



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Medizinische Fakultät Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**Untersuchung systematischer Zusammenhänge zwischen  
Chromatographie-Gel Eigenschaften und Antikörper-spezifischen  
Verunreinigungen in der Säulenchromatographie**

Autor: Felix Wittkopp  
Institut / Klinik: Institut für Molekular- und Zellbiologie der Hochschule Mannheim  
Doktorvater: Prof. Dr. M. Hafner

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der mathematischen Modellierung chromatographischer Trennungen von monoklonalen Antikörpern und deren prozess- und produktbedingten Verunreinigungen. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen dabei schwache Ionenaustausch-Chromatographie-Materialien, welche Carboxy-Gruppen als Ligand synthetisiert haben. Das primäre Ziel der Arbeit ist die Entwicklung eines geeigneten mechanistischen Modells zur Beschreibung dieser schwachen Kationentauscher.

Der Ausgangspunkt der Entwicklung eines geeigneten mathematischen Modells zur Beschreibung der Retentionszeiten auf Kationentauschern ist das stöchiometrische Austausch-Modell (SD-Modell). Dieses häufig angewandte Modell bietet einen guten Kompromiss zwischen dem experimentellen Aufwand zur Bestimmung der benötigten Modellparameter und der Qualität der Voraussagen des Modells. Zur Steigerung der Anwendbarkeit des SD-Modells, beinhaltet dieses einige Vereinfachungen, wie beispielsweise die Vernachlässigung von Co-Ionen. Die Untersuchungen dieses Projektes zeigten, dass diese Vereinfachungen dazu führen, dass das SD-Modell nicht für die Anwendung auf schwachen Kationentauschern geeignet ist. Infolge dessen, wurde das bereits existierende Donnan-Ionen-Austausch-Modell (DIX-Modell) untersucht. Das DIX-Modell erlaubt die Berechnungen von pH-Werten und Ionenstärken im inneren des porösen Chromatographie-Materials und erlaubt so eine detaillierte Beschreibung des Dissoziationsgrades der Liganden. Da schwache Kationentauscher sich durch einen Liganden auszeichnen, welcher innerhalb des angewandten pH-Bereiches dissoziiert, ist eine korrekte Beschreibung dieser pH-abhängigen Ligandendichte ein entscheidender Parameter für die Modellierung schwacher Kationentauscher.

Das DIX-Modell wurde bereits für Ionen und Aminosäuren angewandt und wurde für in diesem Projekt für die Chromatographie von Proteinen weiterentwickelt. Die Arbeit zeigt eine detaillierte Herleitung der entsprechenden Gleichungen. Einflussfaktoren wie die Ladung des Proteins oder der Puffersubstanzen werden in Betracht gezogen und entsprechende Vereinfachungen diskutiert. Das Modell wird weiterhin mit bereits publizierten Modellen verglichen.

Das modifizierte DIX-Modell wird anhand mehrerer Datensätze verifiziert. Zu Beginn der Arbeit wird die Trennung von monoklonalen Antikörpern (mAb) und deren Aggregate bzw. Fragmente auf einem starken Kationentauscher untersucht. Der entsprechende Datensatz wird sowohl mit dem SD-Modell und dem DIX-Modell beschrieben und die Modellparameter verglichen. Das Ergebnis zeigt, dass beide Modelle für die Beschreibung der experimentellen Daten starker Kationentauscher geeignet sind.

Im Anschluss werden spezielle Chromatographie-Material Prototypen verglichen, die aus unterschiedlichem Anteil an Carboxy- und Sulfonsäuregruppen bestehen. Das Ziel der Untersuchungen ist die Verifizierung des DIX-Modells für schwache Kationentauscher und die Charakterisierung der Unterschiede starker und schwacher Kationentauscher auf Basis der Modellparameter. Die Untersuchungen zeigten, dass das SD-Modell nicht für die Beschreibung schwacher Kationentauscher geeignet ist. Unter Verwendung des entwickelten DIX-Modells konnten hingegen alle Chromatographie-Material-Prototypen modelliert werden. Der Vergleich der bestimmten Modellparameter zeigt, dass sich schwache und starke Kationentauscher sowohl in der Bindestärke, als auch in den Werten der Parameter unterscheiden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die Modellparameter der gemixten Resins aus den Werten der Resins zusammensetzen, die ausschließlich aus starken bzw. schwachen Liganden bestehen. Diese These wird unter Verwendung des Modells von Melis et al. untersucht und teilweise bestätigt.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit ist die Untersuchung der Trennung von mAb Ladungsvarianten. Zu diesem Zweck wird die Trennung von drei mAb Ladungsvarianten auf einem starken und einem schwachen Kationentauscher modelliert. Auch für diesen Datensatz werden das SD-Modell und das DIX-Modell verglichen und die beobachteten Trends der vorherigen Datensätze verifiziert. Im Anschluss wird unter der Verwendung der bestimmten Modellparameter des DIX-Modells die Trennung der mAb Ladungsvarianten auf dem schwachen Kationentauscher durch *in silico* Simulation optimiert. Die Ergebnisse werden durch verifizierende Experimente bestätigt und die kleinen, vorhandenen Abweichungen diskutiert.

Der Abschluss der Arbeit stellt der Transfer des modifizierten DIX-Modells auf Mixed-Mode Chromatographie dar. Diese Untersuchungen werden anhand von speziellen Mixed-Mode Prototypen durchgeführt, welche unterschiedliche Aminosäuren als Ligand immobilisiert haben. Die Untersuchungen zeigten, dass das DIX-Modell sich durch entsprechende Erweiterungen zur Beschreibung der hydrophoben Interaktion auf Mixed-Mode Chromatographie anwenden lässt.

Für die Untersuchungen innerhalb des Projektes wurden mehrere Methoden entwickelt. So wurde die Berechnung von pH-Gradienten auf Ionentauschern untersucht und eine Berechnungsmethode für diskontinuierliche Puffersysteme entwickelt. Das Verfahren wurde anschließend in Form einer Software etabliert. Für die Analyse von mAb-Ladungsvarianten wurde unter der Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems eine Analysemethode für Kationentauscher *High-Throughput-Liquid-Chromatography* (HPLC) entwickelt. Weiterhin wurde eine systematische Durchführung der Modellierung von Proteintrennungen etabliert.