen/puffer.vlu.html
[Zugriff am 3 Oktober 2020].
- Fey, H. et al., 1975. Methods of Isolation, Purification and Quantitation of Bovine Immunoglobulins - A technical Review. *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, pp. 296-300.
- Freitag, R., 2014. Chromatographic Techniques in the Downstream. In: *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols*. s.l.:s.n., pp. 419-457.
- Gajdosik, M. S., Clifton, J. & Josic, D., 2012. Sample displacement chromatography as a method for purification of proteins and peptides from complex mixtures. *Journal of Chromatography A*, pp. 1-9.
- Gauglitz, G. & Reichert, M., 2016. *chemgapedia*. [Online]
Available at:
http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/13/vlu/thermodyn/phasen/phasen_gesamt.vlu/Page/vsc/de/ch/13/pc/thermodyn/phasen/adsorption.vscml.html
[Zugriff am 4 Dezember 2020].
- GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2007. *Superloop 10 ml, 50 ml*. s.l.:s.n.
- Ghosh, R., 2002. Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges. *Journal of Chromatography A*, 11 Januar, pp. 13-27.
- Haupt, K. & Bueno, S., 2015. Affinity Separation: Affinity Membranes. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*.
- Hodges, R. S., Burke, T. L. & Mant, C. T., 1988. Multi-column preparative reversed-phase sample displacement chromatography of peptides. *Journal of Chromatography*, 1 Januar, pp. 267-280.
- Kaufmann, S. H. E., 2016. Antikörper und ihre Antigene. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 49-61.
- Kelley, B., 2009. Industrialization of mAb production technology: The bioprocessing industry at a crossroads. *mAbs*, pp. 443-452.

- Lalli, E., Silva, J. S., Boi, C. & Sarti, G., 2019. Affinity Membranes and Monoliths for Protein Purification. *Membranes*.
- Madadlou, A., O'Sullivan, S. & Sheehan, D., 2011. Fast Protein Liquid Chromatography. In: *Protein Chromatography: Methods and Protocols*. s.l.:Springer Link, pp. 439-447.
- MedlinePlus, 2018. *medlineplus.gov*. [Online]
Available at: <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a603010.html#how>
[Zugriff am 8 Oktober 2020].
- Müller, E., 2005. Properties and Characterization of High Capacity Resins for Biochromatography. *Chemical Engineering Technology*, Issue 28.
- Rosenberg, A. S., 2006. Effects of Protein Aggregates: An Immunologic Perspective. *The AAPS Journal*, 4 August.
- Sartorius-Stedim, 2018. *sartorius.com*. [Online]
Available at: <https://www.sartorius.com/shop/medias/-brochure-en-Broch-Sartobind>
[Zugriff am 4 Dezember 2020].
- Statista, 2019. *Statista.com*. [Online]
Available at: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/1006452/umfrage/top-10-arzneimittel-nach-umsatz/>
[Zugriff am 8 Oktober 2020].
- Steffens, I., 2020. *Eignung der Verdrängungschromatographie zur Trennung von bovinen Gammaglobulinaggregaten und dem Monomer an zwei Kationenaustauschern*, s.l.: s.n.
- Stone, M. T., Cotoni, K. A. & Stoner, J. L., 2019. Cation exchange frontal chromatography for the removal of monoclonal antibody aggregates. *Journal of Chromatography A*, pp. 152-160.
- Stryer, L., Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Gatto jr., G. J., 2015. *Stryer Biochemie*. 8. Hrsg. USA: Springer-Verlag.
- Thermo Scientific Pierce, 2020. *thermofischer.com*. [Online]
Available at: tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1601975-Antibody-Production-Purification-Guide.pdf
[Zugriff am 19 September 2020].
- U.S. Food and Drug Administration, 2015. *FDA.gov*. [Online]
Available at: <https://www.fda.gov/drugs/postmarket-drug-safety-information-patients-and-providers/rituximab-marketed-rituxan-information>
[Zugriff am 8 Oktober 2020].
- University of Parma, 2017. *3drei3.de*. [Online]
Available at: <https://www.3drei3.de/artikel/immunsystem-und-immunitat-beim-schwein->

spezifische-humorale-immunitat 1718/

[Zugriff am 30 November 2020].

Vazquez-Rey, M. & Lang, D. A., 2011. Aggregates in monoclonal Antibody Manufacturing Process. *Biotechnology and Bioengineering*.

Veeraragavan, K., Bernier, A. & Braendli, E., 1991. Sample Displacement mode chromatography: purification of proteins by use of a high-performance anion-exchange column. *Journal of Chromatography*, pp. 207-220.

Wan, M. & Wang, G. Y., 2001. *Enhanced Aggregate Removal From Bulk Biologicals Using Ion Exchange Chromatography*. USA, Patentnr. US 6,177,548 B1.

Weiss, J., 2004. *Handbook of Ion Chromatography*. 3. Hrsg. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Winiwarter, S. et al., 2007. Use of Molecular Descriptors for Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion Predictions. In: s.l.:Elsevier Ltd., pp. 531-549.

Yang, D., Kroe-Barrett, R., Singh, S. & Laue, T., 2019. IgG Charge: Practical and Biological Implications. *antibodies*.

Zhong, L., Orr, V., Moo-Young, M. & Chou, P. C., 2013. Recent advances in bioprocessing application of membrane chromatography. *Biotechnology Advances*, Januar, Issue 31, pp. 450-465.

Zhou, J. X. & Tressel, T., 2006. Basic Concepts in Q Membrane Chromatography for Large-Scale Antibody. *Biotechnology Progress*, Issue 22, pp. 341-349.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht. Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben wird.

Hamburg,

Verena Fechter

Anhang A

Zonenchromatographie, pH-Wert 4,5

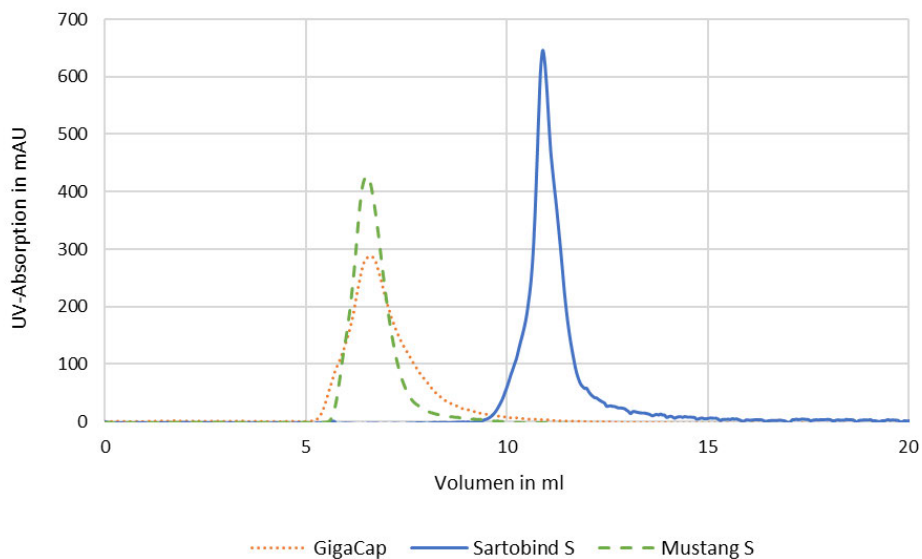


Abbildung 19: Chromatogramme der Zonenchromatographien mit den Säulen GigaCap, Sartobind S und Mustang S bei einem pH-Wert von 4,5. Es wurde 1 ml Gammaglobulin mit einer Konzentration von 2 mg/ml aufgereinigt. Als Equilibrierungspuffer wurde ein Natrium-Acetatpuffer mit einer Konzentration von 100 mM und einem pH-Wert von 4,5 verwendet. Diese Versuche fanden direkt vor der entsprechenden Frontalchromatographie statt. GigaCap – orange; Sartobind S – blau; Mustang S – grün.

Zonenchromatographie, pH = 5,0

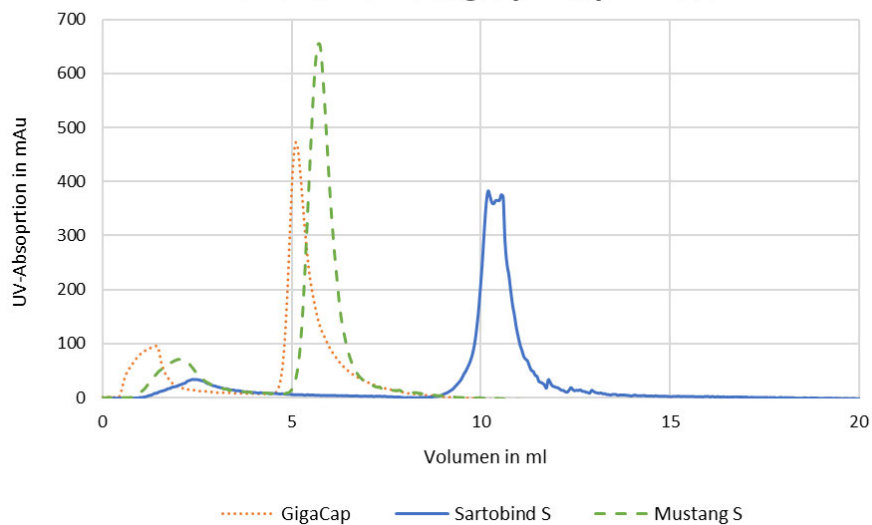


Abbildung 20: Chromatogramme der Zonenchromatographien mit den Säulen GigaCap, Sartobind S und Mustang S bei einem pH-Wert von 5,0. Es wurde 1 ml Gammaglobulin mit einer Konzentration von 2 mg/ml aufgereinigt. Als Equilibrierungspuffer wurde ein Natrium-Acetatpuffer mit einer Konzentration von 100 mM und einem pH-Wert von 5,0 verwendet. Diese Versuche fanden direkt vor der entsprechenden Frontalchromatographie statt. GigaCap – orange; Sartobind S – blau; Mustang S – grün.

Anhang B

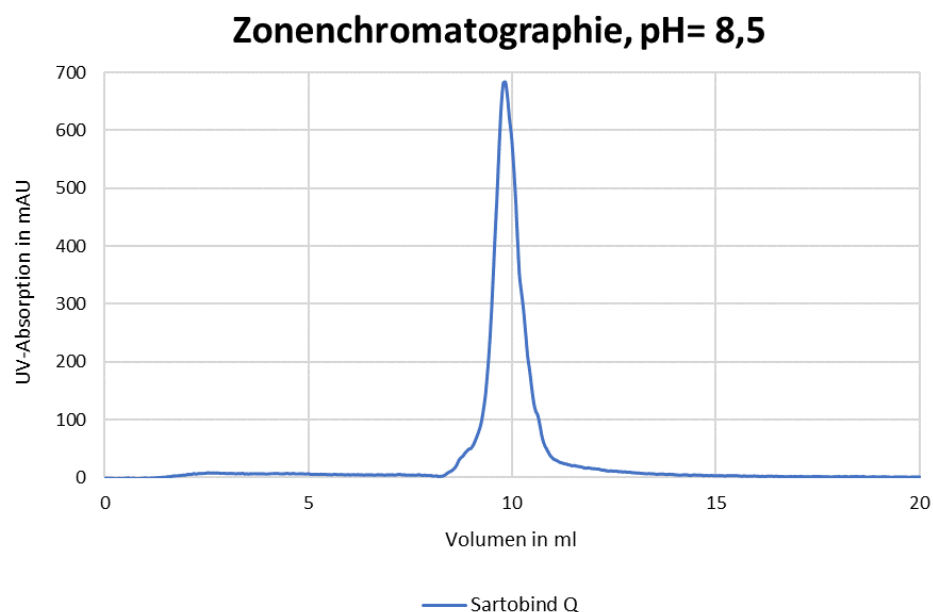


Abbildung 21: Chromatogramm des Anionenaustauschers Sartobind Q in der Zonenchromatographie beim pH-Wert 8,5. Es wurde 1 ml Gammaglobulin mit einer Konzentration von 2 mg/ml aufgereinigt. Aufgezeichnet wurde die UV-Absorption über dem Volumen des Fließmittels. Als Equilibrierungspuffer wurde ein TRIS-Puffer mit einer Konzentration von 20 mM und einem pH-Wert von 8,5 verwendet. Dieser Versuch fand direkt vor der entsprechenden Frontalchromatographie statt.

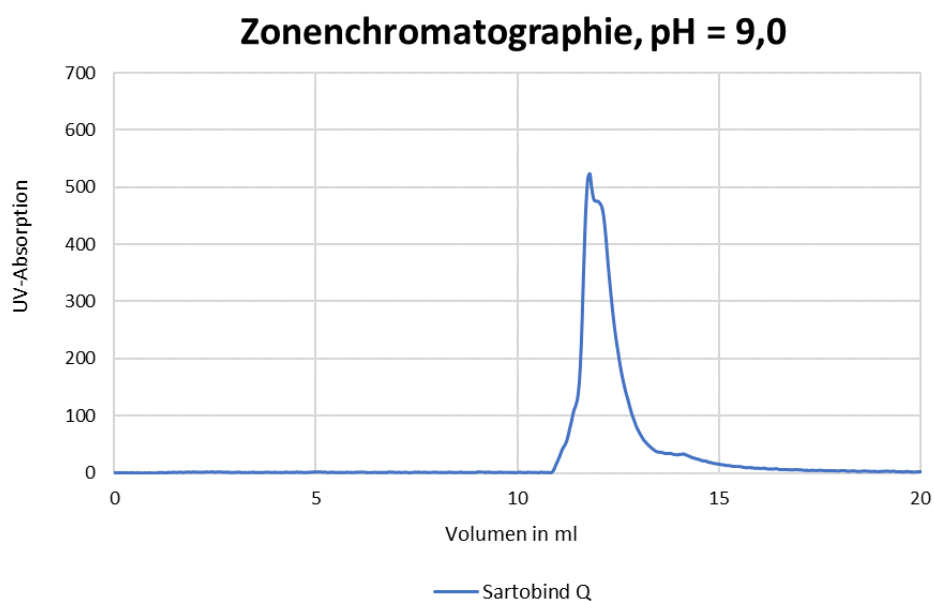


Abbildung 22: Chromatogramm des Anionenaustauschers Sartobind Q in der Zonenchromatographie beim pH-Wert 9,0. Es wurde 1 ml Gammaglobulin mit einer Konzentration von 2 mg/ml aufgereinigt. Aufgezeichnet wurde die UV-Absorption über dem Volumen des Fließmittels. Als Equilibrierungspuffer wurde ein TRIS-Puffer mit einer Konzentration von 20 mM und einem pH-Wert von 9,0 verwendet. Dieser Versuch fand direkt vor der entsprechenden Frontalchromatographie statt.