

**Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg**  
**Fakultät Life Sciences**

*Eignung der Verdrängungschromatographie zur Trennung von bovinen Gammaglobulinaggregaten  
und dem Monomer an zwei Kationenaustauschern*

Bachelorarbeit  
im Studiengang Biotechnologie (B.Sc.)

vorgelegt von

**Inga Steffens**

**Matrikelnummer:** XXXXXXXXXX

Hamburg-Bergedorf  
am 9. März 2020

- 1. Gutachter/in:** Prof. Dr. Birger Anspach (HAW Hamburg)
- 2. Gutachter/in:** Prof. Dr. Gesine Cornelissen (HAW Hamburg)

## **I Danksagung**

Im Rahmen dieser Abschlussarbeit möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich während des Studiums und besonders während der Bachelorarbeitsphase unterstützt haben. Ich danke meinem nun siebenjährigen Sohn, der auf viel Zeit mit mir und viel Aufmerksamkeit von mir verzichten musste und trotzdem oftmals Verständnis dafür gezeigt hat. Meinen Freunden möchte ich danken, dass sie darauf Rücksicht genommen haben, dass ich wenig Zeit für sie hatte. Weiterhin danke ich meinem Freund, meinem Bruder sowie meiner Schwägerin, dass sie mir immer wieder Kraft gegeben und mir Zeit zum Arbeiten verschafft haben. Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken. Ohne ihre regelmäßige Unterstützung mit der Betreuung meines Sohnes wäre mein Studium so nicht möglich gewesen.

## II Inhaltsverzeichnis

I	Danksagung .....	1
II	Inhaltsverzeichnis .....	2
III	Abkürzungsverzeichnis.....	3
IV	Abbildungsverzeichnis.....	4
V	Tabellenverzeichnis .....	5
<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen .....</b>	<b>8</b>
2.1	Immunglobuline.....	8
2.2	Chromatographie .....	11
2.2.1	Größenausschlusschromatographie .....	11
2.2.2	Adsorptionschromatographie.....	12
2.2.3	Frontal- und Verdrängungschromatographie.....	13
2.3	SDS-PAGE .....	14
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
3.1	Chemikalien und Lösungen .....	15
3.2	Geräte.....	17
3.3	Aufreinigung von IgG mit Protein G .....	18
3.4	Trennvorgang mit Kationenaustauschern .....	18
3.5	Analytik mittels Größenausschlusschromatographie.....	20
3.6	Analytik mittels SDS-PAGE .....	20
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>21</b>
4.1	Vorversuche .....	21
4.2	Verdrängungschromatographie.....	29
4.3	Größenausschlusschromatographie .....	33
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>39</b>
VI	Literaturverzeichnis .....	41
VII	Eidesstattliche Erklärung .....	44
VIII	Anhang.....	45

### III Abkürzungsverzeichnis

BSA	Rinderserumalbumin
CV	Säulenvolumen (engl. column volume)
DBC	dynamische Bindungskapazität
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
G0 D	Durchbruch der IgG-Aufreinigung mit Protein G
G0 IgG	Aufgereinigtes IgG mit Protein G
Ig	Immunglobulin
M	Proteinmarker
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
R21	Substanz, die in den SECs der Hauptversuche bei 21 mL erscheint
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	Größenausschlusschromatographie
SG0 Dim.	IgG-Dimere aus der SEC des aufgereinigten IgGs
SG0 Dim. DTT	mit DTT denaturierte IgG-Dimere aus der SEC des aufgereinigten IgGs
SG0 Mono.	IgG-Monomere aus der SEC des aufgereinigten IgGs
TRIS	Tris(hydroxymethyl)methylamin
UV	elektromagnetische Strahlung im ultravioletten Bereich
$\gamma$ -Glob.	Gammaglobulin

## IV **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Aufbau eines Immunglobulins .....	10
Abbildung 2: SEC von Gammaglobulin (15 g/L) mit der Sephacryl-S-200-Säule .....	21
Abbildung 3: SEC von Gammaglobulin (15 g/L) mit der Superdex-200-Säule .....	22
Abbildung 4: SEC mit unbehandeltem bovinem Gammaglobulin (1 g/L).....	22
Abbildung 5: SEC mit BSA (1 g/L) .....	23
Abbildung 6: Aufreinigung von IgG aus Rinderserum mit Protein G .....	24
Abbildung 7: SEC des mit Protein G aufgereinigten bovinen IgGs.....	24
Abbildung 8: Kalibriergerade des bovinen Gammaglobulins .....	26
Abbildung 9: Ionenaustauschchromatographie mit bovinem Gamma-globulin.....	27
Abbildung 10: SDS-PAGE mit 6 %-igem Gel von verschiedenen Gammaglobulinproben ....	29
Abbildung 11: Vier Hauptversuche an der GigaCap-S-Säule im Vergleich.....	30
Abbildung 12: Vier Hauptversuche an der Eshmuno-CPX-Säule im Vergleich.....	31
Abbildung 13: Vergleich der Verdrängungschromatographien vor und nach der Reinigung..	33
Abbildung 14: Vergleich der Monomeranteile an der GigaCap-S-Säule.....	34
Abbildung 15: Vergleich der Monomeranteile an der Eshmuno-CPX-Säule .....	35
Abbildung 16: Wellenlängen-Scan der Substanz R21 von 190 nm bis 600 nm .....	36
Abbildung 17: SDS-PAGE-Gel (12%-ig) zur Untersuchung der Substanz R21.....	37
Abbildung 18: Großaufnahme des SDS-PAGE-Gels aus Abbildung 16 .....	37

## **V Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Inhaltsstoffe, Konzentrationen und pH-Werte der verwendeten Puffer .....	16
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien .....	16
Tabelle 3: Verwendetes Probenmaterial.....	17
Tabelle 4: Verwendete Gerätschaften.....	17
Tabelle 5: Absorptionen des Photometers für die Konzentrationsbestimmung des IgGs .....	25
Tabelle 6: Darstellung der berechneten dynamischen Bindungskapazitäten .....	32

# 1 Einleitung

Immunglobuline (auch Antikörper genannt) gehören zum Immunsystem von Menschen und Tieren. Dort haben sie die Aufgabe, Antigene (Immunreaktion auslösende, meist körperfremde Substanzen) zu erkennen und an sie zu binden, damit weitere Bekämpfungsmaßnahmen des Immunsystems eingeleitet werden können (Reece, et al., 2016). Antikörper binden dabei mit dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an verschiedene Regionen der Antigenoberflächen. Die Bindungsstellen der Antikörper sind sehr spezifisch. Sie können nur an ganz bestimmte Stellen (Epitope) von Antigenen binden. Damit sie dennoch ein großes Spektrum an Bindungsmöglichkeiten abdecken, variieren die Bindungsstellen von Antikörpern stark (Reece, et al., 2016). Durch diese hohe Spezifität und die Möglichkeit, die Bindungseigenschaften der Antikörper molekularbiologisch beeinflussen zu können, haben Antikörper eine große Bedeutung in der Forschung und der klinischen Diagnostik erhalten (GE Healthcare, 2016) (Clark & Pazdernik, 2009). Sie werden bei verschiedenen Diagnoseverfahren (z. B. ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)), zum Nachweis von Proteinen oder in der Molekularbiologie z. B. bei Western Blots eingesetzt (Clark & Pazdernik, 2009). Besonders in der Pharmazie werden monoklonale (identische) Antikörper mit einer hohen Reinheit benötigt (Römling & Müller, 2010).

Die Produktion der Immunglobuline (Ig) besteht aus der Vermehrung in kultivierten Zellen und der anschließenden Aufreinigung (Clark & Pazdernik, 2009). Bei dieser müssen die Zellen, die die Immunglobuline enthalten, zunächst aufgeschlossen werden. Dies geschieht z. B. mit Ultraschallverfahren, einer Rührwerkskugelmühle oder einer French Press (Cornelissen, 2017). Danach müssen Zellrückstände abgetrennt und die Immunglobuline isoliert werden. Zellrückstände und Präzipitate (ausgefallene Moleküle, die einen sichtbaren Niederschlag erzeugen) können durch Zentrifugation entfernt werden (Cornelissen, 2017). Bei bleibender starker Trübung ist es notwendig, zusätzlich einen Filtrationsschritt einzufügen (GE Healthcare, 2016). Weiterhin bedarf es einer Entfernung von Lipoproteinen und anderen fetthaltigen Inhaltsstoffen, da diese chromatographische Säulen verstopfen. Hierzu kann eine Präzipitation (Fällung) mit Dextransulfat oder Polyvinylpyrrolidon (PVP) genutzt werden (Spektrum Akademischer Verlag, 1999). Zusätzlich kann eine (mehrschrittige) Ammoniumsulfat-Fällung für eine weitere Aufreinigung der Antikörper dienen (GE Healthcare, 2016). Die Isolierung der Antikörper kann über die Affinitätschromatographie mit einer Protein-A- oder Protein-G-Säule erfolgen (GE Healthcare, 2016). Diese erzeugen üblicherweise eine hohe Reinheit von über 95 %. Eine Alternative bietet die Aufreinigung mit einem Kationenaustauscher (Römling & Müller, 2010).

Eine Problematik stellt die Aggregation (Verklumpung) von Immunglobulinen dar. Für gewöhnlich besteht ein gewisser Teil einer Antikörper-Lösung nicht aus Monomeren (einzelnen Ig-Einheiten). Es können Dimere (enthalten zwei Ig-Einheiten) und höhere Polymere ausgebildet werden (Stone, et al., 2019). Die Aggregation tritt vermehrt auf, wenn die Antikörperkonzentration höher ist, eine hohe Salzkonzentration vorliegt oder bei Einfrier- und Auftauprozessen (GE Healthcare, 2016). Um eine hohe Reinheit des Monomers zu erhalten, müssen die Aggregate vom Monomer getrennt werden. Die Gelchromatographie bietet hierfür eine effektive Trennung. Diese Methode eignet sich allerdings nur für kleinere Maßstäbe (GE Healthcare, 2016). Aufgrund der Prozesseigenschaften können bei dieser Methode nur geringe Probenmengen aufgetragen werden (maximal 4 % des Säulenvolumens) (Anspach, 2017). Für größer dimensionierte Aufreinigungen wie in der präparativen Chromatographie werden häufig Ionenaustauscher verwendet (GE Healthcare, 2016). Die Nutzung eines Gradienten ermöglicht eine Trennung der Probenbestandteile während der Elution (Verlassen der Säule). Dabei werden die Probenbestandteile in der Reihenfolge ihrer Bindungsstärke an die Säule eluiert (Anspach, 2017).

Bei der Verwendung von Ionenaustauschern gewinnen Aufreinigungsmethoden an Aufmerksamkeit, bei denen das Probenvolumen ein Vielfaches des Säulenvolumens darstellt. Diese Auftragung führt zu Durchbruchkurven. Es handelt sich dabei um die Frontalchromatographie (Anspach, 2017). Für die präparative Chromatographie hat diese Methode den bedeutenden Vorteil, große Probenvolumina nutzen zu können. Wenn verschiedene Probeninhaltsstoffe an die stationäre Phase binden, konkurrieren sie um deren Bindungsstellen. Dabei treten Verdrängungsprozesse auf. Moleküle, mit einer größeren Bindungsaffinität, verdrängen bereits an die stationäre Phase gebundene Moleküle, mit schwächerer Affinität, um deren Plätze einnehmen zu können. Wird dieser Effekt als wesentlicher Trennungsmechanismus genutzt, handelt es sich um Verdrängungschromatographie (Janson & Rydén, 1998).

In einer Studie von Stone et al. (2019) wurde die Trennung von Immunglobulinaggregaten vom Monomer mittels Verdrängungschromatographie untersucht. Die Forscher verwendeten dafür zwei monoklonale Antikörper und verschiedene Kationenaustauscher. Dabei wurden die verschiedenen Eigenschaften der stationären Phasen verglichen sowie der Einfluss von unterschiedlichen pH-Werten, Leitfähigkeiten, Verweilzeiten auf der Säule und unterschiedlichen Probenkonzentrationen (Stone, et al., 2019). Das Trennprinzip dieser Verdrängungschromatographie basiert auf der Eigenschaft, dass die Antikörper-Polymere in Summe eine größere Ladung aufweisen als die Monomere und dadurch eine größere Affinität besitzen an die stationäre

Phase zu binden (Stone, et al., 2019). Somit wirken die Polymere als *Displacer* (Verdränger) und bewirken die Elution des Monomers. Da das Monomer als einzelne Ig-Einheit am schwächsten mit der stationären Phase interagiert, wird dieses als erstes Molekül in einer hohen Reinheit eluiert (Stone, et al., 2019). Das Ziel der Untersuchung von Stone et al. ist es, durch Vergleichsversuche herauszufinden, welche Materialien und Prozessparameter die höchste Reinheit des Antikörper-Monomers ermöglichen.

Diese Arbeit untersucht, ob sich die Verdrängungschromatographie, wie sie in der oben genannten Studie für monoklonale Antikörper angewandt wurde, auch für die Trennung von bovinen (vom Rind stammenden) Gammaglobulin-Aggregaten und dem Monomer eignet. Die Untersuchung soll zeigen, welche Differenzen zwischen dem Einsatz von Gammaglobulin (verschiedene Immunglobulin-Typen) und dem Einsatz von monoklonalen Antikörpern (identische Antikörper eines Typs) auftreten. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, ob sich die Trennmethode von Stone et al. auf ähnliche Verhältnisse übertragen lässt und welche Grenzen es eventuell dabei gibt.

Um die Eigenschaften der verwendeten Prozesse und Materialien aufzuzeigen, werden zunächst in Kapitel 2 die theoretischen Grundlagen erläutert. Im Zusammenhang damit wird anschließend in Kapitel 3 dargelegt, wie die Versuche durchgeführt und mit welchen chromatographischen und nicht-chromatographischen Verfahren diese analysiert wurden. Weiterführend werden in Kapitel 4 die Ergebnisse dargestellt und in Kapitel 5 diskutiert. Abschließend werden in Kapitel 6 neben der Zusammenfassung der wesentlichen Erkenntnisse Vorschläge zur weiteren Untersuchung dieser Thematik gegeben.

## **2 Theoretische Grundlagen**

### **2.1 Immunglobuline**

Das Immunsystem von Wirbeltieren und Menschen ist komplex. Hierbei wird zwischen der zellvermittelten und der humoralen (Antikörper-vermittelten) Immunantwort unterschieden. Bei der humoralen Immunantwort haben Immunglobuline wichtige Funktionen (Reece, et al., 2016). Eine humorale Immunantwort wird eingeleitet, indem eine B-Zelle, die an ein Antigen (Immunreaktion auslösende, meist körperfremde Substanz) gebunden hat, aktiviert wird. Daraufhin vermehrt sich diese B-Zelle und differenziert sich in einem Teil zu Gedächtnis-B-

Zellen und in einem anderen Teil zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Die produzierten Immunglobuline werden von den Plasmazellen sezerniert. Bei Kontakt mit einem Antigen binden die passenden Immunglobuline nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an die Oberfläche des Antigens (Reece, et al., 2016). Antigene werden somit markiert und ihnen wird auf unterschiedliche Weise entgegengewirkt. Die Art der Bekämpfung wird von der Art des Antigens bestimmt. Wenn ein Virus von mehreren Antikörpern markiert wurde, kann das Virus nicht mehr an eine Wirtszelle binden und sich somit nicht vermehren (Neutralisierung). Markierte Bakterien werden durch Phagozytose bekämpft (Opsonisierung). Dabei werden die Bakterien von eigenen Zellen des Immunsystems (Makrophagen und Neutrophilen) verschlungen und zersetzt (Reece, et al., 2016). Die Bindung von Immunglobulinen an die Oberfläche von körperfremden Zellen induziert eine Reaktion des Komplementsystems. Dieses sorgt dafür, dass die Zellmembran der fremden Zelle durchbohrt wird und ein Loch entsteht. Durch eindringendes Wasser schwillt die Zelle an und löst sich auf (Reece, et al., 2016).

Immunglobuline sind Proteine, die aus vier Untereinheiten aufgebaut sind. Dessen räumliche Struktur gleicht der Form eines Y (siehe Abbildung 1). Zwei Proteinketten gehören zu den schweren Ketten (dunkelgrau) und zwei kürzere Ketten gehören zu den leichten Ketten (hellgrau). Der Strang, der keine leichte Kette enthält, stellt die Fc-Region (engl. *fragment, crystallizable*) dar (Clark & Pazdernik, 2009). Die beiden oberen Stränge besitzen an den äußeren Enden die Bindungsstellen für Antigene. Sie werden als Fab-Regionen bezeichnet (engl. *fragment, antigen binding*). Damit die Antikörper ihre Vielfalt an Bindungsmöglichkeiten ausbilden können, sind ihre äußeren Regionen der Fab-Fragmente sehr variabel. Sie variieren jedoch nur von B-Zelle zu B-Zelle. Alle Immunglobuline, die von einer einzelnen B-Zelle stammen, sind identisch (monoklonal). Die vier Proteinketten werden an mehreren Stellen durch Disulfidbrücken zusammengehalten (schwarze Bindungen zwischen den Ketten) (Clark & Pazdernik, 2009).

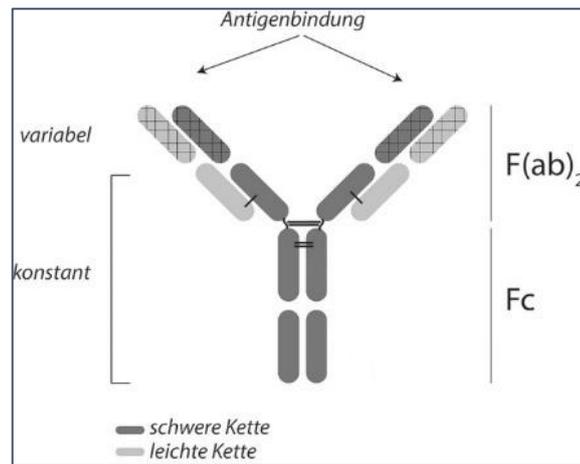


Abbildung 1: Aufbau eines Immunglobulins (Hoffmann & Enk, 2017)

Im menschlichen Körper gibt es fünf verschiedene Klassen von Immunglobulinen. Dazu gehören IgA, IgD, IgE, IgG und IgM (Reece, et al., 2016). Sie differenzieren sich in ihren Funktionen und besitzen verschiedene Strukturen. Dies ist eine Folge der unterschiedlichen Zusammensetzung der schweren Ketten in den konstanten Regionen. IgE, IgD und IgG kommen als Monomere vor. IgA ist ein Dimer (enthält zwei Ig-Einheiten), welcher an den Enden der Fc-Fragmente durch eine zusätzliche Kette gekoppelt ist (Reece, et al., 2016). Weiterhin ist hier eine sekretorische Komponente angesiedelt, die vor enzymatischer Spaltung schützt. IgM hingegen ist ein Pentamer (zusammengesetzt aus fünf Ig-Einheiten). Dieses Immunglobulin wird als erste Klasse nach einem Erstkontakt mit einem Antigen produziert (Reece, et al., 2016). Das am häufigsten auftretende Immunglobulin ist IgG. Im Blutserum ist der Anteil an IgG etwa 75 % (Clark & Pazdernik, 2009). Zusätzlich kommt es in geringeren Mengen in Gewebeflüssigkeiten vor. IgG ist die einzige Klasse der Immunglobuline, die während der Schwangerschaft die Plazentaschranke überwinden kann und ist an vielen immunologischen Prozessen, wie den bereits geschilderten, beteiligt (Reece, et al., 2016).

Insbesondere für medizinische Anwendungen werden monoklonale Antikörper benötigt. Deren Gewinnung erfolgt zunächst durch die Bildung einer Hybridomzelle (Clark & Pazdernik, 2009). Sie entsteht durch die Fusion von einer B-Zelle, die die Gene für den gewünschten Antikörper enthält, mit einer Myelomzelle (Krebszelle), die die Eigenschaft mitbringt *in vitro* (in einer künstlichen Umgebung) beliebig kultiviert werden zu können. Bei der Vermehrung dieser Hybridomzelle produzieren alle Klone dieser ursprünglichen B-Zelle identische, also monoklonale Antikörper (Clark & Pazdernik, 2009).

## 2.2 Chromatographie

Die Chromatographie ist ein Trennverfahren, bei dem eine Probe beim Hindurchfließen einer chromatographischen Säule mit dem Säulenmaterial interagiert. Dabei befindet sich die Probe in einer mobilen Phase, die auf die Säule aufgetragen wird und hindurchfließt. Die stationäre Phase ist fest in der Säule verankert. Beim Hindurchfließen interagiert die Probe in der mobilen Phase mit der stationären Phase und wird von ihr aufgehalten. Entscheidend ist, dass die Affinität der verschiedenen Probenbestandteile, mit der stationären Phase zu reagieren, unterschiedlich stark ist und somit ein Trennvorgang der verschiedenen Inhaltsstoffe stattfindet (Anspach, 2017). Die Entdeckung dieses Verfahrens wird dem Russen Michail Tswett zugesprochen. Ihm gelang es, verschiedene Blattpigmente in einer Säule zu trennen (Weiß, 2001). Die unterschiedlich gefärbten Pigmente interagierten aufgrund ihrer Eigenschaften verschieden mit dem Säulenmaterial. Dabei bildeten sich farbige Ringe, die von außen zu sehen waren. Die Ringe legten zur gleichen Zeit unterschiedlich weite Strecken zurück. Das Verfahren wurde mit der Zeit weiterentwickelt, sodass die Konzentrationen der Moleküle, die die Säule verlassen, mit einem UV-Detektor (misst elektromagnetische Strahlung im ultravioletten Bereich) aufgezeichnet werden (Anspach, 2017). Wird die gemessene Absorption des Detektors gegen die Zeit oder das verbrauchte Volumen aufgetragen, entsteht ein Chromatogramm. Es werden heutzutage zusätzlich andere Parameter gemessen wie z. B. die Leitfähigkeit, der pH-Wert oder der Druck in der Säule. Die in der Säule getrennten Moleküle können aufgefangen und weiterverwendet werden. Durch unterschiedliche Materialien und stationäre Phasen gibt es viele verschiedene Arten der Chromatographie, z. B. die Dünnschicht- oder die Gaschromatographie (Spektrum Akademischer Verlag, 2001).

### 2.2.1 Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie (oder Gelchromatographie, engl. *SEC* für *size exclusion chromatography*) interagieren die Probenbestandteile idealerweise nicht chemisch mit der stationären Phase. Das Prinzip basiert auf einer Trennung der Probenbestandteile nach deren räumlichen Volumina. Die stationäre Phase ist aus Partikeln aufgebaut, die ein Porensystem besitzen. Die Poren sind unterschiedlich groß, sodass nicht alle Moleküle alle Poren passieren können. Je größer ein Molekül ist, in desto weniger Poren kann es gelangen und desto schneller verlässt es die Säule (Janson & Rydén, 1998). Auf dem Chromatogramm erscheint dementsprechend zuerst der Peak von der Probensubstanz mit dem größten räumlichen Volumen. Ein Peak ist ein Ausschlag im Chromatogramm, der mit einem (UV-) Detektor gemessen wurde. Weitere

Peaks folgen mit abnehmendem Volumen der Probeninhaltsstoffe. Dieses Verfahren eignet sich z. B. auch, um Probenbestandteile in einen neuen Puffer zu überführen (Janson & Rydén, 1998). Ein Puffer ist eine wässrige Lösung, die die Eigenschaft hat, Schwankungen im pH-Wert aufzufangen und ihn so konstant zu halten (Spektrum Akademischer Verlag, 2001). Für Proben ist die Lösung in einem Puffer wichtig, damit die Prozessparameter konstant bleiben und sie durch schwankende pH-Werte nicht beschädigt werden. Da die Probenmoleküle ein größeres Volumen besitzen als die Puffersalze, wandern diese bei dem Trennvorgang schneller durch die Säule. Sie gelangen in den Puffer, mit dem zuvor die Säule gespült wurde. Wenn das Eluat aufgefangen wird, können die Probenbestandteile in dem neuen Puffer weiterverwendet werden (Anspach, 2017).

### 2.2.2 Adsorptionschromatographie

Die Adsorptionschromatographie ist gekennzeichnet durch chemische und biochemische Bindungen zwischen den Probenmolekülen und der stationären Phase. Dazu gehören in erster Linie die Ionenchromatographie, die Hydrophobe Interaktionschromatographie sowie die Affinitätschromatographie (Anspach, 2017). Die **Affinitätschromatographie** beschreibt chromatographische Prozesse, bei denen spezifische Interaktionen zwischen biochemischen Molekülen genutzt werden (Janson & Rydén, 1998). An der stationären Phase liegt ein Ligand vor für eine spezifische Bindung mit dem Zielmolekül. Alle weiteren Probeninhaltsstoffe werden nicht zurückgehalten und eluieren direkt nach dem Probenauftrag. Ein Waschschriff mit dem Probenpuffer sorgt dafür, dass unerwünschte Substanzen entfernt werden. Anschließend folgt der Elutionsschritt. Der Elutionspuffer enthält eine Substanz, die eine größere Affinität hat, an die stationäre Phase zu binden als das Zielmolekül, und verdrängt dieses (Anspach, 2017). Bei diesem Verfahren kann eine Aufkonzentrierung stattfinden. Wird das Zielmolekül bei der Elution in einem kleineren Volumen aufgefangen als das der ursprünglichen Probenlösung, liegt es in einer höheren Konzentration vor (Anspach, 2017). Es gibt drei verschiedene Arten der **Ionenchromatographie**, die Ionenaustauscher-, die Ionenausschluss- und die Ionenpaarchromatographie (Weiß, 2001). Im Folgenden wird lediglich auf die Ionenaustauscherchromatographie eingegangen, da die Ionenausschluss- und die Ionenpaarchromatographie für diese Arbeit nicht relevant sind. Das Trennprinzip der Ionenaustauscherchromatographie basiert auf den unterschiedlichen Ladungen der Probenmoleküle. Für Anionen (negative geladene Moleküle) werden Anionenaustauscher eingesetzt, die eine positiv geladene stationäre Phase besitzen, und für Kationen (positiv geladene Moleküle) werden Kationenaustauscher mit einer negativ geladenen

stationären Phase verwendet (Anspach, 2017). Dabei ist die Wahl der mobilen Phase für den Erfolg der Trennung entscheidend. Proteine besitzen durch ihre unterschiedlichen funktionellen Gruppen negative sowie positive Ladungen. Werden alle Ladungen addiert, spricht man von der Nettoladung des Proteins (Anspach, 2017). Diese verändert sich je nach pH-Wert der Umgebung. Besitzt ein Molekül (in einer Lösung) eine Nettoladung von Null, so liegt der pH-Wert der Lösung am isoelektrischen Punkt des Proteins (pI-Wert). Liegt der pH-Wert oberhalb vom pI-Wert des Proteins, so ist die Nettoladung des Proteins negativ, unterhalb des pI-Werts positiv. Da eine geringe Nettoladung für die Bindung an die stationäre Phase ungünstig ist, sollte der pH-Wert der mobilen Phase mindestens eine Einheit vom pI-Wert des Zielproteins entfernt sein. Allerdings ist auch dann keine Adsorption an die stationäre Phase garantiert. Wenn das Protein aus Aminosäuren besteht, die sich nicht protonieren lassen, hat der pH-Wert keinen Einfluss auf die Nettoladung (Anspach, 2017). Die Elution der Probenmoleküle wird durch den Einsatz eines Elutionspuffers bewirkt. Dieser hat entweder einen anderen pH-Wert, der die Ladung der Proteine umkehrt, oder er besitzt eine hohe Salzkonzentration (für gewöhnlich 1 M NaCl) (Anspach, 2017). Der Anteil des Salzes, der die entgegengesetzte Ladung der stationären Phase besitzt, verdrängt die gebundenen Moleküle und lässt diese eluieren. Wird hierbei ein Salzgradient verwendet, der die Salzkonzentration langsam ansteigen lässt, kann während der Elution ein Trennungsprozess stattfinden. Die Moleküle eluieren in der Reihenfolge ihrer Affinität, unter den gegebenen Bedingungen an die stationäre Phase zu binden. Zuerst lösen sich die Moleküle mit einer geringen Bindungsaffinität, danach die mit einer größeren (Anspach, 2017).

### 2.2.3 Frontal- und Verdrängungschromatographie

Wird eine Probe, die ein Vielfaches des Säulenvolumens ausmacht, auf eine chromatographische Säule aufgetragen, führt dies gewöhnlich zu Durchbruchskurven. Während des Probenauftrags bindet die stationäre Phase die Probenmoleküle. Dabei nähert sich die Konzentration des Eluats immer weiter an die ursprüngliche Probenkonzentration an, da immer weniger zusätzliche Moleküle gebunden werden können. Dies kennzeichnet die Frontalchromatographie (Anspach, 2017). Der Begriff entstand durch die Eigenschaft, dass durch die kontinuierliche Auftragung und den unterschiedlichen Interaktionen der verschiedenen Probenbestandteile, unterschiedliche Zusammensetzungen des Eluats, „Fronten“ entstehen (Stone, et al., 2019). Die Verdrängungschromatographie (engl. *displacement chromatography*) ist eine spezielle Form der Frontalchromatographie. Hier wird ein Molekül gezielt als „Verdränger“ (*displacer*)

eingesetzt. Dieses Molekül hat eine größere Affinität, an die stationäre Phase zu binden, als alle anderen Probenbestandteile (Janson & Rydén, 1998). Es verdrängt mit fortlaufendem Prozess die anderen gebundenen Moleküle, da deren Affinität zum Säulenmaterial geringer ist. Diese verlassen die Säule in einer bestimmten Reihenfolge. Zuerst werden die Moleküle eluiert, die keine Affinität haben, an die stationäre Phase zu binden. Weitere Moleküle folgen mit steigender Bindungsaffinität (Janson & Rydén, 1998). Idealerweise ist zuletzt nur der Displacer in der Säule gebunden (wenn eine ausreichende Menge dieses Moleküls vorhanden ist, alle anderen zu verdrängen) (Stone, et al., 2019). Die eluierenden Probenbestandteile können mithilfe eines Fraktionier-Geräts aufgefangen und weiterverwendet werden. Das Gerät füllt kontinuierlich mehrere kleine Probenbehälter nacheinander mit dem Eluat (Spektrum Akademischer Verlag, 1999). So kann das Zielmolekül von den restlichen Probenbestandteilen getrennt werden. Durch den Einsatz eines „Strip-Puffers“ können die auf der Säule verbliebenen Moleküle gelöst und eluiert werden. Oftmals wird für das Auswaschen von in der Säule gebundenen Proben ein Puffer mit einer hohen Salzkonzentration (1 M NaCl) verwendet. Die geladenen Teilchen des Salzes haben für gewöhnlich eine größere Affinität an die gegensätzlich geladene stationäre Phase zu binden (Anspach, 2017).

### 2.3 SDS-PAGE

Der Begriff SDS-PAGE steht für Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Natriumdodecylsulfat engl. *sodium dodecyl sulfate*) (Römpp, 2002). Die Gelelektrophorese ist ein Trennvorgang, bei dem Proteine mithilfe einer angelegten Spannung je nach Ladung und Volumen unterschiedlich weit durch einen Trägerstoff wandern (Polyacrylamidgel). Alle positiv geladenen Moleküle wandern zur negativ geladenen Anode und alle negativ geladenen Moleküle wandern zur positiv geladenen Kathode (Clark & Pazdernik, 2009). Das Gel dient dabei als Sieb, durch das kleinere Moleküle schneller wandern als größere. Wird neben den Proben ein Marker (Proteingemisch dessen Inhaltsstoffe bekannt sind) mit aufgetrennt, können qualitative Aussagen über die Probenbestandteile gemacht werden. Darüber hinaus können den Probenmolekülen ihre Molekülgrößen zugeordnet werden. Dazu werden die Laufstrecken der Probenbanden in das Verhältnis zu denen der Markerproteine mit bekannten Größen gesetzt (Spektrum Akademischer Verlag, 2001).

Bei der SDS-PAGE werden die Probenmoleküle vor der Auftrennung mit Natriumdodecylsulfat gekocht. Dabei denaturieren die Proteine (die räumliche Form der Proteine verändert sich

bis hin zur kompletten Entfaltung des Aminosäuresequenz-Strangs) und das Natriumdodecylsulfat wird gebunden. Im Durchschnitt bindet an jede zweite Aminosäure ein Natriumdodecylsulfat-Molekül (Andrä, 2016). Dieses besitzt eine negative Ladung. Daraus folgt eine negative Ladung der Proteine, deren Ladungsstärken äquivalent zu deren Größen sind. Wenn über diese Proteine eine Spannung angelegt wird, streben alle Proteine in dieselbe Richtung zu wandern, zur Kathode (Andrä, 2016). Die kleineren Moleküle gelangen schneller durch das Polyacrylamidgel als die größeren und es findet ebenfalls eine Trennung bezüglich der Molekülgröße statt. Nach der Trennung werden die Proteine angefärbt. Dies kann mit Coomassie-Blau oder mit der Silberfärbung erfolgen (Clark & Pazdernik, 2009).

### **3 Material und Methoden**

Um die Übertragbarkeit der in der Publikation von Stone et al. angewandten Methode der Verdrängungschromatographie auf bovines Gammaglobulin zu testen, wurden acht Vergleichsversuche damit durchgeführt. An den Versuchsaufbau der Publikation anlehnend, wurden zwei verschiedene Kationenaustauscher-Säulenmaterialien und zwei unterschiedliche Puffersysteme mit jeweils zwei verschiedenen pH-Werten untersucht. Diese wurden in acht Verdrängungschromatographien umgesetzt, deren Eluat für die Analyse aufgefangen wurde. Hierbei wurden drei Proben je Verdrängungsprozess mithilfe einer SEC auf ihr Monomer-Dimer-Verhältnis hin analysiert.

#### **3.1 Chemikalien und Lösungen**

Für die Versuche wurden verschiedene Puffer verwendet. Tabelle 1 beschreibt deren Eigenschaften. Alle Puffer wurden mit demineralisiertem Wasser hergestellt. Nach der Lösung der Salze wurde der gewünschte pH-Wert eingestellt. Die pH-Meter wurden täglich mit einer Zwei-Punkt-Kalibrierung kalibriert. Nach der Einstellung des pH-Werts folgte die Entgasung und die Filtration der Puffer. Hierfür wurden Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm bzw. 0,45 µm verwendet. Die Entgasung der Puffer wurde für jeden Versuchstag wiederholt. In Tabelle 2 werden die verwendeten Chemikalien aufgelistet. Die Probelösungen wurden mit bovinem Gammaglobulin und den verschiedenen Puffern angesetzt. Das Probenmaterial wird in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 1: Inhaltsstoffe, Konzentrationen und pH-Werte der verwendeten Puffer  
 MES ist die Abkürzung für 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (Jahn, 2005), TRIS steht für Tris(hydroxymethyl)methylamin (Spektrum Akademischer Verlag, 1999)

<b>Puffersalz</b>	<b>Konz. des Puffersalzes</b>	<b>Konz. von NaCl</b>	<b>pH-Wert</b>
<b>Glycin</b>	100 mM	0	2,7
<b>MES</b>	50 mM	0	5,0
<b>MES</b>	50 mM	0	5,5
<b>MES (zum Strippen)</b>	50 mM	1 M	5,0
<b>MES (zum Strippen)</b>	50 mM	1 M	5,5
<b>Natrium-Acetat</b>	100 mM	0	5,0
<b>Natrium-Acetat</b>	100 mM	0	4,5
<b>Natrium-Acetat (zum Strippen)</b>	100 mM	1 M	5,0
<b>Natrium-Acetat (zum Strippen)</b>	100 mM	1 M	4,5
<b>Natrium-Phosphat</b>	50 mM	150 mM	7,0
<b>Natrium-Phosphat</b>	20 mM	0	7,0
<b>TRIS</b>	1 M	0	9,0

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Art.-Nr.</b>	<b>Charge</b>	<b>Reinheit</b>
<b>di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG	4984.1	045223953	≥ 99,5 % (p. a.)
<b>Glycine</b>	Merck KGaA	8.16013.1000	S5782713 835	≥ 99,0 %
<b>MES (PUFFERAN®)</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG	4256.2	442190680	≥ 99 %
<b>Natriumacetat Trihydrat</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG	3856.1	255230227	≥ 99 %
<b>Natriumchlorid</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG	3957.1	307258380	≥ 99,5 % (p. a.)
<b>Natriumchlorid</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG	9265.1	123197118	> 99,8 %
<b>TRIS (PUFFERAN®)</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG	4855.1	367260160	≥ 99,9 (p. a.)

Tabelle 3: Verwendetes Probenmaterial

Bezeichnung	Hersteller	Art.-Nr.	Charge	Reinheit
<b>Bovine Serum, Adult</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	B9433 - 500ML	17M479	(steril-filtriert)
<b><math>\gamma</math>-Globulins from bovine blood</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	G5009 - 5G	SLCB1603	$\geq 99 \%$

### 3.2 Geräte

Es wurden mehrere Waagen und zwei pH-Meter für die Herstellung von Puffern und Lösungen verwendet. Für die Probenvorbereitung diente eine Zentrifuge. Die Durchführung der chromatographischen Prozesse fand an verschiedenen Äkta-Anlagen mit zusätzlichen externen Pumpen zum Probenauftrag für die Verdrängungschromatographien statt. Die Steuerung und Aufzeichnung wurden mit der UNICORN-Software realisiert. Weiterhin wurden ein Heizblock und eine Apparatur für die Durchführung der SDS-PAGE genutzt. Absorptionen und Konzentrationsmessungen wurden am Photometer durchgeführt. Die verwendeten Geräte werden in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Gerätschaften

Gerätschaft	Hersteller	Typ	Spezifikationen
<b>Analysenwaage</b>	Sartorius	Entris 224	$\leq 220$ g
<b>Chromatographie-Anlage</b>	GE Healthcare	ÄKTA purifier	-
<b>Chromatographie-Anlage</b>	GE Healthcare	ÄKTA purifier	-
<b>Chromatographie-Anlage</b>	GE Healthcare	ÄKTA explorer	nur Gelchrom.
<b>Heizblock</b>	Eppendorf	Thermomixer	comfort
<b>pH-Meter</b>	Knick	766 Calimatic	pH 4 – 7
<b>pH-Meter</b>	Knick	766 Calimatic	pH 7 – 9
<b>Photometer</b>	GE Healthcare	Ultrospec 2100	pro
<b>Präzisionspumpe</b>	GE Healthcare	P – 500	Probenauftrag
<b>Präzisionswaage</b>	Sartorius	BP 3100 S	$\leq 3100$ g
<b>Präzisionswaage</b>	Sartorius	Entris 323	$\leq 320$ g
<b>SDS-PAGE-Apparatur</b>	Bio-Rad	Mini-PROTEAN	Tetra System
<b>Zentrifuge</b>	Eppendorf	miniSpin	plus

### 3.3 Aufreinigung von IgG mit Protein G

Um die Parameter ähnlich zu halten wie in der Publikation von Stone et al., sollte IgG aus Rinderserum gewonnen werden. Reines IgG ähnelt monoklonalen Antikörpern mehr als Gammaglobulin, bei dem mehrere Immunglobulintypen enthalten sind. Für die Aufreinigung wurde eine Affinitätschromatographie mit Protein G angewandt. Immunglobuline besitzen in den meisten Fällen eine Affinität, an Protein G und Protein A zu binden. Diese Affinität fällt jedoch je nach Spezies und Immunglobulintyp unterschiedlich stark aus. Für bovine Immunglobuline erzielt die Aufreinigung mit Protein G eine größere Ausbeute als mit Protein A (GE Healthcare, 2014). Für die Chromatographie wurde eine „HiTrap Protein G HP“-Säule der Firma GE Healthcare im Maßstab von 1 mL verwendet. Das Säulenmaterial besteht aus Sepharose, welches mit Protein G als Ligand versehen wurde. Vor der chromatografischen Aufreinigung wurden zweimal 1,8 mL des bovines Serums bei 10.000 G zentrifugiert, damit eventuelle Feststoffe entfernt werden. Anschließend wurden beide Probenvolumina zusammengeführt und filtriert. Die Porengröße des Filters betrug 0,45 µm. Der Equilibrierungspuffer, bei dem das IgG an die stationäre Phase binden soll, war ein Phosphatpuffer (20 mM) mit dem pH-Wert 7,0. Mit diesem Puffer wurde für 2 CV (Säulenvolumen, engl. *column volume*) equilibriert. Nach dem Probenauftrag von 2 mL wurde die Säule für 2 CV mit dem Probenpuffer gewaschen. Zum Eluieren des Antikörpers wurde ein Glycinpuffer mit einem pH-Wert von 2,7 verwendet. Dieser wurde 100%-ig für 8 CV eingesetzt. Damit die Antikörper möglichst kurz so einem sauren Milieu ausgesetzt sind, wurden die Eppendorfröhrchen im Fraktionier-Apparat mit einem TRIS-Puffer versehen. Da dieser einen pH-Wert von 9,0 hatte, wurde der saure pH-Wert vom Glycinpuffer neutralisiert. Die Elutionsfraktionen mit dem aufgereinigten IgG wurden zusammengeführt und mit einer SEC die Reinheit untersucht. Zusätzlich wurde die Konzentration des IgGs mit einem Photometer mithilfe einer Kalibriergerade gemessen. Da kein reines IgG als Standard vorhanden war, wurde hierfür das Gammaglobulin verwendet, da die größte Komponente des Gammaglobulins IgG ist (Clark & Pazdernik, 2009).

### 3.4 Trennvorgang mit Kationenaustauschern

Für die Durchführung der Trennprozesse der Antikörperaggregate vom Monomer wurden zwei Kationenaustauscher-Säulen ausgewählt. Diese wurden beide ebenfalls in der Publikation von Stone et al. untersucht und bieten so eine Vergleichsmöglichkeit. Es handelt sich dabei um zwei starke Kationenaustauscher mit unterschiedlichem Säulenmaterial. Die erste Säule ist eine

„TOYOPEARL GigaCap S-650M“ (1 mL) der Firma Tosoh Bioscience. Ihr Säulenmaterial besteht aus hydroxyliertem Methacrylpolymer. Sulfopropyl stellt die funktionelle Gruppe dar, die an das Trägermaterial gebunden ist. Das Säulenmaterial liegt in Form von Partikeln vor, die einen durchschnittlichen Durchmesser von 75  $\mu\text{m}$  haben. Die Partikel haben Poren, die hauptsächlich Größen  $\leq 100$  nm besitzen. Die dynamische Bindungskapazität dieses Materials für menschliches IgG liegt bei 150 mg / mL Säulenmaterial (Tosoh Bioscience GmbH, 2020). Die zweite Säule ist eine selbstgepackte Säule mit dem Säulenmaterial „Eshmuno® CPX media“ der Firma Merck Millipore. Das Säulenvolumen kann aufgrund der eigenständigen Packung nicht angegeben werden. Es beträgt schätzungsweise mind. 1 mL. Die funktionelle Gruppe ist hier Sulfoisobutyl. Im Gegensatz zur ersten Säule besteht das Trägermaterial aus unelastischem hydrophilem Polyvinylether-Polymer. Dessen Partikelgröße beträgt durchschnittlich 50  $\mu\text{m}$ . Die dynamische Bindungskapazität für IgG mit unterschiedlichen IgG-Klassen liegt bei 120 mg / mL Säulenmaterial (Merck KGaA, 2013). Für die Verdrängungschromatographien konnte nicht genug Probe in dem gegebenen Zeitrahmen mit der Aufreinigung von reinem IgG mittels Protein G gewonnen werden (achtmal 200 mL). Es wurden Proben mit bovinem Gammaglobulin und verschiedenen Puffern in einer Konzentration von 1 g/L angesetzt. Da diese Probe bereits einen Anteil an Dimeren von 9 % hatte, wurden keine Schritte zur weiteren Aggregation vorgenommen. Dieser Anteil entspricht einem realistischen Anteil in einem präparativen Downstream-Verfahren für IgG-Aufreinigung (Anspach, 2019). Der Acetatpuffer wurde mit den pH-Werten 4,5 und 5,0 angesetzt, der MES-Puffer mit den pH-Werten 5,0 und 5,5. Jede dieser vier Lösungen wurde auf beide Kationenaustauscher aufgetragen, sodass acht Trennungsprozesse untersucht wurden. Bei den Verdrängungschromatographien wurde ein Probenvolumen von 140 mL mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Anschließend folgte ein Waschschrift mit dem Probenpuffer für fünf Minuten. Die Elution wurde mit dem Einsatz des Strip-Puffers ausgeführt, welcher dem Probenpuffer mit zusätzlich 1 M NaCl entsprach. Der Elutionsschritt dauerte fünf Minuten. Um die Probenbestandteile weiter analysieren zu können, wurden während des Verdrängungsprozesses Fraktionen mit einem Volumen von 5 mL gesammelt. Während der Elution wurde mit 1 mL fraktioniert. Vor und nach jeder Verdrängungschromatographie wurde ein Leergradient mit dem Strip-Puffer auf die Säule aufgetragen. Vor den Trennungen diente dies als zusätzlicher Reinigungsschritt, um sicherzugehen, dass die Prozesse einen möglichst geringen Einfluss durch Verunreinigungen erhalten. Nach den Trennungen dienten die Chromatogramme der Leergradienten dazu, zu beurteilen, ob im Vergleich zum vorherigen Leergradient ein Qualitätsverlust stattgefunden hat.

### 3.5 Analytik mittels Größenausschlusschromatographie

Die Verdrängungschromatographien wurden mit der Größenausschlusschromatographie analysiert, da bei diesem Prozess die Aufteilung von Dimer und Monomer quantitativ ermittelt werden kann. Die räumlich voluminöseren Polymere eluieren aufgrund der Prozesseigenschaften früher als die räumlich kleineren Monomere (s.o.). Das mit Protein G aufgereinigte IgG wurde ebenfalls mit der Gelchromatographie analysiert. Es wurde eine „Superdex 200 HR 10/30“-Säule der Firma GE Healthcare verwendet. Sie hat ein Säulenvolumen von 24 mL. Das Säulenmaterial besteht aus kreuzvernetzter Agarose und Dextran. Dieses Material liegt in einer Partikelgröße von 13 µm vor und trennt Moleküle in einem Größenbereich von 10 bis 600 kDa (GE Healthcare, 1998). Da IgG ein Molekulargewicht von 150 kDa besitzt und dessen Dimere folglich 300 kDa, ist die Säule für die Analysen geeignet (GE Healthcare, 2016). Betrieben wurde die Säule mit einer Flussrate von 0,4 mL/min (Analysen der acht Hauptversuche) bzw. 0,5 mL/min. Die Analysen wurden mit einem Phosphatpuffer (50 mM + 150 mM NaCl) mit einem pH-Wert von 7,0 durchgeführt. Vor jedem Trennprozess wurde die Säule so lange mit diesem Puffer equilibriert, bis sich im Chromatogramm eine konsequente gerade Linie der UV-Absorption bildete. Nach dem Probenauftrag von 800 µL (Analysen der Hauptversuche) über eine Probenschleife wurde mit 1,2 CV des oben genannten Puffers eluiert.

### 3.6 Analytik mittels SDS-PAGE

Neben den chromatographischen Analysen wurden zwei Gelelektrophoresen durchgeführt. Die erste dient zur Analyse des Probenmaterials sowie der Aufreinigung des IgGs aus dem Rinder Serum. Die zweite wurde zur Analyse einer unbekannt Substanz herangezogen, die in den SECs der Hauptversuche auftaucht. Da ein gewöhnliches zwölfprozentiges Gel Moleküle im Bereich von 12 kDa bis 60 kDa auftrennt, wurde für die Proben, in denen IgG enthalten ist, ein sechsprozentiges Gel verwendet. Dessen Trennbereich liegt bei 50 kDa bis 200 kDa (Carl Roth GmbH & Co. KG, 2016). Für die Trennvorgänge wurde eine Spannung von 200 V angelegt. Die Prozesse wurden gestoppt, sobald die Laufbanden den unteren Rand der Gele erreicht hatten. Anschließend wurden sie mit der Coomassie-Färbung über Nacht oder mind. zwei Stunden lang gefärbt. Entfärbt wurden sie zweimal in 25%-iger Ethanollösung für 30 Minuten. Zuletzt wurden die Gele eingeschweißt, um sie vor der Austrocknung zu bewahren.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vorversuche

Neben der Superdex-200-Säule stand eine „Sephacryl S-200 HR“-Säule (von GE Healthcare) zur Verfügung. Beide wurden getestet, um herauszufinden, welche von ihnen geeigneter für die Analysen ist. Abbildung 2 zeigt die SEC mit der Sephacryl-Säule und Abbildung 3 die SEC mit der Superdex-Säule. Es wurden mit beiden Säulen dieselbe Probe mit Gammaglobulin analysiert. Da der obere Größenausschluss der Superdex-Säule in einem größeren Molekulargewichtsbereich liegt als bei der Sephacryl-Säule (die Auftrennungsfähigkeit beginnt weiter links im Chromatogramm), erreicht sie eine effektivere Trennung der Di- und Polymere. Dementsprechend wurde sie für die weiteren Analysen verwendet.

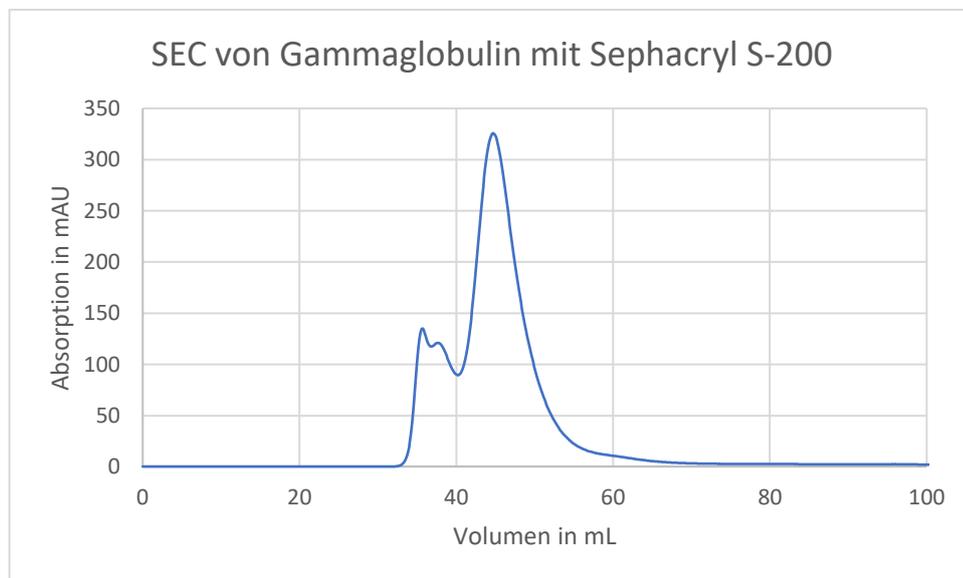


Abbildung 2: SEC von Gammaglobulin (15 g/L) mit der Sephacryl-S-200-Säule, die Flussrate betrug 0,5 mL/min

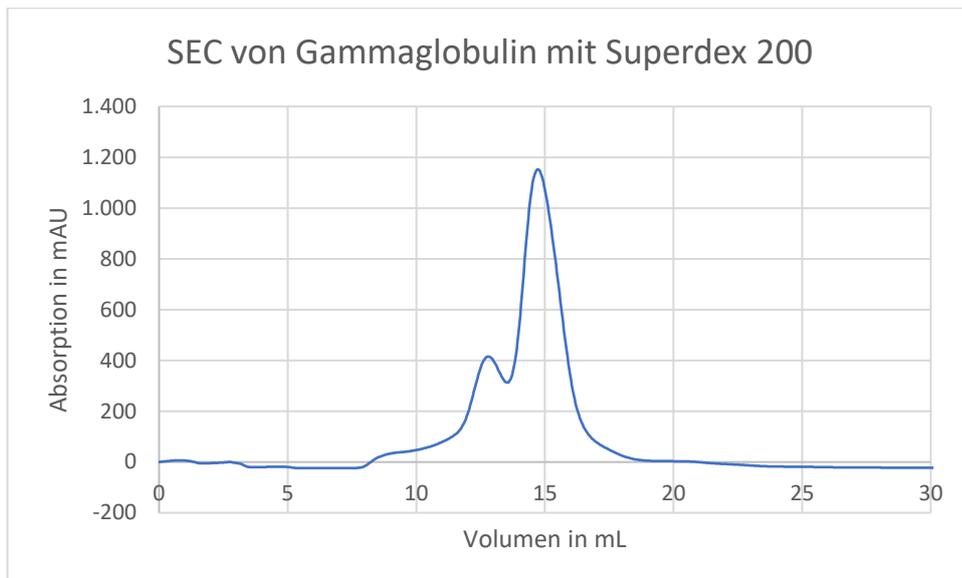


Abbildung 3: SEC von Gammaglobulin (15 g/L) mit der Superdex-200-Säule, die Flussrate betrug 0,4 mL/min

Um den Monomeranteil der unbehandelten Gammaglobulin-Probe zu ermitteln, wurde sie auf die SEC-Säule aufgetragen (siehe Abbildung 4) und das Chromatogramm mithilfe der UNICORN-Software ausgewertet. Dazu wurden die Absorptions-Peaks des UV-Detektors integriert und die Flächen unter dem Monomer- und dem Dimer-Peak ins Verhältnis gesetzt. Das Dimer eluiert bei etwa 12,8 mL und das Monomer bei etwa 14,8 mL. Es wurde ein Monomeranteil von 91 % ermittelt.

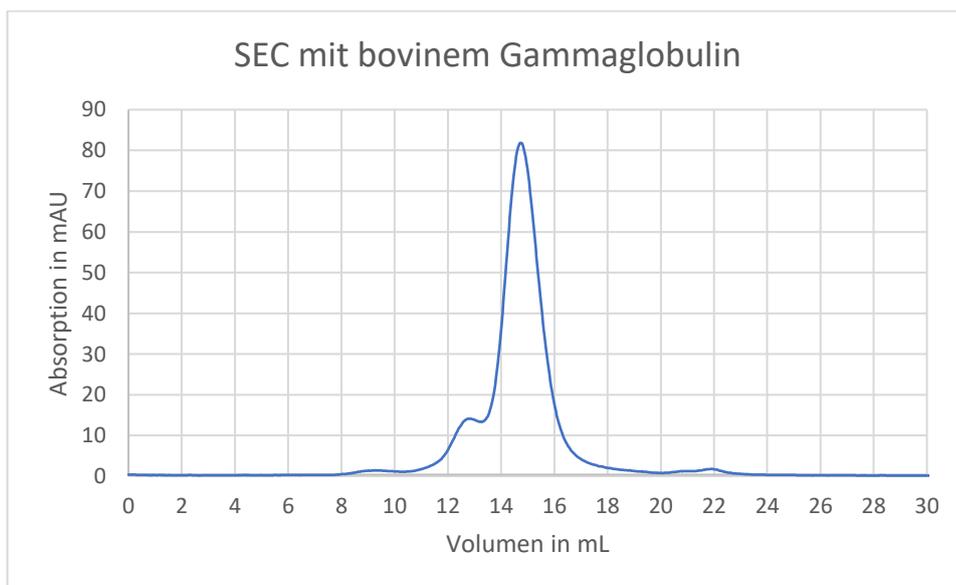


Abbildung 4: SEC mit unbehandeltem bovinem Gammaglobulin (1 g/L)

Ergänzend wurde BSA (Rinderserumalbumin) mit der SEC analysiert (Spektrum Akademischer Verlag, 1999). Das dient dazu die Retentionszeit (Verweilzeit auf der Säule bis zur Elution) dieses Proteins zu ermitteln und dies so in den folgenden Analysen einordnen zu können. Abbildung 5 zeigt die SEC mit BSA. Die Retentionszeit liegt bei 15,8 mL.

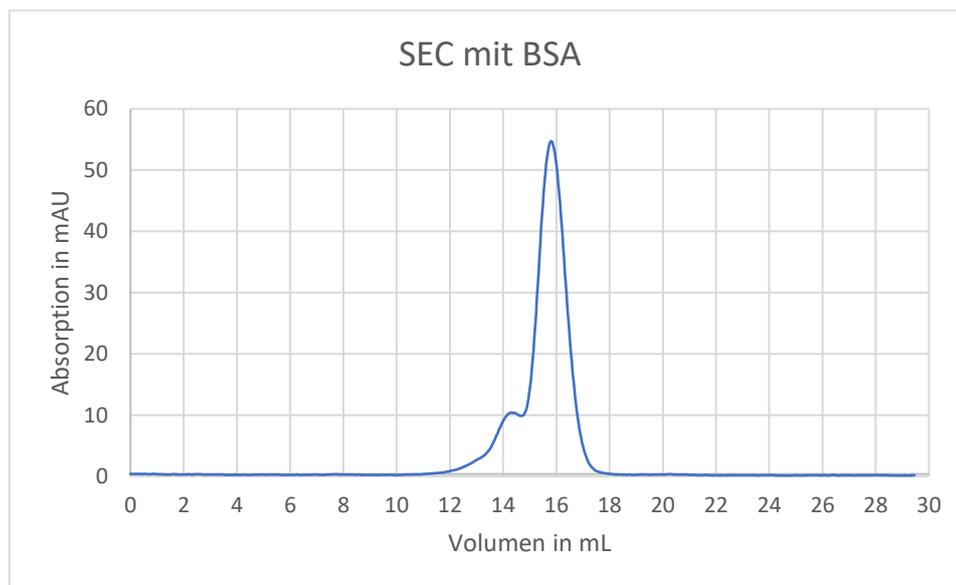


Abbildung 5: SEC mit BSA (1 g/L)

Die Aufreinigung von IgG mit Protein G wird in Abbildung 6 dargestellt. Das Probenvolumen des Rinderserums betrug 2 mL. Es ist erkennbar, dass ein Großteil der Seruminhaltsstoffe nicht an die Säule bindet und direkt eluiert. Beim Einsatz des Strip-Puffers eluiert das gebundene IgG in einer etwas geringeren Konzentration als die durchgebrochenen Inhaltsstoffe.

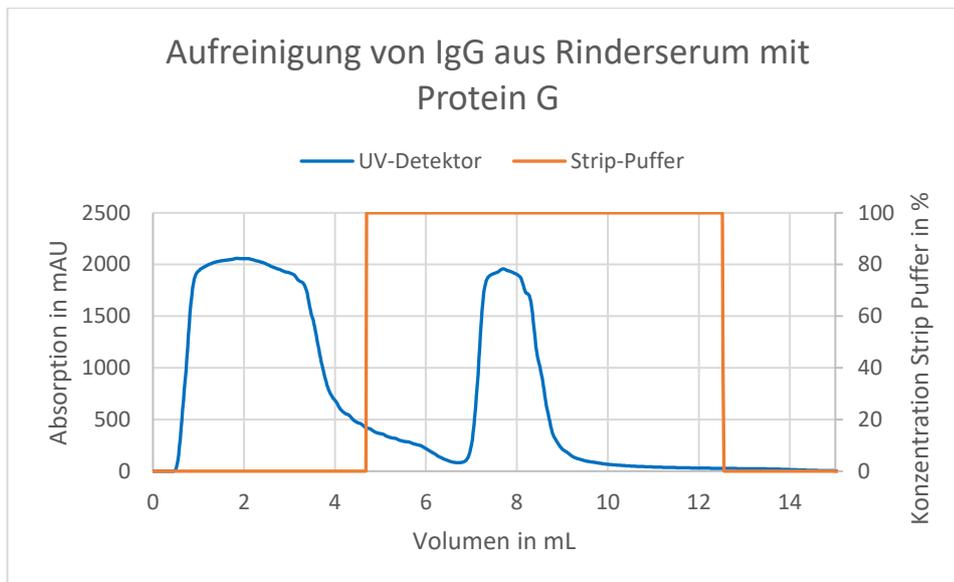


Abbildung 6: Aufreinigung von IgG aus Rinderserum mittels einer Affinitätschromatographie mit Protein G

Das aufgefangene IgG wurde mit einer SEC analysiert. Das Chromatogramm (Abbildung 7) zeigt, dass nicht nur reine IgG-Monomere gewonnen wurden. Da der zusätzliche Peak vor dem Hauptpeak der IgG-Monomere erscheint, können dies Dimere sein. Das Verhältnis zum Monomer-Peak stützt diese Vermutung, da das oben ermittelte Verhältnis des Gammaglobulins ähnlich ist.

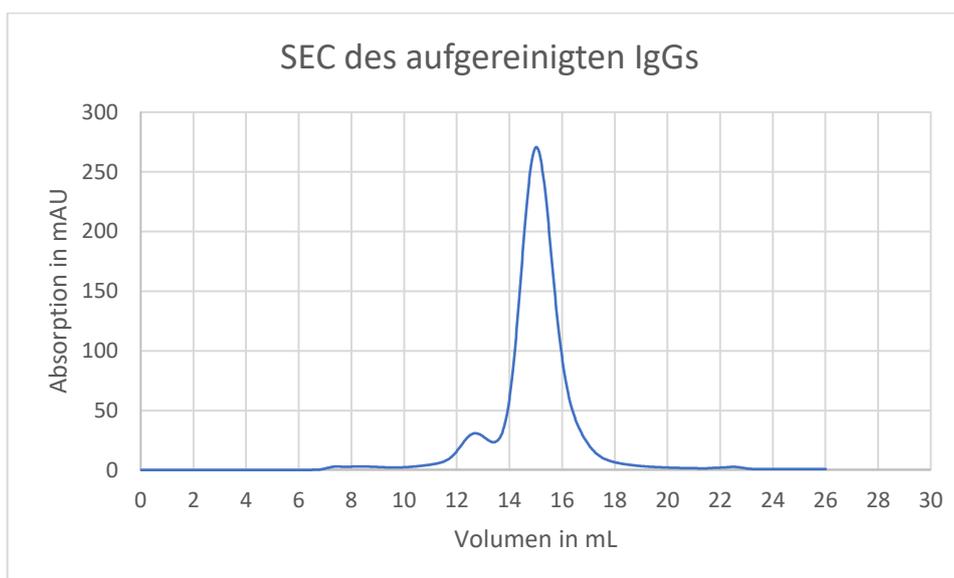


Abbildung 7: SEC des mit Protein G aufgereinigten bovines IgGs

Weiterhin sollte die Konzentration des aufgereinigten IgGs gemessen werden. Dazu wurden mit dem Photometer die Absorptionen von dem Probenpuffer (Acetatpuffer) als Leerwert, drei Standardverdünnungen (0,1; 0,2; 0,5 g/L) und die IgG-Probe (20-fach verdünnt) mit Dreifachbestimmung gemessen. Tabelle 5 zeigt die gemessenen Werte. Die daraus erstellte Kalibriergerade des bovinen Gammaglobulins wird in Abbildung 8 dargestellt. Für den Absorptionswert der Probe wurde das arithmetische Mittel der Dreifachbestimmung berechnet (Formel [ 1 ]). Der Durchschnitt wurde in die Kalibriergerade eingesetzt (Formel [ 2 ]), um die Konzentration zu berechnen. Zuletzt wurde der Verdünnungsfaktor in Formel [ 3 ] angepasst. Die gemessene Konzentration des aufgereinigten IgGs betrug 5,7 g/L.

*Tabelle 5: Absorptionen des Photometers für die Konzentrationsbestimmung des IgGs*

<b>Lösung</b>	<b>Absorption in AU</b>
<b>Leerwert</b>	0,000
<b>Standard 0,1 g/L</b>	0,307
<b>Standard 0,2 g/L</b>	0,356
<b>Standard 0,5 g/L</b>	0,713
<b>Probe</b>	0,458
<b>Probe</b>	0,429
<b>Probe</b>	0,354

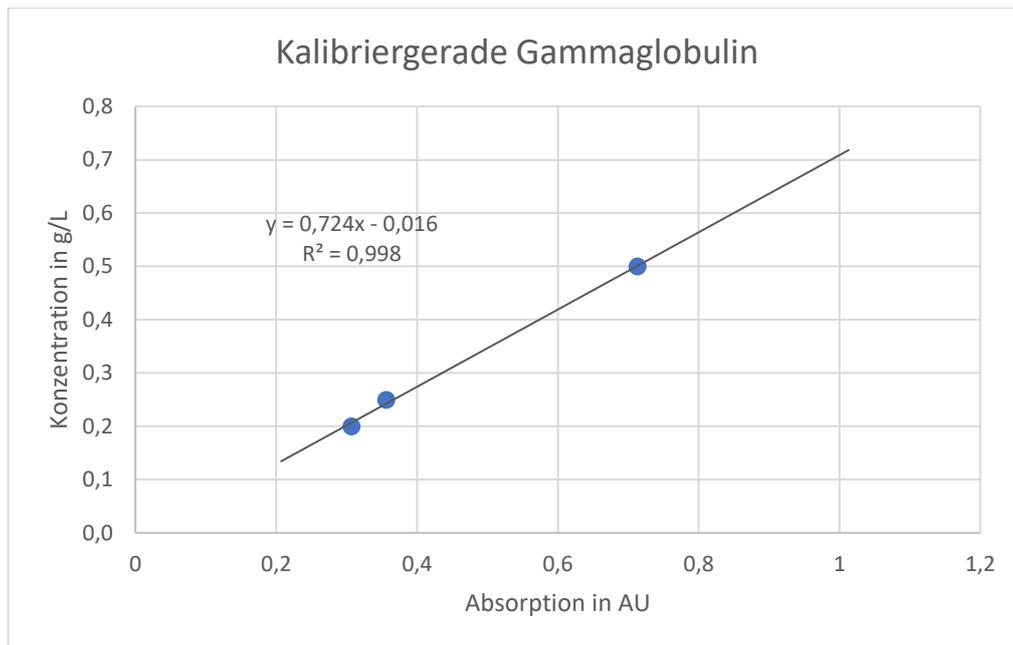


Abbildung 8: Kalibriergerade des bovinen Gammaglobulins

Berechnung des arithmetischen Mittels der Probenabsorption:

$$\frac{(0,458 \text{ g/L} + 0,429 \text{ g/L} + 0,354 \text{ g/L})}{3} = 0,414 \text{ g/L} \quad [1]$$

Berechnung der Konzentration mithilfe der Kalibriergerade:

$$0,724 \cdot 0,414 \text{ g/L} - 0,016 = 0,284 \text{ g/L} \quad [2]$$

Rückrechnung der Verdünnung:

$$0,284 \text{ g/L} \cdot 20 = 5,7 \text{ g/L} \quad [3]$$

Zusätzlich wurde eine Ionenchromatographie in Form einer Zonenchromatographie durchgeführt, um die prinzipielle Funktionalität des Prozesses mit bovinem Gammaglobulin zu prüfen. Die Probe wurde in einem Acetatpuffer (pH-Wert 5,0) gelöst und hatte eine Konzentration von 5 g/L. Davon wurden 2 mL über eine Probenschleife auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde für 1,3 CV (1,3 mL) mit dem Probenpuffer gespült und danach mit dem Strip-Puffer (Probenpuffer + 1 M NaCl) eluiert. Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, hat sich ein Teil der Probe nicht an die Säule gebunden und ist direkt nach dem Probenauftrag eluiert. Die Konzentration der gebundenen Probenmoleküle, die durch den Strip-Puffer eluiert wurden, betrug jedoch mehr

als das Dreifache. Das zeigt, dass die Immunglobuline prinzipiell an das Säulenmaterial binden und der Elutions-Puffer sie eluieren lässt.

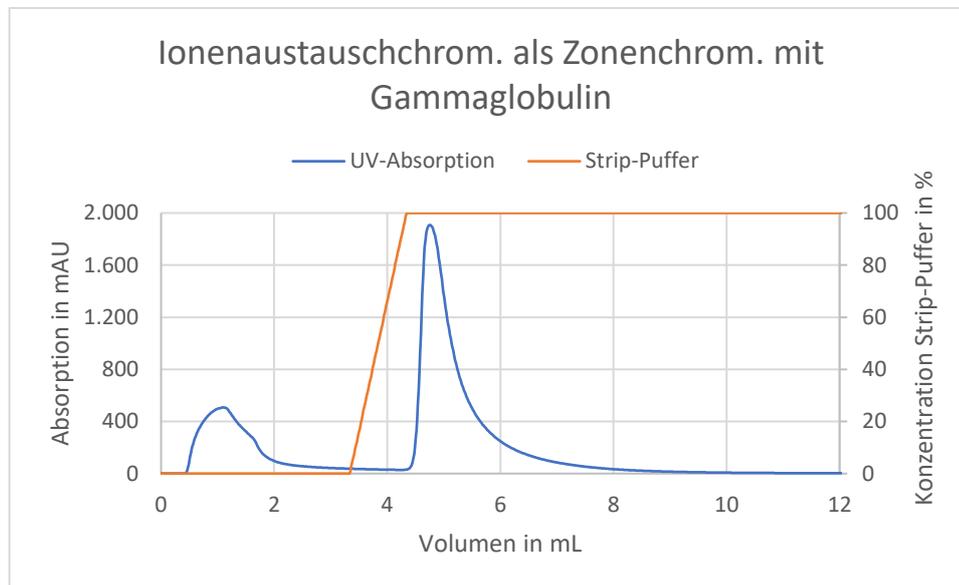


Abbildung 9: Ionenaustauschchromatographie als Zonenchromatographie mit bovinem Gammaglobulin

Des Weiteren wurden verschiedene Proben auf ein 6 %-iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Für die Bezeichnungen gelten folgende Definitionen: M = Proteinmarker, G0 D = Durchbruch der IgG-Aufreinigung mit Protein G, G0 IgG = Aufgereinigtes IgG mit Protein G,  $\gamma$ -Glob. = Gammaglobulin, SG0 Mono. = IgG-Monomere aus der SEC des aufgereinigten IgGs, Serum = Rinderserum, SG0 Dim. = IgG-Dimere aus der SEC des aufgereinigten IgGs, SG0 Dim. DTT = mit DTT denaturierte IgG-Dimere aus der SEC des aufgereinigten IgGs. Der Marker wurde eigens mit den Proteinen Ovalbumin (43 kDa), BSA (66 kDa), Gammaglobulin (150 kDa), Katalase (240 kDa) und Ferritin (450 kDa) hergestellt (Worthington Biochemical Corporation, 2019) (Worthington Biochemical Corporation, 2019) (GE Healthcare, 2016) (Worthington Biochemical Corporation, 2019) (Bio-Rad Laboratories, 2020). Im Marker sind nicht alle Banden der Markerproteine erkennbar. Grund hierfür ist einerseits das Durchlaufen der ersten Bande (des Ovalbumins), damit im oberen Molekulargewichtsbereich eine effektivere Auftrennung erzielt wird. Andererseits teilt sich das Ferritin unter den denaturierenden Bedingungen des Probenpuffers in mehrere Aminosäuresequenzen. Diese befinden sich vermutlich in den blässeren Banden im Marker. Am oberen Ende des Gels sind bei den Markern die Banden der Katalase erkennbar. Da der Trennbereich des Gels lediglich bis 200 kDa reicht und Katalase

ein Molekulargewicht von 240 kDa besitzt, kann es kaum in das Gel gelangen (Carl Roth GmbH & Co. KG, 2016) (Worthington Biochemical Corporation, 2019). Die Denaturierung der IgG-Dimere mit DTT (Dithiothreitol) dient zur Kontrolle, ob die Disulfidbrücken der Immunglobuline korrekt aufgespalten werden (Spektrum Akademischer Verlag, 1999). Da die Probenbehandlung mit SDS die Proteine denaturiert, aber nicht ihre Disulfidbrücken spaltet, ist ein Unterschied zwischen der DTT-behandelten Probe und der unbehandelten zu erwarten. Bei der DTT-Probe sollen sich die leichten und die schweren Ketten der Immunglobuline durch die Aufspaltung der Disulfidbrücken trennen (Clark & Pazdernik, 2009). In Abbildung 10 ist zu erkennen, dass sich das mit DTT denaturierte IgG in die deutlich kleineren leichten und schweren Ketten auftrennt, da die Bande(n) deutlich weiter unten, im niedrigeren Molekulargewichtsbereich, erscheinen als die einzelnen Ig-Einheiten. Bei den DTT-behandelten Dimeren ist lediglich eine Bande gut erkennbar. Es lässt sich jedoch eine zweite Bande ein Stück über dieser erahnen. Die besser sichtbare Bande entspricht folglich den leichten Ketten der Immunglobuline und die schwer erkennbare den schweren Ketten. Durch die Hauptbande des IgG-Monomers (SG0 Mono.) ist erkennbar, auf welcher Höhe die Banden des IgGs zu finden sind. In allen Proben außer den DTT-behandelten Dimeren ist IgG enthalten. Auch im Marker ist diese Bande gut erkennbar. Weiterhin ist zu sehen, dass der Durchbruch der Protein-G-Aufreinigung (G0 D) die gleichen Bestandteile enthält wie das Serum, lediglich die Bande des IgGs ist weniger überladen, was zu erwarten war. Diese ist im aufgereinigten IgG (G0 IgG) als Hauptbestandteil wiederzufinden. Das Gammaglobulin daneben weist ein ähnliches Muster auf. Hier fehlt allerdings im Gegensatz zum aufgereinigten IgG eine Bande auf mittlerer Höhe. Es wird vermutet, dass es sich dabei um BSA handelt. Dieses Protein ist im Marker enthalten. Als Bestätigung befindet sich auf gleicher Höhe eine gut sichtbare (überladene) Bande im Marker, die vermutlich das BSA enthält. Dass sich im G0 Durchbruch und beim Serum ebenfalls stark überladene Banden auf dieser Höhe befinden, unterstützt diese These. BSA ist das meist vorhandene Protein im Rinderserum (Worthington Biochemical Corporation, 2019). Es ist davon auszugehen, dass es im Gammaglobulin fehlt, da dieses mittels Gelelektrophorese aufgereinigt wurde (Merck KGaA, 2020). Wie in Abbildung 10 zu sehen, liegt die Bande im Verhältnis zum Gel weit entfernt von den Immunglobulinen.

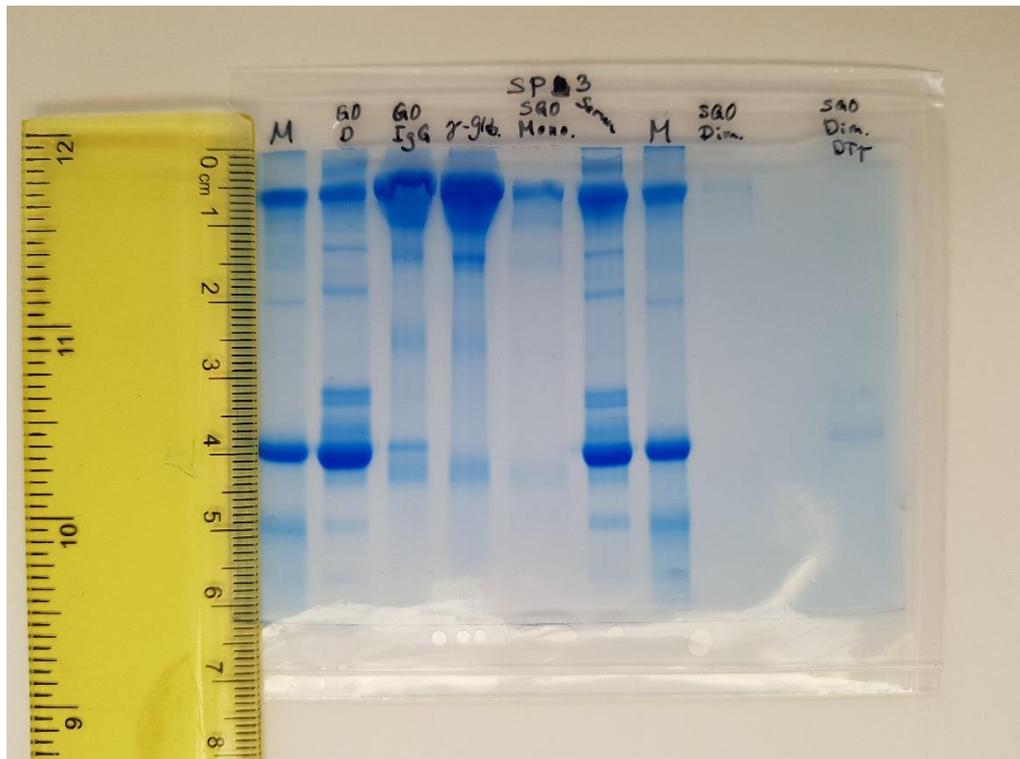


Abbildung 10: SDS-PAGE mit 6 %-igem Gel von verschiedenen IgG- bzw. Gammaglobulinproben (M = Proteinmarker, G0 D = Durchbruch der IgG-Aufreinigung mit Protein G, G0 IgG = Aufgereinigtes IgG mit Protein G,  $\gamma$ -Glob. = Gammaglobulin, SG0 Mono. = IgG-Monomere aus der SEC des aufgereinigten IgGs, Serum = Rinderserum, SG0 Dim. = IgG-Dimere aus der SEC des aufgereinigten IgGs, SG0 Dim. DTT = mit DTT denaturierte IgG-Dimere aus der SEC des aufgereinigten IgGs)

## 4.2 Verdrängungschromatographie

Die acht Hauptversuche wurden mit vier verschiedenen Probenpuffern und zwei starken Kationenaustauscher-Säulen durchgeführt. In Abbildung 11 werden die vier Versuche an der „GigaCap S 650M“-Säule dargestellt. Zwei der Absorptionsverläufe wurden mit einem konstanten Faktor angepasst, da diese Verdrängungschromatographien an einer anderen Anlage mit einer unterschiedlichen Messzelle der UV-Absorption betrieben wurden als die restlichen Hauptversuche. Es handelt sich dabei um die beiden Chromatographien mit dem Acetat-Puffer (gelb und grün). Da der benutzte Detektor dieser Prozesse eine Messstrecke von 5 mm hat und die ansonsten verwendete Messstrecke 2 mm beträgt, wurden die Absorptionen um den Faktor 2,5 angepasst. Bei der GigaCap-S-Säule ist eine Variation in den Verläufen zu sehen. Besonders der Versuch mit dem MES-Puffer bei pH 5,0 (rot) erreicht eine fast doppelt so große Durchbruchkonzentration wie die anderen drei Verläufe. Der Verlauf mit dem Acetat-Puffer bei pH 4,5 (gelb) weist mit Abstand den spätesten Durchbruchverlauf auf. Er beginnt ca. 70 mL nach den ersten Durchbrüchen. Die restlichen beiden Verläufe (blau und grün) zeigen im Verhältnis dazu einen ähnlichen Verlauf. Ihre Durchbruchkurven beginnen direkt nach dem

Beginn des Probenauftrags. Die vier Versuche an der „Eshmuno CPX“-Säule werden in der Abbildung 12 dargestellt. Hier weisen die vier Verläufe ähnlichere Verlaufsformen auf. Die Absorptionen entsprechen einem mehr linearen Anstieg als die der GigaCap-Säule. Dabei variieren die Startpunkte der Durchbruchskurven um maximal 10 mL. Das zeigt ebenfalls geringere Differenzen dieser Vergleichsversuche.

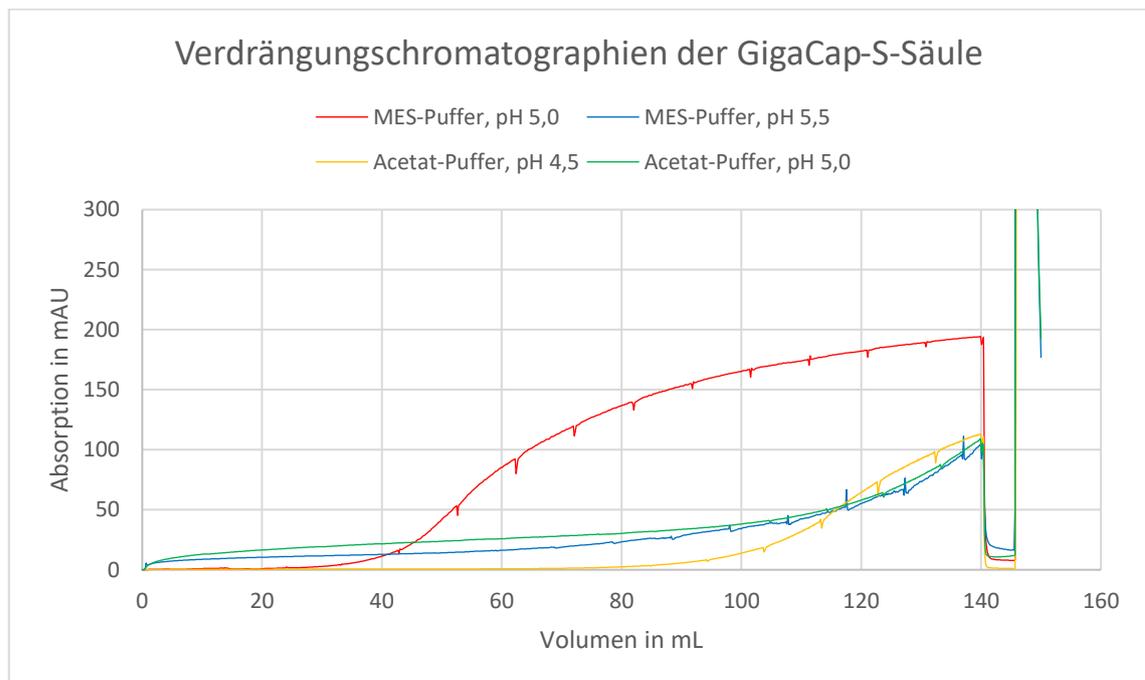


Abbildung 11: Vier Hauptversuche an der GigaCap-S-Säule im Vergleich  
 Die Proben enthielten bovines Gammaglobulin in einer Konzentration von 1 g/L, gelöst in unterschiedlichen Puffer-systemen

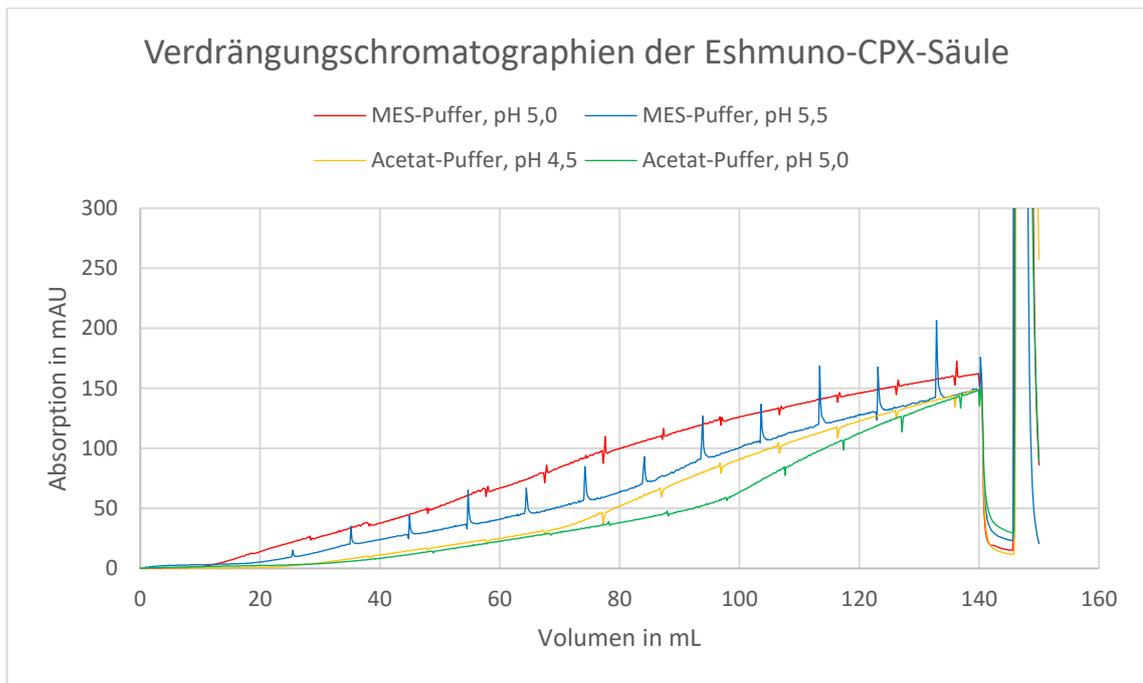


Abbildung 12: Vier Hauptversuche an der Eshmuno-CPX-Säule im Vergleich  
Die Proben enthielten bovines Gammaglobulin in einer Konzentration von 1 g/L, gelöst in unterschiedlichen Puffersystemen

Um mehr über die Eigenschaften der Trennprozesse zu erfahren, wurden die dynamischen Bindungskapazitäten (DBC, engl. *dynamic binding capacity*) der Durchbruchkurven ermittelt. Dazu wurde der maximale Absorptionsschritt während der Probenaufträge (bis max. 140 mL) ermittelt und davon 5 % der Peakhöhe berechnet. Damit wurde das aufgetragene Volumen ermittelt, bei dem der Verlauf diesen Wert erreicht. Dieses Volumen multipliziert mit der Probenkonzentration ergibt die Masse der Probensubstanz, die unter den gegebenen Bedingungen auf die Säule aufgetragen werden kann (Anspach, 2017). Die berechneten dynamischen Bindungskapazitäten werden in Tabelle 6 aufgelistet. Es muss beachtet werden, dass das genaue Säulenvolumen der selbstgepackten Eshmuno-CPX-Säule nicht bekannt ist. Deren Werte können von den wahren Werten stark abweichen. Auffällig ist, dass sich die großen Differenzen der Verläufe bei der GigaCap-Säule in den DBCs widerspiegeln. Sie weisen eine Differenz von 88,4 mg / mL Säulenmaterial auf. Die DBCs der Eshmuno-Säule liegen im Bereich von 16,2 – 38,2 mg / mL Säulenmaterial und steigen in der Reihenfolge der Versuche an. Die verschiedenen Absorptionsverläufe sowie die DBCs der Eshmuno-Säule sind insgesamt konstanter. Sie reagieren weniger auf die verschiedenen Einflüsse der Probenpuffer oder eventuelle Störfaktoren. Ein Grund dafür kann die spezielle Tentakelstruktur dieser stationären Phase sein. Das Säulenmaterial besitzt Arme mit den funktionellen Gruppen, sodass ein dreidimensionales

Netzwerk für die Bindung der Proben zur Verfügung steht (Merck KGaA, 2013). Diese sind für die Probenmoleküle in der mobilen Phase besser erreichbar als bei einer flachen Materialoberfläche.

*Tabelle 6: Darstellung der berechneten dynamischen Bindungskapazitäten der acht Hauptversuche*

<b>Trennprozess</b>	<b>DBC in mg / mL Säulenmaterial</b>
<b>GigaCap, MES, pH 5,0</b>	38,9
<b>GigaCap, MES, pH 5,5</b>	1,9
<b>GigaCap, Acetat, pH 4,5</b>	90,0
<b>GigaCap, Acetat, pH 5,0</b>	1,6
<b>Eshmuno, MES, pH 5,0</b>	16,2
<b>Eshmuno, MES, pH 5,5</b>	25,4
<b>Eshmuno, Acetat, pH 4,5</b>	34,2
<b>Eshmuno, Acetat, pH 5,0</b>	38,2

Die Differenzen der Prozessverläufe an der GigaCap-S-Säule zeigen keine direkten Zusammenhänge mit den verwendeten Puffern oder deren pH-Werten. Es können keine Tendenzen festgestellt werden, welches Puffersystem oder welcher pH-Wert für sich am besten geeignet ist. Hier entscheiden die Versuchsergebnisse der einzelnen Kombinationen über den Grad der Aufreinigung. Für die Ermittlung einer zusätzlich möglichen Ursache für die stark variierenden Verläufe wurde die Säule auf den Einfluss von eventuellen Verunreinigungen untersucht. Dafür wurde sie gereinigt und anschließend der letzte Hauptversuch mit dieser Säule (Acetatpuffer mit pH-Wert 5,0; grün) wiederholt. Entsprechend den empfohlenen Herstellerangaben wurde sie mit (30 mL) einer 0,1 M Salzsäurelösung und (40 mL) einer 0,5 M NatronlaugeLösung gesäubert (Tosoh Bioscience, 2020). In der Abbildung 13 werden die beiden Verläufe mit demselben Probenpuffer vor und nach der Reinigung vergleichend dargestellt. Die Durchbruchskurve zeigt einen steileren Anstieg und die Konzentration des Eluats nach der Reinigung ist größer als vor der Reinigung. Das Säulenmaterial nimmt folglich nach der Reinigung weniger Probe auf als davor. Die Erwartung ist gegensätzlich, da theoretisch nach der Reinigung mehr Bindungsstellen vorhanden sein müssten. Es ist nicht auszuschließen, dass trotz der gründlichen Reinigung Moleküle auf der Säule verblieben sind, die die Bindungsstellen für die Probe

blockieren. Obwohl sich die Formen der beiden Verläufe grundsätzlich ähneln, ist hier keine deutliche Reproduzierbarkeit vorhanden. Um genauere Aussagen über die Reproduzierbarkeit treffen zu können, müssten weitere Versuche durchgeführt werden.

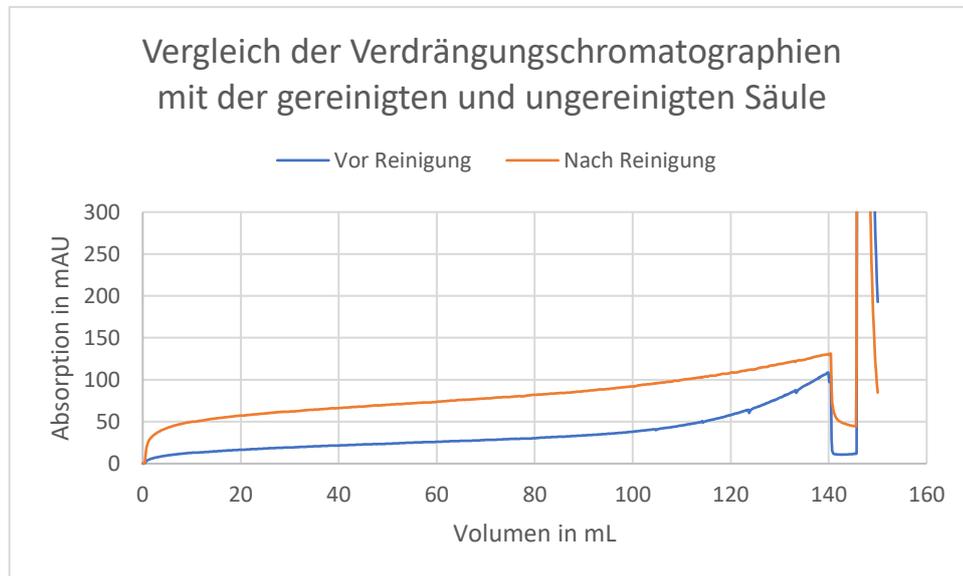


Abbildung 13: Vergleich der Verdrängungschromatographien mit dem Acetat-Puffer (pH 5,0) an der GigaCap-S-Säule vor und nach der Reinigung

### 4.3 Größenausschlusschromatographie

Die Effizienz der Trennung von den Immunglobulinaggregaten vom Monomer wurde mithilfe der Berechnung des Verhältnisses der Monomer- und Dimer-Flächen durch die Software ermittelt (siehe Kapitel 3.2). Dabei wurden je Hauptversuch drei Proben dahingehend analysiert. Im Anhang 1 – 6 sind die einzelnen Analysen je nach Säule und Peakhöhe zusammengeführt und vergleichend dargestellt. Die ersten Proben von jedem Verdrängungsprozess wurden bei einer Peakhöhe von  $11 \% \pm 3 \%$  ausgewählt. Die zweiten Proben entsprechen einer Peakhöhe von  $38 \% \pm 7 \%$  und die dritten Proben der Peakhöhe von  $80 \% \pm 11 \%$ . So kann die Zusammensetzung des Eluats im Verlauf des Trennprozesses verfolgt werden. Im Folgenden werden die Monomeranteile der drei Proben eines jeden Trennprozesses in zwei Diagrammen dargestellt. Abbildung 14 zeigt die Verläufe der Monomeranteile an der GigaCap-Säule und die Monomeranteile an der Eshmuno-Säule werden in der Abbildung 15 aufgeführt. Zusätzlich wurde in die Abbildungen der Monomeranteil des unbehandelten Gammaglobulins eingefügt. Dieser beträgt 91 %. Es ist erkennbar, dass bei beiden Säulen der Fall auftritt, dass die Monomeranteile in allen Proben, bis auf die der Verläufe mit dem MES-Puffer bei dem pH-Wert 5,0 (rot), größer

sind als bei dem unbehandelten Gammaglobulin. Es findet also bei drei der vier Probenpuffer eine Abtrennung der Dimere über die gesamten Verdrängungsprozesse statt. Je nach Dauer der Verdrängungsprozesse erzielen unterschiedliche Puffer die größten Monomeranteile. Der Acetat-Puffer mit dem pH-Wert 5,0 (grün) erreicht bis zur zweiten Probe bei beiden Säulen eine der beiden größten Monomeranteile. Bei der Eshmunu-Säule hat lediglich bei der dritten Probe der Acetat-Puffer mit pH-Wert 4,5 (gelb) einen größeren Monomeranteil. Bei der GigaCap-Säule hat der grüne Puffer (als grüne Datenreihe dargestellt) bei Probe drei einen größeren Monomeranteil. Bei Probe zwei dieser Säule besitzt der MES-Puffer mit pH-Wert 5,5 den größten Monomeranteil. Im Durchschnitt erzielen bei der GigaCap-Säule die Probenpuffer mit dem höheren pH-Wert die größeren Monomeranteile. Bei der Eshmunu-Säule ist diese Tendenz nicht zu erkennen. (Der Durchschnitt hier bei beiden Acetat-Puffern ist 97 %.)

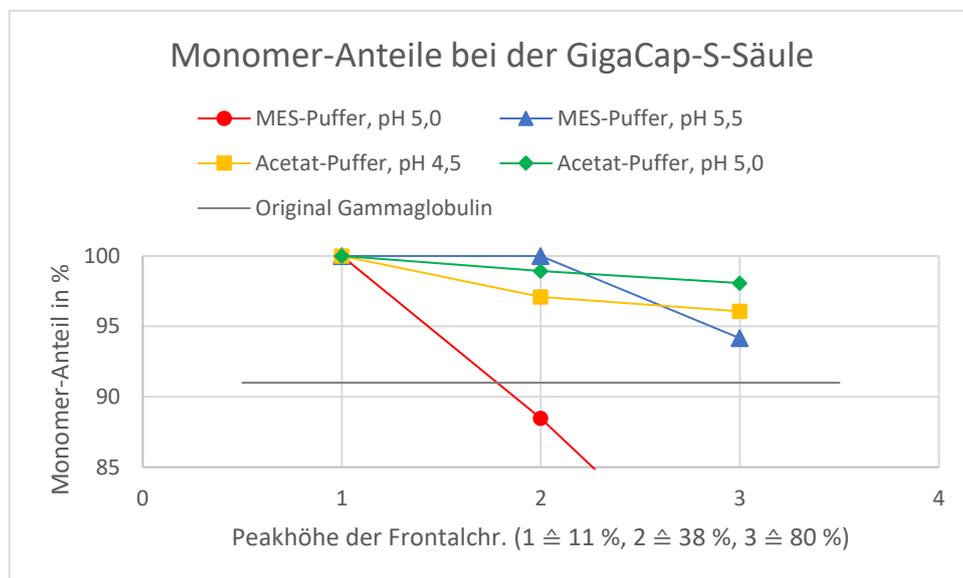


Abbildung 14: Vergleich der Monomeranteile im Verlauf der Verdrängungsprozesse zwischen den verschiedenen Probenpuffern und im Vergleich zum unbehandelten Gammaglobulin an der GigaCap-S-Säule. Der dritte Wert des MES-Puffers mit dem pH-Wert 5,0 beträgt 75 %.

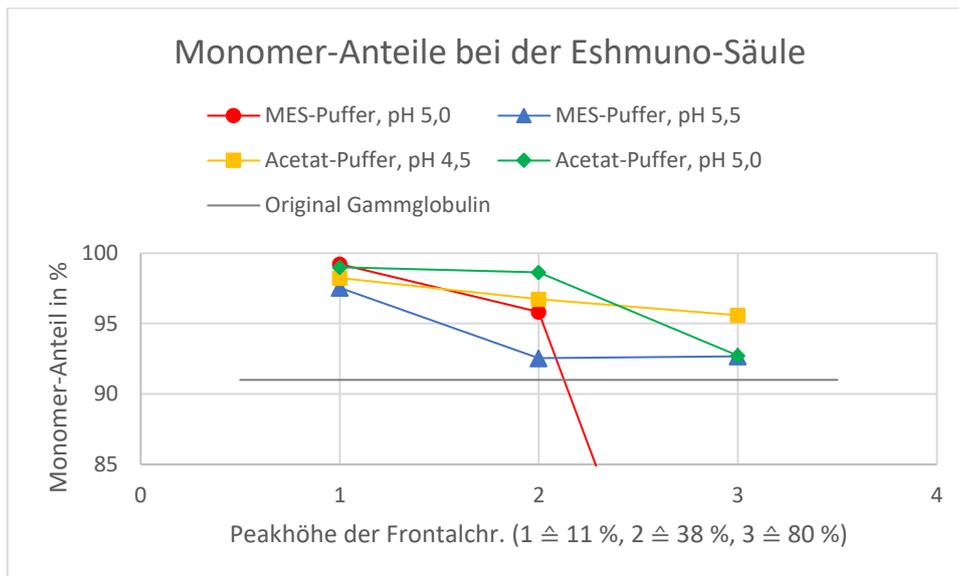


Abbildung 15: Vergleich der Monomeranteile im Verlauf der Verdrängungsprozesse zwischen den verschiedenen Probenpuffern und im Vergleich zum unbehandelten Gammaglobulin an der Eshmuno-CPX-Säule. Der dritte Wert des MES-Puffers mit dem pH-Wert 5,0 beträgt 58 %.

Bei den SECs der Hauptversuche fällt eine Substanz auf, die in den meisten Analysen bei einer Retentionszeit von 21 mL erscheint (siehe Anhang 1 – 6). Sie wird im Folgenden als Substanz R21 bezeichnet. Es kann sich dabei nicht um BSA handeln, da dieses bei 15,8 mL eluiert (s. o.). Zur möglichen Identifikation wurde diese Substanz während einer SEC aufgefangen und mittels SDS-PAGE und einem Wellenlängen-Scan analysiert. In Abbildung 16 ist bei dem Wellenlängenspektrum zu sehen, dass das Absorptionsmaximum bei 280 nm liegt. Bei dieser Wellenlänge haben Proteine ihr Absorptionsmaximum. Die Peptidbindung absorbiert bei einer Wellenlänge von 205 nm (Wiley Information Services GmbH, 1999-2016). Auch hier ist eine Absorption der Substanz erkennbar. Das lässt auf ein kleines Protein oder Peptid schließen, da die Substanz mit der mobilen Phase im unteren Größenausschluss der SEC eluiert (siehe Anhänge). Das Ergebnis der SDS-PAGE passt nicht zu den bisherigen Ergebnissen. Abbildung 17 zeigt das Gel mit dem Marker und daneben die Laufstrecke der Substanz R21. In der Abbildung 18 wird der Bereich, in dem die Bande des Substrats erscheint, vergrößert dargestellt. Der Marker enthält die Proteine Lysozym (14 kDa), Trypsin Inhibitor (20 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Ovalbumin (43 kDa), BSA (66 kDa),  $\beta$ -Galaktosidase (118 kDa) und bovines Myosin (212 kDa) (Carl Roth GmbH + Co. KG, 2017). Die Bande des Substrats R21 befindet sich in einem Größenbereich zwischen 118 kDa ( $\beta$ -Galaktosidase) und 212 kDa (Myosin). Dementsprechend müsste es in der SEC vor dem BSA, in der Nähe des IgGs, eluieren. Dies ist nicht zutreffend. Selbst wenn das Gel nur Proteine bis zu einer Größe von 60 kDa auftrennt, da es ein

12-iges Gel ist, müsste die Bande der Substanz weiter unten im Gel auftauchen. Die verwendete Superdex-Säule trennt Moleküle ab einem Molekulargewicht von 10 kDa auf (GE Healthcare, 1998). Da es nicht mit der Säule aufgetrennt wird, sondern mit der mobilen Phase eluiert, müsste es dafür jedoch kleiner als 10 kDa sein. Für eine Klärung der Identität müssten weitere Versuche durchgeführt werden.

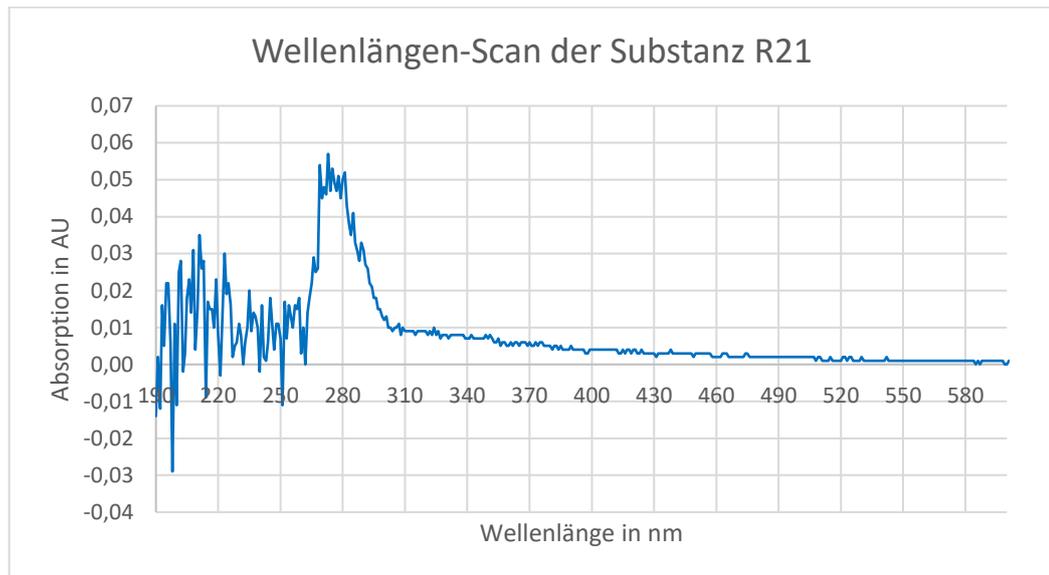
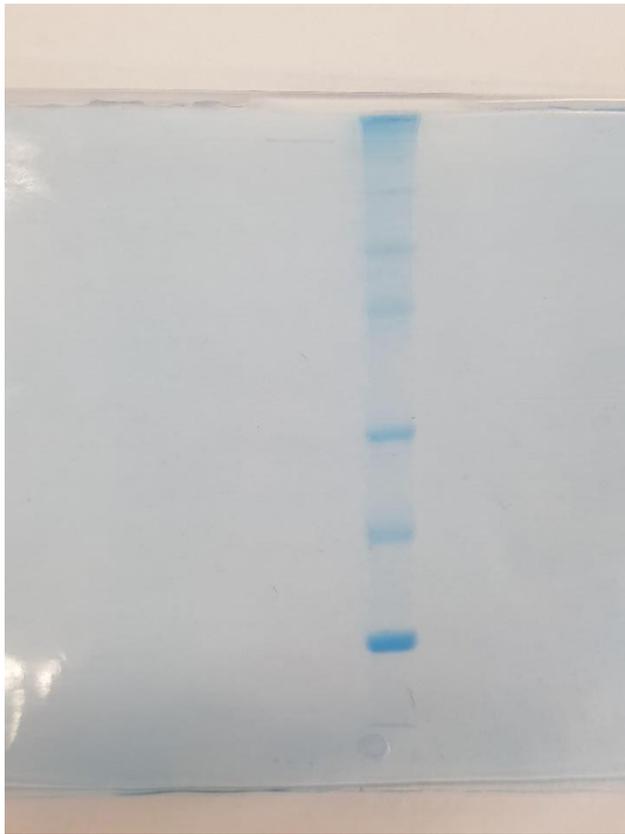
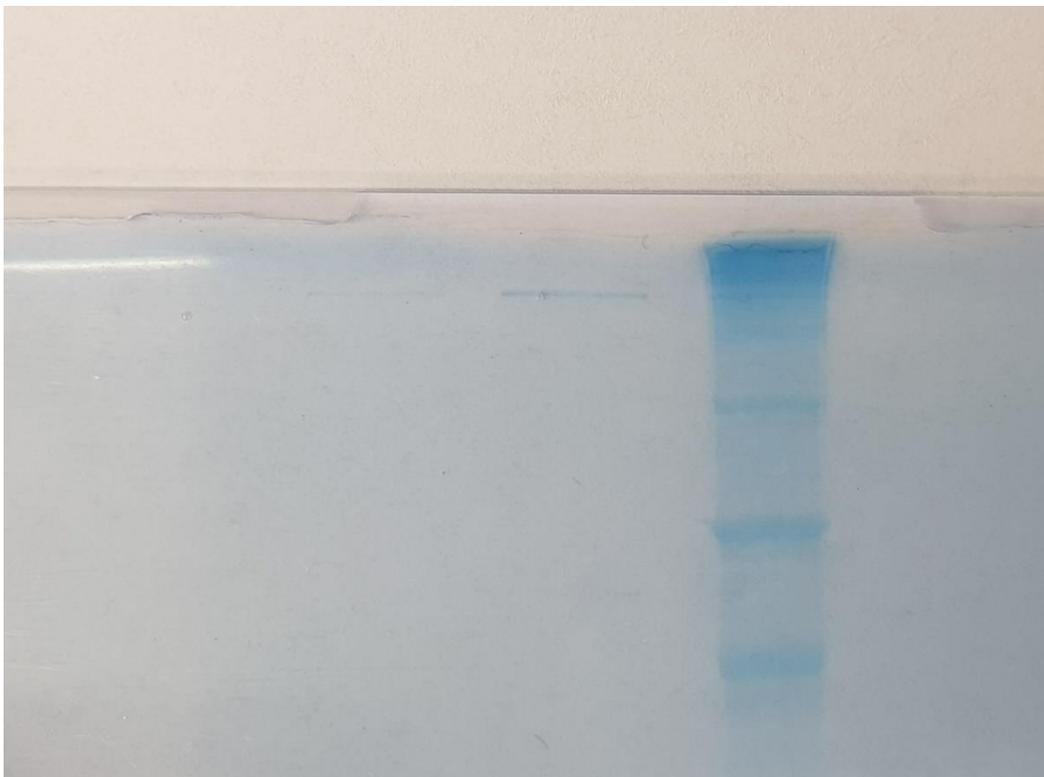


Abbildung 16: Wellenlängen-Scan der Substanz R21 von 190 nm bis 600 nm



*Abbildung 17: SDS-PAGE-Gel (12%-ig) zur Untersuchung der Substanz R21*



*Abbildung 18: Großaufnahme des SDS-PAGE-Gels aus Abbildung 16*

## 5 Diskussion

Durch die Analysen der Verdrängungschromatographien kann die Aufreinigung des IgG-Monomers mit den beiden Kationenaustauschern als erfolgreich angesehen werden. Zu Beginn aller Verdrängungsprozesse (11 % der Peakhöhen) liegt die Reinheit des IgG-Monomers mindestens bei 98 %. Der Monomeranteil der unbehandelten Gammaglobulinprobe liegt bei 91 %. Je nach Auftragsvolumen der Proben variiert der Reinheitsgrad im Fortgang der Aufreinigungen. Bei Betrachtung beider Säulen erzielt der Acetatpuffer mit dem pH-Wert 5,0 (grün) insgesamt die größten IgG-Monomer-Reinheiten.

Dieser Puffer wurde standardmäßig von Stone et al. (2019) in ihrer Studie verwendet. Diese beiden Tatsachen lassen vermuten, dass dieser Puffer gute Voraussetzungen für die IgG-Monomer-Aufreinigung mittels Verdrängungschromatographie besitzt. Die Beobachtung in deren Studie, dass bei der GigaCap-S-Säule der Aggregatanteil des Eluats generell größer ist, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Zu Beginn der Trennungsprozesse treten hier durchschnittlich größere Monomeranteile auf als bei der Eshmuno-CPX-Säule. Auch das Verhalten des pH-Werts differenziert sich. In der Studie gilt die Tendenz je niedriger der pH-Wert, desto geringer der Anteil an Aggregaten. Bei den Chromatographien an der GigaCap-Säule in dieser Arbeit weisen die Puffer mit dem größeren pH-Wert die niedrigeren Anteile an Aggregaten auf. Bei der Eshmuno-Säule sind keine Tendenzen ersichtlich. Der Grad der Aufreinigung durch die Verdrängungsprozesse in der Publikation und in der vorliegenden Arbeit ist vergleichbar. Die GigaCap-S-Säule erreicht in der Publikation Aggregatanteile bis zu 10 %. Wird der MES-Puffer mit pH 5,0 in dieser Arbeit außer Acht gelassen, erreicht die Säule hier Aggregatanteile bis zu 6 %. Die Eshmuno-CPX-Säule erreicht in der Publikation Aggregatanteile bis zu 7,5 %. Wird hier ebenfalls der MES-Puffer mit pH 5,0 außer Acht gelassen, erreicht die Säule in dieser Arbeit Aggregatanteile bis zu 7 %.

Die Ergebnisse aus der Publikation von Stone et al. sind nicht mit denen aus der vorliegenden Arbeit identisch. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die verschiedenen Arbeiten unterschiedliche Proben verwenden. Dass ein Gemisch aus verschiedenen Immunglobulinlinklassen (Gammaglobulin) andere Eigenschaften aufweist als monoklonale Antikörper, ist wahrscheinlich. Eine Probe aus verschiedenen Substanzen reagiert in der Regel mit unterschiedlicheren Reaktionen auf Einflüsse als eine Probe mit einer einzigen Substanz. Zusätzlich haben die Arbeiten in einem unterschiedlich großen Umfang stattgefunden. Um ähnlich umfangreiche Aussagen und präzise Ergebnisse wie in der Publikation ermitteln zu

können, müssten weitaus mehr Versuche (Mehrfachbestimmungen und weitere Vergleichsparameter) und Analysen (mehr Proben der Hauptversuche) durchgeführt sowie weiteres Material (andere Säulenmaterialien und Puffersysteme) benutzt werden. Jedoch kann die grundsätzliche Übertragbarkeit der Trennungsmethode aus der Publikation für die Anwendung mit bovinem Gammaglobulin durch die ähnlich groß erzielten Monomeranteile des IgGs bestätigt werden. Grenzen der Übertragbarkeit müssten hinsichtlich der unterschiedlichen Immunglobulintypen mit weiteren Versuchen untersucht werden. Die Wahl des Probenpuffers ist ein wichtiger Faktor. Hier sollte bei einer Übertragung des Trennprozesses die Variation in Puffersalz, pH-Wert und Leitfähigkeit mit deren verschiedenen Kombinationen getestet werden.

Die Aufreinigung von IgG aus Rinderserum hat gezeigt, dass die Probengewinnung über diesen Weg gut möglich ist. In dem Chromatogramm von der SEC des aufgereinigten IgGs ist zu erkennen, dass das Monomer-Dimer-Verhältnis ähnlich groß ist wie bei dem Gammaglobulin. Die SDS-PAGE der IgG-Proben bestätigt die zuverlässige Händelbarkeit und Aufreinigungsfähigkeit dieser Prozesse. (100%-ige Aufreinigungen sind in der Praxis nicht möglich.) Es gab über den gesamten Zeitraum mit dem Umgang dieser Proben bei den verschiedenen Prozessen keinerlei Komplikationen oder unerwartete Ergebnisse. Da der Wiederholungsversuch an der GigaCap-S-Säule nach der Reinigung keine sichere Reproduzierbarkeit des Versuchs aufzeigt, sollte dies für die Aussagekraft der Ergebnisse aus dieser Arbeit bedacht werden.

## **6 Zusammenfassung und Ausblick**

Diese Arbeit befasste sich mit der Trennung von bovinen Gammaglobulinaggregaten und dem Monomer mittels der Verdrängungschromatographie an zwei Kationenaustauschern. In diesem Rahmen wurden acht Vergleichsversuche mit zwei verschiedenen Puffersystemen und jeweils zwei unterschiedlichen pH-Werten an den beiden Säulen durchgeführt. Der Aufbau der Vergleichsversuche glich dem aus der Studie von Stone et al. (2019), um eine Übertragbarkeit ihrer Trennungsmethode auf bovines Gammaglobulin prüfen zu können. Der Aufreinigungserfolg der Versuche wurde mithilfe der SEC analysiert. Dazu diente der Vergleich der Verhältnisse von Di- und Monomer-Peakflächen.

Diese Arbeit hat gezeigt, dass sich die Trennungsmethode mit der Verdrängungschromatographie auf das bovine Gammaglobulin mit den beiden Kationenaustauschern übertragen lässt.

Dabei treten jedoch auch unterschiedliche Beobachtungen und Ergebnisse bei den einzelnen Prozessen auf. Bei dem Einsatz einer Verdrängungschromatographie zur Trennung von Immunglobulinaggregaten vom Monomer ist die Wahl eines geeigneten Puffers ein bedeutender Faktor. Das Puffersalz, der pH-Wert und die Leitfähigkeit haben einen wesentlichen Einfluss auf die Trennungseffektivität. Die Reproduzierbarkeit der Versuche in dieser Arbeit muss aufgrund der vorliegenden Ergebnisse vorsichtig betrachtet werden.

Die Investition, diese Thematik weiter zu untersuchen, liegt im Interesse der Forschung, da die Nachfrage von aufgereinigten Immunglobulinen durch den wachsenden Einsatz in der Forschung und klinischen Diagnostik wächst (GE Healthcare, 2016). Zur Ergänzung dieser Arbeit könnten weitere Vergleichsversuche durchgeführt werden. Diese Versuche können sich auf verschiedene Säulenmaterialien (andere starke Kationenaustauscher), unterschiedliche Leitfähigkeiten des Probenpuffers, verschiedene Flussraten bzw. Verweilzeiten auf der Säule, unterschiedlich konzentrierte Proben oder unterschiedlich zusammengesetzte Proben beziehen. Weiterhin könnten Versuche mit schwachen Kationenaustauschern durchgeführt werden. Da diese stationären Phasen die Immunglobuline weniger stark binden, könnte dadurch der Verdrängungsprozess begünstigt werden (Anspach, 2019). Letztendlich können sich jedoch die geeigneten Prozessparameter und Materialien für jede chromatographische Trennung unter verschiedenen Bedingungen differenzieren.



ationid=10016&assetid=11660

[Zugriff am 19. Februar 2020].

Hoffmann, J. H. O. & Enk, A. H., 2017. Hochdosierte intravenöse Immunglobuline bei dermatologischen Autoimmunerkrankungen. *Journal of the German Society of Dermatology*, 11. Dezember, pp. 1211-1227.

Jahn, U., 2005. *roempp.thieme.de*. [Online]

Available at: <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-13-03211>

[Zugriff am 04. März 2020].

Janson, J.-C. & Rydén, L., 1998. *Protein Purification*. 2. Hrsg. United States of America: WILEY-VCH.

Merck KGaA, 2013. *emdmillipore.com*. [Online]

Available at: [https://www.emdmillipore.com/Web-US-Site/en\\_CA/-/USD/ShowDocument-Pronet?id=201211.024](https://www.emdmillipore.com/Web-US-Site/en_CA/-/USD/ShowDocument-Pronet?id=201211.024)

[Zugriff am 04. März 2020].

Merck KGaA, 2020. *sigmaaldrich.com*. [Online]

Available at:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g5009?lang=de&region=DE>

[Zugriff am 05. März 2020].

Reece, J. et al., 2016. *Campbell Biologie*. 10. Hrsg. Hallbergmoos: Pearson Deutschland GmbH.

Römling, R. & Müller, E., 2010. *Chemie.de*. [Online]

Available at: <https://www.chemie.de/whitepaper/125715/effiziente-und-robuste-verfahren-fuer-die-aufreinigung-von-biopharmazeutika.html>

[Zugriff am 19. Februar 2020].

Römpp, 2002. *roempp.thieme.de*. [Online]

Available at: <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-19-01584?searchterm=sds+page>

[Zugriff am 04. März 2020].

Spektrum Akademischer Verlag, 1999. *Spektrum.de*. [Online]

Available at: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/fraktionieren/25160>

[Zugriff am 02. März 2020].

Spektrum Akademischer Verlag, 1999. *Spektrum.de*. [Online]

Available at: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/pvp/55070>

[Zugriff am 04. März 2020].

Spektrum Akademischer Verlag, 1999. *Spektrum.de*. [Online]

Available at: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/tris/67693>

[Zugriff am 04. März 2020].

Spektrum Akademischer Verlag, 1999. *Spektrum.de*. [Online]

Available at: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/bsa/10994>

[Zugriff am 04. März 2020].

Spektrum Akademischer Verlag, 1999. *Spektrum.de*. [Online]  
Available at: <https://www.spektrum.de/lexikon/biochemie/dtt/1815>  
[Zugriff am 05. März 2020].

Spektrum Akademischer Verlag, 2001. *Spektrum.de*. [Online]  
Available at: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/chromatographie/2399>  
[Zugriff am 27. Februar 2020].

Spektrum Akademischer Verlag, 2001. *Spektrum.de*. [Online]  
Available at: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/puffer/9527>  
[Zugriff am 02. März 2020].

Spektrum Akademischer Verlag, 2001. *Spektrum.de*. [Online]  
Available at: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/markter/7333>  
[Zugriff am 02. März 2020].

Stone, M. T., Cotoni, K. A. & Stoner, J. L., 2019. Cation exchange frontal chromatography for the removal of monoclonal antibody aggregates. *Journal of Chromatography A*, 16 August, Issue 1599, pp. 152-160.

Tosoh Bioscience GmbH, 2020. *tosohbioscience.com*. [Online]  
Available at: <https://www.separations.eu.tosohbioscience.com/solutions/process-media-products/by-mode/ion-exchange/cation-exchange/toyopearl-gigacap-s-650>  
[Zugriff am 04. März 2020].

Tosoh Bioscience, 2020. *tosohbioscience.com*. [Online]  
Available at:  
<https://www.separations.eu.tosohbioscience.com/File%20Library/TBG/Products%20Download/Resin%20Information%20Sheet/ris0024.pdf>  
[Zugriff am 06. März 2020].

Weiß, J., 2001. *Ionenchromatographie*. 3. Hrsg. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH.

Wiley Information Services GmbH, 1999-2016. *chemgapedia.de*. [Online]  
Available at:  
[http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteinanalytik/proteinreinigung.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/proteinanalytik/methoden\\_protein/pr\\_nachweis.vscml.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteinanalytik/proteinreinigung.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/proteinanalytik/methoden_protein/pr_nachweis.vscml.html)  
[Zugriff am 05. März 2020].

Worthington Biochemical Corporation, 2019. *worthington-biochem.com*. [Online]  
Available at: <http://www.worthington-biochem.com/OA/>  
[Zugriff am 05. März 2020].

Worthington Biochemical Corporation, 2019. *worthington-biochem.com*. [Online]  
Available at: <http://www.worthington-biochem.com/BSANF/default.html>  
[Zugriff am 05. März 2020].

Worthington Biochemical Corporation, 2019. *worthington-biochem.com*. [Online]  
Available at: <http://www.worthington-biochem.com/CTL/default.html>  
[Zugriff am 05. März 2020].

## **VII Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und dabei keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Sämtliche Stellen der Arbeit, die im Wortlaut oder dem Sinn nach Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher weder gesamt noch in Teilen einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

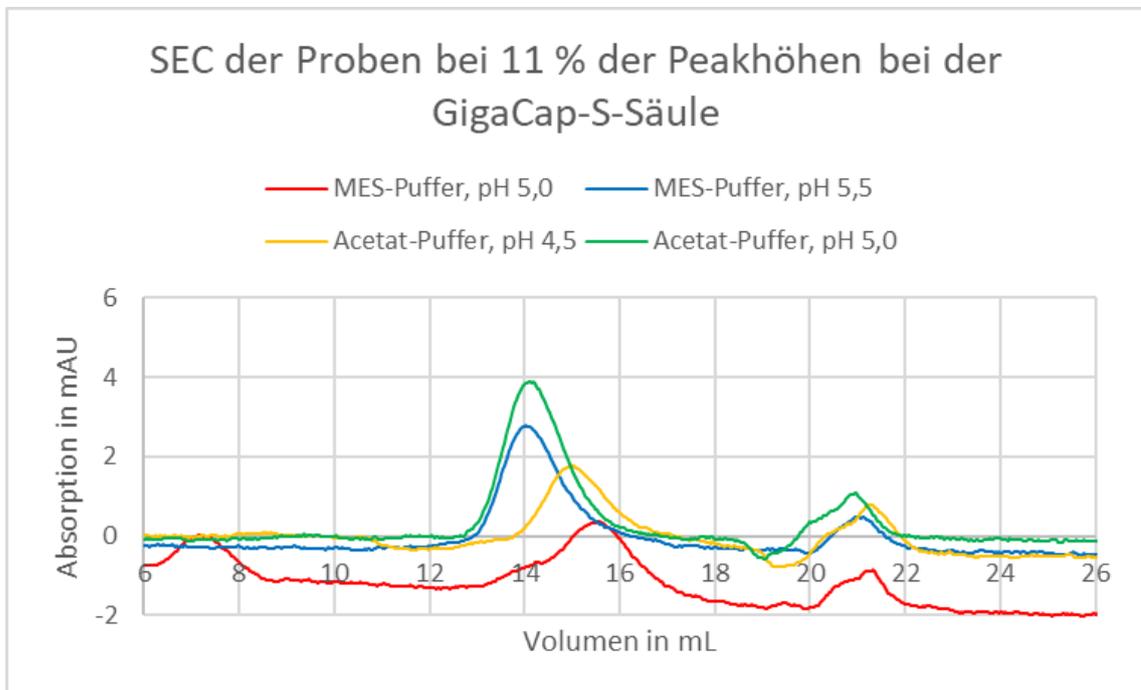
Hamburg, 9. März 2020

---

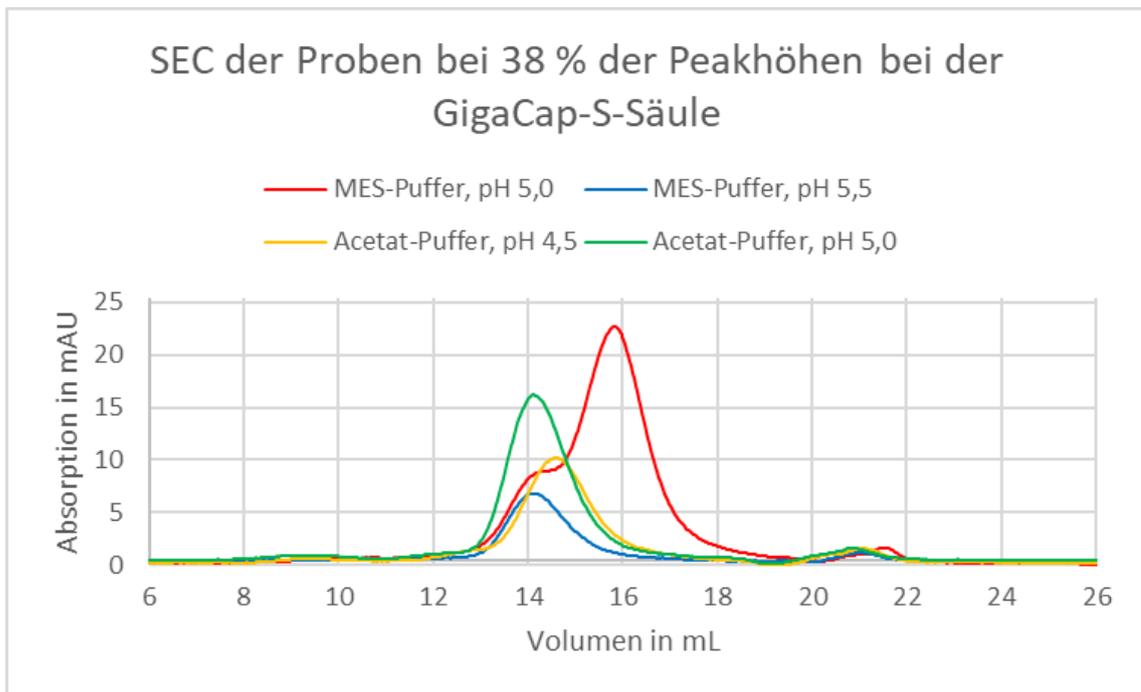
Unterschrift

## VIII Anhang

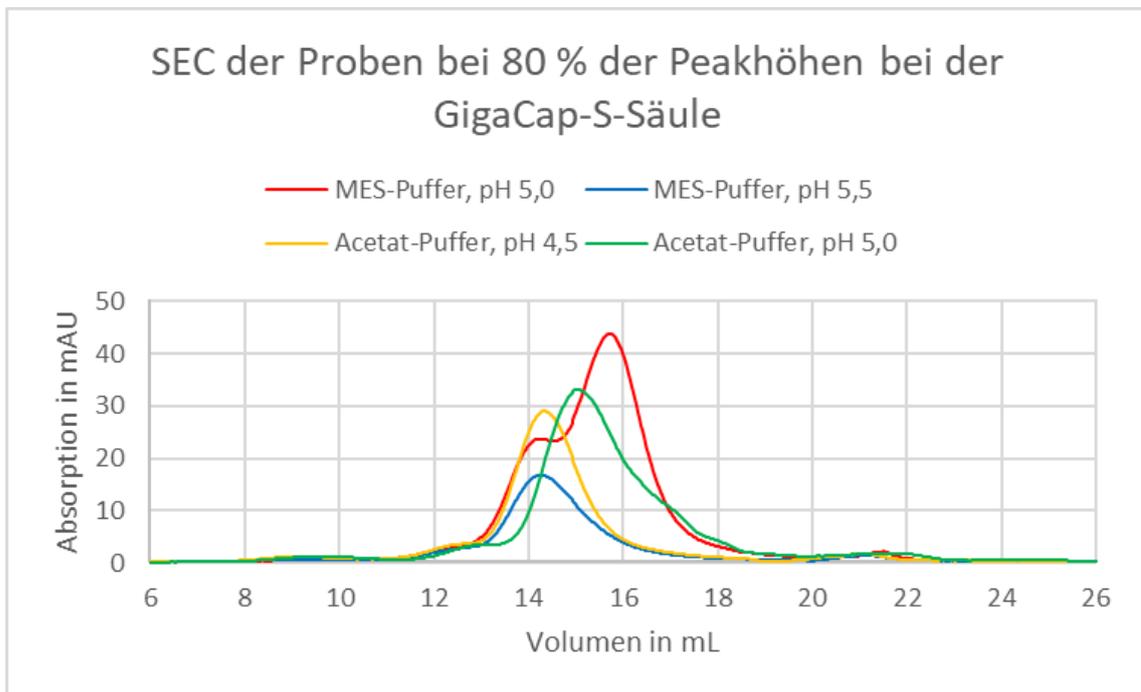
Anhang 1: SEC der Proben bei 11 % der Peakhöhen bei der GigaCap-S-Säule



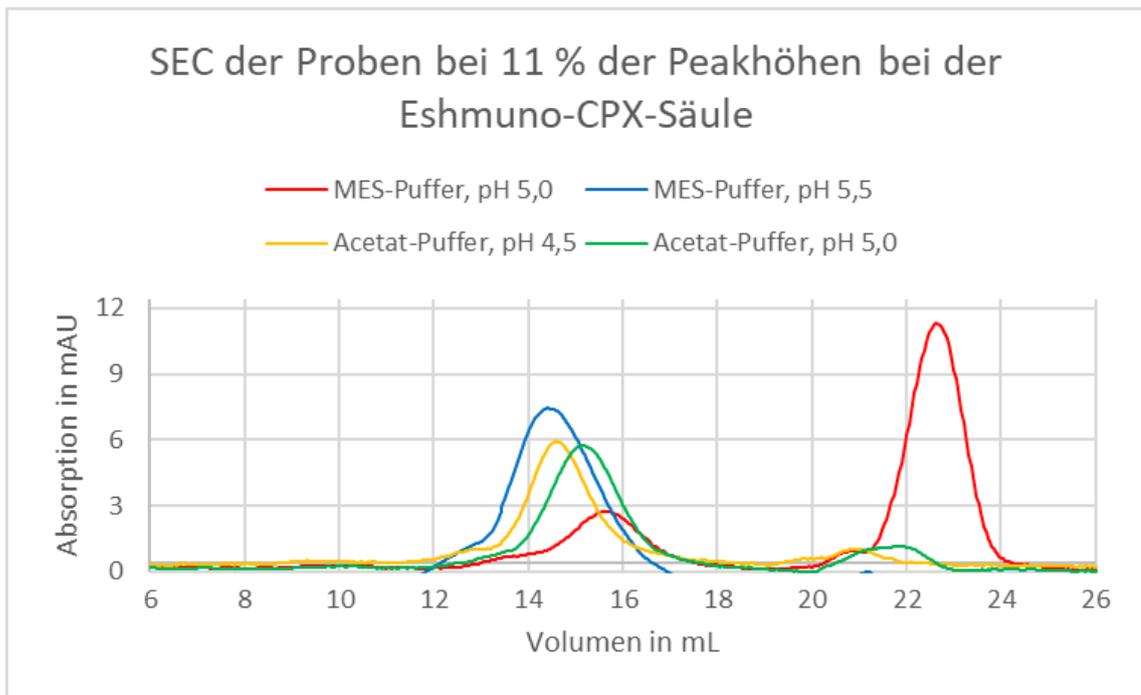
## Anhang 2: SEC der Proben bei 38 % der Peakhöhen bei der GigaCap-S-Säule



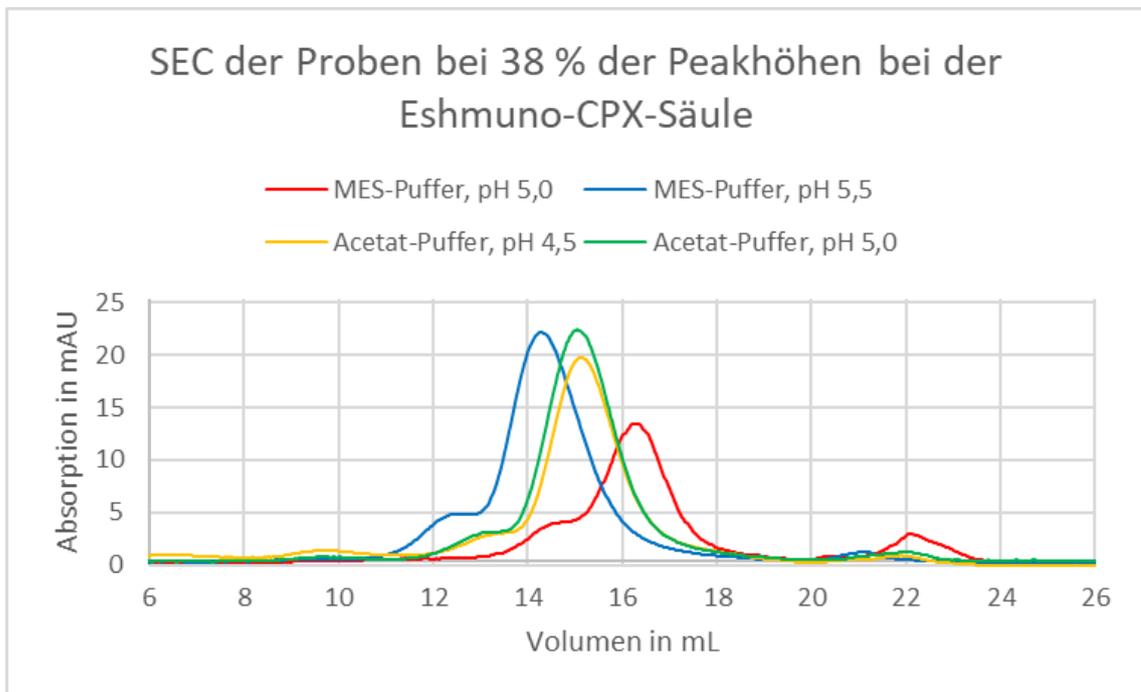
### Anhang 3: SEC der Proben bei 80 % der Peakhöhen bei der GigaCap-S-Säule



## Anhang 4: SEC der Proben bei 11 % der Peakhöhen bei der Eshmuno-CPX-Säule



## Anhang 5: SEC der Proben bei 38 % der Peakhöhen bei der Eshmuno-CPX-Säule



## Anhang 6: SEC der Proben bei 80 % der Peakhöhen bei der Eshmuno-CPX-Säule

