

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
Fakultät Life Sciences

Bachelorarbeit  
Im Studiengang Biotechnologie

# Modulares DoE für die Entwicklung eines Capture-Schrittes von Proteinen im 96-Array-Format

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
B	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
C	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
D	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
E	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
F	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
G	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
H	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o

vorgelegt von  
**Peter Maul**  
Matrikel-Nr. 2023677

Hamburg am 11. April 2014

1. **Gutachter:** Prof. Dr. Birger Anspach (HAW Hamburg)
2. **Gutachter:** Dr. Jan Oschmann (RHB)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt in der Abteilung Prozessentwicklung (Downstreamprocessing) der Firma Richter-Helm BioLogics GmbH & Co. KG.

---

***Eidesstattliche Erklärung***

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, 11. Mai 2014

Peter Maul

## **Zusammenfassung**

In dieser Bachelorarbeit wurden zwei High-Throughput-Screening-Tools zur Chromatographieentwicklung ausgetestet: das *MediaScout<sup>®</sup>CentriColumns* Array der Firma *ATOLL* welches aus 96 mit jeweils 50 µl Resinmaterial gepackten Säulen für Versuche unter quasi-Flussbedingungen besteht, sowie mit Resin manuell gefüllte Mikrofilterplatten von *Pall* für Batchadsorptionsversuche. Ziel war es die Möglichkeiten dieser Screening-Tools zu vergleichen sowie eine generische Vorgehensweise zu ermitteln die für die Integration in den Entwicklungsprozess eines Capture für Proteine einsetzbar ist.

Für Versuchszwecke waren auf den beiden 96-Array-Formaten 12 Kationenaustauscherresins spaltenweise jeweils 8mal platziert. Aus Applikationsbeschreibungen der Hersteller und einigen Anwendungsbeispielen die in Artikeln von Fachjournalen auffindbar waren wurden verschiedene Versuchstypen (Module) identifiziert, darunter Anbindungs- und Elutionsversuche, sowie Durchbruchkurven und Adsorptionsisothermen. Die Durchführung dieser Versuche erfolgte exemplarisch mit drei Proteinen.

Das Pipettieren von Lösungen zur Konditionierung, Probenbeladung und Elution der Chromatographiesins wurde manuell mit Multi-Channel Pipetten ausgeführt, die Chromatographie in Minisäulen gravitationsunterstützt per Zentrifugation, sowie in Mikrofilterplatten zusätzlich auch per Vakuumfiltration. Es wurde ausschließlich mit reinen Proteinlösungen gearbeitet, daher konnte die Analytik für die verwendeten Proteine einfach über die UV-Absorptionsmessung erfolgen. Bei der Ermittlung von Massenbilanzen wurde die Wasserabsorption im nahen IR-Bereich für die Ermittlung der Volumen von Elutionsfraktionen genutzt. Es wurden Laborprotokolle formuliert, Datenauswertungsmöglichkeiten in *Excel* geschaffen, mit *Matlab* eine anschauliche Form zur vergleichenden Datendarstellung getestet und mit *MODDE* verschiedene Daten-Modelle für die experimentell ermittelten Ergebnisse entworfen.

---

## **Danksagung**

Diese Abschlussarbeit wurde im Rahmen des Studienganges Bachelor of Science Biotechnologie an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg (HAW) im Unternehmen Richter-Helm BioLogics GmbH & Co. KG (RHB) erstellt.

Mein Dank an dieser Stelle geht an RHB für die zur Verfügung Stellung von Equipment, Materialien und Laborplatz für die Ausführung der Versuche. Insbesondere bei RHB möchte ich mich bedanken bei Dr. Michael Küchler für den Vorschlag des Themas dieser Abschlussarbeit, bei Dr. Jan Oschmann für die fachliche Betreuung während der Durchführung und bei Dr. Christian Kaiser für die kurze aber sehr hilfreiche Einführung in *Matlab*.

Von Seiten der HAW geht mein Dank an Professor Dr. Birger Anspach für die Ideen und Anregungen zur Planung der praktischen Arbeiten.

Der Bearbeitungszeitraum dieser Abschlussarbeit war vom 3. Februar 2014 bis zum 12. Mai 2014.

---

# Inhalt

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Präparative Chromatographie in der Biotechnologie.....	1
1.2	Zielstellung der Bachelorarbeit .....	2
<b>2</b>	<b>Theoretischer Teil</b> .....	<b>3</b>
2.1	<b>Das Prinzip der Chromatographie</b> .....	<b>3</b>
2.1.1	Operationsmodi in der Chromatographie .....	3
2.1.2	Chromatographietechniken.....	4
2.1.3	Säulenmaterialien .....	5
2.1.4	Chromatographischer Reinigungsprozess.....	5
2.1.5	Operative Parameter in der Chromatographie .....	6
2.2	<b>Entwicklung von chromatographischen Reinigungsstufen</b> .....	<b>6</b>
2.2.1	Entwicklungsstrategien und Entwicklungsmaßstäbe.....	6
2.2.2	Hochdurchsatz-Techniken in der Bioprozessentwicklung.....	7
2.2.3	Hochdurchsatz-Strategien in der Chromatographie.....	7
2.2.4	HTPD-Plattformen zur Chromatographieentwicklung .....	8
2.2.5	Versuchstypen in HTPD-Tools.....	10
2.2.6	Typische analytische Methoden .....	11
2.2.7	Darstellung von Ergebnissen .....	12
2.2.8	Versuchsdesigne .....	12
2.3	<b>Nutzbare Eigenschaften von Proteinen zur chromatographischen Reinigung</b> .....	<b>13</b>
2.4	<b>Ionenaustauschchromatographie</b> .....	<b>13</b>
2.4.1	Prinzip.....	13
2.4.2	Typen.....	14
2.4.3	Liganden in der Kationenaustauschchromatographie.....	14
2.4.4	Einflussfaktoren auf das Bindungsverhalten .....	14
2.5	<b>Der Capture von Proteinen aus Prozesslösungen</b> .....	<b>15</b>
2.6	<b>Versuchsplanung</b> .....	<b>16</b>
2.6.1	Prozessfaktoren und Charakterisierungsraum .....	16
2.6.2	Daten-Auswertung.....	17
2.6.3	Versuchsmodelle.....	17
2.7	<b>Generisches Ablaufschema für die Verwendung von HTPD-Tools</b> .....	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>20</b>
3.1	<b>Allgemeiner Versuchsablauf</b> .....	<b>20</b>
3.2	<b>Massenbestimmung</b> .....	<b>20</b>
3.2.1	Volumenbestimmung (Passlängenkorrektur) .....	20
3.2.2	UV-Messung.....	21
3.3	<b>Lösungstransfer</b> .....	<b>23</b>
3.4	<b>Probenvorbereitung (Konditionierung)</b> .....	<b>23</b>
3.5	<b>Allgemeines Arbeitsprotokoll für <i>MediaScout</i><sup>®</sup> <i>CentriColumns</i></b> .....	<b>23</b>

---

---

<b>3.6</b>	<b>Allgemeines Arbeitsprotokoll für Mikrofilterplatten .....</b>	<b>24</b>
3.6.1	Bereitstellung von 50 % Slurrys .....	25
3.6.2	Füllen der Mikrofilterplatten mit Resin .....	25
3.6.3	Filtration .....	25
<b>3.7</b>	<b>Software .....</b>	<b>26</b>
3.7.1	Microsoft: <i>Word</i> 2010.....	26
3.7.2	Thermo Scientific: <i>ScanIt</i> .....	26
3.7.3	Microsoft: <i>Excel</i> 2010.....	26
3.7.4	Mathworks: <i>Matlab</i> R2014a.....	26
3.7.5	Umetrix: <i>MODDE</i> 9.1 .....	26
<b>3.8</b>	<b>Auswertemethoden .....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>Geräte und Materialien .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2</b>	<b>Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>30</b>
<b>4.3</b>	<b>Chemikalien .....</b>	<b>30</b>
<b>4.4</b>	<b>Proteine.....</b>	<b>31</b>
<b>4.5</b>	<b><i>MediaScout</i><sup>®</sup> <i>CentriColumns</i> .....</b>	<b>31</b>
<b>4.6</b>	<b>Layout 96-Array-Formate.....</b>	<b>31</b>
<b>4.7</b>	<b>Kationenaustauscherresins.....</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1</b>	<b>Überblick durchgeführter Versuche in 96-Array-Formaten.....</b>	<b>33</b>
<b>5.2</b>	<b>Pufferherstellung.....</b>	<b>36</b>
5.2.1	Phosphat-Citrat-Puffer.....	36
5.2.2	pH-Wert und Leitfähigkeit .....	37
<b>5.3</b>	<b>Absorptionsmessung .....</b>	<b>38</b>
5.3.1	Grundabsorption 96-Well UV <sup>®</sup> Star Microplate und Wasser.....	38
5.3.2	Mehrfachverwendung von 96-Well UV <sup>®</sup> Star-Microplates .....	39
5.3.3	Protein-Absorptionsspektren .....	40
5.3.4	Analysenfunktionen Proteinkonzentration .....	40
<b>5.4</b>	<b>Volumenbestimmung in Wells .....</b>	<b>41</b>
<b>5.5</b>	<b>Performance-Tests.....</b>	<b>42</b>
5.5.1	Performance-Test #1 mit BSA in Minisäulen.....	42
5.5.2	Performance Test #2 mit Protein <i>B112</i> in Minisäulen.....	43
5.5.3	Performance-Test #3 und #4 mit Protein <i>B112</i> in Mikrofilterplatten.....	44
<b>5.6</b>	<b>Modul 1: Anbindungsversuche .....</b>	<b>46</b>
5.6.1	Versuchs-Designe für Anbindungsversuche.....	46
5.6.2	Allgemeines Arbeitsprotokoll Anbindungsversuche .....	47
5.6.3	Voll-faktorielles Multi-Level-Design .....	48
5.6.4	Einfaches voll-faktorielles Versuchsdesign (2 <sup>2</sup> ).....	51
5.6.5	<i>Doehlert</i> -Design .....	53
5.6.6	<i>Central Composite Face Centered</i> .....	55
5.6.7	<i>Central Composit Inscribed</i> .....	57

---

---

5.6.8	Anbindungsversuch #2 von Protein <i>B112</i> .....	59
<b>5.7</b>	<b>Modul 2: Elutionsversuche .....</b>	<b>60</b>
5.7.1	Allgemeines Arbeitsprotokoll Elutionsversuche .....	60
5.7.2	Elutionsversuche mit Protein <i>B112</i> in Minisäulen .....	61
5.7.3	Elutionsversuche mit Protein <i>B112</i> in einer Mikrofilterplatte .....	63
5.7.4	Elutionsversuche mit <i>Lysozym</i> in Minisäulen.....	64
<b>5.8</b>	<b>Modul 3: Frontalchromatographie .....</b>	<b>65</b>
5.8.1	Versuchsdesign Durchbruchskurven .....	66
5.8.2	Allgemeines Arbeitsprotokoll für Durchbruchskurven in Minisäulen .....	66
5.8.3	Durchbruchskurven <i>Lysozym</i> .....	67
5.8.4	Dynamische Bindungskapazitäten für <i>Lysozym</i> .....	69
5.8.5	<i>MODDE</i> -Auswertung .....	70
5.8.6	Durchflusstests.....	72
<b>5.9</b>	<b>Modul 4: Adsorptionsisothermen.....</b>	<b>76</b>
5.9.1	Allgemeines Arbeitsprotokoll Adsorptionsisothermen.....	76
5.9.2	Adsorptionsisothermen für <i>Lysozym</i> .....	77
<b>6</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>Ergebnisdiskussion.....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>90</b>
<b>Literatur- und Quellenverzeichnis</b>		

---

## Abkürzungsverzeichnis

2 <sup>2</sup>	2-Faktorielles Design mit 2 Faktorleveln
AU	Absorptionseinheit (engl. Absorption Unit)
BSA	Bovines Serum Albumin
CCC	<i>Central Composit Circumscribed</i> (Versuchsdesign)
CCF	<i>Central Composit Face Centered</i> (Versuchsdesign)
CCI	<i>Central Composit Face Inscribed</i> (Versuchsdesign)
CIP	Cleaning-In-Place
DBK	Dynamische Bindungskapazität
DD	<i>Doehlert</i> -Design, Versuchsdesign
DoE	Design of Experimentes (statistische Versuchsführung)
HCP	Host-Cell-Proteine
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
HTPD	High-Throughput-Process-Development
MLD	Multi-Level-Design
MFP	Mikrofilterplatte
mM	Molarität in Milimol
PLS	Partial Least Square
rpm	Zentrifugendrehzahl (rounds per minute)
RSM	<i>Response Surface Methodology</i>

---



# 1 Einleitung

## 1.1 Präparative Chromatographie in der Biotechnologie

In der Durchführung biotechnologischer Verfahren werden an chromatographische Prozessschritte hohe Anforderungen gestellt. Die Reinigung von rekombinant hergestellten Wirkstoffen mittels präparativer Chromatographie hat einen festen Platz in der Ausführung biotechnologischer Produktionsprozesse um Proteine und Peptide in pharmazeutisch akzeptabler Qualität bereitzustellen. Verbindliche Ansprüche der Prozessführung für Arzneimittelhersteller sind in industriellen Richtlinien aber auch von Zulassungsbehörden formuliert. Darin sind die Charakterisierung eines Herstellungsprozesses und das Prozessverständnis Anforderungen denen sich die Produzenten stellen müssen.

Mittlerweile sind etliche arzneirechtlich zugelassene biotechnologisch hergestellte Wirkstoffe auf dem Markt erhältlich, mehrere befinden sich in Zulassungsverfahren. Es ist davon auszugehen dass der Markt für die Behandlung von Patienten mit neuen protein-basierten Wirkstoffen in den kommenden Jahren weiter wächst. Mittlerweile haben sich verschiedenen Expressionssysteme für Proteine und Peptide bewährt. Jedes bringt seine Vor- und Nachteile und ist nicht für jedes Produkt geeignet, auch was die Zusammensetzung der durch die Produktionsorganismen hergestellten Nebenprodukten betrifft die als Verunreinigungen vom eigentlichen Produkt getrennt werden müssen. [1]

An die Entwicklung im Downstreambereich werden daher immer mehr anspruchsvollere Aufgaben gestellt. Die klassische Entwicklungsstrategie setzt darauf aus der Fülle der experimentell getesteten Möglichkeiten für Prozessparameter eine Auswahl geeigneter Operationsparameter treffen zu können, unter denen der Prozess letztendlich wiederholbar, effektiv und wirtschaftlich gefahren werden kann. Die im industriellen bzw. Produktionsmaßstab üblichen prozessierten Volumina pro Produktionsbatch gehen dabei schnell in den mittleren bis hohen m<sup>3</sup>-Bereich um so den Marktanforderungen zu genügen und die Prozesse profitabel zu gestalten.

Mittels Hochdurchsatzentwicklungstechniken kann die initiale Entwicklung von Chromatographieschritten schnell zu wichtigen Kenntnissen führen und ermöglicht ein breites Spektrum verschiedener Verfahrensmöglichkeiten auszuprobieren bevor mit den gewonnenen Informationen eine Maßstabsübertragung stattfindet.

Zwar stehen für die Chromatographie-Prozessentwicklung Hochdurchsatz-Entwicklungstools zur Verfügung, dennoch stellt sich die Frage in welchem Ausmaß es sinnvoll ist Versuchsserien durchzuführen. Die etwas widersprüchlich erscheinende Forderung nach einer Begrenzung des absoluten Versuchsumfanges stellt sich eine durchdachte und auf mehrere verschiedene Chromatographietechniken übertragbare generische Vorgehensweise entgegen. Diese sollte modular entsprechend den Versuchstypen aufgebaut sein und nacheinander mögliche Faktoren und deren Betriebsparameter ermitteln.

---

## 1.2 Zielstellung der Bachelorarbeit

Ziel dieser Bachelorarbeit ist es, zwei für die Abteilung Prozessentwicklung der Richter-Helm BioLogics GmbH neuartige Entwicklungswerkzeuge im 96-Array-Format bestehend aus 96 Minisäulen sowie Mikrofilterplatten mit 96 Wells die mit Säulenmaterial gefüllt werden für die Chromatographieentwicklung am Beispiel eines Capture-Schrittes für Proteine mittels Kationenaustauschchromatographie auszutesten und ein Konzept aufzustellen wie diese Tools für die initiale Entwicklung genutzt werden können.

Dazu ist eine Sichtung und Recherche von Herstellerapplikationsbeschreibungen und wissenschaftlichen Artikeln über zur Verfügung stehende High-Throughput-Entwicklungstools und mögliche Versuchstypen notwendig um vergleichende praktischer Aspekte und Möglichkeiten von 96-Array Formaten (Batchadsorption und Minisäulen) herauszuarbeiten.

Mit den gefundenen Informationen ist eine generische Vorgehensweise für die Entwicklung eines Capture zu erarbeiten und diese mit verschiedenen Proteinen auszutesten. Zur Abarbeitung der identifizierten Versuchsmodule müssen verschiedene Methoden zur Probenvorbereitung berücksichtigt und eine Analytik von Proteinen in 96-Well Mikrowellplatten etabliert werden die zudem zur Volumenbestimmung von Lösungen in Wells einsetzbar ist.

Die Versuchsplanung erfolgt auf der Basis von *DoE*-Konzepten die zudem einen Vergleich verschiedener Versuchsdesigns zur Reduktion des Versuchsaufwandes bei vertretbarem Informationsgewinn ermöglichen sollen.

Zur Durchführung der einzelnen Versuchsmodule in 96-Array Formaten sind geeignete Datenerfassungs- und Auswertungsmöglichkeiten durch Erstellung von halbautomatischen *Exeltabellen* zu schaffen.

Für den anschaulichen Vergleich der erzeugten Versuchsergebnisse sind geeignete Darstellungsformen zu testen.

---

## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Das Prinzip der Chromatographie

Die chromatographische Trennung durch Vorbeiführen von in fluiden Phasen gelösten Molekülen an stationären Phasen (Chromatographiematerialien) beruht auf verschiedenen Wechselwirkungen und Interaktionen auf molekularer Ebene. Bei der Durchführung einer Chromatographie werden typischerweise die folgenden Schritte durchlaufen: Regeneration und Equilibrieren des verwendeten Chromatographiematerials, Probenbeladung, Waschen von ungebundenen Molekülen, Gradienten- oder Stufen Elution der zu reinigenden Stoffe, Equilibration und gegebenenfalls Reinigung des verwendeten Chromatographiematerials. Neben hervorragenden analytischen Trennergebnissen von kleinen Probenvolumina sind auch präparative Reinigungsschritte durchführbar, diese erfordern allerdings entsprechend dem höheren Prozessvolumen mehr Equipment.

Wichtig für den Trennvorgang ist hierbei eine Konditionierung von Proben – und Prozesslösungen die im Gegensatz zu analytischen Trennverfahren bei präparativen Anwendungen unabdingbar ist. Die Konditionierung bestimmt letztendlich die Lösungseigenschaften wie den pH Wert, den Salzgehalt, die Leitfähigkeit und den Einsatz von organischen Lösungsmitteln.

Reinigungsoperationen sind sowohl satzweise z.B. in gerührten Tanks die mit Chromatographiematerial und Probenlösung gefüllt sind (Batchadsorption), oder in kontinuierlicher Verfahrensweise in gepackten Chromatographiesäulen durchführbar. In Säulen spielt der Durchfluss der mobilen Phase eine wichtige Rolle. Die Menge der zu reinigenden Prozesslösungen muss zudem auf die Säulendimensionen und Kapazität abgestimmt werden wodurch weitere zu berücksichtigende Faktoren hinzukommen.

#### 2.1.1 Operationsmodi in der Chromatographie

Als Operationsmodi kommen drei Varianten für die präparative chromatographische Reinigung in Frage. Im Bindungsmodus wird eine konditionierte Menge eines Stoffgemisches auf das Chromatographiematerial appliziert, gefolgt von Waschrissen (Waschmodus) zur Entfernung ungebundener Stoffe. Nach der Anbindung des zu reinigenden Zielproduktes wird dieses mit geeigneten Lösungen von der Säule gelöst (Elutionsmodus). Im Gegensatz dazu wird im Durchflussmodus (*engl. Flowthrough-Modus*) das eigentliche Zielprodukt nicht am Säulenmaterial gebunden sondern nur die Verunreinigungen. Vor dem applizieren einer Prozesslösung geht üblicherweise eine Regenerations- und Equilibrierungsprozedur der zur Chromatographie genutzten stationären Phasen mit geeigneten Puffern voraus. Nach der Durchführung der Elution folgt dann üblicherweise ein Spülschritt zur erneuten Verwendung der Chromatographiematerialien. In analytischen Anwendungen sind die applizierten Probenmengen eher klein gegenüber den Säulenmaterialien um einfache Anbindungs- und Trennstudien durchzuführen.

---

Um präparativ größere Mengen an Produktlösung zu reinigen wird die Frontalchromatographie eingesetzt bei der ein Probenauftrag bis zu der gewünschten Auslastung des Chromatographiematerials erfolgt. Bei Kenntnis der operativen Gegebenheiten ist eine optimale Ausnutzung der Säulenmaterialien (häufig als Resin bezeichnet, eigentlich *engl.* für Kunstharz) hinsichtlich der maximalen adsorbierten Stoffmenge bei voller Reinigungsleistung möglich.

### 2.1.2 Chromatographietechniken

Mittlerweile haben sich verschiedenen Chromatographietechniken etabliert die auf unterschiedlichen Trennungsmechanismen beruhen und für analytische Zwecke sowie zum Prozessieren größerer Volumina genutzt werden können. In Tab. 1 ist ein Überblick über die gebräuchlichen Techniken und deren Trennprinzipien gegeben.

Jeder neuen Trennaufgabe, ob analytisch oder präparativ, stehen somit zu Beginn der Entwicklung verschiedene Optionen offen. Welche Chromatographietechnik die optimalsten Ergebnisse hinsichtlich der Trennleistung oder Wirtschaftlichkeit liefert, ist zu Beginn einer Entwicklung nicht bekannt. Gleiches gilt für die Auswahl der entsprechenden Betriebsparameter der technischen Anlagen die hierfür notwendig sind.

Die gegebenen Eigenschaften von Proteinen (siehe Kapitel 2.3) sowie die erfahrungsgemäß üblichen Produktionskosten helfen früh dabei, einige Betriebsfaktoren von Chromatographieanlagen nach generischen Versuchsreihen auszuwählen. Modular aufgebaute Versuchsreihen in denen nacheinander verschiedene Möglichkeiten für Betriebsfaktoren ausgetestet werden sind dazu notwendig.

**Tab. 1: Chromatographietechniken**

Technik	Trennprinzip
Kationenaustauschchromatographie	elektrostatische Wechselwirkungen
Anionenaustauschchromatographie	elektrostatische Wechselwirkungen
Hydrophobe Interaktionschromatographie	hydrophobe Interaktionen
Hydroxyapatit-Chromatographie	Elektrostatische WW in Kombination mit hydrophober Interaktion
Umkehrphasenchromatographie	hydrophobe Interaktionen
Größenausschlusschromatographie	Trennung nach Masse bzw. Größe
Affinitätschromatographie	Komplexierung, spezifische Bioseparation u.a.
Mix-Mode Chromatographie	elektrostatische Wechselwirkungen und hydrophobe Interaktionen

### 2.1.3 Säulenmaterialien

Mit Säulenmaterial sind die in der Chromatographie eingesetzten stationären Phasen gemeint (in Fachliteratur häufig bezeichnet als Resin, *engl.* für Kunstharz oder auch Medium, im *engl.* *Media*). Auf dem Markt erhältlich sind verschiedenste zur Chromatographie einsetzbare Materialien. Überwiegend sind dies Gele, Monolithe, Membranen und andere Partikel (z.B. Gel-in-a-Shell) mit einem Porensystem. Als Träger (Matrix) für spezifische Liganden werden unterschiedliche Materialien verwendet, darunter z.B. synthetische und natürliche Polymere oder Keramiken. An der Oberfläche immobilisierte Liganden legen die Eigenschaften und damit die durchführbare Chromatographietechnik fest. Die wichtigsten operativen Eigenschaften für Chromatographiemedien sind dabei der Ligand (bestimmt die Chromatographietechnik), die Partikelgröße (sowohl mittlere als auch untere und obere Grenze, zumeist zwischen 50-150 µm), dynamische oder maximale Bindungskapazität für Referenzproteine (häufig Bovines Serum Albumin, Lysozym, IgG und andere, üblicherweise im Bereich von 30-200 mg Protein pro ml Material) und bezüglich der mobilen Phase empfohlene operative Fenster.

### 2.1.4 Chromatographischer Reinigungsprozess

Das häufigste anzutreffende Prozessmodell zur chromatographischen Reinigung beinhaltet drei Chromatographieschritte. Üblicherweise wird der erste Chromatographieschritt in einem Reinigungsprozess als *Capture* (von *engl.* Einfangen) bezeichnet. Ziel dabei ist die vorgeklärte Prozesslösungen schnell zu verarbeiten, das Produkt von störenden Ausgangsbestandteilen zu trennen, das Produkt zu stabilisieren und gegebenenfalls zu konzentrieren. Diesen Anforderungen kommen selektive Säulenmaterialien am nächsten, die sowohl bei niedrigen als auch bei höher konzentrierten Produktlösungen und mitunter hohen Flussraten ausreichende Bindungskapazität besitzen.

Im nachfolgenden Chromatographieschritt ist es das Ziel produktspezifischere Verunreinigungen mit ähnlichen Eigenschaften, oder Faltungsintermediate und andere Isoformen vom Zielprodukt abzutrennen. Gleichzeitig erfolgt eine weitere Abreinigung von produktspezifischen Verunreinigungen wie DNA, HCP's und Endotoxinen. Für diesen Chromatographieschritt hat sich die Bezeichnung *Intermediate Step* (vom *engl.* Zwischenschritt) in der Fachsprache herausgebildet. Eine typische Anforderung gegenüber dem *Capture* ist primär eine erhöhte Trennleistung zur Entfernung von Verunreinigungen, mit sekundär gewichteter Kapazität. Häufig kommt für einen *Intermediate Step* auch der Durchflussmodus in Frage bei dem nur Verunreinigungen durch Bindung am ausgewählten Säulenmaterial entfernt werden während das Zielprodukt nicht bindet. Häufig werden aber auch weitere *Intermediate Steps* z.B. zur Umpufferung und Konditionierung von Prozesslösungen eingefügt die mitunter auch mittels anderer Verfahren (z.B. Filtrationstechniken) durchführbar sind. Der dritte und finale chromatographische Reinigungsschritt (*Polishing*, von *engl.* Polieren) wird für die Entfernung von Prozesschemikalien und von im Prozess gebildeten Aggregaten sowie zur Herstellung von stabilen Lagerbedingungen und Produktformulierungen verwendet.

### 2.1.5 Operative Parameter in der Chromatographie

Um einen gewünschten Reinigungserfolg zu erzielen ist zunächst die Auswahl der Verfahrensweise, kontinuierlicher Betrieb oder Batchadsorption, zu treffen. Abhängig von dem chromatographischen Reinigungsprozess wird man sich dann für einen Operationsmodus (Bindung und Elution in Frontalchromatographie, oder Durchflussmodus) entscheiden und weitere operative Parameter festlegen. Die wichtigsten sind die Auswahl der stationären und mobilen Phasen. Die Zusammensetzung der mobilen Phase spielt für die Reinigungswirkung eine ebenso große Rolle wie das verwendete Resin. Für mobile Phasen sind im Allgemeinen Parameter entscheidend wie das Puffersystem, organische und andere Zusätze, Salz- und Proteinkonzentration, pH-Wert und verwendete Volumen. Bezüglich des Säulenmaterials sind Entscheidungen bezüglich der Matrixart, der Partikelverteilung, dem Porendurchmesser und Materialmengen zu treffen. Diese bedingen in Verbindung mit den mobilen Phasen die chemische Stabilität, nutzbare Kapazitäten, steuerbare Selektivität, notwendige Kontaktzeiten und Durchflussraten sowie den Preis für Materialien die für wirtschaftliche Prozesse im Industriemaßstab vertretbar sein sollten.[1][4]

## 2.2 Entwicklung von chromatographischen Reinigungsstufen

### 2.2.1 Entwicklungsstrategien und Entwicklungsmaßstäbe

Während der Entwicklung von Reinigungsabläufen, ist eine Reduzierung von operativen Möglichkeiten Teil der Entscheidungsprozesse für die Auswahl von effektiven und wirtschaftlichen Reinigungsverfahren.

In ersten Auswahlverfahren (*engl. Screenings*) werden üblicherweise die stärksten Einflussfaktoren auf den Prozessverlauf identifiziert und diese für weitere Optimierungsversuche übernommen. In Optimierungsversuchen werden die optimalen Betriebsparameter für die Prozessführung herausgestellt. Ist ein Reinigungsverfahren fertig entwickelt können Robustheitstests durchgeführt werden mit denen die Stabilität des Prozesses gegen kleine Schwankungen der gewählten Parameter in der Prozessführung ermittelt wird.

Üblicherweise beginnt die Entwicklung von Chromatographieschritten im Labormaßstab. Zumeist geht eine Stamm- und Fermentationsentwicklung sowie eine Optimierung der Fermentationsausbeuten im 1-10 Litermaßstab voraus um eine ausreichende Menge an Material für Chromatographieentwicklungen im Labormaßstab zu generieren. Für die Chromatographieentwicklung bedeutet dies anfänglich nur eine begrenzte Menge an Material zur Verfügung zu haben. Aber konventionelle Entwicklungsansätze in pumpenbetriebenen Durchflussanlagen benötigen nicht nur mehr Material, sondern liefern zu Beginn weniger Informationen bezüglich grundsätzlichem Anbindungsverhaltens und möglichen Kapazitäten. Gefundene Operationsparameter werden anschließend in einen größeren Maßstab skaliert, und dann vom Pilotmaßstab in den Prozessmaßstab übertragen.

Einige klassische Entwicklungsansätze beginnen unter Verwendung unreiner Prozesslösungen mit 0,5-1 ml Säulenmaterial in gepackten Säulen. Dieses Vorgehen ermöglicht prinzipiell die Testung einer möglichen Anbindung an verschiedene Säulenmaterialien und eine Auswahl geeigneter Faktoren, gefolgt von einer Skalierung (*engl. Up-Scale*) in größere Säulen im Labor bis hin zu Maßstäben die ein prozessieren großer Lösungsvolumina ermöglichen. Für die Entwicklung von alternativen Reinigungsprozessen für z.B. äquivalente Biotechnologische *Arzneimittel* (*engl. Bio-similar*) kann zu Beginn auch mit reinen Prozesslösungen gearbeitet werden. Die Beurteilung der Abreicherung von in einem Zellkultivierungsprozess oder einer Fermentation entstehenden Nebenprodukten wie Nukleinsäuren, Proteine des produzierenden Wirtsorganismus (HCP) oder auch Endotoxine, setzt die Verwendung der tatsächlichen Prozesslösungen voraus.

### 2.2.2 Hochdurchsatz-Techniken in der Bioprozessentwicklung

Hochdurchsatz-Techniken haben sich in Forschung und Entwicklung sowie in der Durchführung analytischer Methoden in verschiedensten Anwendungsbereichen etabliert. Zunächst im Bereich der Wirkstoffsuche und der Analytik angewendet sind Hochdurchsatz-Techniken in der Entwicklung verschiedenster Bioverfahrensschritte adaptiert. Darunter Multiwell-Fermentationen zur Stammentwicklung oder Löslichkeitsstudien von Proteinen die auf den Einsatz von Mikrowellplatten beruhen. Standardisierte Array-Formate sind dabei 24, 48, 96, 384 und 1536 Wells.

Ein Array bezeichnet hierbei die standardisierte Anordnung von Mikrogefäßen in Kunststoffplatten. Mit diesen sind ebenso viele Versuchsserien, Experimente oder Analysen in flüssigen Systemen zeitgleich durchführbar. Das Versuchsdesign wird üblicherweise Software unterstützt erstellt und multivariant ausgewertet. Viele etablierte Entwicklungsmethoden werden unter Einsatz eines Pipettierroboters durchgeführt, falls manuell gearbeitet wird sind zumindest Mehrkanalpipetten notwendig. Hochdurchsatz-Techniken werden vor allem dann im Forschungs- und Entwicklungsbereich genutzt um möglichst viele Informationen aus Versuchsserien zu generieren. In den meisten Fällen lohnt sich eine Investition in diese Techniken, der Aufwand für die Vorbereitung und das Pipettieren von Lösungen wird durch den möglichen Informationsgewinn längst wieder eingeholt. Von verschiedenen Seiten immer wieder hervorgehoben und betont ist in jedem Fall die Verfügbarkeit einer schnellen und leistungsstarken Analytik.

### 2.2.3 Hochdurchsatz-Strategien in der Chromatographie

In den vergangenen 10 Jahren haben sich zwei schnelle Hochdurchsatz-Prozess-Entwicklungs-Techniken in der Chromatographie als bewährt herausgestellt (siehe Kapitel 2.2.4).

Bezüglich der klassischen Herangehensweise in 0,5 bis 1 ml Säulen unter Verwendung von Pumpensystemen zum Erzeugen eines Flusses der mobilen Phase entlang der stationären Phase, stellt dieses Verfahren zwar eine weitere Miniaturisierung dar, die jedoch durch einen geringeren Materialeinsatz und der Erzeugung von mehr Informationen erheblich profitiert.

---

Erste Versuche mit *HTPD*-Techniken für Chromatographieschritte sind bereits 2003 und danach vielfach beschrieben wurden. Von *General Electrics Healthcare (GE Healthcare)* ist 2010 ist die internationale Konferenz für Hochdurchsatz-Prozess-Entwicklungs-Techniken, die *International Conference for High-Throughput-Process-Development* gegründet wurden, die in den vergangenen Jahren vor allem Chromatographienanwendungen thematisierte. [5]

Durch weitere Bemühungen sowie der Bereitstellung von Geräten und Materialien durch verschiedene Unternehmen wurden ausgereifte Plattformen auf der Basis von 96-Array Formaten ausgetestet mit denen das Hochdurchsatz-Prinzip erfolgreich in der Chromatographieentwicklung adaptiert werden konnte, was sich in einer Fülle von auffindbaren wissenschaftlichen Veröffentlichungen und Applikationsbeschreibungen widerspiegelt.

#### 2.2.4 HTPD-Plattformen zur Chromatographieentwicklung

Einige Lieferanten und Hersteller von Geräten und Materialien für *HTPD-Tools* in der Chromatographie sind unter anderen *ATOLL*, *Pall*, *GE Healthcare* und *Bio-Rad*. Eine Übersicht über die zur Verfügung stehenden Systeme ist in Tab. 2 gezeigt.

Zwei operativ unterschiedliche Entwicklungstools stehen zur Verfügung. Zum einen miniaturisierte gepackte Säulen mit Bettvolumina zwischen 50 und 600  $\mu\text{l}$  mit denen Experimente unter dynamischen Bedingungen, bzw. schrittweisen fließen der mobilen Phase entlang der stationären Phase möglich sind. Eine weitere Möglichkeit stellen mit 2-100  $\mu\text{l}$  Chromatographiematerial gefüllte Mikrofilterplatten in denen Batch-Adsorptionsversuche unter statischen Bedingungen durchgeführt werden können dar. Eine Batch-Adsorption wird hierbei in einem durchmischten Gefäß ausgeführt welches mit einer Dispersion aus Chromatographiematerial und flüssiger Phase gefüllt ist. In diesem Zwei-Phasensystem stellt sich nach einer bestimmten Zeit ein Verteilungsgleichgewicht für einen gelösten bzw. adsorbierten Stoff ein.

Letzterer Versuchsansatz ist vom Prinzip her ähnlich einer Batch-Adsorption in einem gerührten Gefäß. Bei diesen wird optimaler Weise eine On-line Analytik über im Kreis abgeführte und wieder zugeführte Lösungen zur Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt und ermöglicht die Aufnahme von Adsorptionsisothermen und Protein-Aufnahme-Raten. [6]

Tab. 2: HTPD Plattformen in der Chromatographieentwicklung im 96-Array-Format

Hersteller	Plattform	Versuchstyp	Bettvolumen	Resin-Befüllung
<i>ATOLL GmbH</i>	<i>MediaScout® MiniColumns</i>	Säulenversuch	50-600 $\mu\text{l}$	auf Wunsch variabel befüllbar
<i>Pall Life Sciences</i>	<i>AcroPrep™ ScreenExpert Plates</i>	Batchadsorption	2-100 $\mu\text{l}$	<i>Pall</i> Säulenmaterialien
	<i>AcroPrep™ Advanced Microplates</i>	Batchadsorption	2-100 $\mu\text{l}$	manuell, beliebig
<i>GE Healthcare</i>	<i>PreDictor™ Plates</i>	Batchadsorption	2-100 $\mu\text{l}$	<i>GE Healthcare</i> Resins
	<i>PreDictor™ RoboColumns™</i>	Säulenversuch	50-600 $\mu\text{l}$	<i>GE</i> Säulenmaterials
<i>Bio-Rad</i>	<i>Foresight™ Mikrofilterplates</i>	Batchadsorption	2-100 $\mu\text{l}$	<i>Bio-Rad</i> Säulenmaterialien
	<i>Foresight™ RoboColumns™</i>	Säulenversuch	200-600 $\mu\text{l}$	<i>Bio-Rad</i> Säulenmaterialien



### **MediaScout® MiniColumns**

Ursprünglich von der Firma *ATOLL GmbH* (Weingarten, Deutschland) auf dem Markt gebrachte Minisäulen-Arrays aus 96 Säulen sind in drei Ausführungen erhältlich. *MediaScout® MiniColumns* können als *RoboColumns™* entweder in ein automatisches Robotersystem eingebunden werden (z.B. im *Freedom Evo®* von *Tecan*), als *PipetColumns* mit Multipipetten manuell betrieben werden, oder als *CentriColumns* mittels Unterstützung durch Zentrifugation. Firmen wie *Pall*, *Bio-Rad*, *GE Healthcare* lassen sich von *ATOLL* Minisäulen mit ihren Medien füllen und vertreiben diese als *RoboColumns™*. *ATOLL* bietet außerdem für alle anderen Kunden an, jedes beliebige Chromatographiematerial in Minisäulen zu packen. [7]

Das Gehäuse einer Minisäule von *ATOLL* besteht aus Polypropylen. Am unteren Ende befindet sich eine Öffnung zum Auslass des durch Gravitation oder Druck initiierten Durchflusses der mobilen Phase. Das Säulenmaterial liegt auf einer Fritte aus Polypropylen mit 17 µm Porendurchmesser und hält die Partikel des Säulenmaterials zurück. Das Säulenbett ist nach oben hin mit einer weiteren Fritte abgeschlossen. Je nach Bettvolumen hat das darüber zur Verfügung stehende Lösungsreservoir ein Volumen von 200 bis 300 µl. In dieses werden nacheinander Lösungen zum Equilibrieren, zum Probenauftrag, zur Elution und zum Spülen der Säulen aufgegeben. *ATOLL* bietet jeweils 8 mit einem Chromatographiematerial gepackte Säulen an. Auf einem 96er-Array können demnach 12 Minisäulenreihen mit je 8 Säulen platziert werden. Das Array-Format ist auf das handelsübliche 96-Well Mikroplattenformat normiert so dass sich jede Säule im zusammengebauten Array genau über einem Well befindet. Die einzelnen Elutionsfraktionen werden typischerweise in zur Analytik passenden Mikrowellplatten aufgefangen. [11]

### **Mikrofilterplatten**

Gefüllte Mikrofilterplatten werden von *GE Healthcare*, *Pall* und *Bio-Rad* angeboten, leere Mikrofilterplatten zum manuellen füllen sind z.B. bei *Pall* erhältlich. [8][9][10]

Für Batch-Adsorptionen geeignete Mikrofilterplatten besitzen ein Leervolumen von 350 bis 1000 µl und zudem einen inerten Filter am Boden der das darüber befindliche Chromatographiematerial zurückhält und dennoch ein erzwungenes Abfließen von Lösungen ermöglicht. Von *Pall* hergestellte 96-Array Mikrofilterplatten bestehen ebenfalls aus Polypropylen und sind mit 350 µl oder 1 ml Volumen erhältlich. In dieses werden ebenfalls nacheinander Lösungen zum Equilibrieren, zum Probenauftrag und zur Elution aufgegeben. Das zuvor erwähnte Verteilungsgleichgewicht für Proteine stellt sich jedoch nur durch ausreichendes Vermischen des Zwei-Phasensystems ein. Dies ist in Horizontalschüttlern bei einer Schüttelfrequenz von 1100-1350 pro Minute mit 3 mm Auslenkung und einer genügend langer Schüttelzeit, die vom Protein und vom Versuchstyp abhängig ist, erreichbar. Die eingebauten Membranfilter aus hydrophilen Polyethersulfon besitzen hierbei typischerweise 0,45 µm Porendurchmesser, sodass auch bei langen Schüttelzeiten kein nennenswerter Verlust an Lösung über den Bodenauslass auftreten sollte. Die Filtration zur Trennung der Phasen ist dabei entweder über Zentrifugation oder Vakuum möglich. [9][12]

### 2.2.5 Versuchstypen in HTPD-Tools

Mit Minisäulen und Mikrofilterplatten sind verschiedene Versuchstypen durchführbar. Es können wichtige Informationen über Operationsbedingungen generiert werden die für eine Skalierung in größere Säulen von Bedeutung sind. Im Folgenden werden einige Applikationsbeschreibungen der Hersteller sowie vorliegende Beiträge in Fachzeitschriften beispielhaft als Quellen für einzelne Versuchstypen aufgeführt.

Die frühesten auffindbaren Beiträge haben vor allem zum besseren Verständnis und zu Konsequenzen in der praktischen Umsetzung vor allem der Batch-Adsorptionsversuche in Mikrofilterplatten beigetragen. [13][14][15][16]

Die Ermittlung von Anbindungsbedingungen für verschiedene Chromatographietechniken oder auch Elutionsstudien mit mehreren Elutionsstufen in Mikrofilterplatten ist vielfach in folgenden Artikeln beschrieben wurden (siehe Tab. 3)

**Tab. 3: Anbindungs- und Elutionsversuche in Mikrofilterplatten**

Technik	Quellen
Kationenaustausch-Chromatographie	[14], [17], [19], [20]
Anionenaustausch-Chromatographie	[14], [15], [16], [20], [21]
Hydrophobe Interaktions-Chromatographie	[16], [23]
Hydroxylapatit-Chromatographie	[22]
Multi-Modal-Chromatographie	[24], [25]

Die dynamischen Bindungskapazitäten für bestimmte Konditionen im Beladungsvorgang sind über Durchbruchkurven in Minisäulen ermittelbar. [17]

Für die Frontalchromatographie, die insbesondere beim Beladen mit Prozesslösungen eine Rolle spielt, sind die Kenntnis der Bindungsbedingungen sowie die zur Verfügung stehende Kapazität des verwendeten Säulenmaterials von Interesse. Dazu bietet sich die Aufnahme von Adsorptionisothermen zur Ermittlung von statischen Bindungskapazitäten an. *GE Healthcare* bietet insbesondere für die Aufnahme von Adsorptionisothermen für Proteine in mit Chromatographiematerial gefüllten Mikrofilterplatten mit 2,4, 6 und 20 µl Volumen an. [13][15][18][20]

In den Applikationsbeschreibungen von *Pall* sind Beispiele für mehrstufige Elutionen in Mikrofilterplatten zu finden. *GE Healthcare* und *Pall* beschreiben neben der Entwicklung eines *Capture*, *Intermediate* und *Polishing* steps weitere Anwendungen zur Ermittlung von Wasch-, Elutions- und CIP-Konditionen. [27]

Mehrere Vergleichsstudien der in 96-Array-Format ermittelten Konditionen mit größeren Prozessentwicklungssäulen sind zu übereinstimmenden Ergebnissen gekommen, dass in Mikrofilterplatten erhaltene Daten im *Up-Scale* reproduzierbare Ergebnisse liefern. [15][16][17][24][27][29]

Eine Gegenüberstellung der möglichen Versuchstypen in den beiden Entwicklungstools ist in Tab. 4 gezeigt.

**Tab. 4: Beschriebene Versuchstypen in Minisäulen und Mikrofilterplatten**

Versuchstyp	Ziel	Mini-säulen	Mikrofilterplatten
<b>Anbindung</b>	Ermittlung von Bedingungen unter denen ein Protein/ Verunreinigung an einem Säulenmaterial bindet	x	x
<b>Waschschritt</b>	Ermittlung von Bedingungen unter denen eine Verunreinigung von einem Säulenmaterial gelöst werden kann während das Zielprotein gebunden bleibt	x	x
<b>Elution</b>	Ermittlung von Bedingungen unter denen das Zielprotein von einem Säulenmaterial gereinigt eluiert werden kann	x	x
<b>CIP</b>	Entwicklung von CIP-Protokollen, Stabilitätsstudien von Resins nach CIP-Läufen	x	x
<b>Durchbruchskurve</b>	Ermittlung der dynamischen Bindungskapazität	x	
<b>Adsorptionsisotherme</b>	Ermittlung der statischen Bindungskapazität unter Gleichgewichtsbedingungen		x
<b>Proteinadsorptionsrate</b>	Ermittlung der Bindungsgeschwindigkeit von Proteinen an Chromatographiematerialien		x

### 2.2.6 Typische analytische Methoden

Ein oft erwähntes Problem der Hochdurchsatz-Anwendungen ist die Bereitstellung schneller und leistungsfähiger analytischer Verfahren zur Abarbeitung der vielen anfallenden Proben. Bei der Verwendung reiner Proteine ist nur ein analytischer Parameter quantitativ zu erfassen.

Vor der Verwendung von realen Prozessproben sind die tatsächlich abzureinigenden Verunreinigungen festzustellen um so schnelle und leistungsstarke analytische Verfahren auszuwählen und zu etablieren. Die Arbeit mit den realen Prozessproben ist aus diesem Grund zu bevorzugen, da die Auswahl der optimalen Konditionen neben der Wiederfindung an aktivem Zielprodukt in den Elutionsfraktionen auch unter dem Aspekt der Reinheit erfolgen kann. Eine Zusammenfassung der zur Verfügung stehenden Analysetechniken für die qualitative und quantitative Beurteilung des Chromatographieversuche sowie die in den Anwendungsbeschreibungen der Hersteller und in publizierten Artikeln beschriebenen und verwendeten Verfahren zeigt Tab. 5.

**Tab. 5: Analysetechniken**

Analysetechnik	Analyten
UV-Absorption	Gesamtprotein
SDS-PAGE	Proteingemisch
HPLC-RP	Proteingemisch
HPLC-SEC	Proteine, Aggregate
Assays	Endotoxine, CHO, HCP
DNA-Assays	DNA
Produktspezifische Aktivitätsassays	Zielprodukt

### 2.2.7 Darstellung von Ergebnissen

In den meisten der zuvor genannten Quellen werden mehrere Resins und/oder verschiedene Konditionen der mobilen Phase gleichzeitig auf einem Array getestet. Analytische Ergebnisse sind entweder Reinheit und Wiederfindung (Gesamtprotein, Zielprotein oder Verunreinigung) sowie Beladungskapazitäten. Die häufigste anzutreffende grafische Darstellungsform experimentell erzeugter Daten sind Kontourplots sowie Multi-Kurvendiagramme. Einige Autoren verwenden auch Säulendiagramme. Kontourplots ermöglichen das einfache Erkennen interessanter Faktorkombinationen anhand der Wertdarstellung von Ergebnisgrößen in Form von Farbcodes. Oftmals werden auch Kontourplots überlagert um zum Beispiel Regionen mit annehmbaren Wiederfindungen und Reinheitsgrad graphisch abzulesen (Sweet-Spot-Analyse).

### 2.2.8 Versuchsdesigne

Anwender von Hochdurchsatz-Techniken haben unterschiedliche Möglichkeiten um eine Auswahl geeigneter Versuchsmodelle vorzunehmen. So können pro Array-Versuch entweder mehrere Resins auf wenige Konditionen oder weniger Resins mit mehr Konditionen zum Teil in Mehrfachbestimmungen getestet werden.

Am weitesten verbreitet sind dabei die voll-faktoriellen Multi-Level-Versuchsdesigne sowie Optimierungsdesigns mit weniger Läufen in denen verschiedene Faktoren wie eines oder mehrere Chromatographiematerialien, unterschiedliche Puffer, variable Pufferkonzentrationen, Salzkonzentrationen, Proteinkonzentrationen oder Zusätze von organischen Lösemitteln miteinander variiert und mittels verschiedener Analysetechniken deren Einflüsse auf die Chromatographie bewertet werden.

---

## 2.3 Nutzbare Eigenschaften von Proteinen zur chromatographischen Reinigung

Proteine und Peptide sind aus Aminosäuren aufgebaute Biopolymere. Aus der Reihenfolge linear verknüpfter Aminosäuren folgen mögliche räumliche Ordnungsstrukturen. Diese werden aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen unterschiedlich geladenen Aminosäureresten hydrophoben Interaktionen zwischen hydrophoben Bereichen und van-der-Waals-Wechselwirkungen herausgebildet. Die Anordnung der Peptidketten hängt dabei von den Umgebungsbedingungen ab in denen sich ein Protein befindet. Diese bedingen den Faltungszustand des Gesamtmoleküls und somit die biologische Aktivität. Aufgrund der Umgebungsbedingungen und somit des Faltungszustandes resultiert eine unterschiedliche Verteilung von elektrischen Ladungen und hydrophoben Bereichen auf der Proteinoberfläche. Auf molekularer Ebene bedeutet dies, dass die Aminosäurereste eines Proteins umgebungsbedingt abhängige Ladungszustände besitzen.

Für Proteine kann ein pH-Wert angegeben werden, an dem insgesamt betrachtet keine Ladungsrichtung überwiegt, der isoelektrische Punkt. Trotzdem sind verschiedene Ladungen über die Oberfläche verteilt und ergeben nur in der Nettobetrachtung einen scheinbar ladungslosen Zustand. Mit sinkenden pH-Werten unterhalb des isoelektrischen Punktes nehmen Proteine somit insgesamt zunehmend einen positiveren Ladungszustand an. Mit steigenden pH-Werten oberhalb des isoelektrischen Punktes nehmen Proteine somit insgesamt zunehmend einen negativeren Ladungszustand an. Einen größeren Einfluss auf die Selektivität bei anderen Chromatographietechniken hat die Hydrophobizität von Proteinen, die über organische Lösungsmittel und die Salzkonzentration beeinflussbar ist. Daneben ist aber auch die Löslichkeit und die an den korrekten Faltungszustand gekoppelte Aktivität und Stabilität bei verschiedenen Bedingungen zu berücksichtigen.

## 2.4 Ionenaustauschchromatographie

### 2.4.1 Prinzip

Das Trennprinzip in der Ionenaustauschchromatographie beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen. In der mobilen Phase befindliche geladene Teilchen können an entgegengesetzt geladenen und an einer Trägermatrix immobilisierten Liganden reversibel binden (adsorbieren). Die Elution kann auf zwei Wegen erfolgen, entweder über eine Verdrängung mit stärker geladenen Ionen oder über die Änderung des Ladungszustandes der gebundenen Ionen. Erstere Variante setzt Salzlösungen mit hohen Ionenstärken ein um im steigenden Salzgradienten oder in Salzstufen eine Elution herbeizuführen. Bei der zweiten Variante bewirkt eine Erhöhung des pH-Wertes eine neue Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche welche die Stärke der elektrostatischen Wechselwirkung herabsetzt und somit die Schwächung der Anbindung hervorruft.

---

## 2.4.2 Typen

In der Kationenaustauschchromatographie werden positiv geladene Proteine an negativ geladenen Liganden gebunden. In der Anionenaustauschchromatographie werden negativ geladene Proteine an positiv geladenen Liganden gebunden.

Zur Elution werden zumeist Natriumionen (beim Kationenaustauscher) bzw. Chlorid (beim Anionenaustauscher) in Form eines Salzes, z.B. Natriumchlorid eingesetzt.

## 2.4.3 Liganden in der Kationenaustauschchromatographie

Liganden in kommerziell erhältlichen Säulenmaterialien für Kationenaustauschanwendungen können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Starke Kationenaustauscher sind z.B. Sulfopropyl (abgekürzt SP im Namen) und Methylsulfonate (abgekürzt mit S im Namen). Carboxymethyl (abgekürzt mit CM im Namen) hingegen wird als schwacher Kationenaustauscher eingestuft. Der Unterschied zwischen den Ligandentypen liegt in der pH-abhängigen Ladung. Schwache Kationenaustauschgruppen besitzen aufgrund der schwächeren Säuregruppe einen kleineren Arbeitsbereich in dem diese geladen vorliegen.

## 2.4.4 Einflussfaktoren auf das Bindungsverhalten

Die für die Ionenaustauschchromatographie relevante Umgebungsvariable für Proteine zur Steuerung des Ladungszustandes ist der pH-Wert. Im sauren Milieu liegen saure Aminosäurereste eher ungeladen, basische hingegen eher positiv geladen vor. Im basischen Milieu liegen saure Aminosäurereste eher negativ geladen, basische hingegen eher ungeladen vor.

Je nachdem wo der isoelektrische Punkt in der pH-Skala liegt ist eher ein Anionenaustauscher oder ein Kationenaustauscher zur Anbindung an einem Resins bei einer bestimmten Kondition geeignet.

Die Salzkonzentration wirkt sich unmittelbar auf das Bindungsverhalten aus, ein Protein das zwar über eine ausreichend starke positive Ladung bei einem bestimmten pH-Wert verfügt, wird trotzdem ab einer bestimmten Salzkonzentration von der Säule eluiert da die zum Protein gleichgeladenen und zum Liganden entgegengesetzt geladenen Ionen das Protein von den Bindungsstellen verdrängen. Dazu sind mitunter sehr hohe Salzkonzentrationen notwendig.

---

## 2.5 Der Capture von Proteinen aus Prozesslösungen

Die Möglichkeiten der Hochdurchsatztools sind in Kapitel 2.2.5 beschrieben wurden, Anforderungen an Capture-Schritte in Kapitel 2.1.4 und die wesentlichen Eigenheiten der Kationenaustauschchromatographie in Kapitel 2.4. Nur wenige der im Kapitel 2.1.5 erwähnten Faktoren die einen Prozess beeinflussen, können tatsächlich in Minisäulen oder Mikrofilterplatten bezüglich ihrer optimalen Betriebsparameter ermittelt werden.

Aus der Kombination der Anforderungen an einen Captureschritt mittels eines Kationenaustauschers können folgende Faktoren für einen skalierbaren Chromatographieschritt bezüglich des verwendeten Chromatographiematerialies formuliert werden:

- Auswahl des Chromatographiematerialies mit selektiver und schneller Bindung des Zielproduktes über Anbindungsversuche entweder in Minisäulen oder Mikrofilterplatten
- Bestimmung der möglichen Produktbindungskapazität des verwendeten Chromatographiematerialies durch experimentelle Ermittlung der maximalen Kapazität über Adsorptionisothermen in Mikrofilterplatten oder in Form von Durchbruchkurven in Minisäulen
- Elution des Zielproduktes oder Entfernung von Verunreinigungen unter Anwendung moderater Salzbedingungen über Elutions-, Wasch- oder Spülversuche in Mikrofilterplatten oder Minisäulen

Bezüglich der operativen Betriebsparameter sind folgende Rahmenbedingungen zu erfüllen:

- Erhalt der Aktivität bzw. Struktur des Zielproteins während der Chromatographie
- Auswahl eines geeigneten Puffersystems und anderer Zusätze
- Möglichkeiten einer Konzentrierung prüfen
- Ermittlung der minimalen Kontaktzeiten und maximalen Flussrate

Damit sind die wichtigsten Einflussfaktoren für ein skalierbares Trennergebnis per Kationenaustauschchromatographie identifiziert. Ziel von Versuchen in Hochdurchsatztools ist es, geeignete Operationsbedingungen für die wichtigsten Betriebsparameter zu ermitteln die für die Skalierung in größere Säulen weiterverwendet werden können.

---

## 2.6 Versuchsplanung

Um für die Kationenaustauschchromatographie geeignete Versuchsbedingungen auszuwählen wurde das Trennprinzip und dafür notwendige wichtige Unterschiede in den Eigenschaften von Proteinen erläutert.

Für die Aufstellung von Versuchsplänen in denen verschiedene Faktorlevel miteinander kombiniert stehen statistische Methoden zur Verfügung. [30]

Speziell für 96-Array Formate sind in der Literatur an anderer Stelle weitere Versuchsmodelle genannt wurden. [33]

Ebenso konnten verschiedene Vorschläge für Versuchsdesigns zur Chromatographie-Entwicklung gefunden werden. [31][32]

Vier der in der Literatur vorgeschlagenen Versuchsdesigns wurden ausgewählt um das Anbindungsverhalten an Kationenaustauscher zu modellieren und die Aussagekraft zu vergleichen. Ein ähnlicher Ansatz der verschiedene Versuchsdesigns bezüglich der Aussagekraft der erzeugten Kontourplots vergleicht wurde in der Literatur gefunden. [34]

### 2.6.1 Prozessfaktoren und Charakterisierungsraum

Zwei Kategorien für Prozessfaktoren sind zu unterscheiden. Qualitative Prozessfaktoren sind solche die bei allen Versuchen konstant bleiben, quantitative Prozessfaktoren hingegen werden von Versuch zu Versuch variiert. Für Prozessfaktoren gibt es einen Wertebereich der aufgrund technischer Gegebenheiten möglich wäre. Dadurch ergeben sich unzählige mögliche Kombinationen verschiedener Faktorwerte. Diese Kombinationen wiederum bilden einen mehrdimensionalen Faktorraum. Für die Prozessentwicklung macht es aber nicht unbedingt Sinn diesen in Versuchsserien komplett abzudecken. Eine Einschränkung zu einem experimentellen Charakterisierungsraum ist daher vorzunehmen. [30]

Letztendlich für einen Prozess entscheidend ist der Designraum (*engl. Design-Space*) der gerade in der GMP-Produktion und von Zulassungsbehörden über die Förderung nach *Quality-by-Design* zu ermitteln ist und den Bereich beschreibt in dem der Einfluss der Variation von Prozessfaktoren am genauesten studiert und für einen Prozess bekannt ist.

Das vorliegende 96-Array besteht aus 12x8 Versuchsplätzen, wobei jeweils 12 Chromatographiematerialien je 8 Plätze zugesprochen werden. Der Faktor „Resin“ wird als multifaktorieller Qualitätsfaktor eingestuft, pro Versuchsblock sind daher 8 Faktorkombinationen für jedes Resin auf dem 96-Array Format zu vergeben.



## 2.6.2 Daten-Auswertung

Für Versuche die in mindestens zwei Faktoren variieren können Konturplots erzeugt werden. Diese stellen eine Ergebnisgröße (*engl. Response*) als Farbcode in Abhängigkeit von Faktorkombinationen dar und können mit spezieller Software erzeugt werden. Dieselben Daten können aber auch in einfachen Diagrammen mit mehreren Kurven dargestellt werden. Wie sich herausstellt, sind beide Formen für die Darstellung des Verlaufes mehrerer Chromatographien geeignet.

Insofern teil-faktorielle Versuchspläne eingesetzt werden fehlen mitunter Datenpunkte in Gitternetzen von Kontourplots. Spezielle Datenverarbeitungssoftware zur Regressionsrechnung kann mittels der erzeugten Stützpunkte den restlichen Kontourplot modellieren.

Die Beurteilung der Qualität eines mathematisch erzeugten Datenmodells kann mit verschiedenen Kennzahlen erfolgen. Mittels des Bestimmtheitsmaßes  $R^2$  wird die Güte des Regressionsmodells ausgedrückt, also inwieweit sich mit einem mathematischen Modell die Varianz von tatsächlich experimentell erzeugten Daten erklären lässt. Als Güte für die Prognose von Datenpunkten die experimentell ermittelt wurden steht der Qualitätsfaktor  $Q^2$ . Mit diesem wird beurteilt in wieweit sich die Rohdaten aus dem ein Datenmodell entwickelt wurde wieder vorhersagen lassen.

Der Einfluss verschiedener Faktorterme auf eine Ergebnisgröße wird in Effektplots dargestellt. In diesem ist der Einfluss einzelner Faktoren auf die Ergebnisgröße graphisch vergleichbar. Mittels einer Datenmodellierungssoftware ist eine Anpassung der Modelltherme vorzunehmen. Verschiedenen Lineare, Quadratische, Kubische und Interaktionsterme der Einflussfaktoren werden dazu hinzugefügt. [30]

## 2.6.3 Versuchsmodelle

Der maximalste Versuchsumfang entspricht einem voll-faktoriellen Multi-Level-Design. Bei diesem sind mehrere Faktorlevel in ausgewählten Wertabständen miteinander kombiniert. Mit gleichmäßigen Abständen zwischen Faktorwerten entsteht ein orthogonales Versuchsdesign das bei nur zwei Faktoren ein dichtes und gleichmäßiges Gitter bildet. Die mit diesem Versuchsansatz ermittelten Rohdaten eines Charakterisierungsraumes ergeben durch systematisches Ausschließen von Datenpaaren verschiedenste teil-faktorielle Versuchsdesigns.

Ein voll-faktorieller Ansatz liefert ein detaillierteres Bild als teil-faktorielle Versuchspläne, ist aber vom Versuchsumfang her aufwendiger im Labor umzusetzen. Dem Gegenüber könnte auch zuerst nur in einem teil-faktoriellen Ansatz ein grobes Bild erzeugt und dieses als Ansatzpunkt für weitere Versuche verwenden werden um in ausgewählten Bereichen des Charakterisierungsraumes die Auflösung zu erweitern. Der Versuchsumfang mag dann genauso groß werden, liefert aber in der ausgewählten Region des Charakterisierungsraumes eine höhere Auflösung.

Zur Erzeugung von Kontourplots, insbesondere für Optimierungsversuche und chromatographische Anwendungen sind mehrfach verschiedene *Composit*-, *Doehlert*- oder *D-Optimale* Designe vorgeschlagen wurden. [31][32][33]

## 2.7 Generisches Ablaufschema für die Verwendung von *HTPD*-Tools

### ***Protein-Eigenschaften***

Zunächst sollten verfügbare Informationen über das zu reinigende Protein insbesondere solche die einen Einfluss auf die Reinigung haben erfasst werden.

Die Kenntnis der Molekülmasse ist z.B. für die SDS-PAGE-Analytik zu Auswahl eines Gelsystems wichtig. Der Hydrophobizitätsindex ist (eher) für die Entwicklung von Reinigungsschritten per HIC von Interesse, der isoelektrischen Punkt dagegen für die Auswahl des Ionenaustauschermaterials und des pH-Wertebereiches für Anbindungsversuche. Mittels der Strukturdaten (bzw. anhand der Aminosäuresequenz) kann der Extinktionskoeffizient für analytische UV-Absorptionsmessungen berechnet werden. Proteinspezifische Assays erlauben eine Aktivitätsanalytik während der Prozessentwicklung. Um den Abbau oder Aktivitätsverlust bei bestimmten äußeren Bedingungen zu verhindern sind Aktivitäts- und Stabilitätsinformationen hilfreich. Die Löslichkeit bei verschiedenen Konzentrationen oder Lösungszusätzen in Lösemitteln schränkt den Arbeitsbereich für z.B. den pH-Wert oder die Salzkonzentrationen weiter ein. Die Herkunft des Proteins z.B. des Produktionsstammes bedingt erfahrungsgemäß bestimmte Verunreinigungen in den Prozesslösungen.

### ***Anforderungen an das Endprodukt, Auswahl Reinigungsverfahren***

Um für eine Reinigungsaufgabe die Auswahl der Reinigungsverfahren zu treffen sind Anforderungen an den Reinigungsprozess zu formulieren.

Mit der Auswahl des Reinigungsverfahrens ergeben sich Faktoren und mögliche Parameterbereiche die für einen Reinigungsschritt zu berücksichtigen sind. Unter Berücksichtigung der zuvor ermittelten Produkteigenschaften wie Löslichkeit oder Stabilität kann der mögliche Charakterisierungsraum für die Prozessfaktoren weiter eingeschränkt werden.

### ***Etablieren einer Analytik zur Prozessentwicklung***

Um Reinigungserfolge zu beurteilen stehen verschiedene analytische Methoden zur Verfügung.

SDS-PAGE kann (begrenzt) zur Reinheitsbestimmung aber vor allem zur Identifikation des Proteins über das Molekulargewicht eingesetzt werden.

Mittels UV/VIS-Spektroskopie kann der Gesamtproteingehalt in Lösungen ermittelt werden.

Der Einsatz hochauflösender HPLC-Methoden ermöglicht eine Reinheitsbestimmung bezüglich vorhandener Iso-Formen und anderer Faltungsintermediate.

Eine hochauflösende SEC-Analytik ermöglicht den Nachweis von Aggregaten und Oligomeren.

Mit Assays für spezifische Verunreinigungen wie HCP's, DNA oder Endotoxine können weitere Analysenparameter erfasst werden.

In jedem Fall ist die Linearität für den Arbeitsbereich sowie mögliche analytische Schwankungen der Analysetechniken festzustellen, um somit die Aussagekraft der Analysen zu bestätigen.

---

### **Datenaufnahme und Verarbeitung**

Die Durchführung von HTPD-Experimenten erzeugt mitunter eine hohe Anzahl von Daten. Zur Sicherung und zur Auswertung dieser Daten ist eine geeignete Software zu wählen die den Anforderungen der Versuchstypen und der Datenverarbeitung gerecht wird.

### **Datendarstellung**

Ziel sollte es sein für einen direkten Vergleich erzeugte Daten in eine anschauliche Darstellungsform zu bringen. So können auch mit einfachen Office-Anwendungen verschiedenste aussagekräftige Diagrammtypen erzeugt werden (z.B. Säulen und Liniendiagramme). Wenn sehr viele Daten in gleicher Form anfallen ist eine Automatisierung zur Darstellung z.B. über Skript-basierte Plot-Programme hilfreich.

### **Auswahl des HTPD-Versuchsmoduls**

Die Anzahl möglicher Versuchstypen zur Entwicklung einer Chromatographie ist recht überschaubar. Je nachdem wo man in einem Entwicklungsprozess steht, wird eines der folgenden Module ausgewählt. Für die initiale Entwicklung von Capture-Schritten unter maximaler Ausnutzung der Möglichkeiten in 96-Array-Formaten empfiehlt sich ein modulares Versuchsdesign. Jedes Modul entspricht dabei einem Versuchstyp in dem wichtige (Teil-)Informationen als Grundlage für die Entscheidung der stationären und mobilen Phase erzeugt werden.

Bei der initialen Entwicklung für Chromatographieschritte wird zunächst davon ausgegangen das eine Anbindung an einem selektiven Resin zur Chromatographie erzielt werden soll (Modul 1: Anbindungsversuche). Mittels geeigneter mobiler Phasen sollen anschließend geeignete Elutions-Bedingungen gefunden werden (Modul 2: Elutionsversuche). Unter dynamischen Flussbedingungen kann die Kapazität der am besten geeignetsten Resins ermittelt werden (Modul 4: Frontalchromatographie). Zur Ermittlung der maximalen Kapazität eines Resins für ein Protein dient die Aufnahme von Adsorptionsisothermen (Modul 4). Zur Beurteilung der Protein-Adsorptions-Geschwindigkeit an Resins sind Protein-Aufnahme-Raten (Modul 5) durchführbar.

### **Erstellen des Versuchsdesigns (DoE)**

Zwar stehen mit Minisäulen und Mikrofilterplatten zwei HTPD-Tools zur Verfügung, deren Einsatz ist aber nur sinnvoll wenn tatsächlich 96-Versuchsplätze aus Kombinationen von qualitativen und quantitativen Prozessfaktoren getestet werden.

Zur Auswahl geeigneter Faktorkombinationen stehen verschiedene Softwarelösungen zur Verfügung. Mittels Methoden der statistischen Versuchsplanung können verschiedene Versuchsdesigns erstellt werden. Screening-Versuchsmodelle dienen dazu Effekte und Trends von Faktoreinflüssen zu ermitteln und benötigen in der Regel wenige Versuchsläufe. Mit Optimierungsdesignen können aussagekräftige Kontourplots erzeugt werden, benötigen aber in der Regel mehr Versuchsläufe.

## 3 Methoden

### 3.1 Allgemeiner Versuchsablauf

In den Versuchen wurde die Absorptionsmessung von Proben in 96-Well-Platten durchgeführt. Es wurde ausschließlich mit reinen Proteinlösungen gearbeitet und daher die Messung der UV-Absorption zur Massenbestimmung in Durchfluss- und Filtrationsfraktionen möglich. Die Vorbereitung der Versuche bestand darin, Pufferlösungen und konditionierte Proteinlösungen herzustellen sowie dem Versuchsmodul entsprechende Datenaufnahme- und Datenverarbeitungstabellen in *Excel* zu generieren. In der Nachbearbeitung wurden *Matlab*-Skripte zur graphischen Darstellung erzeugt.

### 3.2 Massenbestimmung

Die Massenbestimmung dient als Grundlage zur Ermittlung von Massenbilanzen und Kapazitäten. Dazu ist die Masse an Protein in den einzelnen Elutionsfraktionen aus deren Volumen und deren Protein-Konzentration zu ermitteln. Sowohl Konzentration als auch Volumen werden aus den Absorptionswerten bei 280 und 900 nm bzw. 900 und 975 nm umgerechnet.

Mit dem Konzentrationswert und dem Fraktionsvolumen berechnet sich die absolute Menge an Protein in der jeweiligen Fraktion  $i$  mit:

$$m_i = c_i \cdot V_i \quad (1)$$

#### 3.2.1 Volumenbestimmung

Das Arbeitsvolumen für die einzelnen Versuchsschritte wurde auf 200  $\mu\text{l}$  festgelegt, wobei es jedoch sowohl durch Zentrifugation als auch durch Filtration im aufgefangenen Volumen zu Unterschieden kommt. Zur Korrektur dieser Unterschiede im Elutionsvolumen wird das lokale Absorptionsmaximum von Wasser bei 975 nm bestimmt.

Das Volumen wird aus gemittelten Daten einer Kalibrierfunktion berechnet, welche die Absorption bei 975 nm in Abhängigkeit des Proteins, der Salzkonzentration und des Volumens (zwischen 100 und 225  $\mu\text{l}$ ) beschreibt.

Ein ähnliches Prinzip ist als Passlängenkorrektur vom Hersteller des verwendeten Wellplattenspektrometers (*MultiSkan GO* von *Thermo Scientific*) beschrieben. Zur Vergleichbarkeit von Absorptionswerten von Lösungen mit definiertem aber unterschiedlichem Volumen, werden diese auf den Absorptionswert von z.B. einer Passlänge von 1 cm normiert. Zunächst wird für bekannte Lösungszusammensetzungen die Absorptionsdifferenz  $A_{975}-A_{900}$  (=  $k$ -Faktor) in einer 1 cm Küvette bestimmt. Proben werden dann auf die Passlänge der Referenzlösung der 1 cm Küvette korrigiert indem der gemessene UV-Wert einer Probe mit dem  $k$ -Faktor multipliziert und durch die eigene Absorptionsdifferenz  $A_{975}-A_{900}$  geteilt wird. [35][36]

Für die Volumenbestimmung von Auffangfraktionen der 96-Array-Versuche wird dieses Prinzip etwas abgewandelt da das genaue Volumen für die Massenbilanz benötigt wird.

Flüssigkeiten erzeugen in Abhängigkeit der gelösten Komponenten einen unterschiedlich ausgeprägten Meniskus. Ist dieser sehr stark gewölbt dann sinkt die durchstrahlte Flüssigkeitshöhe. Die Form des Meniskus wird von der Salzart und der Salzkonzentration, vom pH-Wert und von der Konzentration organischer Stoffe (organische Lösemittel sowie Nukleinsäuren und Proteine) beeinflusst. In den Versuchen ist zunächst nicht bekannt was die Meniskusverzerrung hervorruft, Protein, pH-Wert oder die aktuelle Salzkonzentration, ebenso ist das Durchflussvolumen mitunter unterschiedlich hoch.

Zur Kalibrierung werden zunächst unterschiedliche pH-Werte und verschiedene Konzentrationen an Salz und Protein berücksichtigt. Dazu werden Volumina von 100-225 µl Wasser, von Puffern bei verschiedenen pH-Werten mit und ohne Salz sowie die konditionierten Proteinlösungen hinsichtlich ihrer Absorption bei 975 und 900 nm vermessen. Die Kalibrierfunktion der Volumenbestimmung hat folgende Abhängigkeiten:

$$A_{975-900} = f(\text{Protein}; c_{\text{NaCl}}; c_{\text{Protein}}; V_{\text{Well}}; \text{pH}) \quad (2)$$

Die lineare Regressionsrechnung mit den gemittelten Daten (dem Volumen als y-Wert und der Absorptionsdifferenz als x-Wert) ergibt folgende Analysenfunktion zur Berechnung von Fraktionsvolumina:

$$V_{\text{Well}} = V_i = a \cdot (A_{975,i} - A_{900,i}) + b \quad (3)$$

$a$  = Anstieg Regressionsgerade

$b$  = Achsenabschnitt Regressionsgerade

$V_i$  = Fraktionsvolumen im Well

$A_{900,i}$  = Wellboden und Puffereigener UV-Blindwert der Fraktion  $i$

$A_{975,i}$  = Wasserabsorption der Fraktion  $i$

### 3.2.2 UV-Messung

Zur schnellen quantitativen Analytik der absoluten Proteinmasse wird die Absorption der Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan bei 280 nm genutzt. *BSA* und *Lysozym* wurden als Feststoff eingewogen, in einem passenden Puffer gelöst und Stocklösungen hergestellt. Für Protein *B112* wird eine Verdünnungsreihe hergestellt und gegen *BSA* als Standard gemessen. Die Absorptionswerte zur Aufnahme einer Analysenfunktionen für die einzelnen Proteine wurden mit je 200 µl von verschiedenen konzentrierten Standardlösungen in 96-Well UV<sup>®</sup>Star-Microplates von *Greiner-Bio* ermittelt und für alle Versuche mit dem jeweiligen Protein verwendet.

Zur UV-Messung werden Standards in UV-durchlässigen Wellplatten pipettiert bzw. Elutionsfraktionen aufgefangen und darin vermessen.

Die verwendete Arbeitsgleichung zur Berechnung der Konzentration lautet:

$$c(A_{280}) = a \cdot (A_{280,i} - A_{900,i}) \cdot \frac{V_{Kal}}{V_i} + b \quad (4)$$

$a$  = Anstieg Kalibriergerade (lineare Regressionsrechnung)

$b$  = Achsenabschnitt Kalibriergerade (lineare Regressionsrechnung)

$V_{Kal}$  = Standardvolumen (hier 200  $\mu$ l)

$V_i$  = Volumen der Fraktion  $i$

$A_{280,i}$  = UV-Absorptionswert der Fraktion  $i$

$A_{900,i}$  = Wellboden und Puffereigener Blindwert der Fraktion  $i$

Die Gefäße in 96-Wellplatten werden senkrecht von einer definierten Lichtmenge durchstrahlt. In Abhängigkeit der Proteinmenge wird ein Teil des Lichtes absorbiert. Spektralphotometer geben die Schwächung der Intensität als negativen logarithmischen Schwächungsquotient (Extinktion bzw. Absorption) an.

$$E_\lambda = -\log_{10} \frac{I}{I_0} \quad (5)$$

Für die Extinktionsmessung gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz. Der molare Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  ist von der Anzahl der absorbierenden Aminosäuren im Protein, der durchstrahlten Schichtdicke  $d$  (also dem Volumen an Lösung) und der Konzentration abhängig.

$$E_\lambda = c \cdot \varepsilon \cdot d \quad (6)$$

Die Analysenfunktion mit den Parametern  $a$  und  $b$  wird aus den Standardabsorptionen erhalten indem der 280 nm Absorptionswert als x-Wert und der Konzentrationswert als y-Wert im linearen Regressionsmodell eingesetzt wird.

Von den gemessenen UV-Werten der Probenfraktionen wird stets der Well-eigene Adsorptionswert bei 900 nm als Blindwert abgezogen. Anschließend wird der UV-Wert der Fraktionen auf das Volumen mit dem die Kalibrierung vorgenommen wurde normiert, in diesem Fall 200  $\mu$ l. Vom Photometer erhaltene Messwerte für chromatographische Fraktionen können dann mit der ermittelten Kalibrierfunktion für 200  $\mu$ l Standards in einen Konzentrationswert umgerechnet werden, wenn das Volumen der jeweiligen Fraktion bekannt ist. Zur Berechnung der Masse wird schließlich Gleichung 3 und 4 in Gleichung 1 eingesetzt.

### 3.3 Lösungstransfer

Die Anordnung der 12 Resins mit je 8 Säulen ermöglicht pro Versuchsblock 8 verschiedene Faktorkombinationen zu testen. Mittels einer elektronischen 8-Kanal-Multidispersions-Pipette (E4™ XLS+™ Adjustable Spacer Multichannel Pipette von *Mettler Toledo*) konnten je 8 Lösungen parallel pipettiert werden. Beim pipettieren von Lösungen mit der verwendeten Kolbenhubpipette unter Luftverdrängung von z.B. 200 µl ist unter Einhaltung der Pipettierregeln dennoch mit einem Volumenpipettierfehler von  $4,8 \mu\text{l} \pm 0,8 \%$ , zu rechnen. [37]

### 3.4 Probenvorbereitung (Konditionierung)

*BSA* und *Lysozym* konnten als lyophilisiert vorliegende Proteine in beliebiger Konzentration und Puffern gelöst werden. Generell wurden die Protein in 15 ml oder 50 ml Gefäßen mit Verschluss hergestellt und bei zeitintensiven Versuchen mit mehr Blöcken für 1-3 Tage bei 4°C gelagert.

Das Protein *B112* lag als Ausgangsmaterial in einer Bulklösung vor, die gegen *BSA* gemessen eine Konzentration von 2,7 mg/ml, einen pH-Wert von 4,1 und eine Leitfähigkeit von 131 µs/cm aufwies. Die Konditionierung auf einem bestimmten pH-Wert und einer bestimmten Salzkonzentration bestand in einem Verdünnen mit Stocklösungen und Auffüllen auf ein definiertes Endvolumen.

Nach dem Lösen bzw. Verdünnen der Proteine erfolgte eine Kontrolle und Anpassung des pH-Wertes sowie eine Überprüfung der Leitfähigkeit. Um die Löslichkeit der Proteine bei den jeweiligen Bedingungen zu ermitteln wurden die Lösungen für mehrere Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem Probenauftrag wurde diese dann zentrifugiert sowie über 0,8 µm und 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter filtriert.

### 3.5 Allgemeines Arbeitsprotokoll für *MediaScout® CentriColumns*

Für alle Versuche wird ein maximales Volumen von 200 µl (=4 CV) pro Schritt verwendet. Der gravitationsunterstützte Fluss der aufgetragenen Lösungen durch die Säule wird mittels Zentrifugation je nach ausgeführtem Versuchstyp für 1-2 Minuten bei 500-1000 rpm gewährleistet.

Vor der Verwendung der Säulen werden die Abdeckplatten vom Säulenkopf und Säulenboden entfernt. Zunächst wird vor jedem Versuch die Lagerlösung abzentrifugiert, in 96-Well Platten aufgefangen und verworfen.

Zentrifugiert wurde in einer Multifuge (Model 3.0 von *Heraeus*) mit Mikroschaukeleinsatz. Als Gegengewicht wird eine mit Wasser austarierte Wellplatte verwendet. Die Regeneration der Säulen erfolgte zweimal mit je 4 CV einer 0,5 molaren Natriumchloridlösung (im späteren Equilibrierungspuffer gelöst). Zum Equilibrieren der Säulen wird 4mal Equilibrierungspuffer aufgetragen. Der Probenauftrag (zum Teil mehrfach) erfolgt mit in Equilibrierungspuffer konditionierten Proteinlösungen.

Bei den versuchstypischen Chromatographieschritten Probenauftrag, Waschschrift, Elution und Spülen erfolgt ein Auffangen der durch die Säulen gelaufenen Fraktionen zur nachfolgenden Analytik in 96-Wellplatten. Die Platten wurden im *MultiSkan GO (Thermo Fischer)* bei 280, 900 und 975 nm im Präzisionsmessmodus ausgelesen.

Bei den Anbindungsversuchen wird die Proteinkonzentration in der Auftragslösung auf 2-10 mg Protein pro ml Resin skaliert, wodurch sich eine maximale Adsorption von etwa 1 AU im Spektrometer ergibt. Durchbruchkurven und Adsorptionsisothermen wurden mit verschiedenen Konzentrationen in der Probenauftragslösung aufgenommen. In den Auffangfraktionen ist dennoch mit einer maximalen Konzentration der Auftragslösung zu rechnen.

Beim Spülen mit Salzlösungen nach der Proteinbeladung zur Aufnahme von Durchbruchkurven ist mit weitaus höheren Konzentrationen zu rechnen und eine Quantifizierung im kalibrierten Bereich dann nicht mehr möglich.

Zur Gewährleistung der Mehrfachverwendung von Minisäulen und um gebundene Proteine vollständig zu eluieren, wird nach jedem Versuch mit einer geeigneten Lösung (Protein abhängig) gespült bis keine nennenswerte UV-Absorption mehr auftritt. Die Lagerung für kurze Standzeiten wurde in 20 % Ethanol mit 0,1 M NaCl vorgenommen, für längere Lagerzeiten mit 20 mM Natronlauge.

Zur Regeneration der Minisäulen nach der Lagerung wird zunächst mit Wasser die Lagerlösung entfernt, anschließend mit 0,5 M Salzpuffer beim pH-Wert der Folgeversuche gespült und anschließend equilibriert.

### **3.6 Allgemeines Arbeitsprotokoll für Mikrofilterplatten**

Laut Hersteller sind die Wells in Mikrofilterplatten jeweils nur für einen Versuch vorgesehen. In den durchgeführten Versuchen wurden leere Platten mit 50 %igen Resin-Slurrys gefüllt. Generell legen Versuchstyp und Versuchsdesign hierbei fest welches Resin und wie viele Wells mit einem Säulenmaterial und welche Mengen abgefüllt werden. Bei Anbindungsversuchen wurden 50 µl Resin verwendet, bei Adsorptionsisothermen 20 µl.

Das Arbeitsprotokoll sieht wie in der Säulenchromatographie üblich die typischen Prozessschritte Regeneration, Equilibrieren, Probenbeladung und Waschschrift vor. Während des Inkubationsvorganges dient eine aufgeklebte Folie dem Überlaufschutz.

Die Filtration erfolgt entweder per Zentrifugation bei 500 rpm für eine Minute oder bei 300-500 mbar für 10-60 Sekunden mittels Vakuumabsaugvorrichtung.



### 3.6.1 Bereitstellung von 50 % Slurrys

Die meisten Resins werden von den Herstellern als Slurrys zumeist in 20 % Ethanol mit variierenden Konzentrationen Natriumchlorid geliefert. Um eine definierte Menge manuell in eine Mikrofilterplatte zu pipettieren wird zunächst einen 50 % Slurry hergestellt. Dazu wird über Nacht in einem 50 ml Gefäß abgesetztes Resin mit demselben Volumen Lösung überschichtet und somit ein 1:1 Volumenverhältnis eingestellt.

### 3.6.2 Füllen der Mikrofilterplatten mit Resin

Von dem in einem Becher bei 400 rpm auf einem Magnetrührer gerührten 50 % Slurry wird mit einer abgeschnittenen 200 µl Tip-Spitze 100 µl entnommen und in das Well einer Mikrofilterplatte pipettiert.

Anders als bei Kapazitätsbestimmungen ist es für einfache Anbindungsversuche nicht notwendig genau das veranschlagte Volumen an Chromatographiematerial in allen Wells eines Säulenmaterials zur Verfügung zu haben. Bezüglich der Beladungskapazität wird bei Anbindungsversuchen der Resins nicht im Sättigungsbereich gearbeitet. Allerdings wird bei der Ermittlung von Adsorptionsisothermen die Beladung mit Protein auf das Säulenmaterialvolumen normiert. Pipettierfehler haben hier einen größeren Einfluss auf die berechneten Bindungskapazitäten.

### 3.6.3 Filtration

Zur Filtration der mobilen Phase in unter die Mikrofilterplatte platzierte 96-Well Mikrowellplatten stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. *Pall* gibt für die Filtration per Zentrifugation in geeigneten Zentrifugen mit Mikroplattenschaukeleinsatz eine Zeit von 30 Sekunden bei 500 rpm an. Ein Vakuummanifold für Mikrofilterplatten mit einer Vakuumpumpe zur Filtration innerhalb von 10-60 Sekunden bei 300-500 mbar stand ebenfalls zur Verfügung und wurde getestet. *Pall* selbst gibt in der Applikationsbeschreibung für den Vakkummanifold bis zu 21 µl und bei Zentrifugation 12 µl Rückhaltevolumen in Mikrofiltern an. [39]

## 3.7 Software

### 3.7.1 Microsoft: *Word 2010*

Diese Bachelorarbeit wurde mit *Word 2010* erstellt.

### 3.7.2 Thermo Scientific: *Skant*

Das *MultiSkon GO* Photometer wird mit der Software *Skant* gesteuert. Zunächst wird das Plattenlayout erstellt, die Messwellenlängen ausgewählt und der Messmodus festgelegt. Nach der Messung einer 96-Well Platte (was für drei Wellenlängen im Präzisionsmessmodus etwa 2,5 Minuten dauert) werden die Messwerte in eine *Excel*-Datei exportiert. Aus dieser Datei werden die Spalten in die vorbereiteten Auswertetabellen übertragen.

### 3.7.3 Microsoft: *Excel 2010*

*Excel* wurde zur Datenverarbeitung verwendet. Die aus *Skant* exportierten Daten werden dazu in vorgesehenen Spalten eingefügt. Auf diese Spalte wird dann per Zellbezug zugegriffen und entsprechend der angegebenen Formeln zunächst das Volumen, die Konzentration und die Masse an Protein für jedes Well einer Plattenmessung berechnet. Die weitere Auswertung ist versuchsabhängig und erfolgt durch weitere Berechnungsgleichungen. Weitere Zellbezüge ordnen die Daten aus mehreren Wellplatten für jeden Säulen- bzw. Batchversuch einzeln nach Resin sortiert in weiteren Tabellenmappen an um Graphiken zu erzeugen die für das Versuchsmonitoring genutzt werden können.

### 3.7.4 Mathworks: *Matlab R2014a*

Zur graphischen Darstellung von Ergebnissen wurde sich für *Matlab* entschieden. *Matlab* bietet u.a. die Möglichkeit Daten aus *Excel*-Dateien zu importieren um diese in Diagrammen darzustellen. Es wurden Skripte geschrieben mit denen das automatische Erzeugen von Diagrammen möglich ist. Dadurch ist das Layout der erzeugten Abbildungen immer wieder identisch. Da es sich bei den hier beschriebenen Versuchen in 96-Array Formaten um empirische Entwicklungsansätze handelt die sehr viele Daten erzeugen, ist es von besonderem Vorteil die Ergebnisse von Versuchen mit mehreren Resins und mehreren Konditionen nebeneinander als Kontourplot oder Kurvendiagramm zum Vergleich vorliegen zu haben.

### 3.7.5 Umetrix: *MODDE 9.1*

Zum Aufstellen von Versuchsplänen nach *DoE*-Prinzipien wurde die Software *MOODE* von Umetrix verwendet. Diese bietet zudem die Möglichkeit die Versuche nach statistischen Methoden auszuwerten. Dabei im Mittelpunkt steht die Auswahl geeigneter Koeffizienten um ein Datenmodell mit annehmbaren statistischen Kennzahlen und geringen Fehlern zu erzeugen. Mit diesen Datenmodellen werden ebenfalls Kontourplots erzeugt.

---

### 3.8 Auswertemethoden

Die Auswertung von Versuchen in 96-Array-Formaten setzt eine qualitative sowie quantitative Analytik der einzelnen aufgefundenen Fraktionen voraus. Die hier vorgestellten Rohdatenverarbeitungsmethoden sind unabhängig von der tatsächlich eingesetzten analytischen Technik insofern diese die Masse an Zielprotein oder eines anderen Analyten liefert.

#### **Massenbilanz**

Die Massenbilanz in einem Batch-oder Durchflussversuch ist ausgeglichen wenn die Summation der Massen an Protein in den jeweiligen aufgetragenen und aufgefundenen Fraktionen (mit  $i$  bezeichnet) zum selben Ergebnis führt.

$$\sum_{j=1}^n m_i = \sum_{j=1}^k m_{Load,i} \quad (7)$$

#### **Wiederfindung in der Fraktion $i$**

Die Wiederfindung der aufgetragenen Proteinmenge in einer einzelnen Fraktion (*engl. Recovery, Abk. R*) wird zur Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Versuche auf die applizierte Gesamtmassenmenge normiert:

$$R_i = \frac{m_i}{\sum_{j=1}^k m_{Load,i}} \quad (8)$$

*Anmerkung:* Bei Durchbruchkurven wird mehrfach Probe aufgetragen und es wird daher die Summe der aufgetragenen Massen verwendet. Bei einfachen Anbindungsversuchen wird nur einmal mit Probenlösung beladen, daher ist  $k$  in diesem Fall für die Summe gleich 1.

#### **Gesamtwiederfindung aller Fraktionen**

Die Gesamtwiederfindung ist die auf die Summe der aufgetragenen Massen normierte Summe der einzelnen Massen Protein in den aufgefundenen Fraktionen.

$$R_{ges} = \frac{\sum_{j=1}^n m_i}{\sum_{j=1}^k m_{Load,i}} \quad (9)$$

#### **Anbindung der aufgetragenen Menge Protein am Säulenmaterial in der Fraktion $i$**

Die Differenz an Masse Protein in der aufgetragenen Lösung und der Masse Protein in einer aufgefundenen Fraktion bildet die aktuelle Anbindung von Protein am Säulenmaterial. Diese wird zur Vergleichbarkeit der Säulenmaterialien untereinander ebenfalls auf die insgesamt im Probenauftrag befindliche Proteinmenge normiert.

$$\sum_{j=1}^n m_{Anb,i} = \sum_{j=1}^k m_{Load,i} - \sum_{j=1}^l m_i \quad (10)$$

$$Anbindung [\%Load] = \frac{\sum_{j=1}^n m_{Anb,i}}{\sum_{j=1}^k m_{Load,i}} = 1 - R_{ges} \quad (11)$$

### **Dynamische Bindungskapazität**

Zur Bestimmung der dynamischen Bindungskapazität der verwendeten Proteine an verschiedenen Resin unter den ausgewählten Bedingungen wird der 10% Durchbruchswert der Auftragskonzentration (Probenlösung) in der Auffangfraktion (Durchflusseluat) herangezogen. Die bis zu diesem Auftragsvolumen an der Säule adsorbierte Summe an Masse Protein wird auf das Säulenmaterialvolumen normiert, die dynamische Bindungskapazität bei 10% Durchbruch erhalten.

$$DBK_{10\%} = \frac{\sum_{i=1}^n m_{Anb,i}}{V_{Resin}} = \left[ \frac{mg \text{ Protein}}{ml \text{ Resin}} \right] \quad (12)$$

### **Adsorptionsisotherme nach Langmuir**

Zur Ermittlung der maximalen Bindungskapazität eines Säulenmaterials werden Batch-Adsorptionsversuche durchgeführt. Die unter statischen Bedingungen erhaltene Gleichgewichtskonzentration an Protein in der flüssigen und festen Phase wird mittels der Langmuir-Isotherme beschrieben. Bei Ein-Komponenten-Systemen, wenn sich nur das Zielprotein in Lösung befindet, beschreibt die Adsorptionsisotherme das Zwei-Phasensystem aus Säulenmaterial und Lösung hinsichtlich dessen Konzentrationsverteilung. Experimentelle Daten werden mit der *Excel*-Solver-Funktion unter Minimierung der Fehlerquadratsumme zu den experimentellen Datenpunkten unter Variation der Parameter  $q_{max}$  und  $K_d$  angepasst. Die theoretisch nicht zu erreichende maximale adsorbierte Masse an Protein pro ml Resin wird dabei mittels  $q_{max}$  ausgedrückt. Die Adsorptionskonstante  $K_d$  beschreibt wie schnell sich ein Gleichgewicht aus Adsorption und Desorption einstellt.

$$q_{ad} = \frac{q_{max} \cdot c_{eq}}{c_{eq} + K_d} = \left[ \frac{mg \text{ Protein}}{ml \text{ Resin}} \right] \quad (13)$$

### **Volumetrische Fließgeschwindigkeit**

Die Volumetrische Fließgeschwindigkeit (oder auch Volumenstrom) ist definiert als die Flüssigkeitsmenge an mobiler Phase die pro Zeiteinheit die Säule passiert.

$$Q = \frac{V}{t} = \left[ \frac{ml}{min} \right] \quad (14)$$

### **Lineare Fließgeschwindigkeit**

Neben dem Volumenstrom ist die lineare Fließgeschwindigkeit eine weitere Kennzahl für den Durchfluss der mobilen Phase in der gepackten Chromatographiesäule. Zur Vergleichbarkeit von Säulen unterschiedlicher Maße bezüglich des Durchmessers und der Säulenlänge wird der volumetrische Fluss auf die durchströmte Querschnittsfläche normiert .

$$u = \frac{Q}{\pi \cdot r^2} = \left[ \frac{cm}{h} \right] \quad (15)$$

$r$  = Radius Säulenbett

## **Erstellen von Datenmodellen mit MODDE**

Für die in Versuchen erzeugten Datensätze berechnet *MODDE* über ein Regressionsmodell Koeffizienten welche zur Darstellung und Interpolation zwischen den Datenpunkten genutzt werden. Ziel ist in einem Kontourplot die Daten zu visualisieren und den Einfluss verschiedener Faktorkombinationen auf die Ergebnisgröße darzustellen. Die Ergebnisgröße selbst wird dabei als Farbcode dargestellt, die Intensität gibt die Höhe des Werte an, zumeist wird Rot für einen hohen Wert, Blau für einen niedrigen Wert, sowie Grün und Gelb für dazwischen liegende Werte verwendet.

Um das Datenmodell zu erhalten muss eine vom Anwender unterstützte statistische Auswertung erfolgen. *MODDE* erstellt zwar Regressionsmodelle, die einzelnen Koeffizienten müssen aber einzeln ausgewählt werden. Die Koeffizienten spiegeln den Effekt von Faktoren und deren Interaktionen als mathematische Faktoren wieder. Koeffizienten können dabei linear, quadratisch, kubisch, interaktiv und sogar quadratisch-interaktiv sein.

Um zu entscheiden welche Koeffizienten ein aussagekräftiges und den experimentellen Daten adäquates mathematisches Modell benötigt, helfen verschiedenen Methoden. Hier werden nur zwei davon angewendet. Für den sogenannten „*Data-Fit*“ wird der Summary Plot und der normalisierte Koeffizientenplot zur Hilfe genommen. Zum einen muss sich durch Hinzufügen eines Termes das Regressions- und Vorhersagemodell verbessern (was in einer Erhöhung der Kennzahlen  $R^2$  und  $Q^2$  ersichtlich ist). Außerdem sollte durch hinzugefügte Koeffizienten der im Modell verursachte Fehler (ausgedrückt über Fehlerbalken im Koeffizientenplot) nicht größer sein als der normalisierte Koeffizient selbst.

Ein Datenmodell für eine Ergebnisgröße  $R$  (für *engl. Response*) deren Höhe von zwei Faktoren  $x$  und  $y$  bestimmt wird und alle der oben genannten Koeffizienten besitzt hätte die folgende Form:

$$R(x, y) = l + a_1x + b_1y + c_1xy + a_2x^2 + b_2y^2 + c_2x^2y + c_3xy^2 + a_4x^3 + b_4y^3 + \varepsilon \quad (16)$$

$l$  = konstanter Term

$x^i, y^i$  = Faktoren ( $i = 1$  linearer,  $i = 2$  quadratischer,  $i = 3$  kubischer Einflusstern)

$a_i, b_i$  und  $c_i$  = Koeffizienten für Lineare, Quadratische, Kubische und Interaktionsterme

$\varepsilon$  = nicht erfassbarer Restterm

Schon während der Erstellung der Versuchsdesigns in *MODDE* wurden 12 Responses (für die 12 Resins) erstellt. Die Daten für jedes Resin wurden im Worksheet nur in dem Spaltenbereich für das Resin eingefügt und die restlichen Spaltenwerte für eine Response manuell für das Datenmodell ausgeschlossen. Vorteil ist das die einzelnen Resins unabhängig voneinander mit *PLS* (Partial Least Square) gefittet und allesamt auf einem Plot dargestellt werden können.

---

## 4 Geräte und Materialien

### 4.1 Geräte

Tab. 6: Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Spezifikation	Zweck
MediaScout®MiniColumns	ATOLL GmbH	12 Resins á 50 µL	Chromatographietests
Array-Halterung	ATOLL GmbH	8x12 Steckplätze	Säulenhalterung
96 Well UV®Star Microplate	Greiner-Bio	96 Wells, 300 µl, UV durchlässig, F-Bottom	Auslesen Elutionsfraktionen bei 280,900 und 975 nm
Mikrotiterplatten	Nunc	96 Well, F-Bottom	Auffangen von Fraktionen ohne Messung
Titerplatte	Nunc	6x8 Plätze á 5 ml	Lösungsreservoir
MultiSkan GO	Thermo Scientific		Auslesen MTP Elutionsfraktionen
Multifuge 3.0	Heraeus		gravitationsunterstützter Chromatographiefluss
Zentrifugeneinsatz	Thermo Scientific	Mikroplattenschaukel	Halterung 96 Array Platte
E4™ XLS+™	Mettler Toledo	8-Kanäle, 100-1200 µl	Pipettieren von Lösungen
Vakuumpumpe	KNF Neuberger		Herstellung eines Vakuums zur Elution von Lösungen in MFP
Vakuummanifold	Pall		Filtration in MFP

### 4.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 7: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Spezifikation	Zweck
Pipettentip	Eppendorf	max.5 ml	Vorlage Puffer
Pipettentip	Rainin	max. 1200 µl	Pipettieren Chromatographietests
Spritzen	B.Braun	20 ml	Filtration Probenlösungen
AcroDisc® PF Supor	Pall Life Sciences	0,8/0,2 µm	Filtration Probenlösungen
Falcon	Greiner-Bio	15, 50 ml	Probenkonditionierung
AcroPrep™ Advanced Microplates	Pall Life Sciences	96-Wells, 1 ml, 0,45 µm Membran	Batch-Adsorptionsversuche

### 4.3 Chemikalien

Tab. 8: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Zweck
Dinatriumhydrogenphosphat*2H2O	Merck	Konditionierung
Citronensäure*H2O	Merck	Konditionierung
Natronlauge	RHB	Reinigung der Säulen
Vollentsalztes Wasser	RHB	Lösungsmittel
Natriumchlorid	Merck	Elutionssalz

## 4.4 Proteine

Tab. 9. Proteine

#	Proteingruppe	Name	Abkürzung	Masse [kDa]	IP	Bulk	Einwaage	Hersteller	Reinheit
1	Albumin	Bovines Serum Albumin	BSA	66	5,4		x	Merck Milipore	>98%
2	Peptidhormon	Protein B112	B112	18,8	5,2	x		RHB	
3	Glycosidase	Lysozym	LSZ	14,3	11		x	Affymetrix (USB)	Ultrapure

## 4.5 MediaScout® CentriColumns

Gepackte Chromatographiesäulen (*MediaScout® MiniColumns*) wurden von ATOLL GmbH (Weingarten, Deutschland) bestellt. 96 *CentriColumns* sind zur gravitationsunterstützten Chromatographie per Zentrifugation auf einer Halterung angebracht. Aus Tab. 11 und Tab. 12 ist das verwendete 96-Array Layout ablesbar. In Tab. 10 ist eine Übersicht über die wichtigsten Kennzahlen der hier verwendeten *CentriColumns* gegeben. [40]

Tab. 10: Eigenschaften *MediaScout® CentriColumns*

Eigenschaft	Einheit	Wert
Volumen Resin (=1 CV)	[ $\mu$ l]	50
Betriebstemperatur	[°C]	5-60
Zentrifugationszeit pro CV	[sec/CV]	10
Geschwindigkeit Zentrifuge	[rpm]	500-1000
Betthöhe	[mm]	3,9
Durchmesser Säulenmaterial	[mm]	2,5
Volumenreservoir	[ $\mu$ l]	315
Material	[-]	Polypropylen
Filterfritte	[ $\mu$ m]	17

## 4.6 Layout 96-Array-Formate

Tab. 11: Layout 96-Minisäulen-Array *CentriColumns*

	Kationenaustauscherresins											
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

## 4.7 Kationenaustauscherresins

Tab. 12: Resins zur Kationenaustauschchromatographie

#	Name	Hersteller	Eigenschaften laut Hersteller			
			Gleichgewichts-Bindungs-kapazität	Dynamische Bin-dungs-kapazität	Matrix	Partikel*
1	Macro-Prep CM	Bio-Rad		25 mg Hem/ml	macroporöse Beads	50 µm
2	UNOsphere S	Bio-Rad		30-60 mg IgG/ml	Methylacrylat Beads	80 µm
3	SP Sepharose FF	GE Healthcare		70 mg/ml Ribonuklease	quervernetzte 6% Agarose	90 µm
4	CM Sepharose FF	GE Healthcare		50 mg/ml Ribonuklease	quervernetzte 6% Agarose	90 µm
5	POROS HS 50	Life Technologies	60-80 mg/ml Lysozym		PSDVB Partikel	50 µm
6	Fractogel EMD SO <sub>3</sub> - (M)	Merck Millipore	160-200 mg/ml Lysozym		quervernetzte PMA + Tentakel	75 µm
7	Fractogel EMD COO- (M)	Merck Millipore	80-120 mg/ml Lysozym		quervernetzte PMA + Tentakel	75 µm
8	Eshmuno S	Merck Millipore	115-165 mg/mL IgG	90 mg/mL mAB	hydrophiles PVE + Tentakel	85 µm
9	S Ceramic HyperD F	Pall		85 mg/mL Lysozym	Gel-in-a-Shell-Partikel	50 µm
10	CM Ceramic HyperD F	Pall		60 mg/mL IgG	Gel-in-a-Shell-Partikel	50 µm
11	Toyopearl SP-650M	Tosoh	40 mg/mL Lysozym		HW65	65 µm
12	Toyopearl CM-650M	Tosoh	40 mg/mL Lysozym		HW65	65 µm

\*mittlerer Partikeldurchmesser



## 5 Experimenteller Teil

Dieses Kapitel behandelt die Durchführung der Versuche in 96-Array-Formaten. Vorangestellt ist eine Zusammenfassung der getätigten Versuche. Zunächst wird die Herstellung der Puffer und deren Eigenschaften beschrieben, sowie die in den Versuchen verwendeten Analysefunktionen zur Konzentrationsbestimmung per UV-Messung und zur Volumenbestimmung. Anschließend erfolgt eine Beschreibung der Versuchsmodule.

Eine Übersicht über die besprochenen Versuche mit Minisäulen und Mikrofilterplatten sowie den genannten Konditionen zeigen Tab. 13 und Tab. 14 (s. S. 35).

### 5.1 Überblick durchgeführter Versuche in 96-Array-Formaten

#### **Allgemeines**

Zur Testung der 96-Array-Tools wurden abwechselnd die Proteine Bovines Serum Albumin (Abk. *BSA*), *Lysozym* oder Protein *B112* in den unterschiedlichen Versuchstypen verwendet. In allen Versuchen wurde mit derselben Anordnung von 12 Resins gearbeitet, entweder vorgepackt in einem Minisäulen-Array von *ATOLL* bzw. in manuell gefüllten Mikrofilterplatten von *Pall* mit jeweils 20  $\mu\text{l}$  oder 50  $\mu\text{l}$  Chromatographiematerial. Da mit reinen Proteinlösungen gearbeitet wurde und die biologische Aktivität für die exemplarische Durchführung der Versuchstypen nicht berücksichtigt werden brauchte war eine einfache quantitative Analytik per UV-Absorption bei 280 nm möglich.

Als Charakterisierungsraum für den pH-Wert wurde der Bereich zwischen pH 3 und 7 als Arbeitsbereich eingegrenzt. Zu Beginn der Versuchsplanung wurde sich dafür entschieden, für die mobile Phase ein einheitliches Puffersystem für den gesamten pH-Bereich zu verwenden. Eine modifizierte Variante des Pufferrezeptes von *Pearse* wurde als qualitativer Faktor in allen Versuchen bei allen pH-Konditionen und Salzkonzentrationen beibehalten. Die Modifizierung betrifft hierbei die Anpassung der Gesamtmolarität von Phosphat und Citrat bei jedem pH-Wert auf 50 mM.

Alle verwendete Proben und Puffer wurden mittels 3 Stocklösungen aus 1 M Citronensäure, 0,4 M Dinatriumphosphat und 5 M Natriumchlorid-Lösung und Wasser konditioniert. Nach dem Vermischen der Lösungskomponenten wurde zunächst der sich ergebende pH-Wert gemessen, anschließend mit Citronensäure bzw. Phosphatstocklösung auf den Sollwert titriert und anschließend die Leitfähigkeit überprüft.

Mit Minisäulen wurden insgesamt 17 Versuche, mit Mikrofilterplatten 9 Versuche durchgeführt wobei einige Versuche geblockt waren (z.B. ein Anbindungsversuch bei 40 Konditionen besteht aus 5 Blöcken, oder die Aufnahme von Durchbruchkurven bestand aus 3 Blöcken).

## Versuche

Für die Minisäulen wurde vor Beginn des ersten Anbindungsversuches ein Performance-Test mit *BSA bei pH 4,5* in allen 96 Säulen durchgeführt. Zur Bewertung der Performance von gepackten Minisäulen und selbst pipettierten Mikrofilterplatten wurde derselbe Anbindungs- und Elutionsversuch in allen 96-Arrayplätzen mit dem Protein *B112* bei pH 5 unter Elution in vier Stufen (50, 100, 150, und 300 mM Natriumchlorid) durchgeführt.

Anbindungsversuche mit insgesamt 40 Konditionen der Protein *B112*-Proben und Elutionsversuche wurden sowohl in Minisäulen als auch Mikrofilterplatten (mit Vakuumfiltration) durchgeführt. Für vergleichende Anbindungsversuche mit Protein *B112* wurden pH-Werte zwischen pH 3 und 7 im Abstand von 0,5 pH-Einheiten sowie Salzkonzentrationen von 0, 50, 100, 150 und 300 mM ausgewählt. Ein weiterer Optimierungsversuch mit dem Protein *B112* wurde bei pH-Werten zwischen pH 4,4 und 5,4 in 0,2 pH-Einheiten mit den Salzstufen 10, 25 und 35 mM in Minisäulen ausgeführt. Damit ergeben sich zunächst 55 Anbindungsbedingungen für Protein *B112*, wobei 40 einem voll-faktoriellen Multi-Level-Design entsprechen und 15 einem Optimierungsversuch in einer zur Anbindung interessanten Region. Zusätzlich wurden noch 8 Kombinationen bei pH 3,6 und 6,4 mit je 44 und 256 mM und pH 4 und 6 mit je 20 und 280 mM Natriumchlorid getestet. Damit war es möglich vier mit *MODDE* erzeugte Versuchsdesigns mit einem voll-faktoriellen Multi-Level-Ansatz bezüglich der Aussagekraft zu vergleichen. Bei den vier Versuchsdesignen handelt es sich um ein *Central Composit Faced Centered*, ein *Central Composit Inscribed*, ein voll-faktorielles mit zwei Leveln ( $2^2$ ) und ein *Doehlert-Design*.

Zur Testung des Elutionsverhaltens in Minisäulen und Mikrofilterplatten wurden pH- Wert konditionierte Proben von Protein *B112* und *Lysozym* eingesetzt und zum Teil mit bis zu 6 Salzstufen bei dem jeweiligen pH-Wert je zweimal eluiert (50, 100, 150, 300, 500 und 1000 mM Natriumchlorid).

Zur Durchführung einer Frontalchromatographie von *Lysozym* mit Minisäulen wurde ein mit *MODDE* erzeugtes L18-Versuchsdesign ausgewählt. Mit diesem konnten verschiedene Kombinationen von drei pH-Werten (pH 5, pH 6 und pH 7), drei *Lysozym*-Konzentrationen (600, 1300 und 2000 µg/ml), drei Salzkonzentrationen (0, 50 und 100 mM Natriumchlorid) sowie drei Rotationsgeschwindigkeiten (500, 750 und 1000 rpm) der Zentrifuge getestet werden.

Die Aufnahme von Adsorptionsisothermen erfolgte für *Lysozym* in Mikrofilterplatten mit 8 verschiedenen Konzentrationen (zwischen 1 und 25 mg/ml *Lysozym*) bei pH 6 und 50 mM Natriumchlorid (Centerpoint des vorigen L18-Versuchsdesigns).

Tab. 13: Versuchsliste Mikrofilterplatten

Protein	Versuchstyp	Konditionen Load	Elution
B112	Chromatographie	8 pH-Werte (3/3,5/4/4,5/5/5,5/6/7)	50/100/150/300/ 500/1000 mM NaCl
B112	Anbindung	0/50/100/150/300 mM NaCl bei 8 pH-Werten (3/3,5/4/4,5/5/5,5/6/7) und 2,5 mg/ml Protein	1 M NaCl, pH 7
B112	Performance	pH 5, 2,5 mg/ml Protein, Elution per Vakuum	1 M NaCl, pH 7
B112	Performance	pH 5, 2,5 mg/ml Protein, Elution per Zentrifugation	1 M NaCl, pH 7
Lysozym	Adsorptionsisotherme	50 mM NaCl, pH 6, 0,6 mg/ml Protein	-

Tab. 14: Versuchsliste Minisäulen

Protein	Versuchstyp	Versuchsbedingungen	Elution
BSA	Performance	pH 4,5, 2,5 mg/ml Protein	1 M NaCl, 0.1/0.5 M NaOH
B112	Anbindung und Elution	8 pH-Werte (3/3,5/4/4,5/5/5,5/6/7), 2,5 mg/ml Protein	50/100/150/300/ 500/1000 mM NaCl
B112	Anbindung	0/50/100/150/300 mM NaCl bei 8 pH-Werten (3/3,5/4/4,5/5/5,5/6/7), 2,5 mg/ml Protein	1 M NaCl, pH 7
Lysozym	Anbindung und Elution	8 pH-Werte (3/3,5/4/4,5/5/5,5/6/7), bei 0,6 mg/ml Lysozym	50/100/150/300/ 500/1000 mM NaCl
Lysozym	Durchbruchskurve	20 Konditionen pH 5/6/7 mit je 0/50/100 mM NaCl	1 M NaCl, pH 7
-	Durchflusstests	300/500/750/1000 rpm, 0/5/10/20/60/120/240 Sekunden Haltezeit	Puffer pH 7 + 300 mM NaCl
B112	Anbindung	10/25/35 mM NaCl, pH 4.4/4.6/4.8/5.2/5.4 bei 2,5 mg/ml Protein	1 M NaCl, pH 7
B112	Anbindung und Elution	8 pH-Werte (3/3,5/4/4,5/5/5,5/6/7), 2,5 mg/ml Protein	50/100/150/300/ 500/1000 mM NaCl
B112	Performance	pH 5, 2,5 mg/ml Protein	1 M NaCl, pH 7

## 5.2 Pufferherstellung

### 5.2.1 Phosphat-Citrat-Puffer

Das verwendete Puffersystem in allen Versuchen war ein modifizierter Phosphat-Citrat-Puffer. Dieses ursprünglich von *Pearse* stammende Rezept für die Mikrobiologie puffert im Bereich von pH 2,2 bis 8. [41]

Er hat jedoch u.a. den Nachteil, dass die Gesamtmolarität mit dem pH-Wert deutlich ansteigt, was für die folgenden Versuche ungeeignet wäre.

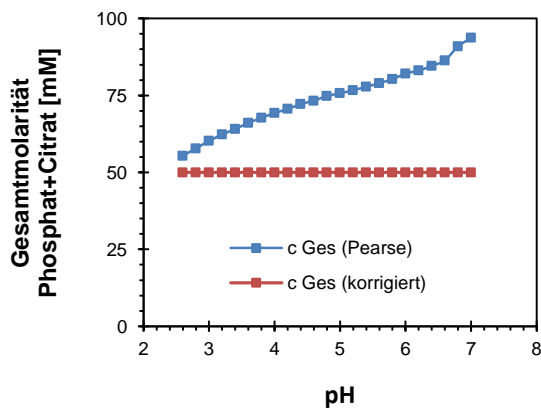


Abb. 1: Korrigiertes Pufferrezept

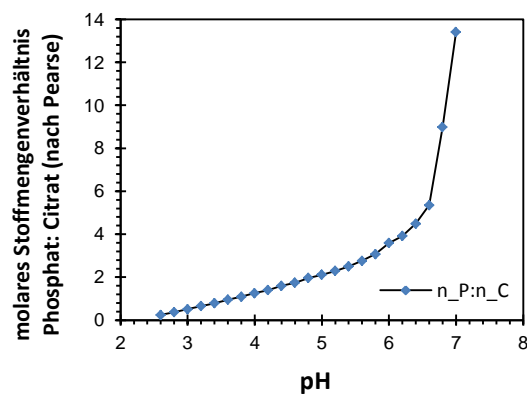


Abb. 2: Pufferrezept nach Pearse

Das von Pearse stammende Pufferrezept unterliegt einer Änderung der Gesamtmolarität mit steigendem pH-Wert. Unter Beibehaltung des molaren Stoffmengenverhältnisses wurde die Gesamtmolarität angepasst und die zur pH-Einstellung notwendigen Stoffmengen auf 50 mM über dem gesamten pH-Bereich skaliert.

Für ein 100 ml Rezept wurde mittels einer kubischen Regressionsrechnung der eingesetzten Stoffmengen zunächst ein volumenunabhängiges Rezept erzeugt und anschließend die molaren Stoffmengenverhältnisse von Phosphat zu Citrat ermittelt. Unter Beibehaltung dieses Stoffmengenverhältnisses wurden die einzusetzenden Stoffmengen für ein 25 ml und ein 250 ml Pufferrezept auf eine Gesamtmolarität von 50 mM skaliert (siehe Abbildung <einfügen>.

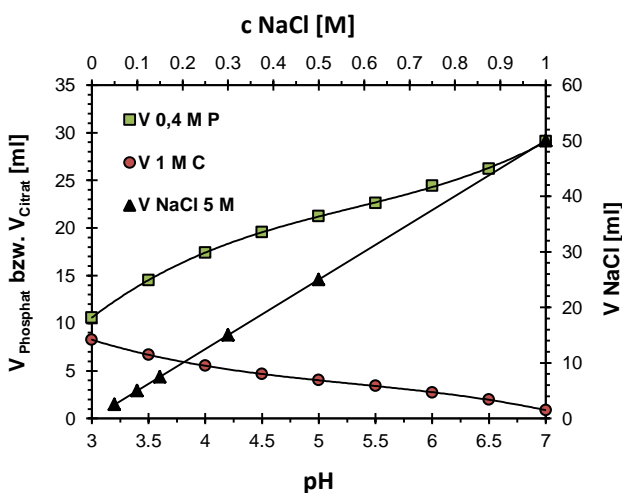


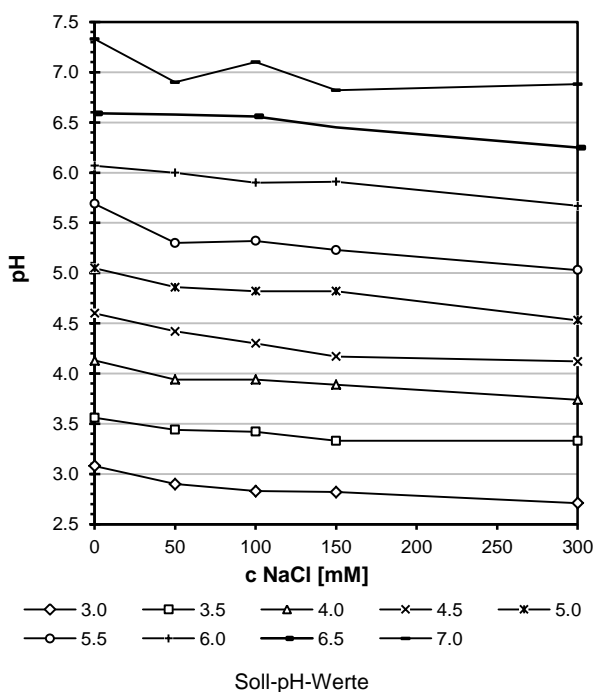
Abb. 3: Pufferrezept für 250 ml

Veranschaulichung des modifizierten Pufferrezeptes des Phosphat-Citrat-Puffers nach Pearse. Zur Herstellung von je 250 ml Puffer für verschiedene pH-Werte und Salzkonzentrationen werden die notwendigen Volumina 0,4 M Dinatriumphosphat, 1 M Citronensäure und 5 M Natriumchlorid pipettiert und mit Wasser auf 250 ml aufgefüllt.

### 5.2.2 pH-Wert und Leitfähigkeit

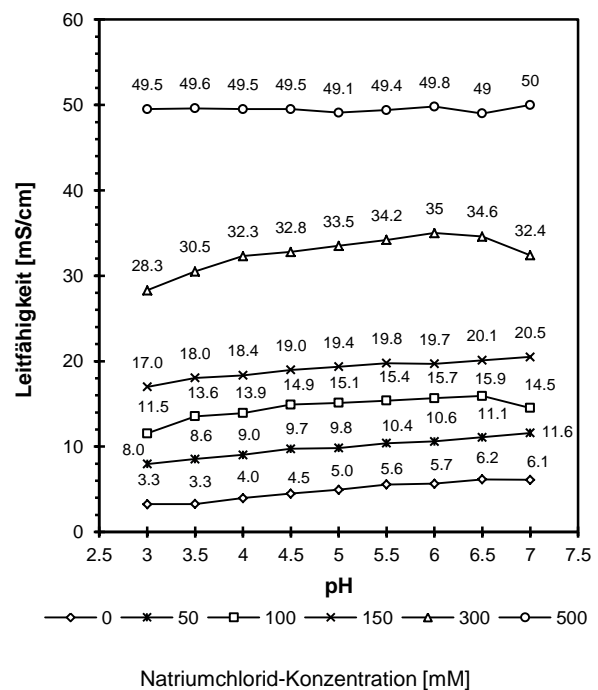
Die zur Pufferherstellung notwendigen Volumina wurden vermischt und anschließend der pH-Wert mit den Stocklösungen auf den Sollwert titriert und die Leitfähigkeit gemessen. Der Sollwert für den pH-Wert ohne Salzzusatz wurde zumeist mit  $\pm 0,2$  pH-Einheiten Abweichung getroffen. Grund hierfür sind wohl Pipettierfehler die sich bei der Citronensäure stärker ausüben dürften, da deren Konzentration größer ist sowie Fehler die aufgrund des kubischen Regressionsmodells entstehen. Mit einem steigendem Salzgehalt konnte beobachtet werden, dass nach dem Zusammenmischen der pH-Wert meist stärker in die negative Richtung vom Sollwert abweicht, was wohl auf die steigende Natriumchlorid-Konzentration zurückzuführen ist. Weiterhin steigt die Leitfähigkeit derselben Salzstufe mit dem pH-Wert bis zu 4 mS/cm an.

Die gleichen Effekte sind in mit diesem Pufferrezept konditionierten Proben aufgetreten (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4: pH-Wert des Puffers nach Zusammenmischen der Stocklösungen**

Das angepasste Pufferrezept liefert annähernd den pH-Sollwert nach Zusammenmischen der Stammlösungen der vom Pearse-Rezept bei dem jeweiligen molaren Stoffmengenverhältnis vorgegeben wurde. Nur geringfügige Zugaben an Citrat-bzw. Phosphat sind notwendig um die im Mittel  $\pm 0,2$ -pH-Einheiten Abweichung vom Sollwert zu korrigieren. Durch Zugabe von Natriumchlorid bei der Herstellung sinkt bei allen Puffern der entstehende pH-Wert bis zu 0,4 pH-Einheiten unter den Sollwert ab, ein Nachkorrektur daher notwendig mit der allerdings weitere Natrium-Ionen über die verwendete Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung eingebracht werden.



**Abb. 5: Leitfähigkeit des Puffers nach pH-Korrektur**

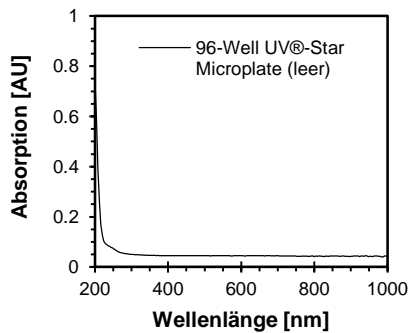
Die Abbildung zeigt die gemessenen Leitfähigkeiten in den Phosphat-Citrat-Puffern mit verschiedenen Salzkonzentrationen nach der pH-Einstellung. Pro Salzstufe ist ein Anstieg der Leitfähigkeit zu beobachten. Die Leitfähigkeit steigt im Mittel um etwa 4 mS/cm von pH 3 bis pH 7. Der Anstieg der Leitfähigkeit zu größeren pH-Werten hin ist auf den größeren Anteil an Phosphatpuffer gegenüber Citrat zurückzuführen. Offensichtlich hat die Erhöhung der Leitfähigkeit durch  $\text{Na}^+$  gegenüber Phosphat über 500 mM Natriumchlorid keinen Einfluss mehr.

### 5.3 Absorptionsmessung

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration in Probenlösungen und Durchfluss- bzw. Filtrationsfraktionen wurde die Absorption bei 280 nm gemessen und der wellbodeneigene Absorptionswert bei 900 nm abgezogen. Zur Volumenbestimmung (s. Kapitel 3.2.1 S. 20) wurde die Absorption von Wasser bei 975 nm verwendet und ebenfalls unter Abzug der Absorption bei 900 nm berechnet.

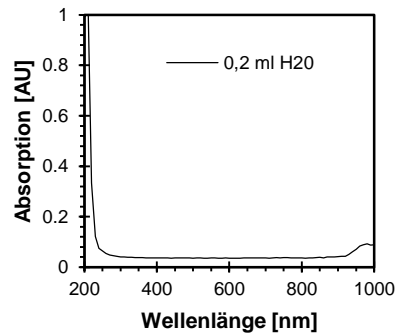
#### 5.3.1 Grundabsorption 96-Well UV®Star Microplates und Wasser

Der wellbodeneigene Absorptionswert zwischen 280-1000 nm einer neuen und leeren 96-Well UV®Star-Platte liegt im Mittel bei  $46 \pm 0,6$  mAU. Bei 280 nm liegt dieser bei  $54,2 \pm 0,4$  mAU, bei 900 nm bei  $43,1 \pm 0,8$  mAU und bei 975 nm bei  $42,9 \pm 0,7$  mAU.



**Abb. 6: Absorptionsspektrum 96-Well UV®Star Microplate**

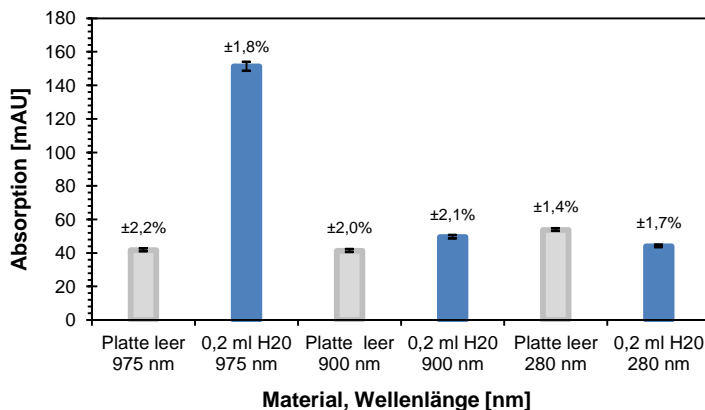
Greiner Platten besitzen nur eine schwache Absorption zwischen 280-1000 nm.



**Abb. 7: Absorptionsspektrum 0,2 ml Wasser in 96-Well UV®Star Microplate**

Das Spektrum von Wasser unterscheidet sich durch eine typische Absorptionsbande um 975 nm.

Mit 200 µl Wasser oder Phosphat-Citrat-Puffer gefüllte Wells zeigen hinsichtlich der Absorptionswerte einige Besonderheiten. In derselben UV-Platte erniedrigen Wasser sowie Phosphat-Citrat-Puffer den Absorptionswert bei 280 nm auf  $44,0 \pm 0,7$  mAU, während bei 900 nm eine geringe Erhöhung auf  $49,1 \pm 1,1$  mAU gemessen wurde. Die typische Wasserabsorptionsbande um 975 nm wird zudem zur Volumenbestimmung in Wells genutzt.



**Abb. 8: Vergleich der Absorption der leeren Platte mit 0,2 ml Wasser**

Der Wasserabsorptionswert verändert sich nur unwesentlich bei 280 und 900 nm. Die Eigenabsorption von Wasser bei 975 nm wird zur Volumenbestimmung verwendet. Wiederholungsmessungen in 96-Wellen ergeben eine mittlere Abweichung von  $\pm 1,9$  % vom jeweiligen Messwert.

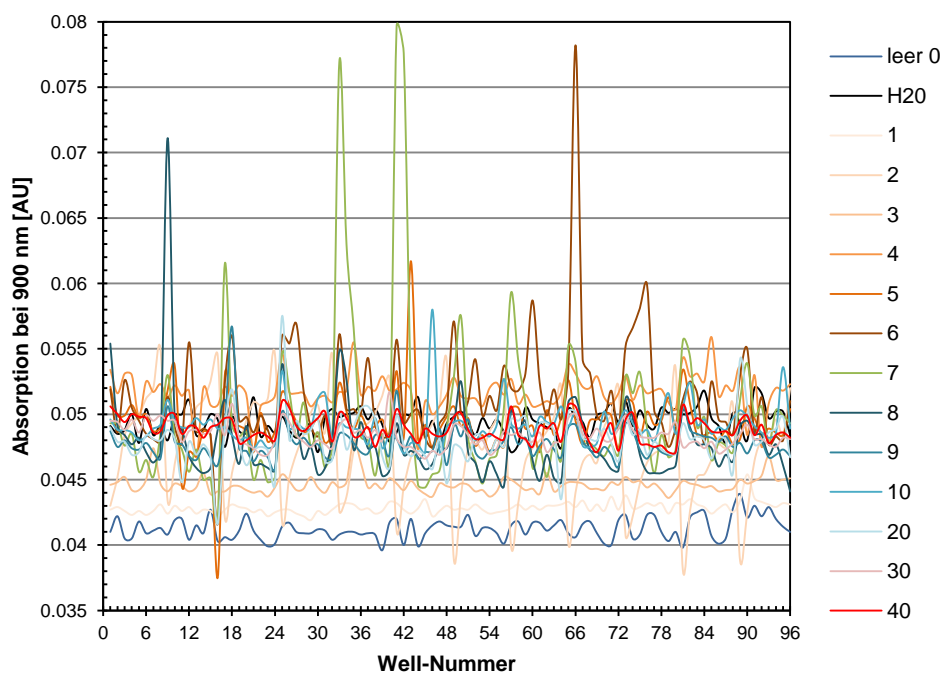
### 5.3.2 Mehrfachverwendung von 96-Well UV<sup>®</sup>Star-Microplates

In den später beschriebenen Versuchsreihen wurden zehn UV<sup>®</sup>Star-Platten mehrfach verwendet. Diese haben einen besonders dünnen und UV-durchlässigen Boden. Es wurden insgesamt 404 Einzelplattenmessungen vorgenommen. Nicht alle Daten sind für die später folgenden Darstellungen eingeflossen (z.B. Messung von Spülfractionen und Plattenleerwerten).

Zwischen den einzelnen Anwendungen der Platten wurden diese mit voll-entsalztem Wasser gespült und an der Luft getrocknet und vor der Benutzung an der Unterseite gesäubert.

Um sicherzustellen und um zu zeigen das die Mehrfachverwendung der Platten möglich ist, wurden vor den ersten Verwendungen der Platten die Absorptionswerte bei 280, 900 und 975 nm sowohl leer als auch mit Puffer vermessen. Ziel war zu überprüfen, ob Protein an der Plastik der Wells adsorbiert bzw. ob durch die Verwendung Schäden am Wellboden auftreten die bei Absorptionsmessungen zu Fehlern führen.

Auch nach mehrstündigen Standzeiten mit Elutionsfraktionen und 0,1 M Natronlauge konnte nach dem Spülen keine Adsorption bzw. Desorption von Protein festgestellt werden.



**Abb. 9: 900 nm Absorptionswerte einer 96-Well UV<sup>®</sup>Star-Microplate über 40 Verwendungen**

Bei Probenmessungen wird der 900 nm Wert vom 280 nm und 975 nm-Wert abgezogen um die wellbodeneigene Absorption zu berücksichtigen. Die Abbildung zeigt 900 nm-Absorptionswerte für 40 Verwendungen derselben UV-Platte. Deutliche Ausreißer dürften von Beschädigungen (Kratzer), Fingerabdrücken, Schmutzpartikel sowie durch sich bildendes Kondensat übereinander gestapelter Wellplatten an der Unterseite der Wells verursacht werden. Auch ist denkbar das während des Versuchs in die Lösungen eingebrachte Partikel das 900 nm Signal stören. Auch konnte mehrfach beobachtet werden, das Luftbläschen und Schaumbildung in den Wells das Absorptionssignal stören, vermutlich durch Streuung an der Phasengrenzfläche zwischen Luft und Flüssigkeit.

### 5.3.3 Protein-Absorptionsspektren

Um sicherzustellen dass die Modelproteine im nahen Infraroten Bereich keine Absorption aufweisen wurden deren Spektren aufgenommen.

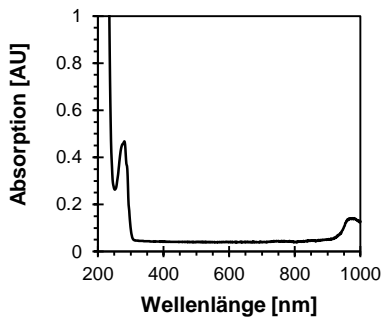


Abb. 10: BSA

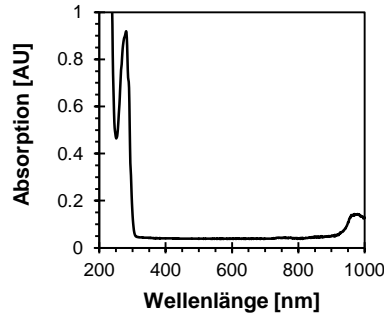


Abb. 11: Lysozym

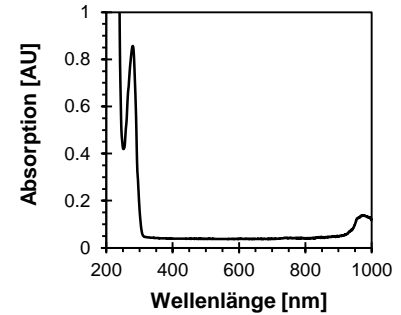


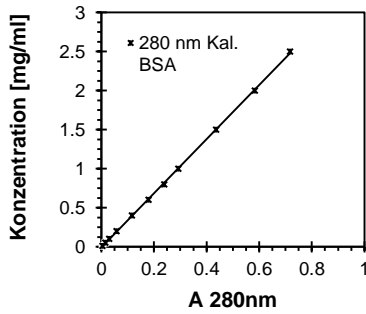
Abb. 12: Protein B112

#### Abb. 10, Abb. 11 und Abb. 12: Protein-Absorptionsspektren

Absorptionsspektren in 96-Well UV<sup>®</sup>Star-Platten von je 200 µl Proteinlösung von 0,8 mg/ml Lysozym (pH 7), bzw. 1,6 mg/ml BSA (pH 4,5) und Protein B112-Bulklösung (quantifiziert gegen BSA zu 2,7 mg/ml bei pH 4). Die drei Proteinlösungen zeigen keine weiteren Absorptionsbanden im gemessenen Wellenlängenbereich.

### 5.3.4 Analysenfunktionen Proteinkonzentration

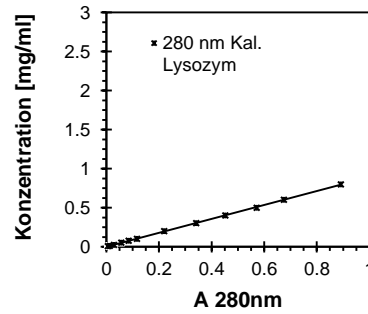
Die UV-Kalibrierung der Proteine wurde mit je 200 µl Lösung mit ansteigender Proteinkonzentration vorgenommen. Die erhaltenen Analysenfunktionen wurden bei allen Versuchen mit dem jeweiligen Protein verwendet.



$$c_{BSA} = 3,467 \cdot A_{280} - 0,010$$

$$R^2 = 0,9995$$

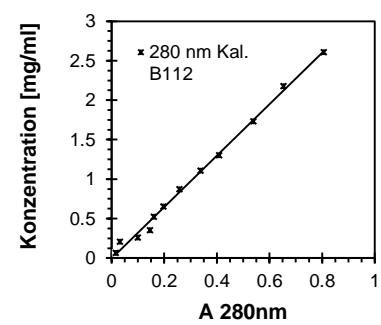
Abb. 13: BSA



$$c_{LSZ} = 0,892 \cdot A_{280} - 0,002$$

$$R^2 = 0,9998$$

Abb. 14: Lysozym



$$c_{B112} = 3,254 \cdot A_{280} - 0,004$$

$$R^2 = 0,995$$

Abb. 15: Protein B112

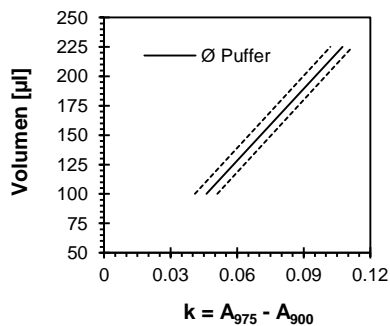
#### Analysenfunktionen der Proteine zur Konzentrationsbestimmung

Gezeigt sind für die drei verwendeten Proteine die UV-Analysenfunktionen unterhalb von 1 AU. Der steilere Anstieg von BSA gegenüber Lysozym ermöglicht höhere Konzentrationen bei vergleichsweise niedrigen Absorptionen. Die Kalibrierung mit den Standardlösungen wurde für jede Konzentrationsstufe in 200 µl Volumen gefüllten 96-Well UV<sup>®</sup>Star-Platten vorgenommen. BSA und Lysozym wurden eingewogen und aus einer Stammlösung entsprechend verdünnt. Protein B112 das gelöst in einer Bulk-Lösung vorlag wurde ebenfalls entsprechend verdünnt und gegen BSA quantifiziert.



## 5.4 Volumenbestimmung in Wells

Die Kalibrierung von Volumenbestimmungsfunktionen wurde in Kapitel 3.2.1 (s. S. 20) beschrieben. Die Ergebnisse der Kalibrierfunktionen für je 100-225  $\mu\text{l}$  Wasser und vier Lösungssysteme (Phosphat-Citrat-Puffer sowie *BSA*-, *Lysozym*- und Protein *B112*-Pufferlösungen in den Stocklösungen mit den Konditionsbedingungen bei 8 pH-Werten ohne Natriumchlorid sowie für Phosphat-Citrat-Puffer und Protein *B112* mit 50, 100, 150, und 300 mM Natriumchlorid) zeigen die folgenden Abbildungen. Wie erwartet rufen die verschiedenen pH-Werte, Salzkonzentrationen und Proteine einen unterschiedlichen Meniskus hervor wodurch die durchstrahlte Schichthöhe der Flüssigkeit in den Wells bei der Absorptionsmessung entsprechend variiert wird. Für die Versuche wird die mittlere Kalibrierfunktion des jeweiligen Proteins verwendet.

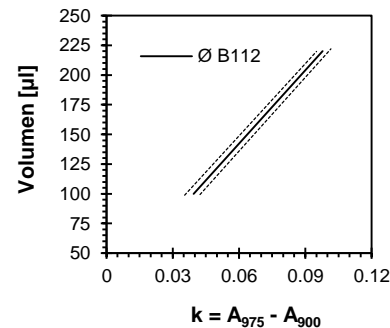


$$k = A_{975} - A_{900}$$

$$V = 2036.4 \cdot k + 6.1$$

Abweichung:  $\pm 10.3 \mu\text{l}$

**Abb. 16: Puffer**

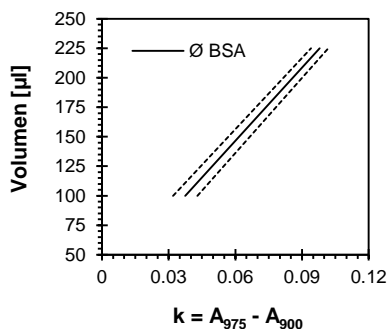


$$k = A_{975} - A_{900}$$

$$V = 2054.7 \cdot k + 18.9$$

Abweichung:  $\pm 6.0 \mu\text{l}$

**Abb. 18: Protein *B112***

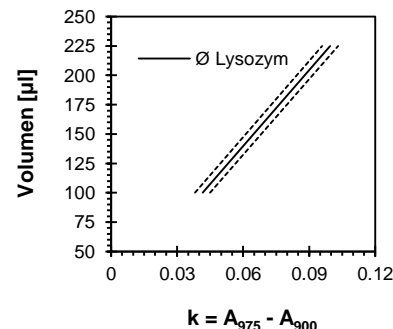


$$k = A_{975} - A_{900}$$

$$V = 2069.1 \cdot k + 22.4$$

Abweichung:  $\pm 10.0 \mu\text{l}$

**Abb. 17: *BSA***



$$k = A_{975} - A_{900}$$

$$V = 2158.6 \cdot k + 10.3$$

Abweichung:  $\pm 6.9 \mu\text{l}$

**Abb. 19: *Lysozym***

### Abb. 16, Abb. 17, Abb. 18 und Abb. 19: Analysenfunktionen zur Volumenbestimmung

Analysenfunktionen zur Volumenbestimmung in 96-Wellkammern wurden ermittelt in multifaktoriellen Messreihen mit Volumina zwischen 100 und 225  $\mu\text{l}$  sowie variierenden Konzentrationen an Protein und Natriumchlorid sowie verschiedenen pH-Werten. In den Versuchen wird jeweils die gemittelte Funktion aus allen bei unterschiedlichen Konditionen aufgenommenen Werten verwendet. Die gestrichelte Linie um die Mittelwertfunktion zeigt den Bereich der aufgenommenen Messwerte. Die angegebene Abweichung entspricht dem mittleren Fehler für eine Sollabsorption von 200  $\mu\text{l}$  unter Verwendung der Trendlinien für die äußeren Grenzen um die Mittelwertfunktion.

## 5.5 Performance-Tests

Performance Tests dienen zum einem dem Vergleich des Verhaltens von je 8 gleichen Minisäulen bzw. gleich gefüllten Mikrofilterplatten eines Arrays, sollen aber auch eine Beurteilung des Langzeitverhaltens der Minisäulen ermöglichen.

Der erste Versuch überhaupt in allen 96-Minisäulen war ein Performance-Test mit *BSA* bei pH 4,5 und 2,5 mg/ml *BSA* sowie 3,6 mS/cm in der Probenlösung. Nach erfolgter Anbindung wurde *BSA* mit 1 M NaCl und 0,1 M Natronlauge gespült. Nach 16 Versuchen mit den Minisäulen wurde ein ähnlicher Anbindungs- und Elutionsversuch allerdings mit *B112* bei pH 5 und 2,5 mg/ml Protein unter Elution in 6 Salzstufen (50, 100, 150, 300, 500 und 1000 mM Natriumchlorid) durchgeführt. Zwei Anbindungs- und Elutionsversuche mit denselben Lösungen allerdings nur bis zu 300 mM Natriumchlorid sind auch in Mikrofilterplatten sowohl unter Vakuumfiltration als auch Filtration per Zentrifugation ausgeführt wurden.

In der Vorbereitung wurden zunächst Probenlösungen hergestellt und diese sowie die für den jeweiligen Versuch geplanten Puffer in 24xWellplatten pipettiert, anschließend die Resins konditioniert und der Anbindungs- und Elutionsversuch ausgeführt. Nur die relevanten Fraktionen ab dem Probenauftrag wurden zur Analytik in entsprechenden Platten aufgefangen und UV280 vermessen.

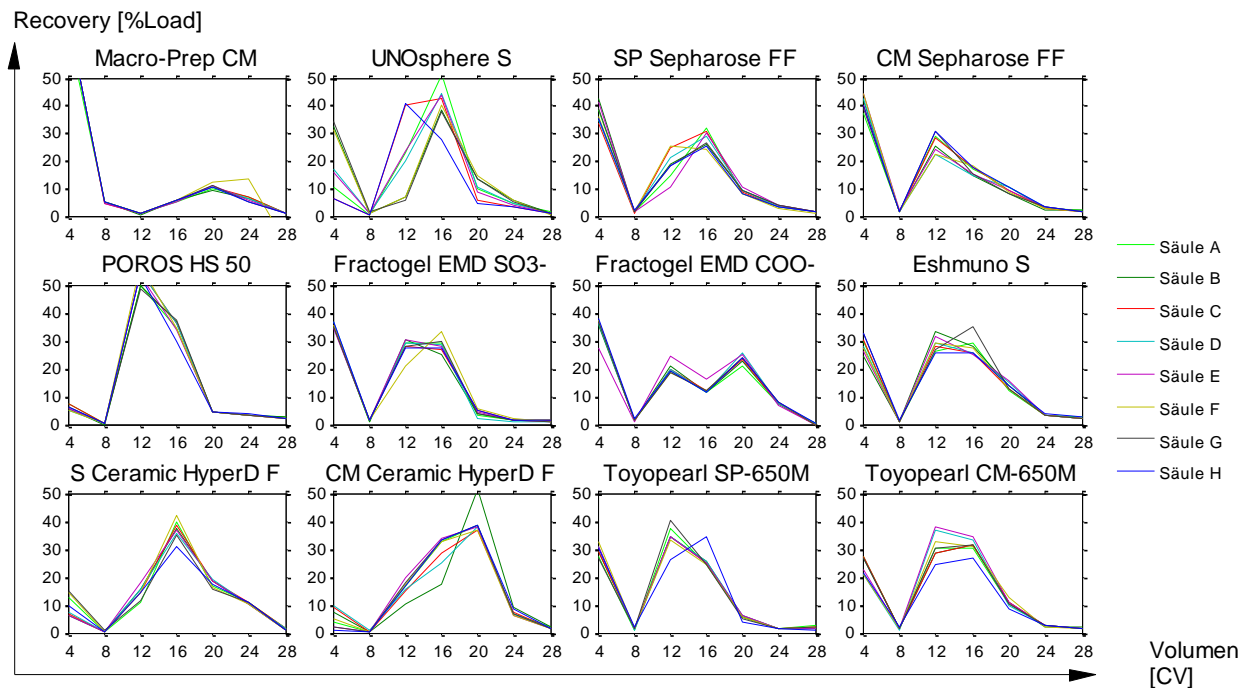
Da alle Säulen eines Resins gleich behandelt wurden ist zunächst zu erwarten, dass die Wiederfindung der Proteinmasse in den einzelnen Fraktionen eines Resins identisch ist. Als Wiederfindung wird hierbei die auf die Masse an Protein im Probenauftrag bezogene Masse in einer Fraktion verstanden (Recovery [%Load]). Die Summierung aller Wiederfindungen eines Versuches ergibt die Gesamtwiederfindung und sollte 100 % betragen wenn alles Protein eluiert werden kann.

### 5.5.1 Performance-Test #1 mit *BSA* in Minisäulen

Die einzelnen Versuchsschritte nach Proben- und Puffervorbereitung für den *BSA*-Performance-Test sind in nachfolgender Tabelle gezeigt. Die Zentrifuge zum Fluss der mobilen Phasen wurde in allen Schritten bei 500 rpm und 2 Minuten Laufzeit betrieben.

**Tab. 15: Versuchsablauf Performance Test #1 in Minisäulen mit *BSA***

Schritt	Anzahl	Bezeichnung	UV-Messung	Volumen im Plot [ $\mu$ l]
1 Entfernung der Lagerlösung	3x	H2O		
2 Pre-Equilibrieren	3x	pH 4,5		
3 Regeneration	3x	pH 4,5 + 0,5 M NaCl		
4 Equilibrieren	3x	pH 4,5		
5 Probenauftrag	1x	Flowthrough	x	4
6 Waschschrift	1x	Wash	x	8
7 100 %-Stufe	2x	1 M NaCl	x	12, 16
8 CIP	2x	0,1 M NaOH	x	20, 24
9 Lagerlösung	1x	0,02 M NaOH	x	28



**Abb. 20: Pseudochromatogramm Performance-Test #1 in Minisäulen mit BSA bei pH 4,5 und 2,5 mg/ml Load**

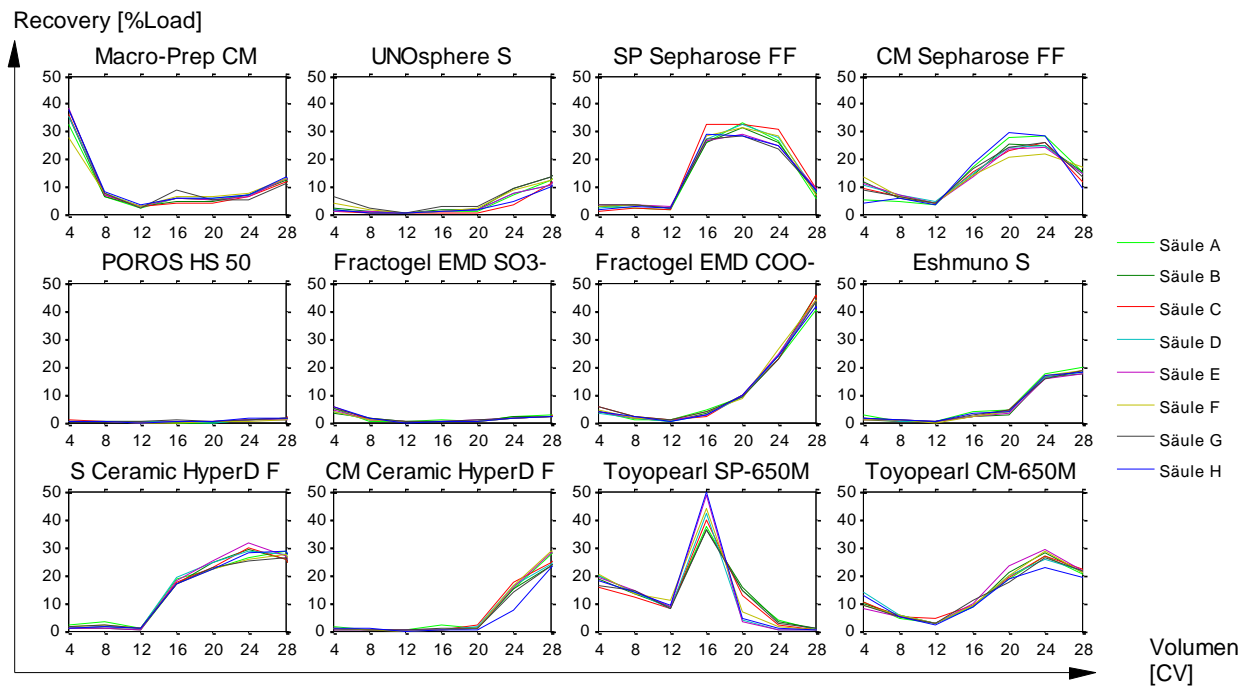
Die Wiederfindungen der einzelnen aufgefundenen Fraktionen für alle 12 Resins und deren 8 Säulen sind in dieser Abbildung verschiedenfarbig übereinander gelegt. Nur an den gekennzeichneten Volumenwerten sind Datenpunkte vorhanden. Zwischen zwei benachbarten Werten wird in dieser Liniendiagrammdarstellung linear interpoliert und somit ein Pseudochromatogramm erzeugt. Die mittlere Gesamt-Wiederfindung dieses Versuches beträgt  $99,9 \pm 4,7$  %. Besonders für einige UNOsphere S Säulen sind Unregelmäßigkeiten (auch in späteren Versuchen immer wieder) aufgetreten.

### 5.5.2 Performance Test #2 mit Protein B112 in Minisäulen

Der zweite Performance-Test wurde nach 15 weiteren Versuchen in Minisäulen mit Protein B112 bei pH 5 sowie 2,5 mg/ml Protein und 4,4 mS/cm durchgeführt. Die einzelnen Versuchsschritte nach Proben- und Puffervorbereitung sind in nachfolgender Tabelle gezeigt. Die Zentrifuge wurde in allen Schritten bei 500 rpm und 2 Minuten Laufzeit betrieben.

**Tab. 16: Versuchsablauf Performance Test #2 mit Minisäulen und Protein B112**

Schritt	Anzahl	Bezeichnung	UV-Messung	Volumen im Plot [CV]
1	3x	H2O		
3	2x	pH 4,5 + 0,5 M NaCl		
4	3x	pH 4,5		
5	1x	Durchflussfraktion	x	4
6	2x	ungebundenes Protein	x	8, 12
7	2x	50 mM NaCl	x	16, 20
8	2x	100 mM NaCl	x	24, 28
9	2x	150 mM NaCl	x	32, 36
10	2x	300 mM NaCl	x	40
11	2x	500 mM NaCl	x	
12	2x	1 M NaCl	x	
13	4x	1 M NaCl pH 7	x	
14	2x	pH 7		
15	2x	20%Ethanol + 0,1 M NaCl		



**Abb. 21: Pseudochromatogramm Performance-Test #2 in Minisäulen mit Protein *B112* (pH 5 und 2,4 mg/ml)**

In dieser Abbildung ist die Überlagerung der einzelnen Wiederfindungen in den Minisäulen für Protein *B112* in den Elutionsfraktionen bis zu einem Volumen von 40 CV die auf die Säulen appliziert wurden gezeigt. Dem eigentlichen Anbindungsversuch folgte eine Elution mit 6 Salzstufen in je zwei Schritten. Grund hierfür ist eine bessere Vergleichbarkeit zu den folgenden beiden Performance-Tests in Mikrofilterplatten (bei denen nach der ersten 300 mM Elutionsstufe abgebrochen wurde). Zuzüglich der nicht gezeigten Fraktionen beträgt die Gesamtwiederfindung hier  $94,2 \pm 8,5 \%$ .

### 5.5.3 Performance-Test #3 und #4 mit Protein *B112* in Mikrofilterplatten

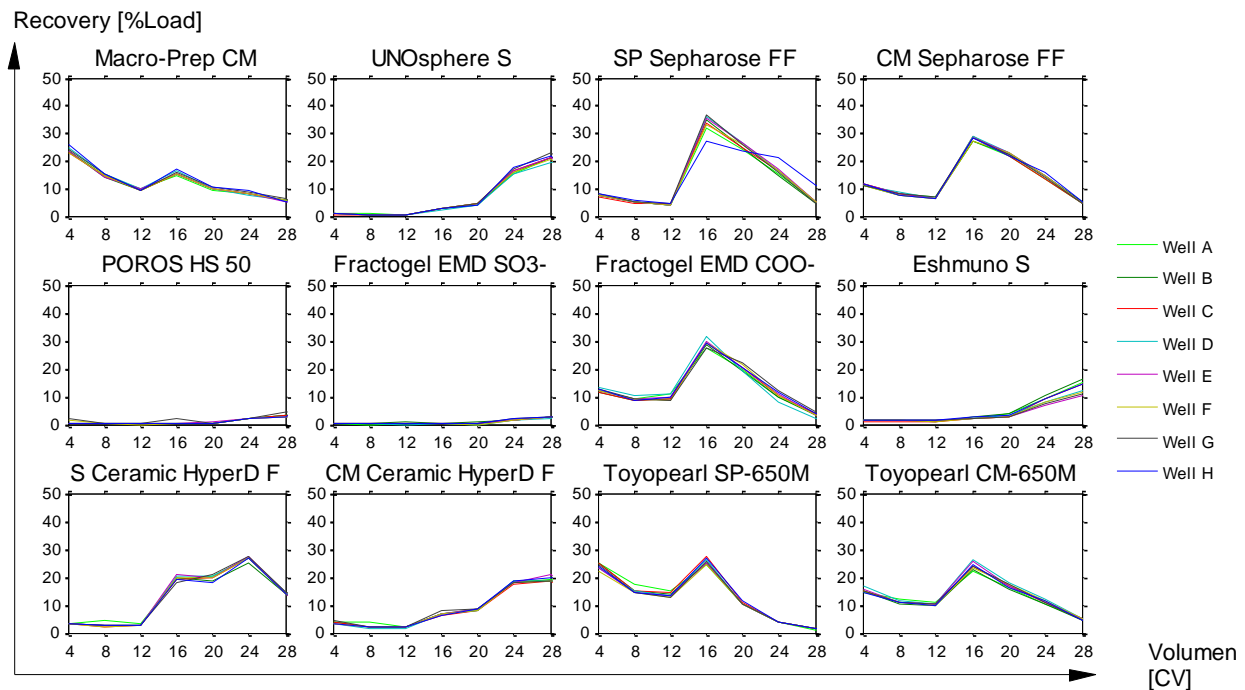
In Batch-Adsorptionsversuchen stehen zwei Techniken für die Filtration von Lösungen zur Verfügung. Ziel ist auch herauszufinden ob Filtration oder Zentrifugation besser zur Filtration geeignet ist.

Mit einer Schüttelzeit von jeweils 3 Minuten bei 1200 rpm für die Equilibrierung usw. sowie einer Inkubationsschüttelzeit von 1 Stunde unter Verwendung der gleichen Lösungen wie im vorigen Performance-Test für die Minisäulen (allerdings nur bis zur ersten 300 mM Salzstufe) ist zudem ein direkter Vergleich möglich.

Nach jeder Filtration wurde die Unterseite der Mikrofilterplatten genauestens begutachtet. *Pall* selbst gibt in den Herstellerspezifikationen ein gewisses Rückhaltevolumen für die unterschiedlichen Filtrationssysteme an.

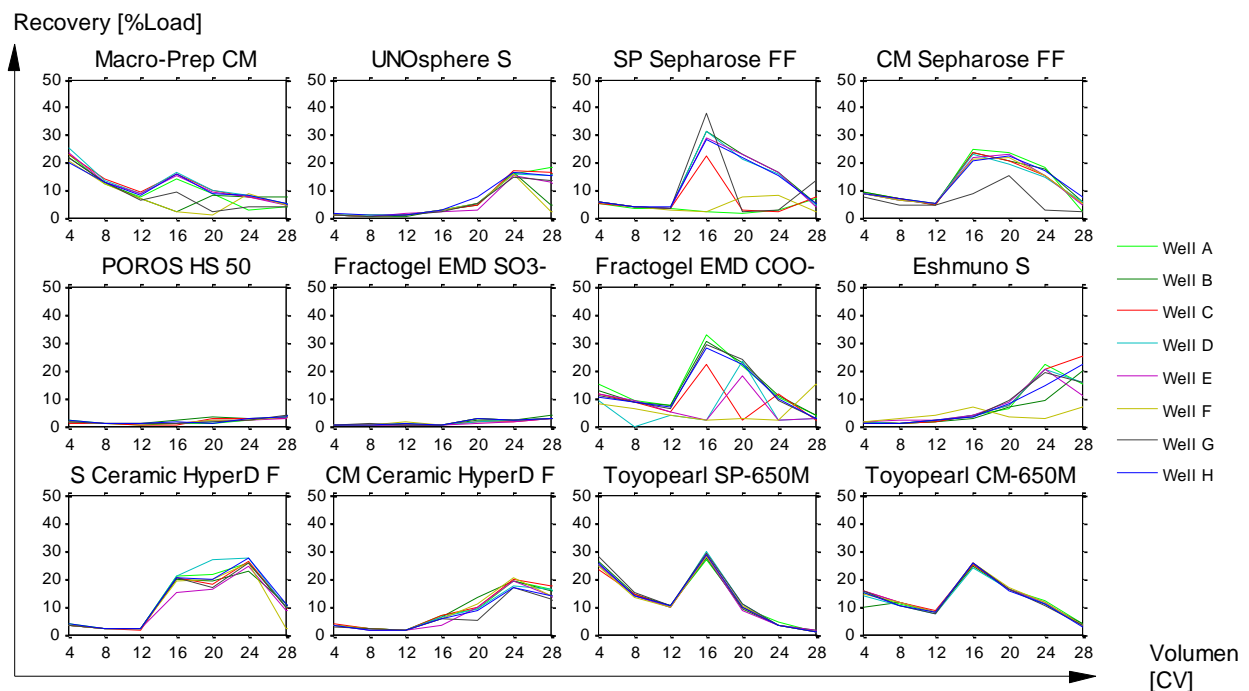
In Performance-Test #3 wurde per Zentrifugation bei 500 rpm für eine Minute die Filtration ausgeführt.

In Performance-Test #4 wurde per Vakuummanifold anfangs bei 300 mbar für 10 Sekunden, ab der 3. Salzstufe mit 500 mbar für 30 Sekunden und dann für 60 Sekunden versucht die Lösungen abzusaugen.



**Abb. 22: Pseudochromatogramm Performance-Test #3 in einer Mikrofilterplatte mit Zentrifugation**

Anbindungsversuch mit Protein *B112* bei pH 5 und 2,4 mg/ml und Elution in 4 Salzstufen. Filtration erfolgte per Zentrifugation bei 500 rpm für eine Minute. Rückstände von Elutionslösungen am Mikrofilterplattenboden wurden bei den 19 ausgeführten Zentrifugationen praktisch nicht beobachtet. Verglichen mit Minisäulen ist die Performance bei diesem Versuch sogar noch besser. Die Gesamtwiederfindung inklusive der 4ten Salzstufe liegt für alle Resins im Mittel bei 92,2 % ± 10,6 %. Es ist zu erwarten das weitere Elutionsstufen ohne weiteres möglich gewesen wären.



**Abb. 23: Pseudochromatogramm Performance-Test #4 in einer Mikrofilterplatte und Vakuumfiltration**

Anbindungsversuch mit Protein *B112* bei pH 5 und 2,4 mg/ml Load sowie Elution in 4 Salzstufen. Filtration erfolgte per Vakuummanifold. Ab der 4ten Fraktion nach dem Probenauftrag wurden bis zu 50 µl Große Tropfen am Mikrofilterboden verteilt im mittleren Teil des Arrays beobachtet. Zudem ist der Durchfluss in einigen Wells immer stärker gehemmt und nur durch Erhöhung auf 500 mbar und Verlängerung auf 30-60 Sekunden, letztlich aber kaum noch möglich. Die Gesamtwiederfindung bis zur 4ten Salzstufe liegt im Mittel für alle Resins bei 73,9 ± 20,0 %.

## 5.6 Modul 1: Anbindungsversuche

Ziel von Anbindungsversuchen ist es herauszufinden ob prinzipiell eine Retention eines Proteins oder einer abzutrennenden Verunreinigung unter bestimmten Bedingungen an einem Chromatographiematerial möglich ist. Dafür ist eine Auswahl unterschiedlicher Konditionen der Zusammensetzung einer Probenauftragslösung auszutesten. In jedem Fall sind die üblichen Schritte zur Vorbereitung der zur Chromatographie eingesetzten Materialien vorzunehmen (Regenerieren, Equilibrieren und Einstellen der Probenlösungen auf die jeweiligen Konditionen).

In verschiedensten Artikeln und auch Applikationsbeschreibungen sind Anbindungsversuche sowohl in Mikrofilterplatten als auch Minisäulen beschrieben wurden (s. S. 10). Es sind verschiedene Versuchsdesigns für die Kombination von Faktoren anzutreffen. Es stellt sich die Frage ob ein 96-Array-Minisäulenversuch oder ein 96-Array-Mikrofilterplattenversuch bezüglich praktischer und kostenmäßiger Aspekte eher geeignet ist. Versuche mit identischem Ablauf bezüglich der verwendeten Resins, Proben und Lösungen wurden dazu durchgeführt.

### **Faktoren und Charakterisierungsraum für Anbindungsversuche**

Für Anbindungsversuche mit 12 Resins wurde der Versuchsumfang auf zwei quantitative Faktoren (pH-Wert und Salzkonzentration) festgelegt. Betrachtet man für einen Versuch ein einzelnes Resin, dann entspricht die Resinart einem qualitativen, konstanten Faktor. Ebenso wurde das Puffersystem mit 50 mM Phosphat-Citrat-Puffer als quantitativer Faktor in allen Versuchen festgesetzt. Es sind durchaus auch Screening-Versuche zur Auswahl eines besser geeigneten Puffersystems planbar und durchführbar, genauso auch Versuche die z.B. die Molarität des Puffersystems optimieren.

Für Protein *B112* wurde der pH-Bereich zwischen pH 3-7 sowie die Salzkonzentration zwischen 0-300 mM Natriumchlorid ausgewählt.

#### **5.6.1 Versuchs-Designs für Anbindungsversuche**

Mit Anbindungsversuchen in Minisäulen wurden zwei Ziele verfolgt. Einerseits sollten verschiedene mit *MODDE* erzeugte Versuchsdesigns in dem genannten Charakterisierungsraum bezüglich der Aussagekraft mit einem voll-faktoriellen Multi-Level-Ansatz verglichen werden und weiterhin ein Optimierungsversuch das Anbindungsverhalten von Protein *B112* in einer für die Anbindung und Elution interessanten Parameterregion mit kleineren Abständen der pH-Werte und der Salzkonzentration charakterisieren.

Bei den vier Versuchsdesigns handelt es sich um ein *Central Composit Inscribed*, ein *Central Composit Face Centered*, ein voll-faktorielles mit zwei Leveln ( $2^2$ ) und ein *Doehlert-Design*. Ein Problem einiger der genannten Versuchsdesigns ist, das sie mitunter mehr Läufe erfordern als in einem Block mit einem 96-Array Format und 12 Resins durchführbar ist. Zudem haben einige Versuchsdesigns Faktorkombinationen gemeinsam. Insgesamt wurden somit in 6 Blöcken alle für die Modellierung notwendigen Faktorkombinationen erfasst.

---

### 5.6.2 Allgemeines Arbeitsprotokoll Anbindungsversuche

Einige Versuchsdesigne erfordern eine entsprechend umfassendere Vorbereitung zur Herstellung von Puffern und dem Konditionieren von Probenlösungen. In jedem Fall wird die Leitfähigkeit nach Anpassung der jeweiligen Lösung auf den Soll-pH-Wert gemessen. Minisäulen als auch manuell gefüllte Mikrofilterplatten wurden entsprechend des üblichen Chromatographieablaufs vorbereitet. Nach der Durchflussfraktion wird zweimal mit Equilibrierungspuffer gewaschen.

Danach erfolgte für alle Minisäulen noch mehrmals eine Spülung mit 1 M NaCl bei pH 7 da gerade bei niedrigen pH-Werte einige Resins eine starke Anbindung aufweisen.

Alle fünf zuvor genannten Versuchsdesigne wurden in Minisäulen mit Protein *B112* bei etwa 2,5 mg/ml Konzentration und den jeweils angegebenen Konditionen im Probenauftrag durchgeführt. Mit Mikrofilterplatten wurde nur das voll-faktorielle Multilevel-Design ausgeführt.

**Tab. 17: Versuchsablauf Anbindungsversuch mit Minisäulen und Protein *B112* (ca. 2,5 mg/ml)**

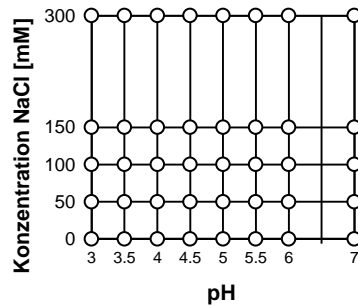
Schritt	Anzahl	Bezeichnung	UV-Messung	
1	Entfernung der Lagerlösung	2x	H2O	
2	Regeneration	2x	pH (*)+ 0,5 M NaCl	
3	Equilibrieren	3x	pH (*)+ (*) NaCl	
4	Probenauftrag	1x	Durchflussfraktion	x
5	Waschschritt	2x	Ungebundenes Protein	x
6	Spülen	4x	1 M NaCl pH 7	
7	Spülen	2x	pH 7	(x)
8	Lagerlösung	2x	20 % Ethanol + 0,1 M NaCl	

(\*) steht für das jeweilige Level laut Versuchsdesign

(x) nur in Minisäulen zur Kontrolle des UV-Signals nach dem Spülvorgang

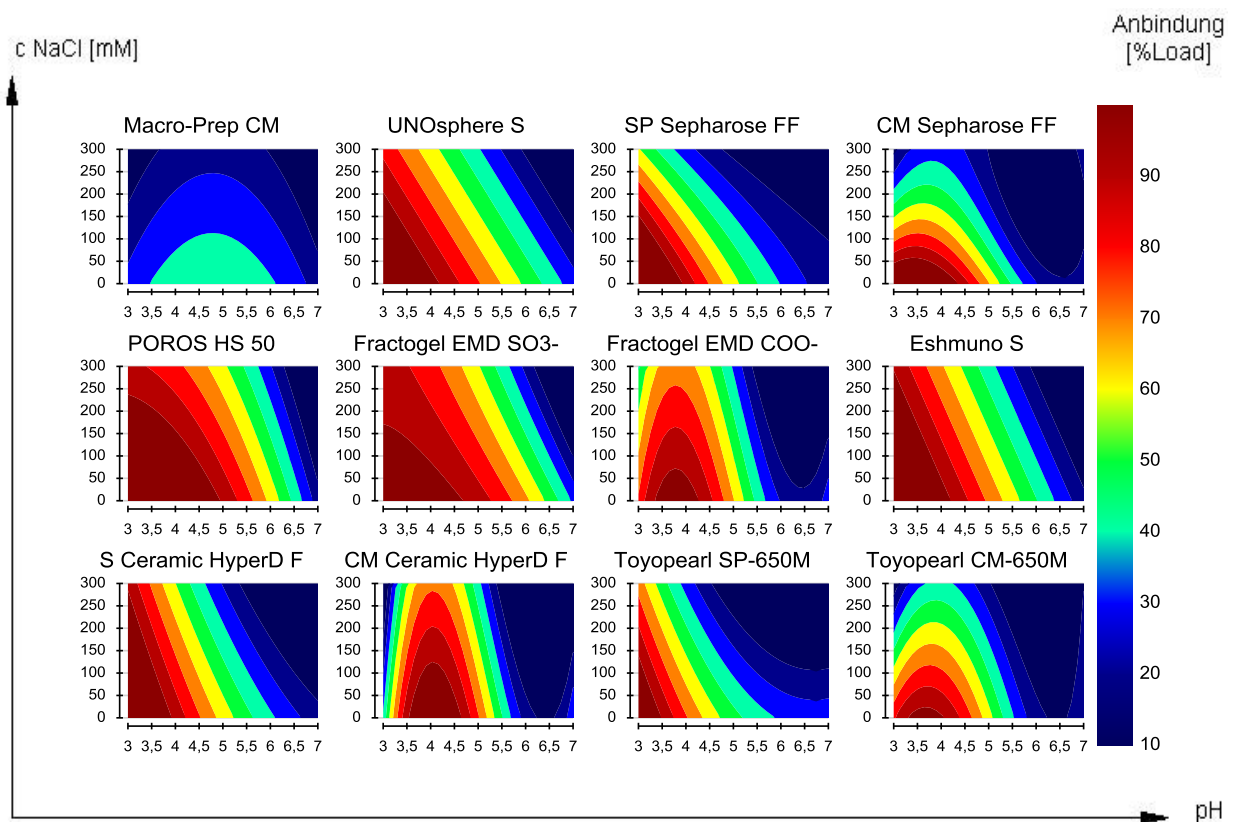
### 5.6.3 Voll-faktorielles Multi-Level-Design

Der umfangreichste Versuchsansatz in Minisäulen und Mikrofilterplatten entspricht einem voll-faktoriellen Versuchsdesign (Abk. MLD) in dem mehrere Kombinationen der Faktoren im Charakterisierungsraum ausgetestet werden.



**Abb. 24: erweitertes voll-faktorielles Multilevel-Design (MLD)**

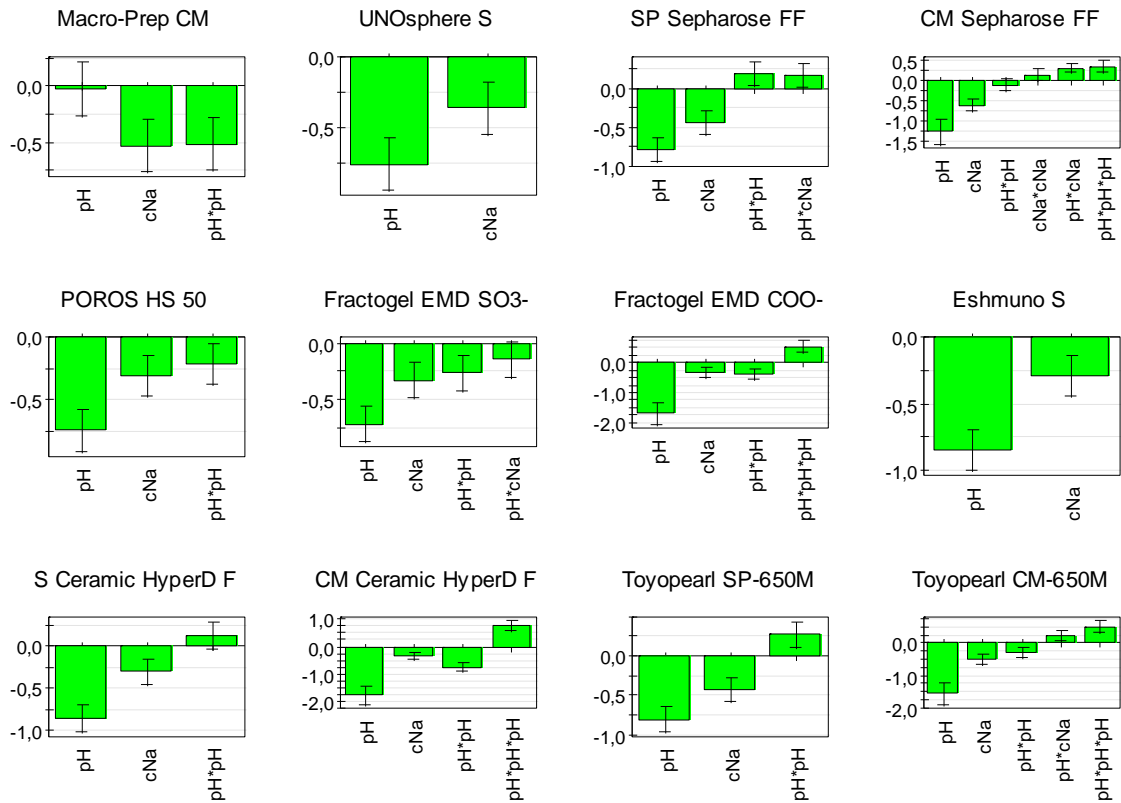
Dieses Design ermöglicht die Kombination von 8 pH Werten und 5 Salzkonzentrationen mit einer resultierenden Anzahl von 40 Experimenten für jedes Resin. Bezüglich eines jeden Resins sind pro Versuchsblock 8 Punkte des Charakterisierungsraumes möglich daher, wird der Versuch in 5 Blöcken ausgeführt. Da die Resins Spaltenweise auf dem Versuchsarray angeordnet sind wird jeweils zeilenweise dieselbe Kondition in Probenlösungen eingestellt. Jeder Block entspricht also einer Salzkonzentration bei jeweils 8 pH-Werten. Um den Bereich zwischen pH 3- 7 in Versuchen abzudecken aber nur 8 Plätze pro Array pro Resins zu Verfügung stehen, wird pH 6,5 weglassen.



**Abb. 25: MODDE-Kontourplot: MLD (Anbindungsversuch in Minisäulen mit Protein B112)**

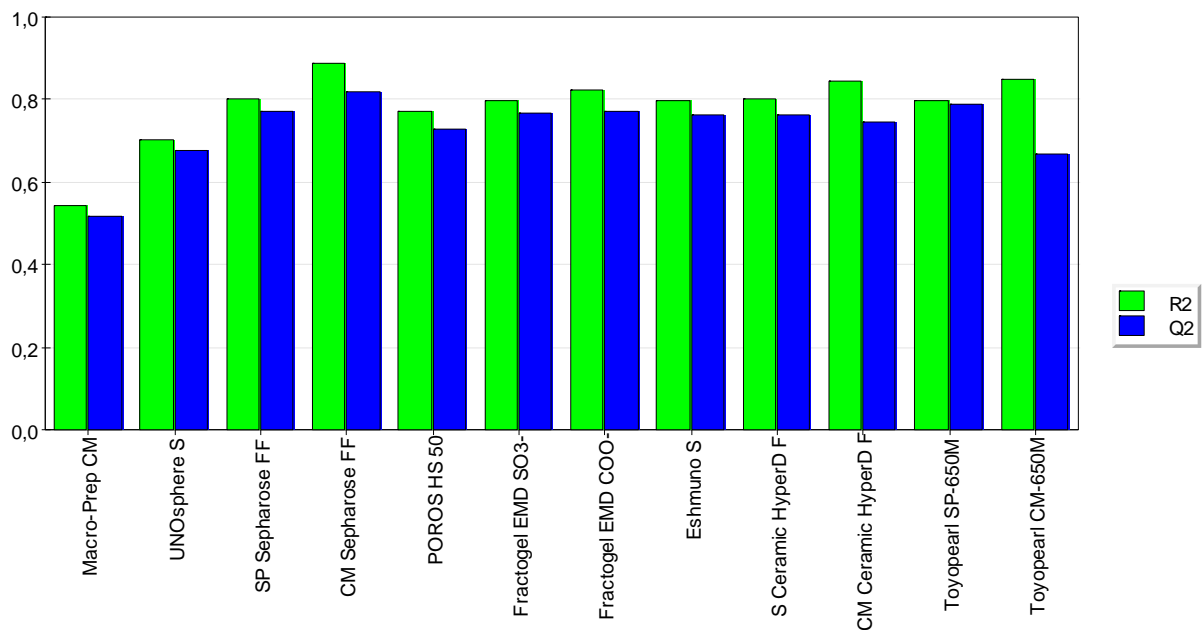
Die Datenmodelle dieser Kontourplots wurden aus jeweils 40 Faktorkombinationen (Kombination aus 8 pH-Werten und 5 Salzkonzentrationen) erzeugt. Probenbeladung (Load) pro Säule: ~2,5 mg/ml bzw. 500 µg entspricht 10 mg/ml Resin.





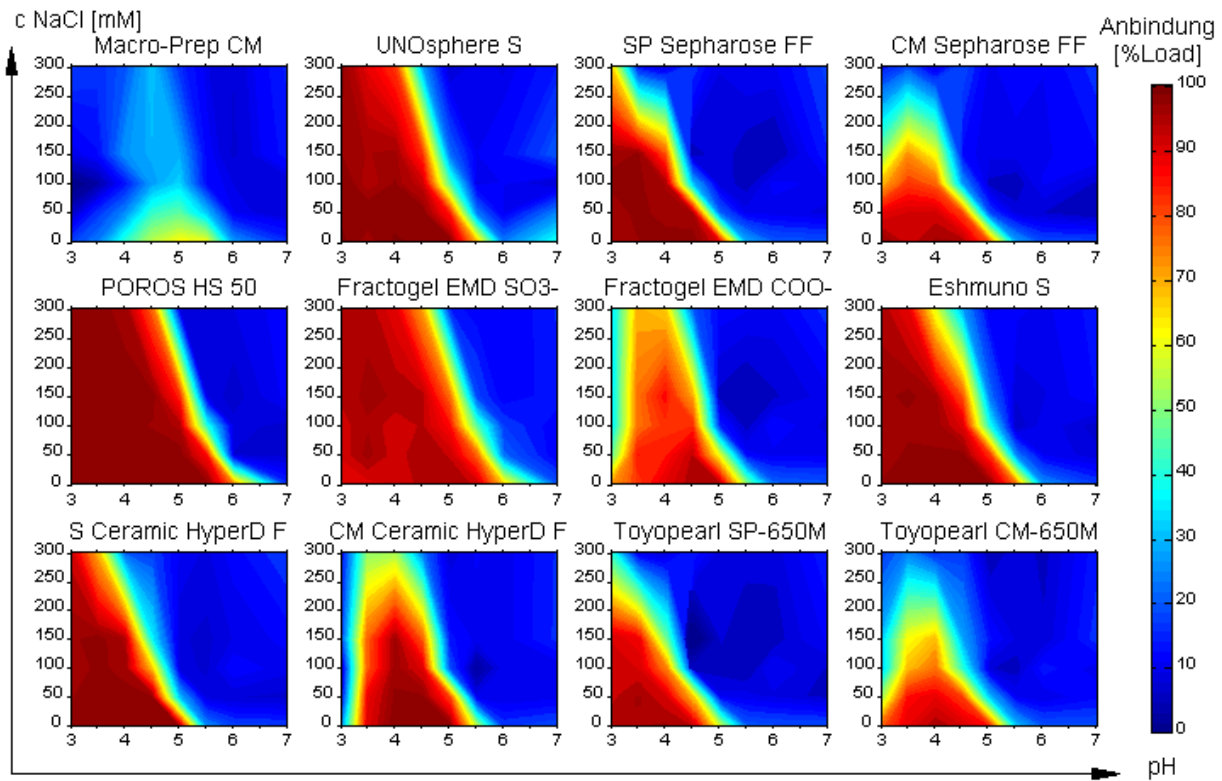
**Abb. 26: MODDE-Koeffizientenplot: MLD (Anbindungsversuch in Minisäulen mit Protein B112)**

Für die normalisierten Koeffizienten der Einflussfaktoren ist es gegenüber allen anderen Modellen bei fast allen Resins möglich die statistischen Fehler (Ausmaß der Fehlerbalken) zu reduzieren. Für einige Resins können sogar wichtige kubische Interaktionsterme eingefügt werden wodurch eine Annäherung an den Rohdatenplot ermöglicht wird.



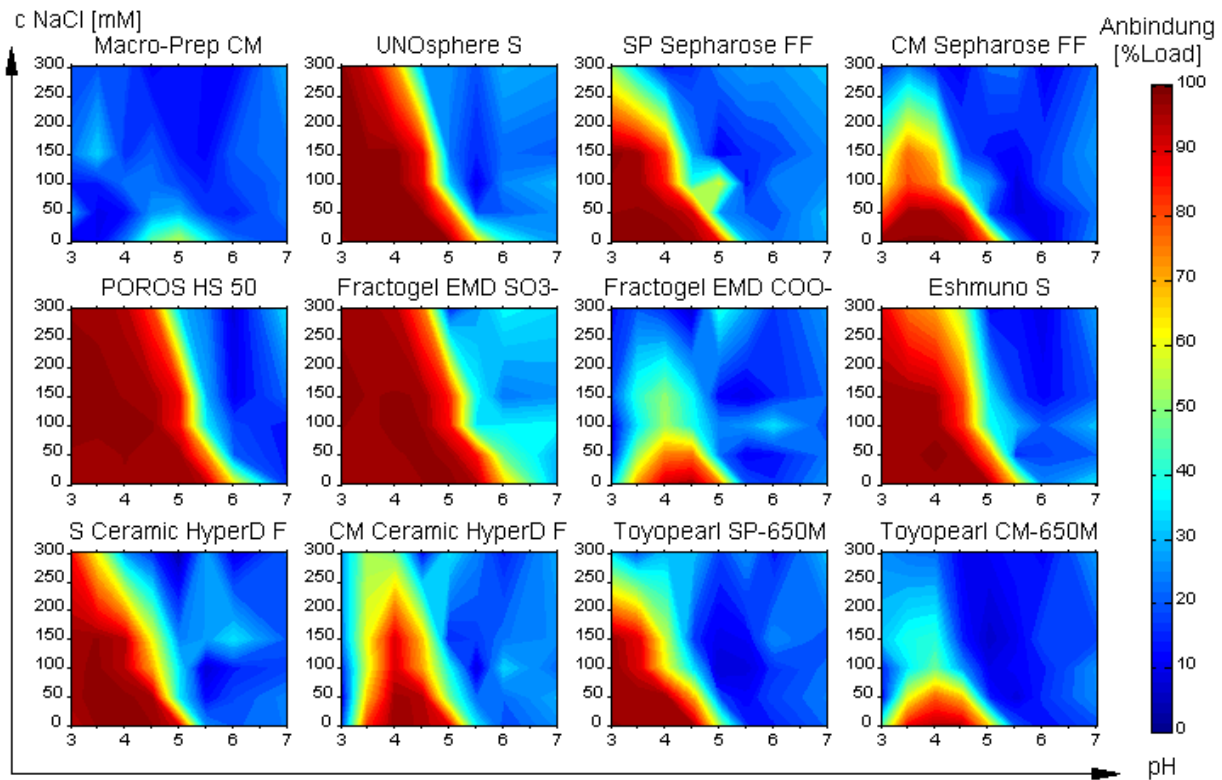
**Abb. 27: MODDE-Statistische Kennzahlen: MLD (Anbindungsversuch in Minisäulen mit Protein B112)**

Durch Ausprobieren verschiedener Termkombinationen konnten für fast alle Resins starke Regressions- und auch Vorhersagemodelle erzeugt werden. Mitunter waren sowohl quadratische und kubische Effekte für den pH-Wert bei schwachen Kationenaustauschern notwendig, bei einigen Resins auch quadratische für die Salzkonzentration sowie einfache Interaktionsterme.



**Abb. 28: Matlab-Rohdaten-Plot: MLD (Anbindungsversuch in Minisäulen mit Protein B112)**

Rohdatenplot für Anbindungsveruche bei 8 pH-Werten und 5 Salzkonzentrationen (=40 Konditionen). *Matlab* erzeugt im Gegensatz zu *MODDE* kein Datenmodell sondern interpoliert linear zu den umgebenden Punkten eines Datenpunktes, die tatsächlichen Datenwerte bleiben somit erhalten.

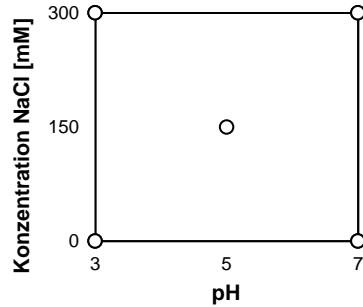


**Abb. 29: Matlab-Rohdaten-Plot: MLD (Anbindungsversuch in Mikrofilterplatten mit Protein B112)**

Dieser Plot wurde durch 5 Mikrofilterplattenversuche mit je 50 µl Resins unter den gleichen Konditionen wie obiger Plot erzeugt.

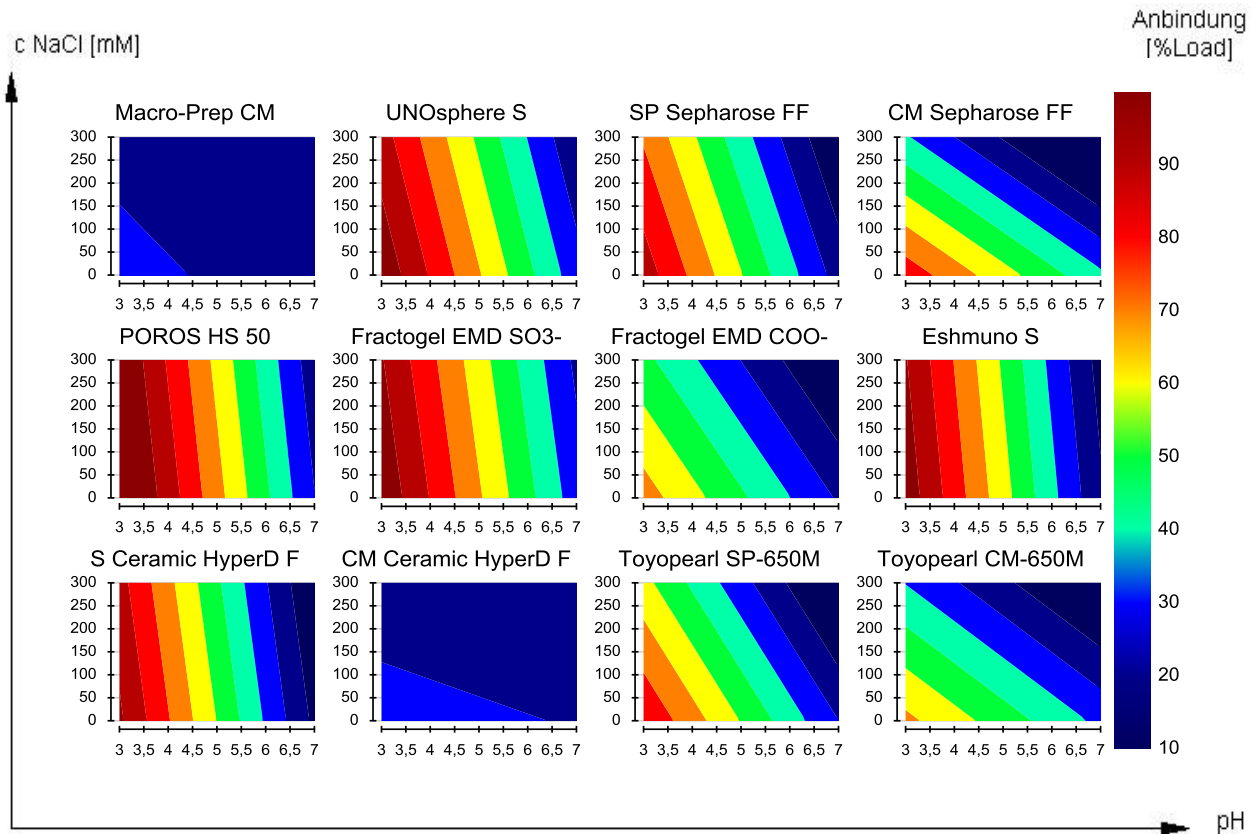
### 5.6.4 Einfaches voll-faktorielles Versuchsdesign (2<sup>2</sup>)

Das einfachste von *MODDE* vorgeschlagene Design ist ein voll-faktorielles Versuchsdesign. Solche Designe werden üblicherweise für Screening-Versuche eingesetzt um die Haupteinflussfaktoren für eine *Response* zu ermitteln.



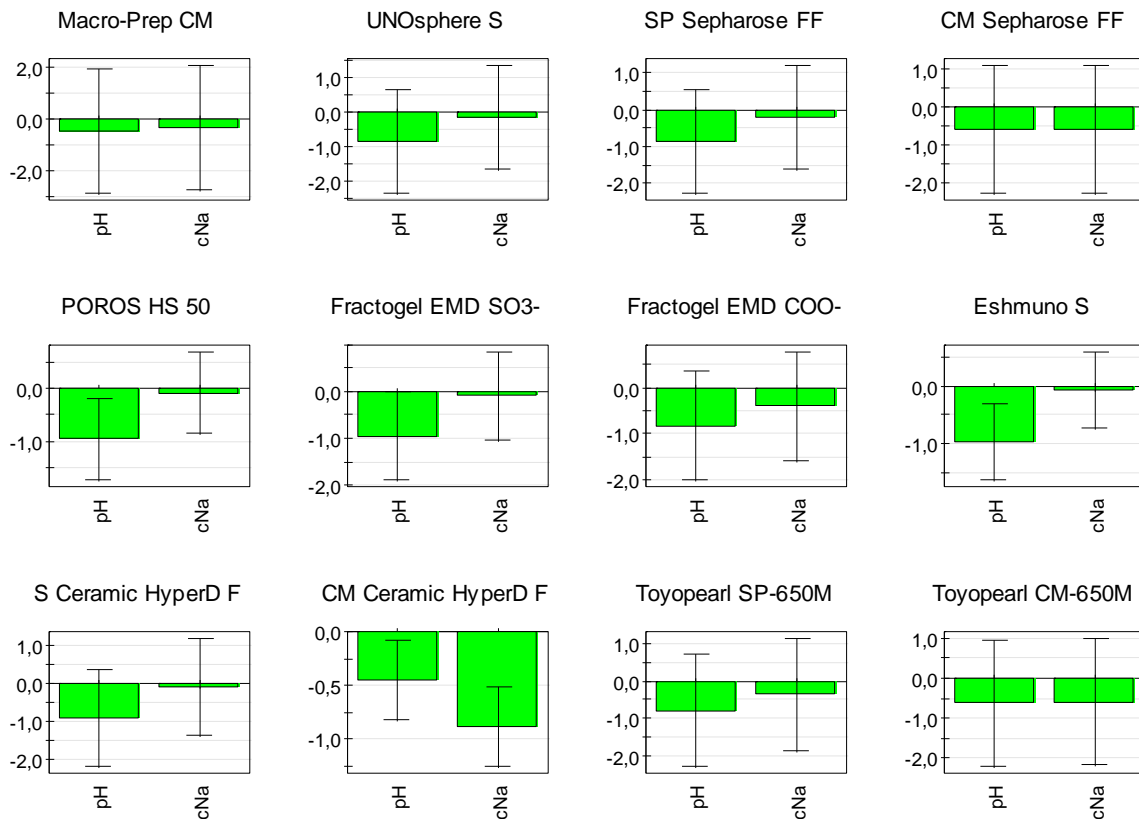
**Abb. 30: Faktorkombinationen voll-faktorielles Versuchsdesign (2<sup>2</sup>)**

Dieses Versuchsdesign besteht aus 5 Faktorkombinationen (4 Eckpunkte und ein Mittelpunkt). Die Eckpunkte bilden die vier möglichen Kombinationen der Faktorausdehnung im Charakterisierungsraum. Die fünfte Punkt stellt die Kombination der Faktorlevel bei halber Ausdehnung dar (Mittelpunkt des Versuchsraumes, engl. *Centerpoint*).



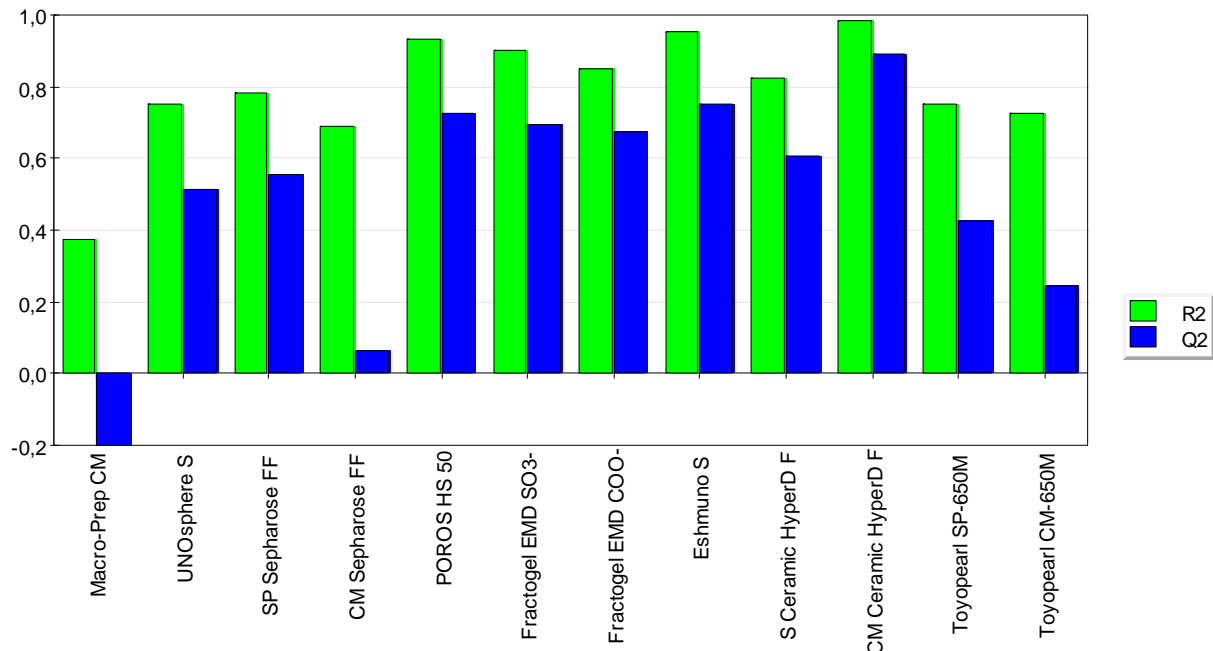
**Abb. 31: MODDE-Kontourplot: 2<sup>2</sup>-Design (Anbindungsversuch in Minisäulen mit Protein *B112*)**

Der obige Kontourplot zeigt die Anbindung prozentual als Anteil der aufgetragenen Protein *B112*-Masse (~500 µg pro Säule). Die Datenmodelle wurden aus jeweils 5 Faktorkombinationen (4 Eckpunkte und ein Mittelpunkt des Charakterisierungsraumes) erzeugt. Daten wurden dem *MLD* in Minisäulen entnommen und mit *PLS* gefittet. Im Vergleich zu dem voll-faktoriellem Multi-Level-Design ergeben sich erhebliche Unterschiede. Resins die nur mit wenigen Koeffizienten im Model auskommen (vor allem starke Kationenaustauscher) werden zumindest vom Trend her richtig erfasst. Deren Trend besteht darin Protein *B112* bei niedrigen pH-Werten bevorzugt anzubinden.



**Abb. 32: MODDE-Koeffizientenplot: 2<sup>2</sup>- Design (Anbindungsversuch in Minisäulen mit Protein B112)**

Gezeigt sind die normalisierten Koeffizienten der Einflussfaktoren die nach dem Modell-Fit erhalten wurden und bei den meisten Resins einen höheren Fehler als Signifikanz besitzen.



**Abb. 33: MODDE-Statistische Kennzahlen: 2<sup>2</sup>-Design (Anbindungsversuchs in Minisäulen mit Protein B112)**

Die relativ hohen Werte für  $R^2$  zeigen zwar eine starke Regression für die eingespeisten Datenpunkte an, die zum Teil viel niedrigeren  $Q^2$ -Werte aber Schwächen bei der Vorhersage. Einfügen weiterer Koeffizienten führte zu keiner Verbesserung der Modelle. Da der Centerpoint (pH 5 und 150 mM NaCl) zumeist in dem Bereich liegt an dem keine Anbindung erfolgt, können quadratische Terme vor allem für schwache Kationenaustauscher nicht erfasst werden.

### 5.6.5 Doehlert-Design

Doehlert-Designs werden als *Response Surface Methodology*-Designs (*RSM*-Designs) zur Optimierung eingesetzt und sollen die Erfassung von quadratischen Termen im Datenmodell ermöglichen.

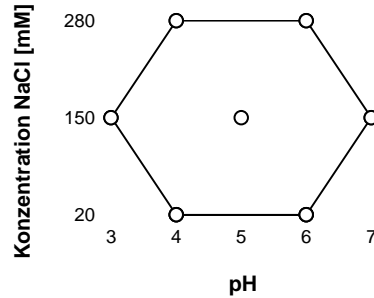


Abb. 34: Faktorkombinationen *Doehlert*-Design

Ein mit 7 Faktorkombinationen auskommendes Versuchsdesign für zwei qualitative Faktoren ist das *Doehlert*-Design. Bezüglich des  $2^2$  werden zwei Mittelpunkte eingefügt und die Eckpunkte nach Innen versetzt. Dadurch können 5 Level des pH-Wertes getestet werden.

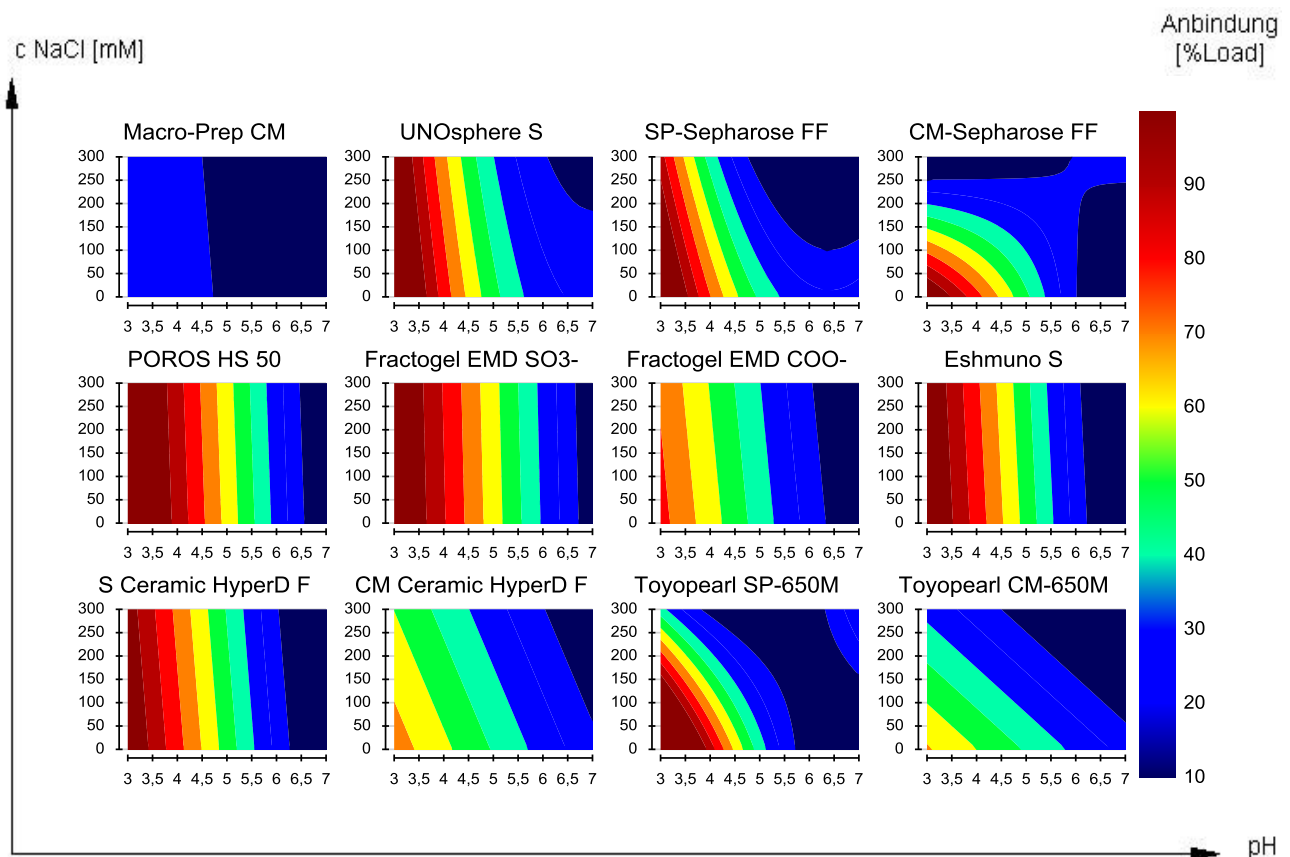
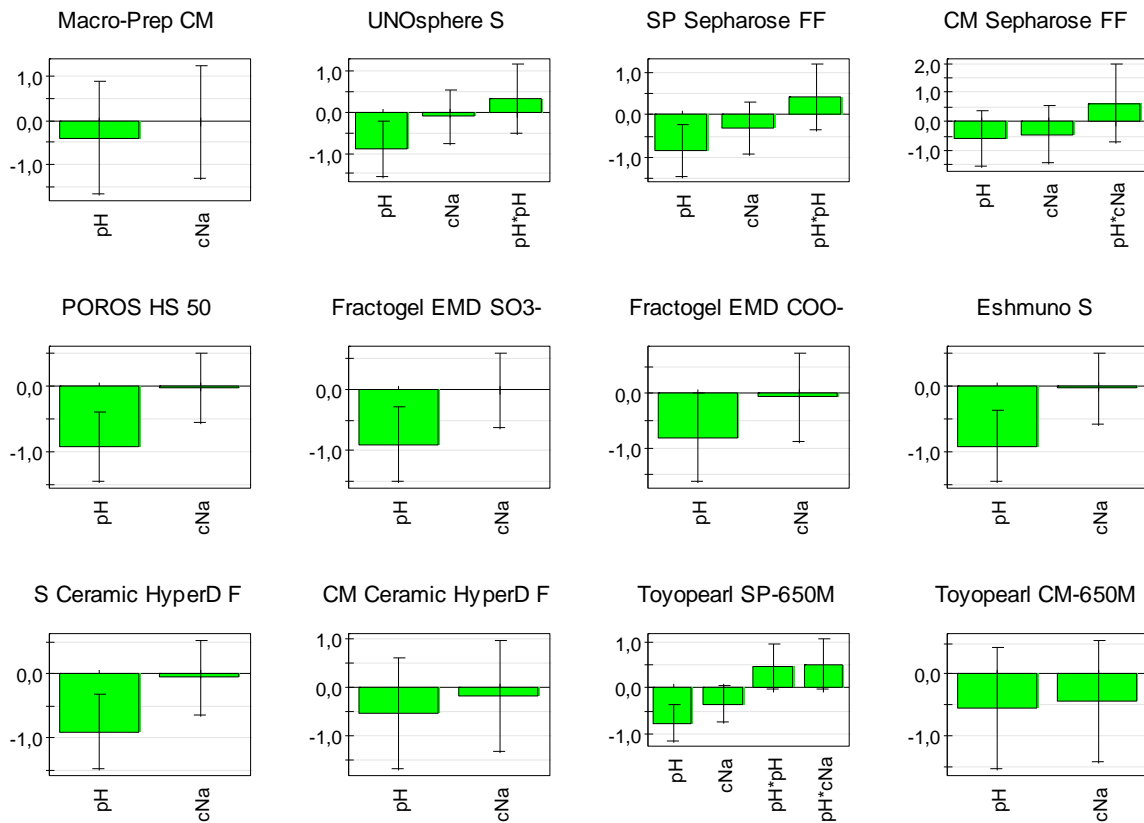


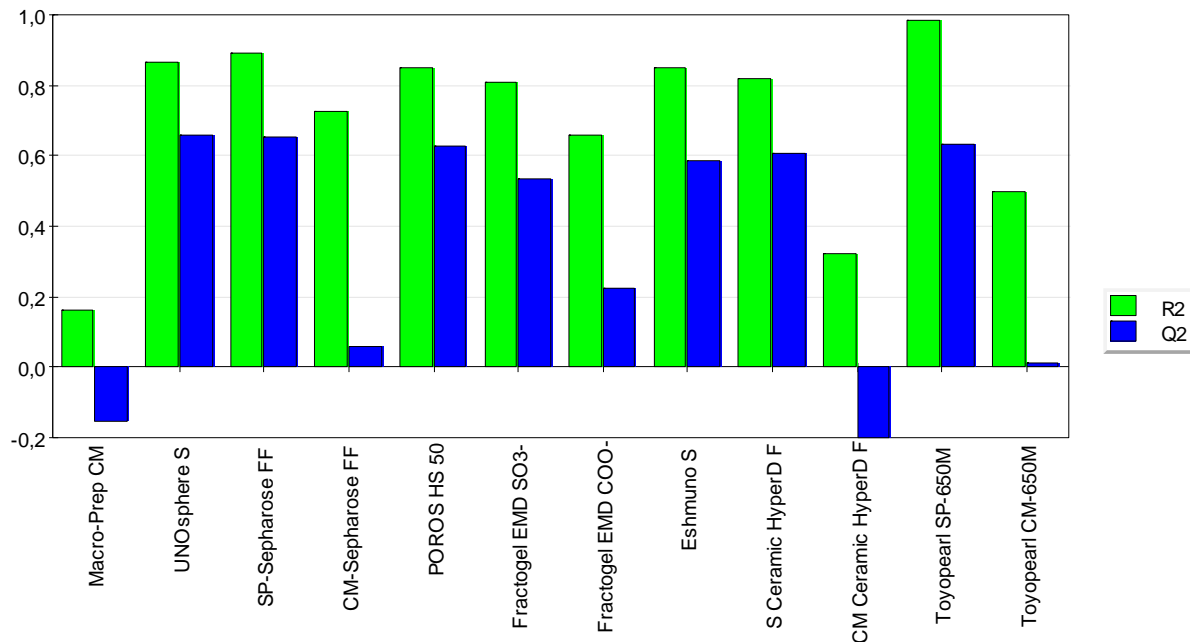
Abb. 35: *MODDE*-Kontourplot: *Doehlert* Design (Anbindungsversuch in Minisäulen mit Protein *B112*)

Die Datenmodelle dieser Kontourplots wurden aus jeweils 7 Faktorkombinationen des *Doehlert*-Designs erzeugt. Daten wurden zum Teil dem *MLD* und den zusätzlichen Anbindungsversuchen bei pH 4 und 6 entnommen und mit *PLS* gefittet. Die beiden seitlich versetzten Stützpunkte bei 150 mM NaCl und pH 3-7 sowie Faktorkombinationen innerhalb des Charakterisierungsraumes für pH 4 und 6 tragen gegenüber dem  $2^2$ -Design kaum zu einer Verbesserung der Kontourplots hinsichtlich dem Rohdaten- bzw. *MODDE*-Kontourplot des *MLD* bei. Es werden zwar Anbindungsstärken im mittleren Salzkonzentrationsbereich erfasst, jedoch sind nur wenige signifikante quadratische Koeffizienten ermittelt wurden.



**Abb. 36: MODDE-Koeffizientenplot: Doehlert-Design (Anbindungsversuch in Minisäulen mit Protein B112)**

Für die normalisierten Koeffizienten der Einflussfaktoren ist gegenüber dem  $2^2$ -Modell, kaum eine Verbesserung zu verzeichnen. Die Fehlerbalken indizieren auch hier große Fehlertoleranzen für einzelne Koeffizienten. Für einige Resins sind dennoch wichtige Interaktionsterme möglich. Hinzufügen weiterer Koeffizienten führte zu keiner Verbesserung der Modelle.

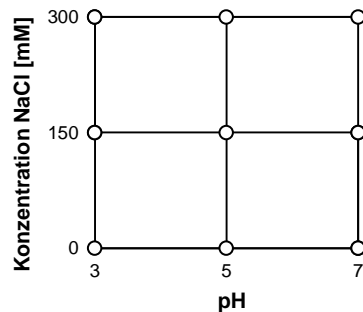


**Abb. 37: MODDE-Statistische Kennzahlen: Doehlert-Design (Anbindungsversuch in Minisäulen mit Protein B112)**

Die erhaltenen  $R^2$  und  $Q^2$ -Werte sind zum Teil deutlich schwächer als im  $2^2$ -Modell. Für einige Resins können etwa gleich gute Regressions –und Vorhersagemodellen erzeugt werden. Für einige Resins ist die Vorhersage und die Regression eher als schlecht einzustufen.

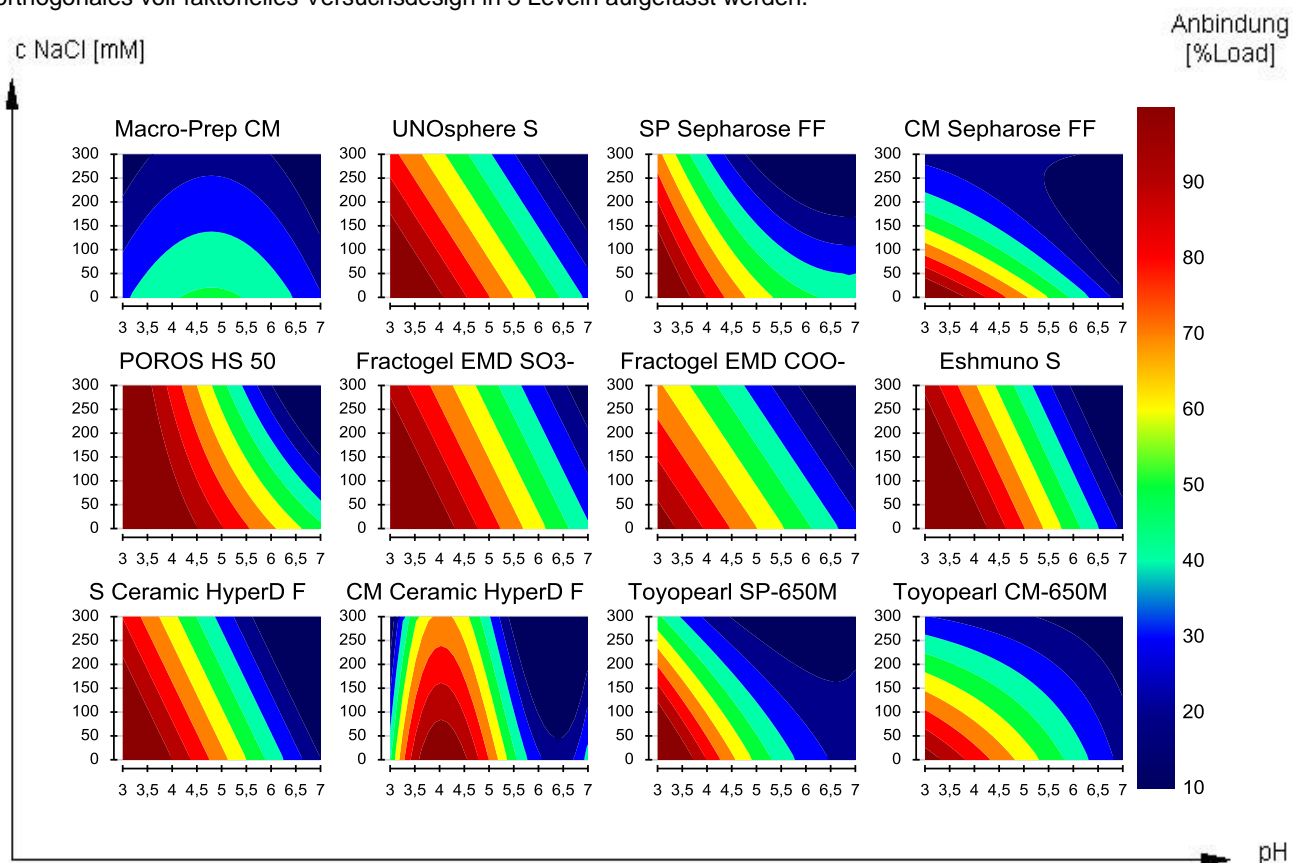
### 5.6.6 Central Composite Face Centered

Eine Erweiterung des  $2^2$ -Designs stellt das *Central Composite Face Centered* (Abk. *CCF*) dar. Zu einem durchgeführten  $2^2$ -Design im selben Charakterisierungsraum fehlen 4 Faktorkombinationen. *CCF*-Designs gehören ebenfalls zur Kategorie der *RSM*-Designs und werden üblicherweise zu Optimierungszwecken und der Erfassung von quadratischen Termen eingesetzt.



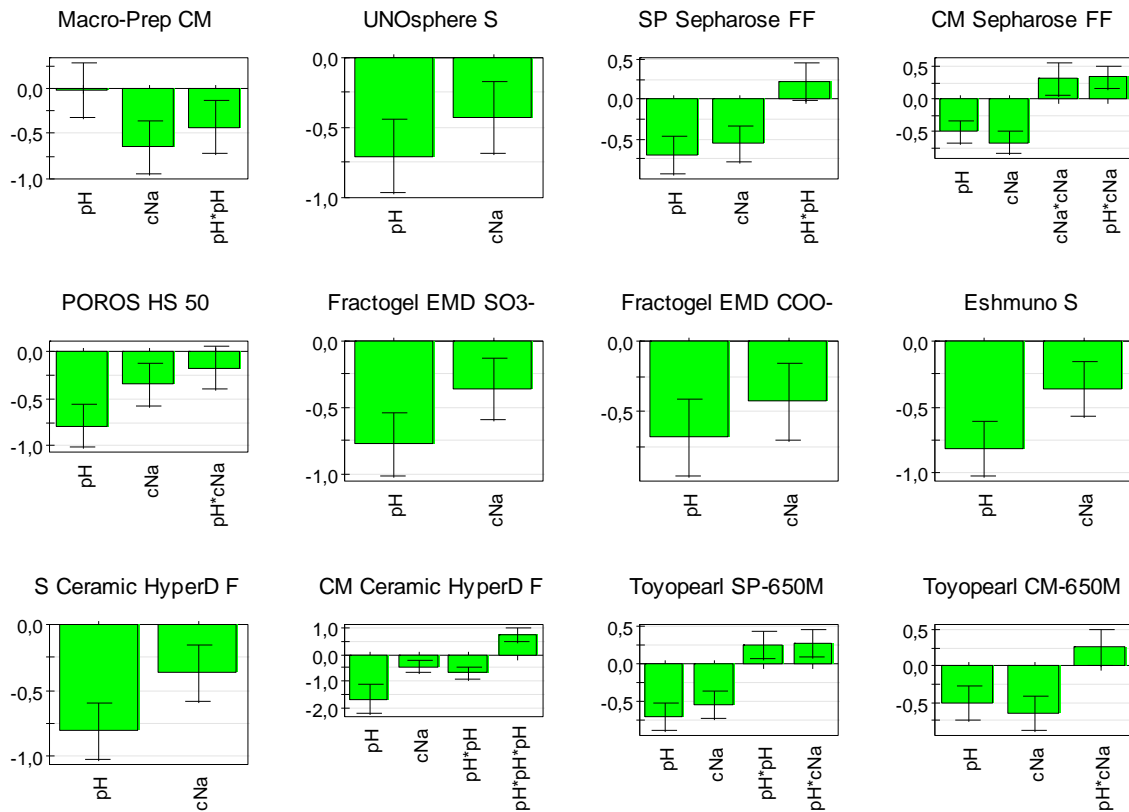
**Abb. 38: Faktorkombinationen Central Composite Face Centered (CCF)**

In diesem Versuchsdesign werden mit Blick auf ein  $2^2$ -Design die Mittelpunkte entlang der Kanten zwischen den Eckpunkten des Charakterisierungsraumes hinzugefügt, wodurch insgesamt 9 Kombinationen entstehen. Es kann auch als orthogonales voll-faktorielles Versuchsdesign in 3 Levels aufgefasst werden.



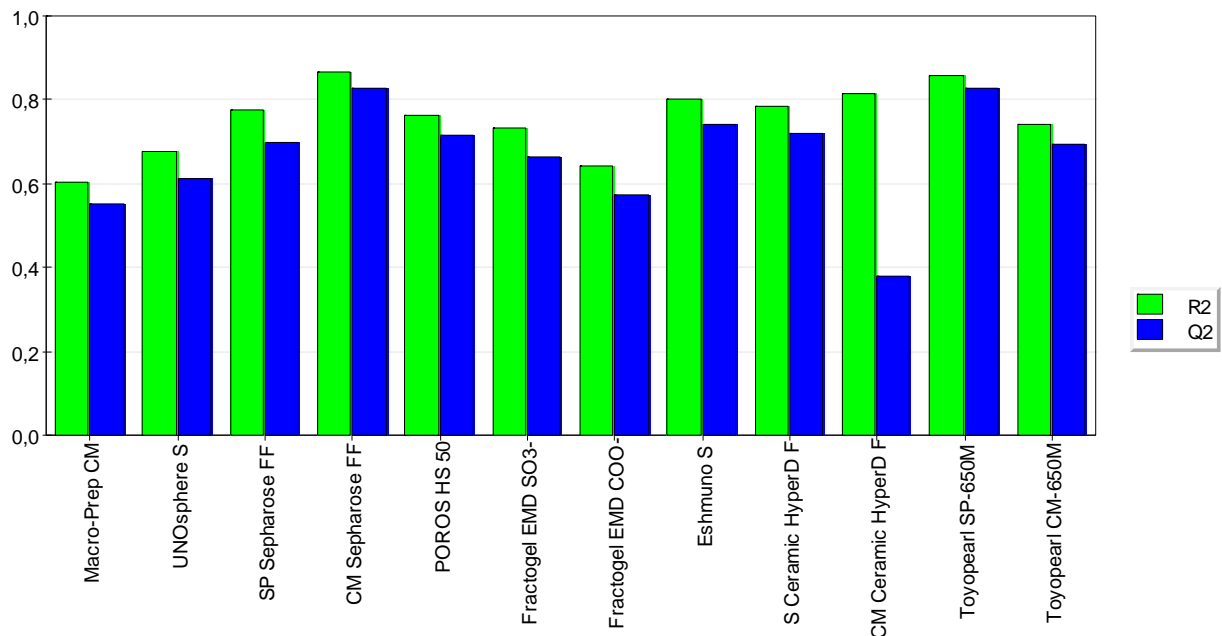
**Abb. 39: MODDE-Kontourplot: CCF-Design (Anbindungsversuch in Minisäulen mit Protein B112)**

Der obige Kontourplot zeigt die Anbindung prozentual als Anteil der aufgetragenen Protein *B112*-Masse (~500 µg pro Säule). Die Datenmodelle wurden aus jeweils 9 Faktorkombinationen erzeugt. Daten wurden dem *MLD* entnommen und mit *PLS* gefittet. Es ist eine Verbesserung gegenüber dem *Doehlert*-Design und dem  $2^2$ -Design festzustellen. Die Koeffizienten-Plots zeigen zum Teil signifikante quadratische Koeffizienten bei schwachen Kationenaustauschern an. Außerdem wird die Ausdehnung des Anbindungsbereiches bei starken Kationenaustauschern besser erfasst.



**MODDE-Koeffizientenplot: CCF-Design (Anbindungsversuch in Minisäulen mit Protein B112)**

Gezeigt sind die normalisierten Koeffizienten die nach dem Fit erhalten wurden. Es ist eine deutliche Verbesserung gegenüber dem 2<sup>2</sup>-Modell zu verzeichnen. Für einige Resins können sogar signifikante Interaktionsterme und quadratische Terme eingefügt werden.



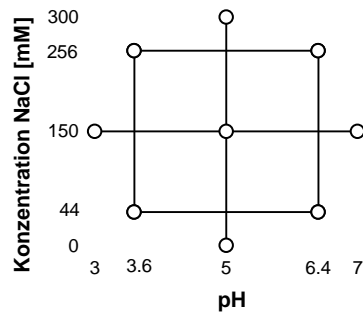
**Abb. 40: MODDE-Statistische Kennzahlen: CCF-Design (Anbindungsversuch in Minisäulen mit Protein B112)**

Für  $R^2$  werden zumeist geringere Werte im Vergleich zu dem 2<sup>2</sup>-Modell erhalten, die Regression über diese Datenpunkte ist aber nur scheinbar schlechter. Eine Steigerung der  $Q^2$ -Werte zeigt eine Verbesserung der Vorhersage der Modelle an. Mit Blick auf den Rohdaten- und dem MODDE-Plot werden mehr übereinstimmende Datenmodelle für die meisten Resins aufgrund der erfassten quadratischen Terme sowie von Interaktionstermen erhalten.



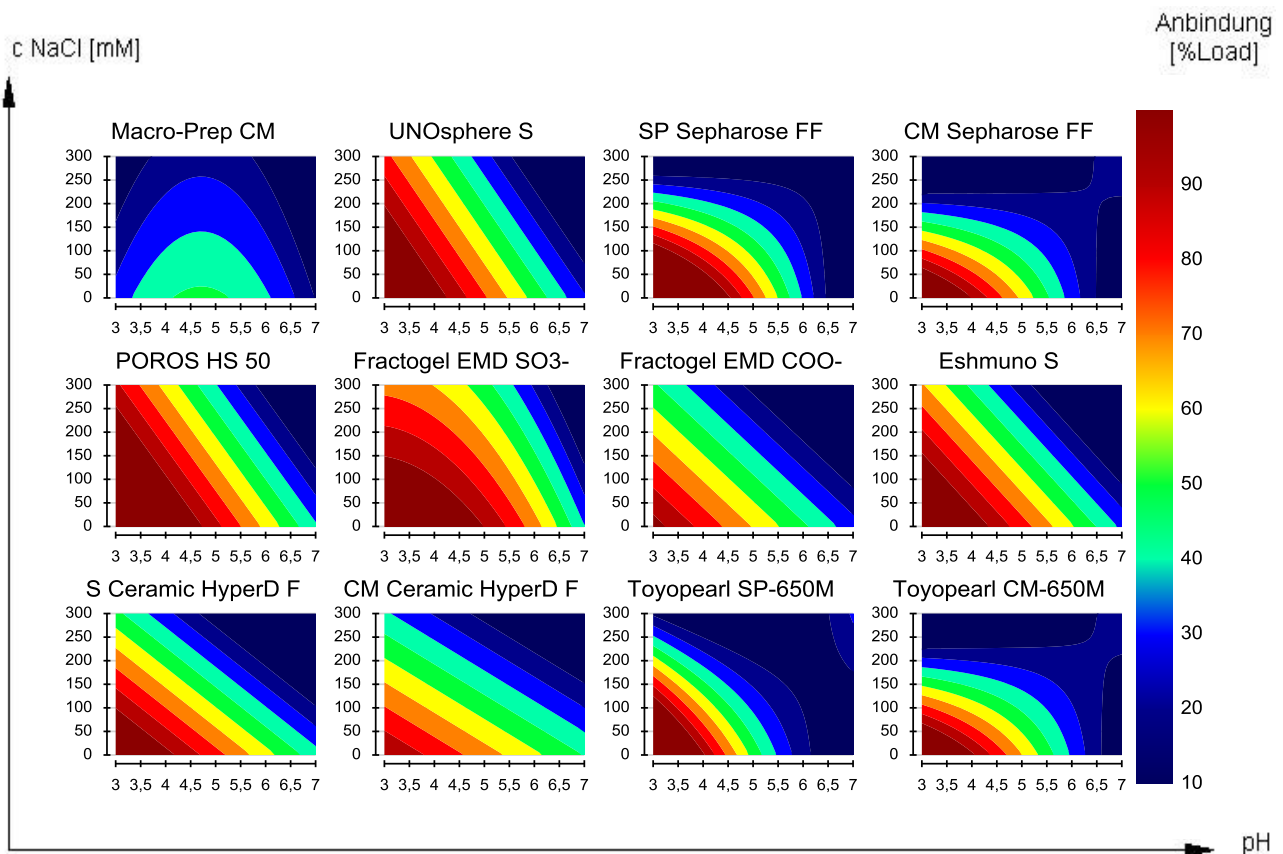
### 5.6.7 Central Composit Inscribed

Eine Variation des CCF stellt das *Central Composit Circumscribed* dar. Bei diesem werden die Eckpunkte beibehalten und die Mittelpunkte nach Außen versetzt. Eine Variation ist wiederum das *Central Composit Inscribed* (Abk. CCI), das eingesetzt wird wenn die Eckpunkte tatsächliche Grenzen des möglichen Charakterisierungsraumes darstellen.



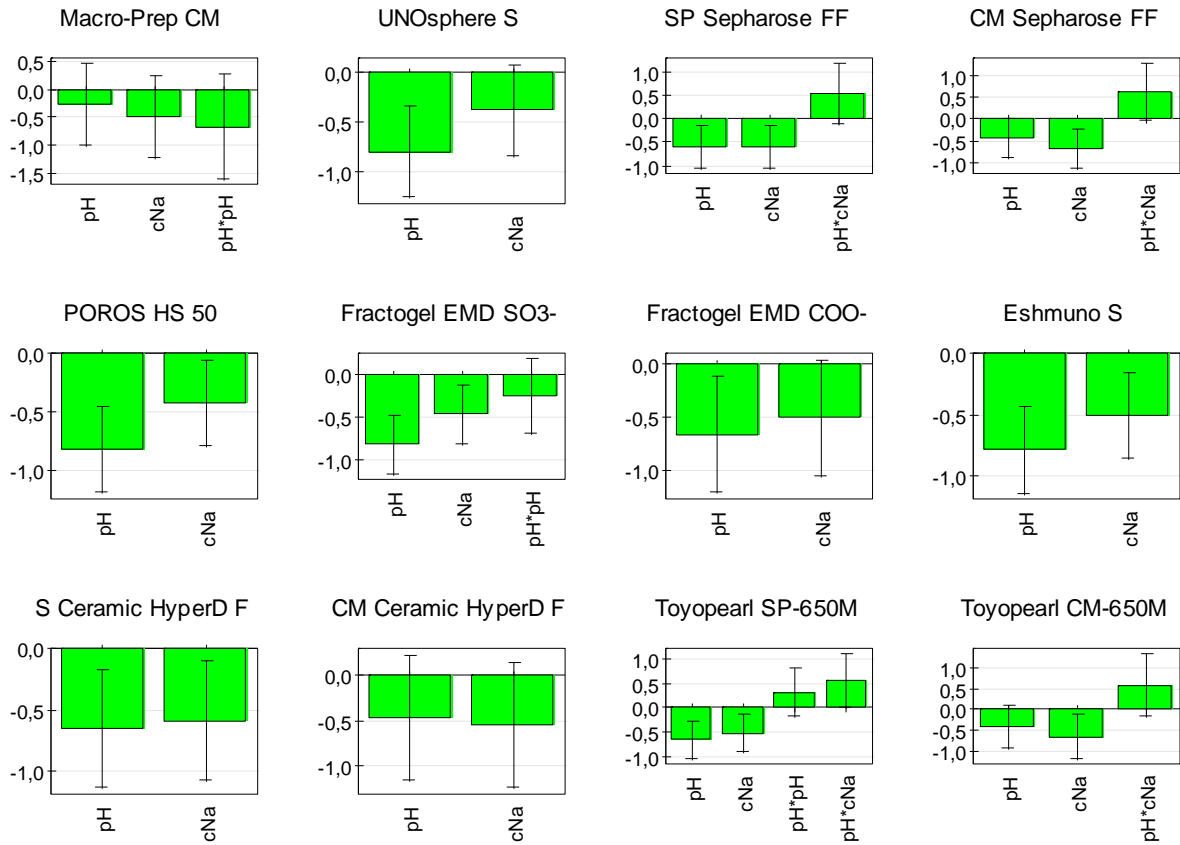
**Abb. 41: Faktorkombinationen Central Composit Inscribed (CCI)**

Gegenüber dem CCF werden die Mittelpunkte entlang der Kanten zwischen den Eckpunkten des Charakterisierungsraumes beibehalten, jedoch werden die tatsächlich ausgeführten Eckpunkte nach innen verschoben. Der Versuchsumfang verbleibt bei 9 Faktorkombinationen (ohne Wiederholungen).



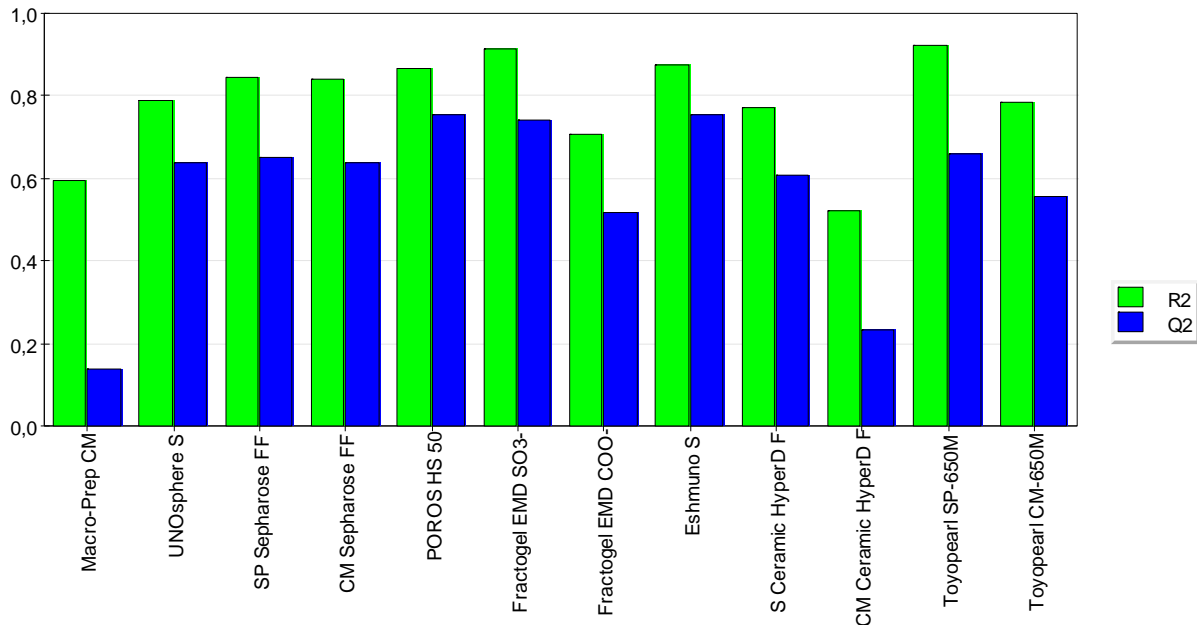
**Abb. 42: MODDE-Kontourplot: CCI-Design (Anbindungsversuch in Minisäulen mit Protein B112)**

Die Datenmodelle dieser Kontourplots wurden aus jeweils 9 Faktorkombinationen (4 orthogonale Punkte innerhalb und 5 Sternpunkte an den Rändern des Charakterisierungsraumes) erzeugt. Daten wurden zum Teil dem MLD und den zusätzlichen Anbindungsversuchen bei pH 3,6 und 6,4 entnommen und mit PLS gefittet. Für einige starke Kationenaustauscher werden die Anbindungsregionen besser erfasst als im 2<sup>2</sup>. Gegenüber dem CCF jedoch ist eher eine Verschlechterung festzustellen.



**Abb. 43: MODDE-Koeffizientenplot: CCI-Design (Anbindungsversuch in Minisäulen mit Protein B112)**

Für die normalisierten Koeffizienten der Einflussfaktoren ist gegenüber dem 2<sup>2</sup>-Modell, wenn gleich auch schwächere Verbesserung gegenüber dem CCF-Modell zu verzeichnen. Die Fehlerbalken indizieren auch hier zum Teil große Fehler-toleranzen für einzelne Koeffizienten. Für einige Resins sind dennoch durch wichtige Interaktionsterme möglich.



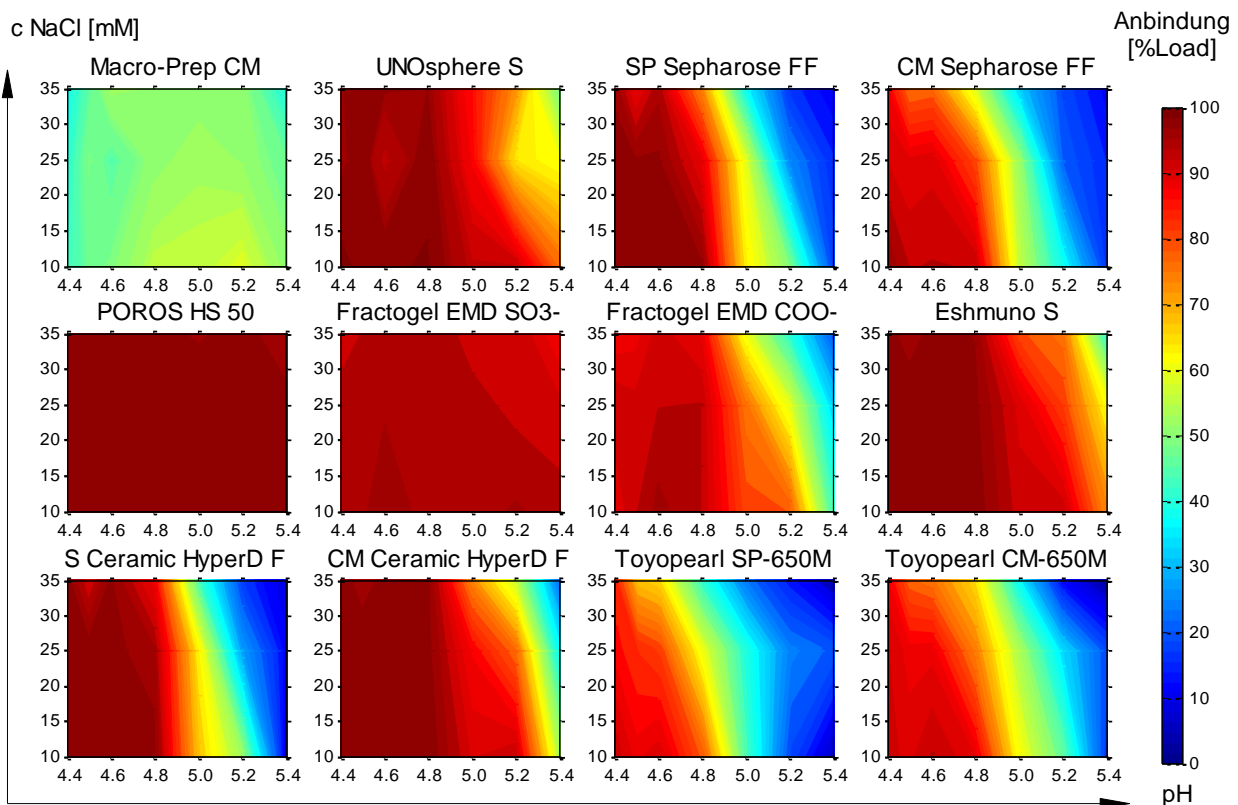
**Abb. 44: MODDE-Plot Statistische Kennzahlen: CCI-Design für den Anbindungsversuch in Minisäulen (B112)**

Bei den meisten Resins sinkt gegenüber dem CCF-Modell die Vorhersagekraft wieder ab, während die Regression über die Datenpunkte nur bei einigen Resins wieder abnimmt. Das Hinzufügen weiterer Koeffizienten führte zu keiner Verbesserung der Modelle oder einer Annäherung an den Rohdatenkontourplot.

### 5.6.8 Anbindungsversuch #2 von Protein *B112*

Die zuvor beschriebenen Versuche mit Protein *B112* zeigen das unterschiedliche Anbindungsverhalten in relativ großen Schrittweiten bezüglich der eingestellten pH-Werte (0,5 pH-Einheiten) und Salzkonzentrationen (im unteren Konzentrationsbereich 50 mM).

Um zu testen ob geringfügige Unterschiede im pH-Wert und der Salzkonzentration im Probenauftrag und der Equilibrierung mit Minisäulen registriert werden können wurde ein entsprechend kleinerer Ausschnitt des Charakterisierungsraumes ausgewählt. Dieser umschließt bei den meisten Resins eine Region in der sowohl mit einer relativ starken Anbindung als auch beginnendem Durchfluss (also keinen bzw. nur teilweisen Anbindung) zu rechnen ist. Das Arbeitsprotokoll war das Gleiche wie zuvor beschrieben.



**Abb. 45: Matlab-Kontourplot: Anbindungsversuch 2 für das Protein *B112* in Minisäulen**

Je 200  $\mu$ l von  $\sim 2,2$  mg *B112*/ml wurden bei folgenden pH-Werten (4,4/4,6/4,8/5,0/5,2/5,4) und 3 Salzkonzentrationen (10/25/35 mM NaCl) auf equilibrierte Säulen aufgetragen. Die Bindung (auf den Protein-Load normiert) unter den eingestellten Bedingungen wurde aus der Summe der Recovery von Flowthrough und der beiden Waschschritte berechnet. Mit den Minisäulen konnten somit auch kleine Unterschiede im pH-Wert (0,2 pH-Einheiten) und der Salzkonzentration (15 mM) bezüglich des Anbindungsverhaltens von Protein *B112* erfasst werden.

Für die erhaltenen Daten wurde keine Modelle erzeugt. Es liegt aber aufgrund des Verlaufs der Kontourlinien die Vermutung nahe, dass lineare und quadratische Terme ausreichen würden die Rohdaten entsprechend zu modellieren. Grund hierfür ist das in dem kleineren Ausschnitt des Charakterisierungsraumes komplexe Kontourlinien praktisch nicht vorkommen.

## 5.7 Modul 2: Elutionsversuche

Häufig wird versucht eine Anbindung des Zielproduktes oder einer Verunreinigung am Chromatographiematerial zu erreichen um es dann gezielt mit ganz bestimmten Lösungen zu eluieren. Wasch- und Spülschritte stellen ebenfalls eine Form der Elution dar, wenngleich auch von unerwünschten oder zum Teil stark bindenden Begleitstoffen der Probenlösung.

Konditionen und Volumen der mobilen Phase die dazu notwendig wären sind daher in Elutionsversuchen zu ermitteln.

Die exemplarische Durchführung von Elutionsversuchen wurde mit vergleichsweise niedriger Resins-Beladung von 2,5 mg/ml *B112* (entspricht 10 mg/ml Resins) bzw. 0,6 mg/ml *Lysozym* (2,4 mg/ml Resin) ohne besonderes Versuchsdesign ausgeführt.

Zur Testung des Elutionsverhaltens in Minisäulen und Mikrofilterplatten wurden nur pH-Wert konditionierte Proben von Protein *B112* und *Lysozym* eingesetzt und mit bis zu 6 Salzstufen bei dem jeweiligen pH-Wert je zweimal eluiert (50, 100, 150, 300, 500 und 1000 mM Natriumchlorid).

Der Elutionsversuch in Minisäulen für *B112* wurde zudem einmal mit neuen Proben wiederholt.

### 5.7.1 Allgemeines Arbeitsprotokoll Elutionsversuche

Wie bei vorigen Versuchen auch, wurden die üblichen Vorbereitungsschritte der Chromatographie ausgeführt. Minisäulen wurden bei 500 rpm für 2 Minuten zentrifugiert und die Mikrofilterplatten in den einzelnen Schritten 3 Minuten geschüttelt sowie beim Probenauftrag 1 Stunde inkubiert und per Vakuum bei 300, später bei 500 mbar für 10-60 Sekunden filtriert.

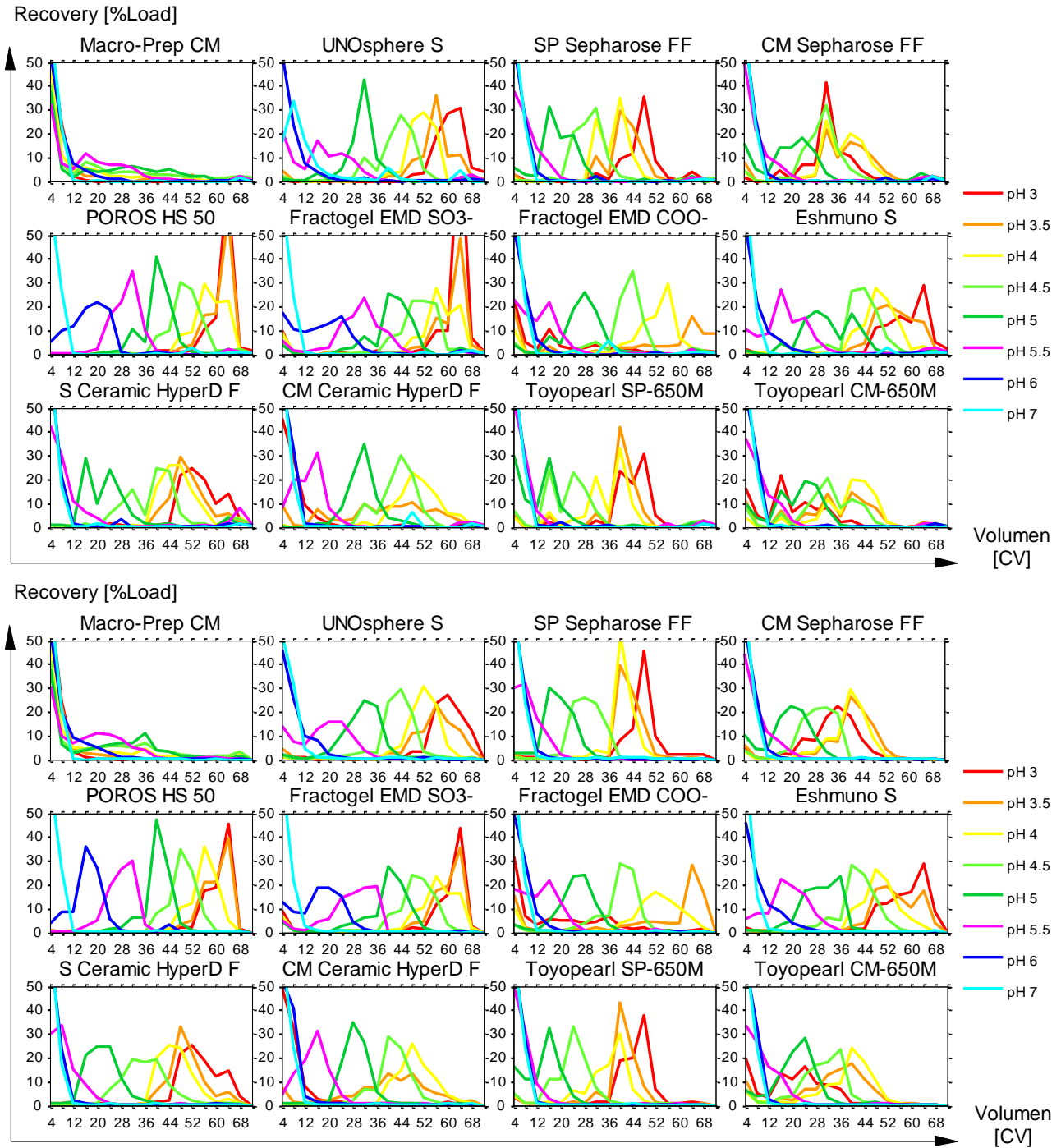
**Tab. 18: Versuchsablauf Elutionsversuche mit Protein *B112* in Minisäulen und Mikrofilterplatten**

Schritt	Anzahl	Bezeichnung	UV-Messung	Volumen im Plot [CV]
1	Entfernung der Lagerlösung	2x	H2O	
2	Regeneration	2x	pH + 0,5 M NaCl	
3	Equilibrieren	3x	pH + x NaCl	
4	Probenauftrag	1x	Durchflussfraktion	x
5	Waschschritt	2x	pH (*) + 0 mM NaCl	4
6	1 Salzstufe	2x	pH (*) + 50 mM NaCl	x
7	2 Salzstufe	2x	pH (*) + 100 mM NaCl	x
8	3 Salzstufe	2x	pH (*) + 150 mM NaCl	x
9	4 Salzstufe	2x	pH (*) + 300 mM NaCl	x
10	5 Salzstufe	2x	pH (*) + 500 mM NaCl	x*
11	6 Salzstufe	4x	pH (*) + 1000 mM NaCl	x*
12	Spülen	4x	1 M NaCl pH 7	x*
13	Spülen	4x	pH 7	x*
14	Lagerlösung	2x	20 % Ethanol + 0,1 M NaCl	

\*nur in Minisäulen ausgeführt

(\*) pH-Wert der jeweiligen Kondition (3/3,5/4/4,5/5/5,5/6/7)

### 5.7.2 Elutionsversuche mit Protein B112 in Minisäulen

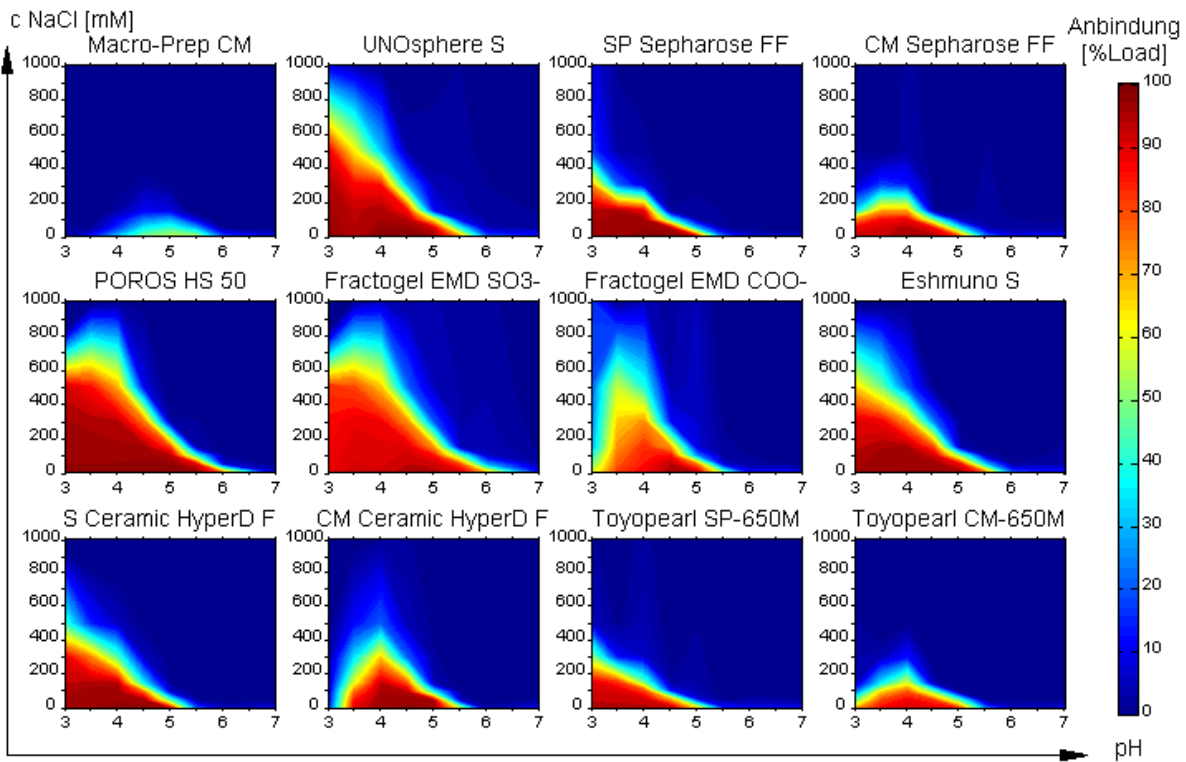
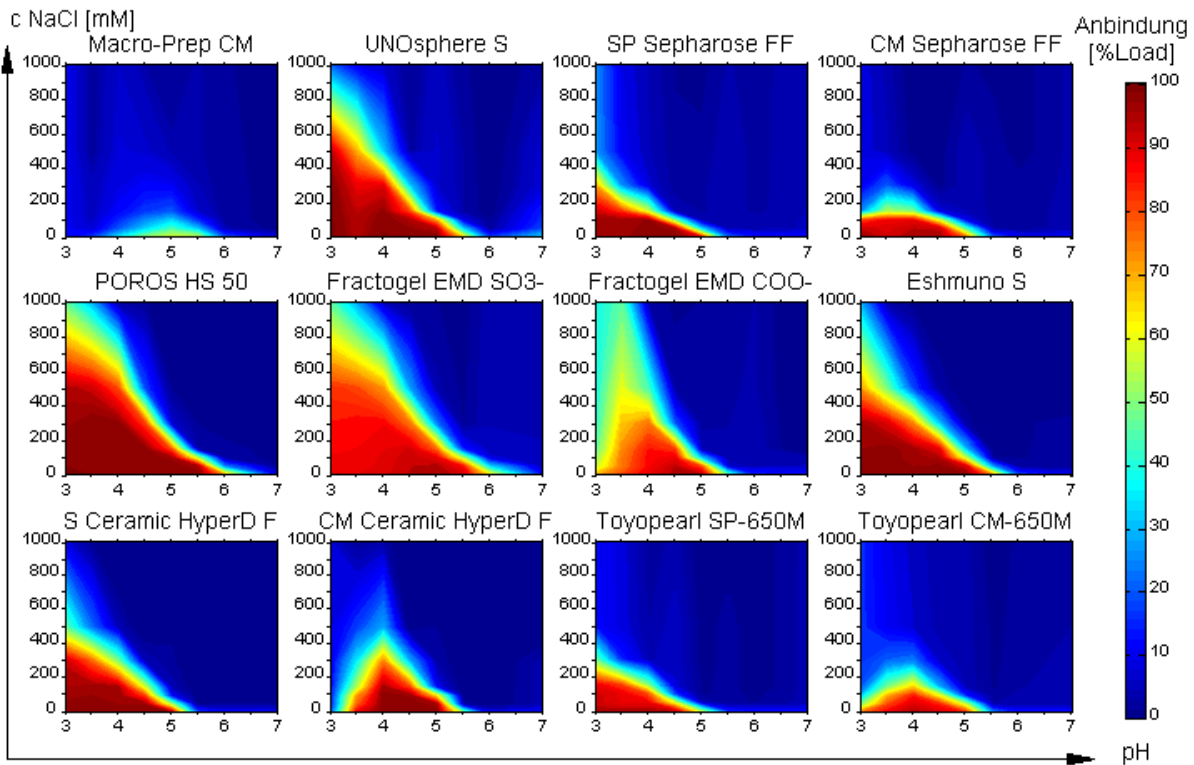


**Abb. 46: Pseudochromatogramme: Elutionsversuche in Minisäulen mit Protein B112**

**Oben:** Elutionsversuch bei vierter Benutzung der Minisäulen

**Unten:** Elutionsversuch bei 15ter Verwendung

Die Anbindung erfolgte jeweils mit neu pH-konditioniertem Protein B112 Bulk mit 2,5 mg/ml Protein und dem gleichem Puffersystem. Nach Probenauftrag (200 µl mit ca. 500 µg Protein B112) und zweimaligem Waschen wurde in 6 Salzstufen (50/100/150/300/500/1000 mM NaCl) je zweimal eluiert. Zusammen mit den anschließenden Spülschritten die nicht gezeigt sind (pH 7+1 M NaCl) wurde eine Gesamtwiederfindung von  $100,1 \pm 7,1 \%$  erreicht. Das Elutionsverhalten bei den verschiedenen pH-Werten ist nach mehrfacher Nutzung der Minisäulen vergleichbar dem ersten Experiment.



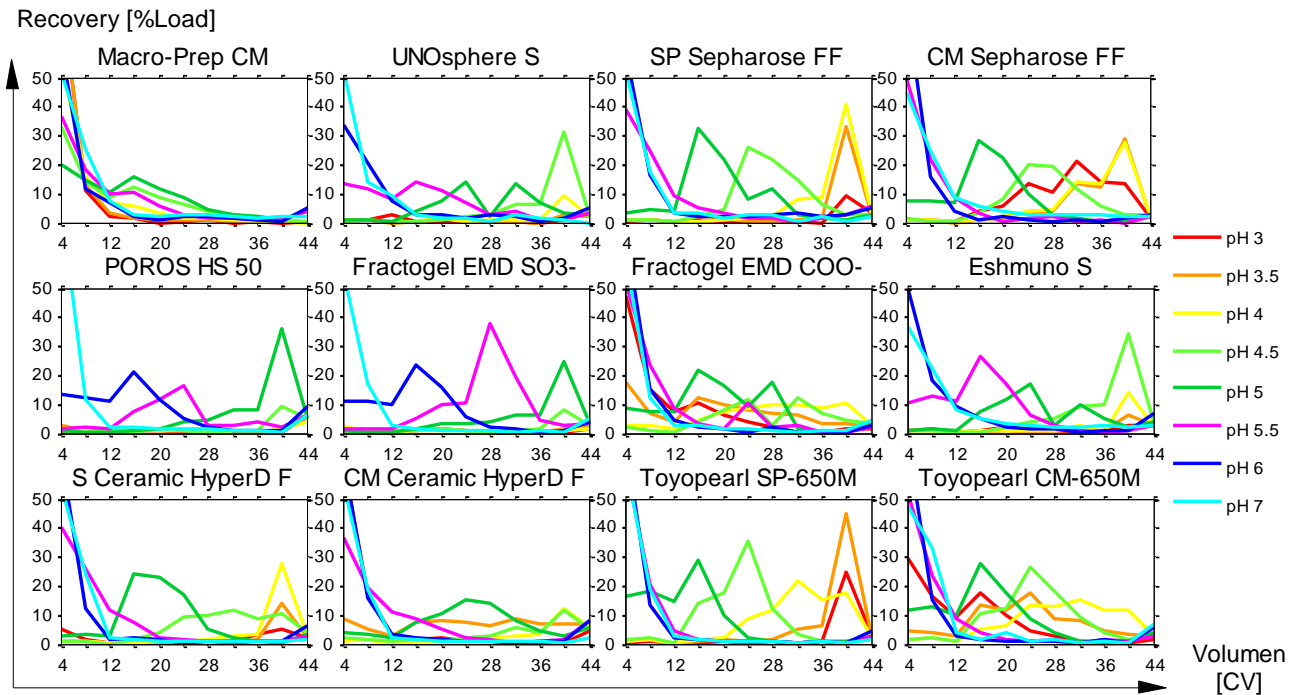
**Abb. 47: Konturplots Elutionsversuche mit Protein B112 in Minisäulen**

**Oben:** Elutionsversuch bei vierter Benutzung der Minisäulen

**Unten:** Elutionsversuch bei 15ter Verwendung

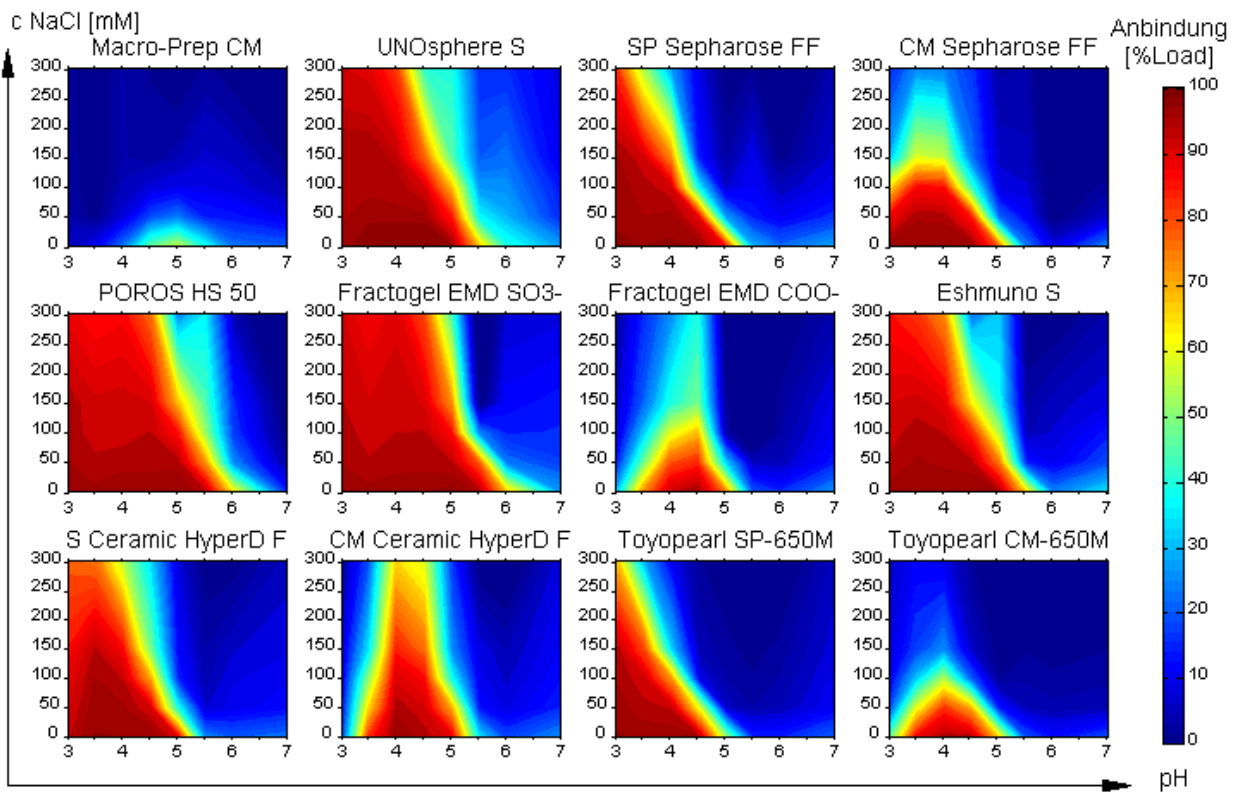
Für diesen Plot wurden die Datenpunkte generiert aus der Summe der Wiederfindungen bis zur jeweiligen Salzstufe. Zum Beispiel wird für die Darstellung der Wiederfindung bei 150 mM NaCl die Wiederfindung in allen vorigen Fraktionen summiert, in diesem Fall Durchfluss, 2 Waschstufen, 2 x 50 mM, 2 x 100 mM und die beiden 150 mM Wiederfindungen. Bemerkenswert an dieser Stelle ist, dass der Konturplotverlauf für die 40 Anbindungsversuche von 8 pH-Werten mit 50, 100, 150 und 300 mM NaCl fast denselben Verlauf zeigen. Die dort gezeigten Konturplots sind also ebenso über eine viel weniger aufwendige Elution in beliebig vielen Salzstufen ermittelbar.

### 5.7.3 Elutionsversuche mit Protein B112 in einer Mikrofilterplatte



**Abb. 48: Pseudochromatogramme: Elutionsversuche mit Protein B112 in einer Mikrofilterplatte**

Der Elutionsversuch wurde nach der vierten Salzstufe abgebrochen. Bereits vorher war der Volumenfluss in einigen Stellen des Arrays stark gehindert, weiterhin waren vermehrt große Tropfen am Bodenauslass zu beobachten die auch durch Druckerhöhung nicht entfernt werden konnten.

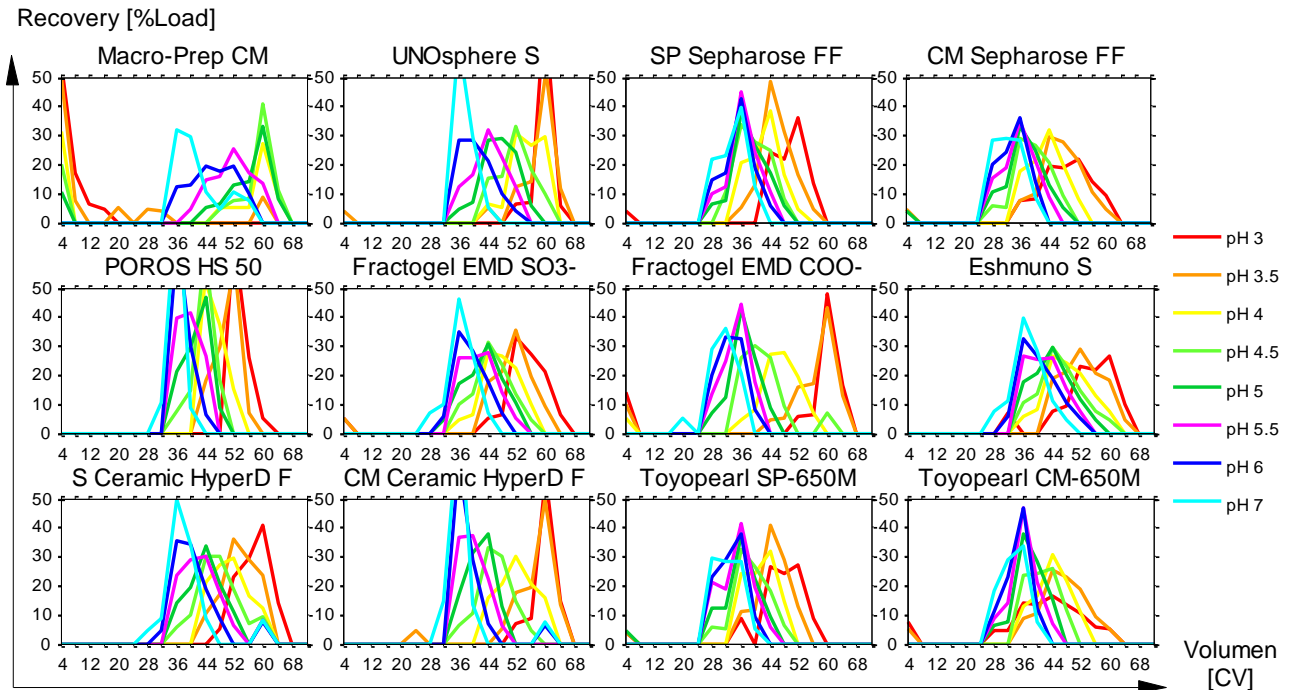


**Abb. 49: Kontourplots: Elutionsversuche mit Protein B112 in einer Mikrofilterplatte**

Für die Erzeugung dieses Plots wurden die Wiederfindungen bis zur jeweiligen Salzstufe aufsummiert und von der Beladungsmenge abgezogen. Trotz erheblicher Volumenverluste von bis zu 50 µl pro Stufe bei einigen Resins werden vergleichbare Plots zu den vorigen Anbindungsversuchen erzeugt (vergl. S. 50 Abb. 29).

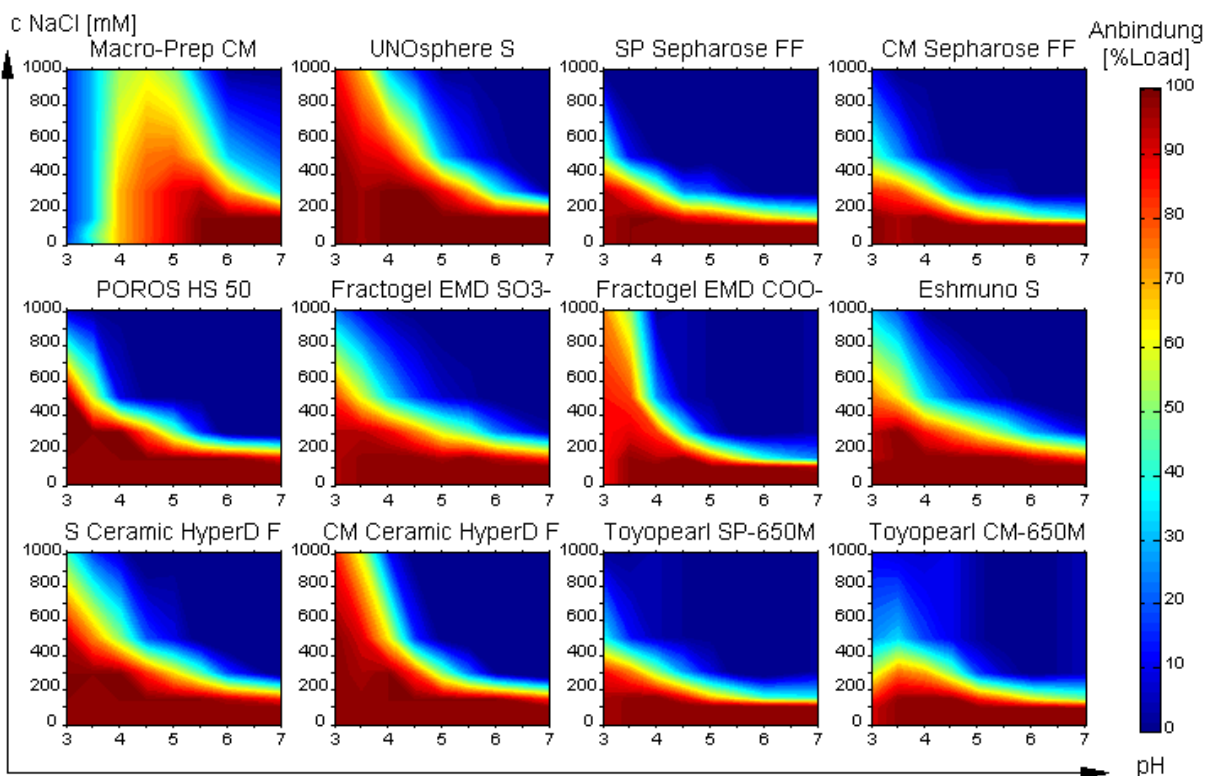


### 5.7.4 Elutionsversuche mit Lysozym in Minisäulen



**Abb. 50: Pseudochromatogramme: Elutionsversuche mit Lysozym in Minisäulen**

Lysozym wurde bei 0,6 mg/ml auf 8 pH-Werte konditioniert und eine Anbindung von 200 µl auf 50 µl Minisäulen versucht. Die nachfolgenden Salzstufen ermöglichen bei fast allen Resins erst ab 100 mM NaCl eine Elution.



**Abb. 51: Kontourplots: Elutionsversuche mit Lysozym in Minisäulen**

Die einzelnen Kontourplots wurden erzeugt aus summierten Wiederfindungen nach Anbindung bei 8 verschiedenen pH-Werten mit jeweils 200 µl von 0,6 mg/ml Lysozym sowie einer Elution in 6 Stufen (50/100/150/300/500/1000 mM NaCl) in je 2 Fraktionen. Die Kontouren im selben Charakterisierungsraum wie Protein B112 haben einer weniger komplexen Verlauf und sollten mit weniger Koeffizienten modellierbar sein



## 5.8 Modul 3: Frontalchromatographie

Neben weiteren Eigenschaften für Chromatographiematerialien (siehe Tab. 12) wird von Herstellern als wichtige Kennzahl die dynamische Bindungskapazität angegeben. Da sich Proteine wiederum in der Aminosäuresequenz, der Struktur, Molekülgröße und weiteren Eigenschaften unterscheiden sind diese Kapazitäten für jedes Protein unterschiedlich. Die Referenzwerte geben nur einen Hinweis auf mögliche erreichbare Kapazitäten unter bestimmten Konditionen an.

Ein zur Kationenaustauschchromatographie einsetzbares Resin besitzt mitunter bei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten und Konditionen der mobilen Phase unterschiedliche dynamische Bindungskapazitäten. Gerade für den Probenauftrag ist die Kenntnis der maximal möglichen linearen Fließgeschwindigkeit, die zur Ausnutzung der Beladungskapazität des Säulenmaterials verwendet werden kann, ein wichtiger Parameter. Dieser Aspekt spielt vor allem bei der Auswahl der Chromatographiematerialien die zur Reinigung von bestimmten Volumina an Prozesslösungen mit bekannten Proteinkonzentrationen verwendet werden sollen eine entscheidende Rolle.

Da die Adsorption in Mikrofilterplatten mitunter lange Inkubationszeiten benötigt sind diese daher zur Bestimmung weniger geeignet.

Obwohl für Minisäulen nur ein schrittweiser Probenauftrag durchführbar ist, und damit quasi-dynamische (Fluss-)Bedingungen erzeugt werden, sollten diese für die Durchführung der sogenannten Frontalchromatographie geeignet sein. Die experimentelle Aufnahme von Durchbruchkurven in Minisäulen zur Ermittlung der dynamischen Bindungskapazität sollte bei verschiedenen Flussbedingungen vorgenommen werden. Die dynamische Bindungskapazität wird häufig definiert als die Masse gebundenen Proteins pro ml Resin bei 10%igen Durchbruch an Protein in der Aufgangfraktion relativ zur Auftragskonzentration (Durchflusskonzentration [% $c_0$ ]).

Der Fluss der mobilen Phase in Minisäulen wird durch die Zentrifugalkraft erzeugt. Die im Laborbetrieb notwendige Zentrifugalbeschleunigung wird dabei mit der eingestellten g-Zahl bzw. Rotationsgeschwindigkeit an der Zentrifuge eingestellt.

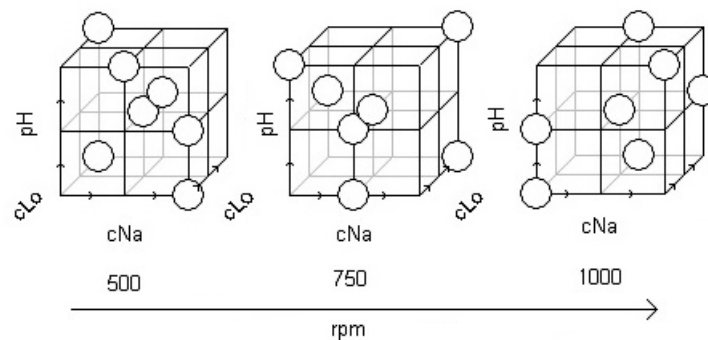
Versuche mit schrittweiser Beladung der Minisäulen in Kombination mit verschiedenen konditionierten Probenlösungen unter Variation der Rotationsgeschwindigkeit von niedrigen und hohen Rotationswerten sollten daher ein Bild liefern, in wie fern sich die Durchbruchkurven unterscheiden. In der praktischen Durchführung bedeutet dies nach den üblichen Vorbereitungsschritten (Regenerieren, Equilibrieren) einen schrittweisen Probenauftrag vorzunehmen und die Durchlauffraktionen bezüglich der Proteinkonzentration zu untersuchen.

Für eine Abschätzung der linearen Fließgeschwindigkeit, die gerade für die Skalierung in größere Säulen eine Rolle spielt, wurde ein Versuch unternommen, die Durchflussvolumina für Lösungen bei verschiedenen Rotationsgeschwindigkeiten für Minisäulen zu ermitteln.

### 5.8.1 Versuchsdesign Durchbruchskurven

Mit *MODDE* wurde ein Versuchsmodell erzeugt, welches die Rotationsgeschwindigkeit der Zentrifuge (und damit die lineare Fließgeschwindigkeit) sowie den pH-Wert, die Natriumchlorid-Konzentration und die Proteinkonzentration der Probenauftragslösung berücksichtigt.

*ATOLL* gibt als operative Einstellung zur Zentrifugation von Minisäulen eine Rotationsgeschwindigkeit von 500-1000 rpm an. Aufgrund von Schätzungen könnte die lineare Fließgeschwindigkeit sehr hoch sein.



**Abb. 52: L18 Versuchsdesign Durchbruchskurven in Minisäulen**

Um einen frühzeitigen Durchbruch zu umgehen und um im Anbindungsbereich zu bleiben, wird die Konzentration von *Lysozym* auf 0,6-2 mg/ml, der pH-Wert auf den Bereich von pH 5-7 und die Salzkonzentration auf 0-100 mM eingegrenzt. Drei Rotationsgeschwindigkeiten sind für Tests ausgewählt wurden. Es sind 8 Faktorkombinationen pro Versuchsblock für jedes Resins möglich, wovon je zwei mit dem doppelten Mittelpunkt (pH 6, 50 mM NaCl und 1,3 mg/ml *Lysozym*) besetzt sind. Die übrigen sechs Plätze stehen für Kombinationen der Protein- und Salzkonzentration sowie dem pH-Wert zur Verfügung. Insgesamt ergeben sich 18 verschiedenen Kombinationen für pH, Protein- und Salzkonzentration sowie 3 Centerpoints bei denen nur die Drehzahl variiert wird.

### 5.8.2 Allgemeines Arbeitsprotokoll für Durchbruchskurven in Minisäulen

Entsprechend dem Versuchsdesign wurden Proben und Puffer konditioniert. Jeder Probenauftrag bei 12 Resins benötigt  $12 \cdot 0,2 \text{ ml} = 2,4 \text{ ml}$ . Mit 60 ml könnten 25 Zyklen durchgeführt werden. Zum Spülen der Säulen wird 1 M NaCl bei pH 7 verwendet da diese Kondition bei allen Resins im Elutionsversuch keine Anbindung zeigte.

**Tab. 19: Versuchsablauf Anbindungsversuch mit Minisäulen und Protein B112**

Schritt	Anzahl	Bezeichnung	UV-Messung
1	2x	H2O	
2	2x	pH (*)+ 0,5 M NaCl	
3	3x	pH (*) + (*)NaCl	
4	16-24x	Durchflussfraktion	x
6	4x	1 M NaCl pH 7	
7	13x	pH 7 +1 M NaCl	(x)
8	2x	20%Ethanol + 0,1 M NaCl	

(\*) jeweiliges Faktor-Level laut Versuchsdesign

(x) Vom 5,10 und 13 Spülzyklus wurde die UV-Absorption gemessen um zu entscheiden ob weiterhin gespült werden muss.

### 5.8.3 Durchbruchskurven Lysozym

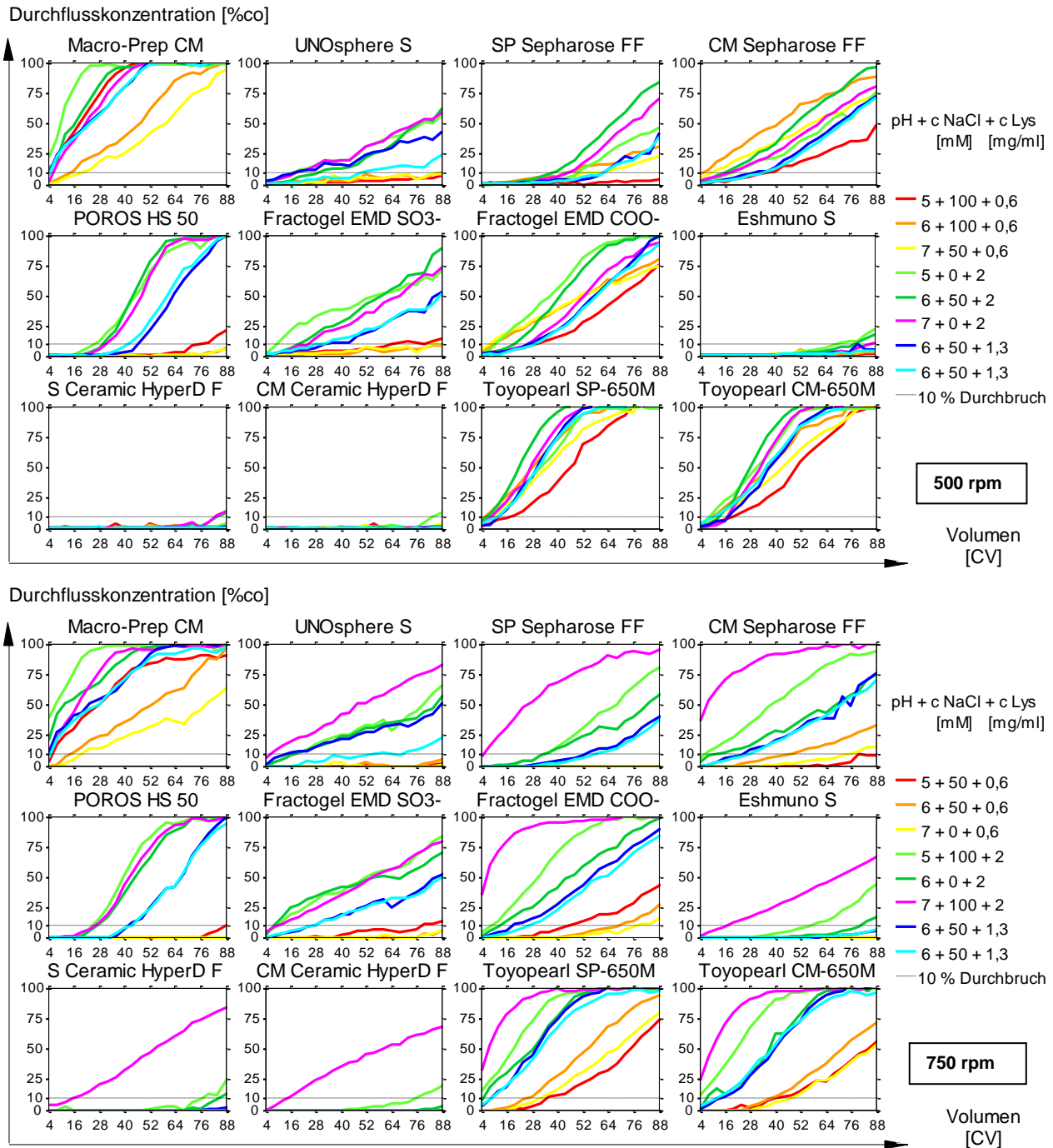
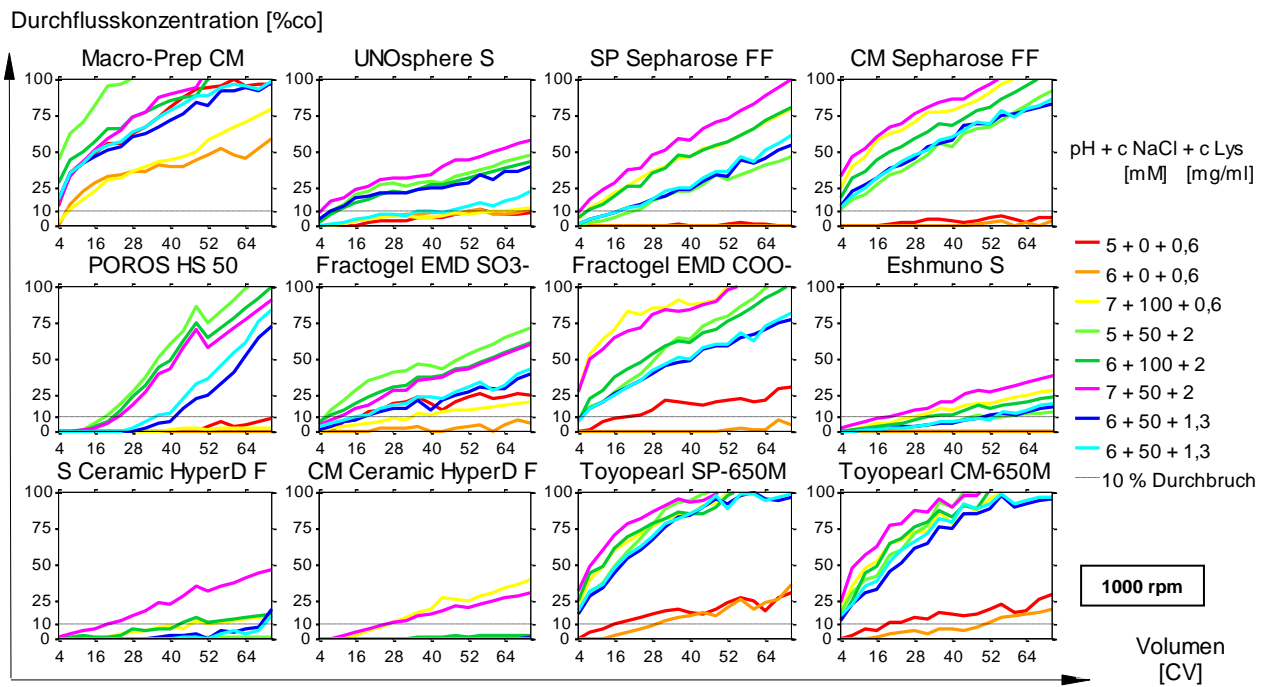


Abb. 53: Durchbruchskurven für Lysozym in 50 µl Minisäulen

Oben: Durchbruchskurven bei 500 rpm

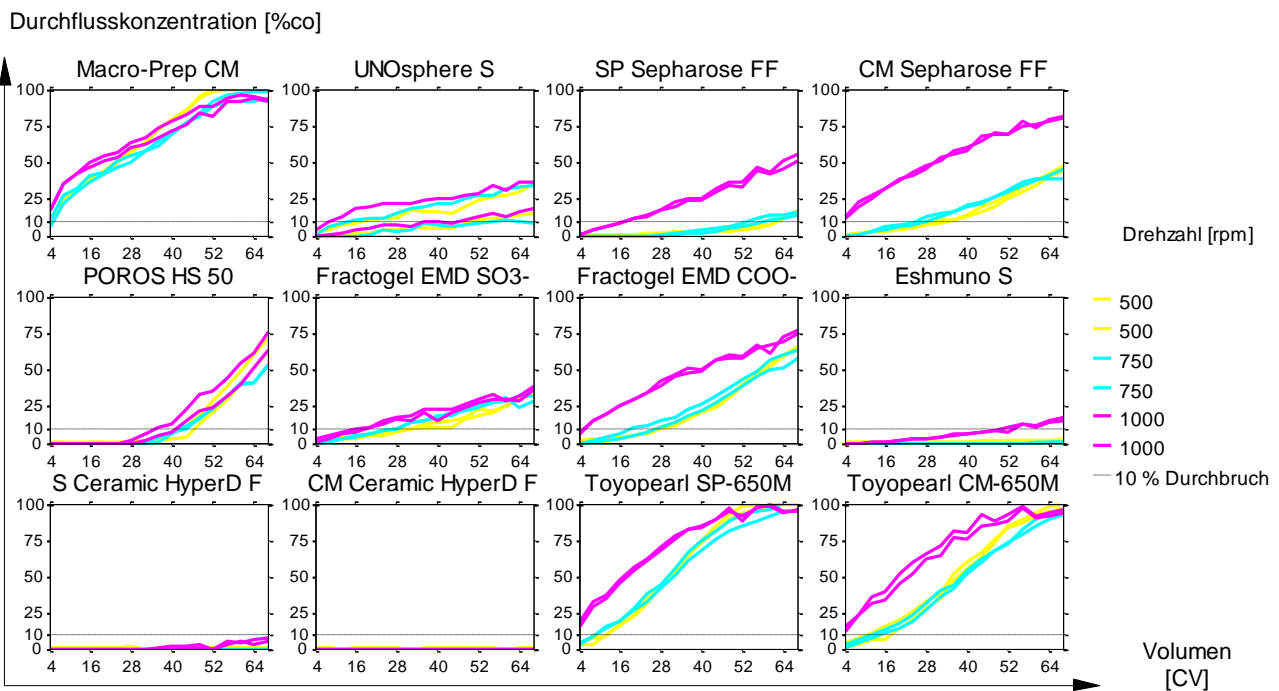
Unten: Durchbruchskurven bei 750 rpm

In allen Versuchsblöcken ist der gleiche doppelte ausgeführte Mittelpunkt bei pH 6, 50 mM NaCl und 1,3 mg/ml Lysozym beibehalten. Für die meisten Resins ist ein frühzeitiger Durchbruch aus den Durchbruchskurven erkennbar. Nur bei den wenigsten Resins kann der erwartete sigmoide Verlauf für Durchbruchskurven erahnt werden (z.B. bei POROS HS 50). Dies ist ein Hinweis darauf dass der lineare Fluss zu hoch ist. Dennoch zeigen ein paar Resins bei einigen Konditionen hohe Kapazitäten, sodass der 10 % Durchbruch nicht erst erreicht wurde.



**Abb. 54: Durchbruchskurven für Lysozym bei 1000 rpm in 50 µl Minisäulen**

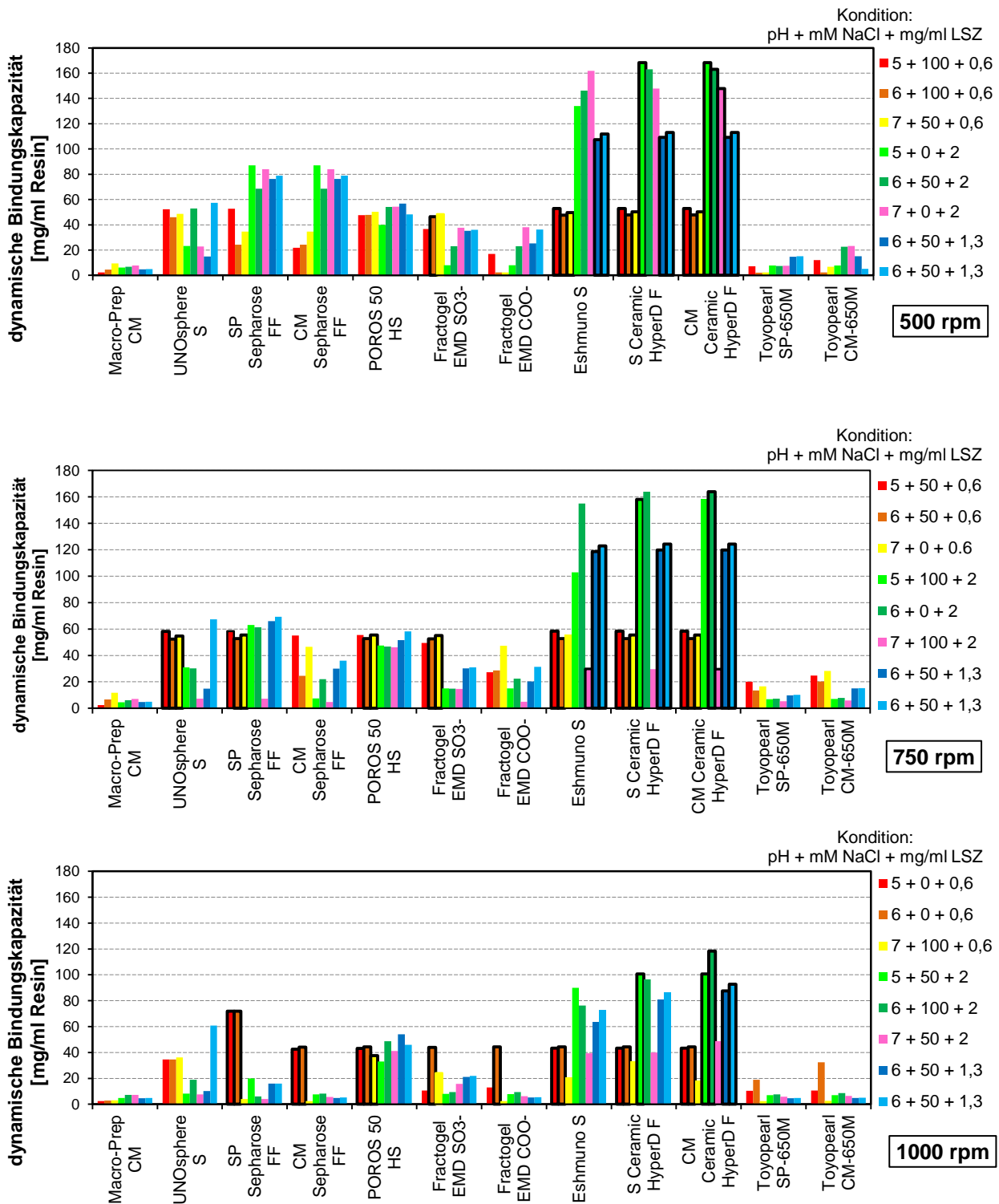
Ähnlich wie bei den meisten Durchbruchskurven im niedrigen Drehzahlbereich, ist schon nach wenigen CV Probenauftrag kaum mehr genügend Kapazität zur Retention von Lysozym vorhanden.



**Abb. 55: Durchbruchskurven L18 Centerpoint**

Die bei 500, 750 und 1000 rpm konstant gehaltene sowie doppelte ausgeführte Faktorkombination pH 6, 50 mM NaCl und 1,3 mg/ml Lysozym ist hier noch einmal separat dargestellt. Bei einigen Resins ist ersichtlich, dass bei 1000 rpm Zentrifugation der Durchbruch eher erreicht wird als bei niedrigeren Drehzahlen, und dass der Unterschied zwischen 500 und 750 rpm eher minimal ist. Auch können Resins identifiziert werden, die schnelle Fließgeschwindigkeiten ohne nennenswerten Durchbruch erlauben würden. Im Idealfall liegen gleichfarbige Kurven übereinander. Die auch bei anderen Versuchen auffällige Säule G von UNOsphere S stimmt nicht mit dem Verlauf von Säule H überein.

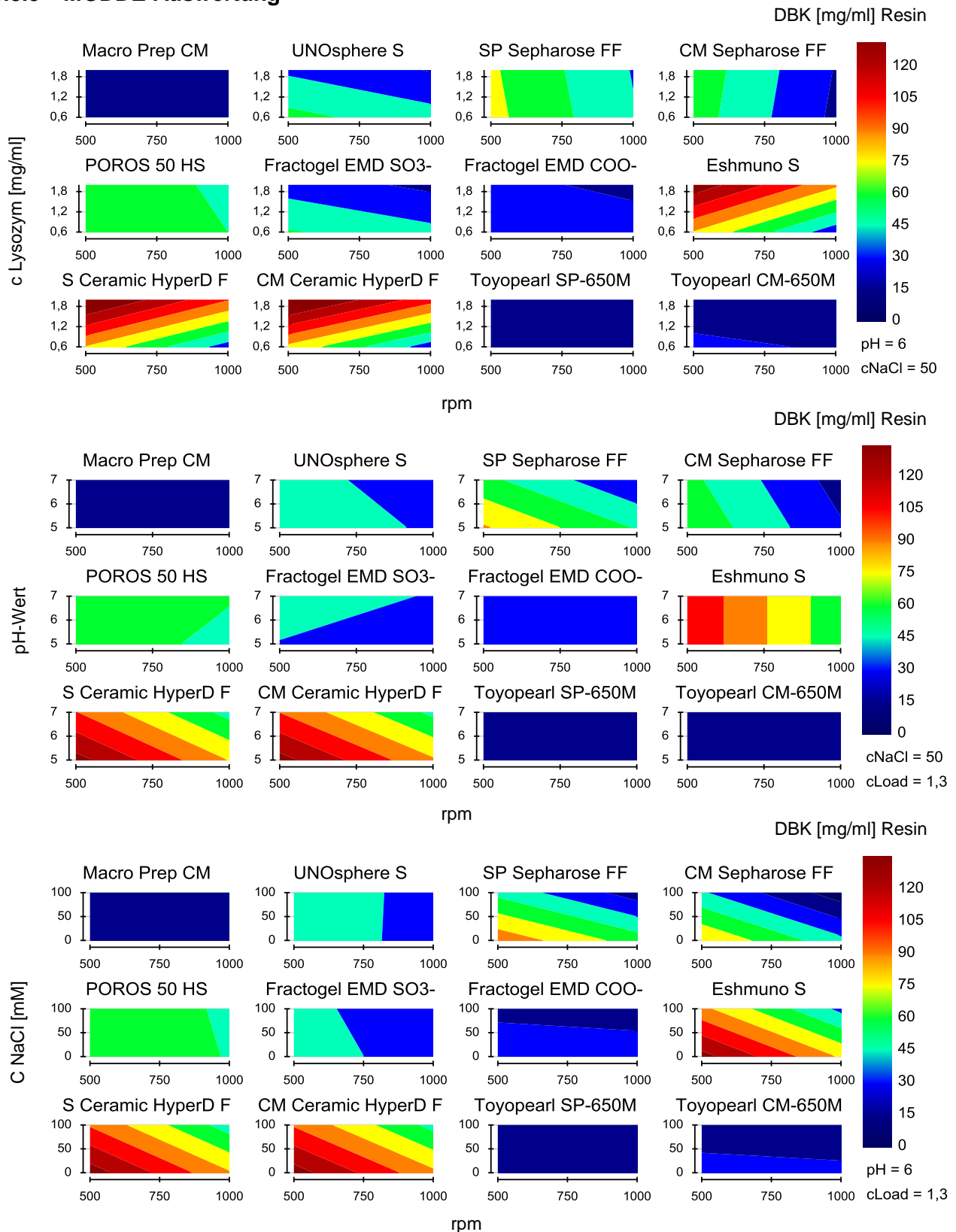
### 5.8.4 Dynamische Bindungskapazitäten für Lysozym



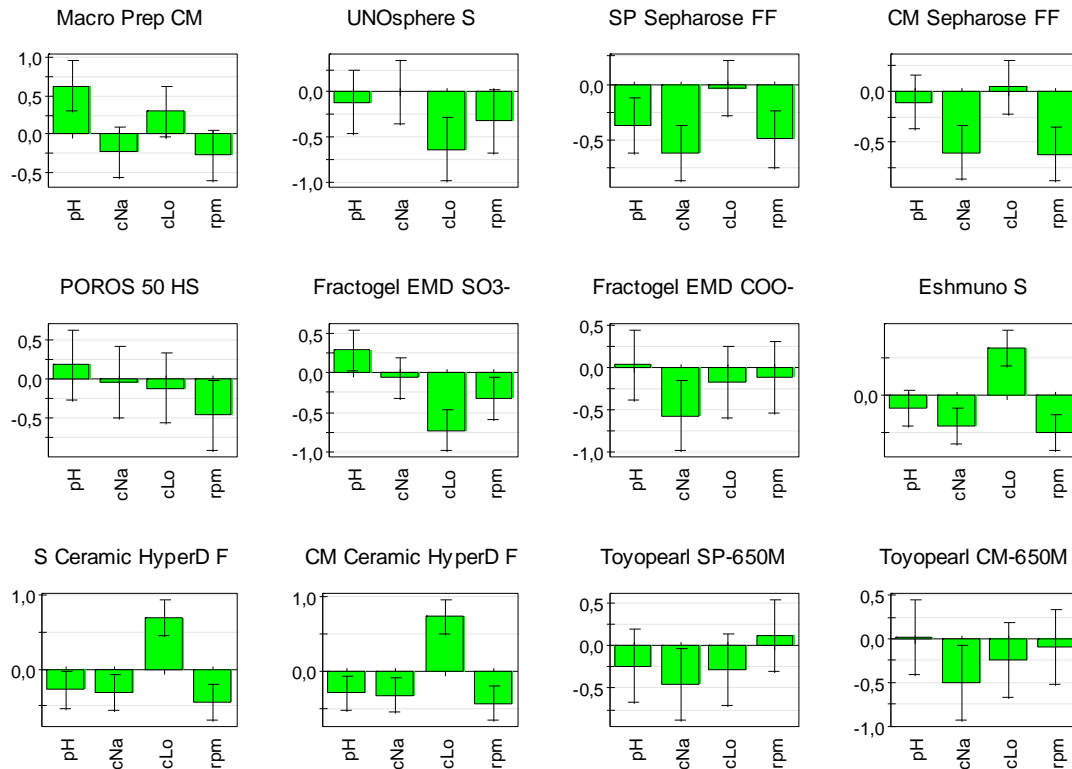
**Abb. 56: Dynamische Bindungskapazitäten für Lysozym in 50 µl Minisäulen**

Die Berechnung der dynamischen Bindungskapazität erfolgt mittels Gleichung 12. Das 10 %-Durchbruchsvolumen wird aus den zuvor gezeigten Kurvenverläufen entnommen und die Proteinkonzentration des Probenauftrags eingesetzt. Bei schwarz eingerahmten Säulen ist der 10 % Durchbruch noch nicht erreicht. Die beiden blauen Konditionen wurden bei allen drei Drehgeschwindigkeiten beibehalten, die restlichen stellen verschiedene Kombinationen für pH, Salz- und der *Lysozym*-Konzentration entsprechend dem L18-Design dar.

5.8.5 MODDE-Auswertung

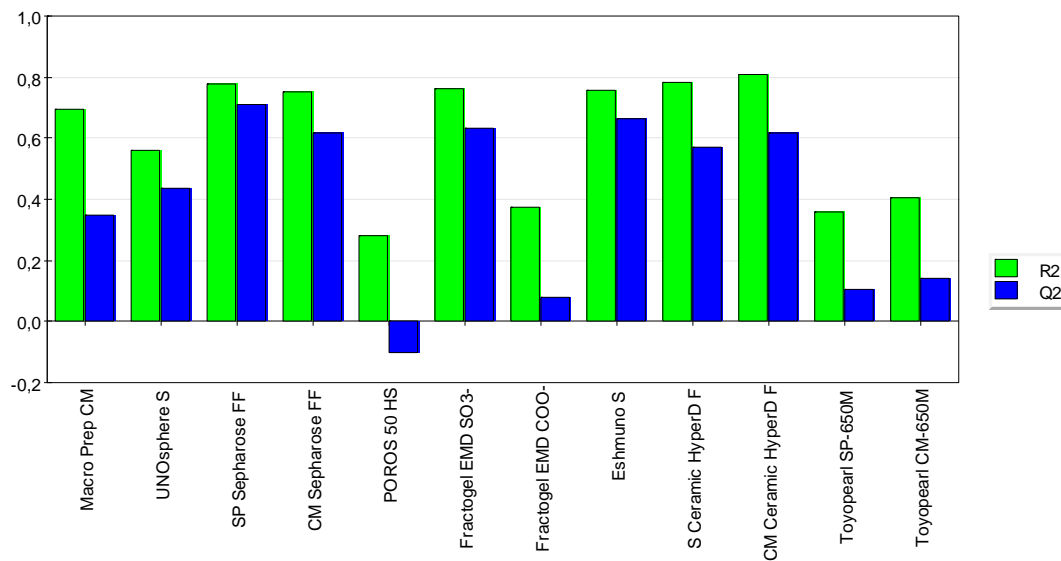


**Abb. 57: MODDE-Kontour-Plots: L18-Design für die dynamische Bindungskapazität von Lysozym in Minisäulen**  
 Es werden jeweils 12 Kontourplots für die dynamische Bindungskapazität von Lysozym bei zwei festgesetzten Faktoren gezeigt.  
**Oben:** Einfluss der Lysozym-Konzentration im Probenauftrag und der Drehzahl bei pH 6 + 50 mM NaCl  
**Mitte:** Einfluss des pH-Wertes im Probenauftrag und der Drehzahl bei 1,3 mg/ml Lysozym + 50 mM NaCl  
**Unten:** Einfluss der NaCl-Konzentration und der Drehzahl bei pH 6 und 1,3 mg/ml Lysozym



**Abb. 58: MODDE-Koeffizientenplot: Lineare Modelkoeffizienten für die Haupteinflussfaktoren auf die dynamische Bindungskapazität von Lysozym in 50 µl Minisäulen**

Darstellung der normalisierten Koeffizienten im gewählten Charakterisierungsraum für die vier Einflussfaktoren. Negative Koeffizienten zeigen an, dass die dynamische Bindungskapazität bei Erhöhung vom niedrigsten auf den höchsten getesteten Wert sinkt, was zumindest für die Drehzahl sowie die Salz- und Proteinkonzentration zu erwarten ist. Positive Koeffizienten für die *Lysozym*-Konzentration wie bei den keramischen Resins spiegeln zwar die in das Modell eingeflossenen Werte wieder, jedoch wurde in den Durchbruchkurven bei diesen Resins der 10 % Durchbruchwert für niedrige und hohe Konzentrationswerte nicht erreicht und somit der gesamte Auftrag bei hohen als auch niedrigen Konzentrationen angebunden. Dieser Anteil ist bei den stärker konzentrierten Lösungen bei gleichen Auftragsvolumen natürlich höher, was sich in einer höheren Kapazität widerspiegelt.



**Abb. 59: MODDE-Statistische Kennzahlen des L18 Designs der dynamische Bindungskapazität von Lysozym**

Für die Keramiken werden (scheinbar) relativ starke Modelle angezeigt, für andere Resins zum Teil schwache Modelle erzeugt, jedoch wurde der 10 % Durchbruch bei diesen Resins nicht erreicht.

### 5.8.6 Durchflusstests

Der Fluss der mobilen Phase in Minisäulen wird per Zentrifugation herbeigeführt. Zur Ermittlung des Volumenstroms in 50  $\mu\text{l}$  Minisäulen wurden die Durchflussvolumina für unterschiedliche Rotationszeiten bei 300, 500, 750 und 1000 rpm über den Wasserabsorptionswert bei 975 nm ermittelt. Mit den Säulenabmessungen kann anschließend die lineare Fließgeschwindigkeit berechnet werden.

#### Versuchsablauf Durchflusstests

Die verwendete Zentrifuge besitzt eine Anfahrts- und Stoppzeit in der bei einigen Drehzahlen schon ein Volumenfluss in den Minisäulen stattfindet. Mit vier Drehzahlen wurde für Haltezeiten zwischen 5 Sekunden und 4 Minuten das aufgefangene Volumen in UV-Platten bestimmt. Als Lösung wurde ein 50 mM Phosphat-Citrat-Puffer mit 150 mM NaCl verwendet.

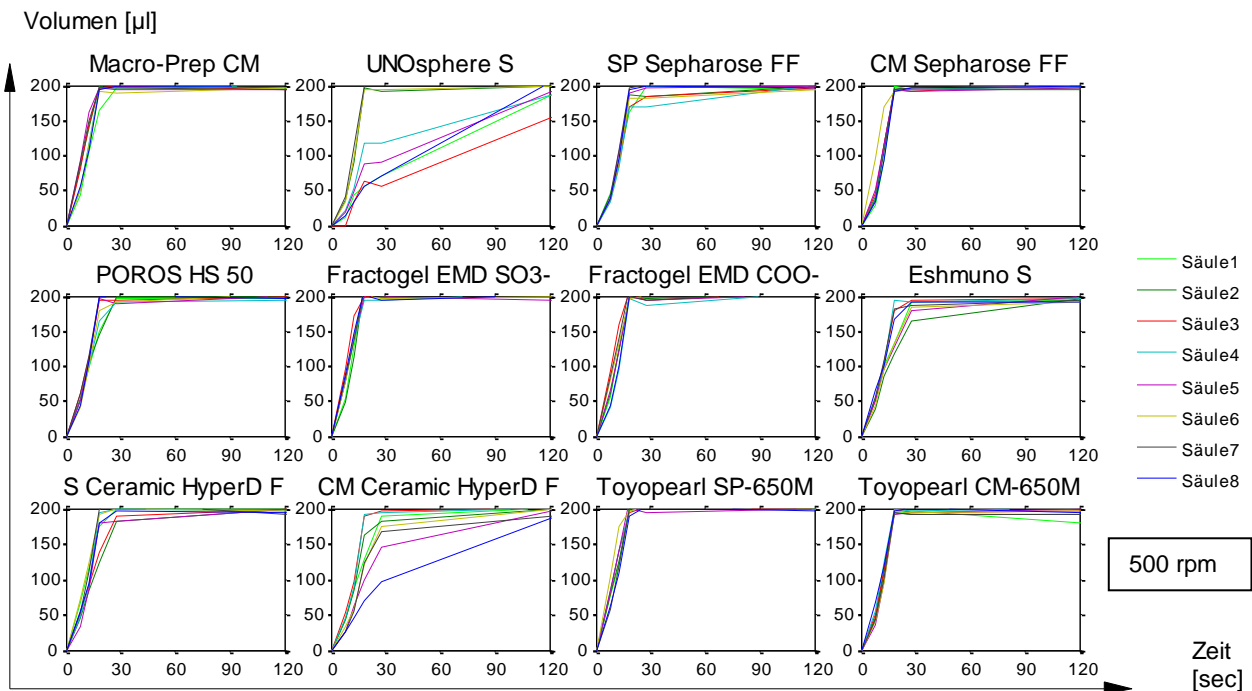
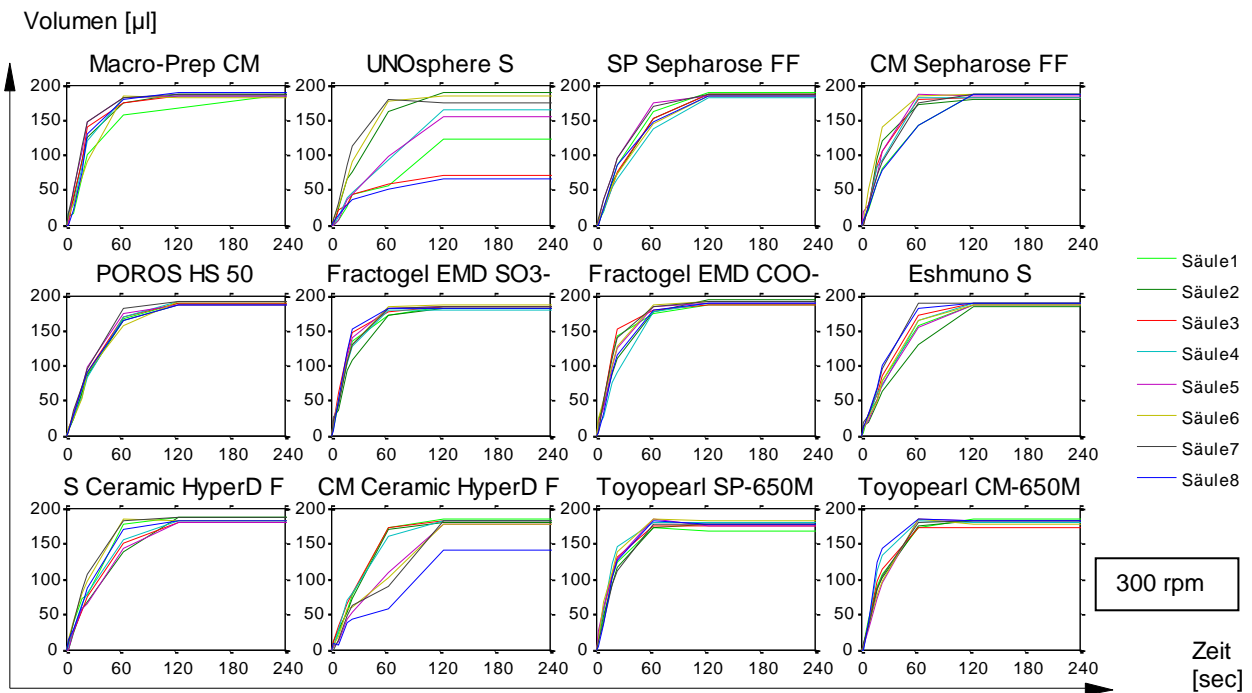
Anfahrt und Stoppen führt bei 300 rpm zu keinem nennenswerten Durchfluss. Bei den anderen Drehzahlen wird schon während dessen ein Fluss verzeichnet. Von den Anfahr- und Haltezeiten wird daher die 300 rpm-Anfahrzeit abgezogen.

Tab. 20: Laufzeiten Durchflusstests

rpm [min <sup>-1</sup> ]	t <sub>0</sub> [sec]	Haltezeit [sec]						
		5	10	15	20	60	120	240
300	3	x	x	x	x	x	x	x
500	13	x	x		x		x	
750	16	x	x		x	x		
1000	17	x	x		x	x		

Es wurden jeweils 200  $\mu\text{l}$  Puffer verwendet. Von den aufgefangenen Durchflussfraktionen wurde nur der 900 und 975 nm Absorptionswert gemessen. Nach einem Lauf bei einer bestimmte Drehzahl und Haltezeit wurde bei 1000 rpm für 1 Minute die restliche Lösung die noch nicht durchgelaufen war abzentrifugiert und dann erst wieder erneut 200  $\mu\text{l}$  aufgetragen. Da bei niedrigen Drehzahlen ein eher geringer Fluss zu verzeichnen ist, wurde dort das Durchflussvolumen über das Restvolumen bestimmt welches bei 1000 rpm noch in einer neuen Platte aufgefangen wurde. Somit wurden für einige Läufe zwei Platten gemessen (Durchfluss- und Restfraktion). Auf den folgenden Seiten wird zunächst das ermittelte Durchflussvolumen über der Zeit aufgetragen. Aus dem linearen Anstieg wird per Regressionsrechnung der mittlere Volumenfluss (Gleichung 14) erhalten und mit den Säulenbettdimensionen (Kapitel 4.5) schließlich die lineare Fließgeschwindigkeit (mit Gleichung 15) berechnet.



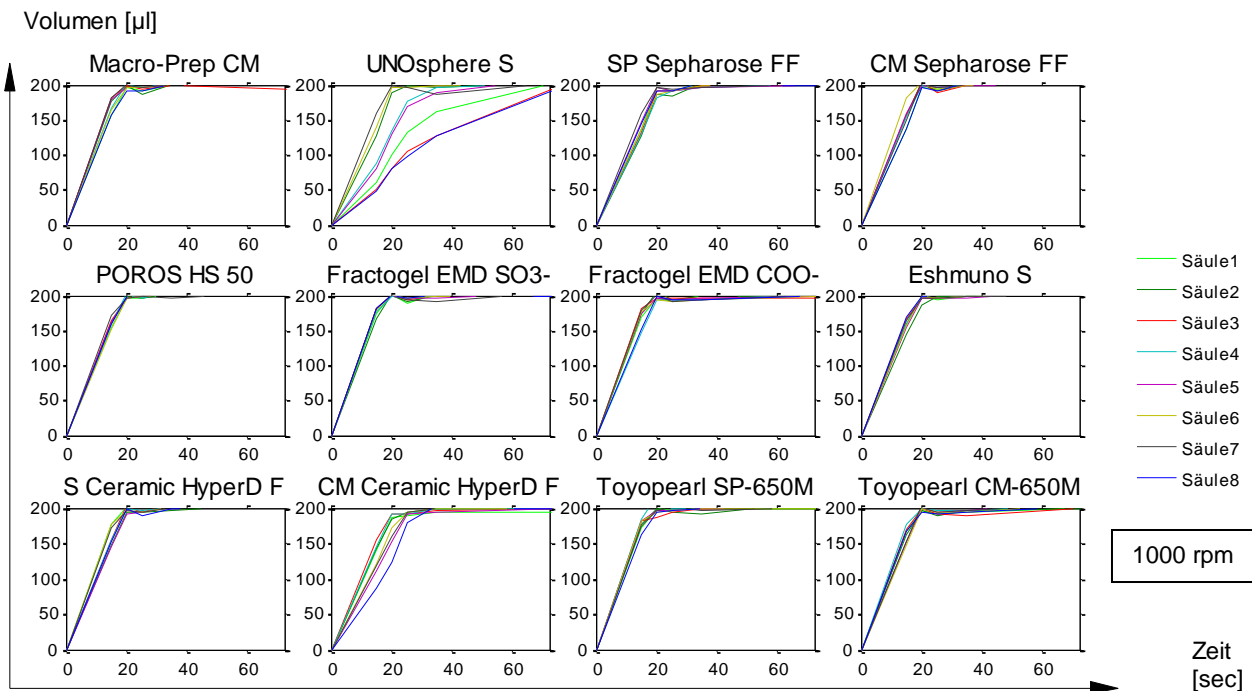
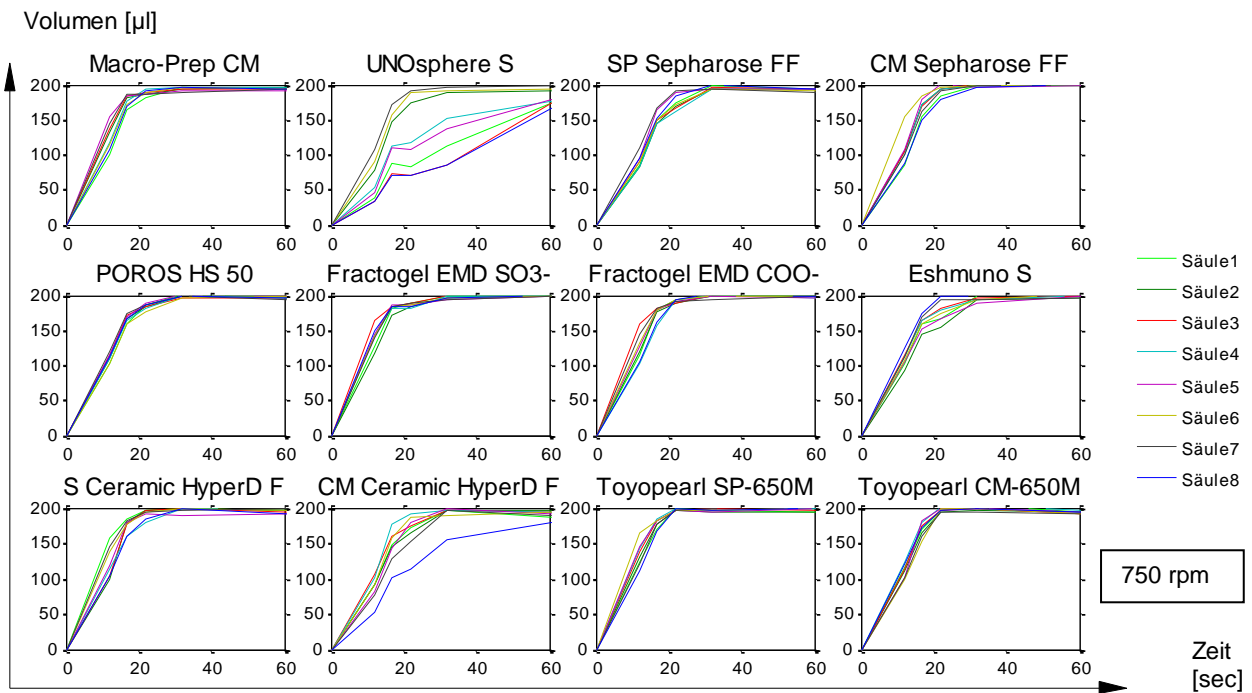


**Abb. 60: Durchflussvolumen in 50 µl Minisäulen**

**Oben:** Durchflussvolumen bei 300 rpm

**Unten:** Durchflussvolumen bei 500 rpm

Es wurden jeweils 200 µl von 50 mM Phosphat-Citrat-Puffer mit 150 mM NaCl aufgetragen, die Laufzeit der Zentrifuge ( *Heraeus Multifuge 3.0*) gestoppt und die Durchflussfraktion in 96-Well *UV®-Star-Platten* über den 975 nm Wasserabsorptionswert gemessen um das Durchflussvolumen zu berechnen. Wäre der Volumenfluss in allen Säulen eines Resins der gleiche, würden die farbigen Kurven übereinander liegen. Einige Säulen zeigen hier wie beim Performance-Test auch ein auffälliges Verhalten (UNOsphere S und CM Ceramic HyperD F). Abgesehen von diesen Resins sind ansonsten 2 Minuten bei 300 rpm und 30 Sekunden bei 500 rpm ausreichend um das aufgetragene Volumen durch die Säulen zu befördern.

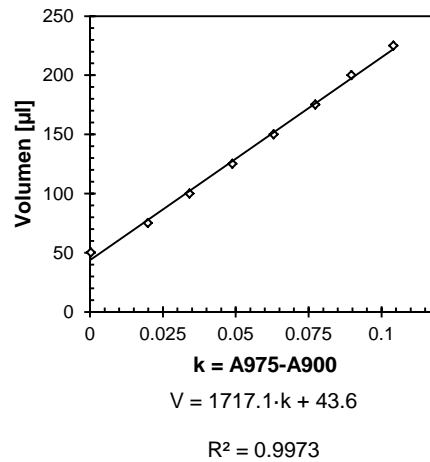


**Abb. 61: Durchflussvolumen in 50  $\mu\text{l}$  Minisäulen**

**Oben:** Durchflussvolumen bei 750 rpm

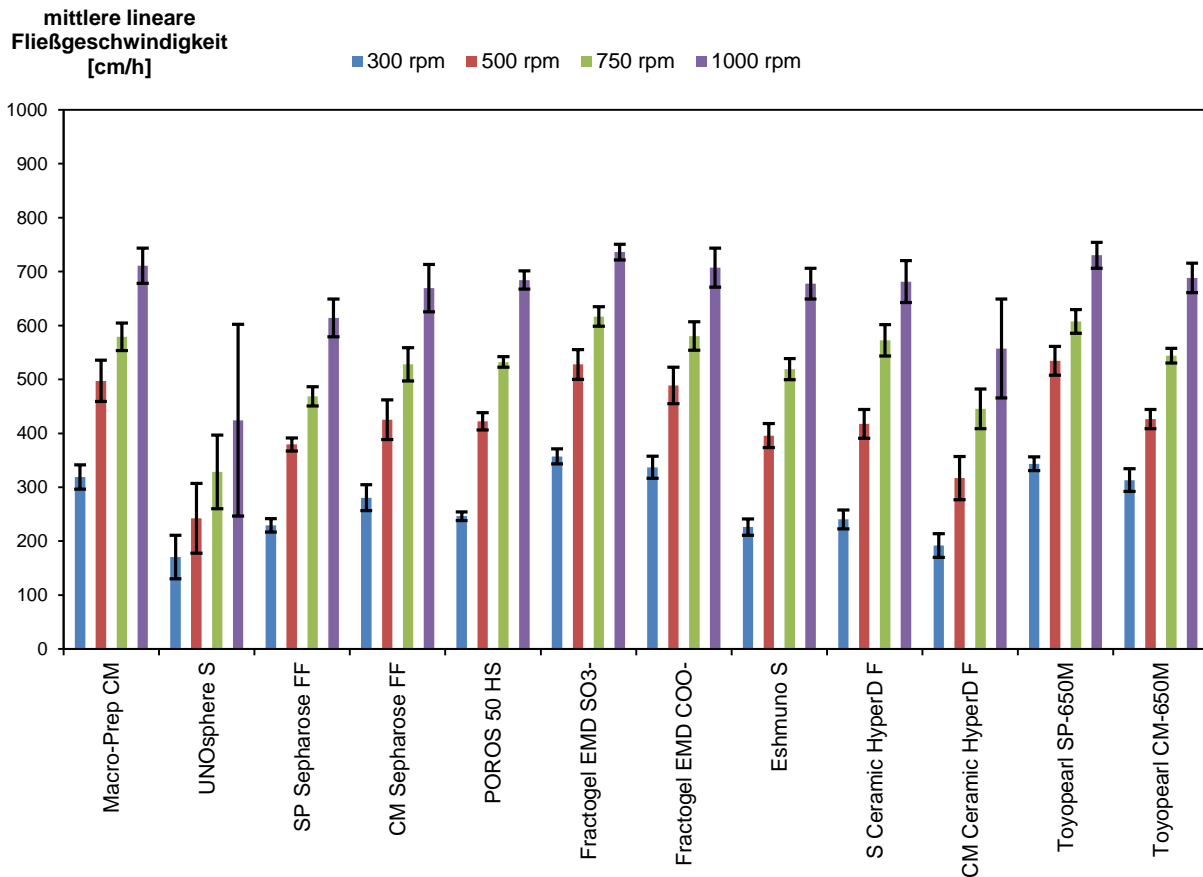
**Unten:** Durchflussvolumen bei 1000 rpm

Es wurden jeweils 200  $\mu\text{l}$  von 50 mM Phosphat-Citrat-Puffer mit 150 mM NaCl bei pH 7 aufgetragen, die Laufzeit der Zentrifuge gestoppt und die Durchflussfraktion in 96-Well UV<sup>®</sup>-Star-Platten über den 975 nm Wasserabsorptionswert gemessen um das Durchflussvolumen zu berechnen. Abgesehen von einigen UNOsphere S-Säulen reichen bei den meisten Säulen etwa 30 Sekunden bei 750 rpm und 20 Sekunden bei 1000 rpm aus um 200  $\mu\text{l}$  durch die Säule zu befördern.



**Abb. 62: Volumen-Analysenfunktion für den verwendeten Puffer (pH 7, 150 mM NaCl)**

Zur Bestimmung der Durchflussvolumen in Minisäulen wurde für den verwendeten Puffer eine Kalibrierfunktion von 50-225 µl Volumen aufgenommen (s. S. 20 Kap 3.2.1 zur Erläuterung der Volumenbestimmung in Wells)



**Abb. 63: Mittlere lineare Fließgeschwindigkeiten in 50 µl Minisäulen in Abhängigkeit der Zentrifugendrehzahl**

Diese Abbildung zeigt die berechneten linearen Fließgeschwindigkeiten für die 12 Kationenaustauscherresins in 50 µl Minisäulen bei vier Zentrifugendrehzahlen. Zunächst wurde aus dem linearen Anstieg des Volumenflusses der Volumenstrom berechnet und mit den Säulenbettabmessungen des Herstellers (2,5 mm Durchmesser und 3,9 mm Betthöhe) der mittlere lineare Fluss für jedes Resins und jede Säule. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Abweichung der Säulen eines Resins vom Säulenmittelwert. Wie zu erwarten ist, steigt mit zunehmender Drehzahl der lineare Fluss an. Es ergeben sich deutlich höhere Werte als erwartet. Die Durchflusstests wurden gegen Ende der Versuche mit Minisäulen durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt war auf den Fritten bei vielen Säulen schon Schmutzpartikel zu erkennen. Falls diese den Fluss hemmen, wäre in neuen Säulen der Anfangsfluss sogar noch höher.

## 5.9 Modul 4: Adsorptionsisothermen

Adsorptionsisothermen liefern wichtige Informationen über die maximal mögliche Bindungskapazität eines Resins für ein Protein unter bestimmten Bedingungen. Das Modell für einen einfachen Adsorptionsprozess kann mittels der Langmuir-Adsorptionsisotherme beschrieben werden. Für Mehrkomponentensysteme stehen weitere Modellgleichungen zur Verfügung.

Im Versuch werden entweder verschiedene Konzentrationen an Protein mit derselben Menge Chromatographiematerial, oder verschiedene Mengen Chromatographiematerial mit gleichen Konzentrationen aber unterschiedlichen Volumen Proteinlösung vermischt und anschließend die Konzentration an Protein in der flüssigen Phase nach einer Inkubation bestimmt. Nach einer genügend langen Inkubationszeit (Schüttelzeit) zwischen 3-6 Stunden entsteht ein stabiles Verteilungsgleichgewicht zwischen der festen und flüssigen Phase bezüglich der Konzentration an adsorbierten und gelöstem Protein. Über die Abnahme der Konzentration in der Durchflussfraktion kann dann die adsorbierte Proteinmenge im Gleichgewicht berechnet werden.

Es ist zu erwarten, dass wie das prinzipielle Anbindungsverhalten für Proteine in der Ionenaustauschchromatographie auch, die maximal adsorbierende Proteinmenge mit steigendem Salzgehalt sinkt und zudem pH-Wert und Protein abhängig ist. Die von den Herstellern angegebenen Bindungskapazitäten für Referenzproteine zeigen recht unterschiedliche Werte und liegen in einem Bereich von 25-250 mg/ml Resin.

Dynamische Bindungskapazitäten in Säulen zu erzeugen, die weitestgehend an die maximale Kapazität heranreichen wäre wünschenswert um die Kapazität für ein Material bestmöglich auszunutzen. Am sinnvollsten wäre es demnach, zuerst die Adsorptionsisothermen für ausgewählte Konditionen (die zuvor in Anbindungsversuchen ermittelt wurden) aufzunehmen. Mit diesen Ergebnissen können dann anschließend Durchbruchkurven für einige Konditionen bestimmt werden bei denen eine hohe Gleichgewichtsbindungskapazität gemessen wurde. Anschließend sollte versucht werden die dynamische Bindungskapazität bestmöglich an die statische Bindungskapazität heranzuführen.

### 5.9.1 Allgemeines Arbeitsprotokoll Adsorptionsisothermen

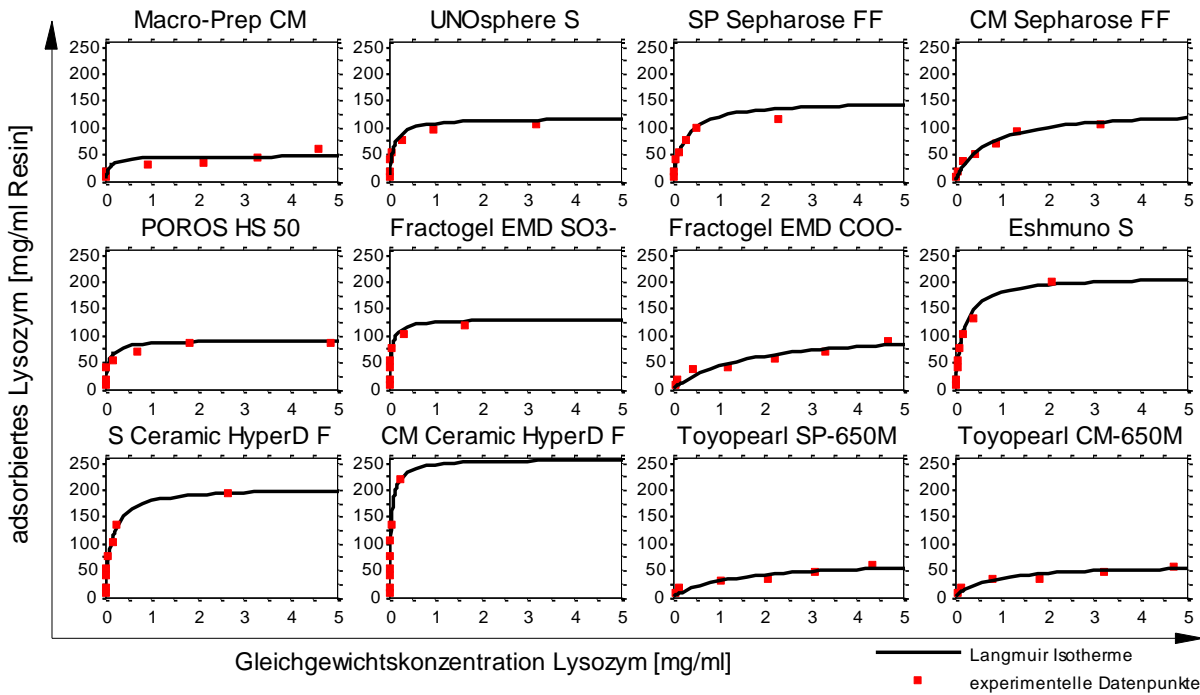
Mikrofilterplatten werden mit 50 % Slurrys gefüllt und die üblichen Vorbereitungen (Regeneration, Equilibrieren usw.) getroffen. Für Adsorptionsisothermen ist die Aufnahme mehrerer Gleichgewichtszustände bei unterschiedlichen Proteinbeladungen zu testen. Es wird nur die Konzentration in der Durchflussfraktion gemessen (mit neuen Lösungen stellt sich ein neues Gleichgewicht ein).

**Tab. 21: Versuchsablauf Adsorptionsisothermen in Mikrofilterplatten für Lysozym**

Schritt	Anzahl	Bezeichnung	UV-Messung
1	2x	H <sub>2</sub> O	
2	2x	pH 6 + 0,5 M NaCl	
3	4x	pH 6 + 50 mM NaCl	
4	1x	Durchflussfraktion	x

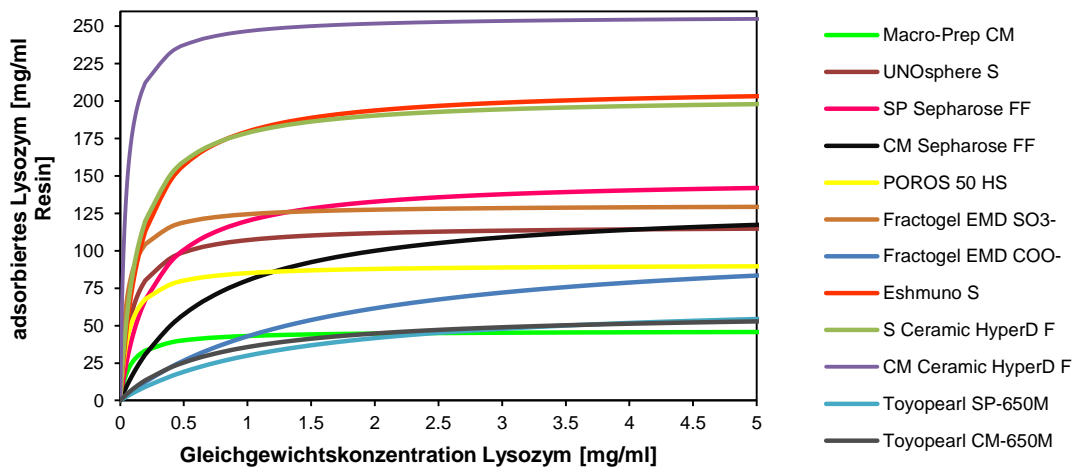
### 5.9.2 Adsorptionsisothermen für Lysozym

Im Versuch wurden 20 µl Resins eingesetzt (entspricht 40 µl eines 50 % Slurrys), geringere Volumen können nach eigener Einschätzung nicht mehr mit ausreichender Genauigkeit pipettiert werden. Als Versuchsprotein wurde *Lysozym* verwendet da es auch in hohen Konzentrationen einfach zu konditionieren ist. Es wurden für den Mittelpunkt des vorher beschriebenen L18-Designs für Durchbruchkurven die Adsorptionsisotherme bei 8 *Lysozym*-Konzentrationen (1/2/4/6/8/10/15/25 mg/ml *Lysozym*) in der Auftragslösung aufgenommen.



**Abb. 64: Adsorptionsisothermen *Lysozym* bei pH 6 und 50 mM NaCl**

Load: je 200 µl 1/2/4/6/8/10/15/25 mg/ml *Lysozym* und 20 µl Resin, Inkubationszeit 6 h bei 1200 rpm. Die Werte für  $q_{max}$  und  $K_d$  wurden mit der *Excel-Solver*-Funktion für die experimentellen Datenpunkte ermittelt und die Langmuir-Isotherme nachgezeichnet. An der Höhe des Plateaus kann die maximale Bindungskapazität abgelesen werden.



**Abb. 65: Vergleichsplot Adsorptionsisothermen *Lysozym***

Überlagerung aller vorher gezeigten Adsorptionsisothermen für *Lysozym* bei pH 6 und 50 mM NaCl. Die höchste Bindungskapazität für *Lysozym* ist für CM Ceramic HyperD F, S Ceramic HyperD F und Eshmuno S ermittelt worden. Dieselben Resins zeigten auch bei den dynamischen Bindungskapazitäten die höchsten Werte.

## 6 Ergebnisse

### ***Phosphat-Citrat-Puffer***

Für alle Versuche wurde dasselbe Puffersystem im Bereich von pH 3-7 verwendet. Bezüglich der Gesamtmolarität von Citrat und Phosphat wurde eine Skalierung des ursprünglichen Pufferrezeptes auf 50 mM vorgenommen. Puffer bei verschiedenen pH-Werten und Salzkonzentrationen wurden mit drei Stocklösungen (1 M Citronensäure, 0,4 M Dinatriumhydrogenphosphat, 5 M Natriumchlorid) und Wasser hergestellt. Der sich ergebende pH-Wert weicht im Mittel um  $\pm 0,2$  pH-Einheiten vom Sollwert ab. Mit steigender Salzkonzentration sinkt der sich einstellende pH-Wert um bis zu 0,4 pH-Einheiten unter den Sollwert ab und musste daher stets nachkorrigiert werden. Die sich ergebenden Leitfähigkeiten bei einer Salzstufe steigen von pH 3-7 um 3-4 mS/cm an. Ursache hierfür ist die ansteigende Phosphat-Molarität gegenüber der abnehmenden Citrat-Molarität im Pufferrezept und weiterhin die notwendige Nachkorrektur mit  $\text{Na}^+$ -haltigen Phosphatstocklösungen. Derselbe Anstieg der Leitfähigkeit ist auch für konditionierte Proteinlösungen zu verzeichnen.

Damit ergeben sich wichtige Konsequenzen für die Versuche mit Kationenaustauschern. Besser wäre die Verwendung eines Puffersystems, das eine konstante Natrium-Konzentration bei verschiedenen pH-Werten mit in die mobile Phase einbringt. In den Versuchen spielt die Konzentration von Natriumchlorid als variabler Faktor eine wichtige Rolle denn Natrium agiert als positiv geladenes Gegenion zum Resinliganden für die Elution von gebundenen Proteinen.

Eine Überprüfung der pH-Werte nach 2 Monaten Standzeit zeigte nur geringfügige Unterschiede zum eingestellten Sollwert von 0,01-0,1 pH-Einheiten. Allerdings konnten bei einigen Puffern vermehrt Partikel in den Lagergefäßen festgestellt werden, bei denen es sich womöglich um Staub oder auch mikrobielles Wachstum handelte. (s. S. 36 Kap. 5.2)

### ***UV-Absorptionsmessung***

Für die Absorptionsmessung konnte sichergestellt werden, dass 96-Well UV<sup>®</sup>Star-Microplates mehrfach verwendet werden können. Es wurden einige Platten mehr als 40mal in unterschiedlichen Versuchen verwendet wobei zum Erhalt der nur 130  $\mu\text{m}$  dünnen Wellböden ein sorgsamer Umgang entscheidend war. Von den gemessenen UV-Werten wurde stets der Messwert bei 900 nm abgezogen um die Absorption des Wellbodens und des Puffers zu berücksichtigen.

Für Proteine wurde einmal eine Kalibrierung unterhalb von 1 AU vorgenommen und für alle Versuche mit dem jeweiligen Protein verwendet. Für *Lysozym* und *BSA* wurden dafür Stocklösungen mit verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Bei Durchbruchkurven und Adsorptionsisothermen wurde zum Teil über dem Kalibrierbereich gearbeitet, Proben mussten dort verdünnt werden. (s. S. 38 Kap. 5.3).

### **Volumenbestimmung in Wells**

In den Versuchen wurde das Volumen von Durchfluss- und Filtrationsfraktionen über den Wasserabsorptionswert bei 975 nm bestimmt. Dazu wurden Kalibrierungen mit unterschiedlich konzentrierten Proteinlösungen bei 8 pH-Werten und verschiedenen Salzkonzentrationen und definierten Volumen in 96-Well-UV<sup>®</sup>Star-Platten vorgenommen und eine mittlere Analysenfunktion aller Daten gebildet. Für die Volumenbestimmung mit der mittleren Analysenfunktion für alle möglichen Kombinationen für ein Protein bezüglich des pH-Wertes und der (Salz-)Konzentration konnte der mögliche Fehler auf 6-10 µl bei 200 µl Sollvolumen herausgestellt werden, der im Bereich des Volumenpipettierfehlers liegt (siehe S. 41 Kap. 5.4).

### **Performance-Tests Minisäulen**

Der von dem ersten Versuch mit 96 Minisäulen erzeugte Überlagerungsplot für BSA bei pH 4,5 und 2,5 mg/ml in allen Säulen (s. S. 43 Abb. 23) zeigt bei fast allen Resins eine Übereinstimmung im Kurvenverlauf. Ein Resin (UNOsphere S) zeigte bei vier Säulen abweichendes Verhalten, womöglich durch Packungsunterschiede des Säulenbettes.

Ein weiterer Performance-Test mit B112 bei pH 5 und 2,5 mg/ml nach 10 weiteren Versuchen in Minisäulen gegen Ende der experimentellen Phase zeigte bei den meisten Resins (bis auf das zuvor genannte) immer noch eine Übereinstimmung der Kurvenverläufe (s. S. 44 Abb. 21).

Wenn sich keine Lösung nach der Zentrifugation in den Minisäulen befindet, kann die Filterfritte die nach oben hin das Säulenmaterial abdeckt begutachtet werden. Nach 17 Versuchen mit Minisäulen sind auf fast allen Resins farbige Rückstände (Fusseln, Fasern, Staub oder Algenrückstände) aus der Raumluft oder den Puffern beim Lösungsauftrag herkommt zu erkennen.

### **Performance-Tests Mikrofilterplatten**

Der Performance-Test in Mikrofilterplatten wurde in allen 96 Wells bei identischen Lösungskonditionen mit Protein B112 bei pH 5 und 2,5 mg/ml sowohl per Vakuumfiltration als auch mittels Zentrifugation ausgeführt. Die Kurvenverläufe die mittels Filtration per Zentrifugation für den Anbindungs- und Elutionsversuch in 4 Salzkstufen erhalten wurden zeigen bei fast allen Wells eines Resins und bei fast allen Resins 100 %ige Übereinstimmungen und decken sich weitestgehend mit dem Kurvenverlauf des zuvor beschriebenen Versuchs in Minisäulen (s. S. 45 Abb. 22).

Die Kurvenverläufe die per Vakuumfiltration erhalten wurden sind von schlechterer Qualität bezüglich der Minisäulen und der Übereinstimmung der Wells eines Resins (s. S. 45 Abb. 23). Bei der praktischen Durchführung mit Protein B112 fiel auf, dass am Boden bis zu 50 µl große Tropfen der Elutionsfraktionen nicht abfiltriert werden und daher für eine UV-Messung nicht verfügbar sind. Dieses Phänomen konnte bei Filtration per Zentrifugation überhaupt nicht beobachtet werden. Eine Erhöhung von Vakuumdruck und Saugzeit brachte nur begrenzt Erfolg.

## **Anbindungsversuche**

Für das Protein *B112* wurde derselbe Anbindungsversuch mit 40 Kombinationen aus 8 pH-Werten und 5 Salzkonzentrationen bei ca. 2,5 mg/ml Protein *B112* jeweils in 5 Blöcken in Minisäulen und Mikrofilterplatten durchgeführt. Die Ergebnisplots liefern für die einzelnen Resins ein ähnliches Aussehen für das prinzipielle Anbindungsverhalten (s. S. 50 Abb. 28 und Abb. 29).

Es fällt jedoch auf das geringfügige Unterschiede vorliegen. Der Betrieb per Vakuumfiltration zur Absaugung der mobilen Phase aus Mikrofilterplatten mit Protein *B112* Lösungen führt zu einer vermehrten Tropfenbildung an den Filterplattenboden in der Mitte des Arrays die auch durch eine Erhöhung des Saugdruckes und der Saugzeit nicht entfernt werden können. Für die Absorptionsmessung einer Fraktion steht dieses Volumen nicht zur Verfügung stehen bzw. die nachfolgende Fraktion fängt dieses auf. Entsprechend sind die Kontourplots der Mikrofilterplatten besonders dann verschmiert, wenn kein Protein anbindet und in die nächste Fraktion verschleppt wird.

Ein weiterer Versuch in Minisäulen in kleineren Abständen des pH-Wertes und der Salzkonzentration zeigte, dass auch minimale Unterschiede (0,2 pH-Einheiten und 15 mM NaCl) registrierbare Unterschiede in den einzelnen Resins hervorrufen (s. S. 59 Abb. 45).

## **Datenauswertung mit MODDE**

Um zu ermitteln, ob der Versuchsumfang für Anbindungsversuche reduzierbar ist und dabei trotzdem aussagekräftige Kontourplots für das Anbindungsverhalten möglich sind, wurden 4 Versuchsdesigns mit *MODDE* erzeugt, die jeweils mit 5, 7, und zweimal 9 Faktorkombinationen auskommen (voll-faktorielles  $2^2$ -Design mit 5, *Doehlert* mit 7, *CCF* und *CCI* mit 9 Läufen). Ein Teil der zur Modellierung notwendigen Daten konnte dem vorigen Anbindungsversuch entnommen werden, zum Teil wurden auch neue Datenpunkte für neue Faktorkombinationen experimentell ermittelt.

Die mit *MODDE* erzeugten Datenmodelle besitzen unterschiedliche Qualität. Zwar werden zum Teil scheinbar aussagekräftige Modelle mit hohen  $R^2$  und  $Q^2$ -Werten erzeugt, jedoch besitzen die Term-Koeffizienten mitunter hohe Spannweiten. Wie aus dem Datenmodell für das Multi-Level-Design mit 40 Datenpunkten ersichtlich ist, benötigen einige Resins (meistens schwache Kationenaustauscher) für ihre Anbindungsplots sowohl quadratische, kubische als auch Interaktionsterme um die Rohdaten entsprechen adäquat darzustellen. Starke Kationenaustauscher hingegen kommen für Protein *B112* zu meist mit linearen und einem quadratischen Koeffizienten aus (s. S. 48/49 und Abb. 26).

Das einfache  $2^2$ -Design ist nicht in der Lage dieses Verhalten zu erfassen (s. S. 51). Mit dem *Doehlert* (s. S. 53), *CCF* (s. S. 55) *CCI* (s. S. 57) können (in dieser Reihenfolge) zum Teil bessere Modelle erzeugt werden. Zwar besitzen die verwendeten Kationenaustauscher die Fähigkeit zur selektiven Bindung für Protein *B112*, jedoch ist diese von der Kondition abhängig und nicht bei allen Resins gleich im Kontourplot verteilt. Einige Versuchsdesigns treffen zufällig geeignete Stellen im Anbindungsplot wodurch wichtige Koeffizienten für die Datenmodelle erzeugt werden können. Dies ist aber nicht für alle Resins der Fall.



### **Elutionsversuche**

Mit Protein *B112* wurde sowohl in Minisäulen als auch in Mikrofilterplatten (per Vakuumfiltration) ein Elutionsversuch bei gleichen Konditionen durchgeführt und zusätzlich in Minisäulen zweimal, einmal zu Beginn der experimentellen Phase und fast zwei Monate später. Dazu wurde Protein *B112* auf 8 pH-Werte zwischen pH 3-7 und ca. 2,5 mg/ml konditioniert. Nach entsprechender Vorbereitung der Resins wurden je 200 µl Probe aufgetragen, zweimal mit Equilibrierungspuffer gewaschen und anschließend in bis zu 6 Salzstufen je zweimal eluiert.

Mit *Lysozym* wurde ein identischer Elutionsversuch bei 0,6 mg/ml *Lysozym* im Probenauftrag vorgenommen.

### **Elutionsversuche in Minisäulen**

Die in Pseudochromatogrammen (s. S. 61 Abb. 46) dargestellten relativen Proteinwiederfindungen der eluierten *B112*-Proteinmassen zeigen in den beiden Minisäulenversuchen ein ähnliches Profil. Bei dem ersten Elutionsversuch sind einige Peaks etwas stärker spitz nach oben hin ausgeprägt. Die Elutionszeiten bei den unterschiedlichen Salzstufen und pH-Konditionen sind aber weitestgehend identisch, was sich in der Übereinstimmung der Farbverlaufplots zeigt, die aus der Summation der bis zu einer bestimmten Salzstufe nicht eluierten Proteinmenge bei einem bestimmten pH-Wert erzeugt werden.

Bemerkenswert an dieser Stelle ist, dass der wie im vorigen Abschnitt beschrieben und erzeugte Kontourplot von Elutionsversuchen ein fast übereinstimmendes Farbprofil wie der Anbindungsversuch für Protein *B112* bei 40 Konditionen erzeugt. Diese 40 Konditionen entsprechen im Übrigen auch den Salzstufen bei den im Versuch eluiert wurde, sowie noch zwei weiteren (500 und 1000 mM NaCl) bei denen kein Anbindungsversuch unternommen wurde.

Damit ist gezeigt, dass der Anbindungskontourplot der Minisäulen für Protein *B112* genauso auch über eine mehrstufige Salzelution erzeugt werden kann (vergl. S. 50, S. 62 und S. 63)

Diese Tatsache wurde zur Aufwandsminimierung genutzt um das Anbindungsverhalten für *Lysozym* über diese Art von Versuch zu ermitteln (s. S.64 Abb. 50).

### **Elutionsversuche in Mikrofilterplatte**

Der Elutionsversuch in der Mikrofilterplatte mit *B112*, ausgeführt mittels Vakuumfiltration, liefert trotz der genannten Probleme bei der Absaugung, einen zu den beiden in Minisäulen bzw. in Mikrofilterplatten durchgeführten Anbindungsversuch bei 40 Konditionen ähnlichen Kontourplot (s. S. 63 Abb. 48). Die Elution wurde jedoch nur bis zur 4 Salzstufe durchgeführt (entspricht 10 Fraktionen mit Probenauftrag und 2 Waschschritten). Grund hierfür ist das Auftreten desselben Phänomens das auch bei dem Performance-Test in einer Mikrofilterplatte per Vakuumfiltration auftrat. Da jede Salzstufe immer zweimal appliziert wird, und sich die nicht abgesaugte Lösung im Well mit der neuen vermischt wird das Protein zeitverzögert sowie Volumen-verschoben eluiert.

## **Frontalchromatographie**

Für *Lysozym* wurden einige Durchbruchskurven in Minisäulen aufgenommen. Mit *MODDE* wurde dazu ein L18 Versuchsdesign erzeugt, welches in 3 Versuchsblöcken die Aufnahme von Durchbruchskurven zur Bestimmung der dynamischen Bindungskapazität bei verschiedenen Konditionen ermöglicht. Als Einflussfaktoren wurden der pH-Wert, die Natriumchlorid-Konzentration, die Protein-Konzentration im Probenauftrag und die Rotationsgeschwindigkeit bei jeweils drei Einstellungen variiert.

Um eine Aussage über die sich bei einer bestimmten Drehzahl ergebende lineare Fließgeschwindigkeit in 50 µl Minisäulen treffen zu können, wurden Durchflusstests für Pufferlösungen bei verschiedenen Drehgeschwindigkeiten und Drehzeiten mit der verwendeten Zentrifuge durchgeführt.

### **Durchbruchskurven**

Die Form der Durchbruchskurven ist bis auf wenige Resins kaum als Sigmoide zu erkennen. Zusammen mit dem frühen Durchbruch bei vergleichsweise guten Anbindungsbedingungen des stark basischen Proteins (*Lysozims*) und relativ niedrigen Probenauftragskonzentrationen dürfte die lineare Fließgeschwindigkeit dafür verantwortlich sein. Jedoch konnte nicht bei allen Resins für alle getesteten Konditionen ein 10 %-Durchbruch der Probenauftragskonzentration in der Durchbruchfraktion erreicht werden, was für eine hohe dynamische Bindungskapazität bei diesen Resins und Konditionen spricht (s. S. 45 Abb. 53 und S. 68 Abb. 54).

Das L18-Design für 4 Faktoren in 18 + 6 Läufen (6 Mittelpunkte) mit linearen Termen spiegelt zumeist die real zu erwartenden Verhältnisse richtig wieder. Mit *MODDE* erzeugte Daten-Modelle bestätigen das erfahrungsgemäße Verhalten für die Veränderung des Verlaufes von Durchbruchskurven bei Variation der genannten Einflussparameter (s. S. 71 Abb. 58).

So wird bei allen Resins richtig erkannt, dass eine erhöhte Salzkonzentration eher zu einem früheren Durchbruch führt und damit die dynamische Bindungskapazität verringert wird. Bis auf drei Resins wird auch richtig erkannt, dass eine Erhöhung der Proteinkonzentration zu einer Verringerung der dynamischen Bindungskapazität beträgt.

Was sich auch in den *MODDE*-Modellen widerspiegelt, ist eine Verringerung der dynamische Bindungskapazität (rpm-Koeffizienten negativ) bei Erhöhung der linearen Fließgeschwindigkeit (ausgedrückt über die Drehzahl der Zentrifuge). Bei drei Resins wird ein (scheinbar) positiver Effekt der *Lysozym*-Konzentration auf die dynamische Bindungskapazität angezeigt. Grund hierfür ist aber das in das Datenmodell bei nichterreichten des 10 % Durchbruches nur die aktuelle Beladung bei Abbruch des Versuches sowohl für den niedrig als auch höher konzentrierten Probenauftrag angegeben werden konnte, die natürlich bei höherer *Lysozym*-Konzentration deutlich höher ist und somit zu einer Verfälschung der eigentlichen Effekte führt.

### **Dynamische Bindungskapazitäten**

Die aus den Durchbruchkurven ermittelten dynamischen Bindungskapazitäten bei 10%igem Proteindurchbruch liegen im Vergleich zu den möglichen Beladungskapazitäten für die meisten Resins weit unter den Angaben der Hersteller (vergl. S. 32 Tab. 12 und S. 69 Abb. 56). Dennoch können einige Resins mit hohen dynamischen Bindungskapazitäten aus den Vergleichsplots identifiziert werden. Bei einigen Resins konnte der 10%-Durchbruch in dem durchgeführten Versuchsumfang nicht erreicht werden und daher nur die am Ende des Versuches applizierte Beladungsmenge angegeben werden (s: S. 69 Abb. 56).

### **Durchflusstests**

Als Ergebnis der Durchflusstests für Pufferlösungen bei verschiedenen Drehzahlen und Zentrifugationszeiten wurde die lineare Fließgeschwindigkeit ermittelt. An der Zentrifuge ist die minimalste Einstellung eine Minute Laufzeit. Dennoch wurden mehrere Zeitpunkte nach Start der Zentrifuge mit verschiedenen Haltezeiten hinsichtlich des Volumenflusses getestet.

Wie sich gezeigt hat reichen 500 oder 750 rpm für 2 Minuten oder 1000 rpm für 1 Minute aus um bei fast allen Säulen die bei allen Versuchen verwendeten 4 CV (=200 µl) durch die Säule zu bewegen (s. S. 73 Abb. 60 und S. 74 Abb. 61).

Aus dem Anstieg des linearen Bereichs der Durchflusskurven konnte der Volumenstrom ermittelt und mit diesem die lineare Fließgeschwindigkeit in jeder Säule auf dem Minisäulenarray bestimmt werden. Die ermittelten Fließgeschwindigkeiten sind prozesstechnisch gesehen hoch und rufen zum Teil frühe Durchbrüche und niedrige dynamische Kapazitäten hervor (s. S. 75 Abb. 63).

### **Absorptionsisothermen**

Es wurde nur für den Mittelpunkt des L18-Versuchsdesign (zur Aufnahme von Durchbruchkurven) die Adsorptionsisothermen für alle Resins mit *Lysozym* im Batchabsorptionsversuch bei 8 Proteinkonzentrationen im Probenauftrag ermittelt. Eine Gegenüberstellung von Adsorptionsisothermen bei verschiedenen Konditionen, z.B. bei Erhöhung der Salzkonzentration ist in dieser Arbeit daher nicht möglich (erwartungsgemäß sinkt die Beladungskapazität von Kationenaustauschern mit steigender Salzkonzentration).

Aus der Plateauregion der mit dem Langmuir-Model für Adsorptionsisothermen gefitteten Datenpunkte wurde die Gleichgewichtsbindungskonzentration die der maximalen Beladungskapazität bei den jeweiligen Konditionen entspricht berechnet (s. S. 77 und Abb. 64). Es wurde durchaus für einige Resins die von den Resin-Herstellern angegebenen Werte für die Beladungskapazität mit *Lysozym* erhalten (allerdings sind für einige Resins keine Vergleichswerte oder eine Nennung der Kondition gefunden wurden). Die optimale Ausnutzung einer Resinkapazität wäre über die Optimierung des Probenauftragsvolumens und der Proteinkonzentration über Durchbruchkurven zu ermitteln.

### **Matlab-Plots**

Zur Optimierung der Darstellung von mit 96-Array-Formaten erzeugten Versuchsergebnissen hat sich die Verwendung von *Matlab* bewährt. Über die Ausführung von Skripten ist ohne viel Aufwand dieselbe Darstellung der Daten von verschiedenen Versuchen desselben Versuchstyps (bzw. desselben Moduls) möglich.

Abgesehen von der Möglichkeit mehrere Diagramme gleichzeitig zu plotten, hat *Matlab* für die Darstellung von Kontourplots gegenüber *Excel* einen weiteren Vorteil. In *Excel* können zwar auch Oberflächendiagramme erstellt werden, jedoch gibt es für die x und y- Achse nicht die Option, diese linear zu skalieren. Zahlenwerte werden nur als Rubrik in die Achsenbeschriftung eingefügt und besitzen keinen äquidistanten Abstand. So ist z.B. in einem *Excel*-Kontourplot der Abstand zwischen 50 und 100 mM genauso groß wie zwischen 150 und 300 mM. Obgleich *Excel* auch automatisch als Farbcode dargestellte Höhenlinien zu den umgebenden Nachbar-Punkten linear interpoliert wird insgesamt das Gesamtbild verzerrt.

### **Excel-Auswertung**

Für jeden Versuchstyp wurde zur Datenaufnahme, zur Daten-Auswertung und für den Datenexport in andere Software (*Matlab* und *MODDE*) ein eigenes *Excel*-Blatt mit mehreren Mappen erstellt. Diese sind für das Versuchslayout mit 12 Resins, die Spaltenweise auf einem 96-Array-Format angeordnet sind optimiert. Eine Verwendung dieser *Excel*-Mappen bei Variation des Versuchslayouts oder des Ablaufs ist nicht ohne eine Überarbeitung der *Excel*-Mappen möglich. Für gleiche Versuchsabläufe können, wie auch so durchgeführt, die Tabellen geleert und als Vorlage wieder verwendet werden. Dazu sind nur die Rohdaten und einige Angaben zu den Resins und zu deren Konditionen die für die Darstellung in integrierte *Excel*-Diagramme dienen, manuell zu löschen.

### **MODDE-Versuchs-Designs**

Die mit *MODDE* erzeugten Datenmodelle spiegeln zumeist richtig, wenngleich zum Teil auch nur ungenau das tatsächliche Verhalten der untersuchten Versuchstypen wieder.

Zudem haben einige der vorgestellten Versuchsmodelle entweder mehr oder weniger Faktorkombinationen als Plätze auf dem verwendeten 96-Array-Layout für 12 Resins zu vergeben sind.

## 7 Ergebnisdiskussion

In dieser Arbeit wurden verschiedene Versuchstypen in zwei 96-Array-Formaten ausgetestet werden die zur initialen Entwicklung von Chromatographieschritten, insbesondere einem Capture nutzbar sind. Die Entwicklungsstrategie für einen Chromatographieschritt wie sie hier beschrieben ist, entspricht im Gegensatz zu anderen Entwicklungsmethoden auf der Basis von mechanischen Modellen einem rein experimentellen Prozessentwicklungsansatz. Aus den erhaltenen Ergebnisplots könnten entsprechend den Anforderungen selektive Resins mit dem gewünschten Elutionsverhalten bei bestimmten pH-Werten und Salzkonzentrationen sowie Resins mit hohen dynamischen Bindungs- und Gleichgewichtskapazitäten abgelesen werden.

In den vorgestellten Versuchen wurde nur mit reinen Proteinlösungen gearbeitet. Die zur Beurteilung der Versuche notwendige Analytik war daher vergleichsweise einfach über UV-Messungen in 96-Wellplatten möglich. Es wurde keine Rücksicht auf Aktivitäts- oder Strukturverlust der verwendeten Proteine genommen. Zudem war die Konditionierung der Proben recht einfach. Bei der Arbeit mit realen Prozessproben sind unter Umständen aufwendige Pufferwechsel wie Ultrafiltration oder Evaporation zur Konzentrierung und anschließender Konditionierung oder Gelfiltration zur Umpufferung sowie weitere qualitative Analysetechniken notwendig.

Hersteller von Chromatographie-Resins empfehlen für einzelne pH-Bereiche bestimmte Puffer. Das Puffersystem wurde als qualitativer Faktor in allen Versuchsmodulen beibehalten. Es sind durchaus auch Veröffentlichungen zur Optimierung der Pufferkonzentration und zur Art des Puffers in 96-Array-Formaten (insbesondere in Mikrofilterplatten) in der Literatur beschrieben worden. Zudem wurde in den Versuchen die erhöhte Natriumionen-Konzentration bei höheren pH-Werten die aufgrund des gewählten Puffers in die Lösung eingebracht werden nicht berücksichtigt. Es ist anzunehmen, dass in den einzelnen Kontourplots der Anbindungsversuche bei niedrigerer  $\text{Na}^+$ -Konzentration im Puffersystem eine etwas stärkere Anbindung zu verzeichnen sein würde.

Ein wie hier verwendetes Array-Layout mit 12 KationenaustauscherResinns ist eher selten in den Recherchen anzutreffen. Nur wenige Artikel in Fachzeitschriften berichten von Vergleichsstudien mit mehreren Resins. Auch Hersteller für Resin und Mikrofilterplatten liefern gefüllte Platten mit höchstens 4 Resinmaterialien. Allerdings ist die Verwendung von 12 Resins in einem realen Entwicklungsansatz für alle Versuchsmodule analytisch extrem aufwendig. Es sollten vielmehr nach jedem Modul nicht-geeignete Resins und Faktorkombinationen ausgeschlossen werden um im nächsten Modul nur die interessanten Kandidaten zu testen. Mikrofilterplatten bieten gegenüber Minisäulen die Möglichkeit das 96-Array-Layout nach Belieben zu variieren. In den Versuchen mit Mikrofilterplatten wurde zu Vergleichszwecken mit 50  $\mu\text{l}$  Minisäulen mit demselben Array-Layout welches durch die Anordnung des von *ATOLL* gelieferten Arrays vorgegeben war gearbeitet.

---

Mit Anbindungsversuchen (Modul 1) konnte praktisch für alle Resins eine gewisse Selektivität für die verwendeten Proteine die zu einer Retention beiträgt festgestellt werden, was aber nicht weiter verwunderlich ist, da es für ein Protein immer operative Fenster für den pH-Wert und die Salzkonzentration gibt in denen eine Anbindung an einem Kationenaustauscher erfolgt. Häufig sind recht große solcher operativen Fenster an den verschiedenen Kationenaustauschern zu beobachten. Um das Potential solcher Resins auszutesten könnte es mitunter sinnvoll sein eine Kondition zu wählen welche z.B. die Anbindung des Zielproteins ermöglicht, während Begleitproteine schon durch den Capture entfernt werden können. Es ist dann Aufgabe analytischer Methoden dies nachzuweisen.

Die Durchführung von Anbindungsversuchen in Minisäulen hat gegenüber Mikrofilterplatten den Vorteil, dass die Inkubations- und Schüttelzeiten wegfallen. Eine Bearbeitung des Versuchs im Labor ist daher schneller möglich. Allerdings müssen die Minisäulen will man sie mehrfach verwenden gespült werden wodurch weitere Arbeitsschritte anfallen, was aber wie in den Versuchen gezeigt wurde durchaus möglich ist. Mikrofilterplatten hingegen sind für den einmaligen Gebrauch vorgesehen. Außerdem sind Versuche im beliebigen Array-Layout bezüglich der verwendeten Resins möglich. Zudem müssen nicht alle Wells einer Mikrofilterplatte für einen Versuch genutzt werden. Mit geeigneten Folien werden die Wells die nicht verwendet werden einfach abgeklebt. Die sonstigen Versuchsschritte (Probenkonditionierung und Pufferbereitstellung) bleiben in beiden Systemen gleich, abgesehen von der Herstellung der Spül- und Lagerpuffer für Minisäulen.

Die Wiederholung ganzer Versuche nach mehreren Verwendungen der Minisäulen zeigen zudem gute Übereinstimmungen trotz der mittlerweile auf den Fritten über dem Säulenbett erkennbaren Schmutzpartikeln, was für eine Langzeitverwendung der Minisäulen bei gleicher Ergebnisqualität bis zu einem gewissen Grad spricht. *ATOLL* als auch *Pall* empfehlen zwar alle verwendeten Lösungen vor der Benutzung zu filtrieren, was aber zu aufwendig gewesen wäre und nur für Probenlösungen vollzogen wurde. Über vergleichende Performance-Tests kann der Status der Säulen gewissermaßen überprüft werden.

Der Versuch die Anzahl der Anbindungsversuche für aussagekräftige *DoE*-Datenmodelle reduzieren zu können, wurde mit vier von *MODDE* erzeugten Versuchsmodellen unternommen. Es bestätigt sich jedoch das sich Ungenauigkeiten bei Versuchsdesignen mit zu wenig Datenpunkten ergeben (vergl. [34]). Prinzipiell ist eine größere Anzahl von Datenpunkten für aussagekräftige Modelle und zur Erfassung wichtiger Termkoeffizienten notwendig insofern große Versuchsräume abgedeckt werden sollen in denen die untersuchten Systeme komplexes Verhalten zeigen. Es ist allerdings anzunehmen das insofern in Versuchsräumen mit kleinerer Ausdehnung genutzt (z.B. wie für Protein *B112* zwischen pH 4,4 und 5,4 sowie 10-35 mM) sowie bei Proteinen mit wenig komplexen Verhalten (wie Lysozym zwischen pH 3-7) auch einfache Versuchsdesigns akzeptable Datenmodelle liefern könnten.

---

Einige mit *MODDE* erzeugte Versuchsmodelle bestehen aus weniger oder mehr Läufen als Plätze auf dem 96-Array-Layout pro Resins zur Verfügung standen. Bei den Versuchsdesignen mit kleineren Umfang (voll-faktorielles  $2^2$  oder das *Doehlert-Design*) könnten doppelte Versuchspunkte (Mittelpunkte) eingefügt werden. Dadurch wird es möglich die Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse zu bewerten. Für Versuchsdesigne mit mehr als der zur Verfügung stehenden Anzahl an Plätzen pro Resin sind dann entweder Punkte wegzulassen, oder besser diese Blockweise mit Wiederholungen auszuführen. Mit leeren Mikrofilterplatten hingegen kann das Plattenlayout entsprechend dem von *MODDE* erzeugten Versuchslayout angepasst werden. Von *ATOLL* ist ein Gerät erhältlich mit dem 96-Well Mikrofilterplatten auf einmal mit einem Resin gefüllt werden können. [38]

In den meisten Applikationsbeschreibungen und Artikeln werden keine sich wiederholenden Trends für die Verwendung von bestimmten Versuchsdesignen erkannt. Es können dennoch teilfaktorielle Versuchsansätze gefunden werden. Der Trend geht vielmehr in die Richtung, Rohdatenplots aus vielen Faktorkombinationen zu erzeugen. Auf diese Weise wird ein umfassenderes und genaueres Bild über den Charakterisierungsraum gewonnen, der die Eingrenzung auf den relevanten Prozessraum erleichtert und begründet bestimmte Faktorkombinationen ausschließt.

Als zweites Modul wurden Elutionsversuche vorgestellt um Konditionen der mobilen Phase zu ermitteln mit denen eine Elution von an Resins gebundenen Molekülen möglich ist. Unter diesen Aspekt fällt auch die Ermittlung von Waschbedingungen für unerwünschte Begleitstoffe. Solche Versuche konnten aber nicht durchgeführt werden, da mit reinen Proteinlösungen gearbeitet wurde. Andererseits kann durch eine genügend hohe Anzahl von Anbindungsversuchen die Information auch dort entnommen werden. Wenn das Zielprotein bei einer bestimmten Bedingung anbindet, die Verunreinigung aber nicht, dann ist im Prinzip schon eine Waschbedingung gefunden. Zur Ermittlung von Elutionsbedingungen für *Lysozym* und Protein *B112* wurden mehrstufige Salzelutionen durchgeführt.

Wie sich gezeigt hat, sind sowohl Anbindungsversuche, als auch Elutionsversuche in mehreren Salzstufen sowohl in Minisäulen als auch Mikrofilterplatten dazu geeignet für Kationenaustauscher adäquate Informationen bezüglich des Bindungs- und Elutionsverhaltens bei Variation von pH-Wert und Salzkonzentration zu generieren.

Diese Vorgehensweise kann auch für einige andere Chromatographietechniken geeignet sein, ist aber z.B. für ein Mix-Mode-Resin so nicht durchführbar da sich solche Resins nicht negativ linear bezüglich der Anbindung mit steigender Salzkonzentration bei festem pH-Wert verhalten.

Es wurden Salzelutionen mit bis zu 6 Salzstufen erfolgreich in Minisäulen getestet. In Mikrofilterplatten mit Filtration per Vakuum war die Elution für Protein *B112* nur mit der Hälfte der Salzstufen möglich.

---

Das Problem war eine verstärkte Zurückhaltung von Lösung in den Wells der Mikrofilterplatte sowie Tropfenbildung am Filterauslass mit bis zu 50 µl Volumen. Hingegen war dies bei der Filtration mittels Zentrifugation nicht beobachtet worden. Dennoch stellt sich die Frage ob nicht unbekannte Lösungsbestandteile der verwendeten Protein *B112*-Bulklösung die Tropfenbildung begünstigt. Versuche in Mikrofilterplatten mit einem anderen Protein wären notwendig gewesen um zu beurteilen ob die Tropfenbildung immer eintritt. Zumindest konnte an einer Stelle in der Literatur dazu eine ähnliche Aussage gefunden werden, welche das etwas schlechtere Filtrationsverhalten per Vakuum bestätigt. [23]

Das dürfte auch die Ursache für Rückvermischungen mit neu hinzugegebener Lösung sein. Zudem gibt *Pall* selbst ein Rückhaltevolumen für die verwendeten Mikrofilterplatten von 20 µl bei Vakuumfiltration und 10 µl bei Zentrifugation an. [39]

Ein weiteres Kriterium zur Auswahl der stationären Phasen ist neben der Selektivität und einer möglichen Elution auch die nutzbare Kapazität des Säulenmaterials für die Adsorption des in einer Prozesslösung gelösten Proteins an der Resin-Oberfläche.

Durchbruchskurven (Modul 3) können dazu genutzt werden mögliche dynamische Bindungskapazitäten während des Probenauftrages zu ermitteln. Die in dieser Arbeit mit Minisäulen erzeugten Durchbruchskurven für *Lysozym* wurden bei linearen Fließgeschwindigkeiten zwischen 500-800 cm/h aufgenommen, was für einige Resins – den Herstellerangaben folgend- schon an der empfohlenen oberen Grenze liegt. Dadurch sind die Verläufe der erzeugten Durchbruchskurven zumeist wenig Sigmoid, eher linear verlaufend. Die Aufnahme von Durchbruchskurven mit druckgesteuertem Fluss zur Erzeugung von gleichmäßigen Fließgeschwindigkeiten wäre z.B. mit einem Mehrkanal-Pipettierroboter in *MediaScout® RoboColumns™* möglich. [17]

Zwar konnte gezeigt werden dass 300 rpm zu einem wenn auch langsameren Fluss führt, jedoch haben Packungsunterschiede der Säulenbetteten dort einen großen Einfluss auf die Zentrifugationsdauer bei der sich das gesamte Auftragsvolumen durch die Säule bewegt.

In Verbindung einer Optimierung von Durchbruchskurven sind die Informationen aus Adsorptionsisothermen nutzbar (Modul 4). Um ein Chromatographieresin bezüglich der maximalen Bindungskapazität für ein Protein bestmöglich auszulasten, kann die Gleichgewichtsbindungskapazität aus der Adsorptionsisotherme herangezogen werden. Zudem kann der Produktverlust als Gleichgewichtskonzentration in der mobilen Phase abgeschätzt werden. Wenn keine anderen Aspekte eine Rolle spielen, würde man sich bei gleicher maximaler Kapazität für jenes Resins entscheiden, welches eine geringere Lösungskonzentration bei Erreichen der maximalen adsorbierten Proteinmenge besitzt. Von daher wäre es sogar am sinnvollsten erst die Adsorptionsisothermen aufzunehmen und dann Durchbruchskurven. Diese könnten dann gleich bezüglich der maximalen Kapazitätsausnutzung optimiert werden.



Aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt aber dennoch als Versuchstyp in Mikrofilterplatten an dieser Stelle beschrieben ist die Aufnahme von Protein-Adsorptionsraten in Mikrofilterplatten (Modul 5). Die zuvor beschriebenen Anbindungsversuche in Mikrofilterplatten wurden nach Empfehlung des Herstellers mit 1 Stunde Inkubationszeit ausgeführt. An verschiedener Stelle sind Protein-Adsorptionsraten auch zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit bei Anbindungsversuchen beschrieben wurden. [13][15]

Die langen Inkubationszeiten bei der Ermittlung von maximalen Beladungskapazitäten sind zur Einstellung eines stabilen Verteilungsgleichgewichts notwendig. Man erhält jedoch durch Adsorptionsisothermen keine Informationen wie schnell der Adsorptionsprozess bezüglich der Stoffverteilung tatsächlich verläuft. Mit der Aufnahme von Protein-Adsorptionsraten in Mikrofilterplatten kann jedoch die Kinetik der Anbindungsgeschwindigkeit vom Protein an Resins beobachtet und somit auch die Dauer der Inkubationszeit in Anbindungsversuchen optimiert werden.

Auch solche Informationen können für die Auswahl von Fließgeschwindigkeiten genutzt werden. Flussgeschwindigkeiten wirken sich unmittelbar auf die Aufenthaltszeiten der mobilen Phase, also der Kontaktzeit zwischen gelöstem Protein und der stationären Phase aus. Ein Chromatographiematerial kann zwar für ein Protein eine hohe Kapazität besitzen, jedoch kann diese bei zu schnellem Fluss unwirksam werden, da die Kontaktzeit nicht ausreicht. Dies ist gerade dann der Fall wenn Anbindungs- bzw. Adsorptionsprozesse langsam ablaufen. Daher empfiehlt sich die experimentelle Ermittlung von Protein-Aufnahme-Raten (*engl. Protein-Uptake-Rate*).

Versuche gestalten sich dann so, dass dieselben Probenlösungen zu verschiedenen Zeitpunkten nacheinander in die verschiedenen Wells eines Resins in eine Mikrofilterplatte pipettiert werden. Um zum Beispiel 8 Inkubationszeiten zu beobachten, wird im Abstand von Minuten bis Stunden konditionierte Proteinlösung in vorbereitete Platten gegeben und die Konzentration in der mobilen Phase nach der Filtration ermittelt.

Da sich die Proteinaufnahmerate unmittelbar auf die Durchbruchskurve auswirkt, korrelieren kurze Inkubationszeiten mit schnellen Flussgeschwindigkeiten. Eine direkte Umrechnung der Inkubationszeit in einer Mikrofilterplatte in die zur Anbindung notwendige Kontaktzeit zwischen mobiler und stationärer Phase ist jedoch nicht möglich und wäre nur durch zusätzliche Säulenversuche für ein bestimmtes Protein durchführbar. [15]

---

## 8 Ausblick

Eine experimentelle Strategie für zukünftige Planungen wäre ein Vergleich von Ergebnissen aus Versuchen die sowohl reine Protein als auch Prozesslösungen bezüglich dem Anbindungs- und Elutionsverhalten sowie nutzbarer und maximaler Bindungskapazitäten verwenden.

Das Austesten von weiteren analytischen Methoden wie SDS-PAGE, HCP-Kits, ELISA, produkt- und verunreinigungsspezifischer Assays für eine Überprüfung der Reinigungswirkung und der Produktaktivität wäre dazu notwendig. Mit einer Entwicklung von robusten HPLC-Methoden mit hohen Trennleistungen für die Bestimmung von Wiederfindung und Reinheit für Anlagen mit einem Autosampler der direkt aus Multiwellplatten Lösung entnimmt, könnten die anfallenden Proben schnell abgearbeitet werden.

Somit wäre auch eine Übertragung der generischen Vorgehensweise und Versuchsmodule für den *Capture* auf *Intermediate Step* und *Polishing* sowie für weitere Chromatographietechniken möglich.

Für die wiederholte Ausführung von Versuchen in 96-Array-Formaten ist zudem die Investition in eine einfach zu bedienende und flexible Datenverarbeitungssoftware zu empfehlen. Bei einer hohen Anzahl an Versuchen in 96-Array-Formaten empfiehlt sich zudem die Verwendung eines Pipettierroboters.

## Literatur- und Quellenverzeichnis

- [1] Heinzle, E.; Biwer, A. P.; Cooney, C. L.: "Development of Sustainable Bioprocesses: Modeling and Assessment". Wiley-VCH, Weinheim, 2007.
- [2] Carta, G.; Jungbauer, A.: "Protein Chromatography-Process Development and Scale-Up" Wiley-VCH, Weinheim, 2010.
- [3] General Electric Healthcare, Uppsala, Sweden: "Strategies for Protein Purification Handbook". Application Note 28-9833-31, Uppsala, Sweden, 2010.
- [4] Storhas, W.: "Bioverfahrensentwicklung", Wiley-VCH, Weinheim, 2013.
- [5] GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden: "High-Throughput-Process Development." <http://www.htpdmeetings.com>.
- [6] Carta, G., Ubiera, A. R., Pabst, T. M.: "Protein Mass Transfer kinetics in ion Exchange Media: Measurements and Interpretations." *Chemical Engineering & Technology*, no.28 (2005): 1252-1264. doi:10.1002/ceat.200500122.
- [7] ATOLL GmbH, Weingarten, Deutschland: "MediaScout® Price List" [http://www.atoll-bio.com/sites/default/files/MediaScout\\_Price\\_List\\_01-MS-E01%20ATO.pdf](http://www.atoll-bio.com/sites/default/files/MediaScout_Price_List_01-MS-E01%20ATO.pdf).
- [8] Bio-Rad Laboratories Inc: "Foresight™ Filterplates". <http://www.bio-rad.com/de-de/category/foresight-chromatography-filter-plates-columns-prepacked>.
- [9] PALL Life Sciences: "AcroPrep™ ScreenExpert Plates." [http://www.Pall.com/pdfs/Biopharmaceuticals/SellSheet\\_AcroPrep\\_ScreenExpert.eng.pdf](http://www.Pall.com/pdfs/Biopharmaceuticals/SellSheet_AcroPrep_ScreenExpert.eng.pdf).
- [10] GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden: "Predictor Plates". <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/de/GELifeSciences/brands/predictor/>.
- [11] ATOLL GmbH, Weingarten, Deutschland: "Media@Scout MiniColumns Instruction Manual". [http://www.ATOLL-bio.com/sites/default/files/CentriColumn\\_Instruction\\_Manual.pdf](http://www.ATOLL-bio.com/sites/default/files/CentriColumn_Instruction_Manual.pdf).
- [12] GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden: "High-throughput Process Development with PreDicator™ Plates: Principles and Methods". [http://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1354014938539/litdoc28940358\\_20140311180355.pdf](http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1354014938539/litdoc28940358_20140311180355.pdf).
- [13] Bensch, M., Schulze Wierling, P., von Lieres, E., Hubbuch, J.: "High Throughput Screening of Chromatographic Phases for Rapid Process Development." *Chemical Engineering & Technology* 28, no. 11 (2005): 1274–1284. doi:10.1002/ceat.200500153.
- [14] Rege, K., Pepsin, M., Falcon, B., Steele, L., Heng, M.: "High-Throughput Process Development for Recombinant Protein Purification." *Biotechnology and Bioengineering* 93, no. 4 (March 5, 2006): 618–630. doi:10.1002/bit.20702.
- [15] Bergander, T., Nilsson-Valimaa, K., Oberg, K., Lacki, K.M.: "High-Throughput Process Development: Determination of Dynamic Binding Capacity Using Microtiter Filter Plates Filled with Chromatography Resins." *Biotechnology Progress* 24, no. 3 (2008): 632–639. doi:10.1021/bp0704687.

- [16] Coffman, J. L., Kramarczyk, J. F., Kelley, B. D.: "High-Throughput Screening of Chromatographic Separations: I. Method Development and Column Modeling." *Biotechnology and Bioengineering* 100, no. 4 (2008): 605–618. doi:10.1002/bit.21904.
- [17] Osberghaus, A., Drechsel, K., Hansen, S., Hepbildikler, S.K., Nath, S., Haindl, M., Lieres, E. von, Hubbuch, J.: "Model integrated process development demonstrated on the optimization of a robotic cation exchange step." *Chemical Engineering Science* 76, (2012): 129–139. doi.org/10.1016/j.ces.2012.04.004.
- [18] GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden: "Adsorption equilibrium isotherm studies using a high-throughput Method". Application Note 28-9403-62 AA.
- [19] Gerster, A., Rudolph, Fr., Dieterle, M. (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG): "High-Throughput Chromatography Screenings for Modulating Charge-Related Isoform Patterns." [www.bioxcellence.com/content/dam/internet/topical/bioxcellence/com\\_EN/documents/BI\\_High\\_Throughput\\_Chromatography\\_Screenings\\_for\\_Modulating\\_Charge\\_Related\\_Isoform\\_Patterns\\_2013.pdf](http://www.bioxcellence.com/content/dam/internet/topical/bioxcellence/com_EN/documents/BI_High_Throughput_Chromatography_Screenings_for_Modulating_Charge_Related_Isoform_Patterns_2013.pdf).
- [20] Kelley, B. D., Switzer, M., Bastek, P., Kramarczyk, J.F., Molnar, K., Yu, T., Coffman, J. L.: "High-Throughput Screening of Chromatographic Separations: IV. Ion-Exchange." *Biotechnology and Bioengineering* 100, (2008): 950–963. doi:10.1002/bit.21905.
- [21] PALL Life Sciences: "HyperCel™ STAR AX: "Salt Tolerant Advanced Recovery Anion Exchange Chromatography Sorbent." *Product Note* USD 2831.
- [22] Wensel, D. L., Kelley, B. D., Coffman, J. L.: "High-Throughput Screening of Chromatographic Separations: III. Monoclonal Antibodies on Ceramic Hydroxyapatite." *Biotechnology and Bioengineering*, no. 100, (2008): 839–854. doi 10.1002/bit.21906.
- [23] Kramarczyk, J. F., Kelley, B. D., Coffman, J. L.: "High-Throughput Screening of Chromatographic Separations: II. Hydrophobic Interaction." *Biotechnology and Bioengineering* 100, (2008): 707–720. doi:10.1002/bit.21907.
- [24] Touelle, M., Uzel, A., Depoisier, J.-F., Gantier, R.: "Designing New Monoclonal Antibody Purification Processes Using Mixed-Mode Chromatography Sorbents." *Journal of Chromatography B* 879, (2011): 836–843. doi:10.1016/j.jchromb.2011.02.047.
- [25] PALL Life Sciences: Simple, Efficient 96-Well Plate High Throughput Screening Lab Method to Optimize the Use of Mixed-Mode Chromatography Sorbents for the Purification of a Monoclonal Antibody". *Application Note* USTR 2795.
- [26] GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden: "Process chromatography: High-throughput process development for design of cleaning-in-place protocols". *Application note* 28-9845-64 AA.
- [27] GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden: "High-throughput process development and scale-up of an intermediate purification step for recombinant insulin". *Application note* 29-0018-56 AB.
- [28] GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden: "Screening of loading conditions on Capto S using a new high-throughput format". *Application Note* 28-9258-40 AA.

- [29] Bhambure, R., Rathore, A. S.: "Chromatography Process Development in the Quality by Design Paradigm I: Establishing a High-Throughput Process Development Platform as a Tool for Estimating 'characterization Space' for an Ion Exchange Chromatography Step." *Biotechnology Progress* 29, (2013): 403–414. doi:10.1002/btpr.1705.
- [30] Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Wikström, C., Wold, S.: "Design of Experiments – Principles and Applications". MKS Umetrics AB, Umea, 2008.
- [31] Hibbert, D. B.: "Experimental design in chromatography: A tutorial review." *Journal of Chromatography B* 910, (2012): 2–13. doi:10.1016/j.jchromb.2012.01.020.
- [32] Atkinson, A. C., Tobias, R. D.: "Optimal experimental design in chromatography." *Journal of Chromatography A*, 1177 (2008) 1–11. doi:10.1016/j.chroma.2007.11.045.
- [33] Olsson, I.-M., Johansson, E., Berntsson, M., Eriksson, L., Gottfries, J., Wold, S.: "Rational DOE protocols for 96-well plates." *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 83, (2006): 66–74. doi:10.1016/j.chemolab.2006.01.005.
- [34] Konstantinidis, S. Chhatre, S., Velayudhana, A., Heldinb, E., Titchener-Hookera, N.: "The hybrid experimental simplex algorithm - An alternative method for 'sweet spot' identification in early bioprocess development: Case studies in ion exchange chromatography." *Analytica Chimica Acta* 743 (2012): 19–32. doi.org/10.1016/j.aca.2012.06.039.
- [35] Thermo Labsystems: "Multiskan<sup>®</sup> Microplate Spectrophotometer: Linearity and Pathlength Correction". *Technical Note: AN-202*, (2001).  
[www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile\\_19096.pdf](http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile_19096.pdf).
- [36] Lampinen, J., Raitio, M., Perälä, A., Oranen, H., Harinen, R.-R. (Thermo Scientific): "Microplate Based Pathlength Correction Method for Photometric DNA Quantification Assay." (2012).  
[http://www.thermoscientific.fr/eThermo/CMA/PDFs/Various/File\\_60220.pdf](http://www.thermoscientific.fr/eThermo/CMA/PDFs/Various/File_60220.pdf)
- [37] Mettler Toledo: "E4<sup>™</sup> XLS+<sup>™</sup> Adjustable Spacer multichannel pipette"  
<http://de.mt.com/de/de/home/products/pipettes/electronic-pipettes/multichannel-adjustable-spacer.html>.
- [38] ATOLL GmbH, Weingarten, Deutschland: "MediaScout Catalogue 2008".
- [39] Pall Life Sciences: "AcroPrep<sup>™</sup> Advance 96-Well Filter Plates for Protein Purification."  
[http://www.Pall.com/pdfs/Laboratory/AcroPrepAdvance\\_LAB\\_SS.pdf](http://www.Pall.com/pdfs/Laboratory/AcroPrepAdvance_LAB_SS.pdf).
- [40] ATOLL GmbH, Weingarten, Deutschland: Applikationsbeschreibung Media<sup>®</sup>Scout MiniColumns  
[http://www.atoll-bio.com/sites/default/files/CentriColumn\\_Instruction\\_Manual.pdf](http://www.atoll-bio.com/sites/default/files/CentriColumn_Instruction_Manual.pdf).
- [41] Pearse: "Phosphat-Citrat-Puffer-Rezept.", (1980).  
[www.microscopy.berkeley.edu/Resources/instruction/buffers.html](http://www.microscopy.berkeley.edu/Resources/instruction/buffers.html)