

Generische *HPLC*-Methodenentwicklung für Protein- und *pDNA*-Proben

BACHELORARBEIT

vorgelegt der

**Fakultät Life Sciences (LS)
Studiengang Biotechnologie**

der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

von

**Maria Rümke
Matrikelnummer 2000196**

Erstgutachter: Prof. Dr. Ernst A. Sanders

Zweitgutachter: Dr. Jan Oschmann

Abgabetermin: 13.08.2013

I`ve not failed.

I`ve just found 10.000 ways that won`t work.

Thomas Alva Edison

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2013 bis August 2013 bei Richter-Helm BioLogics, Standort Hamburg, Abteilung Forschung und Entwicklung/*DSP* unter Betreuung von Dr. Jan Oschmann durchgeführt.

Professor Dr. Ernst A. Sanders danke ich für das in mich gesetzte Vertrauen und die Betreuung meiner Arbeit als Erstgutachter.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jan Oschmann für die wertvollen Ratschläge, Hilfsbereitschaft bei Problemen und für die großartige Betreuung während der praktischen Durchführung als auch beim Verfassen dieser Arbeit.

Ich danke Dr. Anja Büttner, die mir bereits in meinem Praxissemester die theoretischen und praktischen Hintergründe der *HPLC*-Analytik näher gebracht hat und während dieser Arbeit stets ein offenes Ohr für mich hatte.

Den Mitarbeitern der Abteilung Forschung und Entwicklung sowie der *HPLC*-Analytik danke ich für die freundschaftliche Atmosphäre.

In meinem privaten Umfeld danke ich meinem Ehegatten Karsten für sein Verständnis und Unterstützung während des gesamten Studiums und meinem guten Freund Gerd, der sich Zeit genommen hat, meine Arbeit zu lesen.

1. EINLEITUNG.....	5
1.1. ANALYTIK.....	5
1.2. CHROMATOGRAPHISCHE GRÖßEN.....	7
1.3. ELUTIONSARTEN.....	10
1.4. UMKEHRPHASENCHROMATOGRAPHIE (<i>REVERSED-PHASE CHROMATOGRAPHY, RPC</i>) UND DIE WAHL DER GEEIGNETEN SÄULEN.....	10
1.5. KÜNSTLICHE FUSIONSPROTEINE.....	13
1.6. PLASMID-DNA (<i>pDNA</i>) UND IHRE KONFORMATIONEN.....	14
1.7. STATISTISCHE VERSUCHSPLANUNG – <i>DESIGN OF EXPERIMENT (DoE)</i>	16
2. ZIELSETZUNG.....	20
3. MATERIAL	21
3.1. CHEMIKALIEN UND KITSYSTEME.....	21
3.2. GERÄTE UND SOFTWARE.....	22
3.3. CHROMATOGRAPHISCHE SÄULEN.....	23
3.4. BIOLOGISCHE PROBEN.....	23
4. RP-HPLC-METHODENENTWICKLUNG.....	26
4.1. VORVERSUCHE.....	27
4.2. FESTLEGUNG DER VARIABLEN UND KONSTANTEN PARAMETER	29
4.3. <i>ERSTELLEN DER VERSUCHSMATRIX MITTELS DER DoE-SOFTWARE MODDE</i>	31
4.4. <i>FESTLEGUNG DER METHODENBEURTEILUNGSKRITERIEN FÜR DIE DoE-SOFTWARE UND ANSCHLIEßENDE AUSWERTUNG DER DoE-ERGEBNISSE</i>	32
4.5. <i>OPTIMIERUNG DER ENDMETHODE DURCH PROBENVERDÜNNUNG UND ZEITVERKÜRZUNG</i>	34
4.6. <i>ÜBERPRÜFUNG DER ENTWICKELTEN METHODE DURCH FRAKTIONIERUNG UND ANSCHLIEßENDER AUSWERTUNG DER EINZELNEN PROBEN IN EINEM SDS-PAGE-GEL</i>	38
4.6.1. <i>Probenfraktionierung</i>	38
4.6.2. <i>TCA-Proteinfällung</i>	39
4.6.3. <i>SDS-PAGE</i>	39
4.7. PLASMID-DNA-PROBEN.....	42
5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	43
5.1. ERGEBNISSE DER GENERISCHEN <i>HPLC</i> -METHODENENTWICKLUNG FÜR PROTEINPROBEN	43
5.1.1. <i>Ergebnisse der Vorversuche</i>	43
5.1.2. <i>Ergebnisse der Versuchsgruppen 1 und 2: RP-HPLC-C18-Säule</i>	45
5.1.3. <i>Ergebnisse der Versuchsgruppen 3 und 4: RP-HPLC-C4 Säule</i>	50
5.2. ERGEBNISSE DER GENERISCHEN <i>HPLC</i> -METHODENENTWICKLUNG FÜR <i>pDNA</i> -PROBEN	72
6. ZUSAMMENFASSUNG	75
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	77

8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	80
9.	TABELLENVERZEICHNIS	85
10.	LITERATURVERZEICHNIS.....	86
11.	INTERNETQUELLEN DER ABBILDUNGEN	87
12.	ANHANG	88
13.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	89

1. Einleitung

In den folgenden Kapiteln werden nur für die Arbeit relevanten Grundlagen und genutzte chromatographische Größen näher erörtert. Die verwendete Nomenklatur wurde aus der IUPAC-Empfehlung von 1993 übernommen. [1]

1.1. Analytik

Der Begriff Analytik steht im Allgemeinen für die Durchführung einer systematischen Untersuchung eines Sachverhaltes bezüglich aller zu bestimmenden Komponenten und Parametern. Eine Analysenmethode befasst sich mit dem Ablauf der Analyse in wesentlichen Zügen. Dabei sind die Art und Weise der Probenvorbereitung und Auswertung der Messergebnisse für die Analyse eines bestimmten Stoffes festgelegt. Die Methode stellt bestimmte Anforderungen und bestimmt somit das strategische Konzept.

Als Analyt wird die Substanz bezeichnet, die untersucht und bestimmt werden soll. Der Begriff Matrix stellt in diesem Zusammenhang die Gesamtheit aller Substanzen dar, die außer dem zu bestimmender Stoffen in der Probe (Analyt) enthalten sind.

Die Analytische Chemie befasst sich im Allgemeinen mit den folgenden Fragen:

- Was liegt vor? → Analyt
- Wie viel liegt vor? → Konzentration des Analyten
- Welche Anordnung liegt vor? → Konfiguration des Analyten
- Wo befindet sich der Analyt und wie wird dieser extrahiert? → Matrix

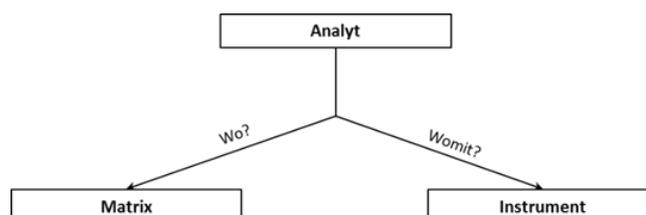


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der Entstehung einer analytischen Methode [2]

Die Analysestrategie sowie die Anforderungen an eine Methode lassen sich aus den o.g. Fragen, mit dem Ziel für den gewünschten Analyten in der vorhandenen Matrix das richtige Instrument herauszufinden, ableiten.

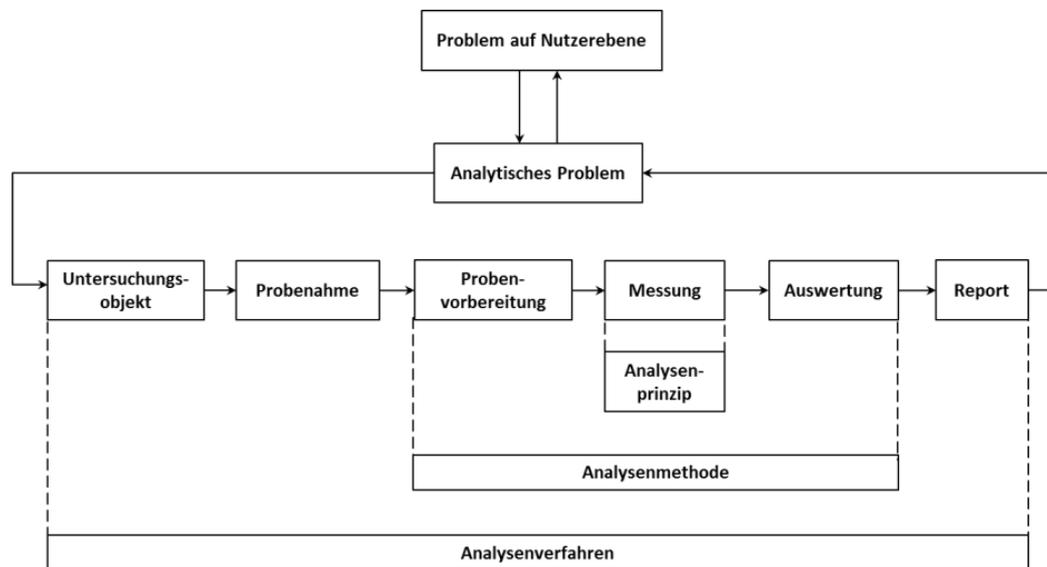


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des analytischen Prozesses [2]

Um eine analytische Methode entwickeln zu können, muss in der ersten Linie die Frage nach dem Analysenziel gestellt werden. Es muss festgelegt werden, welche Anforderungen die Analyse erfüllen soll.

Die aus der Literaturrecherche entstandene vorläufige analytische Methode wird mit unterschiedlichen Systemen (z.B. Säulen, Gelen, apparatives Aufbau, etc.) durchgeführt, bis optimale und robuste Ergebnisse aus den Versuchen erzielt werden. Für die Implementierung in die tägliche Laborroutine werden die optimalen Einstellungen für die zu entwickelnde Methode validiert. [2]

1.2. Chromatographische Größen

Das Trennungsprinzip der Hochdruckflüssigkeitschromatographie basiert auf der Beschaffenheit der stationären Phase. Diese liegt meist entweder in poröser oder unporöser Form vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *RP-HPLC*-Säulen mit porösem Kieselgel und Polymeren als Trägermaterial der stationären Phasen angewandt. Die Porosität des Trägermaterials der stationären Phase ermöglicht eine Vergrößerung der Oberfläche. Dabei nimmt das poröse Trägermaterial ca. 20% des verfügbaren Säulenvolumens ein, das Poren- und Zwischenkornvolumen beansprucht dabei jeweils ca. 40% des verfügbaren Säulenvolumens. Dabei stehen ca. 80% des gesamten Säulenvolumens der mobilen Phase zur Verfügung.

Das Durchströmen der Trennsäule mit der mobilen Phase wird mittels des Pumpsystems ermöglicht. Durch die Beförderung der mobilen Phase in der Trennsäule entsteht der Volumenstrom, der sich aus dem durchströmenden Volumen der mobilen Phase und der dafür benötigten Zeit errechnet. Die mobile Phase ist für den Transport des Analyten im Packungsbett der Trennsäule verantwortlich.

Die Selektivität eines Trennsystems (Zusammensetzung der mobilen und der stationären Phasen) gibt an, inwieweit das gewählte System eine Trennung des Analytengemisches gewährleisten kann und wird daher zur Beurteilung der Qualität des Trennsystems angewandt. Die Selektivität eines Systems wird durch den Trennfaktor α dargestellt und kann somit mit anderen Systemen dimensionslos verglichen werden.

Die Verweilzeit des Analyten in der stationären Phase hängt von der Molekularstruktur des Analyten selbst, der Zusammensetzung der mobilen Phase und der Oberflächenbeschaffenheit (chemische und physikalische Eigenschaften) der stationären Phase ab.

Ist eine gute Selektivität des Trennsystems gegeben, so ist im Idealfall eine vollständige Trennung des Analytengemisches in Form von einzelnen Zonen, die mittels eines Detektors als Peaks in einem Chromatogramm detektiert werden, zu erwarten (Abbildung 1-3).

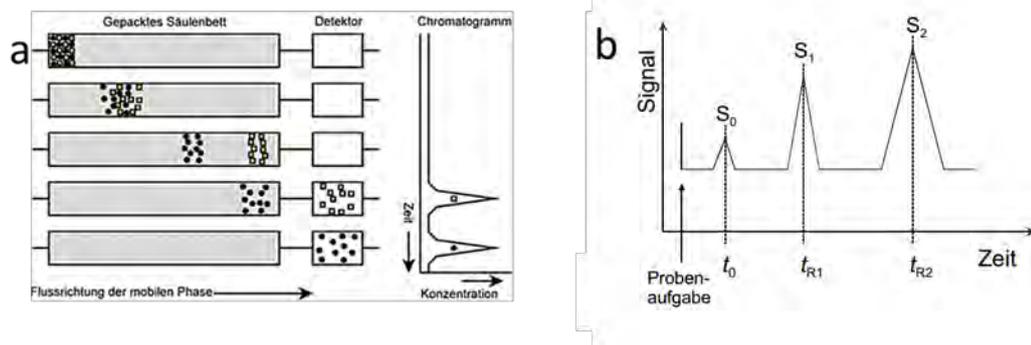


Abbildung 1-3: a) Ablauf einer chromatographischen Trennung. Nach der Probenapplikation auf die Trennsäule wird das Analytengemisch idealerweise in die Einzelkomponenten separiert, die nacheinander den Detektor passieren. Das zeitabhängige Signal wird in Form der Peaks in einem Chromatogramm wiedergegeben [3]; b) Schematische Darstellung eines Chromatogramms [4]

Als Inert wird die Substanz bezeichnet, die in dem Analytengemisch enthalten ist und welche bei der Applikation auf eine Trennsäule keine Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingeht und deswegen unretardiert mit der mobilen Phase durch die Trennsäule gespült und detektiert wird. Die Zeit, die eine inerte Substanz benötigt um die Säule zu passieren um am Ende detektiert zu werden, wird als die Durchflusszeit t_M einer Säule bezeichnet (in der Abbildung 1-3 b) entspricht der t_0 -Wert dem t_M -Wert). Mittels der Durchflusszeit und dem Fluss der mobilen Phase (F : Volumen pro Zeit) wird das Durchflussvolumen der Säule und somit das Volumen der mobilen (V_M) Phase errechnet (Formel(1.1)).

$$t_M = \frac{V_M}{F} \quad (1.1)$$

Durch Auftreten von Wechselwirkungen der einzelnen Analyten im Analytengemisch mit der stationären Phase, kommt es zu zeitlich unterschiedlichen Elutionen. Die Verweilzeit des Analyten in der stationären Phase, verursacht durch Wechselwirkungen, wird als Nettoretentionszeit t'_R bezeichnet. Diese ergibt sich aus der Differenz der Retentionszeit t_R und der Durchflusszeit t_M (Formel (1.2)).

$$t'_R = t_R - t_M \quad (1.2)$$

Der Retentionsfaktor k oder k -Wert (Formel (1.3)) wird angewandt, um Trennungen eines Analytengemisches unabhängig von der Dimensionierung der Trennsäule und anderen Einflussfaktoren vergleichen zu können.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1.3)$$

Der k-Wert definiert das Verhältnis der Verweilzeit des Analyten in den stationären und mobilen Phasen in Bezug auf ein bestimmtes Trennsystem, einen Fluss und die Packungsdichte der Säule. Der k-Wert kann als thermodynamische Größe auf den Nernst'schen Verteilungskoeffizient zurückgeführt werden und daher ist die o.g. Vergleichsmöglichkeit nur unter isokratischen Elutionsbedingungen gegeben.

Für einen Vergleich der Retentionszeiten unter gleichen Trennbedingungen bei der Verwendung eines Gradienten, der während der Trennung kontinuierlichen Veränderungen ausgesetzt ist, werden die relativen Retentionszeiten verwendet. Bei der Ermittlung der relativen Retentionszeiten wird Bezug auf die Retentionszeit eines bekannten Analyten genommen (Formel (1.4)).

$$t_{Rrel} = \frac{t_{RAnalyt}}{t_{RBezug}} \quad (1.4)$$

Die Auflösung R_s , die sich aus den Peakbreiten und den Retentionszeiten bestimmen lässt, ist neben der Selektivität ein entscheidender Faktor für eine erfolgreiche Trennung zweier Analyten (Formel (1.5)), t_{R1} und t_{R2} beziehen sich auf die Retentionszeiten der unmittelbar benachbarten Peaks und $w_{0,5}$ beschreibt die Peakbreite auf der halben Peakhöhe.

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{(w_{0,5_1} + w_{0,5_2})} \quad (1.5)$$

Die Peaksymmetrie A_s ist eine chromatographische Größe, die der Beurteilung des Elutionsverhalten dient. Diese lässt sich aus dem Verhältnis der Peakbreite vor und hinter dem Lot in 10% der Peakhöhe bestimmen (Formel (1.6)).

$$A_s = \frac{b}{a} \quad (1.6)$$

Der Peaksymmetriewert gibt eine Aussage zu dem Tailing- und Frontingverhalten der Peaks. Bei einem Fronting ($A_s < 1$) ist der Peakanstieg flacher als der Peakabfall, bei dem Tailing ($A_s > 1$) ist es umgekehrt. Bei einem Peaksymmetriewert von 1 liegen symmetrische Peaks vor. [5]

1.3. Elutionsarten

Bei einer isokratischen Elution bleibt die Elutionskraft der mobilen Phase während der Analyse konstant. Das Konstanthalten der Elutionskraft der mobilen Phase bewirkt eine Verlängerung der Analysezeit.

Bei Anwendung einer Gradientenelution besteht die Möglichkeit komplexe Gemische von Analyten, die sich in Ihrer Polarität stark unterscheiden, in einem akzeptablen Zeitrahmen zu trennen. Dabei kommt es zu einer kontinuierlichen Änderung der Eluentenzusammensetzung von einem schwachen Eluenten hin zu einem starken Eluenten. Die Applikation des Analytengemisches erfolgt dabei unter schwachen Elutionsbedingungen, und durch die Steigerung der Elutionskraft der mobilen Phase kommt es zum Abschwächen der Affinität der einzelnen Analyten zur stationären Phase. Die Wechselwirkungen mit der stationären Phase werden durch eine weitere Erhöhung der Elutionskraft unterdrückt, und dies begünstigt die Ausbildung von schmalen Peaks.

1.4. Umkehrphasenchromatographie (*Reversed-Phase Chromatography, RPC*) und die Wahl der geeigneten Säulen

Die Umkehrphasenchromatographie (*RP-Chromatographie*) ist die derzeit am weitesten verbreitete Analysenmethode im Hochdruckchromatographiebereich. Das Prinzip der Umkehrphasenchromatographie besteht in der Verwendung chemisch modifizierter Kieselgele als stationäre Phase. Die chemische Modifizierung erfolgt durch die Verknüpfung der sich auf der Oberfläche des Kieselgels befindenden Silanolgruppen mit Chlorsilanen, die definierte funktionelle Gruppen (R) enthalten (Abbildung 1-4).

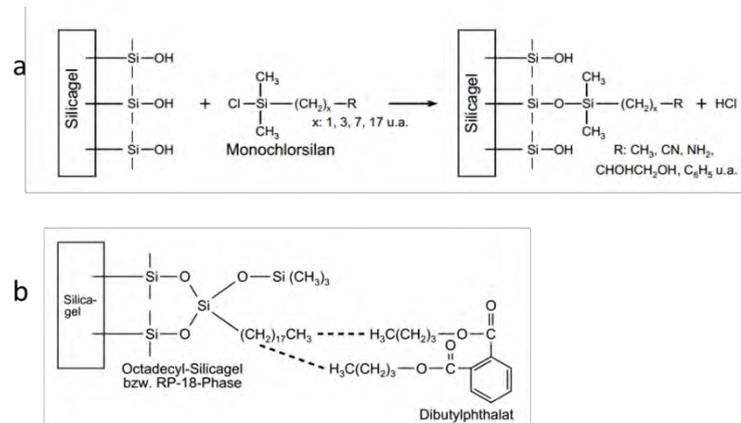


Abbildung 1-4: a) Umsetzung von Silanolgruppen mit Chlorsilanen; b) Beispiel einer hydrophoben RP-18-Phase [4]

Die Trennung der Analyten eines Analytengemisches in der Umkehrphasenchromatographie erfolgt auf Basis der hydrophoben Wechselwirkungen des jeweiligen Analyten mit der stationären Phase. Die stärkste Elutionskraft ist bei der Verwendung eines unpolaren Eluenten zu erwarten. Das Mischungsverhältnis des organischen und des wässrigen Eluenten (die Mischbarkeit muss im Vorfeld gegeben werden) ermöglicht die Einstellung der Retention eines Analyten. Die Elutionskraft der Lösungsmittel kann in der elutropen Reihe (Tabelle 12-1, Kapitel 12. Anhang), nachgelesen werden (Abbildung 1-5).

Am häufigsten kommt Acetonitril oder Methanol als organischer Eluent bzw. organischer Anteil des Eluenten zum Einsatz. Der Kohlenstoffgehalt der stationären Phase hat einen direkten Einfluss auf die Stärke der Wechselwirkungen der hydrophoben Verbindungen. Die Retentionszeit des Analyten ist proportional zum Kohlenstoffgehalt der verwendeten stationären Phase. [2] [4] [6]

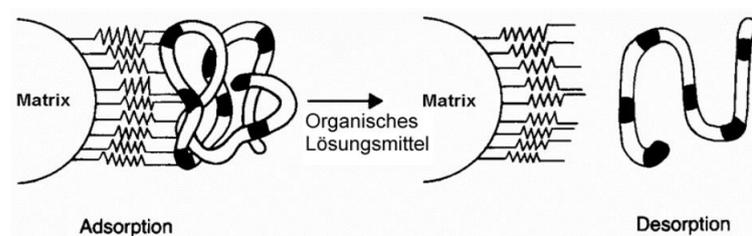


Abbildung 1-5: Adsorption und Desorption bei der RPC. Durch die Verwendung der organischen Lösungsmittel kommt es zur Denaturierung von Proteinen während des Elutionsvorgangs [3]

Derzeit besteht auf dem Markt eine sehr große Auswahl an *RP*-Säulen, die sich in ihrer Selektivität und ihren Anwendungsbereichen voneinander unterscheiden.

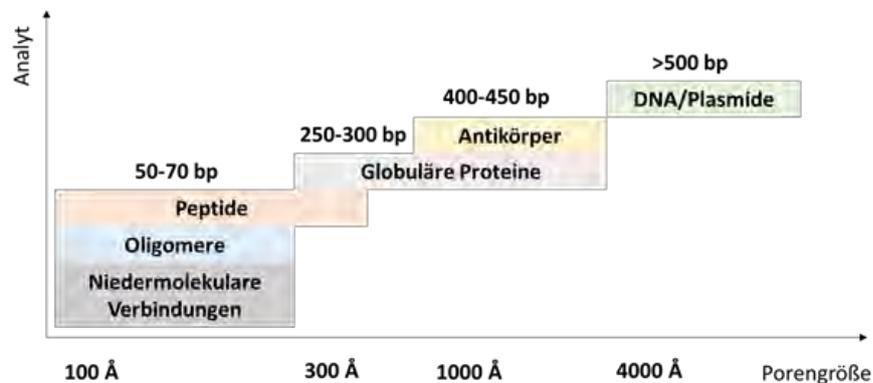


Abbildung 1-6: Empfehlung zur Wahl der geeigneten Porengröße der *RP*-Trennsäule anhand der Eigenschaften des Analyten, herausgegeben von VARIAN Inc. und Polymer Laboratories [1]

Für diese Arbeit wurden zwei *RP*-Säulen des Herstellers Phenomenex® anhand seiner Empfehlung für das bestehende Trennproblem (Abbildung 1-7) ausgewählt. Die Jupiter® 300 C18-Säule eignet sich nach den Herstellerangaben zur Trennung der hydrophilen Proteine ab einem Molekulargewicht von 10 kDa und die Jupiter® 300 C4-Säule eignet sich zur Trennung der hydrophoben Proteine im identischen Molekulargewichtsbereich. Beide Säulen können in einem pH-Bereich von pH 1,5-10 eingesetzt werden. Die Partikelgröße von 5 µm sollte eine gute Auflösung gewährleisten. Die Porengröße von 300 Å ist zur Trennung der Peptide und globulärer Proteine geeignet.

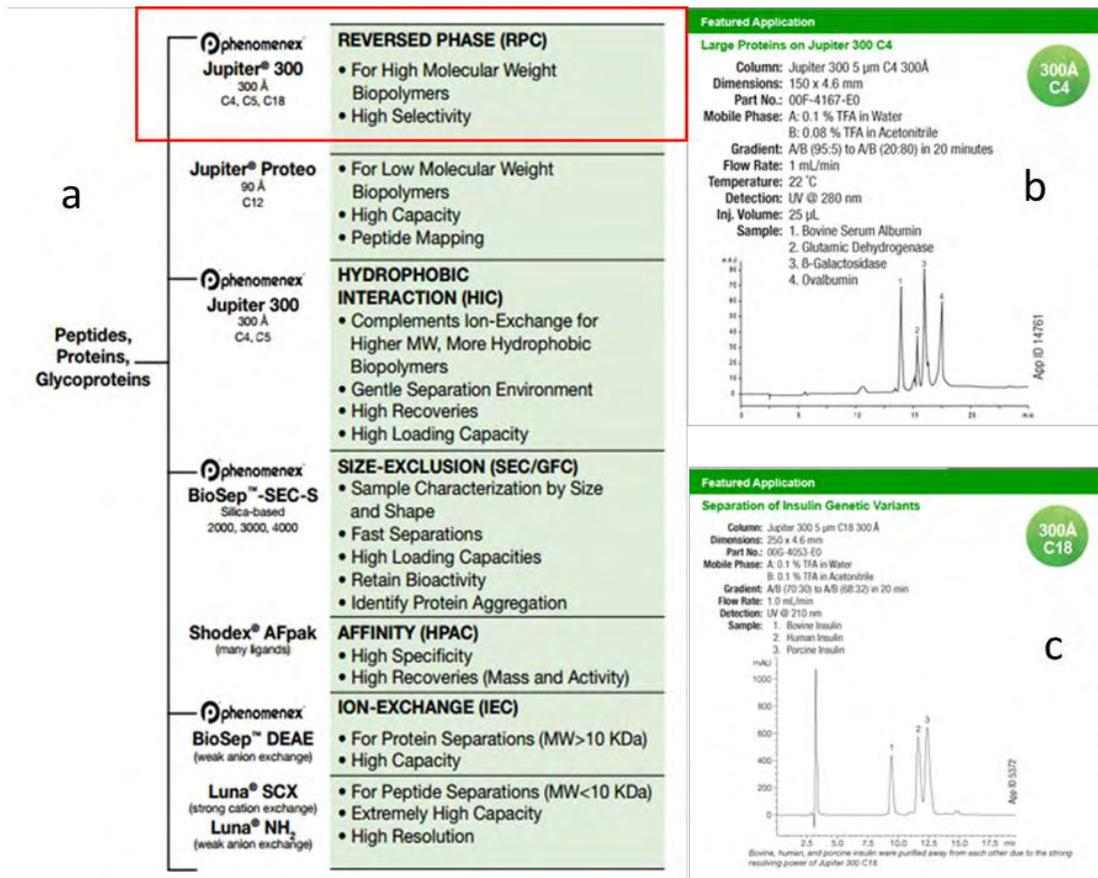


Abbildung 1-7: a) Übersicht der Säulentypen des Herstellers Phenomenex®. Der rot umrandete Bereich entspricht dem für die Methodenentwicklung gewählten Bereich [7]; b) und c) zeigen die Beispielchromatogramme der für die Methodenentwicklung gewählten Säulen: Jupiter® 300 C4 (b) und Jupiter® 300 C18 (c) [2], [3]

1.5. Künstliche Fusionsproteine

Fusionsproteine setzen sich oftmals aus Proteinen mit unterschiedlichen Eigenschaften zusammen. Die Herstellung erfolgt durch DNA-Klonierungstechnologien, indem codierende Abschnitte miteinander fusioniert (hybridisiert) werden. Der Einsatz der Fusionsproteine erstreckt sich von Anwendungen in der Grundlagenforschung (Topologie, Lokalisation *GFP*) bis hin zu kompletten pharmazeutischen Präparaten (Antikörper-Wirkstoff-Konjugate). [8]

1.6. Plasmid-DNA (pDNA) und ihre Konformationen

Plasmide kommen meist extrachromosomal in Form einer ringförmigen doppelstängigen DNA in vielen Mikroorganismen vor und werden oft als pDNA bezeichnet. Plasmide können anhand ihrer Größe 2 bis > 200 kbp und genetischen Funktionen klassifiziert werden. Zusätzlich enthalten Plasmide einen bakteriellen Replikationsursprung und dieser ermöglicht eine autonome Replikation des Plasmids innerhalb eines Bakteriums (Abbildung 1-8).

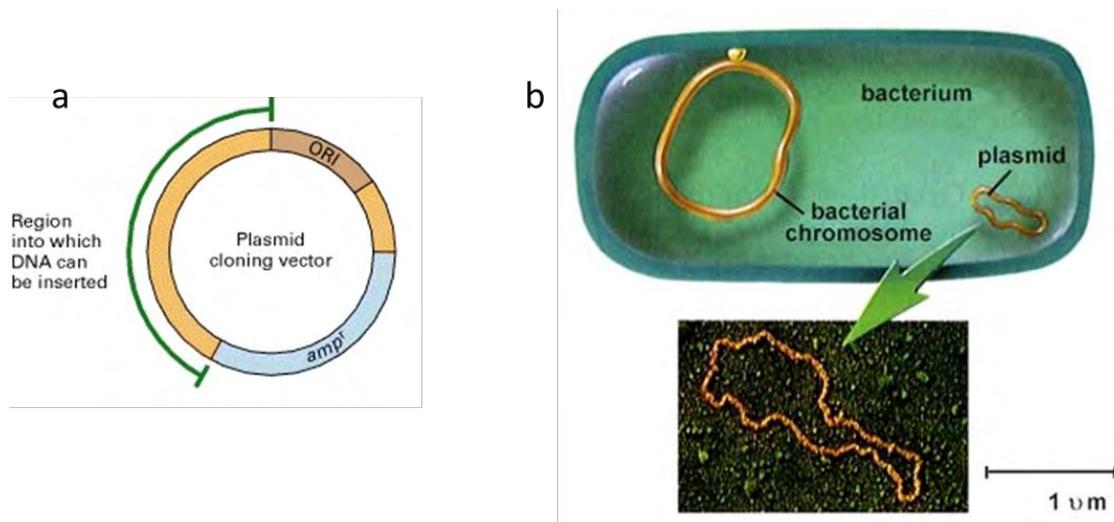


Abbildung 1-8: a) Schematische Darstellung eines Plasmidvektors mit einem Antibiotikaresistenzgen (amp^r), einem Replikationsursprung (ORI) und einem Bereich zum Einfügen der Gene [4]; b) Schematische Darstellung der chromosomalen DNA und der Plasmid-DNA in einer universellen Bakterienzelle [5]

Im biotechnologischen Bereich werden die Plasmide als Klonierungsvektoren für rekombinante Proteine sowohl in pro- als auch in eukaryontischen Zellen angewandt.

Die nachfolgende Abbildung 1-9 zeigt die Struktur eines typischen Plasmids zur Expression von Zielgenen in *E. coli*.

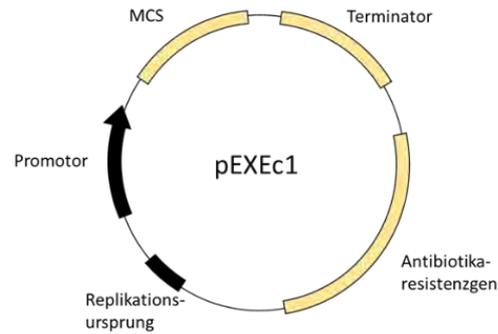


Abbildung 1-9: Aufbau eines typischen Plasmids (pEXEc1) zur Expression von Zielgenen in *E. coli* [9]

Ein *E. coli* Plasmid enthält einen Replikationsursprung (*ORI: origin of replication*) zur autonomen Vermehrung und Kopiezahlregulierung, einen Bereich mit Antibiotikaresistenzgenen, einen Promotor für die Transkription des Zielgens und die Klonierungsstelle (*MCS: multiple cloning site*) mit Schnittstellen für unterschiedliche Restriktionsendonukleasen [9].

Die doppelsträngige *DNA* weist oftmals eine helikale Struktur auf, es gibt jedoch noch weitere Konformationen der *DNA*, die sich in ihrer Topologie und Größe unterscheiden. Die gängigste Konformation der Plasmid-*DNA* liegt in einer negativ superspiralisierten Konformation vor, die als *covalently closed circles (ccc-Konformation)* bezeichnet wird.

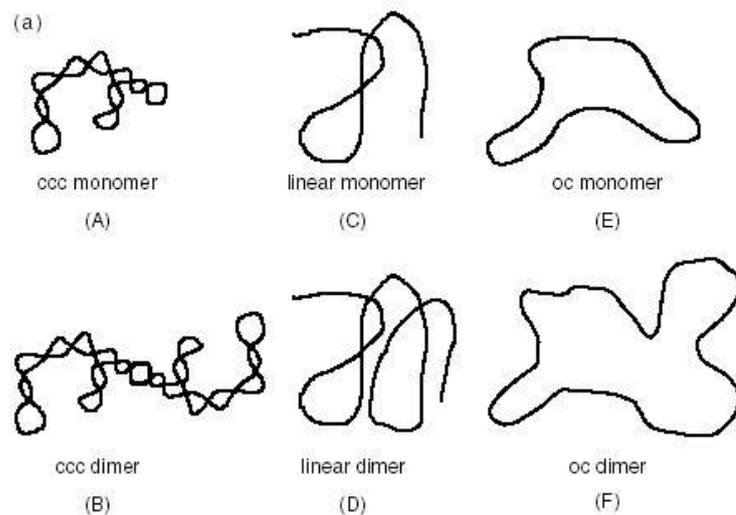


Abbildung 1-10: Monomere (A, C, E) und dimere (B, D, F) Konformationen (*ccc-, oc- und lc-Konformationen*) der Plasmid-*DNA* [6]

Nukleasen oder mechanischer Stress können einen Bruch im *DNA*-Strang verursachen. Dadurch wandelt sich die *ccc*-Konformation in die *open circular (oc)* Konformation um. Diese Form ist im Vergleich zu der *ccc*-Konformation weniger spiralisiert und kompakt.

Die Entstehung einer *line circular (lc)* Konformation wird durch die Öffnung der beiden *DNA*-Stränge an der gleichen Stelle durch eine Endonuklease ermöglicht.

Plasmide werden häufig als Vektoren und zur *DNA*-Vaccination in Gentherapie angewandt. Die Analytik der Plasmide unterscheidet sich auf Grund ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften stark von der Proteinanalytik. Unter physiologischen Bedingungen haben die Polynucleotide eine starke negative Ladung, und auf Grund ihrer Größe sind Plasmide sensitiv in Bezug auf die Scherkräfte, die während der Analytik verursacht werden können.

Wie bereits erwähnt, können die *oc*- und die *lc*-Konformationen aus der *ccc*-Konformation entstehen. Für therapeutische Anwendungen wird jedoch nur die *ccc*-Konformation verwendet, daher ist eine analytische Untersuchung zur Detektion und ggf. Konzentrationsbestimmung der drei *pDNA*-Konformationen in einer Probe während der Kultivierung notwendig. Die Analytik erfolgt meist mittels Anionenaustauschchromatographie (*AEIC*), der Hydrophoben Interaktionschromatographie (*HIC*) und der Größenausschlusschromatographie (*SEC*). [8].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine *RP-HPLC* Methode zu dem o.g. Zweck etabliert werden kann.

1.7. Statistische Versuchsplanung – *Design of Experiment (DoE)*

Statistische Versuchsplanung, auch als *Design of Experiment (DoE)* bekannt, ist eine Methode zur effizienten Planung und Auswertung von Versuchsreihen, die sich in den 80er Jahren weltweit durchsetzen konnte. Die standardisierte Vorgehensweise trägt dazu bei, dass die statistische Versuchsplanung von einer großen Zahl an Auswerteprogrammen unterstützt wird. In dieser Arbeit wurde mit der Auswertesoftware *MODDE 9* von *Umetrics* gearbeitet.

Zu den Vorteilen der statistischen Versuchsplanung gehört ihre universelle Einsetzbarkeit in nahezu allen Ingenieursdisziplinen. Mittels der Methode zur statistischen Versuchsplanung können

im Gegensatz zu den Computersimulationen nur relativ einfache Versuchspläne mit einer geringen Anzahl an Faktoren erstellt werden und dabei trägt die Teststeuerung zur Erschwerung der Versuchsergebnisinterpretationen bei.

In der statistischen Versuchsplanung wird eine standardisierte Nomenklatur verwendet und somit lässt sich die Darstellung der Ergebnisse auch unter Verwendung unterschiedlicher Auswertesoftware vergleichen.

Der Begriff System beschreibt das zu untersuchende Gebilde, welches eindeutig definierte Grenzen aufweisen sollte, die sogenannten Systemgrenzen. Die Eingangsgrößen befinden sich entweder innerhalb oder außerhalb des betrachteten Systems. Die Eingangsgrößen, die direkt zum System gehören, werden während der Untersuchung optimiert, bei allen anderen Eingangsgrößen ist mit Variationen zu rechnen, was eine Optimierungsmöglichkeit nahezu ausschließt (Abbildung 1-11).

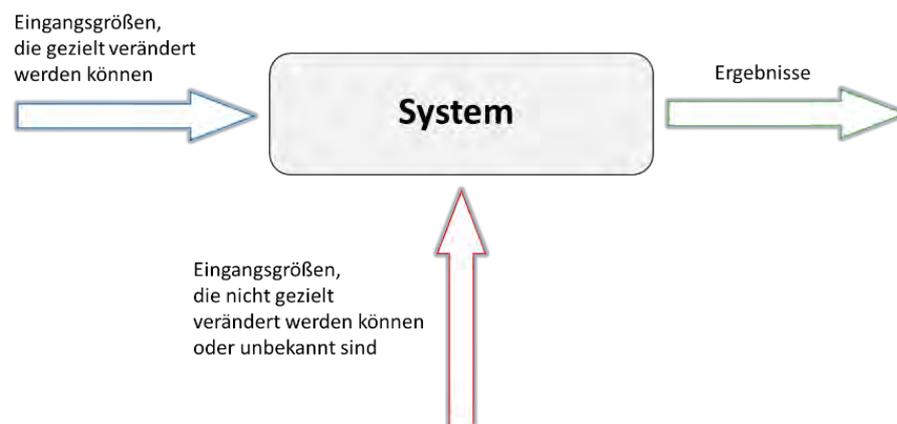


Abbildung 1-11: Schematische Darstellung des untersuchten Systems. Eine Fülle von Eingangsgrößen wirkt darauf ein. Jedes System hat Grenzen und erzeugt Ergebnisse [10]

Die Eingrenzung des zu untersuchenden Systems muss anhand des Anwendungsbereichs im Vorfeld erfolgen, um somit alle möglichen Einflussfaktoren zu berücksichtigen.

Jedes System beinhaltet eine Reihe an Funktionen, deren Erfüllung sich in messbaren Ergebnissen zeigt und eine Systembeurteilung ermöglicht. Ergebnisse, die einen positiven Einfluss auf das zu untersuchende System haben, werden als Qualitätsmerkmale bezeichnet. Diese können nur kontinuierliche Größen sein, da sonst keine Effektberechnung möglich ist. Das System wird

weitgehend nur noch hinsichtlich dieser Art von Ergebnissen untersucht. Die Optimierung mehrerer Qualitätsmerkmale ist durch den Einsatz der sogenannten *Multiple Response Optimisation* möglich.

Als Parameter wird die Menge aller Eingangsgrößen bezeichnet. Die Parameter, die in dem Versuchsplan enthalten sind, werden als Faktoren bezeichnet, die sowohl direkt untersucht, als auch indirekt beobachtet werden können. Mit der steigenden Anzahl an ausgewählten Faktoren erhöht sich auch der Versuchsaufwand.

Jeder zu untersuchende Faktor wird in der statistischen Versuchsplanung mit mindestens zwei Einstellungen, den sogenannten *Levels*, untersucht. Diese sind meist festgelegte Zustände oder Sachverhalte auf der jeweiligen Einstellung der gewählten Faktoren. Der Effekt eines gewählten Faktors ist von der Einstellungsvariation abhängig. Die *Level-Abstände* sind durch die technischen Möglichkeiten des betrachteten Systems begrenzt (Abbildung 1-12).

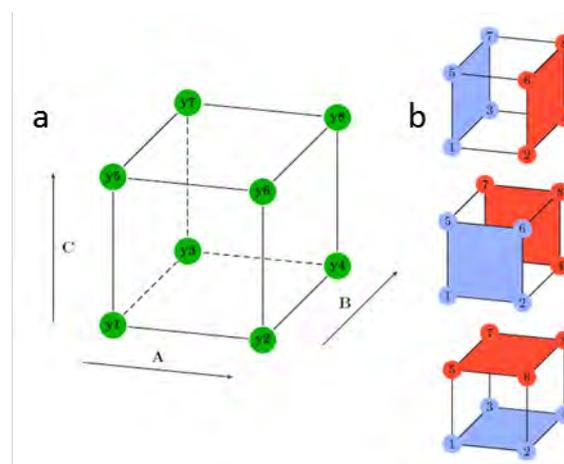


Abbildung 1-12: a) Graphische Darstellung eines vollfaktoriellen Versuchsplans für drei Faktoren auf jeweils zwei Levels; b) Graphische Darstellung der Effektberechnung. Die Haupteffekte jedes Faktors (A, B und C) berechnen sich aus der Differenz der jeweiligen Level-Mittelwerte. Die gleichen Versuchsdaten werden für jeden Faktor, entsprechend der Faktoreinstellung, gruppiert [10]

Auch die Wechselwirkungen der gewählten Faktoren und ihr gegenseitiger Effekt lassen sich graphisch, wie in der Abbildung 1-13 gezeigt, darstellen.

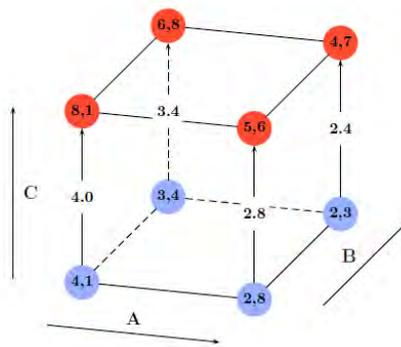


Abbildung 1-13: Graphische Darstellung der gegenseitigen Effekte der einzelnen Faktoren [10]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *Screening*-Versuchsplan angewandt. Dieser bietet die Möglichkeit mit einem minimalen Versuchsaufwand eine hohe Anzahl an Faktoren zu untersuchen.

In der nachfolgenden Abbildung 1-14 ist ein allgemeiner Ablauf einer *DoE*-Anwendung dargestellt. Die drei abgebildeten Phasen werden nacheinander durchlaufen und bauen aufeinander auf. [10]

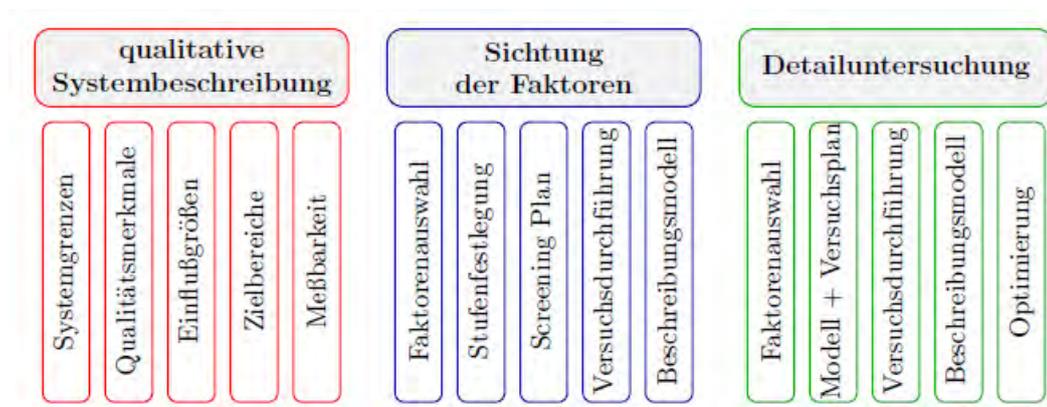


Abbildung 1-14: Schematischer Ablauf einer *DoE*-Anwendung. Die drei Phasen werden nacheinander durchlaufen und bauen aufeinander auf. [10]

Dieser Ablauf wurde im Rahmen dieser Arbeit für die generische *HPLC*-Methodenentwicklung für Protein- und *pDNA*-Proben angewandt.

2. Zielsetzung

Die primäre Zielsetzung dieser Bachelorarbeit lag in der Erarbeitung und Entwicklung einer generischen Analytik-Methode unter Verwendung einer Hochdruckchromatographieanlage in Kombination mit einer *RP-HPLC*-Säule zur qualitativen und quantitativen Beurteilung unterschiedlicher Proteinprozessproben. Gestützt auf die statistische *DoE*- und Auswertesoftware *MODDE* erfolgte die experimentelle Planung der einzelnen Versuchsreihen und gleichfalls die spätere Optimierung der Methoden für den routinemäßigen Einsatz im Labor.

Zusätzlich sollte die zu entwickelnde Methode zur Analytik von Prozessproben nach unterschiedlichen Aufreinigungsstufen geeignet sein.

Neben dem primären Ziel dieser Arbeit erfolgte zusätzlich die Entwicklung einer weiteren *RP-HPLC*-Methode zur qualitativen und quantitativen Analytik von Plasmid-DNA.

3. Material

Im folgenden Kapitel werden alle für die Versuche verwendete Chemikalien, Kits, Protein-Standards sowie die entsprechenden Geräte und dazu gehörige Software aufgelistet. Bei der gleichen Spezifikation und Eignung können auch Chemikalien und Geräte anderer Hersteller verwendet werden.

3.1. Chemikalien und Kitsysteme

Folgende Chemikalien wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Falls nicht anders angegeben, entsprechen die Reagenzien der höchsten Reinheitsklasse.

Für alle Versuche wurde demineralisiertes Wasser verwendet.

Tabelle 3-1: Übersicht der verwendeten Chemikalien/Kits

Chemikalien/Kits	Qualität	Hersteller
2-Propanol	<i>Excipient EMPROVE® exp Ph Eur, BP, JP, USP</i>	Merck
Aceton	<i>Excipient EMPROVE® exp Ph Eur, BP, JPE, NF</i>	Merck
Acetonitril mit 0,1% (v:v) Trifluoressigsäure, LiChrosolv®		Merck
Acetonitril, CHROMASOLV®	<i>gradient grade, for HPLC, ≥ 99,9%</i>	Sigma-Aldrich
<i>Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay</i>		Pierce/Thermo Fisher Scientific
MES-Puffer, 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure		RHB
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel 1,0 mm, 15 Well, Novex®		Invitrogen
NuPAGE® Antioxidant, Novex®		Invitrogen
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X), Novex®		Invitrogen
NuPAGE® Sample Reducing Agent, Novex®		Invitrogen
<i>Protein Molecular Weight Standards, broad range, Novex®</i>		Invitrogen
<i>SimplyBlue™ SafeStain, Ready-to-use, Fast, Sensitive, and Safe Coomassie® G-250 Stain</i>		Invitrogen

Chemikalien/Kits	Qualität	Hersteller
Tetrahydrofuran	EMSURE® ACS, Reag. Ph Eur	Merck
Trichloressigsäure	EMSURE® ACS, Reag. Ph Eur	Merck
Trifluoressigsäure, CHROMASOLV®,		Sigma-Aldrich
BSA-Standard, c=2 mg/mL		Thermo Fisher Scientific

3.2. Geräte und Software

In der Tabelle 3-2 sind die für die Arbeit verwendeten Geräte und die dazugehörige Software zusammengefasst.

Tabelle 3-2: Verwendete Geräte und Software

Gerät	Model/Bezeichnung	Hersteller
HPLC-Anlagen: UV-VIS/DAD-Detektor Säulenofen Pumpe A/B Autoinjektor Systemkontrolleinheit	CTO-10AV VP/ CTO-10AD VP CTO-10A/CTO-10A VP LC-10AT SIL-10A/SIL-10A CHT SCL-10 VP/SCL-10A VP	Shimadzu
Entgaser	Series-300/Series-3315 α	ERC
Zentrifuge	Centrifuge 5415 D	eppendorf
Stromquelle	Elektrophoresis Power Supply-ESP 601	amersham pharmacia bio- tech
Vortexer	Relax top	Heidolph
Thermoblock	ThermoStat plus	eppendorf
Mikrowelle	CMG 2893 DW	Candy
Gelscanner	ViewPix 900	Epson und biostep®
Wippe	ST 5 CAT	Hassa Laborbedarf
Ultraschallbad	SONOREX SUPER RK 1028	BANDELIN electronic
Ultraschallprozessor	UP400S	Dr. Heilscher
Elektrophoresekammer	SE 260	Hoefer
Pipettenspitzen 10 µL, 200 µL, 1000 µL		eppendorf
Pipettenspitzen, GelLoader Tips		eppendorf
Reaktionsgefäße 0,5 mL, 1,5 mL		eppendorf
HPLC-Probengefäße 0,5 mL, 1 mL,		Waters
Statistische Auswertesoftware	MODDE 9	Umetrix

Gerät	Model/Bezeichnung	Hersteller
HPLC Steuer- und Auswertesoftware	LC-Solution	Shimadzu
Gelauswertesoftware	totalbab	BioSystematica

3.3. Chromatographische Säulen

Die nachfolgende Tabelle 3-3 stellt die Übersicht der in der Arbeit verwendeten *RP-HPLC*-Säulen, sowie ihre Ausführungen und Eigenschaften dar.

Tabelle 3-3: Übersicht der verwendeten *RP-HPLC*-Säulen

Material	Ausführung	Matrix	Porengröße	Hersteller
Jupiter® C18	250 x 4,6 mm, 5 µm	Peptide-C18	300Å	Phenomenex®
Jupiter® C4	250 x 4,6 mm, 5 µm	Protein-C4	300Å	Phenomenex®
Jupiter® C4	RP-Vorsäule	Protein-C4	-	Phenomenex®
PLRP-S	250 x 4,6 mm, 8 µm	Polymer	4000 Å	Agilent®

3.4. Biologische Proben

Aus betriebsinternen Gründen werden an dieser Stelle keine genauen Angaben zu den einzelnen Proteinen in der Proteinmischprobe gemacht. Zu den Eigenschaften der oben genannten Proteine dürfen lediglich folgende Angaben gemacht werden:

- Es handelt sich um fünf Fusionsproteine, die zu pharmazeutischen Zwecken als Wirkstoff angewandt werden sollen und befinden sich derzeit in unterschiedlichen klinischen Phasen des Zulassungsverfahrens
- Drei der fünf Proteine enthalten jeweils einen Antikörper und einen Wirkstoff als Fusionsseinheiten. Ihre molekulare Masse liegt im Bereich von 20 bis 40 kDa. Sie befinden sich zur Zeit der Versuchsdurchführung in der III. bzw. II. Phase der klinischen Studien
- Zwei der fünf Proteine enthalten jeweils einen Wirkstoff und eine Peptideinheit, die dem Zweck der Aufreinigung während der Herstellung dient. Die Angaben zur molekularen Größe beschränken sich auf maximal 30 kDa. Diese Proteine befinden sich zur Zeit der Versuchsdurchführung in der I. Phase der klinischen Studie.

Im folgenden Verlauf der Arbeit werden diese Proteine wie folgt benannt:

- Proteine, die einen Antikörper als Fusionseinheit enthalten: B085, B095 und B104
- Proteine ohne Antikörper: B080, B082.

Tabelle 3-4: Zusammenfassende Darstellung der verwendeten biologischen Proben

Modellprotein	Molekulargewicht [kDa]	isoelektrischer Punkt
B080	<6,5	6,00
B082	15,4	5,95
B085	24,3	9,40
B095	36,9	5,54
B104	36,8	8,10

Alle für die Methodenentwicklung verwendeten Proben stammen aus dem *Bulk*-Schritt des Herstellungsprozesses und die Proben zur Methodenüberprüfung aus dem *Clarified-Harvest*-Schritt (Abbildung 3-1).

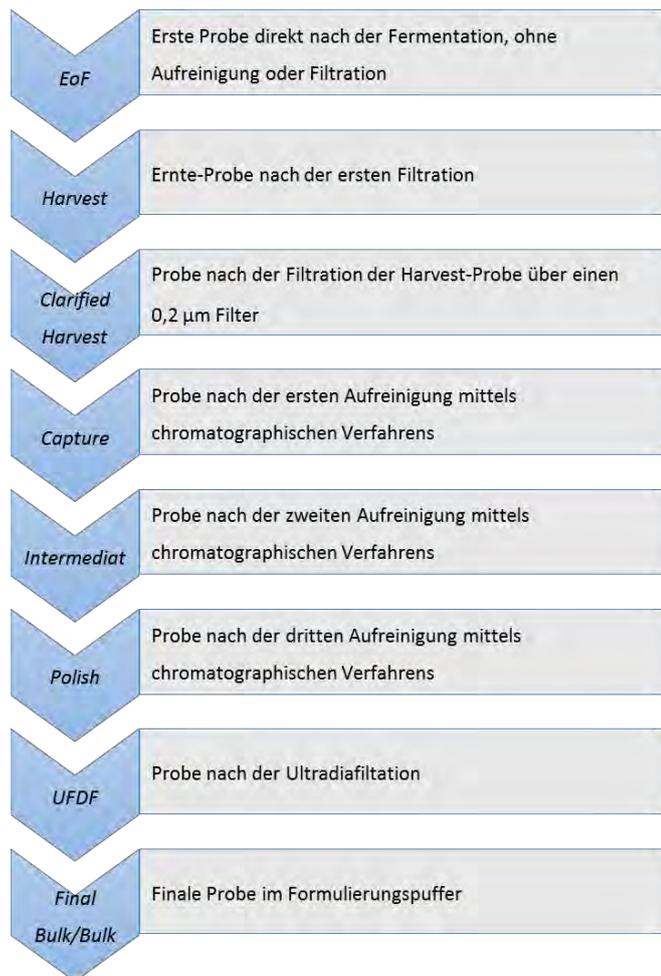


Abbildung 3-1: Übersicht der In-Prozess-Proben bei den unterschiedlichen Aufreinigungsstufen von der Fermentation bis zur Endreinigung und Formulierung

Für die Plasmid-DNA-Versuche wurde ein Plasmid mit einem mittleren Molekulargewicht von 7 kb verwendet. Das isolierte Plasmid lag in der *ccc*-Konformation vor und wurde während der Versuchsdurchführung durch spezielle Restriktionsenzyme in seine zwei weiteren Konformationen (*lc*- und *oc*-Konformation) transformiert.

4. RP-HPLC-Methodenentwicklung

Die Entwicklung einer generischen analytischen Methode zur Quantifizierung und qualitativen Beurteilung von Proteinproben basiert auf Testung der zwei unterschiedlichen *RP-HPLC*-Säulentypen mit zwei unterschiedlichen Elutionssystemen unter gleichen Bedingungen. Dieses grundlegende experimentelle System wurde während der Entwicklung nicht verändert, so dass der Einfluss der verschiedenen Prozessparameter (Säulofentemperatur, Fließmittelgeschwindigkeit, Gradientenlaufzeit) auf die Trennleistung getestet werden konnte.

Für die Entwicklung einer generischen Methode zur Analyse von Plasmid-DNA benötigt man auf Grund der molekularen Größe *RP*-Säulen mit ausreichender Porengröße. Daher wurde die Entwicklung auf einen Säulentyp und ein Eluentensystem fokussiert.

Ein Überblick zur experimentellen Planung gibt Abbildung 4-1, während Tabelle 4-1 die daraus verschiedenen Versuchsgruppen zusammenfasst.

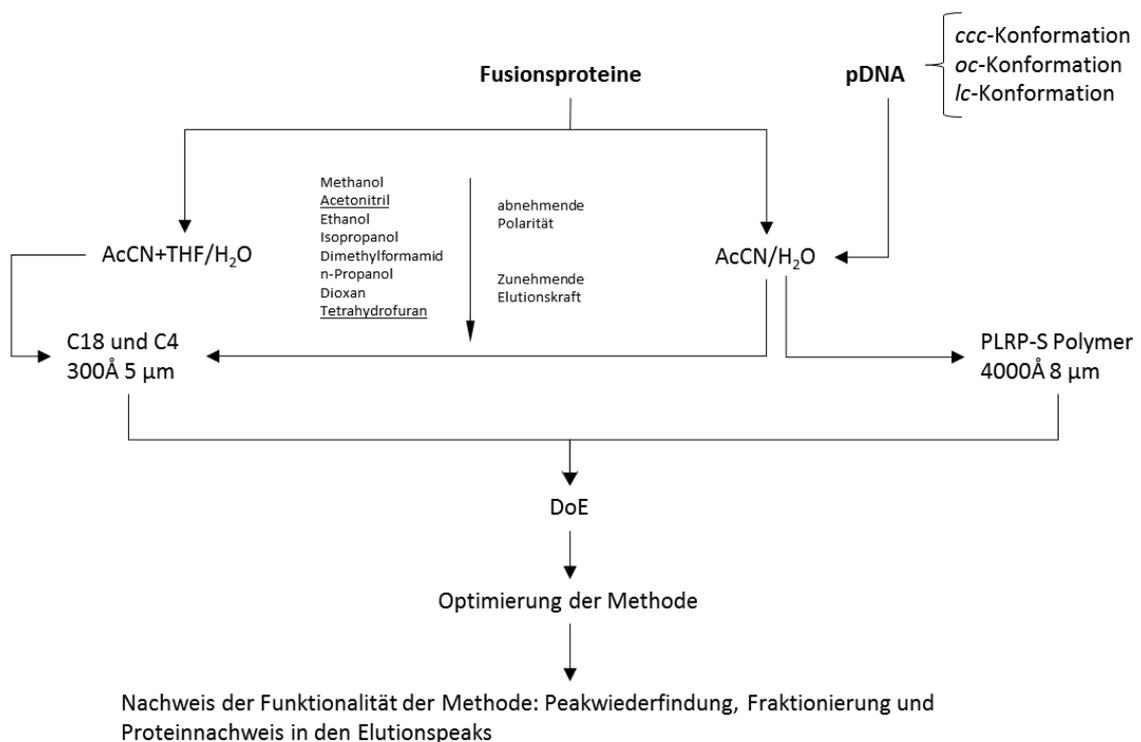


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der Versuchskonstellation zur Methodenentwicklung

Tabelle 4-1: Übersicht der Methodenzusammenstellungen/Versuchsgruppen für die generische HPLC-Methodenentwicklung für Proteinproben. VG = Versuchsgruppe

VG	Säulentyp	Eluent A	Eluent B
1	RP-HPLC C18, 300 Å/5 µm	H ₂ O	80% AcCN+20% THF
2			100% AcCN
3	RP-HPLC C4, 300 Å/5 µm		80% AcCN+20% THF
4			100% AcCN
5	PLRP-S Polymer, 4000 Å/8 µm		100% AcCN

Jedem Elutionssystem wurde 0,1% (v:v) Trifluoressigsäure zugesetzt um eine mögliche Proteinwechselwirkung mit der Säulenmatrix zu minimieren.

Für die Planung der einzelnen Experimente zur Untersuchung des Parametereinflusses auf die Trennleistung wurde mit Hilfe der DoE-Software MODDE eine Versuchsmatrix erstellt und statistisch ausgewertet.

4.1. Vorversuche

Zur Beurteilung des Elutionsverhaltens der einzelnen Proteine wurden entsprechende Vorversuche durchgeführt, bei denen die einzelnen Proteinproben auf die jeweilige Säule unter Verwendung des Elutionssystems 100% AcCN/H₂O appliziert wurden.

Die Parameter für die Vorversuche an den beiden Säulensystemen sind der nachfolgenden Tabelle 4-2 zu entnehmen.

Tabelle 4-2: Übersicht der Parameter für die Vorversuche

Säulentyp	$T_{\text{Säulenofen}}$ [°C]	$\dot{V}_{\text{Fließmittel}}$ [mL/min]	t_{Gradient} [min]	$\varphi_{B, \text{Start}}$ [%]	$\varphi_{B, \text{Ende}}$ [%]
RP-HPLC C18, 300 Å/5 µm	30	0,5	60	2	100
RP-HPLC C4, 300 Å/5 µm					

Der Konzentrationsverlauf des Eluenten B während der Vorversuche wurde in der Abbildung 4-2 graphisch dargestellt.

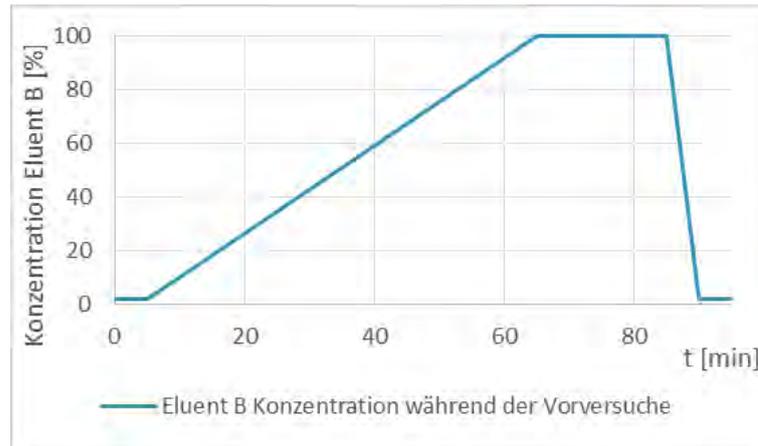


Abbildung 4-2: Graphische Darstellung des Konzentrationsverlaufs des Eluenten B während der Vorversuche

Aus der Überlegung, dass die einzelnen Proben für die Methodenentwicklung in Form einer Mischprobe auf die jeweilige Säule appliziert werden sollten und sich somit eine Probenverdünnung von 1:5 in Bezug auf die einzelnen Proteinproben ergibt, wurden die einzelnen Proteinproben für die Vorversuche ebenfalls 1:5 verdünnt. Als Verdünnungsmittel wurde der Eluent A verwendet. Jeweils 100 μL der Proben B080, B082, B085, B095 und B104 wurden aus dem *Bulk*-Schritt des Herstellungsprozesses verwendet, (Abbildung 3-1), auf Raumtemperatur temperiert und ohne weitere Vorbehandlung in jeweils einem *HPLC*-Probengefäß (Glas, 1 mL) mit jeweils 400 μL des Eluenten A vermischt. Es ergab sich somit die erwünschte Probenverdünnung von 1:5. Das Injektionsvolumen der Probe wurde auf 100 μL festgelegt. Aus einem 1 mL *HPLC*-Probengefäß wurden jeweils vier Probeninjektionen durchgeführt um so das mögliche Ansaugen von Luft während der Injektion zu vermeiden. Weiterhin garantiert dieses Vorgehen die Injektion einer konstanten Probenmenge.

Nach dem Ansetzen der einzelnen Puffer wurden diese in einem Ultraschallbad 15 Minuten entgast und konnten somit direkt an die jeweilige *HPLC*-Anlage angeschlossen werden.

Alle Auswertungen wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt.

Die Ergebnisse der Vorversuche zeigten, dass bei der folgenden Methodenentwicklung in erster Linie auf das Elutionsverhalten der Proteinproben B085, B095 und B104 geachtet werden soll.

4.2. Festlegung der variablen und konstanten Parameter

Im ersten Schritt wurden die Parameter festgelegt, die während der Methodenentwicklung unverändert bleiben, sowie Parameter, die variiert werden können.

Die Wahl der Parameter, die in einer Versuchsgruppe variiert wurden, basierte auf ihrem Einfluss auf die Qualität der Trennung und die Möglichkeit, diese bei der zur Verfügung stehenden HPLC-Anlage einzustellen.

Zu den konstant gehaltenen Parametern gehörten der Säulentyp und das Elutionssystem (siehe Tabelle 4-1), während die Parameter Gradientenlaufzeit, Säulenofentemperatur, Fließmittelgeschwindigkeit und Endkonzentration des Eluenten B während des Gradienten variiert wurden (siehe Abbildung 4-3).

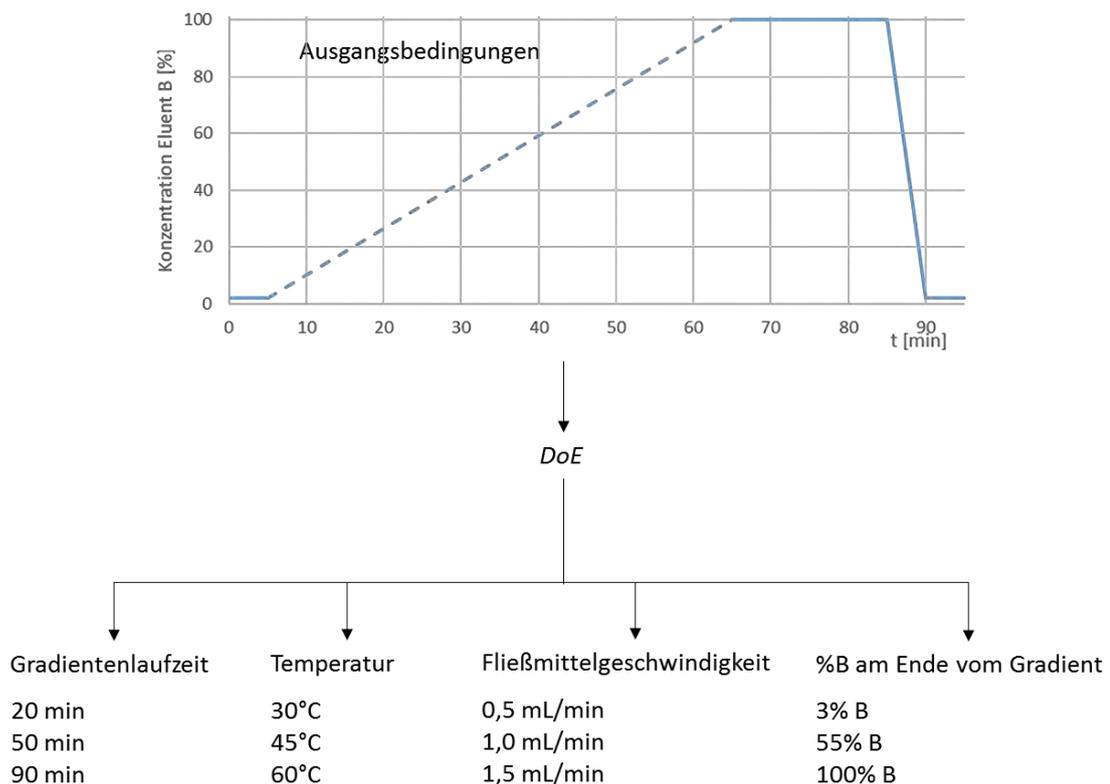


Abbildung 4-3: Schematische Darstellung der Ausgangsbedingungen der RP-HPLC Methode zur Untersuchung der Proteinproben sowie die Variation der Methodenparameter. Der gestrichelte Bereich, der in diesem Fall dem Gradienten entspricht, wurde variiert, restliche Bereiche blieben bei allen Versuchen konstant. Zusätzlich sind die einzelnen Bereiche der zu variiierenden Parameter abgebildet

Bei der Gradientenlaufzeit wurde ein Bereich zwischen 20 und 90 Minuten festgelegt. Die Mindestzeit von 20 Minuten sollte in diesem Fall sicherstellen, dass die in der jeweiligen Säule applizierte Probe vollständig von der Säule eluieren kann, um so spätere Akkumulationen und damit verbundene Abweichungen zu vermeiden. Die Maximalzeit von 90 Minuten dient dem zeitlichen Rahmen des Versuchs und sollte somit gewährleisten, dass die Analysezeit je Probe nicht zu lange dauert und die Ressourcen nicht unnötig verbraucht werden.

Die Temperatur des Säulenofens wurde auf eine Mindesttemperatur von 30°C festgelegt. Dies ist die geringste Temperatur, die bei der zur Verfügung stehenden Anlage einstellbar ist. Für die Versuche wurde zusätzlich eine Maximaltemperatur von 60°C festgelegt. Die zur Verfügung stehende Anlage gewährleistet eine Säulenofentemperatur von maximal 80°C.

Für die Fließmittelgeschwindigkeit wurde ein Bereich von 0,5 – 1,5 mL/min festgelegt. Die Fließmittelgeschwindigkeit hat einen direkten Einfluss auf den Druck, der während der Analyse in der Säule auftritt. Eine Fließmittelgeschwindigkeit von unter 0,5 mL/min hätte eine mögliche Peakverbreiterung und ggf. eine Peaküberlagerung zur Folge. Eine Fließmittelgeschwindigkeit von über 1,5 mL/min kann je nach der Viskosität des Eluentensystems und der Größe der zu untersuchenden Proteine zu einem Druckanstieg in der Säule führen, der unter Umständen zur nachhaltigen Schädigung der Säulenmatrix führt.

Der Gradient hat einen direkten Einfluss auf das Elutionsverhalten der zu untersuchenden Probe. Ein sehr flacher Gradient von 3% Eluent B sollte keine Elution der Probenbestandteile hervorrufen. Somit kann untersucht werden, ob die Probenbestandteile mittels des gewählten Elutionssystems voneinander trennbar sind. Bei einem Gradienten von 100% B ist mit einer vollständigen Elution der einzelnen Probenbestandteile zu rechnen.

Die Equilibrierungszeiten von je 5 Minuten vor und nach der Elution, das 20-minütige Halten der maximalen Konzentration des Eluenten B und die Senkung der Konzentration des Eluenten B auf den Ausgangswert wurden bei jedem Versuch beibehalten.

4.3. Erstellen der Versuchsmatrix mittels der DoE-Software MODDE

Zur Erstellung der Versuchsmatrix und der nachfolgenden Beurteilung der Eignung der Methode wurde das *Full-Frac-(2 Level)*-Interaktionsmodell angewandt. Dieses Modell bietet die Möglichkeit, die Zusammenhänge und Wechselwirkungen der einzelnen Parameter wie beispielsweise Säulenofentemperatur und Fließmittelgeschwindigkeit auf die Auflösung der Peaks und ihrer Retentionszeit zu untersuchen. Zusätzlich ermittelt dieses Modell die sogenannten *Center-points*, die die Mittelwerte der Parameter in ihren Variabilitätsbereich darstellen.

Die resultierende Versuchsmatrix ist in Tabelle 4-3 zusammengefasst.

Tabelle 4-3: Versuchsmatrix zur Methodenentwicklung erstellt mittels der DoE-Software unter Berücksichtigung der im Vorfeld ausgesuchten variablen Parameter

$T_{\text{Säulenofen}} [^{\circ}\text{C}]$	$\dot{V}_{\text{Fließmittel}} [\text{mL}/\text{min}]$	$t_{\text{Gradient}} [\text{min}]$	$\varphi_{B, \text{Start}} [\%]$	$\varphi_{B, \text{Ende}} [\%]$
30	0,5	20	2	3
30	0,5	90	2	3
30	0,5	20	2	100
30	0,5	90	2	100
30	1,5	20	2	3
30	1,5	90	2	3
30	1,5	20	2	100
30	1,5	90	2	100
45	1	55	2	51,5
45	1	55	2	51,5
45	1	55	2	51,5
60	0,5	20	2	3
60	0,5	90	2	3
60	0,5	20	2	100
60	0,5	90	2	100
60	1,5	20	2	3
60	1,5	90	2	3
60	1,5	20	2	100
60	1,5	90	2	100

Diese Versuchsmatrix ist identisch für alle in der Tabelle 4-1 erwähnten Versuchsgruppen, und wurde an zwei baugleichen HPLC-Anlagen zeitgleich abgearbeitet. Alle Chromatogramme wurden bei einer Detektorwellenlänge von 280 nm aufgenommen. Vor dem ersten und nach jedem weiteren Versuch wurden jeweils zwei Leerläufe mit Eluent B als Probe durchgeführt. Die Leerläufe wurden mit den gleichen Einstellungen durchgeführt, wie die jeweils vorhergehenden und nachfolgenden Probenläufe. Dies diente der Anpassung der Säule an die veränderten Einstellungen und der Vermeidung von Probenverschleppungen.

Die zur Verfügung stehende HPLC-Anlage und die dazugehörige LC-Solution Software bieten die Möglichkeit die gesamte Versuchsmatrix in Form eines Programms durchzuführen. Dabei wurde die Reihenfolge der Versuche an den Säulenofentemperaturverlauf (min → max) angepasst. Für jeden einzelnen Versuch der Versuchsmatrix wurde jeweils eine eigene Methode mittels der LC-Solution Software erstellt.

Die Probenvorbereitung für alle in der Tabelle 4-1 abgebildeten Versuche wurde einheitlich durchgeführt.

4.4. Festlegung der Methodenbeurteilungskriterien für die DoE-Software und anschließende Auswertung der DoE-Ergebnisse

Um den Erfolg der einzelnen Versuche im Rahmen der Methodenentwicklung mittels der verwendeten DoE-Software zu beurteilen wurden folgende Bewertungsparameter, die direkt den Chromatogrammen zu entnehmen waren, festgelegt:

1. Gesamtretentionszeit
2. Anzahl der sichtbaren Peaks
3. Anzahl der getrennten Peaks

Bei der Gesamtretentionszeit wurde die benötigte Zeit betrachtet, um alle fünf Proteine der zu untersuchenden Probe voneinander chromatographisch zu trennen. Auf Grund dessen, dass die Anzahl der zu trennenden Proteine in der Probe bekannt ist, wurde daher die Retentionszeit des fünften Peaks verwendet. Weiterhin erlaubt die Gesamtretentionszeit eine Beurteilung der Dauer der Methode, die für den Einsatz im Labor ein wichtiger Parameter ist.

Bei der Anzahl der sichtbaren Peaks wurden die Peaks betrachtet, die in dem Chromatogramm zu erkennen waren. Dabei spielten Faktoren wie Auflösung, Basislinientrennung, Tailing oder Fronting keine Rolle.

Im Gegensatz zu den sichtbaren Peaks berücksichtigt die Anzahl der getrennten Peaks nur die deutlich voneinander getrennten Peaks.

Die drei o.g. Parameter wurden der DoE-Software zur weiteren statistischen Auswertung übergeben. Die Ergebnisse dieser Auswertung zeigten den Einfluss der variablen Parameter (Abbildung 4-4) auf die Beurteilungsparameter in Form von *Coefficient Plot*, Modellumgebungsdarstellung und *Summery of Fit*.

Anhand der statistischen Auswertung und der durch die durchgeführten Versuche vorliegenden Ergebnisse in Form der Chromatogramme wurden Überlegungen für die nachfolgenden Optimierungsversuche getroffen. Diese Optimierungsversuche dienten der genaueren Untersuchung, ob die Änderungen der variablen Parameter mit dem höchsten Einfluss auf die Beurteilungsparameter eine qualitative und quantitative Verbesserung der Methode bewirken. Die Tabelle 4-4 zeigt die ermittelten variablen Parameter mit dem höchsten Einfluss auf die Beurteilungsparameter.

Tabelle 4-4: Ermittlung der variablen Parameter mit dem höchsten Einfluss auf die Beurteilungsparameter

VG	Säulentyp	Eluentensystem	Änderung der variablen Parametren im Rahmen der Optimierung
1	RP-HPLC C18, 300 Å/5 µm	80% AcCN+20% THF/ H ₂ O	Säulenofentemperatur
			Fließmittelgeschwindigkeit
2		100% AcCN/H ₂ O	Säulenofentemperatur
			Fließmittelgeschwindigkeit
3	RP-HPLC C4, 300 Å/5 µm	80% AcCN+20% THF/H ₂ O	Säulenofentemperatur
			Fließmittelgeschwindigkeit
4		100% AcCN/H ₂ O	Säulenofentemperatur
			Fließmittelgeschwindigkeit

Anhand der Ergebnisse aus den Versuchen der DoE-Versuchsmatrix (Tabelle 4-3) wurde deutlich, dass eine qualitativ bessere chromatographische Trennung der einzelnen Bestandteile der Probe unter Verwendung des 90-minütigen Gradienten mit einer 100%-igen Endkonzentration an Eluent B erreichbar ist. Aus diesem Grund wurden folgende Parameter für die weiteren Versuche übernommen.

Es ergab sich somit folgende Versuchsmatrix für die Optimierung der Methode:

Tabelle 4-5: Versuchsmatrix zur Optimierung der Methode

$T_{\text{Säulenofen}} [^{\circ}\text{C}]$	$\dot{V}_{\text{Fließmittel}} [\text{mL}/\text{min}]$	$t_{\text{Gradient}} [\text{min}]$	$\varphi_{B, \text{Start}} [\%]$	$\varphi_{B, \text{Ende}} [\%]$
60	0,25	90	2	100
80	0,50			
	1,00			
	1,50			

Diese Versuchsmatrix ist identisch für alle in der Tabelle 4-4 erwähnten Versuchsgruppen, und wurde an zwei baugleichen HPLC-Anlagen zeitgleich abgearbeitet. Alle Chromatogramme wurden bei einer Detektorwellenlänge von 280 nm aufgezeichnet.

Zusätzlich wurde die Optimierungsfunktion der DoE-Software angewandt. Dies erlaubt eine hypothetische Aussage über eine mögliche Verbesserung der Ergebnisse durch die weitere Änderung der variablen Parameter. Die Gesamtretentionszeit wurde hierbei nicht berücksichtigt und der Einfluss der Parameter für „Anzahl der sichtbaren Peaks“ und „Anzahl der getrennten Peaks“ auf jeweils 50% festgelegt. Der Parameter „Anzahl der sichtbaren Peaks“ sollte dabei minimiert und der Parameter „Anzahl der getrennten Peaks“ maximiert werden. Die Ergebnisse wurden in Form der 4D Contour Diagramme und Contour Plots dargestellt. Diese bekräftigten die Überlegungen zur Optimierung, wie in der Tabelle 4-5 aufgezeigt.

4.5. Optimierung der Endmethode durch Probenverdünnung und Zeitverkürzung

Aus den Ergebnissen der Versuche der Versuchsmatrix aus der Tabelle 4-5 wurden die variablen Parameter bestimmt, die die bestmögliche chromatographische Auftrennung der einzelnen Probenbestandteile erzielen. Somit ergaben sich folgenden Endmethodenzusammenstellungen für beide Versuchsgruppen.

Tabelle 4-6: Finale Methodenparameter, ermittelt aus den Ergebnissen der Optimierungsversuche

VG	Säulentyp	Eluentensystem	Parameter für die optimale chromatographische Auftrennung				
			$T_{\text{Säulenofen}}$ [°C]	$\dot{V}_{\text{Fließmittel}}$ [mL/min]	t_{Gradient} [min]	$\varphi_{B, \text{Start}}$ [%]	$\varphi_{B, \text{Ende}}$ [%]
3	RP-HPLC C4, 300 Å/5 µm	80% AcCN+20% THF/H ₂ O	80	0,5	90	2	100
4		100% AcCN/H ₂ O	80	0,5	90	2	100

Durch Applikation der einzelnen Proteinproben auf die jeweilige Säule konnte die Identifikation und Übereinstimmung mit den jeweils eluierten Probenpeaks der Mischprobe gezeigt werden. Dabei wurden diese der gleichen Verdünnung unterzogen, wie in der Mischprobe (1:5), um so die gleiche Proteinkonzentration pro Injektion zu erhalten (Injektionsvolumen wurde konstant bei 100 µL gehalten). Die Verdünnung erfolgte mittels des Eluenten A, in diesen beiden Fällen war das H₂O mit 0,1% (v:v) Trifluoressigsäure.

Für eine weitere Verbesserung der Trennleistung sollte eine weitere Probenverdünnung der einzelnen Proteinproben untersucht werden. Es wurden nur die Proteinproben verdünnt, deren Elutionspeaks sich in dem Chromatogramm überlagerten und nicht auf Basislinienniveau getrennt wurden. Die einzelnen Verdünnungsstufen der Proteinproben je nach Versuchsgruppe summiert die nachfolgende Tabelle 4-7.

Tabelle 4-7: Verdünnung der einzelnen Proteinproben zur Optimierung der Auflösung

VG	Säulentyp	Eluentensystem	Verdünnungsfaktoren der einzelnen Proteinproben zur Verbesserung der Auflösung				
			B080	B082	B085	B095	B104
3	RP-HPLC C4, 300 Å/5 µm	80% AcCN+20% THF/H ₂ O	1:5	1:10	1:10	1:500	1:80
1:40							
1:100							
4	RP-HPLC C4, 300 Å/5 µm	100% AcCN/H ₂ O	1:5	1:5	1:5	1:80	1:80
1:100							
1:160							
1:500							

Die *LC-Solution*-Software der verwendeten *HPLC*-Anlagen bietet die Möglichkeit der Überlagerung einzelner Chromatogramme. Dies ermöglicht eine theoretische Vorhersage, wie die Auflösung der Mischprobe mit den jeweiligen Verdünnungen der einzelnen Komponenten aussehen könnte. Somit ließ sich Probenmaterial und Zeit sparen.

Die Ergebnisse der Verdünnungsversuche ergaben die optimale Probenverdünnung für die jeweilige Versuchsgruppe, die unter gegebenen technischen Voraussetzungen die bestmögliche Auflösung bot. Ab diesem Schritt der Methodenentwicklung wurden die Proteinproben B080 und B082 zu der Mischprobe hinzugefügt. Das Verhältnis der hinzugefügten Proteinproben in den Mischproben betrug wie bei den Vorversuchen 1:5.

Im letzten Schritt der Optimierung der Methoden wurde die Laufzeit der einzelnen Analyse untersucht.

Bei der Optimierung der Gradientenlaufzeit wurde die Konzentration des Eluenten B beim ersten und letzten Elutionspeak, sowie die für die gesamte Elution der fünf Proteinpeaks benötigte Zeit betrachtet. Dieser Konzentrationsverlauf wurde anschließend in die jeweiligen Methoden übernommen. Um den möglichen Schwankungen bei der Vermischung der Eluenten A und B im zweiten Pumpensystem entgegenzuwirken wurde die Startkonzentration des Eluenten B auf einen geringeren Wert gesetzt und die Endkonzentration des Eluenten B auf einen höheren Wert. Die für die gesamte Elution der fünf Proteinpeaks benötigte Zeit wurde beibehalten.

Die Equilibrierungszeit von 5 Minuten nach der Elution wurde als ausreichend befunden und beibehalten, so dass keine weitere Verlängerung vor der Elution notwendig ist. Das 20-minütige Halten der maximalen Konzentration des Eluenten B und die Senkung der Konzentration des Eluenten B vom maximalen Wert auf den Ausgangswert wurden durch einen Anstieg der Konzentration des Eluenten B auf 90% innerhalb von 5 Minuten und eine anschließende sofortige Senkung der Konzentration des Eluenten B auf die Anfangskonzentration ersetzt.

Durch die Probenverdünnung und die Veränderung der Gradientenlaufzeit, sowie die Anpassung der Start- und Endkonzentrationen des Eluenten B ergaben sich folgende Parameterzusammenstellungen, die Tabelle 4-8 zusammenfasst.

Tabelle 4-8: Finale Parameter für die Methodenentwicklung für Proteinproben

VG	Säulentyp	Eluentensystem	Parameter für die optimale chromatographische Auftrennung					Optimale Verdünnung der Proben				
			$T_{\text{Säulenofen}}$ [°C]	$\dot{V}_{\text{Fließmittel}}$ [mL/min]	t_{Gradient} [min]	$\varphi_{B, \text{Start}}$ [%]	$\varphi_{B, \text{Ende}}$ [%]	B080	B082	B085	B095	B104
3	RP-HPLC C4, 300 Å/5 µm	80% AcCN+20% THF/ H ₂ O	80	0,5	20	25	75	1:5	1:500	1:80		
4		100% AcCN/H ₂ O			22							

Visuell lässt sich sowohl die Optimierung des Gradientenverlaufs und die Konzentration des Eluenten B der beiden Versuchsgruppen Abbildung 4-4 darstellen.

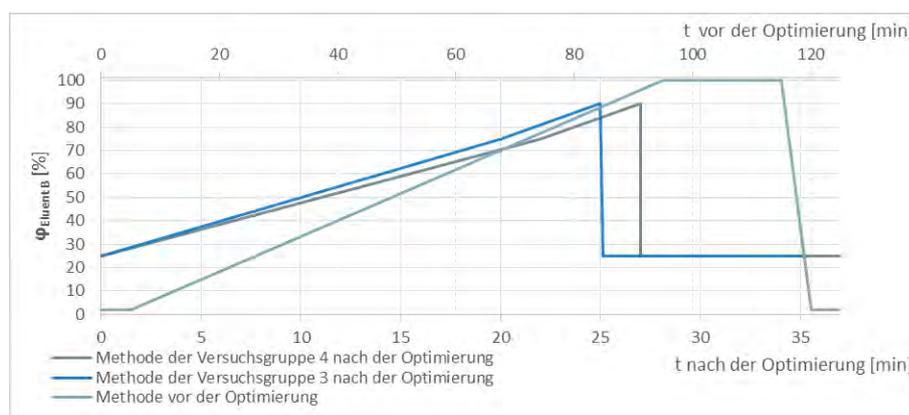


Abbildung 4-4: Graphischer Vergleich des zeitlichen Ablauf der Methoden vor und nach der Optimierung der Gradientenlaufzeit und Eluenten B-Konzentration

Das Auftreten zusätzlicher Peaks durch das verwendete Elutionsmittel konnte durch einen Leerlauf (ohne Probeninjektion) der Methode geklärt werden. Im Fall einer UV-Detektion wurden diese Peaks für die Auswertung nicht verwendet.

Bei der Testung der entwickelten Methode auf Peakwiederfindung wurden die In-Prozess-Proben aus dem *Clarified-Harvest*-Schritt (Abbildung 3-1) auf die jeweilige Säule appliziert. Die Testung der o.g. Proben wurde unter Verwendung der jeweiligen optimierten Methode mit den in der Tabelle 3 12 aufgeführten finalen Parametern durchgeführt. Das Injektionsvolumen der Mischprobe wurde wie in den vorhergehenden Versuchen auf 100 µL eingestellt.

4.6. Überprüfung der entwickelten Methode durch Fraktionierung und anschließender Auswertung der einzelnen Proben in einem SDS-PAGE-Gel

Der Schritt der Fraktionierung der einzelnen Elutionspeaks diente dem Nachweis der Identität der Proteine.

4.6.1. Probenfraktionierung

Bei der Fraktionierung wurde der *Waste*¹-Schlauch der HPLC-Anlage, der unmittelbar nach dem Detektor angeschlossen ist, auf eine Länge von 3 cm verkürzt, um das Totvolumen möglichst gering zu halten.

Die Fraktionierung begann unmittelbar nach dem Anstieg des Peaks, der mittels der Software in Echtzeit visualisiert wurde und endete mit dem Erreichen der Basislinie am Ende des zu fraktionierenden Peaks. Zusätzlich wurde die Echtzeit-Anzeige direkt am Detektor überprüft. Die Fraktionsproben wurden in 2,0 mL Probengefäße aufgefangen.

¹ Waste = Abfall

4.6.2. TCA-Proteinfällung

Um die Fraktionsproben auf ihren Proteingehalt mittels der *SDS-PAGE*-Methode untersuchen zu können, musste eine Proteinfällung der Proben durchgeführt werden. AcCN-haltige Proben können nicht mittels *SDS-PAGE* untersucht werden, da AcCN zu einer Auflösung der Gelstruktur führen kann.

Außerdem wird die Proteinfällung zum Zweck der Aufkonzentrierung der Probe angewandt. Es wurde die *TCA*-Proteinfällungsmethode angewandt und wie folgt durchgeführt:

Für die 100%-ige (*w:v*) Trichloressigsäure-Stammlösung wurden 500 g Trichloressigsäure (*TCA*) mit 350 mL dH₂O versetzt und homogenisiert. Fraktionsproben wurden im Verhältnis 1:4 mit der 100%-igen (*w:v*) *TCA*-Stammlösung in einem separaten Probengefäß vermengt. Dabei wurde das gesamte Volumen der jeweiligen Fraktionsprobe verwendet, um eine höhere Endkonzentration an Proteinen zu erreichen. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubationszeit bei 4°C und eine 5-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm. Der Überstand der mit *TCA* versetzten Proben wurde vorsichtig abgenommen (Pellet war in manchen Fällen kaum sichtbar). Das sich im Reaktionsgefäß befindende Pellet wurde mit jeweils 200 µL kaltem Aceton gewaschen und erneut einer 5-minütigen Zentrifugation bei 14000 rpm unterzogen. Der Überstand wurde anschließend erneut vorsichtig abgenommen. Und der Aceton-Waschschrift insgesamt drei Mal durchgeführt.

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Pellets in einem Heizblock bei 95°C in den offenen Reaktionsgefäßen 10 Minuten lang getrocknet. Der Trocknungsschrift diente der vollständigen Verdampfung des Acetons aus den jeweiligen Proben.

Nach der abgeschlossenen Proteinfällung wurden die Fraktionsproben mit Hilfe der *SDS-PAGE*-Methode auf ihren Proteingehalt untersucht.

4.6.3. SDS-PAGE

Für die *SDS-PAGE*-Analyse aller Pellets der Fraktionsproben wurden diese in jeweils 10 µL Reinstwasser resuspendiert und wie in der Tabelle 4-9 dargestellt, mit *SDS-PAGE*-Probenpuffern versetzt. Zusätzlich wurden ein *Broad-Range*-Molekularmassenstandard und ein BSA-Proteinstandard aufgetragen. Die Analyse erfolgte unter reduzierenden Bedingungen.

Tabelle 4-9: Probenvorbereitung und Auftragsposition für die SDS-PAGE zur Untersuchung der Fraktionsproben der Versuchsgruppe 3 und der Versuchsgruppe 4

Spur	Probe/Marker Bezeichnung	Probe [µL]	H ₂ O [µL]	10x Reducing Agent [µL]	4x LDS Probenpuffer[µL]	Auftragsmenge [µL]
1	Broad Range Marker	5,00	4,75	1,50	3,75	10,00
2	-	-	-	-	-	-
3	BSA 200 µg/mL	10,00	-	1,00	2,50	10,00
4	BSA 150 µg/mL	10,00	-	1,00	2,50	10,00
5	BSA 100 µg/mL	10,00	-	1,00	2,50	10,00
6	BSA 75 µg/mL	10,00	-	1,00	2,50	10,00
7	BSA 50 µg/mL	10,00	-	1,00	2,50	10,00
8	BSA 25 µg/mL	10,00	-	1,00	2,50	10,00
9	BSA 10 µg/mL	10,00	-	1,00	2,50	10,00
10	-	-	-	-	-	-
11	Fraktion 1, Versuchsgruppe 4	10,00	-	1,00	2,50	10,00
12	Fraktion 2, Versuchsgruppe 4	10,00	-	1,00	2,50	10,00
13	Fraktion 3, Versuchsgruppe 4	10,00	-	1,00	2,50	10,00
14	Fraktion 4, Versuchsgruppe 4	10,00	-	1,00	2,50	10,00
15	Fraktion 5, Versuchsgruppe 4	10,00	-	1,00	2,50	10,00
16	-	-	-	-	-	-
17	Fraktion 1, Versuchsgruppe 3	10,00	-	1,00	2,50	10,00
18	Fraktion 2, Versuchsgruppe 3	10,00	-	1,00	2,50	10,00
19	Fraktion 3, Versuchsgruppe 3	10,00	-	1,00	2,50	10,00
20	Fraktion 4, Versuchsgruppe 3	10,00	-	1,00	2,50	10,00
21	Fraktion 5, Versuchsgruppe 3	10,00	-	1,00	2,50	10,00
22	Fraktion 6, Versuchsgruppe 3	10,00	-	1,00	2,50	10,00
23	-	-	-	-	-	-
24	Broad Range Marker	5,00	4,75	1,50	3,75	10,00

Anschließend wurden alle Fraktionsproben, der BR-Marker und die BSA-Standard-Proben 5 Minuten bei 95°C in einem Heizblock aufgeköcht und nach einem kurzen Abkühlen 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert.

Als Gel wurde ein 10%-iges Polyacrylamidgel mit 26 Taschen verwendet. Die Beladung erfolgte gemäß der Tabelle 4-9.

Als Laufpuffer wurde im Haus hergestellter MES-Puffer verwendet, dieser wurde zusätzlich mit 1 mL Antioxidans-Puffer versetzt. Die eingestellte Spannung betrug 200 V und die Dauer der Elektrophorese betrug 50 Minuten.

Nach dem Ablauf des Elektrophoresevorgangs wurde das Gel mittels *Simply-Blue-Safe-Stain*-Färbung gefärbt. Hierzu wurde das Gel in frischem Reinstwasser drei Mal nacheinander jeweils 1 Minute bei 800 W in der Mikrowelle erhitzt und anschließend 1 Minute bei Raumtemperatur

gewaschen. Im Anschluss an die drei Waschschrte wurde das Gel mit 50 mL *Coomassie*-Färbelösung für 45 Sekunden bei 800 W in der Mikrowelle erhitzt und weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Entfärbung erfolgte durch das Austauschen der Färbelösung gegen Reinstwasser mit anschließender Inkubation über Nacht.

Nach der Entfärbung wurde das Gel eingescannt und mit Hilfe der *totalab*-Software ausgewertet.

Anhand der Ergebnisse der *SDS-PAGE*-Analyse der Fraktionsproben der Versuchsgruppen 3 und 4 wurde eine weitere Untersuchung der Proben B080 und B082 mittels reduzierender *SDS-PAGE*-Methode durchgeführt. Die Beladung des Gels sowie die Probenverdünnungen sind der Tabelle 4-10 zu entnehmen.

Tabelle 4-10: Probenvorbereitung und Auftragsposition für die *SDS-PAGE* zur Untersuchung der Proben B080 und B082

Spur	Probe/Marker Bezeichnung	Probe/Marker [µL]	H ₂ O [µL]	10x Reducing Agent [µL]	4x LDS Probenpuffer[µL]	Auftragsmenge [µL]
1	<i>Broad Range</i> Marker	5,00	4,75	1,50	3,75	10,00
2	-	-	-	-	-	-
3	BSA 200 µg/mL	10,00	-	1,00	2,50	10,00
4	BSA 150 µg/mL	10,00	-	1,00	2,50	10,00
5	BSA 100 µg/mL	10,00	-	1,00	2,50	10,00
6	BSA 75 µg/mL	10,00	-	1,00	2,50	10,00
7	BSA 50 µg/mL	10,00	-	1,00	2,50	10,00
8	BSA 25 µg/mL	10,00	-	1,00	2,50	10,00
9	BSA 10 µg/mL	10,00	-	1,00	2,50	10,00
10	-	-	-	-	-	-
11	B080 1:5 Verdünnung	10,00	-	1,00	2,50	10,00
12	B080 1:4 Verdünnung	10,00	-	1,00	2,50	10,00
13	B080 1:3 Verdünnung	10,00	-	1,00	2,50	10,00
14	B080 1:2 Verdünnung	10,00	-	1,00	2,50	10,00
15	B080	10,00	-	1,00	2,50	10,00
16	-	-	-	-	-	-
17	B082 1:5 Verdünnung	10,00	-	1,00	2,50	10,00
18	B082 1:4 Verdünnung	10,00	-	1,00	2,50	10,00
19	B082 1:3 Verdünnung	10,00	-	1,00	2,50	10,00
20	B082 1:2 Verdünnung	10,00	-	1,00	2,50	10,00
21	B082	10,00	-	1,00	2,50	10,00
22	-	-	-	-	-	-
23	Mischprobe aus B080, B082, B085, B095 und B104 im Verhältnis 1:5	10,00	-	1,00	2,50	10,00
24	-	-	-	-	-	-
25	<i>Broad Range</i> Marker	5,00	4,75	1,50	3,75	10,00

4.7. Plasmid-DNA-Proben

Die derzeit auf dem Markt verfügbare PLRP-S Polymer-Säule wurde mit den vom Hersteller empfohlenen Elutionsmitteln 120 Minuten bei einer Fließmittelgeschwindigkeit von 0,5 mL/min auf 50% Eluent A und 50% Eluent B gespült und equilibriert. Anschließend erfolgte eine 5 µL Injektion des Eluenten B zur Untersuchung des Basislinienverhaltens und der UV-Aktivität. Die Einstellungen des Gradienten wurden ebenfalls vom Hersteller übernommen (Tabelle 4-11).

Tabelle 4-11: Übersicht der Parameter bei der Testung der PLRP-S Polymer-Säule für generische HPLC-Methodenentwicklung für pDNA-Proben nach Empfehlungen des Herstellers

Säulentyp	Eluentensystem		Einstellungen für das HPLC-System				
			T Säulenofen [°C]	V Fließmittel [mL/min]	t Gradient [min]	φ B, [%]	
	A	B				φ B, Start	φ B, Ende
PLRP-S Polymer, 4000 Å/8 µm	100% H ₂ O	100% AcCN	30	0,5	30	10	30
						2	50

Nach der Untersuchung des Basislinienverhaltens wurde die pDNA-Probe in ihrer ccc-Konformation auf die Säule appliziert. Dabei wurden die zwei in der Tabelle 4-11 aufgeführte Gradienten getestet (Abbildung 4-5). Die Auswertung der Chromatogramme wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm bzw. 254 nm durchgeführt.

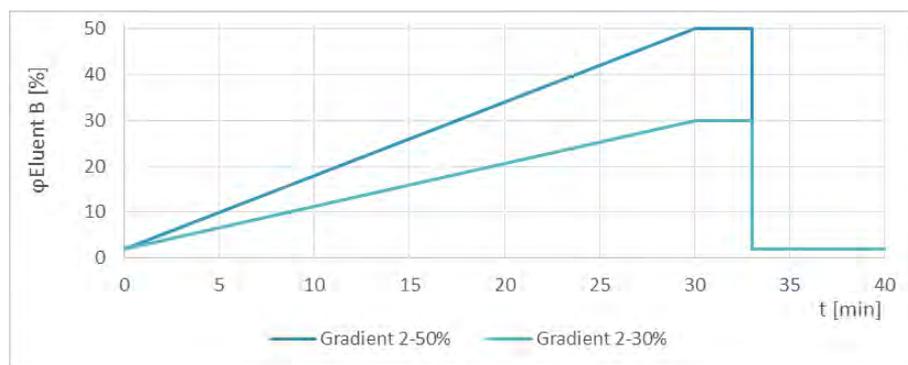


Abbildung 4-5: Graphische Darstellung der Gradientenvariation für die Analytik der pDNA-Proben mittels der PLRP-S Polymer-Säule nach Angaben und Empfehlungen des Herstellers

Auf Grund der Ergebnisse dieser Testung wurde auf weitere Versuche verzichtet und die betroffene Säule wurde beim Hersteller reklamiert.

5. Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden Kapitel werden die einzelnen Ergebnisse der Versuche zur generischen Methodenentwicklung dargestellt und anschließend bewertet. Die Ergebnisse wurden wie in Kapitel 4 sinngemäß nach Versuchsgruppen unterteilt. Die Übersicht der gesamten Versuchsgruppen ist der nachfolgenden Tabelle 5-1 zu entnehmen.

Tabelle 5-1: Übersicht der gesamten Versuchsgruppen zur generischen HPLC-Methodenentwicklung für Protein- und pDNA-Proben

Verwendung der Methode	VG	Säulentyp	Eluent A	Eluent B
Proteinanalytik	1	RP-HPLC C18, 300 Å/5 µm	H ₂ O	80% AcCN+20% THF
	2			100% AcCN
	3	RP-HPLC C4, 300 Å/5 µm		80% AcCN+20% THF
	4			100% AcCN
pDNA-Analytik	5	PLRP-S Polymer, 4000Å/8 µm		100% AcCN

5.1. Ergebnisse der generischen HPLC-Methodenentwicklung für Proteinproben

Bei der generischen HPLC-Methodenentwicklung für Proteinproben wurde zwei Säulentypen getestet. Die Ergebnisse der zwei Versuchsgruppen bei der Testung der RP-HPLC-C18-Säule wurden nachfolgend zusammengefasst.

Da die Versuche der Versuchsgruppen 1 und 2 parallel zu den Versuchen der Versuchsgruppen 3 und 4 verliefen, war ein direkter Vergleich der Säulentypen unter den gleichen Bedingungen möglich.

5.1.1. Ergebnisse der Vorversuche

Anhand der Ergebnisse der Vorversuche wurde festgestellt, dass die Proben B080 und B082 bei einer Einzelprobeapplikation bei beiden Säulentypen jeweils in Form eines definierten Peaks eluieren. Die Retentionszeiten der beiden Proben liegen weit auseinander und überschneiden

sich nicht mit den Retentionszeiten der restlichen Proben (Abbildung 5-1). Aus diesem Grund wurden die zwei o.g. Proben bei den nachfolgenden Methodenentwicklungsversuchen ausgeschlossen und nur bei den letzten Schritten der Optimierung erneut untersucht.

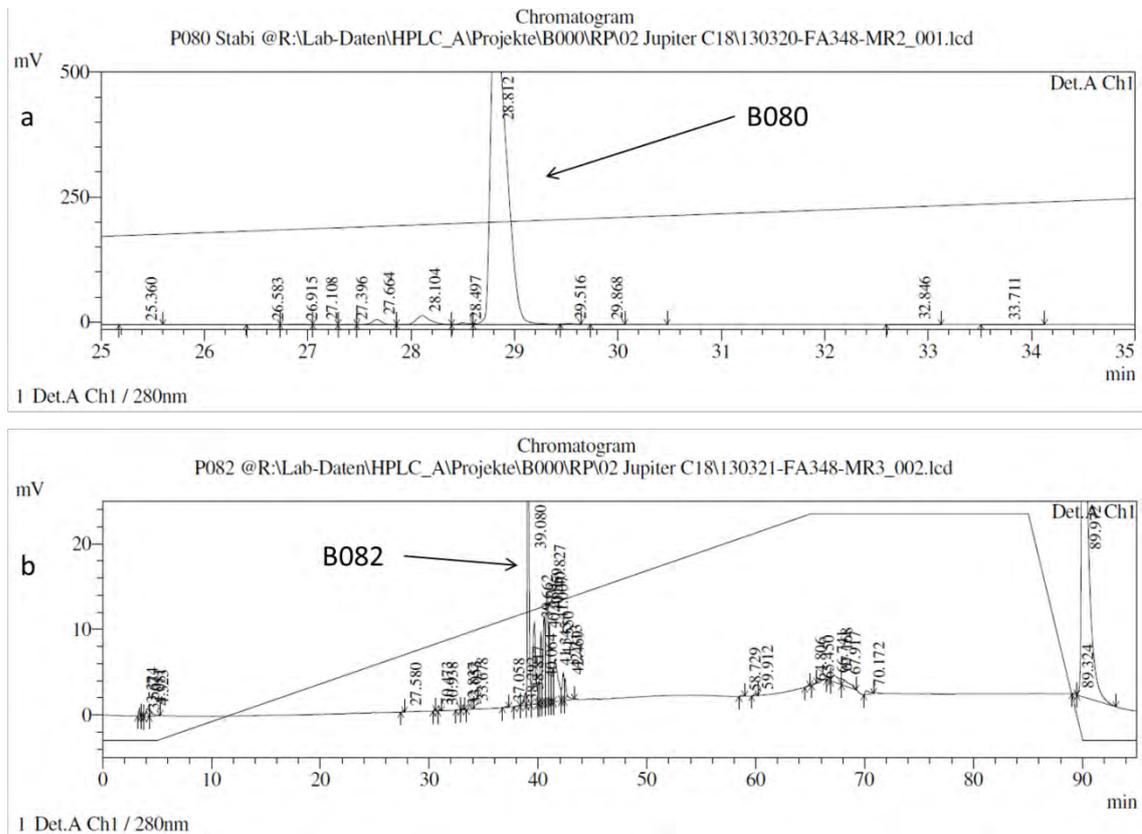


Abbildung 5-1: Elutionsverhalten der B080 und B082 Proben während der Vorversuche der C18-Säule. a) B080 Probe (Verdünnung 1:5), Injektionsvolumen 100 µL, Retentionszeit 28 min; b) B082 Probe (Verdünnung 1:5), Injektionsvolumen 100 µL, Retentionszeit 39 min

Bei den Proteinproben B085, B095 und B104 wurde während der Vorversuche festgestellt, dass diese in einem sehr engen Zeitfenster eluieren und dass die Elutionspeaks sich gegenseitig überlagern. Eine eindeutige Peaktrennung war nicht möglich (Abbildung 5-2).

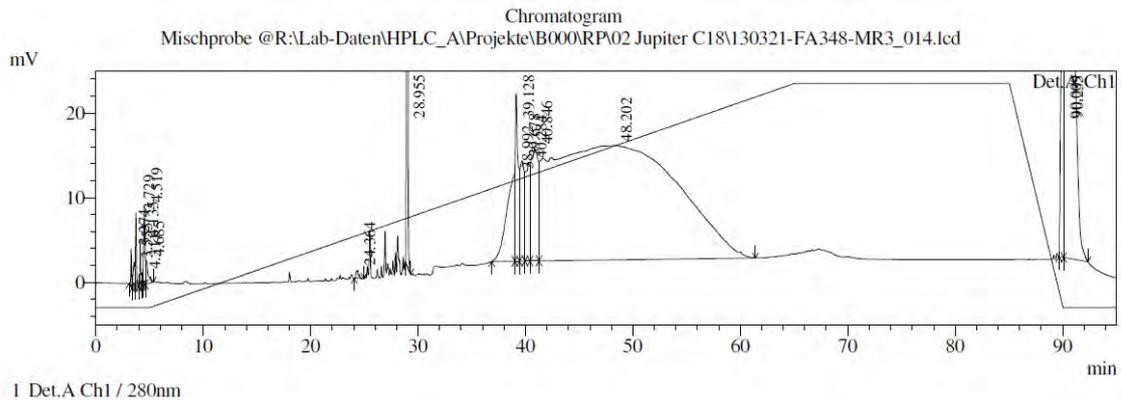


Abbildung 5-2: Ergebnisse der Applikation der Mischprobe auf die C18-Säule. Elutionspeaks der Proben B080 und B082 sind eindeutig erkennbar. Proben B085, B095 und B104 eluieren in Bereich zwischen 38 min und 62 min in Form eines einzigen Peaks

In darauffolgenden Methodenentwicklungsversuchen galt es zu überprüfen, ob eine bessere Peaktrennung der Antikörperproben durch die Veränderung der Systemparameter möglich ist.

5.1.2. Ergebnisse der Versuchsgruppen 1 und 2: RP-HPLC-C18-Säule

Die Verwendung eines flachen Gradienten von 2-3% des Eluenten B führte sowohl bei einer Gradientenlaufzeit von 20 Minuten als auch bei einer Verlängerung der Gradientenlaufzeit auf 90 Minuten zu keiner Elution der zu untersuchenden Probe. Die Erhöhung der Säulenofentemperatur von 30°C auf 60°C und der Fließmittelgeschwindigkeit von 0,5 mL/min auf 1,5 mL/min hatten ebenfalls keinen nennenswerten Einfluss auf die Ergebnisse (Abbildung 5-3).

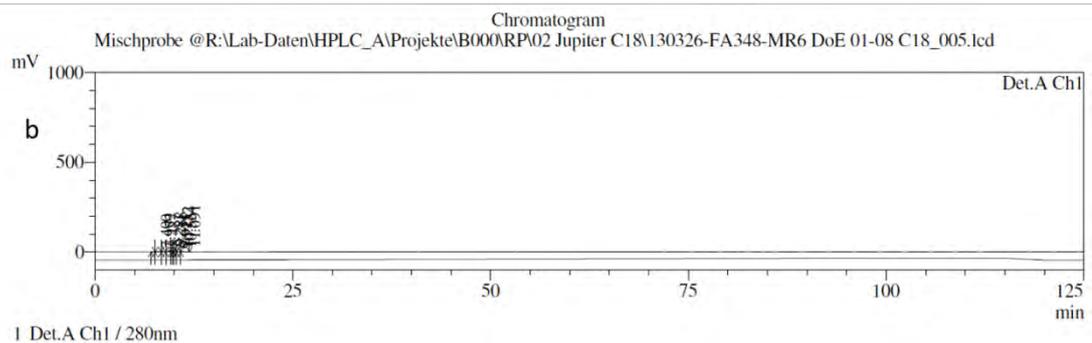
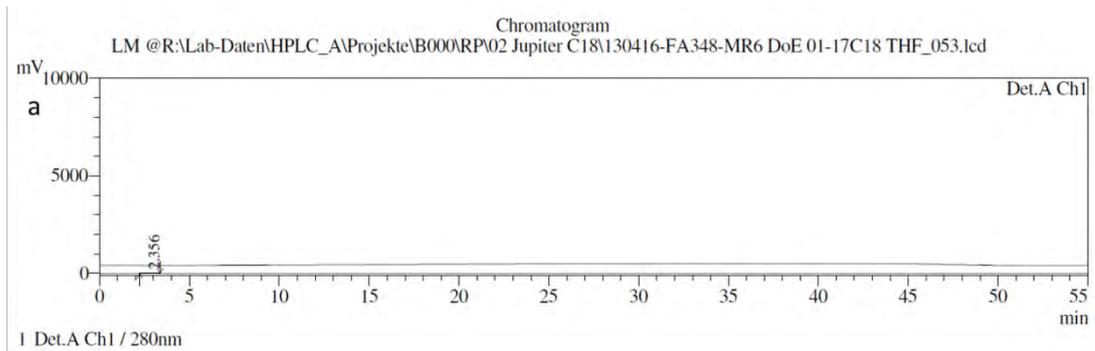


Abbildung 5-3: Versuchsergebnisse unter Verwendung eines flachen Gradienten von 2-3% des Eluenten B. a) Ergebnisse der Versuchsgruppe 1 bei einer Säulenofentemperatur von 60°C, Gradientenlaufzeit von 20 Minuten und einer Fließmittelgeschwindigkeit von 1,5 mL/min; b) Ergebnisse der Versuchsgruppe 2 bei einer Säulenofentemperatur von 30°C, Gradientenlaufzeit von 90 Minuten und einer Fließmittelgeschwindigkeit von 0,5 mL/min

Die Erhöhung der Konzentration des Eluenten B (80% AcCN+20% THF) im Gradienten auf 100% lieferte folgende Ergebnisse:

- Bei Verwendung einer Fließmittelgeschwindigkeit von 0,5 mL/min und einer Gradientenlaufzeit von 20 Minuten erfolgte die Elution außerhalb des Gradienten. Durch den Anstieg der Fließmittelgeschwindigkeit von 0,5 mL/min auf 1,5 mL/min erfolgte die Elution zwar innerhalb der Gradientenlaufzeit, lieferte jedoch keine gewünschte Trennung der Probe. Dieses Elutionsverhalten wurde sowohl bei einer Säulenofentemperatur von 30°C als auch bei 60°C beobachtet
- Bei Verwendung einer Gradientenlaufzeit von 90 Minuten und der Fließmittelgeschwindigkeiten von 0,5 mL/min und 1,5 mL/min, erfolgte die Elution innerhalb der Gradientenlaufzeit. Die Säulenofentemperatur von 30°C reichte nicht aus, um eine gewünschte Auftrennung zu erreichen. Nach der Erhöhung der Säulenofentemperatur von 30°C auf 60°C wurde eine deutlich bessere Trennung der Probe beobachtet.

Die Erhöhung der Konzentration des Eluenten B (100% AcCN/H₂O) im Gradienten auf 100% lieferte folgende Ergebnisse:

- Bei Verwendung einer Fließmittelgeschwindigkeit von 0,5 mL/min, einer Säulenofentemperatur von 30°C und einer Gradientenlaufzeit von 20 Minuten erfolgte die Elution teilweise außerhalb des Gradienten. Durch den Anstieg der Fließmittelgeschwindigkeit von 0,5 mL/min auf 1,5 mL/min erfolgte die Elution innerhalb der Gradientenlaufzeit und lieferte eine bessere Trennung im Vergleich zum Elutionssystem 80% AcCN+20% THF/H₂O unter gleichen Bedingungen
- Die beste Trennleistung wurde unter Verwendung der Gradientenlaufzeit von 90 Minuten, einer Fließmittelgeschwindigkeit von 0,5 mL/min und einer Säulenofentemperatur von 60°C erreicht.

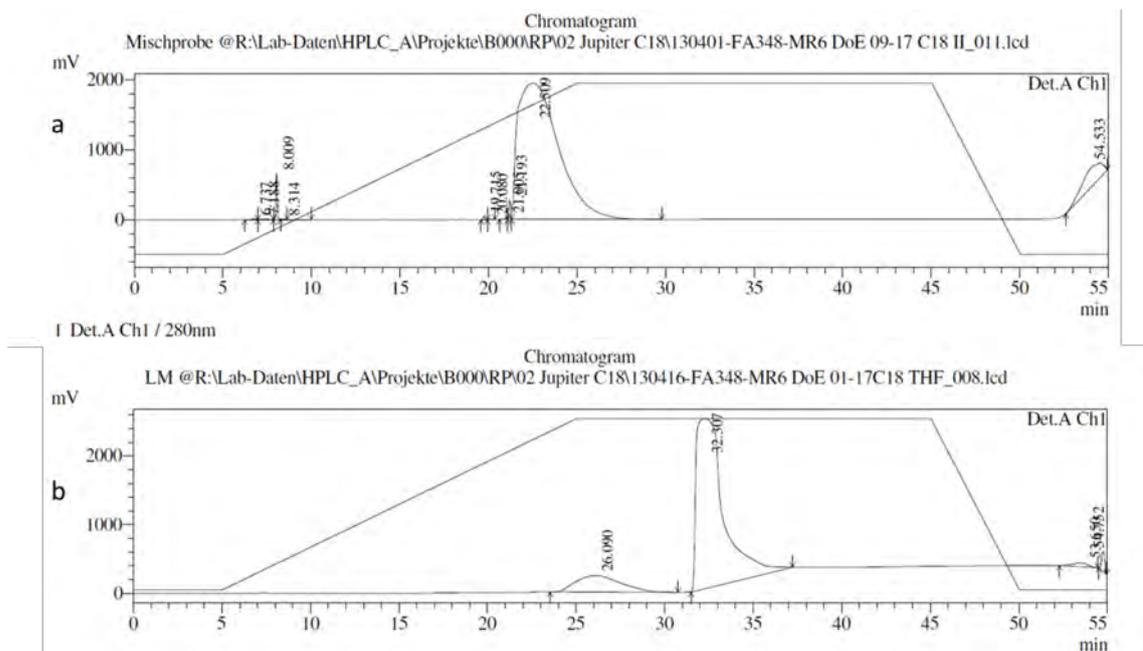


Abbildung 5-4: Ergebnisse nach der Erhöhung der Konzentration des Eluenten B im Gradienten auf 100% der Versuchsgruppen 1 und 2: a) Elutionssystem 100% AcCN/H₂O, Gradientenlaufzeit 20 Minuten, Säulenofentemperatur 60°C, Fließmittelgeschwindigkeit 0,5 mL/min; b) Elutionssystem 80% AcCN+20% THF/H₂O, Gradientenlaufzeit 20 Minuten, Säulenofentemperatur 30°C, Fließmittelgeschwindigkeit 0,5 mL/min

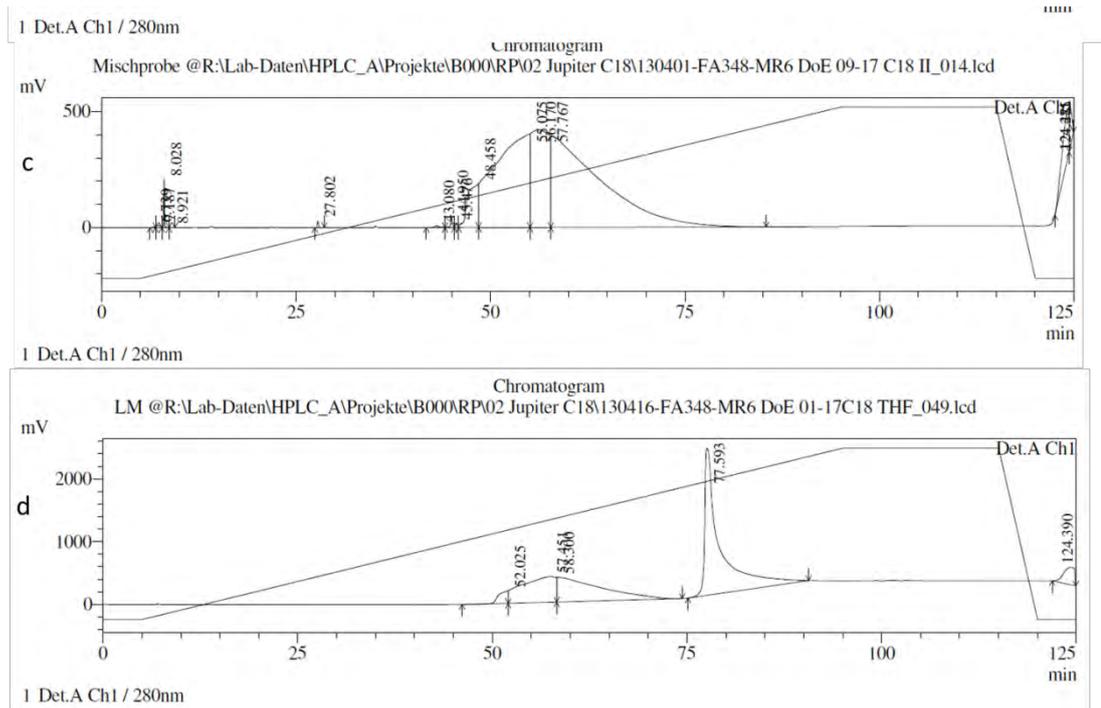


Abbildung 5-5: c) Elutionssystem 100% AcCN/H₂O, Gradientenlaufzeit 90 Minuten, Säulenofentemperatur 30°C, Fließmittelgeschwindigkeit 0,5 mL/min; d) Elutionssystem 80% AcCN+20% THF/H₂O, Gradientenlaufzeit 90 Minuten, Säulenofentemperatur 60°C, Fließmittelgeschwindigkeit 0,5 mL/min

Die *Centerpoint*-Versuche unter Verwendung einer Fließmittelgeschwindigkeit von 1,0 mL/min und einer Endkonzentration des Eluenten B von 51,5% bei einer Gradientenlaufzeit von 50 Minuten und Säulenofentemperatur von 45°C zeigten in beiden Fällen ungenügende Trennleistung im Vergleich zu den Versuchen unter Verwendung der Gradientenlaufzeit von 90 Minuten, einer Fließmittelgeschwindigkeit von 0,5 mL/min und einer Säulenofentemperatur von 60°C (Abbildung 5-6).

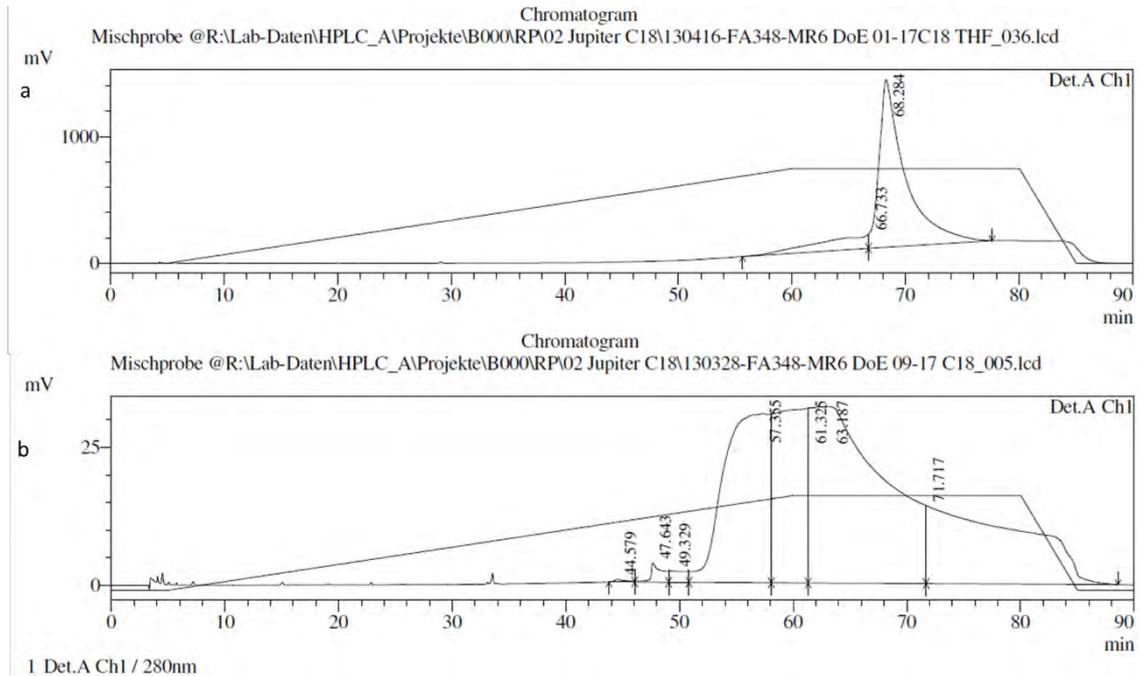


Abbildung 5-6: Ergebnisse der Centerpoint-Versuche der Versuchsgruppen 1 und 2. a) Versuchsgruppe 1; b) Versuchsgruppe 2. Gradientenlaufzeit 50 Minuten, Endkonzentration des Eluenten B 51,5%

Auf Grund der Ergebnisse konnte ein Zusammenhang zwischen der Trennleistung und der Säulenofentemperatur sowie der Fließmittelgeschwindigkeit festgestellt werden.

Die beste Trennleistung wurde bei einer Säulenofentemperatur von 80°C und einer Fließmittelgeschwindigkeit von 0,5 mL/min erreicht. Die Abbildung 4 6 dokumentiert den Einfluss der Säulenofentemperatur und der Fließmittelgeschwindigkeit auf die Auflösung.

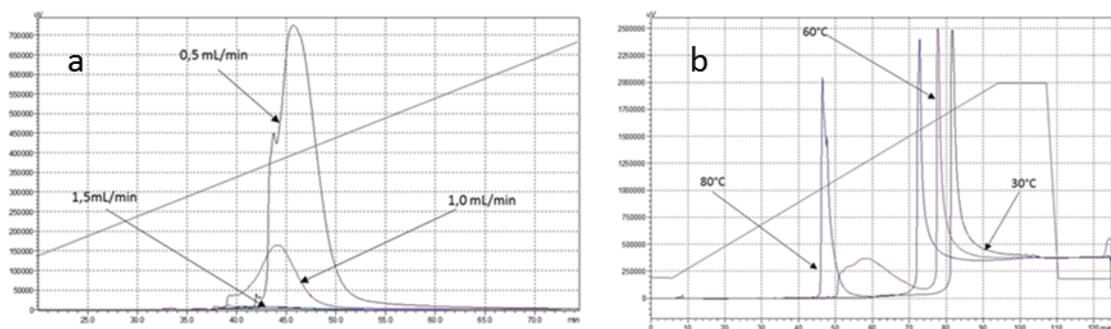


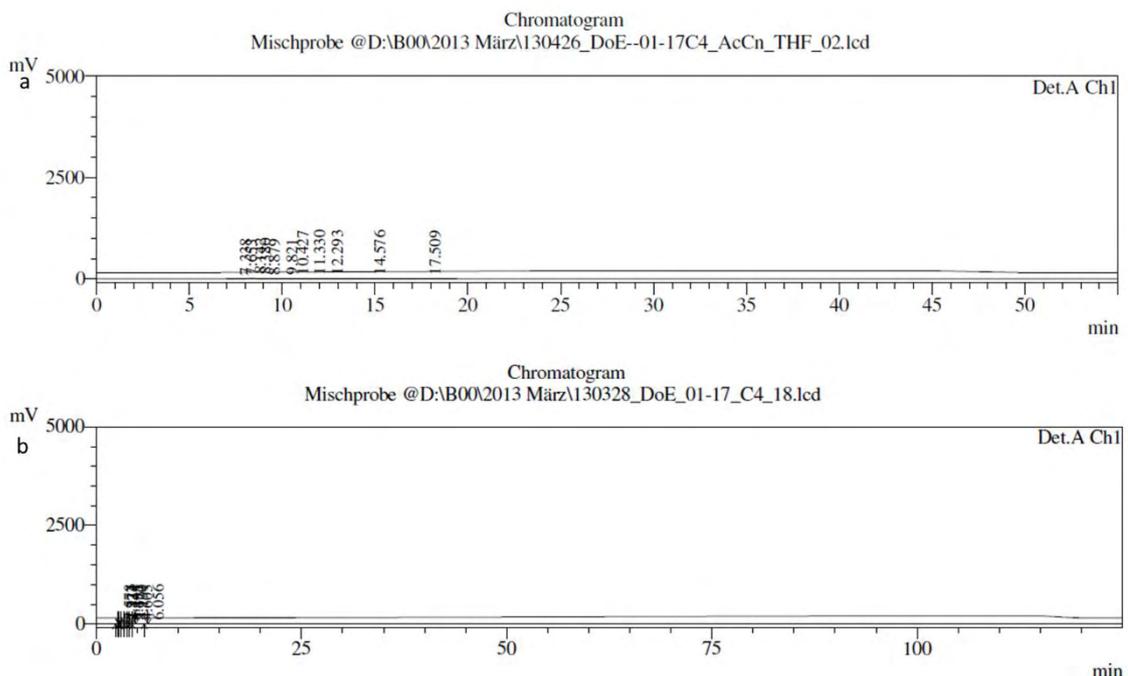
Abbildung 5-7: Einfluss der Säulenofentemperatur und der Fließmittelgeschwindigkeit auf die chromatographische Trennung der Proben. a) Ergebnisse der Versuchsgruppe 2 unter Verwendung der unterschiedlichen Fließmittelgeschwindigkeiten; b) Ergebnisse Versuchsgruppe 1 unter Verwendung unterschiedlicher Säulenofentemperaturen. In beiden Fällen betrug die Gradientenlaufzeit 90 Minuten mit einer Endkonzentration des Eluenten B von 100%

Da die Experimente der beiden Versuchsgruppen zeitgleich an zwei Anlagen durchgeführt wurden, war ein direkter Vergleich der Ergebnisse möglich. Anhand diesen Vergleichs wurden die Ergebnisse der Versuchsgruppen mit der *RP-HPLC-C18*-Säule als nicht ausreichend für eine weitere Optimierung befunden.

Die *RP-HPLC-C18*-Säule stellte sich als ungeeignet für eine analytische Untersuchung der Fusionsproteine mit Antikörpern als Fusionsuntereinheit dar. Es konnten nur die Fusionsproteine chromatographisch getrennt werden, die einen Wirkstoff und eine Peptideinheit als Fusionsuntereinheiten beinhalten. Aus diesem Grund ist dieser Säulentyp für generische Methoden ungeeignet.

5.1.3. Ergebnisse der Versuchsgruppen 3 und 4: *RP-HPLC-C4* Säule

Die Verwendung eines flachen Gradienten von 2-3% des Eluenten B lieferte identische Ergebnisse wie bei den Versuchsgruppen 1 und 2.



Die Ergebnisse der *Centerpoint*-Versuche zeigen, dass eine Gradientenlaufzeit von 50 Minuten und eine Endkonzentration des Eluenten B von 3% nicht ausreichend sind, um eine qualitative Trennung der Proben zu erzielen. Die Elution findet teilweise außerhalb des Gradienten statt (Abbildung 5-9). Jedoch ist deutlich erkennbar, dass die Peaktrennung unter Verwendung des Elutionssystems 100% AcCN/H₂O deutlich besser ist.

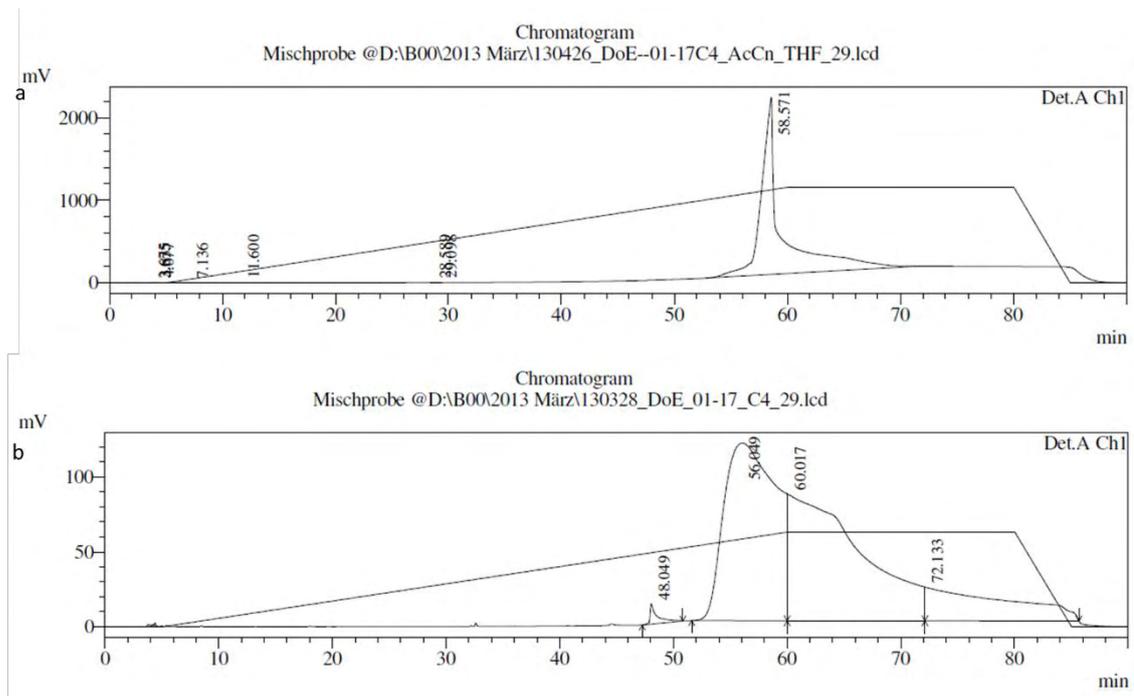


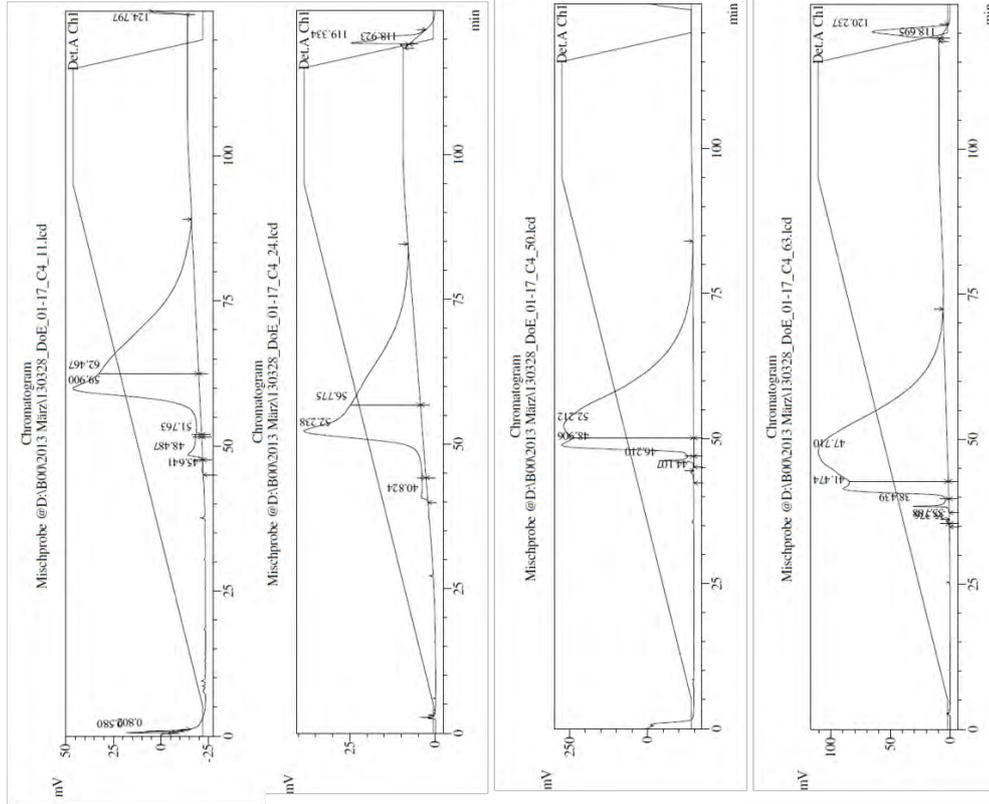
Abbildung 5-9: Ergebnisse der *Centerpoint*-Versuche der Versuchsgruppen 3 und 4. a) Versuchsgruppe 3; b) Versuchsgruppe 4. Gradientenlaufzeit 50 Minuten, Endkonzentration des Eluenten B 51,5%

Die Erhöhung der Konzentration des Eluenten B im Gradienten auf 100% lieferte folgende Ergebnisse:

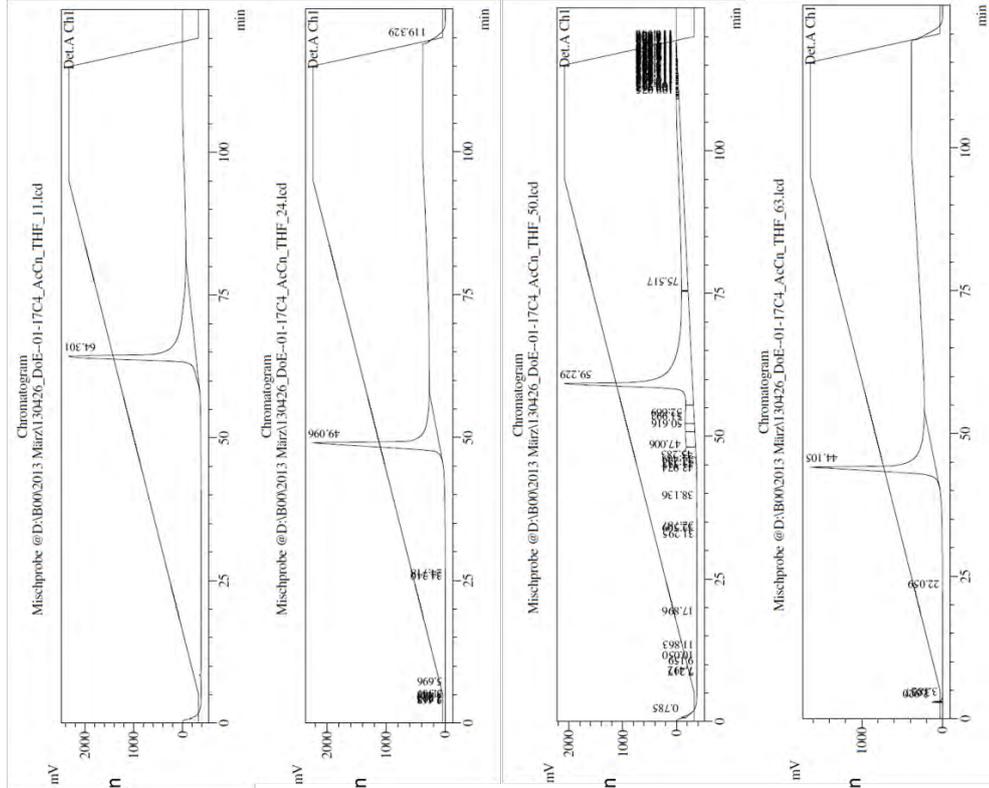
- Die Gradientenlaufzeit wurde als zu gering und somit als unzureichend befunden. Die Elution der Proben fand teilweise außerhalb des Gradienten statt. Die Variation der Säulenofentemperatur und der Fließmittelgeschwindigkeit ergaben keine nennenswerte Verbesserung
- Die Erhöhung der Gradientenlaufzeit auf 90 Minuten ermöglichte eine vollständige Elution innerhalb des Gradienten. Die Steigung der Fließmittelgeschwindigkeit von 0,5 mL/min auf 1,5 mL/min verringerte die Auflösung, verkürzte aber die Retentionszeiten
- Die Umstellung auf eine höhere Säulenofentemperatur von 90°C ermöglichte eine deutlich bessere Peakauftrennung bei beiden Versuchsgruppen.

Die Ergebnisse der Versuche sind in der Abbildung 5-10 zusammengefasst. Der Einfluss der Säulenofentemperatur und der Fließmittelgeschwindigkeit auf die Qualität der Peaktrennung ist deutlich erkennbar. Zusätzlich sind die Unterschiede der Elutionssysteme erkennbar. Die Zugabe von 20% THF zum AcCN hat einen direkten Einfluss auf die Elutionsfläche und bestätigt die Annahmen, dass durch die o.g. Eluentenzusammensetzung die Elutionskraft gesteigert wird. Die Peaktrennung bei Anwendung des Elutionssystem 100% AcCN/H₂O ist in diesen Versuchen deutlich besser.

Versuchsgruppe 4



Versuchsgruppe 3



$T_{\text{Säulenofen}} = 30^{\circ}\text{C}$
 $\dot{V}_{\text{Fließmittel}} = 0,5 \text{ mL/min}$
 $t_{\text{Gradient}} = 90 \text{ min}$

$T_{\text{Säulenofen}} = 30^{\circ}\text{C}$
 $\dot{V}_{\text{Fließmittel}} = 1,5 \text{ mL/min}$
 $t_{\text{Gradient}} = 90 \text{ min}$

$T_{\text{Säulenofen}} = 60^{\circ}\text{C}$
 $\dot{V}_{\text{Fließmittel}} = 0,5 \text{ mL/min}$
 $t_{\text{Gradient}} = 90 \text{ min}$

$T_{\text{Säulenofen}} = 60^{\circ}\text{C}$
 $\dot{V}_{\text{Fließmittel}} = 1,5 \text{ mL/min}$
 $t_{\text{Gradient}} = 90 \text{ min}$

Abbildung 5-10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Versuchsgruppen 3 und 4, im direkten Vergleich

Zur Beurteilung der Eignung der Methode mittels der *DoE*-Software, wurden folgende Bewertungsparameter, die direkt den Chromatogrammen entnommen wurden, in die Auswertungsmatrix übertragen:

1. Gesamtretentionszeit
2. Anzahl der sichtbaren Peaks
3. Anzahl der getrennten Peaks

Die Anzahl der getrennten Peaks wurde als primärer Beurteilungsfaktor betrachtet. Im Idealfall sollten die Methodenentwicklung und ihre Optimierung dazu führen, dass die zu untersuchende Probe in drei definierten Peaks darstellbar ist.

Die statistische Auswertung der *DoE*-Software lieferte folgende Parameterkonstellationen und ihren Einfluss auf die Beurteilungsparameter.

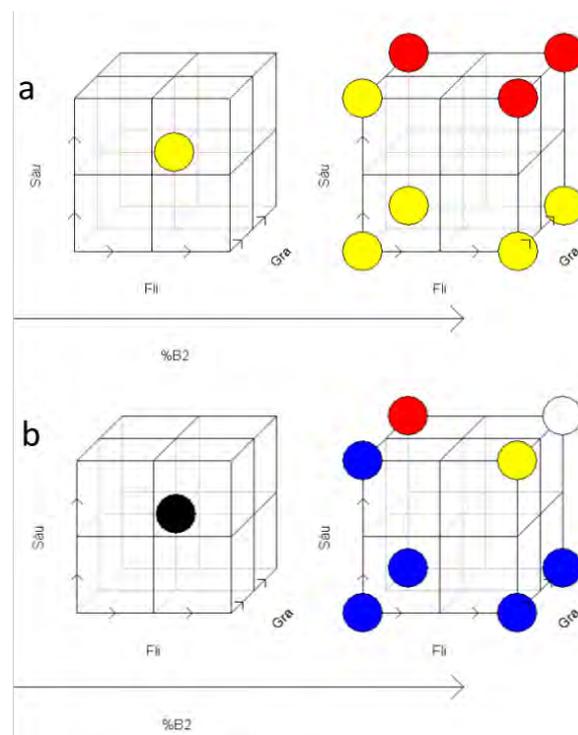


Abbildung 5-11: Modellumgebung der Parameterkonstellation für die generische HPLC-Methodenentwicklung für Proteinproben unter Verwendung einer RP-HPLC-C4-Säule (300 Å/5 µm) und des Elutionssystems 80% AcCN+20% THF/H₂O (Versuchsgruppe 3, a) und des Elutionssystems 100% AcCN/H₂O (Versuchsgruppe 4, b)). Abkürzungen der Achsenbeschriftung: Fli = Fließmittelgeschwindigkeit, Gra = Gradientenlaufzeit, Säu = Säulenofentemperatur, %B2 = Endkonzentration des Eluenten B während des Gradienten

Die Abbildung 5-11 definiert die Matrix der untersuchten Parameterkonstellationen, es handelt sich in diesem Fall um eine statistische Vorhersage der Ergebnisse unter Verwendung der zuvor festgelegten Parameter. In den jeweils linken Würfeln befinden sich die *Centerpoint*-Versuche. Die Kombinationen der einzelnen Parameter befinden sich auf den jeweils rechten Würfelkanten. Der Parameter „Anzahl der getrennten Peaks“ wurde in Form der farbigen Kreise dargestellt. Die Farbkodierung der Kreise gliedert sich nach dem folgenden Schema:

- Rot: hohe Ergebniswerte
- Gelb: mittlere Ergebniswerte
- Blau: niedrige Ergebniswerte
- Weiß/Schwarz: keine Vorhersage möglich/Konflikt

Die statistische Vorhersage der Ergebnisse stimmt mit den tatsächlichen Ergebnissen weitgehend überein. Die Steigung der Säulenofentemperatur, der Endkonzentration des Eluenten B während des Gradienten und der Gradientenlaufzeit lieferte die maximale Anzahl an getrennten Peaks. Bei der Fließmittelgeschwindigkeit korreliert die Vorhersage mit den tatsächlichen Ergebnissen der Versuche.

Anhand des in der Abbildung 5-12 dargestellten *Coefficient Plots* wird der Einfluss der Eingangsparameter einzeln und in Wechselwirkung mit einander auf die Ausgangsparameter beurteilt. Als Ausgangsparameter wurde hier ebenfalls die Anzahl der getrennten Peaks gewählt.

Die Dimension des Einflusses wurde in Form eines Balkens mit seiner Schwankungsbreite dargestellt.

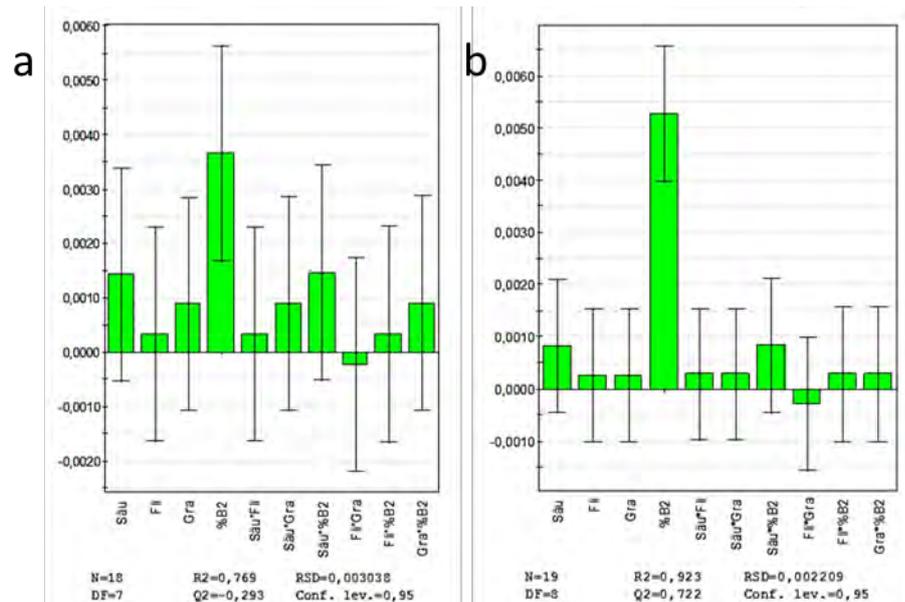


Abbildung 5-12: Coefficient Plot für die Anzahl der getrennten Peaks bezogen auf die möglichen Kombinationen/Wechselwirkungen der Einflussparameter für die generische HPLC-Methodenentwicklung für Proteinproben unter Verwendung einer RP-HPLC-C4-Säule (300 Å/5 µm) und des Elutionssystems 80% AcCN+20% THF/H₂O (Versuchsgruppe 3, a)) und des Elutionssystems 100% AcCN/H₂O (Versuchsgruppe 4, b)). Abkürzungen der Achsenbeschriftung: Fli = Fließmittelgeschwindigkeit, Gra = Gradientenlaufzeit, Säu = Säulenofentemperatur, %B2 = Endkonzentration des Eluenten B während des Gradienten, * steht für die Wechselwirkung/Kombination der Einflussparameter

Diese Darstellung ermöglicht eine Unterscheidung zwischen den signifikanten und den nicht signifikanten Modellparametern. Die signifikanten Modellparameter zeigen eine einseitige Schwankungsbreite, so dass eine Trenderkennung möglich ist. Die nicht signifikanten Modellparameter erreichen dagegen eine in beide Richtungen derart starke Schwankungsbreite, dass es nicht möglich ist, einen Trend zu erkennen.

Der *Coefficient Plot* in der Abbildung 5-12 zeigt ähnliche Ergebnisse, wie die Matrix der Parameter aus der Abbildung 5-11. Die Säulenofentemperatur und ihr Zusammenspiel mit der Endkonzentration des Eluenten B im Gradienten haben bei beiden Versuchsgruppen den größten Einfluss auf die Peaktrennung. Bei der Fließmittelgeschwindigkeit ist kein eindeutiger Trend erkennbar. Bei der Versuchsgruppe 3 zeigt sich zusätzlich, dass die Gradientenlaufzeit einen positiven Einfluss auf die Anzahl der getrennten Peaks ausübt, bei Versuchsgruppe 4 dagegen nicht. Anhand der tatsächlichen Ergebnisse wurde es aber deutlich, dass die Peaktrennung von der Gradientenlaufzeit abhängig ist.

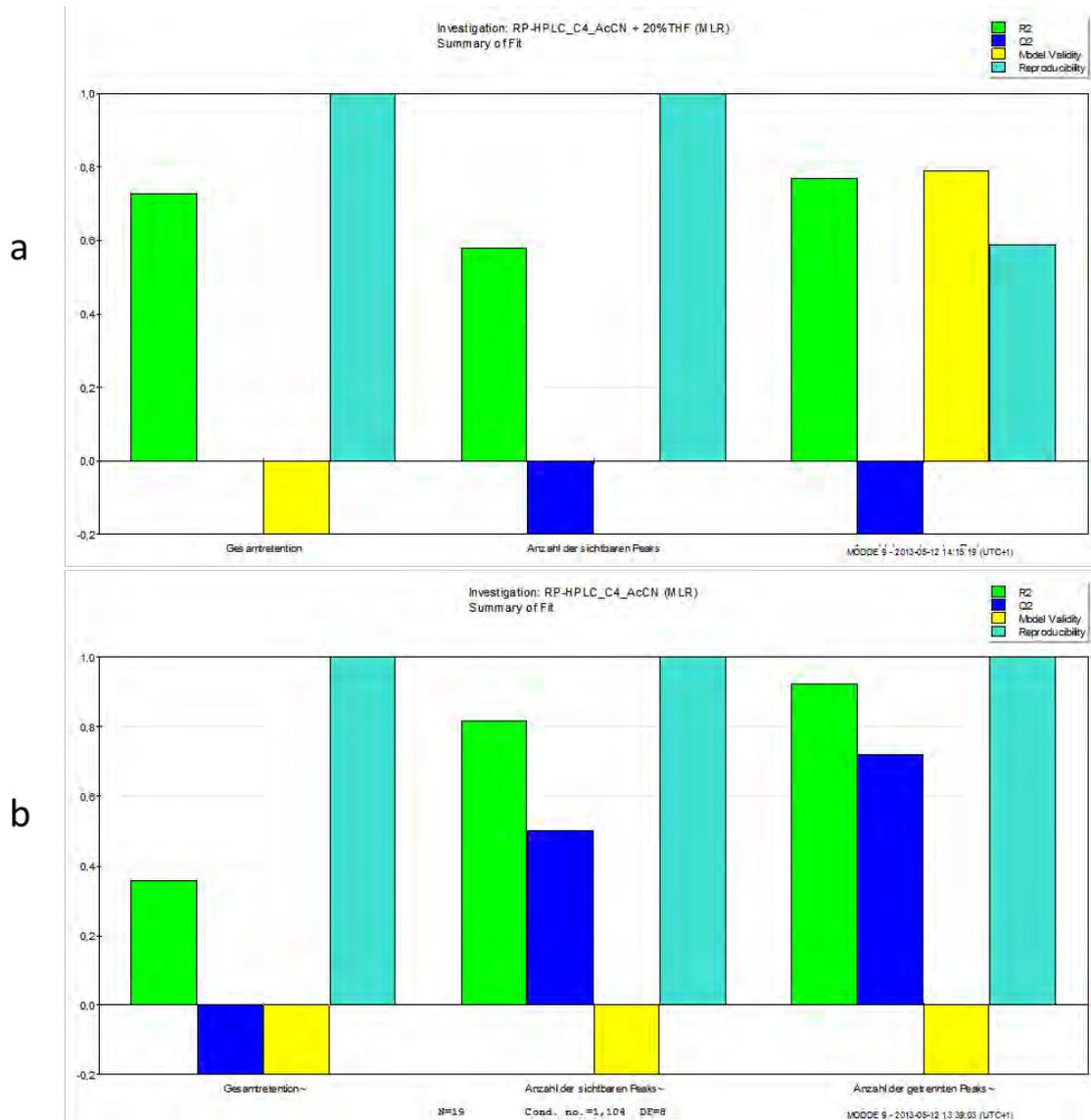


Abbildung 5-13: Summary of Fit für die Bewertung der Versuchsergebnisse in Bezug auf das gewählte Modell unter Verwendung einer RP-HPLC-C4-Säule (300 Å/5 µm) und des Elutionssystems 80% AcCN+20% THF/H₂O (Versuchsgruppe 3, a) und des Elutionssystems 100% AcCN/H₂O (Versuchsgruppe 4, b)). Abkürzungen: R² = Korrelationsfaktor, Q² = Genauigkeit der Vorhersage

Die Abbildung 5-13 zeigt das aussagekräftigste Diagramm (*Summary of Fit*) in Bezug auf die Auswertung mit der *DoE*-Software. Anhand des Diagramms können die Ergebnisse der Versuche im Hinblick auf das ausgewählte Modell zur statistischen Auswertung beurteilt werden. Für die Methodenentwicklung wurde ein *Full-Frac-(2 Level)*-Interaktionsmodell gewählt um die Versuchsmatrix für die durchgeführten Experimente zu erstellen, dieses beinhaltet die Interaktion zweier Eingangsparameter.

Der Korrelationsfaktor *R²* ist ein Parameter für die Auswahl des richtigen Modells und gibt an, wie gut das Modell auf die Versuchsergebnisse passt. Ein signifikantes Modell sollte $R^2 > 0,5$

aufweisen. In Hinsicht auf die Anzahl der getrennten Peaks ist das gewählte *Full-Frac-(2 Level)*-Interaktionsmodell als signifikant zu betrachten, da $0,5 < R^2_{\text{Versuchsgruppe 3}} \approx 0,8$ und $0,5 < R^2_{\text{Versuchsgruppe 4}} \approx 0,9$.

Q^2 beschreibt die Aussagekraft und die Genauigkeit der Vorhersage des gewählten Modells in Anlehnung an die ermittelten Versuchsergebnisse. Ein signifikantes Modell sollte $Q^2 > 0,1$ haben, ein gutes Modell $Q^2 > 0,5$. Das gewählte Modell weist einen negativen Wert für Q^2 bei der Versuchsgruppe 3 und einen Wert von $Q^2 \approx 0,7$ für die Versuchsgruppe 4. Anhand der Ergebnisse der *DoE*-Auswertung, die in den Abbildung 5-11 und Abbildung 5-12 dargestellt wurden, entsteht ein Widerspruch in Hinsicht auf die von dem Q^2 -Wert abgeleiteten Aussagen über die Genauigkeit der Vorhersage des gewählten Modells.

Model-Validity-Wert steht für Modell-Validität und beinhaltet diverse Modellprobleme, z.B. das Vorhandensein von „Ausreißern“, ein inkorrektes Modell sowie falsche Transformation der Messwerte. Ein signifikantes Modell sollte $MV > 0,25$ haben. Es ist erkennbar, dass das Modell für die Versuchsgruppe 3 als valide zu betrachten ist ($0,25 < MW = 0,8$) und bei der Versuchsgruppe 4 nicht, hier ist der MW-Wert im negativen Bereich. Die Betrachtung bezieht sich auch in diesen Fällen auf die Anzahl der getrennten Peaks. Das *Full-Frac-(2 Level)*-Interaktionsmodell wird trotz der Ergebnisse in Hinsicht auf Validität weiter verwendet, da dieses Modell nur zur Methodenentwicklung angewandt wurde. Im Falle der Methodvalidierung wäre ein anderes Modell zu wählen.

Reproducibility bezieht sich auf die *Centerpoint*-Versuche und gibt eine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Versuche und ihrer Ergebnisse im gesamten System. Die Reproduzierbarkeit ist in diesem Fall bei beiden Versuchsgruppen vorhanden.

In Anbetracht der o.g. Ergebnisse wurde das gewählte *Full-Frac-(2 Level)*-Interaktionsmodell für die weitere Methodenentwicklung und -optimierung als geeignet befunden.

Wie bereits im Kapitel 4.4 beschrieben, bietet die *DoE*-Software eine mögliche Vorhersage zur Methodenoptimierung, den *Optimizer*. Das *Full-Frac-(2 Level)*-Interaktionsmodell zeigte anhand der statistischen Auswertungen, die zum Teil durch die tatsächlichen Ergebnisse der Versuche betätigt wurden, die aussagekräftigsten Einflussparameter auf die Qualität der Peaktrennung. Diese Parameter wurden wie folgt für die Optimierungsvorhersage der *DoE*-Software übermittelt.

Tabelle 5-2: Übersicht der Dateneingabe für die statistische Vorhersage zur Optimierung der Methoden der Versuchsgruppen 3 und 4

Eingangsparameter			Ausgangsparameter					
	min	max		Kriterium	Gewichtung	min	Vorgabe	max
$T_{\text{Säulenofen}} [^{\circ}\text{C}]$	30	60	Gesamtretentionszeit	exklusiv	-	-	-	-
$\dot{V}_{\text{Fließmittel}} [\text{mL}/\text{min}]$	0,5	1,5	Anzahl der sichtbaren Peaks	maximieren	1	1	0	3
$t_{\text{Gradient}} [\text{min}]$	20	90	Anzahl der getrennten Peaks	Vorgabe	1	1	0	3
$\varphi_{B, \text{Ende}} [\%]$	3	100						

Die Ergebnisse der Optimierungsvorhersage wurden in Form des *Contour Plots* und *4D Contour Plots* für die jeweilige Versuchsgruppe dargestellt. Zusätzlich bestand die Möglichkeit bei der Option *Optimizer* einen neuen maximalen Wert für die Säulenofentemperatur zu setzen. Dieser wurde anhand der Trendergebnisse aus der Abbildung 5-12 und der technischen Möglichkeiten der verwendeten *HPLC*-Anlagen auf 80°C festgelegt. Die Fließmittelgeschwindigkeit wurde auf 0,5 mL/min begrenzt.

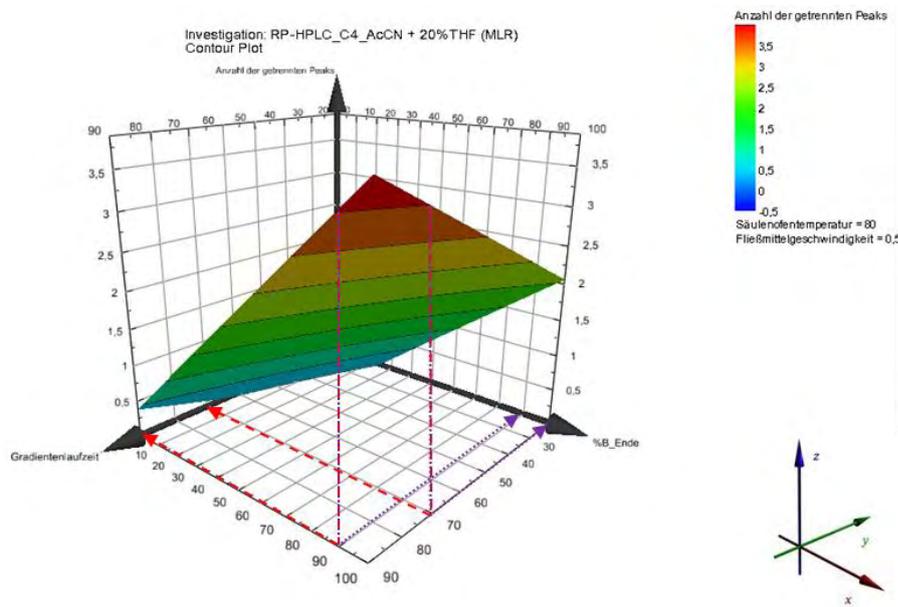


Abbildung 5-14: Contour Plot der Versuchsgruppe 3. Auf der z-Achse ist die mögliche Anzahl der getrennten Peaks (- 0,5 - 3,5) dargestellt, die y-Achse repräsentiert die Gradientenlaufzeit in Minuten (30 - 90 min), x-Achse stellt die Endkonzentration des Eluenten B im Gradienten in Prozent (0-100%) dar. Als konstante Parameter wurden die Säulenofentemperatur auf 80°C und die Fließmittelgeschwindigkeit auf 0,5 mL/min festgelegt

Die Abbildung 5-14 zeigt, dass eine Verbesserung der Auflösung/Peaktrennung für die Versuchsgruppe 3 im roten Bereich der Fläche zu erreichen ist. Dieser Bereich ist durch drei Parameter

definiert: Gradientenlaufzeit, Endkonzentration des Eluenten B während des Gradienten und Säulenofentemperatur. Dabei sollte die Endkonzentration des Eluenten B während des Gradienten im Bereich 90-100%, Gradientenlaufzeit 70-90 Minuten und die Säulenofentemperatur bei 80°C liegen. Die Bestimmung der „Optimalbereiche“ erfolgte mittels der Lotfällung auf die jeweiligen Achse.

Der *4D Contour Plot* in der Abbildung 5-15 zeigt den gleichen Trend in einer anderen Darstellungsform. Anhand dieser Darstellung lässt sich der Zusammenhang zwischen allen vier Eingangsparametern betrachten. So wird deutlich, dass das Optimum an Auflösung im gelben Bereich zu erwarten ist. Dieses ist bei einer Gradientenlaufzeit ab 55 Minuten, Säulenofentemperatur ab 63°C, Endkonzentration des Eluenten B von mindestens 75,5% und einer Fließmittelgeschwindigkeit im Bereich von 0,5 – 1,5 mL/min zu erreichen.

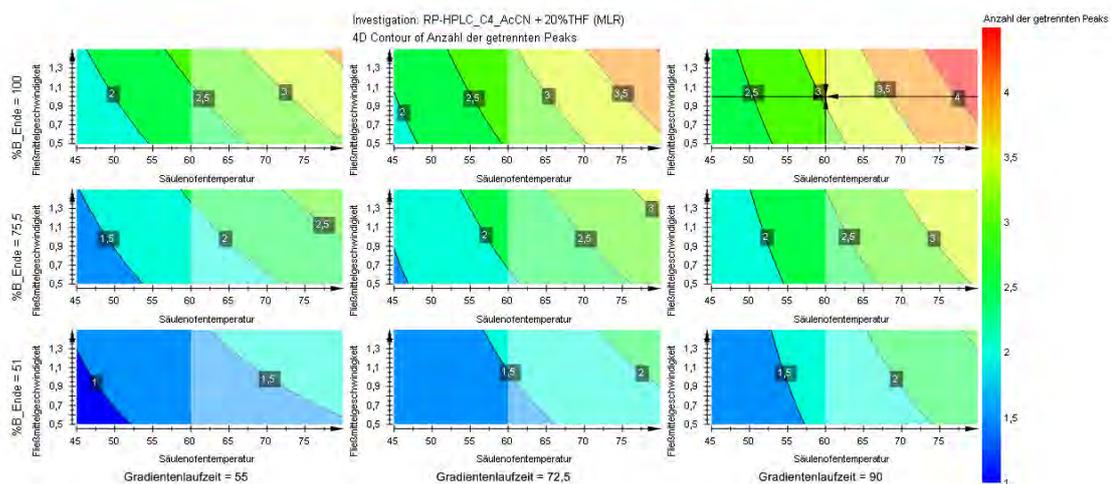


Abbildung 5-15: 4D Plot der Versuchsgruppe 3. Auf der äußeren x-Achse sind drei Zeitangaben zu der Gradientenlaufzeit in Minuten (55 Minuten, 72,5 Minuten und 90 Minuten) dargestellt. Auf der äußeren y-Achse sind drei Endkonzentrationsangaben des Eluenten B während des Gradienten in Prozent (51%, 75,5% und 100%) abgebildet. Die innere x-Achse stellt die Säulenofentemperatur in °C (45°C-80°C) und die innere y-Achse die Fließmittelgeschwindigkeit in mL/min (0,5 mL/min - 1,3 mL/min) dar. Die hellunterlegten Bereiche repräsentieren die hypothetischen Ergebnisse aus den statistischen Daten der durchgeführten Versuche aus der Versuchsmatrix. Der den Pfeilen markierte Punkt stellt die Zusammenstellung der aktuellen Parametereinstellungen dar. Die Anzahl der getrennten Peaks ist durch die Farbskala dargestellt

Die Ergebnisse der Optimierungsvorhersage der Versuchsgruppe 4 sind in der nachfolgenden Abbildung 5-16 und Abbildung 5-17 dargestellt. Anhand des *Contour Plots* wird deutlich, dass der Optimumbereich etwas größer ist als bei der Versuchsgruppe 3.

Hier sollte die Endkonzentration des Eluenten B während des Gradienten ebenfalls im Bereich 90-100%, Gradientenlaufzeit 50 – 90 Minuten und die Säulenofentemperatur bei 80°C liegen. Die Bestimmung der „Optimalbereiche“ erfolgte mittels der Lotfällung auf die jeweilige Achse.

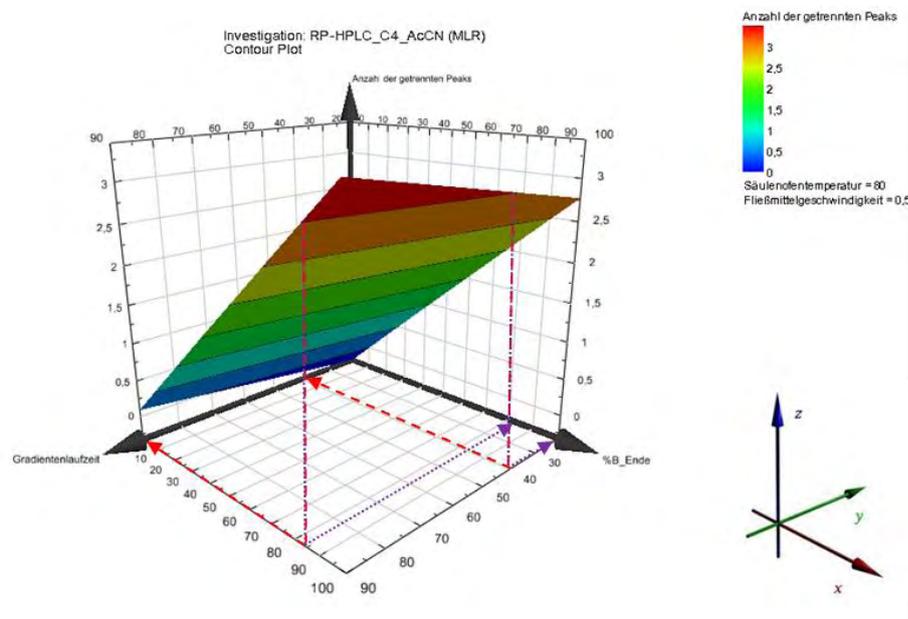


Abbildung 5-16: Contour Plot der Versuchsgruppe 4. Auf der z-Achse ist die mögliche Anzahl der getrennten Peaks (0 – 3) dargestellt, die y-Achse repräsentiert die Gradientenlaufzeit in Minuten (30 – 90 Minuten), die x-Achse stellt die Endkonzentration des Eluenten B im Gradienten in Prozent (0 - 100%) dar. Als konstante Parameter wurden die Säulenofentemperatur auf 80°C und die Fließmittelgeschwindigkeit auf 0,5 mL/min festgelegt

Der 4D Contour Plot in der Abbildung 5-17 zeigt den gleichen Trend in einer zweiten Darstellungsform. Das Optimum an Auflösung ist im gelben Bereich zu erwarten. Dieses ist bei einer Gradientenlaufzeit ab 55 Minuten, Säulenofentemperatur ab 63°C, Endkonzentration des Eluenten B von 100% und einer Fließmittelgeschwindigkeit im Bereich von 0,5 – 1,5 mL/min zu erreichen.

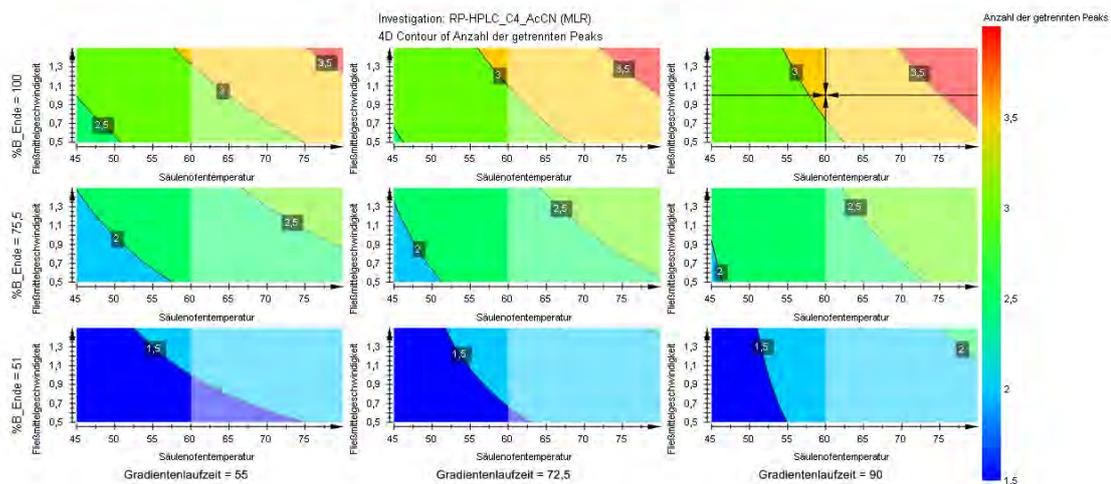


Abbildung 5-17: 4D Plot der Versuchsgruppe 4. Auf der äußeren x-Achse sind drei Zeitangaben zu der Gradientenlaufzeit in Minuten (55 Minuten, 72,5 Minuten und 90 Minuten) dargestellt. Auf der äußeren y-Achse sind drei Endkonzentrationsangaben des Eluenten B während des Gradienten in Prozent (51%, 75,5% und 100%) abgebildet. Die innere x-Achse stellt die Säulenofentemperatur in °C (45°C - 80°C) und die innere y-Achse die Fließmittelgeschwindigkeit in mL/min (0,5 mL/min - 1,3 mL/min) dar. Die hellunterlegten Bereiche repräsentieren die hypothetischen Ergebnisse aus der statistischen Daten der durchgeführten Versuche aus der Versuchsmatrix. Der von den Pfeilen markierte Punkt stellt die Zusammenstellung der aktuellen Parametereinstellungen dar. Die Anzahl der getrennten Peaks ist durch die Farbskala dargestellt

Anhand der gewonnen Erkenntnisse aus der *Optimizer*-Funktion der *DoE*-Software wurden bei beiden Versuchsgruppen Optimierungsversuche in Hinblick auf die Wechselwirkungen zwischen der Fließmittelgeschwindigkeit und der Säulenofentemperatur durchgeführt.

In der Abbildung 5-18 sind die einzelnen Chromatogramme in Form des *Overlays*² zur Veranschaulichung des Einflusses der Fließmittelgeschwindigkeit auf das Elutionsverhalten der Proben dargestellt. Die Fließmittelgeschwindigkeit von 0,25 mL/min lieferte in beiden Fällen kein zufriedenstellendes Ergebnis und wurde deshalb nicht abgebildet.

² *Overlay* = Überlappung/Überlagerung

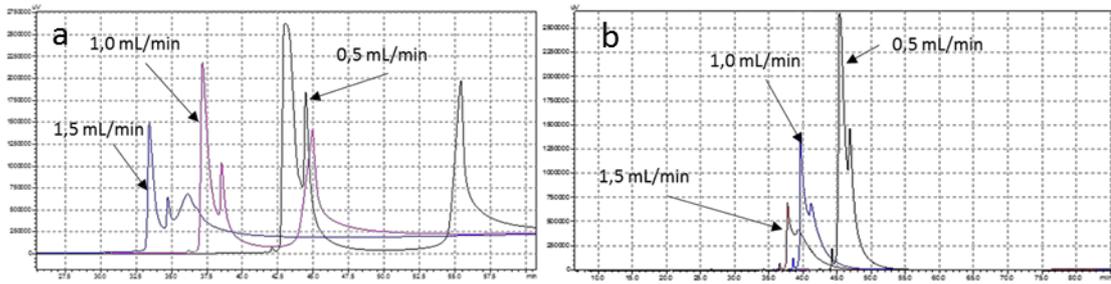


Abbildung 5-18: Einfluss der Säulenofentemperatur und der Fließmittelgeschwindigkeit auf die chromatographische Trennung der Proben. a) Ergebnisse der Versuchsgruppe 3 unter Verwendung der unterschiedlichen Fließmittelgeschwindigkeiten; b) Ergebnisse Versuchsgruppe 4. In beiden Fällen betrug die Gradientenlaufzeit 90 Minuten mit einer Endkonzentration des Eluenten B von 100% und die Säulenofentemperatur 80°C

Somit konnte die Aussage des *Optimizers* in Hinblick auf den Einfluss der Säulenofentemperatur auf die Auflösung bestätigt werden. Bei der Fließmittelgeschwindigkeit hat sich die Vermutung anhand der die tatsächlichen Ergebnisse als richtig erwiesen.

Die Konzentration der einzelnen Proben wurde ebenfalls untersucht, um eine möglichst höhere Auflösung zu erzielen. Abbildung 5-19 und Abbildung 5-21 zeigen die Ergebnisse der Verdünnungsversuch der einzelnen Proben (B085, B095, B104) der Versuchsgruppe 3 und 4.

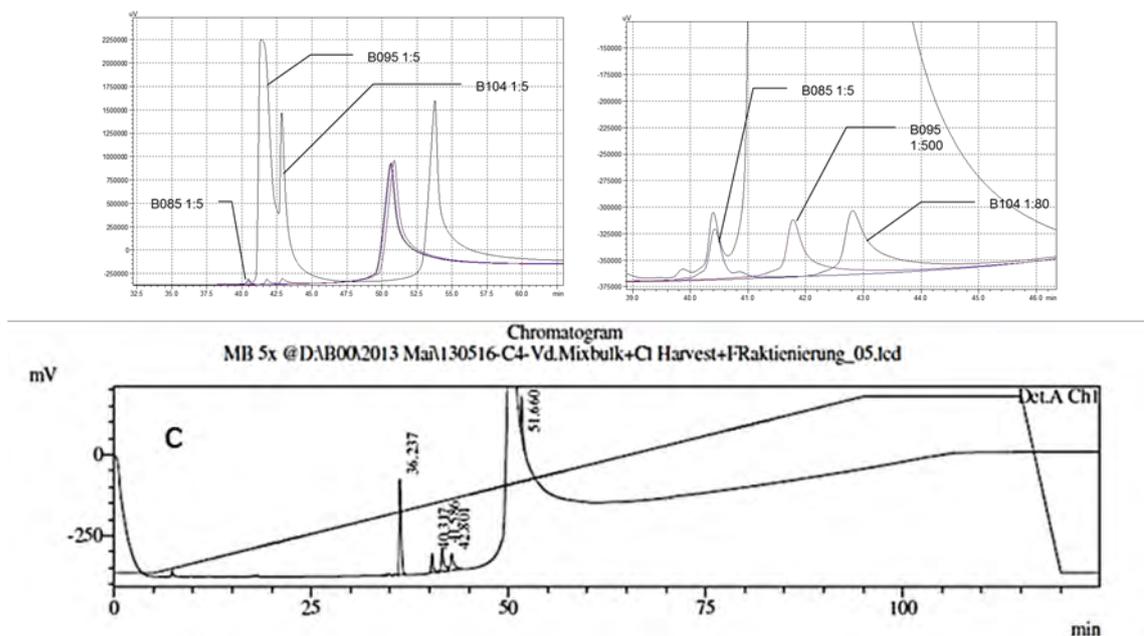


Abbildung 5-19: Chromatographische Darstellung der Verdünnungsversuche der Versuchsgruppe 3 zur besseren Peaktrennung. a) Ausgangsverdünnung von 1:5 der Proben B085, B095 und B104; b) Einzelne Verdünnungen der Proben in Form eines Overlays; c) Applikation der fünf Proben auf die Säule: B080, B082 und B085 sind dabei 1:5 verdünnt, B095 wurde 1:500 verdünnt und B104–1:80

Durch die gezielte Verdünnung der Proben ist es gelungen, nahezu basisliniengetrennte Elutionspeaks der drei Proben B085, B095 und B104 zu erhalten. Im Vergleich zur Ausgangssituation der Peaktrennung, die im Kapitel 4.1 beschrieben wird, ist es gelungen, die Trennung der Peaks der Proben soweit zu optimieren, dass die einzelnen Elutionspeaks der Proben deutlich erkennbar sind und auch fraktioniert werden können (Abbildung 5-20).

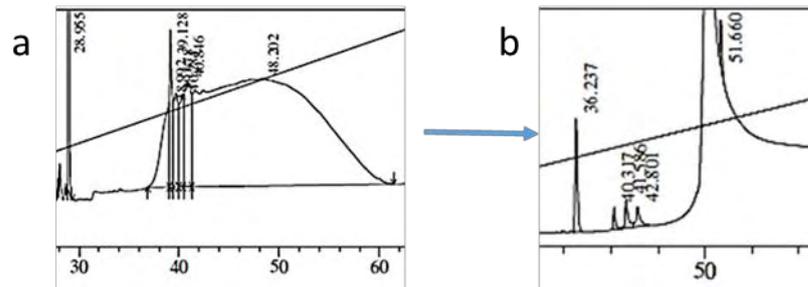


Abbildung 5-20: Vergleich der Ergebnisse der Versuchsgruppe 3 vor und nach der Methodenentwicklung mit anschließender Optimierung. a) Ergebnis der Vorversuche; b) Ergebnis der optimierten Methoden der Versuchsgruppe 3 mit gezielter Probenverdünnung

Auch bei der Versuchsgruppe 4 ist eine deutliche Verbesserung der Auflösung durch die gezielte Probenverdünnung zu erkennen (Abbildung 5-21).

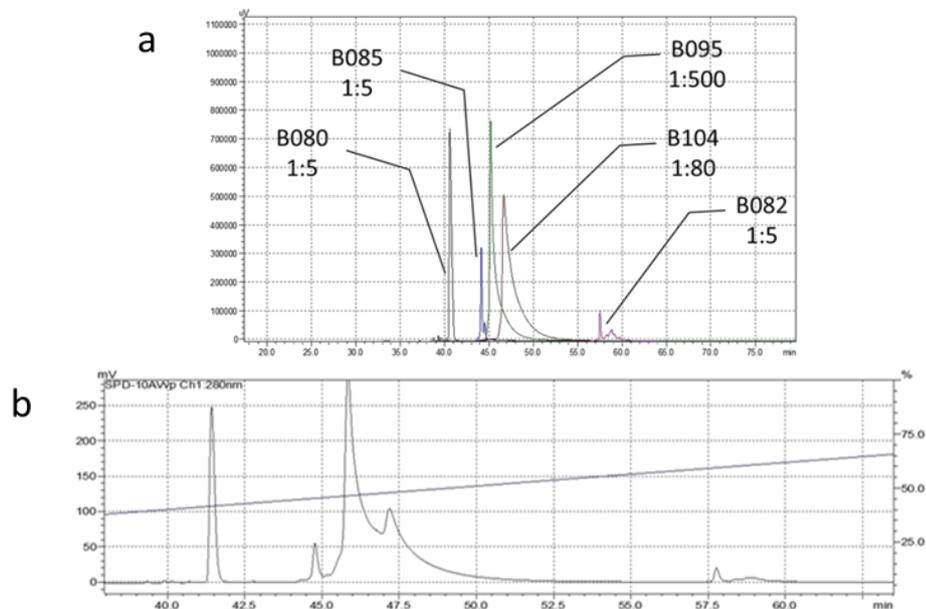


Abbildung 5-21: Chromatographische Darstellung der Verdünnungsversuche der Versuchsgruppe 4 zur besseren Peaktrennung. a) Einzelne Verdünnungen der Proben in Form eines Overlays; b) Applikation der fünf Proben auf die Säule: B080, B082 und B085 sind dabei 1:5 verdünnt, B095 wurde 1:500 verdünnt und B104 – 1:80

Der in der Abbildung 5-22 folgender Vergleich der Ergebnisse des Vorversuchs und der Optimierung der entwickelten Methode zeigt eine eindeutige Verbesserung der Peaktrennung.

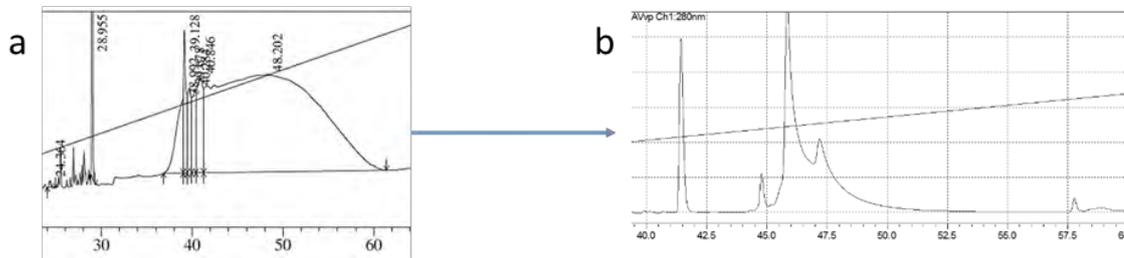


Abbildung 5-22: Vergleich der Ergebnisse der Versuchsgruppe 4 vor und nach der Methodenentwicklung mit anschließender Optimierung. a) Ergebnis der Vorversuche; b) Ergebnis der optimierten Methoden der Versuchsgruppe 4 mit gezielter Probenverdünnung

Im letzten Schritte der Methodenoptimierung Versuchsgruppen 3 und 4 wurde versucht den Gradienten in Hinsicht auf die Gradientenlaufzeit zu optimieren. Die Vorgehensweise der Gradientenoptimierung wurde bereits im Kapitel 4.5 beschrieben.

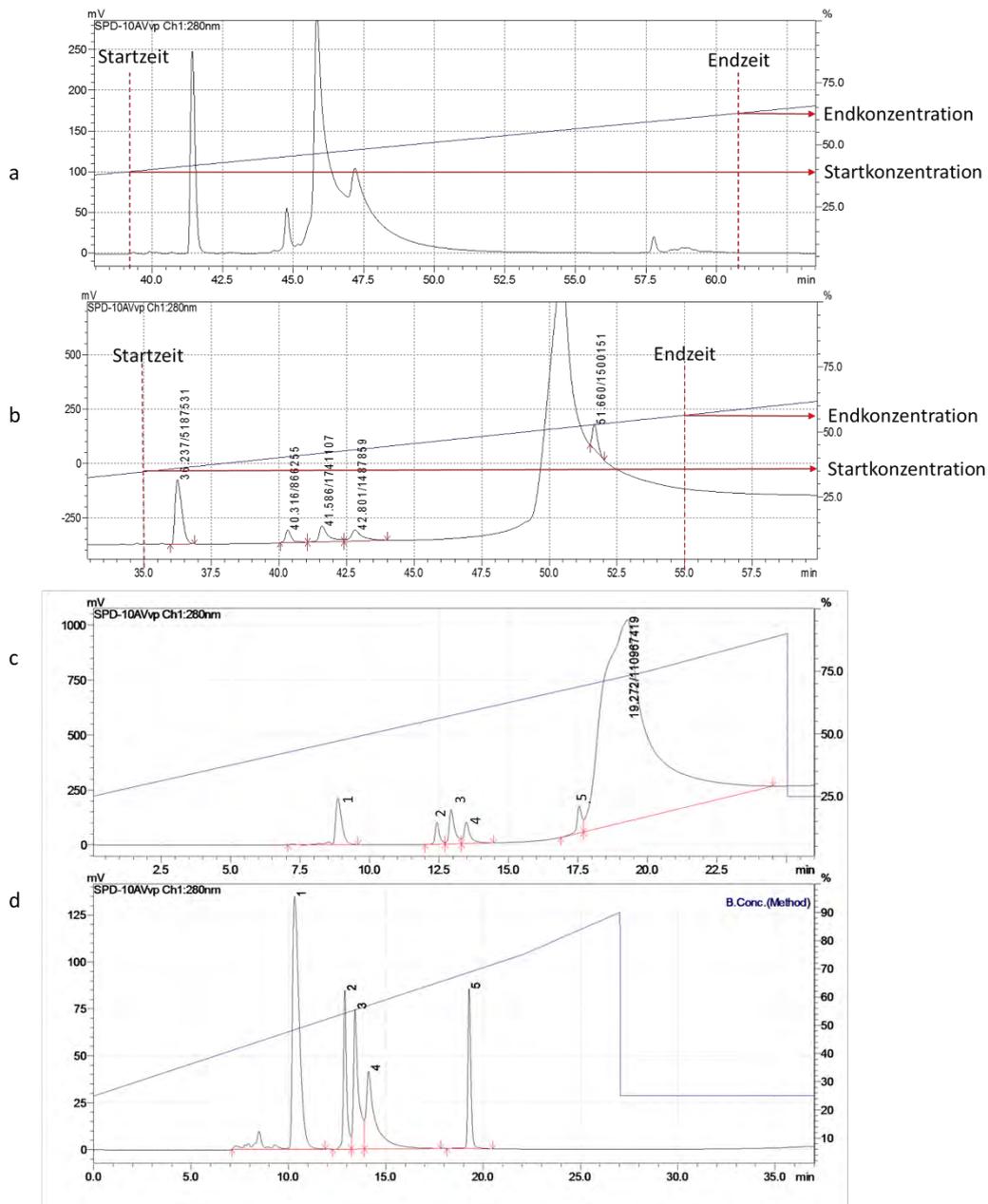


Abbildung 5-23: Gradientenoptimierung der Versuchsgruppe 3. a) Ausgangsbedingungen: Gradientenlaufzeit 90 Minuten, Startkonzentration der Eluenten B im Gradienten 2%; c) Elutionsverhalten nach der Optimierung der Gradienten: Gradientenlaufzeit 20 Minuten, Startkonzentration der Eluenten B im Gradienten 25%, Endkonzentration des Eluenten B im Gradienten 75%. Gradientenoptimierung der Versuchsgruppe 4: b) Ausgangsbedingungen: Gradientenlaufzeit 90 Minuten, Startkonzentration der Eluenten B im Gradienten 2%; d) Elutionsverhalten nach der Optimierung der Gradienten: Gradientenlaufzeit 22 Minuten, Startkonzentration der Eluenten B im Gradienten 25%, Endkonzentration des Eluenten B im Gradienten 75%

In der Abbildung 5-23 ist die Anfangs- und Endsituation der Gradientenoptimierung der Versuchsgruppen 3 und 4 in Form von Chromatogrammen dargestellt. Die Gradientenoptimierung bei der Versuchsgruppe 3 führte zusätzlich dazu, dass die Retentionszeit des Peaks 5 (Probe B082) soweit verkürzt wurde, dass die Elution dieser Probe vor dem letzten Peak erfolgt.

Der letzte Elutionspeak der Versuchsgruppe 3 ist der THF-Peak. Dies wurde durch einen Leerlauf bestätigt (Abbildung 5-24). THF ist in der vorliegenden Konzentration von 20% (v:v) in dem Elutionsmittel B der Versuchsgruppe 3 UV-aktiv und wird daher in Form eines Laufmittelpeaks detektiert.

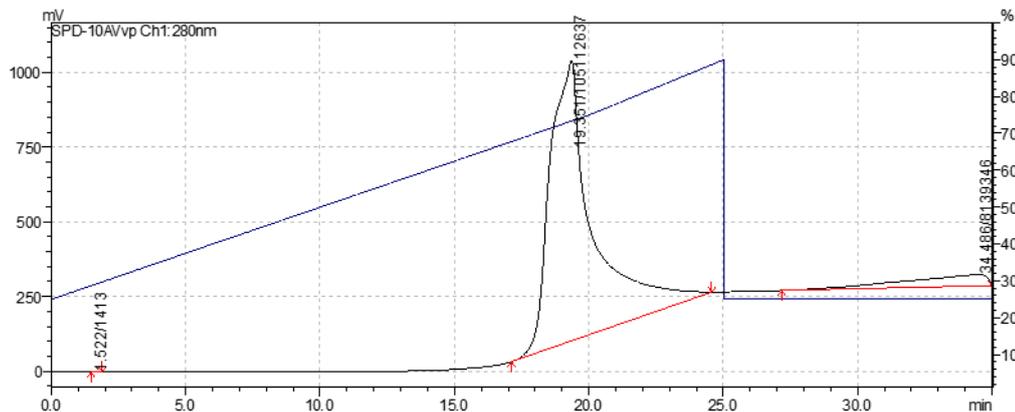


Abbildung 5-24: Leerlauf der Versuchsgruppe 3 unter Verwendung der finalen Methodeneinstellungen zur Überprüfung der UV-Aktivität des Eluentensystems

Unter Verwendung der finalen Einstellungen der entwickelten Methoden wurden Mischproben aus dem *Clarified-Harvest*-Schritt analog zu den *Bulk*-Proben auf die Säule appliziert und in Form eines Chromatogramm-*Overlays* mit dem Elutionsverhalten der *Bulk*-Proben verglichen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 5-25 dargestellt. Die Probe B082 aus dem *Clarified-Harvest*-Schritt war leider nicht mehr verfügbar und wurde in diesen Versuchen nicht zu der *Clarified-Harvest*-Mischprobe hinzugefügt. Die restlichen *Clarified-Harvest*-Proben wurden in der Mischprobe auf die finalen Verdünnungsstufen analog zu den *Bulk*-Proben eingestellt.

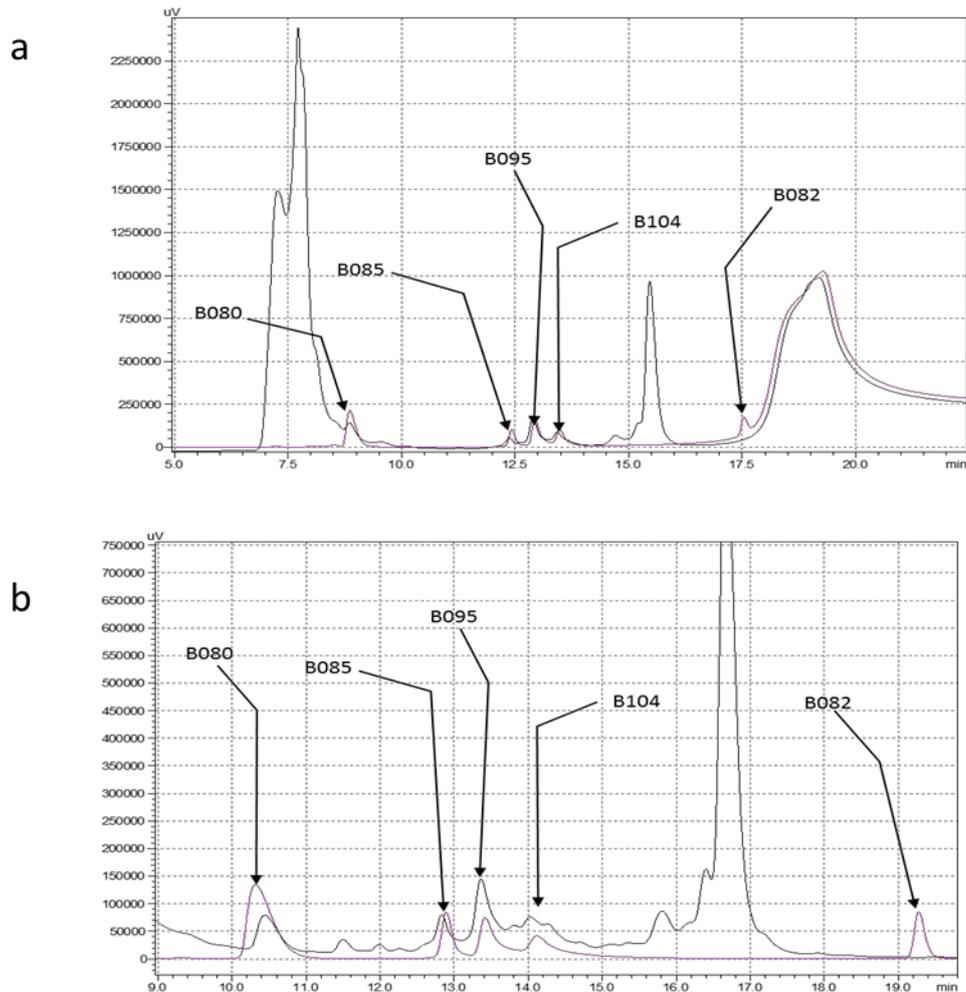


Abbildung 5-25: Übersicht der Ergebnisse der Peakwiederfindungs-Versuche der Versuchsgruppe 3 (a) und der Versuchsgruppe 4 (b). Schwarz: Elutionsverlauf der Mischprobe aus dem Clarified-Harvest-Schritt (ohne B082-Probe). Rot: Elutionsverlauf der Mischprobe aus dem Bulk-Schritt

Die Chromatogramme der Abbildung 5-25 zeigen, dass die einzelne Probenpeaks der *Clarified-Harvest*-Mischprobe eindeutig zu Peaks der *Bulk*-Mischprobe zugeordnet werden können. Die Retentionszeiten der Proteine der beiden Mischproben stimmen überein. Anhand dieser Ergebnisse wurde sichtbar, dass die entwickelte Methode auch zu Analyse und Detektion von In-Prozess-Proben geeignet ist.

Nach der Festlegung der finalen Methodeneinstellungen wurde eine Fraktionierung bei beiden Versuchsgruppen durchgeführt. Bei der Versuchsgruppe 3 wurde zusätzlich zu den 5 Probenpeaks auch der Laufmittelpik fraktioniert um sicherstellen zu können, dass dieser keine Proteine enthält.

Die Ergebnisse der reduzierenden *SDS-PAGE* sind in der Abbildung 5-26 dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Bereiche der BSA-Proben, Fraktionsproben der Versuchsgruppe 3 und der

Versuchsgruppe 4 farbig umrandet. Folgende Abkürzungen wurden für die Gelbeschriftung verwendet:

Tabelle 5-3: Übersicht der verwendeten Abkürzung für die Gelbeschriftung der reduzierenden SDS-PAGE zur Analyse der Fraktionsproben der Versuchsgruppen 3 und 4

Spur	Abkürzung	Bezeichnung
1/24	BR	<i>Broad Range</i> Marker
3-9	BSA	Bovines Serumalbumin in unterschiedlichen Konzentrationen
11-15	F1/A-F5/A	Fraktionsproben 1 bis 5 der Versuchsgruppe 4. Nummerierung entspricht der Peakreihenfolge
12-21	F1/T-F5/T	Fraktionsproben 1 bis 5 der Versuchsgruppe 3. Nummerierung entspricht der Peakreihenfolge
22	FT/T	Fraktionsprobe des Laufmittelpeaks der Versuchsgruppe 3

Der zu den Fraktionsproben der beiden Versuchsgruppen zusätzlich auf das Gel aufgetragene BSA-Standard in Konzentrationen von 200 µg/mL bis 10 µg/mL diente dem Zweck der Abschätzung der Proteinkonzentration Fraktionsproben.

In den Spuren 11 und 17 sind jeweils die Fraktionen der Probe B080 und in den Spuren 15 und 21 jeweils die Fraktionen der Probe B082 aufgetragen worden. Diese sind auf dem in der Abbildung 5-26 dargestellten Gel nicht erkennbar. Ein möglicher Grund dafür ist die niedrige Proteinkonzentration der Proben sowie ihr geringes Molekulargewicht. Um dies überprüfen zu können, wurden beide Proben in unterschiedlichen Verdünnungsstufen auf ein separates Gel aufgetragen und bewertet.

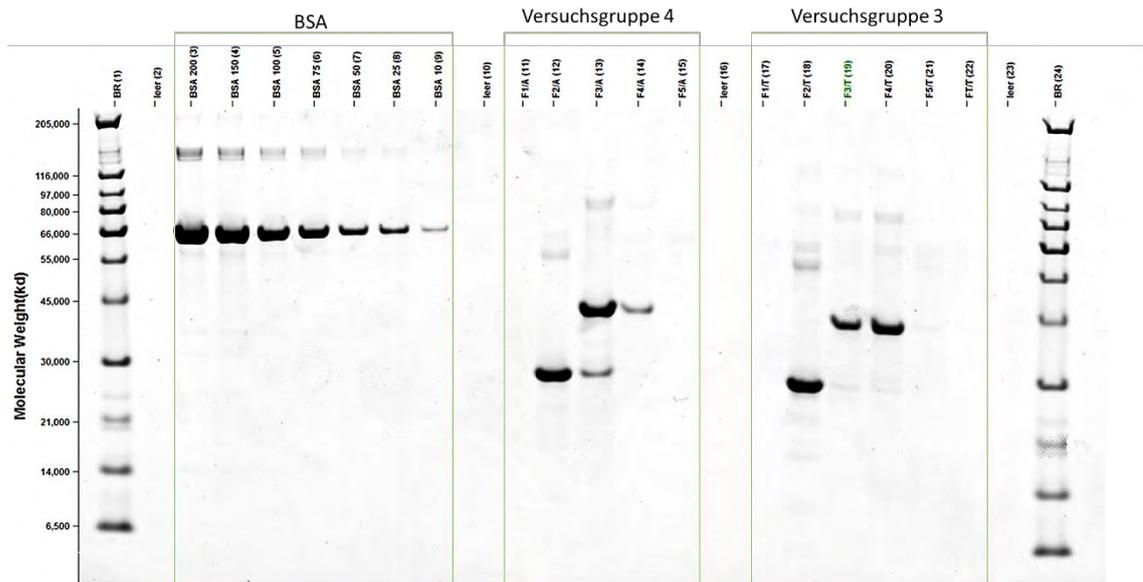


Abbildung 5-26: Ergebnisse der reduzierenden SDS-PAGE der Fraktionsproben der Versuchsgruppe 3 und 4

In den Spuren 12 und 18 sind jeweils die Fraktionen der Probe B085 aufgetragen worden. Die Banden in den Spuren weisen ein identisches Molekulargewicht von 24,3 kDa. Es ist davon auszugehen, dass es sich in den beiden Spuren um das gleiche Protein handelt.

In den Spuren 13 und 19 sind jeweils die Fraktionen der Probe B095 aufgetragen worden. In der Spur 12 ist zusätzlich eine weitere Bande sichtbar, die das gleiche Molekulargewicht von 24,3 kDa wie die Bande der Probe B085 aufweist. Das Vorhandensein der Zusatzbande ist durch das Elutionsverhalten der Proben B085 und B095 bei der Versuchsgruppe 4 zu erklären. Bei der Fraktionierung wurde in der Fraktionsprobe B095 ein anteiliges Volumen der Probe B085 gesammelt. Auf Grund dessen, dass die Hauptbanden der o.g. Spuren identisch sind, ist auch hier davon auszugehen, dass bei den Fraktionsproben es sich um das gleiche Protein mit dem Molekulargewicht von 36,9 kDa handelt.

In den Spuren 14 und 20 sind jeweils die Fraktionen der Probe B104 aufgetragen worden. Die abgebildeten Banden weisen ein Molekulargewicht von 36,8 kDa auf.

In der Spur 22 wurde die Fraktionsprobe des Laufmittelpeaks der Versuchsgruppe 3 aufgetragen. Hier sind wie erwartet keine Banden zu erkennen. Dies bestätigt die Annahme, dass es sich bei dem letzten Peak um einen Laufmittelpeak handelt und dieser auf Grund der UV-Aktivität des THF detektiert wurde.

Für die zusätzliche Testung der Proben B080 und B082 in Hinblick auf ihre Proteinkonzentration und des Molekulargewichts wurden für die Gelbeschriftung folgende Abkürzungen verwendet:

Tabelle 5-4: Übersicht der verwendeten Abkürzung für die Gelbeschriftung der reduzierenden SDS-PAGE zur zusätzlichen Testung der Proben B080 und B082 in Hinblick auf ihre Proteinkonzentration und Molekulargewicht

Spur	Abkürzung	Bezeichnung
1/25	BR	Broad Range Marker
3-9	BSA	Bovines Serumalbumin in unterschiedlichen Konzentrationen
11-15	B080(1)- B080(5)	Verdünnungen der Probe B080: 1:5 (1), 1:4 (2), 1:3 (3), 1:2 (4) und unverdünnt (5)
12-16	B082(1)- B082(5)	Verdünnungen der Probe B082: 1:5 (1), 1:4 (2), 1:3 (3), 1:2 (4) und unverdünnt (5)
23	BM	Mischprobe aus B080, B082, B085, B095 und B104 im Verhältnis 1:5

Die Ergebnisse der reduzierenden SDS-PAGE für die zusätzliche Testung der Proben B080 und B082 sind in der Abbildung 5-27 dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Bereiche für die BSA-Proben, die Verdünnungsreihe der B080 Probe und der Verdünnungsreihe der B082 Probe umrandet.

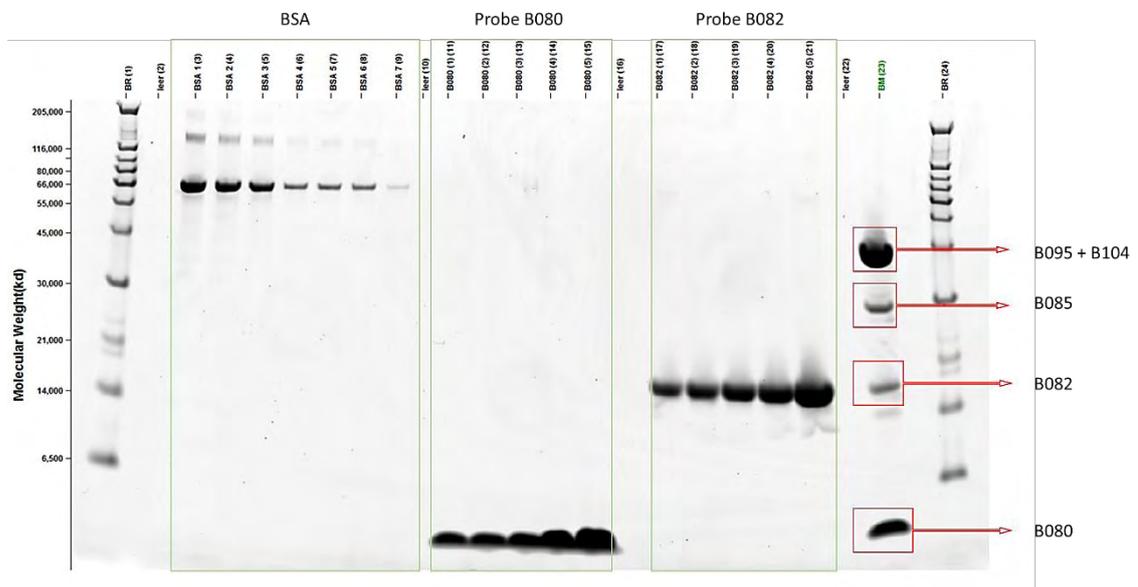


Abbildung 5-27: Ergebnisse der reduzierenden SDS-PAGE der verschiedenen Verdünnungen der B080 und B082 Proben

Die Banden der Spuren 11 bis 15 zeigen deutlich, dass das Molekulargewicht der B080 Probe unterhalb des niedrigsten Molekulargewichts des *Broad-Range*-Markers liegt (6,5 kDa). Somit

ist das Nichtvorhandensein der Banden in den Spuren 11 und 17 des in der Abbildung 5-26 dargestellten Gels zu erklären. Die Probe ist während der Elektrophorese vollständig aus dem Gel gewandert.

Die Banden der Spuren 17 bis 21 weisen ein Molekulargewicht von 15,4 kDa auf. Das Nichtvorhandensein der Banden in den Spuren 15 und 21 des in der Abbildung 5-26 dargestellten Gels ist durch zu geringe Proteinkonzentration der Fraktionsproben zu erklären. Es wird angenommen, dass die Proteinkonzentration deutlich unter 10 µg/mL liegt.

In der Spur 23 wurde die Mischprobe aus B080, B082, B085, B095 und B104 im Verhältnis 1:5 aufgetragen. Auf dem Gel sind nur vier Banden erkennbar. Die erste Bande mit dem höchsten Molekulargewicht beinhaltet die Proteine der Proben B095 und B104, da diese das gleiche Molekulargewicht aufweisen.

Diese Ergebnisse bestätigen die Funktionalität der entwickelten Methoden der Versuchsgruppen 3 und 4.

5.2. Ergebnisse der generischen *HPLC*-Methodenentwicklung für *pDNA*-Proben

Wie im Kapitel 4.7 bereits erwähnt wurde, konnte die derzeit auf dem Markt verfügbare und im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte PLRP-S Polymer-Säule nicht zur generischen *HPLC*-Methodenentwicklung für *pDNA*-Proben verwendet werden.

In der Abbildung 5-28 wurden die Ergebnisse der Vorversuche in Form der Chromatogramme dargestellt.

Beide Einstellungen für den Gradientenverlauf, die in der Tabelle 4-11 beschrieben wurden, lieferten keine zufriedenstellenden Ergebnisse.

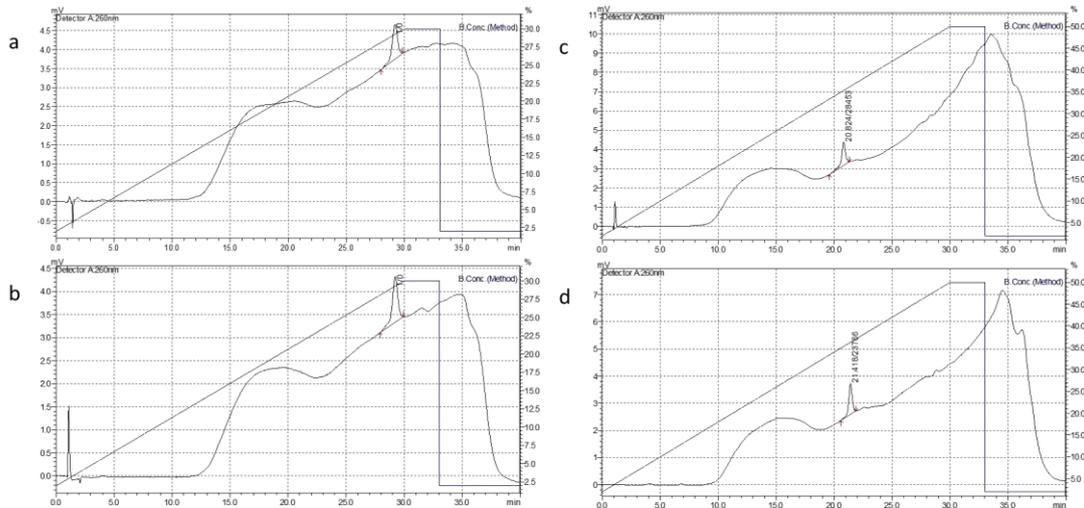


Abbildung 5-28: Darstellung der Ergebnisse der Vorversuche zu generischen HPLC-Methodenentwicklung für pDNA-Proben bei Verwendung der PLRP-S Polymer-Säule, des Elutionssystems 100% AcCN/H₂O bei einer Fließmittelgeschwindigkeit von 0,5 mL/min und der Säulenofentemperatur von 30°C. a) Gradientenlaufzeit 20 Minuten, Konzentration des Eluenten B während des Gradienten 10-30%, 5 µL Injektion des Eluenten B; b) Gradientenlaufzeit 20 Minuten, Konzentration des Eluenten B während des Gradienten 10-30%, 5 µL Injektion der pDNA-Probe; c) Gradientenlaufzeit 20 Minuten, Konzentration des Eluenten B während des Gradienten 2-50%, 5 µL Injektion des Eluenten B; d) Gradientenlaufzeit 20 Minuten, Konzentration des Eluenten B während des Gradienten 2-50%, 5 µL Injektion der pDNA-Probe

Bei der Applikation des Eluenten B zeigten sich bei beiden Gradiententypen erhebliche Schwankungen der Basislinie. Der gleichmäßige Anstieg der Basislinie wäre zwar durch die Verwendung der Gradientenelution möglich, jedoch sind damit die Schwankungen im Bereich zwischen 10 und 25 Minuten nicht erklärbar. Zusätzlich wurde ein Peak detektiert, der am Ende des Gradienten erscheint. Dieser kann nicht als Laufmittelpeak betrachtet werden, da Acetonitril ein UV-inaktives Lösungsmittel ist. Die Vermutung, dass es sich bei dem Peak um eine mögliche Kontamination im Eluentensystem handeln könnte, wurde durch die Verwendung frischen Acetonitrils widerlegt. Eine mögliche Kontamination innerhalb der verwendeten HPLC-Anlage konnte ebenfalls ausgeschlossen werden.

Bei der Applikation der pDNA-Probe wurde in beiden Fällen die bereits erwähnte Basislinienschwankung beobachtet. Bei dem detektierten Peak kann nicht davon ausgegangen werden, dass es sich tatsächlich um die applizierte pDNA-Probe handelt, da dieser die gleiche Retentionszeit aufweist, wie der unbekannte Peak bei der Applikation des Eluenten B auf die Säule. Die Peakfläche nimmt nach der Probeninjektion zu und dies lässt vermuten, dass der Probenpeak von dem unbekanntem Peak zum Teil überlagert wird.

Die Schwankungen der Basislinie werden in manchen Fällen durch eine Druckschwankung im HPLC-System verursacht. In der Abbildung 5-29 ist der Druckverlauf während des Gradienten dargestellt.

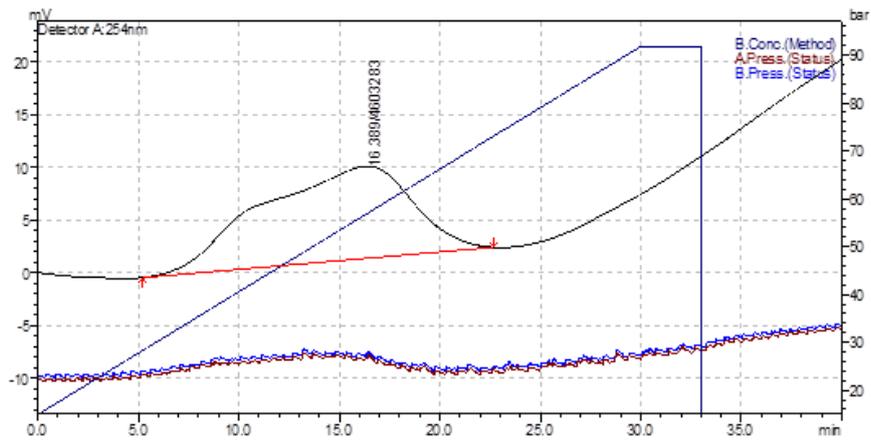


Abbildung 5-29: Druckverlauf während des Gradienten. Gradientenlaufzeit 20 min, Startkonzentration des Eluenten B 2%, Endkonzentration des Eluenten B 50%, Eluent B als 5 μ L Injektion

Es ist ersichtlich, dass unter Verwendung der o.g. Säule es zu erheblichen Druckschwankungen bis zu 10 bar kommt. Eine vollständige Systemüberprüfung der HPLC-Anlage zeigte, dass die beiden Laufmittelpumpen funktionstüchtig sind und sämtliche Verbindungskapillaren frei von möglichen Verstopfungen waren. Somit wurde die verwendete Säule als defekt und ungeeignet für eine weitere Methodenentwicklung betrachtet.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, zwei generische Analytik-Methoden unter Verwendung einer Hochdruckchromatographieanlage mit einer *RP-HPLC-C4* (300 Å/5 µm)-Säule und der statistischen Auswertesoftware (*DoE*, *MODDE*) zur Detektion von fünf Proteinproben in einem Probengemisch zu entwickeln.

Durch den Einsatz der statistischen Auswertesoftware (*DoE*, *MODDE*) war es möglich, eine methodische und strukturierte Versuchsplanung zu erstellen und diese anschließend zu beurteilen. Nicht alle Ergebnisse und Vorhersagen der statistischen Auswertesoftware entsprachen den tatsächlichen Ergebnissen der Versuche. Daher waren die Beurteilung der Ergebnisse und das weitere Vorgehen stets von der Betrachtung der statistischen als auch der realen Versuchsergebnisse abhängig.

Die Versuche mit der *RP-HPLC-C18* (300 Å/5 µm)-Säule unter Verwendung der Elutionssysteme 80% AcCN+20% THF/H₂O und 100% AcCN/H₂O zeigten, dass diese Säule für eine generische Methode ungeeignet ist. Die *RP-HPLC-C18*-Säule eignete sich zur Trennung und Detektion der Fusionsproteine, die ein Molekulargewicht unter 14 kDa aufweisen. Zur Detektion und Trennung der größeren Fusionsproteine ist diese Säule auch unter Verwendung der für Antikörperfusionsproteine notwendigen Säulenofentemperatur nicht verwendbar.

Aus den Versuchen und anschließenden Optimierungen mit der *RP-HPLC-C4* (300 Å/5 µm)-Säule konnten zwei generische Methoden unter Verwendung der Elutionssysteme 80% AcCN+20% THF/H₂O und 100% AcCN/H₂O entwickelt werden, die sowohl den qualitativen als auch den quantitativen Anforderungen des Labors entsprechen. Anhand der chromatographischen Ergebnisse beider Methoden ist die Möglichkeit gegeben, eine Aussage über die Reinheit und Konzentration der einzelnen Bestandteile der Probe zu treffen. Beide Methoden sind zusätzlich zur Überprüfung der Prozessproben der unterschiedlichen Aufreinigungsstufen geeignet.

Die Methode unter Verwendung des Elutionssystems 80% AcCN+20% THF/H₂O eignet sich im Vergleich zur Methoden unter Verwendung des Elutionssystems 100% AcCN/H₂O besser zur Detektion von Proteinen geringer Konzentration. Zusätzlich bietet die Methode eine deutlich höhere Auflösung der untersuchten Proben. Die Elutionskraft der Methode ist durch die Zugabe des 20% Tetrahydrofurans (v:v) deutlich höher und hat eine bessere Elution der Probe zur Folge. Als Nachteil der entwickelten Methode hat sich die UV-Aktivität des Tetrahydrofurans im Eluen-

tensystem gezeigt. Die UV-Aktivität wird in Form eines Laufmittelpeaks sichtbar. Bei den untersuchten Proben ergab sich eine im Vergleich zu Tetrahydrofuran kürzere Retentionszeit, so dass die Probenpeaks vor dem Laufmittelpeak im Chromatogramm erkennbar waren. Daher beschränkt sich die Verwendung der Methode (80% AcCN+20% THF/H₂O) auf die Analyse von Proben mit einer Retentionszeit bis zu 17 Minuten. In Falle einer längeren Retentionszeit sollte die Methoden mit dem Eluentensystem 100% AcCN/H₂O verwendet werden.

Im Allgemeinfall empfiehlt es sich bei der Analyse der unbekannt Proben die Vorstufe der beiden Methoden zu testen (Tabelle 4-6) um die Retentionszeit der Proben bestimmen zu können. Anschließend kann wie in Kapitel 4.5 und der Abbildung 5-23 dargestellt, die jeweilige Gradientenlaufzeit und die Konzentration des Eluenten B während des Gradienten angepasst werden.

Bei der Untersuchung der derzeit auf dem Markt verfügbaren PLRP-S Polymer-(4000Å/8 µm)-Säule auf die Fähigkeit Plasmid-DNA in ihren drei Konformationen (*ccc-*, *lc-* und *oc-*Konformation) sowohl qualitativ als auch quantitativ mittels einer *RP-HPLC*-Methode zu analysieren, wurde festgestellt, dass diese Säule aufgrund ihrer Beschaffenheit für diesen Zweck nicht verwendet werden konnte. Durch den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit war eine Neubeschaffung der o.g. Säule nicht gegeben und die entsprechenden Arbeiten wurden eingestellt.

7. Abkürzungsverzeichnis

%B/%B2	Konzentration des Eluenten B
%B2_Ende	Endkonzentration des Eluenten B
3D	dreidimensional
4D	vierdimensional
Å	Ångström
<i>A. Press</i>	
AcCN	Acetonitril
<i>AEIC</i>	<i>anion-exchange chromatography</i>
<i>B. Conc.</i>	<i>Concentration B</i>
<i>B. Press</i>	
B080(1)-B080(5)	Verdünnungen der Probe B080: 1:5 (1), 1:4 (2), 1:3 (3), 1:2 (4) und unverdünnt (5)
B080, B082, B085, B095, B104	Probenbezeichnung
B082(1)-B082(5)	Verdünnungen der Probe B082: 1:5 (1), 1:4 (2), 1:3 (3), 1:2 (4) und unverdünnt (5)
BM	Mischprobe aus B080, B082, B085, B095 und B104 im Verhältnis 1:5
bp	Basenpaar
<i>BR</i>	<i>Broad Range</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
<i>ccc</i>	<i>covalently closed circles</i>
<i>Ch1</i>	<i>Chanel 1</i>
DAD	Diodenarraydetektor
<i>Det</i>	<i>Detector</i>
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser
<i>DNA</i>	<i>deoxyribonucleic acid</i>
<i>DoE</i>	<i>Design of Experiment</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ect.	Et cetera
<i>EoF</i>	<i>End of Fermentation</i>

F1/A-F5/A	Fraktionsproben 1 bis 5 der Versuchsgruppe 4. Nummerierung entspricht der Peakreihenfolge
F1/T-F5/T	Fraktionsproben 1 bis 5 der Versuchsgruppe 3. Nummerierung entspricht der Peakreihenfolge
Fli	Fließmittelgeschwindigkeit
FT/T	Fraktionsprobe des Laufmittelpeaks der Versuchsgruppe 3
<i>GFP</i>	<i>green fluorescent protein</i>
ggf.	gegeben Falls
Gra	Gradientenlaufzeit
H ₂ O	Wasser
<i>HIC</i>	<i>hydrophobic interaction chromatography</i>
<i>HPLC</i>	<i>high performance liquid chromatography</i>
<i>IUPAC</i>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
<i>lc</i>	<i>line circular (lc)</i>
<i>LDS</i>	<i>lithium dodecyl sulfate</i>
max	Maximum
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minimum
MSC	<i>multiple cloning site</i>
mV	Milivolt
<i>MW</i>	<i>Model Validity</i>
o.g.	oben genannt
<i>oc</i>	<i>open circular</i>
<i>ORI</i>	<i>origin of replication</i>
pDNA	Plasmid-DNS
Q2	Aussagekraft und die Genauigkeit der Vorhersage des Modells
R2	Korrelationsfaktor
RHB	Richter-Helm BioLogics
<i>RP</i>	<i>Reverse Phase</i>
<i>rpm</i>	<i>revolutions per minute</i>
Säu	Säule

SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEC	Size Exclusion Chromatography
T Säulenofen	Säulenofentemperatur
t Gradient	Gradientenlaufzeit
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
UFDF	Ultradiafiltration
UV	Ultraviolett
UV-VIS	UV-Visible
v:v	Volume per Volume
\dot{V} Fließmittel	Fließmittelgeschwindigkeit
VG	Versuchsgruppe
W	Watt
w:v	Weight per Volume
$\varphi_{B, Ende}$	prozentuale Endkonzentration des Eluenten B
$\varphi_{B, Start}$	prozentuale Startkonzentration des Eluenten B

8. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1-1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ENTSTEHUNG EINER ANALYTISCHEN METHODE [2]	5
ABBILDUNG 1-2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ANALYTISCHEN PROZESSES [2]	6
ABBILDUNG 1-3: A) ABLAUF EINER CHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNG. NACH DER PROBENAPPLIKATION AUF DIE TRENNSÄULE WIRD DAS ANALYTENGEMISCH IDEALERWEISE IN DIE EINZELKOMPONENTEN SEPARIERT, DIE NACHEINANDER DEN DETEKTOR PASSIEREN. DAS ZEITABHÄNGIGE SIGNAL WIRD IN FORM DER PEAKS IN EINEM CHROMATOGRAMM WIEDERGEgeben [3]; B) SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES CHROMATOGRAMMS [4]	8
ABBILDUNG 1-4: A) UMSETZUNG VON SILANOLGRUPPEN MIT CHLORSILANEN; B) BEISPIEL EINER HYDROPHOBEN RP-18- PHASE [4]	11
ABBILDUNG 1-5: ADSORPTION UND DESORPTION BEI DER RPC. DURCH DIE VERWENDUNG DER ORGANISCHEN LÖSUNGSMITTEL KOMMT ES ZUR DENATURIERUNG VON PROTEINEN WÄHREND DES ELUTIONSVORGANGS [3]	11
ABBILDUNG 1-6: EMPFEHLUNG ZUR WAHL DER GEEIGNETEN PORENGRÖÖE DER RP-TRENNSÄULE ANHAND DER EIGENSCHAFTEN DES ANALYTEN, HERAUSGEgeben VON VARIAN INC. UND POLYMER LABORATORIES [1]	12
ABBILDUNG 1-7: A) ÜBERSICHT DER SÄULENTYPEN DES HERSTELLERS PHENOMENEX®. DER ROT UMRANDETE BEREICH ENTSPRICHT DEM FÜR DIE METHODENENTWICKLUNG GEWÄHLTEN BEREICH [7]; B) UND C) ZEIGEN DIE BEISPIELCHROMATOGRAMME DER FÜR DIE METHODENENTWICKLUNG GEWÄHLTEN SÄULEN: JUPITER® 300 C4 (B) UND JUPITER® 300 C18 (C) [2], [3]	13
ABBILDUNG 1-8: A) SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES PLASMIDVEKTORS MIT EINEM ANTIBIOTIKARESISTENZGEN (AMP ^R), EINEM REPLIKATIONSURSPRUNG (ORI) UND EINEM BEREICH ZUM EINFÜGEN DER GENE [4]; B) SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER CHROMOSOMALEN DNA UND DER PLASMID-DNA IN EINER UNIVERSELLEN BAKTERIENZELLE [5] .	14
ABBILDUNG 1-9: AUFBAU EINES TYPISCHEN PLASMIDS (PEXEC1) ZUR EXPRESSION VON ZIELGENEN IN E. COLI [9]	15
ABBILDUNG 1-10: MONOMERE (A, C, E) UND DIMERE (B, D, F) KONFORMATIONEN (CCC-, OC- UND LC-KONFORMATIONEN) DER PLASMID-DNA [6]	15
ABBILDUNG 1-11: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES UNTERSUCHTEN SYSTEMS. EINE FÜLLE VON EINGANGSGRÖÖEN WIRKT DARAUF EIN. JEDES SYSTEM HAT GRENZEN UND ERZEUGT ERGEBNISSE [10]	17
ABBILDUNG 1-12: A) GRAPHISCHE DARSTELLUNG EINES VOLLFAKTORIELLEN VERSUCHSPLANS FÜR DREI FAKTOREN AUF JEWEILS ZWEI LEVELS; B) GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER EFFEKTBERECHNUNG. DIE HAUPTEFFEKTE JEDES FAKTORS (A, B UND C) BERECHNEN SICH AUS DER DIFFERENZ DER JEWEILIGEN LEVEL-MITTELWERTE. DIE GLEICHEN VERSUCHSDATEN WERDEN FÜR JEDEN FAKTOR, ENTSPRECHEND DER FAKTOREINSTELLUNG, GRUPPIERT [10]	18
ABBILDUNG 1-13: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER GEGENSEITIGEN EFFEKTE DER EINZELNEN FAKTOREN [10]	19
ABBILDUNG 1-14: SCHEMATISCHER ABLAUF EINER DOE-ANWENDUNG. DIE DREI PHASEN WERDEN NACHEINANDER DURCHLAUFEN UND BAUEN AUF EINANDER AUF. [10]	19
ABBILDUNG 3-1: ÜBERSICHT DER IN-PROZESS-PROBEN BEI DEN UNTERSCHIEDLICHEN AUFREINIGUNGSSTUFEN VON DER FERMENTATION BIS ZUR ENDREINIGUNG UND FORMULIERUNG	25
ABBILDUNG 4-1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VERSUCHSKONSTELLATION ZUR METHODENENTWICKLUNG	26

ABBILDUNG 4-2: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES KONZENTRATIONSVERLAUFS DES ELUENTEN B WÄHREND DER VORVERSUCHE.....	28
ABBILDUNG 4-3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER AUSGANGSBEDINGUNGEN DER RP-HPLC METHODE ZUR UNTERSUCHUNG DER PROTEINPROBEN SOWIE DIE VARIATION DER METHODENPARAMETER. DER GESTRICHelte BEREICH, DER IN DIESEM FALL DEM GRADIENTEN ENTSPRICHt, WURDE VARIERT, RESTLICHE BEREICHE BLIEBEN BEI ALLEN VERSUCHEN KONSTANT. ZUSÄTZLICH SIND DIE EINZELNEN BEREICHE DER ZU VARIIERENDEN PARAMETER ABGEBILDET	29
ABBILDUNG 4-4: GRAPHISCHER VERGLEICH DES ZEITLICHEN ABLAUF DER METHODEN VOR UND NACH DER OPTIMIERUNG DER GRADIENTENLAUFZEIT UND ELUENTEN B-KONZENTRATION	37
ABBILDUNG 4-5: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER GRADIENTENVARIATION FÜR DIE ANALYTIK DER PDNA-PROBEN MITTELS DER PLRP-S POLYMER-SÄULE NACH ANGABEN UND EMPFEHLUNGEN DES HERSTELLERS	42
ABBILDUNG 5-1: ELUTIONSVERHALTEN DER B080 UND B082 PROBEN WÄHREND DER VORVERSUCHE DER C18-SÄULE. A) B080 PROBE (VERDÜNNUNG 1:5), INJEKTIONSVOLUMEN 100 µL, RETENTIONSZEIT 28 MIN; B) B082 PROBE (VERDÜNNUNG 1:5), INJEKTIONSVOLUMEN 100 µL, RETENTIONSZEIT 39 MIN.....	44
ABBILDUNG 5-2: ERGEBNISSE DER APPLIKATION DER MISCHPROBE AUF DIE C18-SÄULE. ELUTIONSPEAKS DER PROBEN B080 UND B082 SIND EINDEUTIG ERKENNBAR. PROBEN B085, B095 UND B104 ELUIEREN IN BEREICH ZWISCHEN 38 MIN UND 62 MIN IN FORM EINES EINZIGEN PEAKS	45
ABBILDUNG 5-3: VERSUCHSERGEBNISSE UNTER VERWENDUNG EINES FLACHEN GRADIENTEN VON 2-3% DES ELUENTEN B. A) ERGEBNISSE DER VERSUCHSGRUPPE 1 BEI EINER SÄULENOFENTEMPERATUR VON 60°C, GRADIENTENLAUFZEIT VON 20 MINUTEN UND EINER FLIEßMITTELGESCHWINDIGKEIT VON 1,5 ML/MIN; B) ERGEBNISSE DER VERSUCHSGRUPPE 2 BEI EINER SÄULENOFENTEMPERATUR VON 30°C, GRADIENTENLAUFZEIT VON 90 MINUTEN UND EINER FLIEßMITTELGESCHWINDIGKEIT VON 0,5 ML/MIN	46
ABBILDUNG 5-4: ERGEBNISSE NACH DER ERHÖHUNG DER KONZENTRATION DES ELUENTEN B IM GRADIENTEN AUF 100% DER VERSUCHSGRUPPEN 1 UND 2: A) ELUTIONSSYSTEM 100% ACCN/H ₂ O, GRADIENTENLAUFZEIT 20 MINUTEN, SÄULENOFENTEMPERATUR 60°C, FLIEßMITTELGESCHWINDIGKEIT 0,5 ML/MIN; B) ELUTIONSSYSTEM 80% ACCN+20% THF/H ₂ O, GRADIENTENLAUFZEIT 20 MINUTEN, SÄULENOFENTEMPERATUR 30°C, FLIEßMITTELGESCHWINDIGKEIT 0,5 ML/MIN	47
ABBILDUNG 5-5: C) ELUTIONSSYSTEM 100% ACCN/H ₂ O, GRADIENTENLAUFZEIT 90 MINUTEN, SÄULENOFENTEMPERATUR 30°C, FLIEßMITTELGESCHWINDIGKEIT 0,5 ML/MIN; D) ELUTIONSSYSTEM 80% ACCN+20% THF/H ₂ O, GRADIENTENLAUFZEIT 90 MINUTEN, SÄULENOFENTEMPERATUR 60°C, FLIEßMITTELGESCHWINDIGKEIT 0,5 ML/MIN	48
ABBILDUNG 5-6: ERGEBNISSE DER CENTERPOINT-VERSUCHE DER VERSUCHSGRUPPEN 1 UND 2. A) VERSUCHSGRUPPE 1; B) VERSUCHSGRUPPE 2. GRADIENTENLAUFZEIT 50 MINUTEN, ENDKONZENTRATION DES ELUENTEN B 51,5%	49
ABBILDUNG 5-7: EINFLUSS DER SÄULENOFENTEMPERATUR UND DER FLIEßMITTELGESCHWINDIGKEIT AUF DIE CHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG DER PROBEN. A) ERGEBNISSE DER VERSUCHSGRUPPE 2 UNTER VERWENDUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN FLIEßMITTELGESCHWINDIGKEITEN; B) ERGEBNISSE VERSUCHSGRUPPE 1 UNTER VERWENDUNG UNTERSCHIEDLICHER SÄULENOFENTEMPERATUREN. IN BEIDEN FÄLLEN BETRUG DIE GRADIENTENLAUFZEIT 90 MINUTEN MIT EINER ENDKONZENTRATION DES ELUENTEN B VON 100%	49

ABBILDUNG 5-8: VERSUCHSERGEBNISSE DER VERSUCHSGRUPPEN 3 UND 4 UNTER VERWENDUNG DES GRADIENTEN VON 2-3% DES ELUENTEN B. A) VERSUCHSGRUPPE 3, GRADIENTENLAUFZEIT 20 MINUTEN, SÄULENTEMPERATUR 30°C, FLIEßMITTELGESCHWINDIGKEIT 0,5 ML/MIN; B) VERSUCHSGRUPPE 4, GRADIENTENLAUFZEIT 90 MINUTEN, SÄULENTEMPERATUR 60°C, FLIEßMITTELGESCHWINDIGKEIT 1,5 ML/MIN.....	50
ABBILDUNG 5-9: ERGEBNISSE DER CENTERPOINT-VERSUCHE DER VERSUCHSGRUPPEN 3 UND 4. A) VERSUCHSGRUPPE 3; B) VERSUCHSGRUPPE 4. GRADIENTENLAUFZEIT 50 MINUTEN, ENDKONZENTRATION DES ELUENTEN B 51,5%.....	51
ABBILDUNG 5-10: ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER VERSUCHSGRUPPEN 3 UND 4. IM DIREKTEN VERGLEICH	53
ABBILDUNG 5-11: MODELLUMGEBUNG DER PARAMETERKONSTELLATION FÜR DIE GENERISCHE HPLC-METHODENENTWICKLUNG FÜR PROTEINPROBEN UNTER VERWENDUNG EINER RP-HPLC-C4-SÄULE (300 Å/5 MM) UND DES ELUTIONSSYSTEMS 80% ACN+20% THF/H ₂ O (VERSUCHSGRUPPE 3, A)) UND DES ELUTIONSSYSTEMS 100% ACN/H ₂ O (VERSUCHSGRUPPE 4, B)). ABKÜRZUNGEN DER Achsenbeschriftung: FLI = FLIEßMITTELGESCHWINDIGKEIT, GRA = GRADIENTENLAUFZEIT, SÄU = SÄULENTEMPERATUR, %B2 = ENDKONZENTRATION DES ELUENTEN B WÄHREND DES GRADIENTEN	54
ABBILDUNG 5-12: COEFFICIENT PLOT FÜR DIE ANZAHL DER GETRENNTEN PEAKS BEZOGEN AUF DIE MÖGLICHEN KOMBINATIONEN/WECHSELWIRKUNGEN DER EINFLUSSPARAMETER FÜR DIE GENERISCHE HPLC-METHODENENTWICKLUNG FÜR PROTEINPROBEN UNTER VERWENDUNG EINER RP-HPLC-C4-SÄULE (300 Å/5 MM) UND DES ELUTIONSSYSTEMS 80% ACN+20% THF/H ₂ O (VERSUCHSGRUPPE 3, A)) UND DES ELUTIONSSYSTEMS 100% ACN/H ₂ O (VERSUCHSGRUPPE 4, B)). ABKÜRZUNGEN DER Achsenbeschriftung: FLI = FLIEßMITTELGESCHWINDIGKEIT, GRA = GRADIENTENLAUFZEIT, SÄU = SÄULENTEMPERATUR, %B2 = ENDKONZENTRATION DES ELUENTEN B WÄHREND DES GRADIENTEN, * STEHT FÜR DIE WECHSELWIRKUNG/KOMBINATION DER EINFLUSSPARAMETER.....	56
ABBILDUNG 5-13: SUMMARY OF FIT FÜR DIE BEWERTUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE IN BEZUG AUF DAS GEWÄHLTE MODELL UNTER VERWENDUNG EINER RP-HPLC-C4-SÄULE (300 Å/5 MM) UND DES ELUTIONSSYSTEMS 80% ACN+20% THF/H ₂ O (VERSUCHSGRUPPE 3, A)) UND DES ELUTIONSSYSTEMS 100% ACN/H ₂ O (VERSUCHSGRUPPE 4, B)) .ABKÜRZUNGEN: R2 = KORRELATIONSFAKTOR, Q2 = GENAUIGKEIT DER VORHERSAGE	57
ABBILDUNG 5-14: CONTOUR PLOT DER VERSUCHSGRUPPE 3. AUF DER z-ACHSE IST DIE MÖGLICHE ANZAHL DER GETRENNTEN PEAKS (- 0,5 - 3,5) DARGESTELLT, DIE y-ACHSE REPRÄSENTIERT DIE GRADIENTENLAUFZEIT IN MINUTEN (30 - 90 MIN), x-ACHSE STELLT DIE ENDKONZENTRATION DES ELUENTEN B IM GRADIENTEN IN PROZENT (0-100%) DAR. ALS KONSTANTE PARAMETER WURDEN DIE SÄULENTEMPERATUR AUF 80°C UND DIE FLIEßMITTELGESCHWINDIGKEIT AUF 0,5 ML/MIN FESTGELEGT	59
ABBILDUNG 5-15: 4D PLOT DER VERSUCHSGRUPPE 3. AUF DER ÄUßEREN x-ACHSE SIND DREI ZEITANGABEN ZU DER GRADIENTENLAUFZEIT IN MINUTEN (55 MINUTEN, 72,5 MINUTEN UND 90 MINUTEN) DARGESTELLT. AUF DER ÄUßEREN y-ACHSE SIND DREI ENDKONZENTRATIONSANGABEN DES ELUENTEN B WÄHREND DES GRADIENTEN IN PROZENT (51%, 75,5% UND 100%) ABGEBILDET. DIE INNERE x-ACHSE STELLT DIE SÄULENTEMPERATUR IN °C (45°C-80°C) UND DIE INNERE y-ACHSE DIE FLIEßMITTELGESCHWINDIGKEIT IN ML/MIN (0,5 ML/MIN - 1,3 ML/MIN) DAR. DIE HELLUNTERLEGTE BEREICHE REPRÄSENTIEREN DIE HYPOTHETISCHEN ERGEBNISSE AUS DEN STATISTISCHEN DATEN DER DURCHFÜHRTEN VERSUCHE AUS DER VERSUCHSMATRIX. DER DEN PFEILEN MARKIERTE PUNKT STELLT DIE	

ZUSAMMENSTELLUNG DER AKTUELLEN PARAMETEREINSTELLUNGEN DAR. DIE ANZAHL DER GETRENNTEN PEAKS IST DURCH DIE FARBSKALA DARGESTELLT.....	60
ABBILDUNG 5-16: CONTOUR PLOT DER VERSUCHSGRUPPE 4. AUF DER Z-ACHSE IST DIE MÖGLICHE ANZAHL DER GETRENNTEN PEAKS (0 – 3) DARGESTELLT, DIE Y-ACHSE REPRÄSENTIERT DIE GRADIENTENLAUFZEIT IN MINUTEN (30 – 90 MINUTEN), DIE X-ACHSE STELLT DIE ENDKONZENTRATION DES ELUENTEN B IM GRADIENTEN IN PROZENT (0 - 100%) DAR. ALS KONSTANTE PARAMETER WURDEN DIE SÄULENOFENTEMPERATUR AUF 80°C UND DIE FLIEßMITTELGESCHWINDIGKEIT AUF 0,5 ML/MIN FESTGELEGT	61
ABBILDUNG 5-17: 4D PLOT DER VERSUCHSGRUPPE 4. AUF DER ÄUßEREN X-ACHSE SIND DREI ZEITANGABEN ZU DER GRADIENTENLAUFZEIT IN MINUTEN (55 MINUTEN, 72,5 MINUTEN UND 90 MINUTEN) DARGESTELLT. AUF DER ÄUßEREN Y-ACHSE SIND DREI ENDKONZENTRATIONSANGABEN DES ELUENTEN B WÄHREND DES GRADIENTEN IN PROZENT (51%, 75,5% UND 100%) ABGEBILDET. DIE INNERE X-ACHSE STELLT DIE SÄULENOFENTEMPERATUR IN °C (45°C - 80°C) UND DIE INNERE Y-ACHSE DIE FLIEßMITTELGESCHWINDIGKEIT IN ML/MIN (0,5 ML/MIN - 1,3 ML/MIN) DAR. DIE HELLUNTERLEGTE BEREICHE REPRÄSENTIEREN DIE HYPOTHETISCHEN ERGEBNISSE AUS DER STATISTISCHEN DATEN DER DURCHFÜHRTEN VERSUCHE AUS DER VERSUCHSMATRIX. DER VON DEN PFEILEN MARKIERTE PUNKT STELLT DIE ZUSAMMENSTELLUNG DER AKTUELLEN PARAMETEREINSTELLUNGEN DAR. DIE ANZAHL DER GETRENNTEN PEAKS IST DURCH DIE FARBSKALA DARGESTELLT.....	62
ABBILDUNG 5-18: EINFLUSS DER SÄULENOFENTEMPERATUR UND DER FLIEßMITTELGESCHWINDIGKEIT AUF DIE CHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG DER PROBEN. A) ERGEBNISSE DER VERSUCHSGRUPPE 3 UNTER VERWENDUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN FLIEßMITTELGESCHWINDIGKEITEN; B) ERGEBNISSE VERSUCHSGRUPPE 4. IN BEIDEN FÄLLEN BETRUG DIE GRADIENTENLAUFZEIT 90 MINUTEN MIT EINER ENDKONZENTRATION DES ELUENTEN B VON 100% UND DIE SÄULENOFENTEMPERATUR 80°C.....	63
ABBILDUNG 5-19: CHROMATOGRAPHISCHE DARSTELLUNG DER VERDÜNNUNGSVERSUCHE DER VERSUCHSGRUPPE 3 ZUR BESSEREN PEAKTRENNUNG. A) AUSGANGSVERDÜNNUNG VON 1:5 DER PROBEN B085, B095 UND B104; B) EINZELNE VERDÜNNUNGEN DER PROBEN IN FORM EINES OVERLAYS; C) APPLIKATION DER FÜNF PROBEN AUF DIE SÄULE: B080, B082 UND B085 SIND DABEI 1:5 VERDÜNNT, B095 WURDE 1:500 VERDÜNNT UND B104–1:80	63
ABBILDUNG 5-20: VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER VERSUCHSGRUPPE 3 VOR UND NACH DER METHODENENTWICKLUNG MIT ANSCHLIEßENDER OPTIMIERUNG. A) ERGEBNIS DER VORVERSUCHE; B) ERGEBNIS DER OPTIMISIERTEN METHODEN DER VERSUCHSGRUPPE 3 MIT GEZIELTER PROBENVERDÜNNUNG.....	64
ABBILDUNG 5-21: CHROMATOGRAPHISCHE DARSTELLUNG DER VERDÜNNUNGSVERSUCHE DER VERSUCHSGRUPPE 4 ZUR BESSEREN PEAKTRENNUNG. A) EINZELNE VERDÜNNUNGEN DER PROBEN IN FORM EINES OVERLAYS; B) APPLIKATION DER FÜNF PROBEN AUF DIE SÄULE: B080, B082 UND B085 SIND DABEI 1:5 VERDÜNNT, B095 WURDE 1:500 VERDÜNNT UND B104 – 1:80.....	64
ABBILDUNG 5-22: VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER VERSUCHSGRUPPE 4 VOR UND NACH DER METHODENENTWICKLUNG MIT ANSCHLIEßENDER OPTIMIERUNG. A) ERGEBNIS DER VORVERSUCHE; B) ERGEBNIS DER OPTIMISIERTEN METHODEN DER VERSUCHSGRUPPE 4 MIT GEZIELTER PROBENVERDÜNNUNG.....	65
ABBILDUNG 5-23: GRADIENTENOPTIMIERUNG DER VERSUCHSGRUPPE 3. A) AUSGANGSBEDINGUNGEN: GRADIENTENLAUFZEIT 90 MINUTEN, STARTKONZENTRATION DER ELUENTEN B IM GRADIENTEN 2%; C) ELUTIONSVERHALTEN NACH DER OPTIMIERUNG DER GRADIENTEN: GRADIENTENLAUFZEIT 20 MINUTEN, STARTKONZENTRATION DER ELUENTEN B IM	

GRADIENTEN 25%, ENDKONZENTRATION DES ELUENTEN B IM GRADIENTEN 75%. GRADIENTENOPTIMIERUNG DER VERSUCHSGRUPPE 4: B) AUSGANGSBEDINGUNGEN: GRADIENTENLAUFZEIT 90 MINUTEN, STARTKONZENTRATION DER ELUENTEN B IM GRADIENTEN 2%; D) ELUTIONSVERHALTEN NACH DER OPTIMIERUNG DER GRADIENTEN: GRADIENTENLAUFZEIT 22 MINUTEN, STARTKONZENTRATION DER ELUENTEN B IM GRADIENTEN 25%, ENDKONZENTRATION DES ELUENTEN B IM GRADIENTEN 75%.....	66
ABBILDUNG 5-24: LEERLAUF DER VERSUCHSGRUPPE 3 UNTER VERWENDUNG DER FINALEN METHODENEINSTELLUNGEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER UV-AKTIVITÄT DES ELUENTENSYSTEMS	67
ABBILDUNG 5-25: ÜBERSICHT DER ERGEBNISSE DER PEAKWIEDERFINDUNGS-VERSUCHE DER VERSUCHSGRUPPE 3 (A) UND DER VERSUCHSGRUPPE 4 (B). SCHWARZ: ELUTIONSVERLAUF DER MISCHPROBE AUS DEM CLARIFIED-HARVEST-SCHRITT (OHNE B082-PROBE). ROT: ELUTIONSVERLAUF DER MISCHPROBE AUS DEM BULK-SCHRITT	68
ABBILDUNG 5-26: ERGEBNISSE DER REDUZIERENDEN SDS-PAGE DER FRAKTIONSPROBEN DER VERSUCHSGRUPPEN 3 UND 4	70
ABBILDUNG 5-27: ERGEBNISSE DER REDUZIERENDEN SDS-PAGE DER VERSCHIEDENEN VERDÜNNUNGEN DER B080 UND B082 PROBEN	71
ABBILDUNG 5-28: DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE DER VORVERSUCHE ZU GENERISCHEN HPLC-METHODENENTWICKLUNG FÜR pDNA-PROBEN BEI VERWENDUNG DER PLRP-S POLYMER-SÄULE, DES ELUTIONSSYSTEMS 100% ACCN/H ₂ O BEI EINER FLIEßMITTELGESCHWINDIGKEIT VON 0,5 ML/MIN UND DER SÄULENOFENTEMPERATUR VON 30°C. A) GRADIENTENLAUFZEIT 20 MINUTEN, KONZENTRATION DES ELUENTEN B WÄHREND DES GRADIENTEN 10-30%, 5 µL INJEKTION DES ELUENTEN B; B) GRADIENTENLAUFZEIT 20 MINUTEN, KONZENTRATION DES ELUENTEN B WÄHREND DES GRADIENTEN 10-30%, 5 µL INJEKTION DER pDNA-PROBE; C) GRADIENTENLAUFZEIT 20 MINUTEN, KONZENTRATION DES ELUENTEN B WÄHREND DES GRADIENTEN 2-50%, 5 µL INJEKTION DES ELUENTEN B; D) GRADIENTENLAUFZEIT 20 MINUTEN, KONZENTRATION DES ELUENTEN B WÄHREND DES GRADIENTEN 2-50%, 5 µL INJEKTION DER pDNA-PROBE	73
ABBILDUNG 5-29: DRUCKVERLAUF WÄHREND DES GRADIENTEN. GRADIENTENLAUFZEIT 20 MIN, STARTKONZENTRATION DES ELUENTEN B 2%, ENDKONZENTRATION DES ELUENTEN B 50%, ELUENT B ALS 5 µL INJEKTION.....	74

9. Tabellenverzeichnis

TABELLE 3-1: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN/KITS.....	21
TABELLE 3-2: VERWENDETE GERÄTE UND SOFTWARE.....	22
TABELLE 3-3: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN RP-HPLC-SÄULEN	23
TABELLE 3-4: ZUSAMMENFASSEND E DARSTELLUNG DER VERWENDETEN BIOLOGISCHEN PROBEN.....	24
TABELLE 4-1: ÜBERSICHT DER METHODENZUSAMMENSTELLUNGEN/VERSUCHSGRUPPEN FÜR DIE GENERISCHE HPLC- METHODENENTWICKLUNG FÜR PROTEINPROBEN. VG = VERSUCHSGRUPPE	27
TABELLE 4-2: ÜBERSICHT DER PARAMETER FÜR DIE VORVERSUCHE	27
TABELLE 4-3: VERSUCHSMATRIX ZUR METHODENENTWICKLUNG ERSTELLT MITTELS DER DOE-SOFTWARE UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER IM VORFELD AUSGESUCHTEN VARIABLEN PARAMETER	31
TABELLE 4-4: ERMITTLUNG DER VARIABLEN PARAMETER MIT DEM HÖCHSTEN EINFLUSS AUF DIE BEURTEILUNGSPARAMETER	33
TABELLE 4-5: VERSUCHSMATRIX ZUR OPTIMIERUNG DER METHODE	34
TABELLE 4-6: FINALE METHODENPARAMETER, ERMITTELT AUS DEN ERGEBNISSEN DER OPTIMIERUNGSVERSUCHE	35
TABELLE 4-7: VERDÜNNUNG DER EINZELNEN PROTEINPROBEN ZUR OPTIMIERUNG DER AUFLÖSUNG	35
TABELLE 4-8: FINALE PARAMETER FÜR DIE METHODENENTWICKLUNG FÜR PROTEINPROBEN	37
TABELLE 4-9: PROBENVORBEREITUNG UND AUFTRAGSPOSITION FÜR DIE SDS-PAGE ZUR UNTERSUCHUNG DER FRAKTIONSPROBEN DER VERSUCHSGRUPPE 3 UND DER VERSUCHSGRUPPE 4	40
TABELLE 4-10: PROBENVORBEREITUNG UND AUFTRAGSPOSITION FÜR DIE SDS-PAGE ZUR UNTERSUCHUNG DER PROBEN B080 UND B082.....	41
TABELLE 4-11: ÜBERSICHT DER PARAMETER BEI DER TESTUNG DER PLRP-S POLYMER-SÄULE FÜR GENERISCHE HPLC- METHODENENTWICKLUNG FÜR PDNA-PROBEN NACH EMPFEHLUNGEN DES HERSTELLERS	42
TABELLE 5-1: ÜBERSICHT DER GESAMTEN VERSUCHSGRUPPEN ZUR GENERISCHEN HPLC-METHODENENTWICKLUNG FÜR PROTEIN-UND PDNA-PROBEN	43
TABELLE 5-2: ÜBERSICHT DER DATENEINGABE FÜR DIE STATISTISCHE VORHERSAGE ZUR OPTIMIERUNG DER METHODEN DER VERSUCHSGRUPPEN 3 UND 4	59
TABELLE 5-3: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN ABKÜRZUNG FÜR DIE GELBESCHRIFTUNG DER REDUZIERENDEN SDS-PAGE ZUR ANALYSE DER FRAKTIONSPROBEN DER VERSUCHSGRUPPEN 3 UND 4	69
TABELLE 5-4: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN ABKÜRZUNG FÜR DIE GELBESCHRIFTUNG DER REDUZIERENDEN SDS-PAGE ZUR ZUSÄTZLICHEN TESTUNG DER PROBEN B080 UND B082 IN HINBLICK AUF IHRE PROTEINKONZENTRATION UND MOLEKULARGEWICHT	71
TABELLE 12-1: ELUOTROPE REIHE FÜR SOLVENTIEN IN DER FLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE NACH ZUNEHMENDER POLARITÄT GEORDNET [2]	88

10. Literaturverzeichnis

- [1] H. Engelhardt und L. Rohrschneider, *Deutsche chromatographische Grundbegriffe zu IUPAC-Nomenklatur*, Saarbrücken, Münster: Arbeitskreis der Fachgruppe Analytische Chemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker , 1993.
- [2] M. Otto, *Analytische Chemie*, 4. Auflage Hrsg., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011.
- [3] P. D. B. Anspach, *Deutsches Skript zur Vorlesung Protein Purification/Preparative Chromatography*, Hamburg, 2012/2013.
- [4] M. H. Grey, *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*, Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 2008.
- [5] V. R. Meyer, *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004.
- [6] G. Rücker, M. Neugebauer und G. G. Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1988.
- [7] T. P. D. Bradshaw, *Introduction to Peptide and Protein HPLC*, USA: Phenomenex, Inc., 2006.
- [8] W. Decker, A. Pühler und R. Schmidt, *RÖMPP Lexikon*, Biotechnologie und Genetik, 2. Auflage Hrsg., Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1999.
- [9] K. Munk, *Taschenbuch Biologie Mikrobiologie*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2008.
- [10] K. Siebertz, D. Bebbler und T. Hochkirchen, *Statistische Versuchsplanung Design of Experiments (DoE)*, Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 2010.

11. Internetquellen der Abbildungen

- [1ⁱ] [www.hicorpo.com](http://www.hicorpo.com/s_menu/pdf/International%20Catalogue.pdf), Polymer Laboratories B.V, 2004-2005. [Online]. Available: http://www.hicorpo.com/s_menu/pdf/International%20Catalogue.pdf. [Accessed 09 August 2013].
- [2ⁱ] [www.phenomenex.com](http://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Jupiter/C4?returnURL=/Products/Search/HPLC), Phenomenex Inc., [Online]. Available: <http://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Jupiter/C4?returnURL=/Products/Search/HPLC>. [Accessed 09 August 2013].
- [3ⁱ] [www.phenomenex.com](http://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Jupiter/C18?returnURL=/Products/Search/HPLC), Phenomenex Inc., [Online]. Available: <http://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Jupiter/C18?returnURL=/Products/Search/HPLC>. [Accessed 09 August 2013].
- [4ⁱ] www.biotechnology-wiki-thing-of-awesomeness.wikispaces.com, Tangient LLC, [Online]. Available: <http://biotechnology-wiki-thing-of-awesomeness.wikispaces.com/file/view/ch7f1.jpg/200628008/ch7f1.jpg>. [Accessed 09 August 2013].
- [5ⁱ] [www.uni-hamburg.de](http://www.uni-hamburg.de/b-online/library/onlinebio/14_1.jpg), [Online]. Available: http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/library/onlinebio/14_1.jpg. [Zugriff am 09 August 2013].
- [6ⁱ] [www.ufrgs.br](http://www.ufrgs.br/imunovet/molecular_immunology/plasmidtopologies1.jpg), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [Online]. Available: http://www.ufrgs.br/imunovet/molecular_immunology/plasmidtopologies1.jpg[imunovet/molecular_immunology/invitrocellfree_nucleicacid.html](http://www.ufrgs.br/imunovet/molecular_immunology/invitrocellfree_nucleicacid.html). [Accessed 09 August 2013].

12.Anhang

Tabelle 12-1: Eluotrope Reihe für Solventien in der Flüssigkeitschromatographie nach zunehmender Polarität geordnet [2]

Solvens	Polaritätsindex, P'	Elutionsstärke, ϵ^0 (SiO ₂)	UV Durchlässigkeit nm
Fluoralkane	< -2	-0,2	200
Cyclohexan	0,04	0,03	200
n-Hexan	0,1	0,01	195
Tetrachlorkohlenstoff	1,6	0,11	265
iso-Propylether	2,4	0,22	220
Toluol	2,4	0,22	285
Diethylether	2,8	0,38	215
Methylenchlorid	3,1	0,34	230
Tetrahydrofuran	4,0	0,35	210
Chloroform	4,1	0,26	235
Ethanol	4,3	0,68	205
Etylacetat	4,4	0,38	255
Dioxan	4,8	0,49	215
Methanol	5,1	0,73	205
Acetonitril	5,8	0,50	190
Nitromethan	6,0	0,49	380
Wasser	10,2	stark	170

13. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass die vorliegende Bachelorarbeit mit dem im Ausgabeantrag formuliertem Thema ohne fremde Hilfe selbständig 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, den 13.08.2013

Maria Rümke