

Aus dem Institut für Molekular- und Zellbiologie der Hochschule Mannheim

Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Mathias Hafner

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

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doctor scientiarum humanarum (Dr. sc. hum.)

der

Medizinischen Fakultät Mannheim

der Ruprecht-Karls-Universität

zu

Heidelberg

vorgelegt von

Felix Wittkopp

aus

Stuttgart

2018

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Mathias Hafner

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern Beate und Dirk, meinem Bruder Jan sowie meiner Freundin Verena, die mir jederzeit den benötigten Rückhalt und ihre volle Unterstützung geboten haben.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
CEX	Cation-Exchange-Chromatography
CHES	2-(Cyclohexylamino)ethanesulfonic acid
CIP	Cleaning in Place
cm	Zentimeter
CPP	Critical Process Parameter
CQA	Critical Quality Parameter
DBC	Dynamische Bindekapazität
DIX	Donnan Ion Exchange
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
FDA	Food and Drug Administration
HCP	Host Cell Protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HETP	Anzahl der theoretischen Böden pro Länge
HMW	High Molecular Weight
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HTPD	High-Throughput Process Development
HTS	High-Throughput Screening
LGE	Lineare Gradientenelution

Verzeichnisse

mAb	Monoklonaler Antikörper
mAU	Milli-Absorption Unit
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimol
MOPSO	β -Hydroxy-4-morpholinepropanesulfonic acid
MPa	Mega-Pascal
mS	Milli-Siemens
Na ⁺	Natriumkation
Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
PAT	Process Analytical Tool
QbD	Quality by Design
SD	Stoichiometric Displacement
SEC	Size-Exclusion-Chromatography
SE-HPLC	Größenausschluss HPLC
SMA	Steric Mass Action
UV	Ultra Violett

Symbole und deren Bedeutung

A_i	Verteilungskoeffizient
A	Summe der Anionen
A	Empirischer Variable
a_P	Querschnittsfläche
B	Bulk Phase
B	Empirische Variable
B^+	Konzentration dissoziierte Puffersubstanz
c	Konzentration
C	Empirische Variable
c_{LW}	Konzentration des Wassers
D_{ax}	Axialer Dispersionskoeffizient
F_K	Kompressionsfaktor
F_Q	Quellfaktor
GH	Normalisierte Gradientensteigung
$K_{a,i}$	Dissoziationskonstante
K_D	Ausschlussfaktor
k_{eff}	Massentransferkoeffizient
K_{eq}	Gleichgewichtskonstante
L	Konzentration Ligand
P	Konzentration Protein
pK_s	Säurekonstante
R	Resin Phase

R	Gaskonstante
r_D	Donnan-Verhältnis
S	Konzentration Salz
$S_{x,y}$	Selektivitätskoeffizient
T	Temperatur
V	Summe der Kationen
V_c	Volumen der Chromatographie Säule
V_G	Gradientenvolumen
V_{int}	Zwischenkorn Volumen
V_{pore}	Porenvolumen
z	Ladung des Salzes
ΔG_p^0	Freie Gibbs-Enthalpie des Proteins
ΔG_s^0	Freie Gibbs-Enthalpie des Salzes

Griechische Buchstaben und deren Bedeutung

Λ^-	Ligandendichte der dissoziierten Form
Λ_{pore}	Ligandendichte in bezug auf das Porenvolumen
Λ_{TM}	Ligandendichte der Trockenmasse
ε_T	Totale Porosität
ε_p	Porenporosität
Λ	Totale Ligandendichte
α	Empirischer Term im Mixed Mode Modell
β	Pufferkapazität
β	Empirischer Term in Mixed Mode Modell

ε	Zwischenkornporosität
ν	Anzahl der Bindungsstellen (SD) / Effektive Austauschladung (DIX)
σ	Abschirmfaktor

Verwendete Anglizismen

Biosimilars	Nachahmerprodukt nach oder kurz vor Ablauf der Patentlaufzeit von rekombinant hergestellten therapeutischen Proteinen.
Curve Fit	Automatisches Anpassen von Parametern an Kurven.
Design Space	Parameterraum für einen Prozess innerhalb festgelegter Spezifikationen, die eine gewünschte Produktqualität garantieren.
Downstream Processing	Zweiter Teil des Bioprozesses. Das Zielprotein aus dem Zellkulturüberstand des Upstream Processing wird bis zur geforderten Reinheit unter Verwendung von Chromatographie und Filtrationen (Diafiltration, Ultrafiltration) aufgereinigt.
Fill and Finish	Finales Prozessieren des Therapeutikums in Abhängigkeit der jeweiligen Applikationsform (z.B. Spritzenabfüllung)
Mixed-Mode Resin	Chromatographiegel, dessen Trennprozess auf verschiedenen physikalischen Eigenschaften beruht (wie z.B. ionische und hydrophobe Interaktion).
Peak	Bereich des Höhepunktes der eluierenden Spezies
Protein Engineering	Veränderung von Proteinen in der Aminosäuresequenz oder des Glykosylierungsmusters zur Verbesserung der physiochemischen Eigenschaften.
Resin	Chromatographiegel / -material.
Screening	Umfangreiche Untersuchung mehrerer Parameter.
Software	Computerprogramm.
Tailing	Verlängerung / Ablaufen (Peak Tailing).
Upstream Processing	Erster Teil des Bioprozesses. Beinhaltet die Überführung des Zellklons mit der gewünschten Erbinformation für das zu produzierende Therapeutikum stufenweise in höhere Mediumvolumina in einem Bioreaktor, der dortigen Expression des Zielproteins und der finalen Zellabtrennung.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	II
Symbole und deren Bedeutung.....	IV
Griechische Buchstaben und deren Bedeutung.....	V
Verwendete Anglizismen	VI
Inhaltsverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Medizinische Anwendung monoklonaler Antikörper	1
1.2 Produkt- und prozessspezifische Verunreinigungen monoklonaler Antikörper Präparate	2
1.2.1 <i>Antikörper-Aggregate und -Fragmente</i>	3
1.2.2 <i>Host Cell Protein</i>	4
1.2.3 <i>Antikörper-Ladungsvarianten</i>	4
1.2.4 <i>Ausgewaschenes Protein A</i>	5
1.2.5 <i>Endotoxine</i>	5
1.3 Die Herstellung monoklonaler Antikörper im Produktionsmaßstab und die Rolle chromatographischer Trennverfahren.....	5
1.4 Prozessentwicklung unter Berücksichtigung industrieller Aspekte	9
1.5 Mathematische Modellierung chromatographischer Verfahren	11
1.6 Starke und schwache Kationentauscher und deren Unterschiede	13
1.7 Ziel des Projektes.....	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Instrumente	15
2.2 Computerprogramme	15
2.3 Chemikalien und Puffersysteme.....	16
2.3.1 <i>Berechnung von homogenen Puffersystemen</i>	17
2.3.2 <i>Berechnung von diskontinuierlichen Puffersystemen</i>	18
2.3.3 <i>Übersicht über die verwendeten Puffersysteme</i>	20
2.4 Chromatographie Gele	24
2.4.1 <i>Präparative Ionentauscher</i>	24
2.4.2 <i>Präparative Mixed-Mode-Gele</i>	24
2.4.3 <i>Präparative Protein A-Gele</i>	25
2.4.4 <i>HPLC-Säulen</i>	25

2.5	Monoklonaler Antikörper und Probenvorbereitung	26
2.5.1	<i>Protein A-Reinigung monoklonaler Antikörper</i>	26
2.5.2	<i>Aufreinigung von Antikörper-Ladungsvarianten</i>	27
2.5.3	<i>Herstellen der mAb05-Monomer, -Dimer und -Aggregat-Probe</i>	27
2.6	Modellierung von Proteintrennungen und Retentionen in chromatographischen Prozessen.....	28
2.6.1	<i>Das stöchiometrische Austausch Modell</i>	28
2.6.2	<i>Das Donnan-Ionen-Austausch Modell</i>	30
2.6.3	<i>Verbindung zwischen SD-und DIX-Modell</i>	38
2.6.4	<i>Das Mixed Mode Modell</i>	39
2.6.5	<i>Berechnung der Ligandendichte</i>	41
2.6.6	<i>Modell zur linearen Gradientenelution zur Bestimmung von Modellparametern</i>	42
2.6.7	<i>Durchführung von linearen Gradientenelutionsexperimenten</i>	44
2.6.8	<i>Bestimmung der Modellparameter</i>	44
2.6.9	<i>In silico Simulation von Proteinchromatographie</i>	46
2.7	Bestimmung der Chromatographiesäulen-Parameter	48
2.7.1	<i>Bestimmung der Porositäten</i>	48
2.7.2	<i>Bestimmung des D_{ax}-Wertes</i>	48
2.8	Analyse von Antikörper Monomer, Dimer und Aggregat durch SE-HPLC ..	49
2.9	Analyse von Antikörper-Ladungsvarianten durch CEX-HPLC	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Test von diskontinuierlichen Puffersystemen zur Herstellung linearer pH-Gradienten	51
3.2	Untersuchung von pH-Gradienten auf einem starken und schwachen Kationentauschern	55
3.3	Bestimmung der Chromatographiesäulenparameter.....	59
3.4	Analyse der monoklonalen Antikörper-Proben	61
3.4.1	<i>SE-HPLC-Analyse der Antikörper-Proben</i>	61
3.4.2	<i>Korrelation zwischen der Pufferkapazität und Ionenstärke und der Trennung von mAb Ladungsvarianten</i>	62
3.4.3	<i>CEX-HPLC-Analyse der Antikörper-Proben</i>	63
3.5	Charakterisierung des Donnan-Effektes unter der Verwendung des DIX-Modells.....	65
3.5.1	<i>Berechnung des Einflusses der Proteinladung auf den Donnan-Effekt</i> 65	
3.5.2	<i>Berechnung der Ligandendichte unter Verwendung des DIX-Modells</i> 66	

3.5.3	<i>Berechnung der Bedingungen der Resin-Phase bezüglich pH-Wert und Ionenstärke.....</i>	69
3.6	<i>Modellierung der Trennung von Antikörper-Monomer, -Dimer und -Aggregat Spezies auf einem starken Kationentauscher</i>	73
3.6.1	<i>Herstellen der mAb05 Monomer-, Dimer- und Aggregatprobe</i>	73
3.6.2	<i>Modellierung der experimentellen Daten unter Anwendung des SD-Modells</i>	74
3.6.3	<i>Modellierung der experimentellen Daten unter Anwendung des DIX-Modells</i>	76
3.6.4	<i>Vergleich der Ergebnisse der Modellierung von mAb05 mit dem SD- und DIX-Modell.....</i>	78
3.7	<i>Modellierung von mAb05 auf Carboxy-, SO₃- und gemixten Kationentauschern</i>	80
3.7.1	<i>Vergleich der Elutionsbedingungen hinsichtlich pH-Wert und Salzkonzentration von mAb05 auf Prototyp Resin 1 bis 4</i>	80
3.7.2	<i>Modellierung der Daten unter Verwendung des SD-Modells.....</i>	82
3.7.3	<i>Modellierung der Daten unter Verwendung des DIX-Modells.....</i>	84
3.7.4	<i>Verbindung der Ergebnisse der Modellierung unter Verwendung des DIX-Modells mit einem Modell für zusammengesetzte Systeme</i>	89
3.7.5	<i>Vergleich der Ergebnisse der Modellierung des Prototyp Resins 4 von mAb05 mit dem SD- und DIX-Modell</i>	92
3.7.6	<i>In silico Simulation von Chromatogrammen der mAb05 Retention auf Prototyp Resin 1 bis 4 unter Verwendung des DIX-Modells</i>	93
3.8	<i>Modellierung der Trennung von Antikörper Ladungsvarianten auf Carboxy- und SO₃-Tauschern</i>	97
3.8.1	<i>Herstellung der Antikörper Ladungsvarianten-Proben</i>	97
3.8.2	<i>Modellierung der Daten experimentellen Daten des Eshmuno® CPX unter der Verwendung des SD-Modells.....</i>	99
3.8.3	<i>Modellierung der experimentellen Daten des Eshmuno® CPX unter der Verwendung des DIX-Modells</i>	102
3.8.4	<i>Vergleich der Ergebnisse der Modellierung des starken Ionentauschers Eshmuno® CPX von mAb02 mit dem SD- und DIX-Modell.....</i>	105
3.8.5	<i>Modellierung der experimentellen Daten von Prototyp Resin 1 unter der Verwendung des DIX-Modells</i>	107
3.8.6	<i>Vergleich der Ergebnisse der Modellierung des Eshmuno® CPX und Prototyp Resin 1 von mAb02 mit dem DIX-Modell</i>	110
3.8.7	<i>In silico Simulation und Optimierung der Trennung der drei mAb02-Ladungsvarianten auf Prototyp Resin 1.....</i>	113
3.9	<i>Modellierung von Carboxy-Mixed-Mode-Tauschern mit unterschiedlicher Aminosäure-Modifikation.....</i>	118

3.9.1	<i>Modellierung mit Salz- und pH-abhängigen K_s-Wert und einem n-Wert pro Resin</i>	118
3.9.2	<i>Modellierung mit globalen K_s-Wert und Salz- und pH-abhängigen n-Wert</i> 121	
3.9.3	<i>Modellierung mit globalen K_s-Wert und empirischer Beschreibung des n-Wertes</i>	124
4	Diskussion	128
4.1	Vergleich homogener und diskontinuierlicher Puffersysteme	128
4.2	Untersuchung von pH-Gradienten auf starken und schwachen Kationentauschern	129
4.3	Methode zur Analyse von Antikörper-Ladungsvarianten	130
4.4	Charakterisierung des Donnan-Effektes unter Verwendung des DIX-Modells 131	
4.4.1	<i>Einfluss der Proteinladung auf den Donnan-Effekt</i>	131
4.4.2	<i>Berechnung der Bedingungen der Resin-Phase</i>	131
4.5	Modellierung der Trennung von Antikörper-Monomer, -Dimer und -Aggregaten unter der Verwendung des SD-Modells und DIX-Modells	133
4.6	Modellierung von Carboxy-, SO_3^- - und gemixten Kationentauschern	134
4.6.1	<i>Modellierung der Daten mit dem SD-Model</i>	134
4.6.2	<i>Modellierung der Daten mit dem DIX-Model und dessen Herleitung</i> . 135	
4.6.3	<i>Berechnung der Retentionszeit von gemixten Resins</i>	136
4.6.4	<i>Simulation von Chromatogrammen</i>	137
4.7	Modellierung der Trennung von Antikörper-Ladungsvarianten auf Carboxy- und SO_3^- -Tauschern	139
4.7.1	<i>Modellierung der experimentellen Daten des Eshmuno® CPX unter der Verwendung des SD-Modells</i>	139
4.7.2	<i>Modellierung der experimentellen Daten des Eshmuno® CPX unter der Verwendung des DIX-Modells</i>	140
4.7.3	<i>Modellierung der experimentellen Daten von Prototyp Resin 1 unter der Verwendung des DIX-Modells</i>	141
4.7.4	<i>In silico Simulation und Optimierung der Trennung der drei mAb02-Ladungsvarianten auf Prototyp Resin 1</i>	142
4.8	Modellierung von Carboxy-Mixed-Mode-Tauschern mit unterschiedlicher Aminosäure-Modifikation	144
4.8.1	<i>Modellierung mit Salz- und pH-abhängigen K_s-Wert und einem n-Wert pro Resin</i>	144
4.8.2	<i>Modellierung mit globalen K_s-Wert und Salz- und pH-abhängigen n-Wert</i> 145	
4.8.3	<i>Modellierung mit globalen K_s-Wert und empirischer Beschreibung des n-Wertes</i>	146

5	Zusammenfassung.....	148
6	Literaturverzeichnis	150
7	Abbildungsverzeichnis	163
8	Tabellenverzeichnis	169
9	Lebenslauf	171
10	Danksagungen	173

1 Einleitung

1.1 Medizinische Anwendung monoklonaler Antikörper

Die Erfolgsgeschichte monoklonaler Antikörper (mAbs) begann mit der Entwicklung des Herstellungsverfahrens durch Köhler und Milstein (Köhler und Milstein, 2005). Heute sind mAbs ein wichtiger Bestandteil der modernen Medizin in der *in vitro* Diagnostik oder bei der Behandlung komplexer Krankheiten durch Immuntherapie (Breedveld, 2000). Unter allen biotechnologischen Therapeutika nehmen mAbs einen Anteil von ca. 25% ein. Im Jahr 2016 wurden neun mAbs durch die *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen, sieben davon als neue Therapeutika (Morrison, 2017). Weitere 50 monoklonale Antikörper sind in der finalen Zulassungsphase (Reichert, 2017). Der Umsatz monoklonaler Antikörper beträgt ca. 50 % des gesamten Markts für Biopharmazeutika (Ecker et al., 2015).

Heute werden Immuntherapien unter anderem im Bereich von Autoimmunkrankheiten, Infektionskrankheiten und Entzündungskrankheiten eingesetzt (Reichert, 2017). Der Schwerpunkt liegt jedoch in der Krebsimmuntherapie. Im Vergleich zu klassischen Krebstherapien, wie Chemo- oder Strahlungstherapien, sind Immuntherapien spezifischer, da die Antikörper gezielt mit den Krebszellen interagieren (Adams und Weiner, 2005). Ziele können dabei beispielsweise spezifische Membranproteine der Tumorzelle sein (Rodgers und Chou, 2016). Die Bindung des Antikörpers löst die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) aus, welche in der Apoptose oder Phagozytose der Krebszelle durch die Aktivierung des Immunsystems endet (Foltz et al., 2013; Wang et al., 2015).

Immunglobuline (Ig) werden in die folgenden Klassen eingeteilt: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, IgG und IgY, wobei in der therapeutischen Anwendung vor allem IgG von Bedeutung ist (Weiner et al., 2010). IgG wird in vier Unterklassen eingeteilt (IgG1-4) und besteht aus zwei schweren Ketten (ca. 50 kDa) und zwei leichten Ketten (ca. 25 kDa). Die Hinge-Region unterteilt den Antikörper in den konstanten Fc-Teil und zwei variable Fab-Teile (Woof und Burton, 2004). Monoklonale Antikörper können durch verschiedene Modifikationen verbessert werden (Wu und Senter, 2005). Eine Übersicht zeigt Abbildung 1. So können beispielsweise Antikörper-Konjugate hergestellt werden, welche ein bestimmtes Toxin beinhalten, das die Krebszelle zum Beispiel durch Radioaktivität eliminiert (Witzig et al., 2002). Weiterhin ist eine

1 Einleitung

Verbesserung der Pharmakokinetik durch beispielsweise die Veränderung des Glykosylierungsmusters möglich (Beck et al., 2008; Herter et al., 2014).

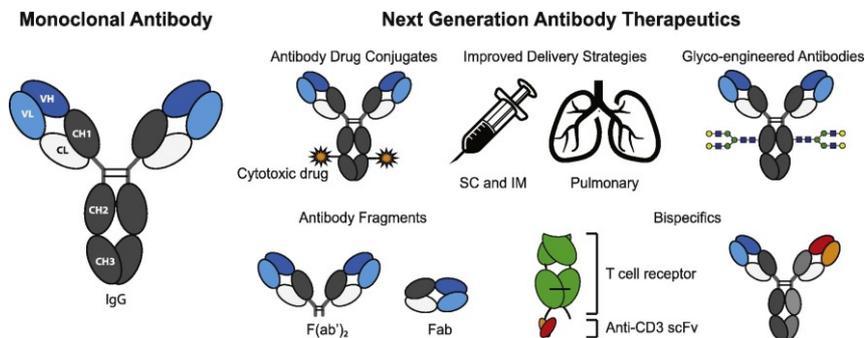


Abbildung 1: Schematischer Aufbau monoklonaler Antikörper und deren moderne Weiterentwicklung für therapeutische Anwendungen (Elgundi et al., 2016).

Eine neue Klasse an monoklonalen Antikörpern stellen bispezifische Antikörper dar, welche in der Lage sind, zwei Antigene zu erkennen (Merchant et al., 1998). Dies kann dann ein Vorteil sein, wenn eine Bindung an mehrere Zielproteine zur effektiven Behandlung der Krebsform in Frage kommen (Kontermann, 2012). Auch die Verwendung von Antikörper-Fragmenten, wie beispielsweise der variablen Fab-Region, ist möglich (Carrasquillo et al., 1984).

1.2 Produkt- und prozessspezifische Verunreinigungen monoklonaler Antikörper Präparate

Die Herstellung monoklonaler Antikörper erfolgt durch die Kultivierung von Säugerzelllinien, wobei vor allem *Chinese Hamster Ovary*-Zellen (CHO) und Mausmyelom-Zellen (NS0) verwendet werden (Seifert und Phillips, 1999; Spens und Häggström, 2007). Dabei werden die Antikörper in das Kulturmedium sekretiert. Für die therapeutische Applikation müssen Antikörper-Präparate eine Reinheit nahe 100 % vorweisen. Verunreinigungen können in produktspezifische Verunreinigungen, wie z.B. Wirtszellproteine (*Host Cell Proteins* (HCPs)), Desoxyribonukleinsäure (DNS) oder prozessspezifische Verunreinigungen, wie z.B. Antikörper-Aggregate, -Fragmente oder Detergenzien, eingeteilt werden.

1 Einleitung

1.2.1 Antikörper-Aggregate und -Fragmente

Aggregate und Fragmente von monoklonalen Antikörpern entstehen während deren Herstellung in Zellkultur und auch in der darauffolgenden Aufreinigung. Diese Sorte von Verunreinigungen besitzt eine mögliche veränderte Aktivität und kann unerwünschte Immunreaktionen auslösen (Ahmadi et al., 2015; Bessa et al., 2015; Rosenberg, 2006).

Die Ursachen, die zur Bildung von Aggregaten führen, können in intrinsische und extrinsische Faktoren eingeteilt werden. Intrinsische Faktoren sind beispielsweise strukturelle Aspekte der Tertiär- und Quartärstruktur des Antikörpers sowie hydrophobe und ionische Wechselwirkungen, die sich intra- unter intermolekular ausbilden können (Wang et al., 2010). Durch die gezielte Veränderung einzelner Aminosäuresequenz können bestimmte *Hot-Spots*, welche die Aggregationsrate erhöhen, eliminiert werden (Latypov et al., 2012).

Zu den extrinsischen Faktoren werden beispielsweise Parameter wie die Temperatur, Ionenstärke, der pH-Wert, die Proteinkonzentrationen und Scherkräfte gezählt. Eine ungünstige Wahl dieser Parameter erhöht Protein-Protein-Interaktionen und so die Bildung von Aggregaten (Manning et al., 2010). Parameter wie der pH-Wert und die Ionenstärke können bei der Auslegung des Aufreinigungsprozesses verändert werden, falls eine erhöhte Bildung von Aggregaten beobachtet wird. Dabei führen vor allem hohe Ionenstärken in Kombination mit pH-Werten nahe des isoelektrischen Punktes (pI) des Proteins zu Aggregation (Arosio et al., 2013; Sahin et al., 2010). Auch der Einfluss höherer Temperaturen und Scherkräften und beispielsweise längeres Rühren ist ein wichtiger Aspekt beim Auslegen der Herstellungsprozesse (Telikepalli et al., 2014).

Die Entstehung von Aggregaten führt nicht zwangsläufig zum Verlust des Proteins. Unter bestimmten Bedingungen ist die Aggregation reversibel (Wang, 2005). Dies ist jedoch von der Struktur der Aggregate abhängig. Aggregate, welche beispielsweise durch Disulfidbrücken kovalent miteinander verknüpft sind, können nicht in ihre native Struktur zurück umgewandelt werden. Aggregate unspezifischen Ursprungs, wie beispielsweise aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen, können durch die Zugabe von Löslichkeitsverbessernden Substanzen, wie beispielsweise Saccharose, in ihre native Form übergehen (Chaudhuri et al., 2014).

1 Einleitung

Antikörper-Fragmente können durch einen enzymatischen Verdau oder durch chemische Veränderung an spezifischen Stellen, wie beispielsweise der Hinge-Region, entstehen (Elgundi et al., 2016; Manning et al., 2010). Der enzymatische Abbau kann durch die Zugabe von Proteaseinhibitoren minimiert werden. Die Unterbindung chemischer Fragmentierung ist ein Aspekt beim *Protein Engineering*, der Veränderung der Aminosäuresequenz. Einen besonderen Einfluss hat beispielsweise die Aminosäure Asparagin in der Hinge-Region (Manning et al., 2010).

1.2.2 Host Cell Protein

Host Cell Protein (HCP) ist ein Sammelbegriff für zelleigene Proteine der produzierenden Zelllinie, die nicht mit dem Zielprotein übereinstimmen. So sind HCP-Verunreinigungen Proteine, die ebenfalls von den Zellen sekretiert werden bzw. durch apoptotische Zellen im Zellkulturmedium gelöst sind. Aufgrund der Heterogenität haben diese Proteine unterschiedliche physiochemische Eigenschaften, beispielsweise in ihrem isoelektrischen Punkt, der Größe oder der Hydrophobizität, weshalb eine Abtrennung im Aufreinigungsprozess komplex ist (Zhang et al., 2014). Eine nicht ausreichende Abtrennung kann zu zusätzlichen Nebenwirkungen (Beatson et al., 2011) oder dem Verlust der Aktivität durch Protolyse führen (Gao et al., 2011).

1.2.3 Antikörper-Ladungsvarianten

Antikörper-Ladungsvarianten bezeichnen Antikörper, die in ihrer Struktur dem Produkt sehr ähnlich sind (Khawli et al., 2010; Vlasak und Ionescu, 2008). Sie können beispielsweise durch Sialinierung (Lyubarskaya et al., 2006), Amidierung (Johnson et al., 2007), Deamidierung (Zheng und Janis, 2006) oder durch Oxidation entstehen (Chumsae et al., 2007). Diese Variationen können zu einer Veränderung des isoelektrischen Punktes führen und haben so einen Einfluss auf die Pharmakokinetik und Aktivität des Antikörper-Präparates (Sharifi et al., 1998).

Aufgrund der nahezu identischen Struktur dieser Varianten zum Zielprotein ist eine Separierung im präparativen Maßstab schwierig und erfordert moderne Chromatographie-Medien und geeignete mobile Phasen (Fekete et al., 2015a, b) in Kombination mit geeigneten Analytik-Methoden (Lingg et al., 2013; Wagner-Rousset et al., 2017).

1 Einleitung

1.2.4 Ausgewaschenes Protein A

Eine klassische Verunreinigung in einem mAb Produktionsprozess ist Protein A, ein Membranprotein des *Staphylococcus aureus*. Immobilisiertes Protein A wird als initialer *Capturing*-Chromatographieschritt in den meisten Antikörper Produktionsprozessen verwendet (Varadaraju et al., 2011), wobei es zum Ablösen des Liganden kommen kann. Protein A kann eine unerwünschte Immunreaktion verursachen und muss gemäß regulatorischen Vorgaben aus dem Produkt entfernt werden (Gomez et al., 2004). Dies kann beispielsweise durch hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) erreicht werden (Yoo und Ghosh, 2012).

1.2.5 Endotoxine

Der Begriff Endotoxin bezeichnet Lipopolysaccharide aus der Zellwand von *Gram*-negativen Bakterien. Aufgrund ihrer hohen Immunogenität führen bereits kleine Mengen zu unerwünschten Nebenwirkungen bei der Applikation im Patienten (Anspach, 2001). Die Gefahr der Kontamination durch Endotoxine ist vor allem bei transienten Transfektionen durch die hier verwendeten Plasmide mit bakteriellen Ursprungs gegeben (Ritzén et al., 2007). Endotoxine können durch Filtration (Sweadner et al., 1977), HIC (Wilson et al., 2001) oder Anionenaustauschchromatographie (AEX) (Hou und Zaniewski, 1990) vom Produkt getrennt werden.

1.3 Die Herstellung monoklonaler Antikörper im Produktionsmaßstab und die Rolle chromatographischer Trennverfahren

Die Herstellung monoklonaler Antikörper beginnt mit der der Selektion der Produktionzelllinie, welche das jeweilige Produkt mit den gewünschten Eigenschaften produziert. Für die Auswahl werden Parameter wie die Produktivität, das Nebenproduktprofil oder das Glykosylierungsmuster evaluiert und beachtet (Li et al., 2010). Der Zell-Klon wird in einer *Master*-Zellbank archiviert. Der schematische Ablauf des *Upstream* Prozesses einer mAb Produktion ist in Abbildung 2 gezeigt.

1 Einleitung

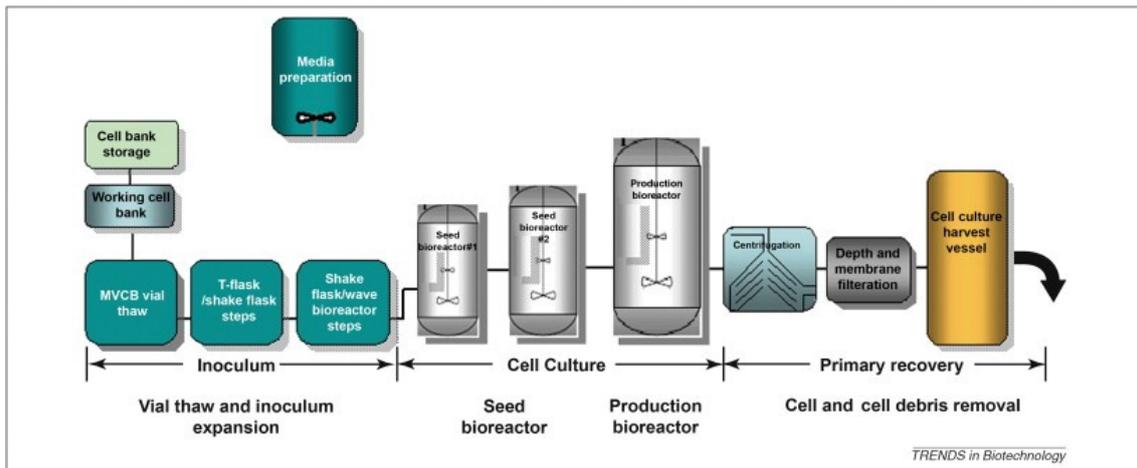


Abbildung 2: Schematischer Aufbau einer mAb Produktion durch Zellkultur im Produktionsmaßstab (Shukla und Thömmes, 2010).

Die Produktion beginnt mit dem Auftauen der Zellen und der Kultivierung im Kleinmaßstab. Das jeweilige Kulturvolumen wird anschließend schrittweise auf bis zu 10.000 L erhöht. Der Titer des Produktes kann zum Ende der Fermentation bis zu 5 bis 10 g/L betragen (Shukla und Thömmes, 2010). Im Anschluss werden die Zellen durch Zentrifugation vom Zellmedium getrennt, in welches die monoklonalen Antikörper sekretiert wurden. Dieser zellfreie Überstand wird filtriert und bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Im Anschluss erfolgt der *Downstream* Prozess, welcher die Aufreinigung des Zellüberstandes zur Isolation der Antikörper und Abtrennung unerwünschter Verunreinigungen bis hin zu einer therapeutisch unbedenklichen Reinheit und der Überführung in den Formulierungspuffer beinhaltet. Durch die in der Zellkultur erreichten hohen Produkttiter wurde der Aufreinigungsprozess in den letzten Jahren zu einem Engpass im Produktionsprozess (Hanke und Ottens, 2014). Aufgrund dessen und des hohen Kostenanteils des *Downstream* Prozesses von bis zu 70 % stellt dieser Teil der Produktion einen entscheidenden Faktor bei der erfolgreichen und kostengünstigen Entwicklung von Biopharmazeutika dar (Guiochon und Beaver, 2011; Strube et al., 2011). Eine schematische Übersicht eines industriellen Aufreinigungsverfahrens ist in Abbildung 3 dargestellt.

1 Einleitung

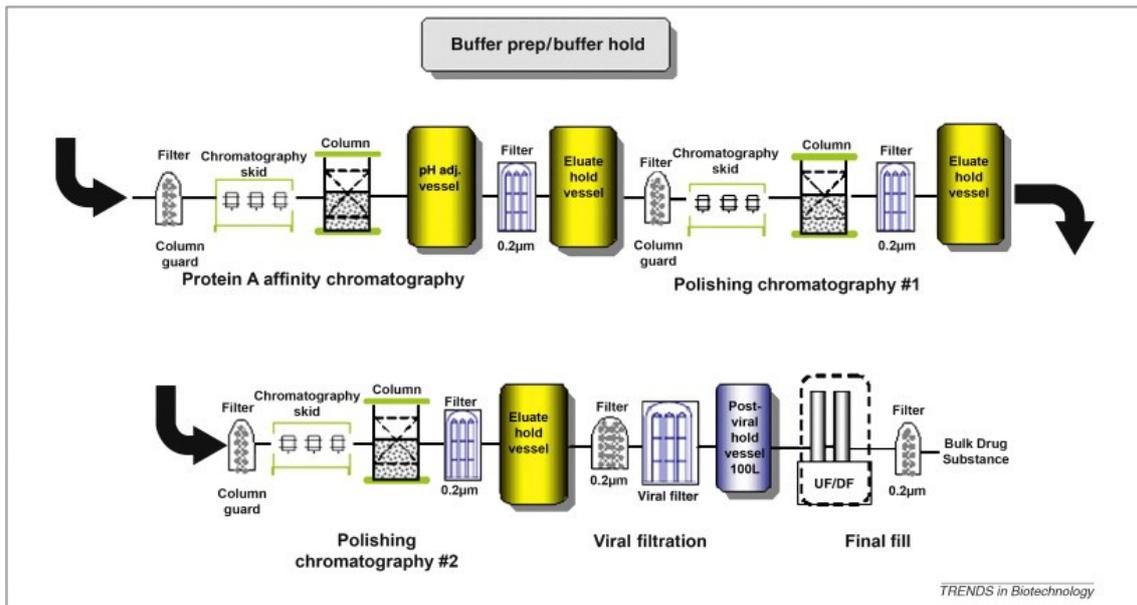


Abbildung 3: Schematische Aufbau eines mAb Aufreinigungsverfahrens im Produktionsmaßstab (Shukla und Thömmes, 2010).

Der Prozess beginnt mit einem Protein A Affinitätschromatographie Schritt. Das an die Säulenmaterial immobilisierte Protein A bindet unter physiologischen Bedingungen selektiv an den Fc-Teil monoklonaler Antikörper (Bjork et al., 1972). Der zellfreie Kulturüberstand kann direkt auf die Chromatographiesäule aufgetragen werden. Geeignete Waschstschritte unter Verwendung von Salz oder leicht geringerem pH-Wert eluiert teilweise unspezifisch gebundenes HCP (Zhang et al., 2016). Die Elution der monoklonalen Antikörper erfolgt bei pH-Werten von 3 - 4 (Shukla et al., 2007). Die Reinheit der monoklonalen Antikörper beträgt zu diesem Zeitpunkt bereits > 98 %, was die hohen Kosten von Protein A Resins rechtfertigt (Shukla et al., 2007). Anschließend erfolgt eine Virusinaktivierung des Eluates, indem es, je nach Produkt, für mehrere Stunden im Elutionspuffer der Protein A Chromatographie verbleibt (Sofer et al., 2003).

Im Anschluss erfolgt die Feinreinigung des mAb Produktes. Hier sind vor allem die in Kapitel 1.2 genannten Verunreinigungen von Bedeutung. Im Allgemeinen erfolgt eine zweistufige Kombination von Kationenaustauschchromatographie (CEX), Anionenaustauschchromatographie (AEX), hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) oder Mixed-Mode Chromatographie (MMC). Die Wahl des geeigneten Prozesses, also des zu verwendenden Chromatographie-Materials, der mobilen Phase und der weiteren Prozessparametern ist abhängig von den individuellen

1 Einleitung

Eigenschaften des jeweiligen Antikörpers. Eine Übersicht der wichtigsten Kenngrößen eines Chromatographieprozesses ist in Abbildung 4 gezeigt.

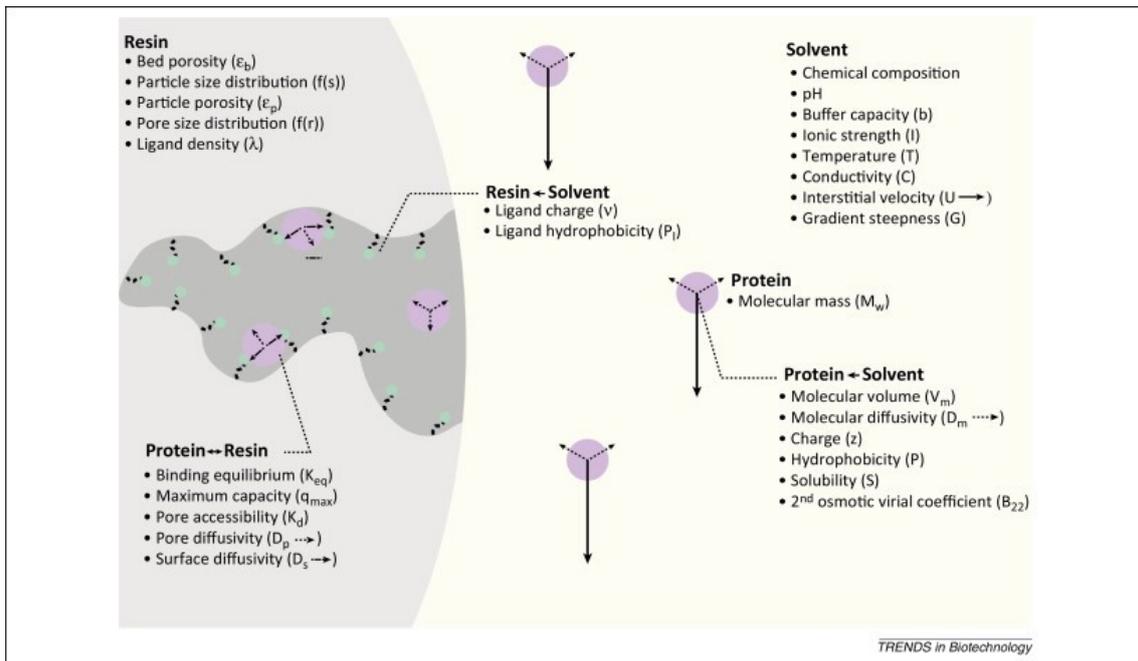


Abbildung 4: Wichtige Prozesse und deren Parameter bei der chromatographischen Trennung von Proteinen (Hanke und Ottens, 2014).

Die in Abbildung 4 gezeigten Kenngrößen werden unterteilt in Parameter, die beeinflusst und optimiert werden können, wie beispielsweise die Eigenschaften der mobilen Phase und andere Parameter, welche durch das Protein vorgegeben sind. Die Selektivität des Chromatographieschrittes wird von der Wahl der Chromatographiemethode, des Resins sowie von der mobilen Phase beeinflusst.

Die Ionenaustauschchromatographie ist vor allem zur Abtrennung von Fragmenten, Aggregaten und Ladungsvarianten geeignet (Vázquez-Rey und Lang, 2011; Zhang et al., 2011). Sie basiert auf der Interaktion der geladenen Aminosäuren des Proteins mit entgegengesetzt geladenen Liganden des Resins. Gegenionen werden durch die Bindung des Proteins ausgetauscht. Durch eine Erhöhung der Salzkonzentration kann dieses Gleichgewicht auf die Seite des ungebundenen Proteins verschoben werden, was zu einer Elution des Proteins führt. Eine weitere Möglichkeit ist die Variation des pH-Wertes und die damit einhergehende Veränderung der Nettoladung des Proteins. Im Vergleich zu Salzgradienten können pH-Gradienten eine verbesserte Selektivität aufzeigen (Ahamed et al., 2008; Zhou et al., 2007).

1 Einleitung

Die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) eignet sich zur Trennung von Proteinen mit unterschiedlicher Hydrophobizität, beispielsweise für hochmolekulare Aggregate (Lu et al., 2009). Die Bindung von monoklonalen Antikörpern an HIC Resins erfordert die Zugabe kosmotroper Salze und damit eine erhöhte Ionenstärke. Die daraus resultierende verringerte Hydrathülle der Proteine kann zur Aggregation führen (Vázquez-Rey und Lang, 2011).

Mixed-Mode Resins bestehen aus ionischen und hydrophoben Liganden und vereinen die Eigenschaften von Ionentauschern und HIC Resins, weshalb besondere Selektivitäten beispielsweise bei der Abtrennung von Aggregaten erzielt werden können (Holstein et al., 2012).

Die Feinreinigung enthält eine große Anzahl an variablen Prozessparametern, weshalb eine auf das Produkt angepasste Prozessentwicklung notwendig ist. Diese wird im nachfolgenden Kapitel näher beschrieben.

Der Prozess endet mit einer Diafiltration in einen auf das Produkt und die Applikation abgestimmten Formulierungspuffer. In Abhängigkeit der jeweiligen Applikation werden weiterhin Parameter, wie beispielsweise die Proteinkonzentration, eingestellt. Als finalen Schritt vor dem *Fill and Finish*, wird eine physische Virusabtrennung in Form einer Nanofiltration durchgeführt.

1.4 Prozessentwicklung unter Berücksichtigung industrieller Aspekte

Die Entwicklung geeigneter Chromatographieprozesse in der Feinreinigung ist ein entscheidender Faktor in der erfolgreichen Entwicklung von Biopharmazeutika (Guiochon und Beaver, 2011). Die Prozessentwicklung ist dabei oft ein Kompromiss aus der Effektivität des Prozesses und den damit einhergehenden Kosten bzw. der Entwicklungszeit. Die Entwicklung von Biosimilars übt zusätzlichen Druck hinsichtlich einer schnellen und effektiven Prozessentwicklung aus (Rathore, 2009). Die Rahmenbedingungen sind dabei vor allem durch die regulatorischen Vorgaben der *Food and Drug Administration* (FDA) bzw. der europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) vorgegeben.

Eine schematische Übersicht über die verschiedenen Ansätze der Prozessentwicklung ist in Abbildung 5 dargestellt. Die klassische Prozessentwicklung erfolgt einem *Trial and error* Prinzip, also einer rein empirischen Verkettung von Entwicklungsschritten auf Basis einzelner Experimente. Das anschließende Verständnis des Prozesses ist

1 Einleitung

somit gering und kleine Schwankungen einzelner Parameter innerhalb festgelegter Spezifikationen führen zu nicht voraussehbaren Prozess-Abweichungen.

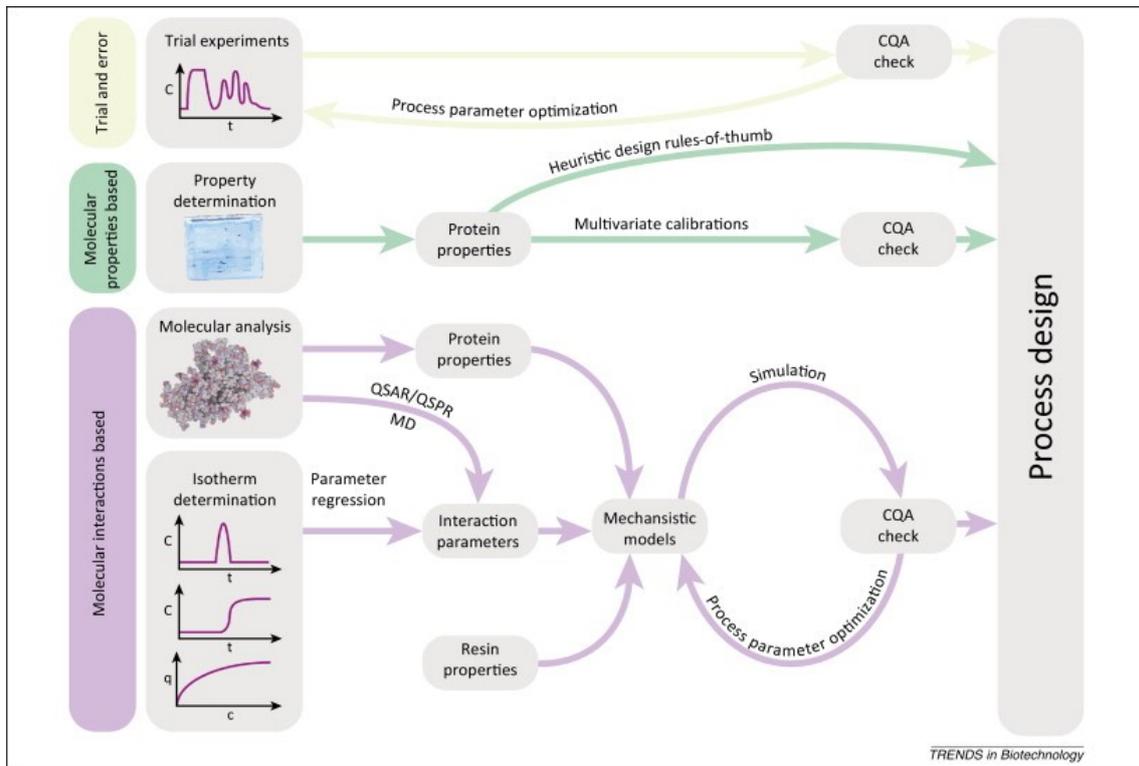


Abbildung 5: Schematische Darstellung der unschädlichen Ansätze der Prozessentwicklung von chromatographischen Trennungen von Proteinen (Hanke und Ottens, 2014).

Durch die aktuellen Forderungen der FDA zur Prozessentwicklung auf Basis des *Quality by Design* (QbD) unter Verwendung entsprechender Analyseverfahren (*Process Analytical Technology* (PAT)) entspricht diese empirische Prozessentwicklung nicht die aktuellen regulatorischen Anforderungen (FDA, 2011; Rathore und Winkle, 2009).

Das gleiche ist für die zweite Möglichkeit der in Abbildung 5 gezeigten Prozessentwicklung gültig. Rein empirische Experimente werden durch entsprechende abgestimmte Analyseverfahren auf die Eigenschaften des Proteins optimiert (Asenjo und Andrews, 2004). So geben beispielsweise Unterschiede zwischen Produkt und Verunreinigung in der Größe oder Hydrophobizität einen Hinweis auf die geeignete Chromatographiemethode. Durch die über die Zeit gesammelten Erfahrungen kann so die Anzahl an benötigten Experimenten reduziert werden.

1 Einleitung

Für die Definition von kritischen Qualitätsparametern (*critical quality attributes* (CQAs)) des Proteins in Abhängigkeit von kritischen Prozessparametern (*critical process parameters* (CPPs)) ist jedoch eine systematische Analyse und die Entwicklung eines tiefgreifenden Prozessverständnisses erforderlich (Hanke und Ottens, 2014). Dessen Grundlage sind Daten, die über den gesamten Prozess gesammelt und miteinander in Verbindung gebracht werden.

Vor allem durch die Einführung der *High Throughput Screening* (HTS) Technologie wird die Menge an verfügbaren Daten immer größer. Die erhaltenen Datensätze können in Kombination mit einer multivarianten Datenanalyse und dem *Design of Experiment*-Ansatz (DoE) in empirische Zusammenhänge gebracht werden, die zur Bestimmung optimaler Prozessparameter dienen (Kirdar et al., 2008). Dieser Prozess wird auch als *High Throughput Process Development* (HTPD) bezeichnet. Vorteile dieses Ansatzes sind die kurze Entwicklungsdauer und der große dahinterstehende Datensatz. Da die Daten auf rein empirischen Zusammenhängen beruhen, sind Voraussagen von Prozessabweichungen und eine Verknüpfung verschiedener Datensätze schwierig.

Eine Weiterentwicklung stellen mechanistische Modelle dar, welche in dieser Arbeit eine zentrale Rolle einnehmen und im nachfolgenden Kapitel behandelt werden.

1.5 Mathematische Modellierung chromatographischer Verfahren

Die Beschreibung chromatographischer Prozesse durch mathematische Modelle ist seit Jahrzehnten von wissenschaftlichen Interesse (Staby et al., 2017). Die Implementierung dieser Modelle in der Entwicklung von biopharmazeutischen Prozessen ist ein moderner Ansatz (Hanke und Ottens, 2014). Dies ist für die Zellkultur im *Upstream*-Bereich (Gernaey et al., 2010) als auch *Downstream*-Bereich gültig (Mollerup et al., 2010).

Für den *Downstream*-Bereich hat die Anwendung mathematischer Modelle mehrere Vorteile. So kann beispielsweise die Retention des Zielproteins und verschiedenerer Verunreinigungen exakt charakterisiert werden und optimale Bedingungen für eine Trennung festgelegt werden (Klutters et al., 2016). Weiterhin können Toleranzbereiche für verschiedene Parameter festgelegt werden, die zusammengefasst einen *Design Space* ergeben (Close et al., 2014). Die angewandten Modelle können in zwei Gruppen unterteilt werden: Empirische Modelle, ähnlich wie beim DoE-Ansatz und

1 Einleitung

mechanistische Modelle, die auf physikalischen Prozessen und Größen basieren (Osberghaus et al., 2012). Durch die Charakterisierung dieser physikalischen Prozesse wird das allgemeine Prozessverständnis gesteigert und Voraussagen über die Veränderung von CPPs bei erlaubten Schwankungen innerhalb der Spezifikation anderer Parameter verbessert.

In chromatographischen Prozessen bestehen die Modelle in der Regel aus zwei Teilen. Der erste Teil beschreibt die dynamischen Prozesse der mobilen Phase und den Massentransfer (Gritti und Guiochon, 2012). In dieser Arbeit wird hierzu ein *Lumped-rate* Modell verwendet (siehe Abschnitt 2.6.9) (Ingham, 2007; Schmidt-Traub et al., 2012). Andere Modelle, wie beispielsweise ein *General-rate* Modell erhöhen durch ihre Komplexität die Qualität der Voraussagen, beinhalten jedoch eine höhere Anzahl an Parametern und benötigen eine erhöhte Rechenkapazität (Schmidt-Traub et al., 2012).

Der zweite Teil beschreibt die Austauschreaktionen des Proteins und der Salze mit den Liganden. Ein verbreitetes Modell für die Adsorption von Proteinen auf Ionentauschern ist das stöchiometrische Austauschmodell (Helfferich, 1962), welches für hohe Proteinbeladungen durch einen sterischen Limitierungsfaktor erweitert werden kann (Brooks und Cramer, 1992). Dieses SMA Modell (*steric mass action*) bietet einen guten Kompromiss zwischen dem Aufwand zur Bestimmung der benötigten Parameter und der Genauigkeit der berechneten Vorhersagen und wird daher breit angewendet (Huuk et al., 2017; Kluters et al., 2016; Pedersen et al., 2003; Schmidt et al., 2014). Die Anwendbarkeit des Modells wird durch mehrere Annahmen, beispielsweise die Exklusion von Co-Ionen in der Resin Phase, gesteigert (Helfferich, 1962; Saunders et al., 1989). Die dadurch verringerte Komplexität führt zu einer Limitierung des Modells, da beispielsweise der pH-Wert der Resin-Phase dem der Bulk-Phase, gleichgesetzt wird. Diese Annahmen wurden in mehreren Publikationen widerlegt und zeigen, dass das SMA Modell unter bestimmten Bedingungen den Chromatographie-Prozess nicht korrekt wiedergeben kann (Boardman und Partridge, 1955; Goldstein, 1976; Heumann und Baier, 1982; Peterson und Gowen, 1953; Peterson und Jeffers, 1952; Vermeulen, 1984).

Einen komplexeren Ansatz verwendet das Donnan-Ionen-Austausch (DIX) Modell (Jansen et al., 1996). Es berücksichtigt den Donnan-Effekt, welcher die Verteilung unterschiedliche geladener Ionen in einem zweiphasigen System beschreibt (Donnan,

1 Einleitung

1911). Die Bedeutung des Donnan-Effektes wurde in mehreren Publikationen gezeigt (Gregor, 1951; Lodi et al., 2017; Shen und Frey, 2004; Yigit et al., 2012). Jansen et al. berücksichtigten diesen Effekt in ihrem Modell für die Ionenaustauschchromatographie und konnten so Parameter wie den pH-Wert in der Resin-Phase und die Konzentration jeder ionischen Spezies beschreiben (Jansen et al., 1996). Auch die Verteilung dissoziierender Elektrolyte wurde gezeigt (Jansen et al., 1997). Das Modell wurde in mehreren weiteren Publikationen beispielsweise zur Charakterisierung von Chromatographie-Resins (Lendero et al., 2008) oder der Berechnung der Verteilung von Aminosäuren angewandt (Wu et al., 2016). Die Applikation auf Proteinchromatographie wurde von Shen et al. gezeigt, jedoch ist das Modell nur nahe des isoelektrischen Punktes des Proteins gültig (Shen und Frey, 2004).

Mechanistische Modelle sind ebenfalls für hydrophobe Interaktionschromatographie (Chen et al., 2008) und Mixed-Mode Chromatographie (Lee et al., 2016) vorhanden. Die Modellierung von Mixed-Mode Resins ist dabei eine besondere Herausforderung, da sie verschiedene Liganden enthalten und die Adsorption des Proteins an die Liganden auf mehrere Interaktionen zurückzuführen ist. Dennoch ist aktuell die Mixed-Mode Chromatographie von großem Forschungsinteresse, da hier die verschiedenen Vorteile, beispielweise eine höhere Bindekapazität oder Selektivität, miteinander kombiniert werden können (Chen et al., 2010).

1.6 Starke und schwache Kationentauscher und deren Unterschiede

Schwache Ionentauscher unterscheiden sich in der chemischen Natur der funktionellen Gruppe von starken Ionenaustauschern. Für schwache Kationentauscher werden Carboxy-Gruppen verwendet, während für starke Kationentauscher Sulfonsäure-Gruppen verwendet werden. Der Unterschied liegt dabei in der Eigenschaft der Carboxy-Gruppen, im Bereich von pH 4 bis 6 zu dissoziieren und so die Menge an geladenen Liganden zu variieren. Während starke Kationentauscher oft höhere Bindekapazitäten besitzen (Staby et al., 2006), zeigen schwache Kationentauscher Vorteile in der Selektivität von Proteinaggregaten (Liu et al., 2010), PEG-modifizierten Proteinen (Ramon et al., 2005) oder anderen Kationen (Stenholm et al., 2006). Aufgrund dessen sind neben der weit verbreiteten Anwendung starker Kationentauscher auch schwache Kationentauscher von wissenschaftlichen Interesse, auch bei der Anwendung von mathematischer Modellierung (Melter et al., 2008; Wittkopp et al., 2018).

1 Einleitung

1.7 Ziel des Projektes

Ziel dieser Arbeit ist die mathematische Modellierung chromatographischer Trennungen von Proteinen mit schwachen Kationentauschern. Hierfür soll die Anwendbarkeit bestehender Chromatographie Modelle untersucht werden oder, falls nötig, ein geeignetes, neues Modell entwickelt werden.

Der zentrale Fokus liegt dabei auf Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern und deren produktspezifischen Verunreinigungen, wie Fragmenten, Aggregaten oder Ladungsvarianten. Mit Hilfe von linearen Gradientenelutionen unter Verwendung von pH-, NaCl- oder kombinierten pH/Salzgradienten wird das Elutionsverhalten experimentell untersucht. Die Auswertung der experimentellen Ergebnisse liefert den Datensatz für die computerbasierte Modellierung und Voraussage. Basierend auf den Ergebnissen der Modellierung mit dem entwickelten Modell werden die Unterschiede zwischen starken und schwachen Kationentauschern charakterisiert.

Das entwickelte Modell für Ionentauscher soll anschließend auf Mixed-Mode Chromatographie-Materialien, welche schwache Liganden enthalten, übertragen werden. Die verwendeten Mixed-Mode Prototypen enthalten unterschiedliche Aminosäure-Modifikationen.

Für die Modellierungsexperimente sollen geeignete Methoden beispielsweise für die Berechnung von pH-Gradienten oder zur Analyse der Verunreinigungen entwickelt werden.

2 Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Instrumente

Folgende Instrumente wurden während des Projekts verwendet:

Tabelle 1: Übersicht über verwendete Instrumente.

Name	Hersteller	Beschreibung
Äkta Purifier 10	GE Healthcare	Chromatographie System
Äkta Micro	GE Healthcare	HPLC System
Hanna Edge HI2020-02	Hanna Instruments	pH Meter
Agilent 8453	Agilent Technologies	Spectrometer
MilliQ	Merck Millipore	Reinstwasser Anlage
Sartorius Research R200D	Sartorius	Feinwaage
Sonorex Super 10 P	Bandelin	Ultraschallbad

2.2 Computerprogramme

Folgende Computerprogramme wurden in diesem Projekt verwendet:

Tabelle 2: Übersicht über verwendete Computerprogramme.

Name	Hersteller	Beschreibung
Unicorn 5.31	GE Healthcare	Chromatographie Steuerung und Auswertung
Peak Fit	Seasolve	Mathematische Beschreibung von Peak Formen
Buffer Maker	BPP Marcel Borowski	Berechnung von Puffern
Berkeley Madonna	Berkeley Madonna Inc.	Modellierungs- und Simulationssoftware

Name	Hersteller	Beschreibung
-------------	-------------------	---------------------

2 Material und Methoden

Table Curve 2D	Systat	Mathematische Beschreibung von experimentellen Datenpunkten
Table Curve 3D	Systat	Mathematische Beschreibung von experimentellen Datenpunkten

2.3 Chemikalien und Puffersysteme

Folgende Chemikalien bzw. Puffersubstanzen wurden verwendet:

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.

Name	Hersteller
Bernsteinsäure	Sigma Aldrich
CHES	Sigma Aldrich
Dextran Blau	Sigma Aldrich
Dinatriumdihydrogenphosphat	Merck Millipore
Essigsäure	AppliChem
Ethanol	Berkel AHK GmbH
HEPES	Sigma Aldrich
MES	Sigma Aldrich
MOPS	Sigma Aldrich
MOPSO	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Merck Millipore
Natriumhydroxid	Merck Millipore
Salzsäure	Merck Millipore
TAPS	Sigma Aldrich
Zitronensäure	Merck Millipore

2 Material und Methoden

Ein Teil dieser Arbeit behandelt die Herstellung von Puffersystemen für die Proteinelution mit linearen pH-Gradienten. Die verschiedenen Vorgehensweisen werden im Folgenden erläutert.

2.3.1 Berechnung von homogenen Puffersystemen

Die Elution von Proteinen mit CEX-Materialien ist neben den traditionellen Salzgradienten auch mit steigenden pH-Gradienten möglich. Das Protein wird entladen und so eluiert. Die pH-Gradienten werden durch eine Kombination von einzelnen Puffersubstanzen ermöglicht. Jede Puffersubstanz hat einen oder mehrere individuelle pK_S -Werte, welche eine entsprechende Titrationskurve festlegen. Durch geeignete Kombination mehrerer Puffersubstanzen führt die Überlagerung der Titrationskurven zu einem linearen pH-Gradienten. Die Grundlagen zur Berechnung der Titrationskurven und der damit einhergehenden Pufferkapazität wurden von Urbansky et al. veröffentlicht (Urbansky und Schock, 2000). Kröner et al. publizierten eine Anleitung zur Herstellung dieser Puffermixturen (Kröner und Hubbuch, 2013). Die Konzentration einer nicht dissoziierten monoprotischen Puffersubstanz $[B^+]$ kann über folgenden Zusammenhang berechnet werden (Urbansky und Schock, 2000):

$$[B^+] = \frac{c_a K_a}{c_{H^+} + K_a} - c_{H^+} + \frac{K_w}{c_{H^+}} \quad (1)$$

Hierbei ist die gesamte Konzentration der Puffersubstanz c_a , die Dissoziationskonstante der Puffersubstanz K_a , die Dissoziationskonstante K_w von Wasser und die Konzentration an H^+ Ionen c_{H^+} . Ist die jeweilige Puffersubstanz in beiden Puffern A und B enthalten, ist die Konzentration über den pH-Gradienten konstant. Ein solches Puffersystem wird im Folgenden als homogenes Puffersystem bezeichnet. Die Pufferkapazität β ist die Ableitung der Konzentration nach dem pH-Wert.

Bei einem homogenen Puffersystem ist sie definiert als (Urbansky und Schock, 2000):

$$\beta = \frac{d}{dpH} [B^+] = \ln(10) \left(\frac{c_a K_a c_{H^+}}{(K_a + c_{H^+})^2} + c_{H^+} + \frac{K_w}{c_{H^+}^2} \right) \quad (2)$$

In einem System aus mehreren Puffersubstanzen wird die Gesamtpufferkapazität wie folgt berechnet (Kröner und Hubbuch, 2013):

2 Material und Methoden

$$\beta_{Total} = \sum_i \beta_i \quad (3)$$

Für die Berechnung eines linearen pH-Gradienten werden die einzelnen Pufferkonzentrationen so variiert, dass eine lineare Abhängigkeit zwischen Gesamtpufferkapazität und pH-Wert entsteht:

$$\beta_{Total} - \beta_0 \longrightarrow 0 \quad (4)$$

Hier ist die jeweils gewünschte mittlere Pufferkapazität β_0 . Diese Berechnung wurde unter Verwendung des Mathematik-Programmes Berkeley Madonna® durchgeführt.

2.3.2 Berechnung von diskontinuierlichen Puffersystemen

Gleichung (2) aus Kapitel 2.3.1 setzt voraus, dass die Konzentration der Puffersubstanz c_a konstant ist. Am Anfang dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, wie sich die Berechnung der Pufferkapazität ändert, wenn einzelne Puffersubstanzen ausschließlich in Puffer A oder Puffer B verwendet werden und ob dies einen positiven Einfluss auf die jeweilige durchgeführte Chromatographie hat. Ein solches Puffersystem wird im Folgenden als diskontinuierliches Puffersystem bezeichnet. Die Methode zur Berechnung dieser diskontinuierlichen Puffersysteme wurde publiziert und wird im Folgenden erläutert (Wittkopp et al., DRAFT). Die pH-Abhängigkeit der jeweiligen Puffersubstanz wird über die Parameter a und b definiert:

$$\left[c_{a,pH} \right] = a * pH - b \quad (5)$$

Die Puffersubstanzen, welche ausschließlich in Puffer A vorhanden sind, werden über den Gradienten verdünnt, wohingegen Puffersubstanzen aus Puffer B konzentriert werden. Demzufolge ist die Definition der Parameter a und b je nach Zugehörigkeit zu Puffer A oder B unterschiedlich definiert:

$$\begin{aligned} a_{PufferA} &= \frac{-c_{a,0}}{pH_E - pH_S} & b_{PufferA} &= a_{PufferA} * pH_E \\ a_{PufferB} &= \frac{c_{a,0}}{pH_E - pH_S} & b_{PufferB} &= a_{PufferB} * pH_S \end{aligned} \quad (6)$$

Hierbei beschreibt $c_{a,0}$ die jeweilige Konzentration der Substanzen in Puffer A bzw. Puffer B. Gleichung (1) ändert sich wie folgt:

2 Material und Methoden

$$[B^+] = \left\{ \left(-a \log_{10}(c_{H^+}) - b \right) \frac{K_a}{c_{H^+} + K_a} \right\} - c_{H^+} + \frac{K_W}{c_{H^+}} \quad (7)$$

Die Ableitung der H^+ -Konzentration über den pH-Wert ergibt sich aus der Definition des pH-Wertes:

$$\frac{dc_{H^+}}{dpH} = -\ln(10)c_{H^+} \quad (8)$$

Die Ableitung von Gleichung (7) und die Kombination mit (8) ergibt:

$$\beta = (-\ln(10)[c_{H^+}]) \left(-\frac{K_a \left(-\frac{a \ln(c_{H^+})}{\ln(10)} - b \right)}{(c_{H^+} + K_a)^2} - \frac{aK_a}{\ln(10)c_{H^+}(c_{H^+} + K_a)} - \frac{K_W}{c_{H^+}^2} - 1 \right) \quad (9)$$

Gleichung (9) ist nur für monoprotische Puffersubstanzen gültig. Für diprotische Substanzen mit den Dissoziationskonstanten $K_{a,1}$ und $K_{a,2}$ ändert sich Gleichung (1). Dadurch ändert sich Gleichung (7) für diprotische Puffersubstanzen zu:

$$[B^+] = c_a \left(\frac{K_{a,1}c_{H^+} + 2K_{a,1}K_{a,2}}{c_{H^+}^2 + K_{a,1}c_{H^+} + K_{a,1}K_{a,2}} \right) - c_{H^+} + \frac{K_W}{c_{H^+}} \quad (10)$$

Für die Pufferkapazität ergibt sich:

$$\beta = \frac{d}{dpH} [B^+] = (-\ln(10)c_{H^+}) \left(\frac{K_{a,1} \left(-\frac{a \ln(c_{H^+})}{\ln(10)} - b \right)}{c_{H^+}^2 + K_{a,1}c_{H^+} + K_{a,1}K_{a,2}} - \frac{(2c_{H^+} + K_{a,1})(K_{a,1}c_{H^+} + 2K_{a,1}K_{a,2}) \left(-\frac{a \ln(c_{H^+})}{\ln(10)} - b \right)}{(c_{H^+}^2 + K_{a,1}c_{H^+} + K_{a,1}K_{a,2})^2} - \frac{a(K_{a,1}c_{H^+} + 2K_{a,1}K_{a,2})}{\ln(10)c_{H^+}(c_{H^+}^2 + K_{a,1}c_{H^+} + K_{a,1}K_{a,2})} - \frac{K_W}{c_{H^+}^2} - 1 \right) \quad (11)$$

Die Berechnung triprotischer Puffersubstanzen kann äquivalent durchgeführt werden. Bei basischen Puffersubstanzen muss mit der jeweiligen OH^- -Konzentration gerechnet

2 Material und Methoden

werden. Des Weiteren kann die Abhängigkeit der pK_s -Werte von der Ionenstärke I über die Davis-Gleichung bzw. Debye-Hückel-Gleichung eingefügt werden, um die Berechnungen zu optimieren (Davis, 1962; Debye und Hückel, 1923). Die Einführung der Davies-Gleichung für ein Ion mit der Ladung z ergibt folgende Gleichung (Nagai et al., 2008):

$$pK_{a,i}^{eff} = pK_{a,i} + 2(z_{a,i} - 1) \left[\frac{A_{Debye} \sqrt{I}}{\sqrt{I} + 1} - B_{Debye} I \right] \quad (12)$$

Die Parameter A_{Debye} und B_{Debye} sind für jedes Lösungsmittel und Ion individuell zu bestimmen.

2.3.3 Übersicht über die verwendeten Puffersysteme

Eine Übersicht über die verwendeten Puffer ist im Folgenden dargestellt.

2.3.3.1 Pufferrezepte und Parameter für Abschnitt 3.6: Modellierung der Trennung von Antikörper-Monomer, -Dimer und HMW Spezies auf einem starken Kationentauscher

Tabelle 4: pH-Pufferrezept für Abschnitt 3.6: Modellierung der Trennung von Antikörper-Monomer, -Dimer und HMW Spezies auf einem starken Kationentauscher.

Substanz	Konzentration im Bindepuffer [mmol/L]	Konzentration im Elutionspuffer [mmol/L]
Essigsäure	12	-
MES x H ₂ O	13	-
MOPSO	6	6
HEPES	-	10
TAPS	-	8
CHES	-	10
NaCl	5,1	29,3
NaOH	24,2	0
pH-Wert	4,5	9,5

2 Material und Methoden

Die Salzkonzentrationen für die Modellierungsexperimente mit pH-Gradienten in Abschnitt 3.6 betragen 29,3 / 80 / 110 / 170 oder 230 mmol/L.

2.3.3.2 Pufferrezepte und Parameter für Abschnitt 3.7: Modellierung von mAb05 auf Carboxy-, SO₃- und gemixten Kationentauschern

Tabelle 5: pH-Pufferrezept für Abschnitt 3.7: Modellierung von mAb05 auf Carboxy-, SO₃- und gemixten Kationentauschern.

Substanz	Konzentration im Bindepuffer [mmol/L]	Konzentration im Elutionspuffer [mmol/L]
Essigsäure	14,1	-
MES × H ₂ O	23,4	-
MOPSO	-	28,1
TAPS	-	12,2
NaCl	25,6	-
NaOH	8,4	34,0
pH-Wert	4,75	8,5

Die Salzkonzentrationen für die Modellierungsexperimente mit pH-Gradienten in Abschnitt 3.7 betragen 34 / 60 / 90 / 130 oder 180 mmol/L. Für die Salzgradienten wurden folgende Puffer verwendet:

Tabelle 6: Salzgradienten Pufferrezept für Abschnitt 3.7: Modellierung von mAb05 auf Carboxy-, SO₃- und gemixten Kationentauschern.

pH-Wert	Puffersubstanz	Na ⁺ Konzentration
5,0	25 mmol/L Essigsäure	25 / 325 mmol/L
6,0	25 mmol/L MES	10 / 210 mmol/L
7,0	25 mmol/L MOPSO	13 / 213 mmol/L

2 Material und Methoden

2.3.3.3 Pufferrezepte und Parameter für Abschnitt 3.8: Modellierung der Trennung von Antikörper Ladungsvarianten auf Carboxy- und SO₃-Tauschern

Tabelle 7: pH-Pufferrezept für Abschnitt 3.8: Modellierung der Trennung von Antikörper Ladungsvarianten auf Carboxy- und SO₃-Tauschern.

Substanz	Konzentration im Bindepuffer [mmol/L]	Konzentration im Elutionspuffer [mmol/L]
Essigsäure	15,6	15,6
MES	12,1	12,1
MOPSO	3,8	3,8
HEPES	9,4	9,4
TAPS	8,2	8,2
CHES	13,4	13,4
NaCl	39,7	0,0
NaOH	9,3	49,0
pH-Wert	4,75	8,75

Die Salzkonzentrationen für die Modellierungsexperimente mit pH-Gradienten in Abschnitt 3.8 betragen 50 / 75 / 100 / 150 / 200 mmol/L. Für die Salzgradienten wurden folgende Pufferrezepte verwendet:

Tabelle 8: Salzgradienten Pufferrezept für Abschnitt 3.8: Modellierung der Trennung von Antikörper Ladungsvarianten auf Carboxy- und SO₃-Tauschern.

pH-Wert	Puffersubstanz	Na⁺-Konzentration
5,0	50 mmol/L Essigsäure	45/ 500 mmol/L
6,0	50 mmol/L MES	45/ 500 mmol/L
7,0	30 mmol/L MOPSO	35 / 500 mmol/L

2 Material und Methoden

2.3.3.4 Pufferrezepte und Parameter für Abschnitt 3.9: Modellierung von Carboxy-Mixed-Mode-Tauschern mit unterschiedlicher Aminosäure-Modifikation

Tabelle 9: pH Pufferrezept für Abschnitt 3.9: Modellierung von Carboxy-Mixed-Mode-Tauschern mit unterschiedlicher Aminosäure-Modifikation.

Substanz	Konzentration im Bindepuffer [mmol/L]	Konzentration im Elutionspuffer [mmol/L]
Essigsäure	15,65	15,65
MES	12,20	12,20
MOPSO	3,66	3,66
HEPES	9,69	9,69
TAPS	7,64	7,64
CHES	15,07	15,07
NaCl	41,5	3,5
NaOH	8,5	46,5
pH-Wert	4,75	8,5

Die Salzkonzentrationen für die Modellierungsexperimente mit pH-Gradienten in Abschnitt 3.9 betragen 50 / 75 / 100 / 150 / 200 oder 250 mmol/L. Für die Salzgradienten wurden folgende Pufferrezepte verwendet:

Tabelle 10: Salzgradienten Pufferrezept für Abschnitt 3.9: Modellierung von Carboxy-Mixed-Mode-Tauschern mit unterschiedlicher Aminosäure-Modifikation.

pH-Wert	Puffersubstanz	Na⁺-Konzentration
5,0	Mix aus Tabelle 9	50 / 600 mmol/L
6,0	Mix aus Tabelle 9	50 / 600 mmol/L
7,0	Mix aus Tabelle 9	50 / 600 mmol/L bzw. 30 / 600 mmol/L

2 Material und Methoden

2.4 Chromatographie Gele

2.4.1 Präparative Ionentauscher

Alle präparativen Kationenaustausch-Experimente wurden mit Chromatographie-Gelen, auch Resins genannt, der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Sie wurden von der Firma Repligen (Weingarten, Deutschland) in 2,5 mL (0,8 x 5 cm) und 1 mL (0,5 x 5 cm) MiniChrom Formate gepackt. Tabelle 11 zeigt eine Übersicht über die verwendeten präparativen Kationentauscher:

Tabelle 11: Übersicht zur Ligandenzusammensetzung und Ligandendichte der verwendeten präparativen Ionenaustauschchromatographie-Resins.

Name	Art des Liganden	Ligandendichte Trockenmasse Λ_{TM} [$\mu\text{eq}/\text{mg}$]	Kompressions- faktor F_K	Volumen [mL]
Prototyp Resin 1	100 % COO	786	0,1	2,5
Prototyp Resin 2	88 % COO, 12 % SO ₃	775	0,1	2,5
Prototyp Resin 3	73 % COO, 27 % SO ₃	791	0,1	2,5
Prototyp Resin 4	100 % SO ₃	701	0,1	2,5
Eshmuno® CPX	100 % SO ₃	600	0,1	2,5
Prototyp 5	100 % COO	520	0,1	1,0

2.4.2 Präparative Mixed-Mode-Gele

Alle präparativen Mixed-Mode-Experimente wurden mit Resins der Firma Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Sie wurden von der Firma Repligen (Weingarten, Deutschland) in 1 mL (0,5 x 5 cm) MiniChrom Format gepackt. Die in diesem Projekt verwendeten Materialien haben als Liganden die Aminosäuren Valin und Leucin gekoppelt und können sowohl über die Carboxylgruppe ionische Wechselwirkungen als auch über die CH₃-Gruppe hydrophobe Wechselwirkungen eingehen. Tabelle 12 zeigt eine Übersicht der wichtigsten Parameter.

2 Material und Methoden

Tabelle 12: Übersicht zur Ligandenzusammensetzung und Ligandendichte der verwendeten, präparativen Mixed-Mode Chromatographie-Resins.

Name	Art Liganden	Ligandendichte	Kompressions- faktor F_K	Volumen [mL]
		Trockenmasse Λ_{TM} [$\mu\text{eq}/\text{mg}$]		
Prototyp Resin 6	Valin	564	0,1	1,0
Prototyp Resin 7	Valin	718	0,1	1,0
Prototyp Resin 8	Valin	891	0,1	1,0
Prototyp Resin 9	Leucin	514	0,1	1,0

2.4.3 Präparative Protein A-Gele

Für die Aufreinigung von mAb-Zellkulturüberständen wurde eine Protein A-Säule (PROSEP Ultra Plus, Merck KGaA, Darmstadt) verwendet. Die Säulendimension betrug 2,6 x 25,2 cm (535 mL).

2.4.4 HPLC-Säulen

Für die Analyse von Proben wurden folgende HPLC-Säulen verwendet:

Tabelle 13: Übersicht zu den verwendeten HPLC-Säulen.

Name	Art der Trennung	Hersteller	Dimensionen
BioPro SP-F	CEX	YMC	4,6 x 50 mm
BioSep s3000	SEC	Phenomenex	7,8 x 300 mm

2 Material und Methoden

2.5 Monoklonaler Antikörper und Probenvorbereitung

Im diesem Projekt wurden zwei monoklonale Antikörper der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Tabelle 14: Verwendete monoklonale Antikörper.

Name	Hersteller
mAb04	Merck KGaA
mAb05	Merck KGaA

Die Antikörper wurden gefroren als 0,2 µm filtrierter Zellkulturüberstand zur Verfügung gestellt. Die Lagerung erfolgte bis zur Verwendung bei - 20 °C.

2.5.1 Protein A-Reinigung monoklonaler Antikörper

Die Lösungen wurden bei 37 °C aufgetaut und mittels Protein A-Chromatographie aufgereinigt. Hierzu wurden folgende Puffer verwendet:

Tabelle 15: Puffer für Protein A-Chromatographie.

Funktion	Zusammensetzung
Bindungspuffer	50 mM Zitronensäure, pH 5
Elutionspuffer	50 mM Zitronensäure, pH 3

Der pH-Wert der Puffer wurde mit HCl eingestellt. Anschließend wurden die Puffer mit einem 0,45 µm Cellulose-Nitrat-Filter (Sartorius, Göttingen, Deutschland) filtriert und 20 min im Ultraschallbad entgast. Die Protein A-Säule wurde für mindestens 5 CV mit Puffer A equilibriert und die Probe mit der Proben-Pumpe aufgetragen. Im Anschluss folgte ein 10 CV Waschschrift mit Bindungspuffer. Die Elution wurde in Form einer Stufe von 0 auf 100 % Elutionspuffer durchgeführt. Der gesammelte Elutionspool wurde mit 0,1 mol/L NaOH auf pH 5 eingestellt. Die Probe wurde bis zur Verwendung bei - 20°C gelagert.

2 Material und Methoden

2.5.2 Aufreinigung von Antikörper-Ladungsvarianten

Eine Besonderheit stellt die Mab04-Probe dar, da sie einen hohen Anteil Ladungsvarianten enthält (siehe Analyse in Absatz 3.4). Diese wurden durch die CEX mit dem Ziel aufgetrennt, sie gesondert in den Modellierungsläufen untersuchen zu können. Es wurde hierzu eine 17 mL (1,5 x 9,5 cm) Eshmuno CPX-Säule verwendet. Die Flussrate betrug 10 mL/min. Die Methode hierfür ist in Tabelle 16 zusammengefasst:

Tabelle 16: Ablaufschema der LGE Experimente.

Schritt	Puffer	Dauer
Equilibrierung	25 mM MOPSO, pH 7	10 CV
Auftrag der Probe	Probe + 25 mM MOPSO, pH 7	
Waschen	25 mM MOPSO, pH 7	10 CV
Elution im Gradienten	25 mM MOPSO, pH 7 25 mM MOPSO, 200 mM NaCl, pH 7	50 CV
Reinigung	CIP Puffer	10 CV
Reequilibrierung	25 mM MOPSO, pH 7	10 CV

Der Elutionspeak wurde fraktioniert und mit CE-HPLC analysiert (Abschnitt 2.9). Es wurden die drei Hauptvarianten (siehe Abschnitt 3.4) als Pools zusammengefasst und bis zu den Modellierungsversuchen bei - 20°C gelagert.

2.5.3 Herstellen der mAb05-Monomer, -Dimer und -Aggregat-Probe

Für die Modellierung von Monomeren, Dimeren und Aggregaten aus Abschnitt 3.6 wird eine Probe mit erhöhtem Aggregatanteil benötigt. Die Bildung von Aggregaten wurde in der Protein A-Chromatographie erreicht. Durch rasches Einstellen des pH-Wertes des Elutionspools auf pH 5 bilden sich durch die plötzliche pH-Änderung vermehrt Aggregate. Eine genaue Beschreibung der Methode wurde von Kluters et al. veröffentlicht (Kluters et al., 2016).

2 Material und Methoden

2.6 Modellierung von Proteintrennungen und Retentionen in chromatographischen Prozessen

Mathematische Modelle für die Beschreibung chromatographischer Proteintrennungen bestehen im Allgemeinen aus zwei Teile. Der erste Teil wird allgemein als Adsorptionsmodelle bezeichnet und beschreibt die Wechselwirkungen der einzelnen Spezies (Ståhlberg, 1999). Der zweite Teil beschreibt die dynamischen Prozesse innerhalb der Chromatographiesäule und wird in Abschnitt 2.6.9 beschrieben. Der Inhalt dieser Arbeit ist unter anderem die Weiterentwicklung und der Vergleich zweier Adsorptionsmodelle, die im Folgenden beschrieben werden.

2.6.1 Das stöchiometrische Austausch Modell

Das stöchiometrische Austausch (SD) Modell wurde von Helfferich beschrieben und wird breit angewendet (Helfferich, 1962). Grundlage ist der ionische Austausch des gebundenen Salzes S mit der Ladung z durch ein Protein P mit der Ladung v am Liganden L (Mollerup et al., 2010):



Für Na^+ ist $z = 1$. Die Ladung des Proteins v ist ähnlich zur Nettoladung, jedoch nicht identisch (siehe Gleichung (17)). Im Falle hydrophober Wechselwirkungen enthält Gleichung (13) weitere Parameter (Mollerup, 2014). Unter der Vernachlässigung der Aktivitätskoeffizienten des Salzes und des Proteins ist die Gleichgewichtskonstante K_{eq} von Gleichung (13) gegeben durch (Mollerup et al., 2010):

$$K_{eq} = \frac{c_P^R}{c_P^B} \left(\frac{c_S^B}{c_S^R} \right)^v \quad (14)$$

Die Indizes R und B stehen für Resin, die gebundene Spezies und Bulk, die Spezies in der flüssigen Pufferphase. Gerstner et al. beschrieben K_{eq} durch die freie Gibbs-Energien für das Protein (ΔG_p^0) und das Salz (ΔG_s^0) (Gerstner et al., 1994; Mollerup et al., 2007; Pedersen et al., 2003):

$$\ln(K_{eq}) = \frac{-\Delta G_p^0}{RT} + v \frac{\Delta G_s^0}{RT} \quad (15)$$

Helfferich entwickelte die Annahme, dass unter niedrigen Salzkonzentrationen die Konzentration des Salzes in der Resin-Phase der Ligandendichte entspricht

2 Material und Methoden

(Helfferich, 1962). Unter der Annahme geringer Proteinbeladung, also im linearen Bereich der Isotherme zwischen freiem und gebundenen Protein, ergibt die Kombination von Gleichung (14) und (15) den Verteilungskoeffizienten A (Pedersen et al., 2003):

$$A = \frac{c_P^R}{c_P^B} = e^{\frac{-\Delta G_P^0 + \nu \Delta G_S^0}{RT}} \left(\frac{\Lambda^-}{c_S^B} \right)^\nu \quad (16)$$

Die Anzahl der Bindungsstellen ν des Proteins ist abhängig vom pH-Wert und kann über die Anzahl an positiv geladenen Aminosäuren N_{+i} und negativ geladenen Aminosäuren N_{-i} , die am Austausch teilnehmen, beschrieben werden (Schmidt et al., 2014).

$$\nu_{pH_{R/B}} = \sum_i -\frac{N_{-i}}{1+10^{pK_{a_i}-pH_{R/B}}} + \sum_i \frac{N_{+i}}{1+10^{pH_{R/B}-pK_{a_i}}} \quad (17)$$

Für hohe Proteinkonzentrationen entwickelten Brooks und Cramer das SMA Modell (Brooks und Cramer, 1992). Es modifiziert die Gleichung (16) mit einem Abschirmfaktor σ , der die Anzahl an unzugänglichen Liganden in Abhängigkeit der Proteinkonzentration beschreibt (Brooks und Cramer, 1992):

$$c_P^B = \frac{c_S^R}{K_{eq}} \left(\frac{c_S^R}{\Lambda^- - (\sigma + \nu) c_P^B} \right)^\nu \quad (18)$$

Das Modell enthält einige Annahmen, unter anderem:

1. Co-Ionen, wie z.B. Cl^- werden vollständig aus der Resin-Phase ausgeschlossen (Helfferich, 1962).
2. Durch den Ausschluss an Co-Ionen ist die maximale Konzentration an Gegenionen, wie z.B. Na^+ , auf die Konzentration der Ligandendichte beschränkt.
3. Der pH-Wert der Resin- und Bulk -Phase ist gleich. Dadurch kann in Gleichung (17) der pH-Wert der Bulk-Phase verwendet werden (Schmidt et al., 2014).

Diese Vereinfachungen erleichtern die Anwendbarkeit des Modells, schränken es jedoch auch ein. In diesem Projekt konnten deshalb einige Datensätze nicht beschrieben werden (siehe Abbildung 34), weswegen das DIX-Modell für die Protein Chromatographie adaptiert und angewandt wurde. Dies wird im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

2 Material und Methoden

2.6.2 Das Donnan-Ionen-Austausch Modell

Das Donnan-Ionen-Austausch (DIX) Modell wurde von Jansen et al. entwickelt (Jansen et al., 1996). Im Gegensatz zum SD-Modell berücksichtigt es den Donnan-Effekt (Donnan, 1911), der auch als Donnan-Gibbs-Gleichgewicht bezeichnet wird. Der Effekt beschreibt Konzentrationsveränderungen von Ionen an einer semipermeablen Membran durch immobilisierte bzw. nicht frei bewegliche Ladungen. Vereinfacht betrachtet wird eine Spezies, die die gleiche Ladung wie die nicht frei bewegliche Spezies besitzt, in der jeweiligen Phase abgereichert. Für entgegengesetzt geladene Spezies dreht sich der Effekt um. Bereits 1962 beschrieb Helfferich den Einfluss dieses Effektes auf Chromatographie-Gele (Helfferich, 1962). Jansen et al. berücksichtigten den Effekt für die Herleitung ihres Chromatographie Modells (Jansen et al., 1996).

Die Grundlage des Modells ist eine Bilanzierung der Ladungen in der Resin- bzw. Bulk-Phase des Ionentauschers:

$$\sum_c (a_c^R)^{1/z_c} \sum_a (a_a^R)^{-1/z_a} = \sum_c \left[(a_c^B)^{1/z_c} S_{c,H^+}^{1/(z_c z_{H^+})} \right] \sum_a \left[(a_a^B)^{1/z_a} S_{a,OH^-}^{1/(z_a z_{OH^-})} \right] \quad (19)$$

In diesem Fall bezeichnet α die Aktivität von Kationen c und Anionen a mit der jeweiligen Ladung z. Die Selektivität $S_{x,y}$ beschreibt besondere individuelle Affinitäten. Sie ist definiert als:

$$S_{x,y} = \left(\frac{a_x^R}{a_x^B} \right)^{z_y} \left(\frac{a_y^B}{a_y^R} \right)^{z_x} \quad (20)$$

Ab diesem Punkt wurde im Rahmen dieser Arbeit der Bilanzierung von Jansen et al. ein geladenes Protein hinzugefügt (Wittkopp et al., 2018). Da das Protein ebenfalls Ladungen enthält und frei beweglich ist, kann es wie ein weiteres Ion dem Modell hinzugefügt werden. Eine Besonderheit besteht in der Eigenschaft des Proteins in Abhängigkeit des pH-Wertes die Nettoladung zu ändern, was auf die Titration der einzelnen Aminosäuren im Protein zurückzuführen ist. Da das DIX-Modell den pH-Wert zwischen Resin- und Bulk-Phase unterscheidet, ändert das Protein seine Ladung je nach Phasenzugehörigkeit. Der pH-Wert des Resins ist zusätzlich abhängig von der jeweiligen Salzkonzentration, sodass auch diese indirekt einen Einfluss auf die Ladung des Proteins hat. Diese Zusammenhänge werden in Abbildung 6 veranschaulicht. Ein ähnlicher Ansatz wurde von Shen et al. in Bezug auf das H^+ -Gleichgewicht

2 Material und Methoden

veröffentlicht, jedoch eignen sich ihre Berechnungen nur für den Bereich nahe des isoelektrischen Punkts pI des Proteins (Shen und Frey, 2004).

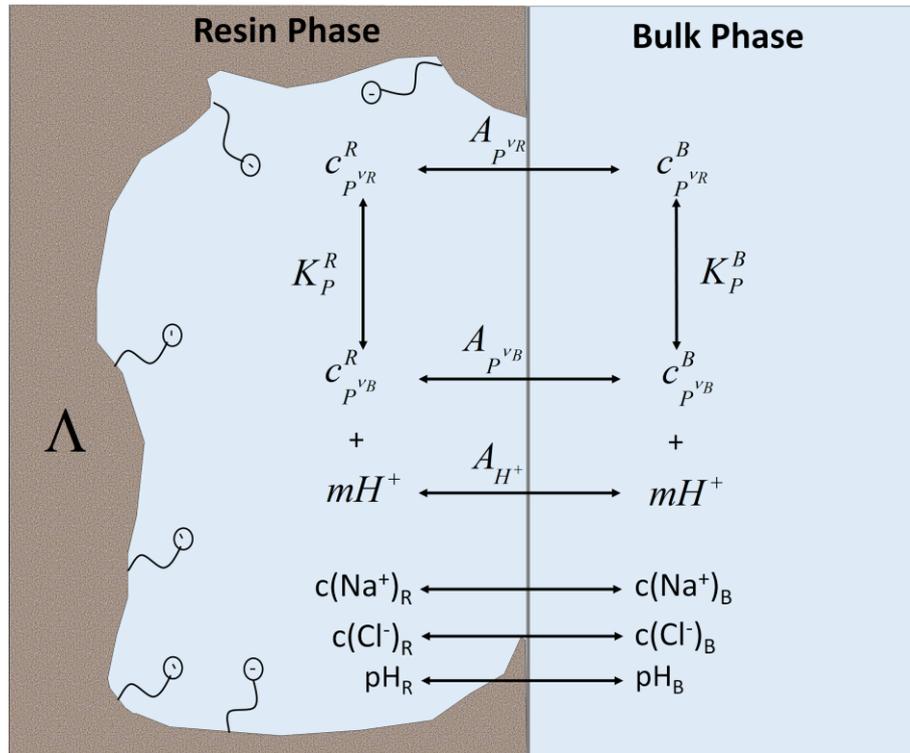


Abbildung 6: Schematische Verteilung eines geladenen Proteins zwischen Bulk- und Resin-Phase unter Berücksichtigung des DIX-Modells (Wittkopp et al., 2018).

Durch die Einführung eines Proteins ändert sich Gleichung (19) zu (Wittkopp et al., 2018):

$$\begin{aligned} & \left[\sum_c (a_c^R)^{1/z_c} + (a_{P^{vR}}^R)^{1/v_R} \right] \sum_a (a_a^R)^{-1/z_a} \\ &= \left\{ \sum_c \left[(a_c^B)^{1/z_c} S_{c,H^+}^{1/(z_c z_{H^+})} \right] + (a_{P^{vR}}^B)^{1/v_R} S_{P^{vR},H^+}^{1/v_R} \right\} \sum_a \left[(a_a^B)^{1/z_a} S_{a,OH^-}^{1/(z_a z_{OH^-})} \right] \end{aligned} \quad (21)$$

Die jeweiligen Aktivitäten sind definiert über die Konzentration c und den jeweiligen Aktivitätskoeffizienten γ :

$$a = c\gamma \quad (22)$$

Bei geringen Konzentrationen bzw. zur Vereinfachung können die Aktivitätskoeffizienten auf 1 gesetzt werden, sodass Aktivitäten durch Konzentrationen ersetzt werden können. Für die weitere Herleitung werden die Bedingungen in der

2 Material und Methoden

Resin-Phase betrachtet. Da zu jedem Zeitpunkt Elektroneutralität bestehen muss, kann folgender Zusammenhang hergestellt werden (Wittkopp et al., 2018):

$$\sum_c z_c c_c^R + v_R c_{P^{v_R}}^R - \Lambda^- = \sum_a -z_a c_a^R \quad (23)$$

Die Summen der Ionen aus Gleichung (23) können zusammengefasst werden zu (Jansen et al., 1996):

$$A = \left(\sum_a c_a^B S_{a,OH^-} \right) \quad (24)$$

$$C = \left(\sum_c c_c^B S_{c,H^+} \right)$$

Die Gleichungen (23) und (24) können miteinander kombiniert werden, sodass nach Umstellung der Gleichung folgender Zusammenhang entsteht (Wittkopp et al., 2018):

$$\left(\frac{c_{H^+}^R}{c_{H^+}^B} \right) \left[C \left(\frac{c_{H^+}^R}{c_{H^+}^B} \right) + v_R \left(c_{P^{v_R},H^+}^B S_{P^{v_R},H^+} \left(\frac{c_{H^+}^R}{c_{H^+}^B} \right)^{v_R} \right) - \Lambda^- \right] - A = 0 \quad (25)$$

Das Verhältnis der H⁺-Ionen zwischen Resin- und Bulk-Phase kann über die Selektivität des Proteins zu H⁺ ausgedrückt werden:

$$S_{P^{v_R},H^+} = \frac{c_{P^{v_R}}^R}{c_{P^{v_R}}^B} \left(\frac{c_{H^+}^B}{c_{H^+}^R} \right)^{v_R} \rightarrow \frac{c_{H^+}^R}{c_{H^+}^B} = \left(\frac{c_{P^{v_R}}^R}{c_{P^{v_R}}^B} \frac{1}{S_{P^{v_R},H^+}} \right)^{1/v_R} \quad (26)$$

Die Kombination aus Gleichung (25) und (26) ergibt:

$$v_R c_{P^{v_R}}^R \left(\frac{c_{H^+}^R}{c_{H^+}^B} \right) + \left(\frac{c_{H^+}^R}{c_{H^+}^B} \right)^2 C - \left(\frac{c_{H^+}^R}{c_{H^+}^B} \right) \Lambda^- - A = 0 \quad (27)$$

Wird Gleichung (27) nach dem Verhältnis von H⁺ in der Resin- bzw. Bulk-Phase aufgelöst, wird folgende Formel erhalten:

$$\frac{c_{H^+}^R}{c_{H^+}^B} = \frac{\sqrt{\left(c_{P^{v_R}}^R \right)^2 v_R^2 - 2 \Lambda^- c_{P^{v_R}}^R v_R + 4AC + \left(\Lambda^- \right)^2} - c_{P^{v_R}}^R v_R + \Lambda^-}{2C} \quad (28)$$

Zur weiteren Herleitung ist eine genauere Definition der Summenparameter A und C notwendig. Laut Gleichung (24) beinhalten die Parameter alle positiv bzw. geladenen Spezies bis auf das Protein und die Liganden des Ionentauschers. Bei den in diesem

2 Material und Methoden

Projekt durchgeführten Experimenten sind das die Salz-Ionen sowie die Puffersubstanzen:

$$\begin{aligned}
 A &= \left(\sum_a c_a^B S_{a,OH^-} \right) = c_{Cl^-}^B S_{Cl^-,OH^-} + \alpha_{AA} c_{AA}^{0,pH} S_{AA,OH^-} \\
 &+ \beta_{MES} c_{MES}^{0,pH} S_{MES,OH^-} + \beta_{MOPSO} c_{MOPSO}^{0,pH} S_{MOPSO,OH^-} + \beta_{TAPS} c_{TAPS}^{0,pH} S_{TAPS,OH^-} \\
 C &= \left(\sum_c c_c^B S_{c,H^+} \right) = c_{Na^+}^B S_{Na^+,H^+}
 \end{aligned} \tag{29}$$

Hierbei sind der Dissoziationsgrad α_i bzw. die Assoziationskoeffizienten β_i wie folgt definiert:

$$\alpha = \frac{HA}{c^0} = \frac{K_s}{c_{H^+}^B + K_s} \quad \beta = 1 - \alpha \tag{30}$$

Diese Unterscheidung ist notwendig, da die in den Experimenten eingesetzten Puffersubstanzen mit steigendem pH-Wert ihre Ladung von neutral zu negativ geladen (z.B. Essigsäure) bzw. von negativ geladen zu zwitterionisch ändern (z.B. MES). Bei einem diskontinuierlichen Puffersystem (siehe Abschnitt 2.3.2) ist zu beachten, dass sich die Konzentration c_0 ändern kann. Um eine notwendige Iteration zur mathematischen Lösung an dieser Stelle zu vermeiden und zur Vereinfachung des Modells, werden im Folgenden die Selektivitäten der Pufferionen und der Cl-Ionen gleichgesetzt. Dadurch wird der Einfluss der Pufferionen vernachlässigt und die Summe aller negativ geladenen Spezies ist aufgrund der Elektroneutralität gleich der Konzentration an Na^+ -Ionen. So vereinfacht sich Gleichung (29) zu:

$$\begin{aligned}
 A &= c_{Cl^-}^B S_{Cl^-,OH^-} \\
 C &= c_{Na^+}^B S_{Na^+,H^+}
 \end{aligned} \tag{31}$$

Der Selektivitätskoeffizient von Na^+ zu H^+ ist definiert als:

$$S_{Na^+,H^+} = \frac{c_{Na^+}^R c_{H^+}^B}{c_{Na^+}^B c_{H^+}^R} \tag{32}$$

Die Kombination der Gleichungen(28), (31) und (32) ergibt:

2 Material und Methoden

$$\frac{c_{Na^+}^R}{c_{Na^+}^B} = \frac{\sqrt{(c_{P^{vR}}^R)^2 v_R^2 - 2\Lambda^- c_{P^{vR}}^R v_R + 4c_{Cl^-}^B c_{Na^+}^B S_{Cl^-,OH^-} S_{Na^+,H^+} + (\Lambda^-)^2} - c_{P^{vR}}^R v_R + \Lambda^-}{2c_{Na^+}^B} = r_D \quad (33)$$

Das Verhältnis der Na⁺-Ionen zwischen Resin- und Bulk-Phase ist im Zusammenhang mit dem Donnan-Effekt von Bedeutung und wird als r_D-Wert bezeichnet. Mit ihm können weitere Ionenkonzentrationen, wie z.B. die der H⁺-Ionen, über den in Gleichung (32) gezeigten Zusammenhang berechnet werden. Gleichung (33) zeigt den Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und r_D-Wert. Für den pH-Wert in der Resin-Phase pH_R folgt:

$$pH_R = pH_B - \text{Log}_{10}(r_D) + \text{Log}_{10}(S_{Na^+,H^+}) \quad (34)$$

Für die Berechnung von Ionenkonzentrationen der Resin-Phase folgt:

$$c_{Na^+}^R = r_D c_{Na^+}^B \quad (35)$$

$$c_{Cl^-}^R = S_{Cl^-,OH^-} \frac{c_{Cl^-}^B}{r_D} \quad (36)$$

Für die Berechnung des Phasenverhältnisses der Proteinkonzentration sind weitere Umstellungen notwendig. Wird in Gleichung (32) die Konzentration der Na⁺-Ionen durch das Protein ersetzt, ändert sich die Gleichung zu:

$$S_{P^{vR},H^+} = \frac{c_{P^{vR}}^R}{c_{P^{vR}}^B} \left(\frac{c_{H^+}^B}{c_{H^+}^R} \right)^{v_R} \quad (37)$$

Die Kombination der Selektivitäten aus den Gleichungen (32) und (37) ergibt:

$$\frac{c_{P^{vR}}^R}{c_{P^{vR}}^B} = \left(\frac{c_{H^+}^R}{c_{H^+}^B} \frac{1}{S_{P^{vR},Na^+}} \right)^{1/v_R} \frac{1}{S_{Na^+,H^+}} \quad (38)$$

Das Einsetzen von Gleichung (38) in Gleichung (33) ergibt:

2 Material und Methoden

$$\frac{c_{P^{vR}}^R}{c_{P^{vR}}^B} = S_{P^{vR}, Na^+} \left[\frac{\sqrt{\left(c_{P^{vR}}^R\right)^2 v_R^2 - 2\Lambda^- c_{P^{vR}}^R v_R + 4c_{Cl^-}^B c_{Na^+}^B S_{Cl^-, OH^-} S_{Na^+, H^+} + \left(\Lambda^-\right)^2}}{2c_{Na^+}^B} \right]^{v_R} \left[\frac{-c_{P^{vR}}^R v_R + \Lambda^-}{2c_{Na^+}^B} \right]^{v_R} \quad (39)$$

Gleichung (39) zeigt den vollständigen Zusammenhang der Änderung der Proteinkonzentration zwischen Resin- und Bulk-Phase in Abhängigkeit des pH-Wertes, der Salzkonzentration, der Ligandendichte sowie der individuellen Selektivitäten. Eine direkte Lösung von Gleichung (39) ist nicht möglich ist, da die Gleichung nicht explizit nach der Proteinkonzentration der Resin-Phase aufgelöst werden kann. Folglich ist ein iterativer Lösungsansatz notwendig. Bei einer geringen Proteinkonzentration kann der Einfluss des Proteins auf den r_D -Wert vernachlässigt werden, wobei Gleichung (33) wie folgt vereinfacht wird:

$$r_D = \frac{c_C^R}{c_C^B} = S_{C, H^+} \frac{\sqrt{4AC + \left(\Lambda^-\right)^2} + \Lambda^-}{2C} \quad (40)$$

Dies entspricht der Lösung, die von Jansen et al. für ein rein ionisches System publiziert wurde (Jansen et al., 1996).

Auch die Gleichung für den Verteilungskoeffizienten des Proteins wird vereinfacht zu:

$$\frac{c_{P^{vR}}^R}{c_{P^{vR}}^B} = S_{P^{vR}, C} \left[\frac{\sqrt{4AC + \left(\Lambda^-\right)^2} + \Lambda^-}{2C} S_{C, H^+} \right]^{v_R} = S_{P^{vR}, C} [r_D]^{v_R} \quad (41)$$

Die Kombination aus Gleichung (39) und (41) ergibt:

$$\frac{c_{P^{vR}}^R}{c_{P^{vR}}^B} = S_{P^{vR}, C} \left[\frac{S_{C, H^+} \frac{\sqrt{4AC + \left(\Lambda^-\right)^2} + \Lambda^-}{2C}}{\frac{\sqrt{\left(c_{P^{vR}}^R\right)^2 v_R^2 - 2\Lambda^- c_{P^{vR}}^R v_R + 4AC + \left(\Lambda^-\right)^2} - c_{P^{vR}}^R v_R + \Lambda^-}{\sqrt{4AC + \left(\Lambda^-\right)^2} + \Lambda^-}} \right]^{v_R} \quad (42)$$

Gleichung (42) kann in zwei Teilen betrachtet werden. Der a-Teil entspricht Gleichung (41) und berechnet den Einfluss der Ionen auf den r_D -Werte. Der b-Teil berücksichtigt

2 Material und Methoden

zusätzlich den Einfluss der Ladung des Proteins auf den r_D -Wert und kann für geringe Proteinkonzentrationen vernachlässigt werden. Eine genaue Berechnung zum Einfluss der Proteinladung auf den r_D -Wert wird in Abschnitt 3.2 betrachtet.

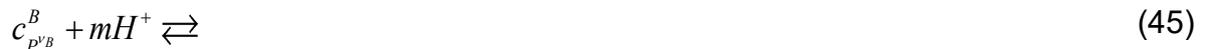
Wenn sich die Aktivitätskoeffizienten des Wassers zwischen beiden Phasen nicht unterscheiden und Quelleffekte vernachlässigt werden, kann die Selektivität durch die Gleichgewichtskonstante ausgedrückt werden (Jansen et al., 1996). Gleichung (41) ändert sich wie folgt:

$$\frac{c_{P^{v_R}}^R}{c_{P^{v_R}}^B} = K_{P^{v_R}, Na^+} r_D^{v_R} = K_{P^{v_R}, Na^+} \left(\frac{c_{Na^+}^R}{c_{Na^+}^B} \right)^{v_R} \quad (43)$$

Für den Verteilungskoeffizienten des Proteins mit der Ladung v_B ergibt sich:

$$\frac{c_{P^{v_B}}^R}{c_{P^{v_B}}^B} = K_{P^{v_B}, Na^+} r_D^{v_B} = K_{P^{v_B}, Na^+} \left(\frac{c_{Na^+}^R}{c_{Na^+}^B} \right)^{v_B} \quad (44)$$

Der nachfolgende Abschnitt behandelt die genauere Beschreibung des Verteilungskoeffizienten des Proteins A. Abbildung 6 zeigt, dass zwischen dem Protein mit der Ladung v_B und dem der Ladung v_R unterschieden werden muss. Ladung v_R repräsentiert die Ladung des Proteins am pH-Wert der Resin Phase; v_B die der Bulk-Phase. Beide Ladungszustände haben einen eigenen Verteilungskoeffizienten $A_{P^{v_R}}$ bzw. $A_{P^{v_B}}$. Den jeweils anderen Ladungszustand erhält das Protein je nach Phase durch Aufnahme bzw. Abgabe von H^+ -Ionen:



Der Prozess, indem ein Protein von der Bulk-Phase in die Resin-Phase übergeht, kann über zwei Abläufe erfolgen: Das Protein behält die Ladung bei und überschreitet die Phasengrenze ($A_{P^{v_B}} + K_P^R$) oder die Ladung passt sich jener der Resin Phase an, bevor die Phasengrenze überschritten wird ($K_P^B + A_{P^{v_R}}$). Mit Hilfe des DIX-Modells können nur die Werte von $A_{P^{v_R}}$ und $A_{P^{v_B}}$ berechnet werden. Für die Berechnung der Gleichgewichte von K_P^R und K_P^B sind ebenfalls Modelle verfügbar, welche in vier Gruppen unterteilt werden können. Die Herausforderung stellt dabei die Veränderung des pK_s -Wertes aufgrund verschiedener Einflussparameter, wie z.B. pH-Wert,

2 Material und Methoden

Salzkonzentration, Position der Aminosäure, Dissoziationsgrad oder der Proteinfaltung dar (Laskowski und Scheraga, 1954; Salis et al., 2011; Spassov und Bashford, 1999). Die erste Gruppe an Modellen postuliert nur eine dissoziierende Gruppe mit einem pK_s -Wert (Shen und Frey, 2004). Die zweite Gruppen geht von mehreren identischen, aber unabhängigen Gruppen aus (Scatchard, 1949; Tanford, 1961). Die dritte Gruppe berücksichtigt den Einfluss der unterschiedlichen Gruppen zueinander (Günther et al., 1997; Tanford und Roxby, 1972). Die vierte Gruppe beinhaltet komplexe Modelle, die eine Gruppierung unterschiedlicher Subspezies zu vermeiden versucht. Dieser moderne Rechenansatz erfordert die genaue Kenntnis jedes pK_s -Wertes in Abhängigkeit aller Einflussparameter (Spassov und Yan, 2008). Ein Nachteil ist die hohe benötigte Rechenleistung, was einen routinemäßigen Einsatz in diesem Projekt ausschließt. Eine mögliche Anwendung des Modells mit unabhängigen Liganden wurde innerhalb dieses Projektes untersucht, jedoch sind ganzzahlige Werte für die Ladung des Proteins notwendig (Cantor und Schimmel, 1980; Tanford, 1961). Ebenfalls wurde das Modell mit nur einem dissoziierenden Liganden von Shen et al. untersucht, wobei dieses nur nahe des isoelektrischen Punktes pI des Proteins gültig ist (Shen und Frey, 2004). Beide Voraussetzungen sind in diesem Projekt nicht gegeben, sodass diese Modelle nicht angewendet werden können.

Es wurde die Annahme getroffen, dass das Gleichgewicht der Reaktionen in der Bulk- bzw. Resin-Phase stark auf einer Seite liegt und damit die Gleichgewichtskonstanten K_P^R und K_P^B sehr groß bzw. sehr klein sind. Die vorherrschende Protein Spezies entspricht dem Ladungszustand, welcher zum pH-Wert der jeweiligen Phase passt. Sind die pH-Werte der Phasen unterschiedlich, kann die Annahme getroffen werden, dass das Protein nahezu vollständig im Zustand $c_{P^{v_B}}^B$ in der Bulk-Phase vorliegt. Es wird folgender Zusammenhang festgehalten:

$$c_{P^{v_B}}^B \gg \quad (46)$$

Für die Verteilungskoeffizienten von $A_{P^{v_R}}$ und Gleichung (44) gilt:

$$A_{P^{v_R}} = K_{P^{v_R}, Na^+} r_D^{v_R} \quad (47)$$

Für $A_{P^{v_B}}$ wird folgende Gleichung erhalten:

2 Material und Methoden

$$A_{P^{v_B}} = K_{P^{v_B}, Na^+} r_D^{v_B} \quad (48)$$

Für die Verteilung des Proteins kann folgender Zusammenhang hergeleitet werden:

$$\frac{c_P^R}{c_P^B} = \frac{c_{P^{v_R}}^R + c_{P^{v_B}}^R}{c_{P^{v_R}}^B + c_{P^{v_B}}^B} = \frac{A_{P^{v_R}} c_{P^{v_R}}^B + A_{P^{v_B}} c_{P^{v_B}}^B}{c_{P^{v_R}}^B + c_{P^{v_B}}^B} = \left(A_{P^{v_R}} - A_{P^{v_B}} \right) \frac{c_{P^{v_R}}^B}{c_P^B} + A_{P^{v_B}} \quad (49)$$

Mit der Annahme aus Gleichung (46) ergibt sich:

$$\frac{c_P^R}{c_P^B} = A_{P^{v_B}} = \frac{c_{P^{v_B}}^R}{c_{P^{v_B}}^B} \quad \text{für} \quad \frac{c_{P^{v_R}}^B}{c_P^B} \rightarrow 0 \quad (50)$$

Somit ist gezeigt, dass Gleichung (48) die finale Lösung für den Verteilungskoeffizienten des Proteins in der hier gezeigten Adaption des DIX-Modells ist. Die Ladung des Proteins in der Resin-Phase v_R ist für die Berechnungen vernachlässigbar. In diesem Zusammenhang ist die Annahme aus Gleichung (46) zu nennen, die das Modell vereinfacht. Eine weitere Diskussion der Annahme wird in Kapitel 3.5.1 durchgeführt.

2.6.3 Verbindung zwischen SD- und DIX-Modell

Nach der Herleitung bzw. Adaption der beiden SD- und DIX-Modelle werden in diesem Kapitel die Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede beschrieben. Beide Herleitungen enthalten stöchiometrische Ansätze; das DIX-Modell basiert jedoch zusätzlich auf einer Bilanzierung der Ladungen (siehe Gleichung (19)). Dies führt dazu, dass die Aufnahme weiterer Spezies, wie beispielweise Cl-Ionen, Puffersubstanzen oder auch neutral geladene Spezies, beschrieben werden können (Jansen et al., 1997; Jansen et al., 1996). Dies macht die Unterscheidung der beiden Phasen, zum Beispiel bezüglich des pH-Wertes, möglich. Weiterhin ist die Salzkonzentration im DIX-Modell nicht auf die Ligandendichte limitiert, sondern kann je nach Bulk-Konzentration beliebig ansteigen. Ein detaillierter Vergleich wurde durch Jansen et al. aufgestellt (Jansen et al., 1996).

Der Vergleich der Gleichungen für den Verteilungskoeffizienten des Proteins A zeigt den Unterschied. Für das SD-Modell gilt aus Gleichung (16):

2 Material und Methoden

$$A_{SD} = \frac{c_P^R}{c_P^B} = K_{eq} \left(\frac{\Lambda^-}{c_{Na^+}^B} \right)^v \quad (51)$$

Das DIX-Modell liefert für den gleichen Zusammenhang aus Gleichung (44):

$$A_{DIX} = A_{P^{v_B}} = \frac{c_{P^{v_B}}^R}{c_{P^{v_B}}^B} = K_{P^{v_B}, Na^+} \left(\frac{c_{Na^+}^R}{c_{Na^+}^B} \right)^{v_B} = K_{P^{v_B}, Na^+} r_D^{v_B} \quad (52)$$

Es wird deutlich, dass nur der Parameter der Salzkonzentration der Resin-Phase unterschiedlich ist. Im SD-Modell wird dieser gleich der Ligandendichte Λ gesetzt und damit unabhängig von der Salzkonzentration in der Bulk-Phase definiert. Das DIX-Modell trifft diese Annahme nicht und berechnet je nach gewählten Bedingungen einen individuellen r_D -Wert. Dieser ist je nach gewählten Bedingungen und Vereinfachungen von der Proteinkonzentration, der Konzentration weiterer geladener Spezies, in jedem Fall aber von der Salzkonzentration der Bulk-Phase und der Ligandendichte abhängig (siehe Gleichung (33)).

2.6.4 Das Mixed Mode Modell

In diesem Projekt wurden neben Kationentauschern auch Mixed-Mode-Gele verwendet. Dieser Begriff fasst unterschiedliche Materialien zusammen, die aus mehr als einer Art an Liganden bestehen und so unterschiedliche Interaktionen erlauben.

2.6.4.1 Modell von Nfor et al. und Lee et al.

Ein geeignetes Modell wurde von Nfor et al. publiziert (Nfor et al., 2010). Lee et al. erweiterten das Modell und zeigten die Anwendung auf pH-Wert, Salz- und duale Gradienten (Lee et al., 2016). Das Modell kombiniert das SD-Modell mit einer Beschreibung der hydrophoben Wechselwirkungen. Die Austausch-Reaktion beinhaltet neben dem ionischen Austausch auch einen hydrophoben Austausch und wird im Vergleich zum SD-Modell wie folgt geändert (Lee et al., 2016):



Somit ändert sich auch die Gleichgewichtskonstante K (Lee et al., 2016):

2 Material und Methoden

$$K_{eq} = \frac{c_P^R}{c_P^B} \left(\frac{c_{Na^+}^B}{c_{Na^+}^B} \right)^v \left(\frac{c}{c_{LW_\xi}} \right)^n \left(\frac{1}{\gamma_P} \right) a_w^{n\xi} \quad (54)$$

Gleichung (58) beinhaltet die molare Konzentration von Wasser pro Volumen c , die Konzentration an hydrophoben Liganden c_{LW_ξ} , den Aktivitätskoeffizienten des Proteins, die Anzahl an hydrophoben Wechselwirkungen n sowie den Aktivität von Wasser a_w . Bei einem Resin mit einem Verhältnis von ionischen Liganden zu hydrophoben Liganden von 1:1 folgt für den Verteilungskoeffizienten des Proteins A:

$$A_{MM} = \frac{\Lambda^{n+v}}{c^n \left(c_{Na^+}^B \right)^v} \exp \left(\frac{-\Delta G_P^0}{RT} + v \frac{\Delta G_S^0}{RT} \right) \exp \left(c_{Na^+}^B K_S^{MM} \right) \quad (55)$$

Für die Berechnung von Gleichung (55) wird zusätzlich der Interaktionsparameter des Salzes für hydrophobe Wechselwirkungen K_S^{MM} benötigt, welche abhängig vom pH-Wert ist. (Lee et al., 2017b; Nfor et al., 2010):

$$K_S^{MM} = \alpha e^{(pH\beta)} \quad (56)$$

2.6.4.2 Kombination des Mixed-Mode Models mit dem DIX Model

Im Folgenden wird das Modell von Lee et al. mit der Herleitung des DIX-Modells kombiniert. Ziel ist es, die Anzahl an benötigten Annahmen zu verringern. Da das Modell von Lee et al. vom SD-Modell abgeleitet wurde, enthält es ebenfalls die Annahme, dass die Salzkonzentration in der Resin-Phase gleich der Ligandendichte ist. Mit Hilfe des DIX-Modells und Gleichung (35) kann diese Annahme eliminiert werden. Gleichung (55) ändert sich daher wie folgt:

$$A_{MM,DIX} = \frac{(r_D c_{Na^+}^B)^{n+v_B}}{c^n \left(c_{Na^+}^B \right)^{v_B}} \exp \left(\frac{-\Delta G_P^0}{RT} + v_B \frac{\Delta G_S^0}{RT} \right) \exp \left(c_{Na^+}^B K_S^{MM} \right) \quad (57)$$

Weiterhin beinhaltet das Modell von Lee et al. keine Beschreibung der Ligandendichte. Da die hydrophobe Gruppe der Aminosäuren auch bei Dissoziation unverändert bleibt, kann die aus dem DIX-Modell hergeleitete Beschreibung aus Gleichung (63) verwendet werden. Der r_D -Wert wird mit Hilfe der Ligandendichte in der Resin-Phase und Gleichung (40) berechnet.

2 Material und Methoden

2.6.5 Berechnung der Ligandendichte

Für die Berechnungen aller Modellierungsmodelle wird die Ligandendichte des Chromatographie-Resins benötigt. Dies ist insbesondere für das DIX-Modell gültig, da hier alle Konzentrationen der Resin-Phase über den r_D -Wert von der Ligandendichte abhängig sind. Die Ligandendichte in der gepackten Säule $\Lambda_{Packung}$ ist definiert als (Klutens et al., 2016):

$$\Lambda_{Packung} = \frac{\Lambda_{TM}}{F_Q} \frac{1}{1 - F_K} \quad (58)$$

Hierbei ist Λ_{TM} die Ligandendichte der Trockenmasse, welche vom Gelhersteller bestimmt wurde. Auch werden der Quellfaktor F_Q und Kompressionsfaktor F_K benötigt. F_Q wurde in diesem Projekt auf einen Erfahrungswert von fünf gesetzt. Eine Übersicht über die weiteren Werte und die in diesem Projekt verwendeten Chromatographie-Materialien sind in Tabelle 11 gelistet. Aus Gleichung (58) kann die Ligandendichte in den Poren berechnet werden (Klutens et al., 2016):

$$\Lambda_{Pore} = \Lambda_{Packung} \frac{1}{\varepsilon_p (1 - \varepsilon)} \quad (59)$$

Die Zwischenkorn-Porosität ε und die Poren-Porosität ε_p wurden experimentell bestimmt und sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Für die Berechnungen der Modellierung wurde die Ligandendichte in Bezug auf das Porenvolumen verwendet.

In diesem Projekt liegt ein Fokus auf schwachen Kationentauschern, welche Liganden immobilisiert haben, die im angewendeten pH-Bereich dissoziieren. Die Dissoziation einer Carboxylgruppe C wurde von Helfferich beschrieben (Helfferich, 1962):



Die Dissoziationskonstante K_a ist wie folgt definiert:

$$K_a = \frac{\Lambda^- c_{H^+}^R}{\Lambda_{Pore} - \Lambda^-} \quad (61)$$

Hier muss zwischen der maximalen Ligandendichte Λ_{Pore} und der tatsächlich ionischen Ligandendichte Λ^- unterschieden werden. Zudem bezieht sich die H^+ -Konzentration auf die jeweiligen Bedingungen, in diesem Fall die Resin-Phase. Da diese unbekannt

2 Material und Methoden

ist, muss Gleichung (61) mit der aus der Herleitung des DIX-Modells erhaltenen Gleichung (34) kombiniert werden:

$$K_a = \frac{\Lambda^- c_{H^+}^B \frac{r_D}{S_{Na^+,H^+}}}{\Lambda_{Pore} - \Lambda^-} \quad (62)$$

Nach Umstellung wird folgende Gleichung für die Ligandendichte erhalten:

$$\Lambda^- = \frac{\Lambda_{Pore} K_a}{\frac{r_D}{S_{Na^+,H^+}} c_{H^+}^B + K_a} \quad (63)$$

Zur Berechnung der Ligandendichte eines schwachen Ionentauschers wird der r_D -Wert benötigt. Da dieser von der Ligandendichte abhängig ist, ist eine iterative Lösung erforderlich. In der Literatur können Lösungen gefunden werden, die eine direkte Lösung von Gleichung (63) durch weitere Annahmen ermöglichen, jedoch ist eine solche Vorgehensweise nicht mit den Annahmen aus dem DIX-Modell vereinbar (Pabst und Carta, 2007).

In diesem Projekt wurden weiterhin Resins verwendet, in denen SO_3^- - und COO^- -Gruppen kombiniert werden. Hier kann die Ligandendichte wie folgt berechnet werden:

$$\Lambda_{total}^- = \Lambda_{\Lambda_{Pore}}^{SO_3} + \Lambda_{\Lambda_{Pore}}^{COO} \frac{K_a}{\frac{r_D}{S_{Na^+,H^+}} c_{H^+}^B + K_a} \quad (64)$$

2.6.6 Modell zur linearen Gradientenelution zur Bestimmung von Modellparametern

Das Modell zur linearen Gradientenelution wurde von Yamamoto et al. entwickelt (Yamamoto et al., 1988; Yamamoto et al., 1983). Es verbindet die Salzkonzentration am jeweiligen Maximum des UV-Peaks bei 280 nm des eluierenden Proteins mit der normalisierten Gradientensteigung GH.

$$\int_{c_{s,start}}^{I_R} \frac{dI}{K[I] - K'} = GH \frac{1}{Z} \int_0^Z dz_P = GH \quad (65)$$

Die Gleichung (65) beinhaltet die aktuelle Salzkonzentration I , die Salzkonzentration zum Retentionszeitpunkt I_R , die anfängliche Salzkonzentration zum Retentionszeitpunkt $c_{s,start}$, den Verteilungskoeffizienten für das Protein K und den des Salzes K'

2 Material und Methoden

sowie die Länge der Säule z mit der Peak-Position z_p innerhalb der Chromatographiesäule. Das Modell wurde von Petersen et al. abgewandelt und auf die Porenbedingungen bezogen (Pedersen et al., 2003):

$$GH_{Salz} = g \left(V_C (1 - \varepsilon) \varepsilon_p k_{d,i} \right) \quad (66)$$

Zur Berechnung von Gleichung (66) wird zusätzlich das Volumen der Säule V_C , die Zwischenkorn-Porosität ε und die Poren-Porosität ε_p benötigt. Weiterhin beinhaltet Gleichung (66) einen Ausschlussfaktor k_D , der die relative Zugänglichkeit des Proteins bezogen auf das gesamte Porenvolumen beschreibt. Auch werden das Gradientenvolumen V_g sowie die Steigung des Gradienten g benötigt. Diese ist folgendermaßen definiert:

$$g = \frac{c_{s,Ende} - c_{s,Start}}{V_g} \quad (67)$$

Die Gleichung (67) beinhaltet das Gradientenvolumen V_G sowie die Anfangs- und Endkonzentration des Salzes $c_{s,start}$ bzw. $c_{s,Ende}$. Schmidt et al. und Kluters et al. zeigten, dass das Modell auch auf lineare pH-Gradienten übertragbar ist (Kluters et al., 2016; Schmidt et al., 2014):

$$GH_{pH} = g_{pH} \left(V_C (1 - \varepsilon) \varepsilon_p k_{d,i} \right) = \frac{pH_{final} - pH_{init}}{V_g} \left(V_C (1 - \varepsilon) \varepsilon_p k_{d,i} \right) \quad (68)$$

Die Kombination und Modifikation der Gleichungen (65), (66) und (68) ergibt (Kluters et al., 2016):

$$\int_{c_{s,init}}^{c_{s,elu}} c_s^{v_{B,i}} dc_s = GH_{Salz} \frac{1}{L_C} K_{eq} (r_D)^{v_{B,i}(pH)} \int_0^{L_C} dx \quad (69)$$

Die Ableitung nach dem pH-Wert bzw. zur Salzkonzentration in Kombination mit dem DIX-Modell aus Gleichung (52) ergibt:

$$\frac{dGH_{Salz}}{dc_{s,elu}} = \frac{dGH_{pH}}{dpH_{elu}} = \frac{1}{A_i} \left[K_{eq} (r_D)^{v_{B,i}(pH)} \right]^{-1} \quad (70)$$

Gleichung (70) stellt die Grundlage zur Korrelation zwischen den experimentellen Daten und des mathematischen Modells dar. Die Vorgehensweise zur Bestimmung der einzelnen Modellparameter ist in Abschnitt 2.6.8 beschrieben.

2 Material und Methoden

2.6.7 Durchführung von linearen Gradientenelutionsexperimenten

Im Rahmen dieses Projektes wurde zahlreiche lineare Gradientenelutions (LGE)-Experimente durchgeführt. Die Proteinprobe wird mit dem Bindungspuffer verdünnt (mindestens 1:5), um den pH-Wert und die Leitfähigkeit anzupassen. Der Ablauf der Chromatographie ist in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Ablaufschema der LGE-Experimente.

Schritt	Puffer	Dauer
Equilibrierung	Bindepuffer	10 CV
Auftrag der Probe	Probe + Bindepuffer	
Wasch	Bindepuffer	10 CV
Elution im Gradienten	Binde- und Elutionspuffer	Individuell
Reinigung	CIP-Puffer	10 CV
Reequilibrierung	Bindepuffer	10 CV

Die Gradientensteigungen betragen in allen Experimenten 40, 60, 80 oder 120 CV von 0 bis 100 % Puffer B. Nach dem Gradienten wurde ein Reinigungsschritt durchgeführt. Für alle Kationentauscher wurde hierfür ein Puffer mit 0,02 mol/L Na_2PO_4 + 1 mol/L NaCl, pH 7 verwendet. Bei Mixed-Mode-Resins wurde ein Puffer mit 1 M Arginin, pH 7 verwendet, um zusätzlich mögliche hydrophobe Wechselwirkungen zu adressieren. Die Experimente wurden mit pH-Elution sowie mit Salzelution durchgeführt, um jeweils die Salzkonzentration bzw. den pH-Wert konstant zu halten. Für die pH-Elution wurden je nach pH-Bereich und Pufferkapazität unterschiedliche Pufferrezepte verwendet. Eine Übersicht findet sich in Abschnitt 2.3.3.

2.6.8 Bestimmung der Modellparameter

Die Bestimmung der Modellparameter erfolgte auf Basis der experimentell ermittelten Daten. Dabei wird für die Modellierung das Maximum des Elutionspeaks aus dem Chromatogramm bestimmt. Der schematische Ablauf der Modellierung ist in Abbildung 7 dargestellt.

2 Material und Methoden

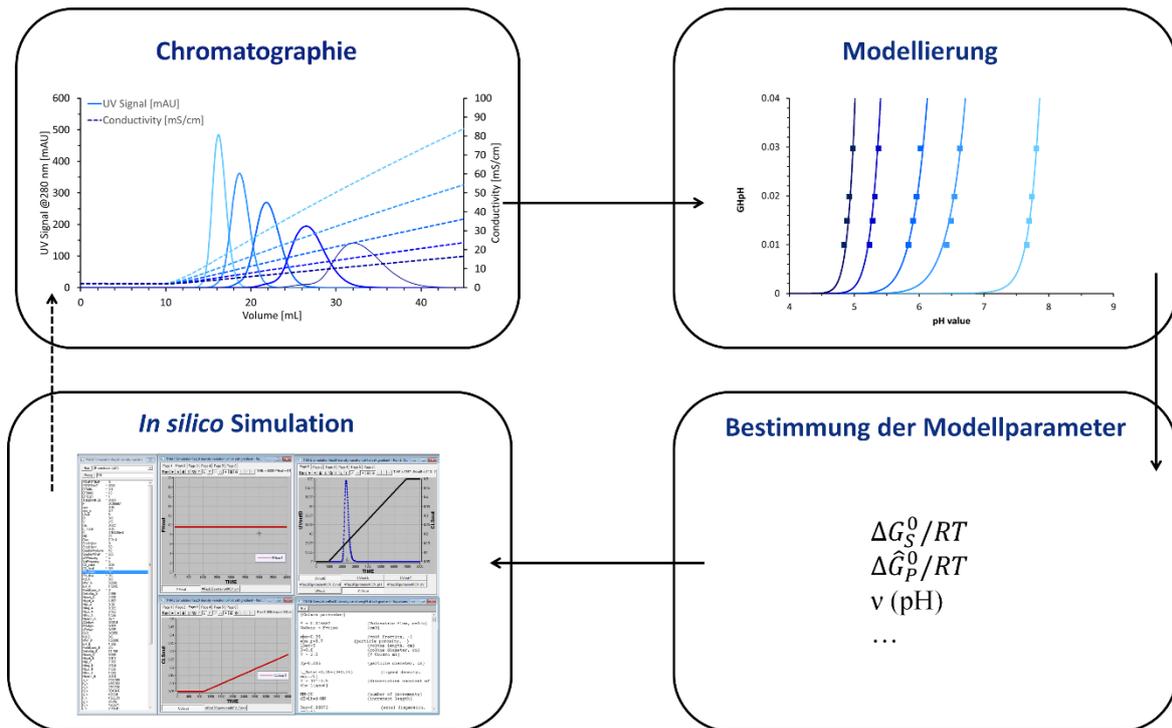


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Prozesses von der Aufnahme der experimentellen Daten zur Modellierung und *in silico*-Simulation.

Für jeden Chromatographie-Lauf wurde der pH-Wert bzw. die Na^+ -Konzentration am Peak-Maximum bestimmt. Die Na^+ -Konzentration wurde dabei über eine Kalibrierkurve aus der Leitfähigkeit bestimmt. Bei Auftreten von Peak-Schultern wurde ausschließlich der Monomer Peak betrachtet. Eine Ausnahme stellt der Abschnitt 3.6 dar, in dem mAb-Monomer, -Dimer und -Aggregate untersucht wurden. Hier wurde der Elutionspeak fraktioniert und auf den Anteil der jeweiligen Spezies untersucht (Abschnitt 2.8) (Klutters et al., 2016). Die Elutionsdaten wurden mit der entsprechenden normalisierten Gradientensteigung aus den Gleichung (66) für Salzelution bzw. Gleichung (68) für pH-Elution in Verbindung gebracht. Diese Datenpaare wurden in die Software Berkeley Madonna importiert. Dort wurden die Parameter der in Abschnitt 2.6.1 und 2.6.2 beschriebenen Modelle durch die Variation der Variablen an den Datensatz angepasst. Die Variablen sind beim SD- und DIX-Modells die Gibbs-Enthalpien ΔG_p^0 und ΔG_s^0 sowie die Anzahl der Aminosäuren N . Das Mixed-Mode Modell beinhaltet zusätzlich die Parameter v , n und K_s . Für das Korrelationsverfahren wurde ein Runge-Kutta-Algorithmus vierter Ordnung verwendet. Die Qualität dieses Algorithmus ist abhängig von zwei vorgegebenen Schätzwerten. Die Variation dieser Schätzwerte führt bei richtiger Anwendung zu einer Verbesserung der Korrelation

2 Material und Methoden

zwischen Datensatz und dem mathematischen Modell. Die Schätzwerte wurden so lange variiert, bis keine weitere Verbesserung des Korrelationswertes beobachtet wurde. In der Auswertung aus 3.7 wurde zusätzlich die Variation der Ergebnisse mit dem besten Korrelationswert gezeigt.

2.6.9 *In silico* Simulation von Proteinchromatographie

Im Anschluss an die Modellierung folgte in diesem Projekt die Simulation entsprechender Chromatogramme mit Hilfe der bestimmten Modellparameter. Auf diese Weise konnte überprüft werden, ob die durchgeführten Berechnungen korrekt sind und die experimentellen Daten beschrieben werden können. Hierfür wurde ein *Lumped-Rate* Modell verwendet, welches schematisch in Abbildung 8 dargestellt ist (Schmidt-Traub et al., 2012).

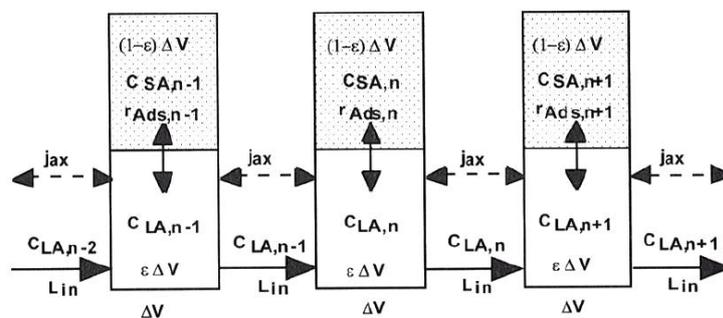


Abbildung 8: Schematische Darstellung des *Lumped-Rate* Modells zur *in silico*-Simulation von Ionen und Proteinen in Säulen-Chromatographie (Ingham, 2007).

Dieses Modell umfasst axiale Dispersion und Massentransport, was ein Vorteil hinsichtlich der benötigten Rechenzeit darstellt (Klutters et al., 2016). Die Säule wird dabei in N Kompartimente unterteilt und die Gleichgewichtsbedingungen für jedes Element berechnet. Die Berechnung der gesamten Säule erfolgt im Anschluss durch dynamische Differentialgleichungen (Ingham, 2007). Ein weiterer Vorteil ist die geringe Anzahl an Parametern, die für das Modell benötigt werden. Es stellt somit einen guten Kompromiss zwischen notwendigen Vereinfachungen, benötigter Rechenzeit und Qualität der Berechnungen dar (Müller-Späth et al., 2011).

Die Grundlage des Modells ist die Beschreibung der Wanderung einer Spezies i über die Säule (Ingham, 2007; Schmidt-Traub et al., 2012):

2 Material und Methoden

$$\frac{\partial c_{P,i}^B}{\partial t} + u_{int} \frac{\partial c_{P,i}^B}{\partial x} + \frac{(1-\varepsilon)\varepsilon_p k_{d,i}}{\varepsilon} \frac{\partial c_{P,i}^R}{\partial t} = D_{ax} \frac{\partial^2 c_{P,i}^B}{\partial x^2} \quad (71)$$

Die Gleichung (71) beinhaltet die Proteinkonzentrationen der Resin-Phase c_p^R und Bulk-Phase c_p^B , die Geschwindigkeit der mobilen Phase u_{int} , den axialen Dispersionskoeffizienten D_{ax} sowie die Position innerhalb der Säule x .

Der Massentransfer zwischen der Bulk- und Resin-Phase ist beschrieben als (Schmidt-Traub et al., 2012):

$$\frac{\partial c_{P,i}^R}{\partial t} = k_{eff,i} \frac{6}{d_p} (c_{P,i,eq}^R - c_{P,i}^R) \quad (72)$$

Der in Gleichung (72) vorkommende Massentransferkoeffizient k_{eff} ist ein zusammengefasster Wert und beinhaltet unter anderem die Film- und Porendiffusion (Schmidt-Traub et al., 2012). Dieser Wert ist von mehreren Parametern, wie z.B. der Beschaffenheit des Resins, der Salzkonzentration, der Gradientensteigung, abhängig (Kluters et al., 2016; Pfister und Morbidelli, 2015). In diesem Projekt wurde der Wert individuell an den jeweiligen Datensatz angepasst. Eine Berechnungsmethode für pH- und Salzgradienten wurde in Zusammenhang mit einem anderen, von mir mitbetreuten, Projekt publiziert (Hedrich et al., DRAFT). Die Gleichung (72) beinhaltet auch die Proteinkonzentration im theoretischen Gleichgewicht $c_{P,i,eq}^R$. Diese kann mit Hilfe des jeweiligen Modells berechnet werden. Für das DIX-Modell folgt:

$$c_{P,i,eq}^R = \exp\left(v_i(pH) \cdot \frac{\Delta G_s^0}{RT} - \frac{\Delta G_p^0}{RT}\right) \cdot (r_D)^{v_{B,i}(pH)} \cdot c_{P,i}^B \quad (73)$$

Beim SD-Modell muss entsprechend Gleichung (16) für niedrige Proteinkonzentrationen bzw. Gleichung (18) für höhere Beladungen eingesetzt werden.

2 Material und Methoden

2.7 Bestimmung der Chromatographiesäulen-Parameter

2.7.1 Bestimmung der Porositäten

Die Porosität der einzelnen Chromatographiesäulen wurde mit einer isokratischen Messung durchgeführt. Hierzu wurde die Säule mit 150 mM NaCl equilibriert. Anschließend wurde ein Puls der Analysenlösung mit Hilfe einer 20 μ L Probenschleife aufgetragen. Die Analysenlösung bestand aus einer 1:1 Mischung aus 1 mg/mL Blue Dextran in 150 mM NaCl mit einer 0,5 mol/L NaOH-Lösung. Durch diese Kombination entsteht ein UV-, Leitfähigkeits- und pH-Signal. Die Retentionszeit des jeweiligen Signals entspricht dem benötigten Volumen, dass der jeweilige Analyt durch das Resin bzw. bis zu dem jeweiligen Messinstrument benötigt. Für die Bestimmung der Totvolumina der Äkta Purifier 10 Anlage wurde die identische Messung ohne Chromatographiesäule durchgeführt. Die Zwischenkorn-Porosität ε ist wie folgt definiert (Schmidt-Traub et al., 2012):

$$\varepsilon = \frac{V_{\text{int}}}{V_C} \quad (74)$$

V_{int} steht für das Zwischenkornvolumen und wird aus der Blue Dextran-Messung bestimmt. V_C ist das Volumen der Säule. Die Poren-Porosität ε_p ist definiert als (Schmidt-Traub et al., 2012):

$$\varepsilon_p = \frac{V_{\text{Pore}}}{V_{\text{ads}}} \quad (75)$$

Für die Berechnung wird das Volumen der Poren benötigt, welches aus der Differenz des Leitfähigkeitspeaks und des Blue Dextran-Peaks berechnet werden kann.

Die totale Porosität ε_T ist definiert als (Schmidt-Traub et al., 2012):

$$\varepsilon_t = \frac{V_{\text{int}} + V_{\text{Pore}}}{V_C} = \varepsilon + (1 - \varepsilon)\varepsilon_p \quad (76)$$

2.7.2 Bestimmung des D_{ax} -Wertes

Die Bestimmung des D_{ax} -Wertes wurde für jede Flussrate individuell durchgeführt. Hierzu wurde die Anlage mit 0,15 mol/L NaCl eingespült und ein Puls an 1 mg/mL Blue Dextran in mit 0,15 mol/L NaCl mit einer 20 μ L Probenschleife injiziert. Der UV-Elutionspeak wurde mit der Software PeakFit analysiert, mit einer EMG-Funktion

2 Material und Methoden

beschrieben und die Momente σ_{mom} und μ_{mom} bestimmt. Der D_{ax} -Wert kann danach wie folgt berechnet werden (Borg et al., 2014):

$$D_{ax} = \frac{\sigma_{mom}}{\mu_{mom}} \frac{L_C u_{int}}{2} \quad (77)$$

Für die Äkta Purifier 10, mit der alle Modellierungsexperimente durchgeführt wurden, wurde für die Flussrate 1 mL/min ein D_{ax} -Wert von $1,18 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ bestimmt.

2.8 Analyse von Antikörper Monomer, Dimer und Aggregat durch SE-HPLC

Die Analyse von mAb auf Monomer-, Dimer- und Aggregatgehalt wurde mit Hilfe von SE-HPLC durchgeführt. Hierfür wurde eine SEC s3000 HPLC Säule der Firma Phenomenex oder eine TSKgel SuperSW mAb HTP der Firma Tosoh Bioscience an einer Äkta Micro verwendet. Als Laufpuffer wurde ein Puffer aus 0,02 mol/L Na_2PO_4 + 0,3 mol/L NaCl, 0,03% Na_3N , pH 7 bei einer Flussrate von 1 mL/min verwendet. Es wurden jeweils ca. 100 μg mAb aufgetragen und isokratisch eluiert.

2 Material und Methoden

2.9 Analyse von Antikörper-Ladungsvarianten durch CEX-HPLC

Die Analyse von mAb Ladungsvarianten wurde mit Hilfe einer BioPro SP-F der Firma YMC durchgeführt. Es wurden 100 µL Probe injiziert und durch einen pH-Gradienten von 50 % auf 100 % Elutionspuffer in 50 CV eluiert. Die Steigung und Länge des Gradienten wurde dabei auf den individuellen Antikörper bzw. die benötigte Peak-Trennung angepasst.

Für die Methode wurde folgendes Puffersystem entwickelt:

Tabelle 18: pH-Pufferrezept für die CEX-HPLC-Analyse.

Substanz	Konzentration im Bindepuffer [mmol/L]	Konzentration im Elutionspuffer [mmol/L]
Essigsäure	8,8	-
MES	10,0	-
MOPSO	15,5	-
HEPES	-	18,4
TAPS	-	7,2
CHES	-	7,7
NaCl	22,5	-
NaOH	6,5	29,0
pH-Wert	5,0	9,5

3 Ergebnisse

3.1 Test von diskontinuierlichen Puffersystemen zur Herstellung linearer pH-Gradienten

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der theoretischen Herleitung des diskontinuierlichen Puffersystems gezeigt und mit einem entsprechenden homogenen Puffersystem verglichen. Als erster Schritt wurden Berechnungen mit der Software Berkeley Madonna durchgeführt. Das Ergebnis für das homogene Puffersystem ist in Abbildung 9 dargestellt. Es zeigt sich, dass die einzelnen Puffersubstanzen gemäß ihrem pK_s -Wert protonieren und der Kurvenverlauf daher der jeweiligen Titrationskurve entspricht. Dies entspricht den Ergebnissen von Kröner et al. (Kröner und Hubbuch, 2013).

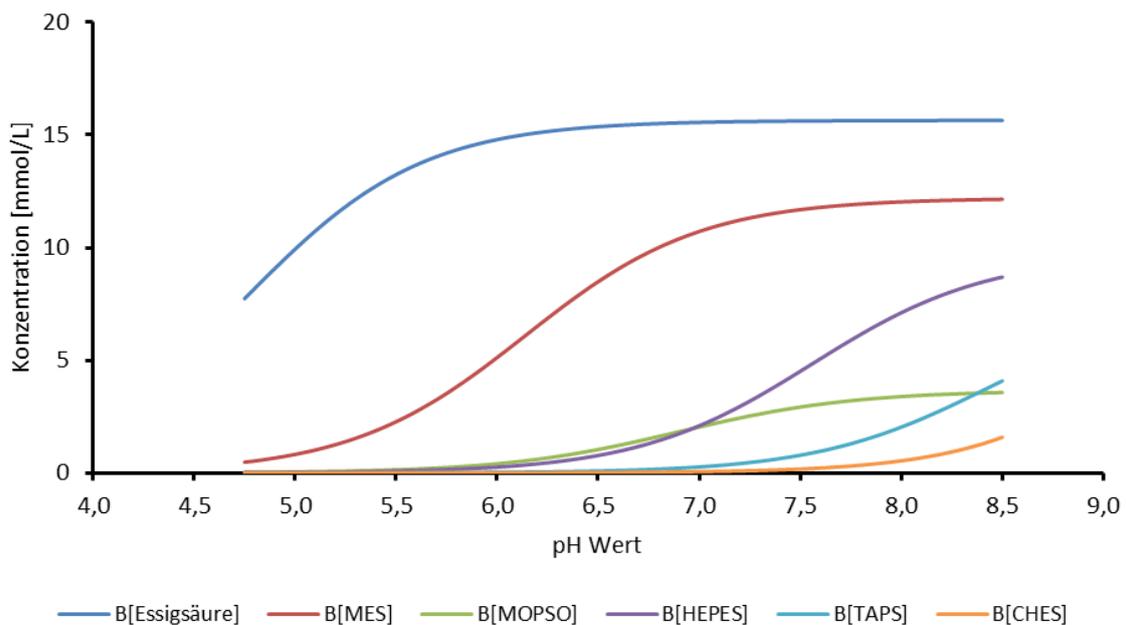


Abbildung 9: Berechnungen zum Verlauf der Konzentration der protonierten Spezies B der Puffersubstanzen in einem homogenen Puffersystem. Pufferkonzentrationen: Essigsäure: 15,6 mmol/L, MES: 12,2 mmol/L, MOPSO: 3,7 mmol/L; HEPES 9,7 mmol/L; TAPS: 7,6 mmol/L; CHES: 15,1 mmol/L.

3 Ergebnisse

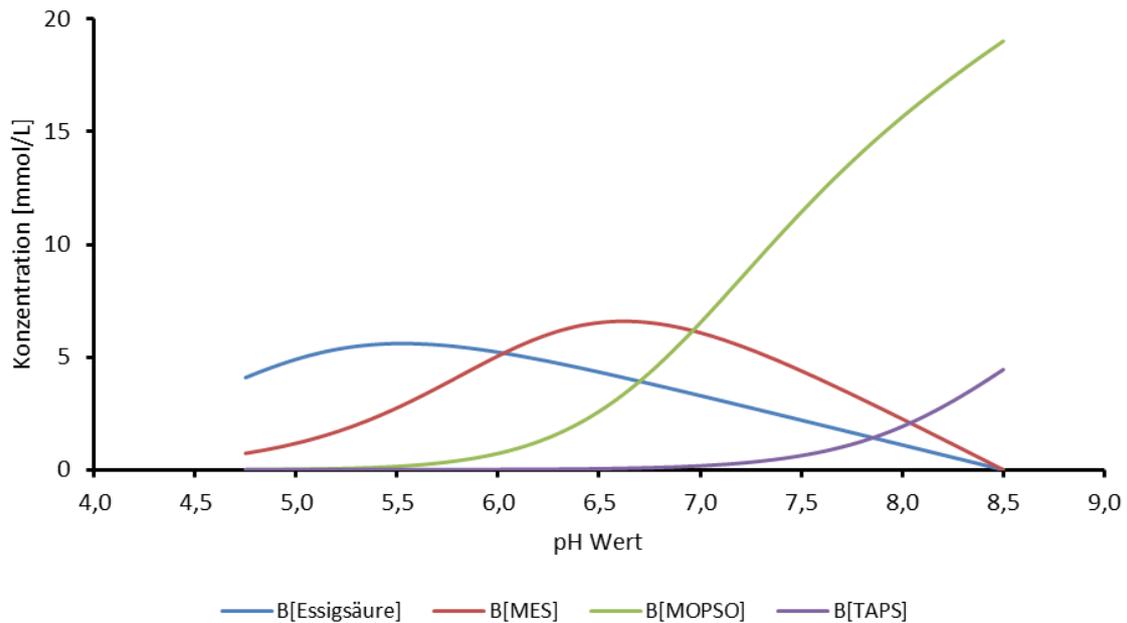


Abbildung 10: Berechnungen zum Verlauf der Konzentration der protonierten Spezies B der Puffersubstanzen in einem diskontinuierlichen Puffersystem. Pufferrezept: Puffer A: 14,1 mmol/L Essigsäure; 23,4 mmol/ MES 25,6 mmol/L NaCl, 8,4 mmol/L NaOH; pH 4,75. Puffer B: 28,1 mmol/L MOPSO, 12,2 mmol/L TAPS, 34 mmol/L NaOH, pH 8,5.

Die äquivalente Berechnung für das diskontinuierliche Puffersystem erfolgt mit Gleichung (7). Das Ergebnis ist in Abbildung 10 dargestellt. Es zeigt, dass sich die Kurven der dissoziierten Puffersubstanzen verändern. Dies ist auf die entsprechende Verdünnung bzw. Anreicherung während des Gradienten zurückzuführen. Folglich werden die Puffersubstanzen aus Puffer A über den Gradienten vollständig aus dem System entfernt.

Die Ableitung der Kurven der protonierten Spezies aus Abbildung 10 ergibt mit Hilfe von Gleichung (9) die Pufferkapazität. Die entsprechende Berechnung ist in Abbildung 11 dargestellt.

3 Ergebnisse

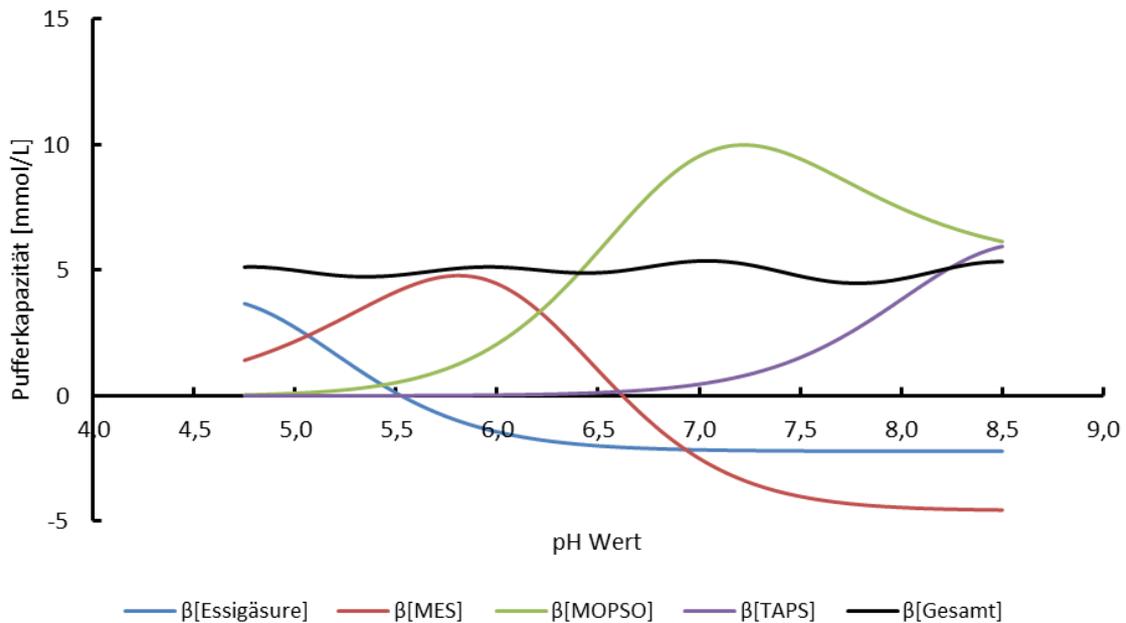


Abbildung 11: Berechnungen zum Verlauf der einzelnen Pufferkapazitäten in einem diskontinuierlichen Puffersystem. Pufferrezept: Puffer A: 14,1 mmol/L Essigsäure; 23,4 mmol/ MES 25,6 mmol/L NaCl, 8,4 mmol/L NaOH; pH 4,75. Puffer B: 28,1 mmol/L MOPSO, 12,2 mmol/L TAPS, 34 mmol/L NaOH, pH 8,5.

Durch die Verdünnung der in Puffer A befindlichen Puffersubstanzen können auch negative Pufferkapazitäten entstehen. Dies wurde beim homogenen Puffersystem nicht beobachtet. Dennoch kann durch die geeignete Kombination der Puffersubstanzen und deren Konzentration ein linearer Zusammenhang zwischen der gesamten Pufferkapazität und dem pH-Wert erreicht werden. Dies ist die Voraussetzung für ein lineares Verhältnis zwischen pH-Wert und dem Anteil von Puffer B im Gradienten (Kröner und Hubbuch, 2013). Die in Abbildung 11 gezeigten leichten Schwankungen der addierten Pufferkapazität könnten durch zusätzliche Puffersubstanzen verbessert werden. Während des Projektes wurde festgestellt, dass kleine Schwankungen (< 10 %) akzeptabel sind. Ein entsprechendes Experiment ist in Abbildung 12 dargestellt. Der Graph zeigt die experimentelle Durchführung der Berechnung aus dem zuvor berechneten System. Das Experiment veranschaulicht, dass die Berechnungen zu einem linearen pH-Gradienten führen. Die Korrelation der Kurve wurde auf den Teil des tatsächlichen Gradientenvolumens beschränkt und beträgt > 99 %. Die Linearität des pH-Gradienten ist so mit den homogenen Puffersystemen vergleichbar (Kröner und Hubbuch, 2013; Lingg et al., 2013). Das

3 Ergebnisse

Experiment zeigt, dass die theoretische Herleitung der Formeln korrekt durchgeführt wurde.

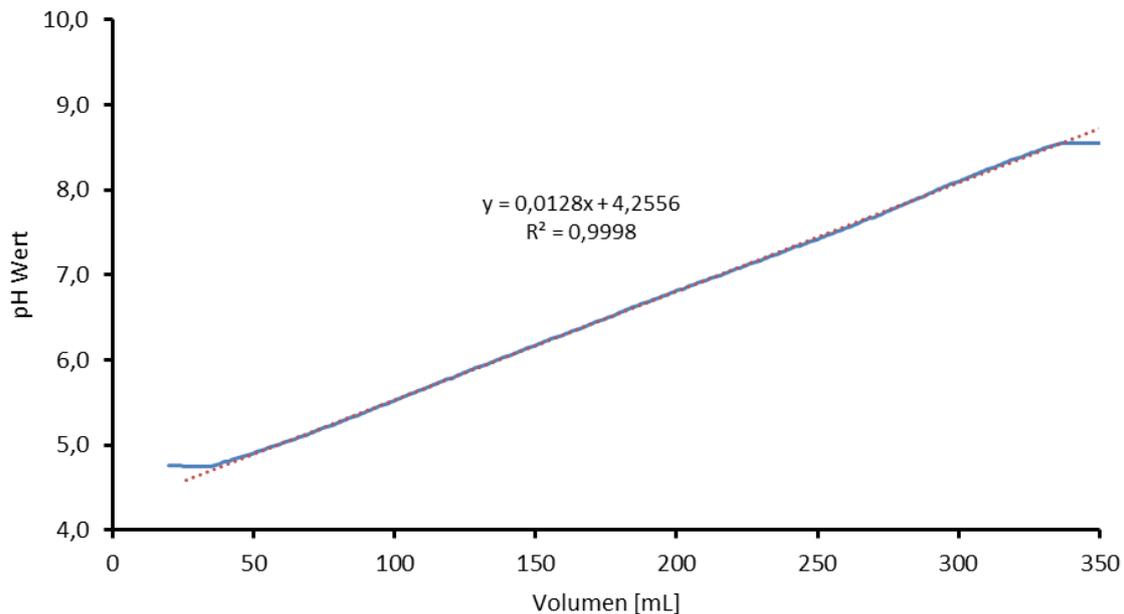


Abbildung 12: pH-Gradient eines diskontinuierlichen Puffersystems. Pufferrezept: Puffer A: 14,1 mmol/L Essigsäure; 23,4 mmol/ MES 25,6 mmol/L NaCl, 8,4 mmol/L NaOH; pH 4,75. Puffer B: 28,1 mmol/L MOPSO, 12,2 mmol/L TAPS, 34 mmol/L NaOH, pH 8,5. Flussrate: 1 mL/min, Prototyp 4, Gradientenlänge: 40 CV.

Ein Vergleich der Proteintrennung von mAb05 unter Verwendung beider Puffersysteme in einem analytischen Lauf ist in Abbildung 13 dargestellt. Es zeigt sich, dass das Chromatogramm unterschiedlich ist. Beim diskontinuierlichen Puffersystem eluiert der mAb etwas früher. Dies könnte auf die insgesamt leicht höhere Konzentration an Puffersubstanzen zurückzuführen sein. Bei der Auftrennung der einzelnen Subspezies sind jedoch nur minimale Unterschiede zu erkennen, sodass nicht gezeigt werden kann, dass eines der beiden verwendeten Puffersysteme einen Vorteil bietet. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass kleine Abweichungen in der Pufferherstellung zu einer geringen Verschiebung des Elutionspeaks führen können.

3 Ergebnisse

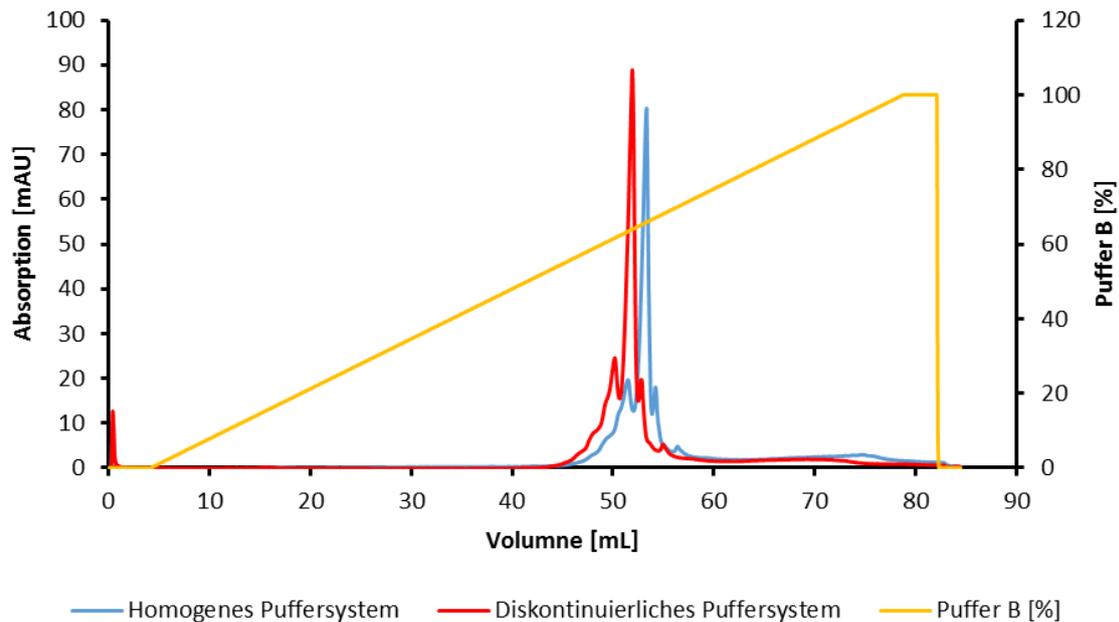


Abbildung 13: Vergleich eines diskontinuierlichen und homogenen Puffersystems pH 4 bis pH 10. Säule: BioPro SP-F, Anlage: Äkta Micro, Flussrate 0,65 mL/min, Probe: 600 µg mAb05, Gradientenvolumen: 60 CV. Homogenes Puffersystem Puffer A und B: 6,5 mmol/L Essigsäure; 4,6 mmol/L MES; 1,8 mmol/L MOPSO; 3,4 mmol/L HEPES; 3,7 mmol/L TAPS; 3,9 mmol/L CHES; 4,5 mmol/L CAPS. Diskontinuierliches Puffersystem Puffer A: 7,4 mmol/L Essigsäure; 8,9 mmol/L MES; 10,3 mmol/L MOPSO. Puffer B: 13,3 mmol/L HEPES; 6,5 mmol/L TAPS; 5,2 mmol/L CHES, 3,7 mmol/L CAPS (Wohlfart, 2016).

3.2 Untersuchung von pH-Gradienten auf einem starken und schwachen Kationentauschern

Im folgenden Abschnitt wird die Anwendung diskontinuierlicher Puffersysteme für die Modellierungsexperimente beschrieben. Die Modellierungsexperimente der Abschnitte 3.6 und 3.8 wurden mit starken und schwachen Kationentauschern durchgeführt. Für diese Experimente ist ein linearer reproduzierbarer pH-Gradient notwendig. Abbildung 14 zeigt den Test eines diskontinuierlichen Puffersystems.

3 Ergebnisse

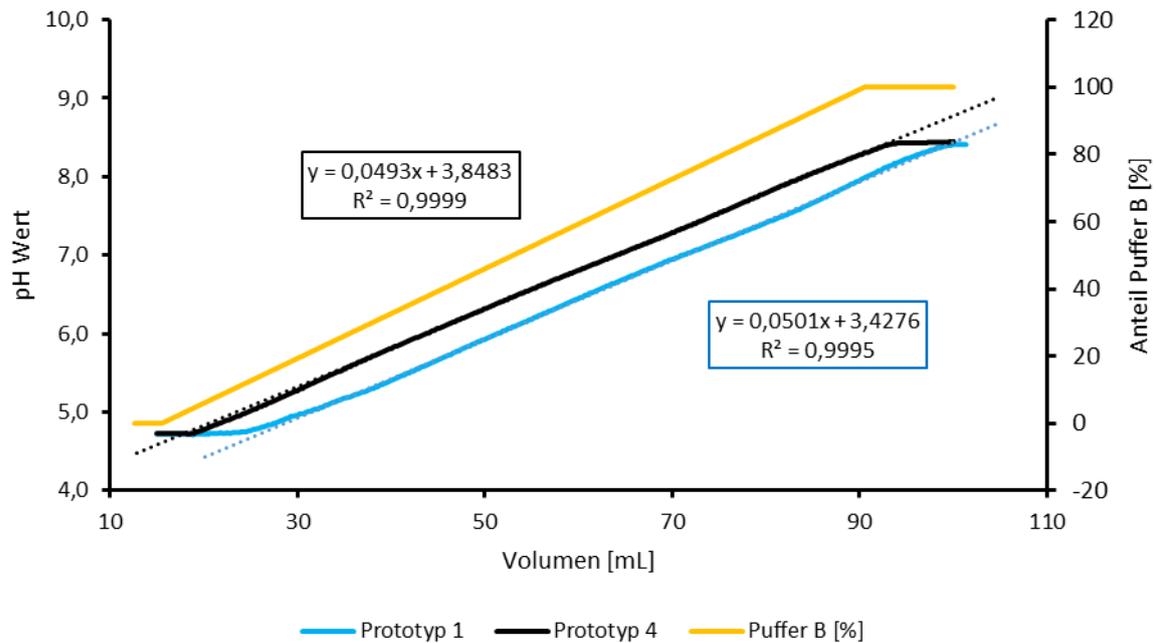


Abbildung 14: Vergleich des pH-Gradienten zwischen einem starken Kationentauscher (Prototyp Resin 4) und einem schwachen Kationentauscher (Prototyp Resin 1) unter Verwendung folgendes Pufferrezeptes: Puffer A: 14,1 mmol/L Essigsäure; 23,4 mmol/ MES 25,6 mmol/L NaCl, 8,4 mmol/L NaOH; pH 4,75. Puffer B: 28,1 mmol/L MOPSO, 12,2 mmol/L TAPS, 34 mmol/L NaOH, pH 8,5. Flussrate: 1 mL/min, Gradientenlänge: 30 CV.

Der Vergleich aus Abbildung 14 zeigt ein für die Modellierungsexperimente repräsentatives Puffersystem von pH 4,75 - 8,50. Das Puffersystem für Prototyp Resin 4 (starker Kationentauscher) verläuft wie der der Gradient des Prototyp Resins 1 (schwacher Kationentauscher) linear, wobei bei Verwendung des Prototyp Resins 1 mit 0,9995 ein leicht geringerer Regressionsfaktor im Vergleich zum Prototyp Resins 4 mit einem Regressionsfaktor von 0,9999 vorliegt. Zu Beginn des Gradienten als auch im Bereich pH 6 und pH 7 sind leichte Abweichungen zu erkennen. Auch zeigt der pH-Gradient des Prototyp Resins 1 eine stärkere Verzögerung im Vergleich zum Gradientenstart als Prototyp Resin 4. Diese Abweichungen entstehen entweder durch die Interaktion der Puffersubstanzen oder durch die Dissoziation bzw. den Austausch der Gegenionen der Carboxy-Liganden. Um den Einfluss der Dissoziation des Liganden weiter zu untersuchen, wurden pH-Gradienten mit verschiedenen pH-Werten bei Beginn des Gradienten untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt.

3 Ergebnisse

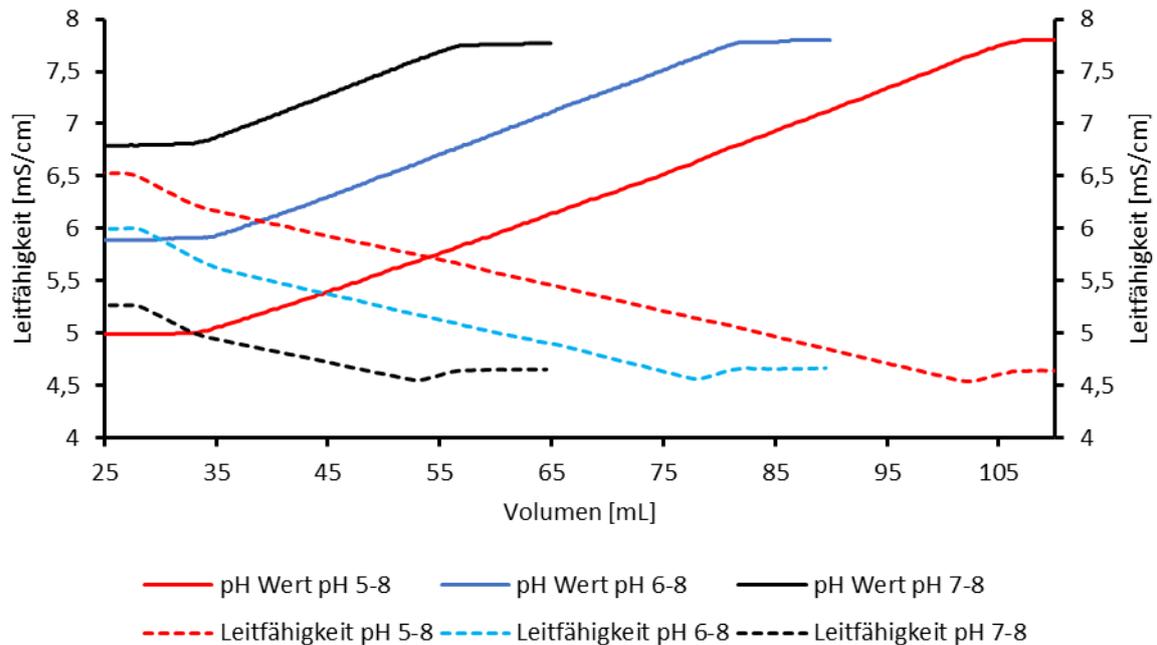


Abbildung 15: Vergleich des pH-Gradienten auf einem schwachen Kationentauscher (Prototyp Resin 1). Flussrate: 1 mL/min, Gradientenlänge: 10 / 20 / 30 CV. Puffersystem: 19 mmol/L Essigsäure, 16 mmol/L MES, 14 mmol/L MOPS, 5,5 mmol/L HEPES, 20 mmol/L TAPS, 5 mmol/L Bernsteinsäure.

Abbildung 15 zeigt, dass alle drei pH-Gradienten parallel verlaufen und die gleiche Linearität besitzen. Auch die Verzögerung zum Start des Gradienten ist identisch. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Verzögerung nicht durch die Dissoziation des Liganden verursacht wird. Die Betrachtung der Leitfähigkeitsdaten zeigt, dass zu Beginn des Gradienten ein nicht linearer Abfall zu erkennen ist. Anschließend ist auch der Leitfähigkeitsgradient linear. Am Ende des Gradienten ist erneut ein nicht linearer Sprung zu erkennen. Diese Abweichungen der Leitfähigkeit sind für alle drei Experimente identisch. Auch dies widerspricht dem Argument, dass möglicherweise die Dissoziation des Liganden die Abweichungen verursacht. Eine Interaktion der Puffersubstanzen kann ebenfalls vernachlässigt werden, da die Abweichungen unabhängig des pH-Wertes auftreten.

Die Effekte von pH-Gradienten auf schwachen Kationentauschern wurden ebenfalls mit dualen Gradienten, also einer Variation der Salzkonzentration und des pH-Wertes, untersucht. Ein repräsentatives Beispiel ist in Abbildung 16 dargestellt.

3 Ergebnisse

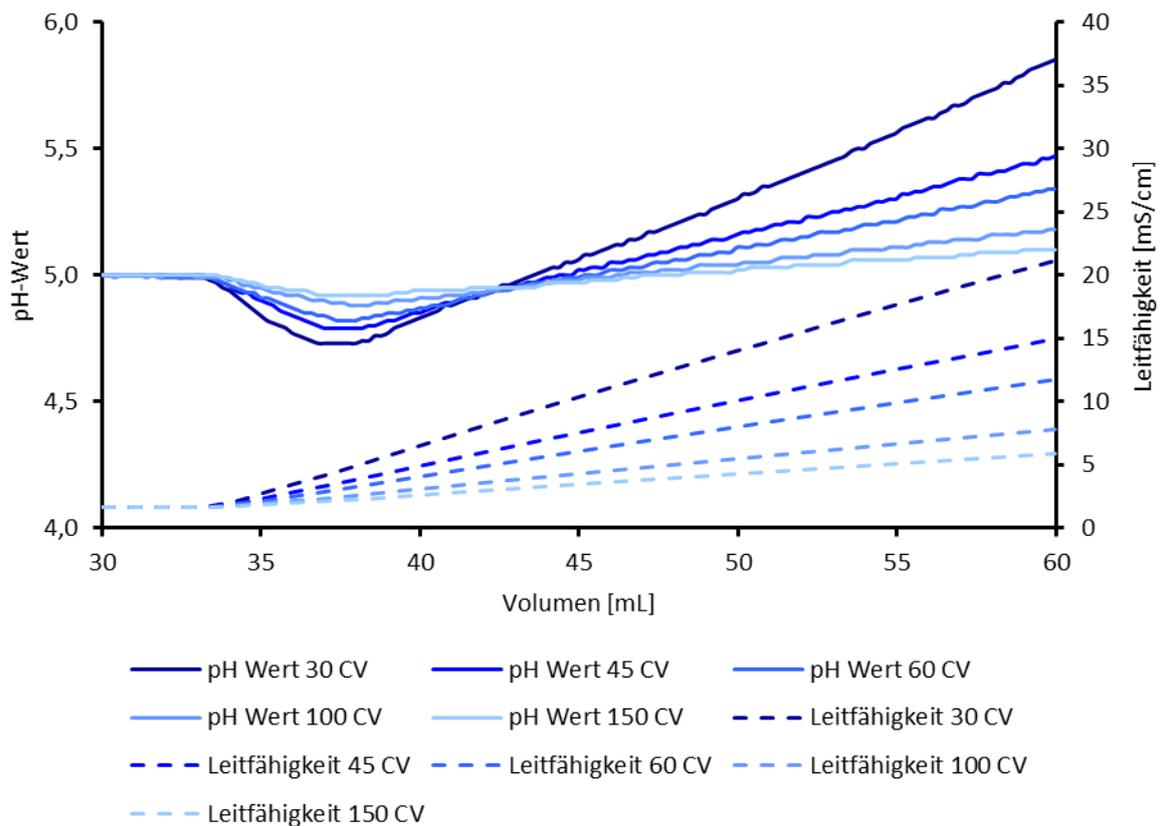


Abbildung 16: Dualer Gradient von 20 - 600 mmol/L NaCl und pH 5 - 9 unter Verwendung von Prototyp Resin 1, Flussrate 1 mL/min, Puffersystem: 10 mmol/L Bernsteinsäure; 10 mmol/L Essigsäure; 13,5 mmol/L MES; 9,2 mmol/L MOPSO; 12,5 mmol/L HEPES; 13,5 mmol/L TAPS; 16,6 mmol/L CHES.

Abbildung 16 zeigt, dass duale Gradienten im Vergleich zu reinen pH- oder Salzgradienten andere Abweichungen besitzen. Im Gegensatz zu Abbildung 15 zeigt Abbildung 16 für den dualen Gradienten keine Abweichung der Leitfähigkeit. Diese verläuft linear, unabhängig von der Gradientensteigung. Beim pH-Gradienten ist erkennbar, dass, je nach Gradientensteigung ein unterschiedlicher Abfall des pH-Wertes entsteht. Anschließend verläuft der pH-Gradient linear, jedoch mit einem abweichenden Gradientenvolumen. Das Experiment zeigt, dass die Abweichung des pH-Wertes kinetischen Ursprungs ist. In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss der Ionenstärke untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 17 dargestellt.

3 Ergebnisse

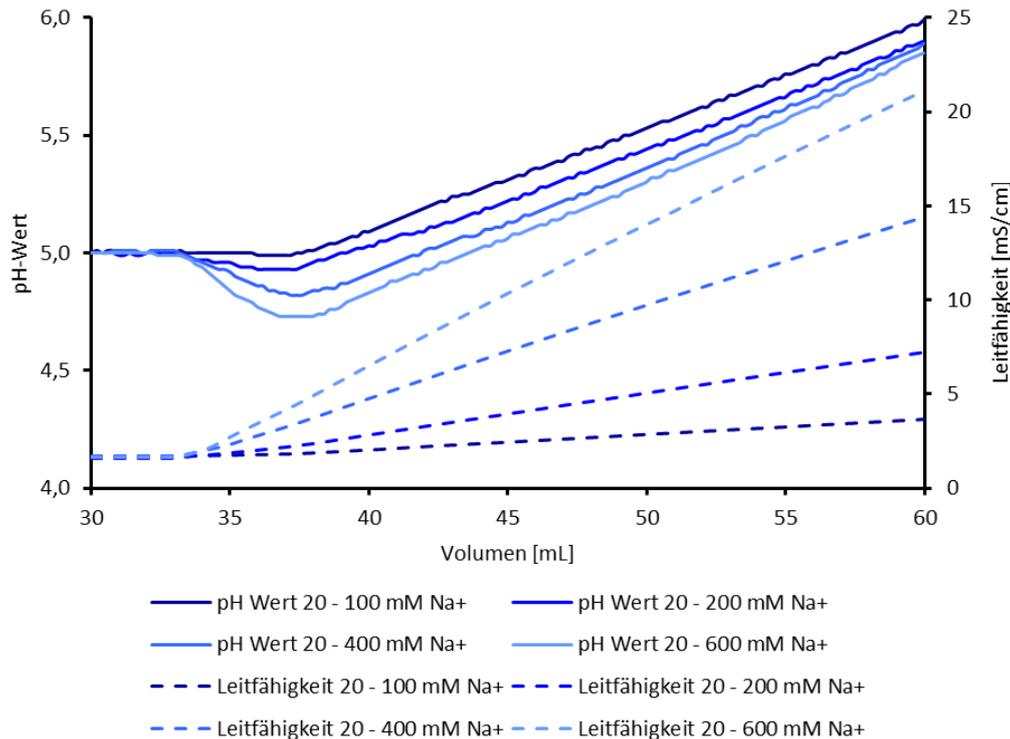


Abbildung 17: Dualer Gradient von pH 5 - 9 bei verschiedenen Salzkonzentrationen unter Verwendung von Prototyp Resin 1, Flussrate 1 mL/min, Gradientensteigung: 30 CV, Puffersystem: 10 mmol/L Succinat; 10 mmol/L Essigsäure; 13,5 mmol/L MES; 9,2 mmol/L MOPSO; 12,5 mmol/L HEPES; 13,5 mmol/L TAPS; 16,6 mmol/L CHES.

Abbildung 17 zeigt, dass auch für unterschiedliche Ionenstärken der Leitfähigkeitsgradient linear verläuft. Der Abfall des pH-Wertes zu Beginn des pH-Gradienten ist von der Ionenstärke abhängig und für hohe Ionenstärken am stärksten ausgeprägt. Abbildung 16 und Abbildung 17 zeigen, dass duale Gradienten aufgrund der starken Abweichungen des pH-Wertes und deren Abhängigkeiten von der Ionenstärke und Gradientensteigung nicht für Modellierungsexperimente geeignet sind. Für pH-Gradienten entsteht eine Verzögerung zu Beginn des pH-Gradienten, jedoch verläuft dieser linear und mit der gewünschten Gradientensteigung.

3.3 Bestimmung der Chromatographiesäulenparameter

Die Bestimmung der Porositäten stellt eine Grundlage für die Berechnungen der mathematischen Modellierung dar. Die Bestimmung erfolgte nach der Beschreibung aus Abschnitt 2.7.1. Die Ergebnisse der Berechnungen aus den jeweiligen Elutionsvolumina sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

3 Ergebnisse

Tabelle 19: Übersicht der Porositäten der verwendeten Chromatographie-Resins (Koch, 2017)

Name	Zwischenkorn-Porosität ε	Poren-Porosität ε_p	Totale Porosität ε_T
Prototyp Resin 1	0,387	0,778	0,864
Prototyp Resin 2	0,380	0,774	0,860
Prototyp Resin 3	0,383	0,780	0,864
Prototyp Resin 4	0,365	0,777	0,858
Prototyp Resin 5	0,630	0,860	0,948
Prototyp Resin 6	0,496	0,757	0,877
Prototyp Resin 7	0,476	0,710	0,848
Prototyp Resin 8	0,457	0,681	0,827
Prototyp Resin 9	0,540	0,726	0,874
Eshmuno® CPX	0,383	0,760	0,830

Die Ergebnisse aus Tabelle 19 zeigen, dass die Porositäten von Resin 1 bis 4 nahezu identisch sind. Auch die Untersuchung des Eshmuno® CPX ergibt ähnliche Ergebnisse. Bei allen gelisteten Prototypen handelt es sich um Resins, deren Grundmaterial identisch ist. Resin 1 bis 4 sind Kationentauscher mit unterschiedlichen Liganden. Bei Resin 5 bis 9 handelt es sich um Mixed-Mode-Resins mit unterschiedlichen Liganden. Die Untersuchung zeigt hier geringe Unterschiede. Lediglich Resin 9, welches den Liganden mit dem größten Molekulargewicht besitzt, hebt sich von den anderen Mixed-Mode-Resins ab. Während der Experimente wurde bei allen Resins eine mögliche Interaktion des Blue Dextrans beobachtet, was teilweise zu Peak Tailing oder mehreren Peaks führte. Dieser Effekt trat insbesondere bei den Prototyp Resins 1 bis 3 sowie Prototyp Resin 5 bis 9 auf. Eine mögliche Ursache ist die Heterogenität des Blue Dextrans. Vor allem bei den Mixed-Mode-Resins wurden diese Varianten aufgetrennt.

3 Ergebnisse

3.4 Analyse der monoklonalen Antikörper-Proben

Die Antikörper-Proben wurden als filtrierter Zellkulturüberstand zur Verfügung gestellt. Diese Proben wurden aufgrund des hohen Verunreinigungsgrades nicht analysiert, jedoch erfolgte eine Analyse nach der initialen Protein A-Reinigung (siehe Abschnitt 2.5.1). Eventuelle Veränderungen der Probe durch die Bedingungen der Protein A-Reinigung werden nicht betrachtet (Gagnon et al., 2015).

3.4.1 SE-HPLC-Analyse der Antikörper-Proben

Zur Bestimmung von mAb-Fragmenten und -Aggregaten wurde eine SE-HPLC-Analyse durchgeführt (siehe Abschnitt 2.8). Das Ergebnis ist in Abbildung 18 dargestellt.

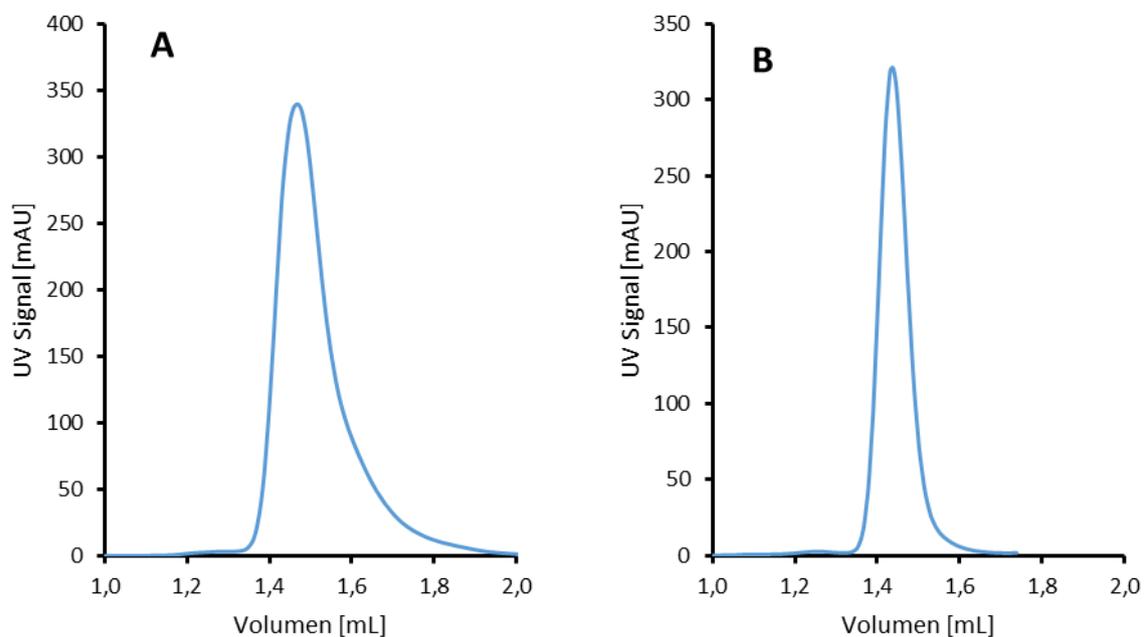


Abbildung 18: SE-HPLC-Analyse von mAb02 (A) und mAb05 (B). Chromatographie Säule: Tosoh TSKgel SuperSW mAb, Flussrate: 0,5 mL/min. Probenmenge: ca. 100 µg. Laufpuffer: 0,02 mol/L Na₂PO₄ + 0,3 mol/L NaCl + 0,03 % Na₃N, pH 7.

Abbildung 18 A zeigt die SE-HPLC-Analyse von mAb02. Die Elution erfolgt in zwei Peaks; einem Aggregat-Peak bei 1,3 mL Elutionsvolumen und einen Monomer-Peak bei 1,5 mL Elutionsvolumen. Der Aggregat-Peak hat einen Anteil von 0,66 % der gesamten Peakfläche. Der Monomer-Peak zeigt ein Peak Tailing, welches auf die Anwesenheit von Fragmenten hindeutet. Eine klare Abtrennung ist schwierig, weshalb dies vernachlässigt wurde, da die mAb02-Probe vor der Verwendung in den Modellierungsexperimenten weiter prozessiert wurde (siehe Abschnitt 3.8.1).

3 Ergebnisse

Die Analyse von mAb05 ist in Abbildung 18 B dargestellt. Die Integration der Peaks ergibt einen Aggregatanteil von 1,5 % sowie einen Fragment-Anteil von 0,9 %. Die Probe besteht somit zu 97,6 % aus Antikörper-Monomer, was für die darauffolgenden Modellierungsversuche wichtig ist. Teilweise wurde die Probe für die Modellierungsversuche weiter behandelt, um den Anteil an Aggregaten zu erhöhen (siehe Abschnitt 3.6.1).

3.4.2 Korrelation zwischen der Pufferkapazität und Ionenstärke und der Trennung von mAb Ladungsvarianten

In folgendem Kapitel wird der Einfluss der Ionenstärke auf die Trennung von Ladungsvarianten in analytischen Kationenaustauscher getestet. Hierzu wurde das Puffersystem schrittweise auf verschiedene Pufferkapazitäten verdünnt. Die Pufferkapazität korreliert mit der benötigten minimalen Menge an NaOH, welche zum Einstellen des pH-Wertes notwendig ist. Abbildung 19 vergleicht die jeweiligen resultierenden Chromatogramme.

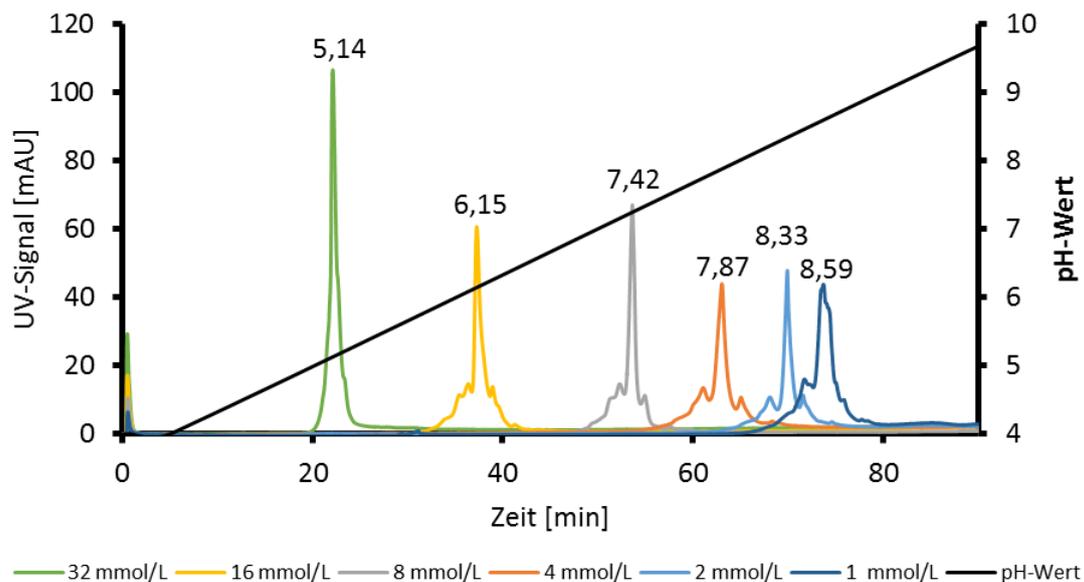


Abbildung 19: Vergleich des Einflusses der Pufferkapazität auf den Elution-pH-Wert und die Auftrennung von mAb05. HPLC-Säule: Biopro SP-F, Probe: 100 µg mab05, Flussrate: 1 mL/min, pH-Gradient von pH 4 auf pH 10 in 90 min, System: HP1050, Puffersystem: Puffer A: 3,77 mmol/L Essigsäure, 8,17 mmol/L MES, 5,12 mmol/L MOPSO, 4,02 mmol/L Na-Formiat, pH 4; Puffer B: 9,72 mmol/L HEPES, 3,2 mmol/L TAPS, 5,30 mmol/L CHES, pH 10.

Aus vorheriger Abbildung kann abgelesen werden, dass eine Erniedrigung der Pufferkapazität und damit der Ionenstärke zu einer Erhöhung des Elutions-pH-Wertes

3 Ergebnisse

führt. Diese Veränderung ist vor allem bei niedrigen Pufferkapazitäten stark ausgeprägt. Bei einer Pufferkapazität von 1 mmol/L eluiert der mAb erst bei einem pH-Wert von 8,59. Der berechnete isoelektrische Punkt liegt bei 7,9 und damit unter dem Elutions-pH-Wert. Auch wird die Auftrennung der einzelnen Varianten mit steigenden Elutions-pH-Wert verbessert. Die größten Unterschiede sind zwischen 32 mmol/L und 16 mmol/L bzw. 2 mmol/L und 1 mmol/L Pufferkapazität erkennbar. Für diese analytische Säule wird die Auflösung durch geringe Ionenstärken verbessert.

Die Linearität des pH-Gradienten ist bei der HPLC Analyse aufgrund des hohen Druckes schwierig zu bewerten. Das Puffersystem wurde an einer Äkta Purifier 10 ohne Säule gemessen und der pH-Gradient war linear (Daten nicht gezeigt). Das Chromatographie-Material könnte die Linearität jedoch verschlechtern. Eine Online-Messung ist bei diesen HPLC-Systemen nicht möglich. Dies könnte z.B. bei dem Versuch mit 1 mmol/L Pufferkapazität eine Rolle spielen.

3.4.3 CEX-HPLC-Analyse der Antikörper-Proben

Der Protein A-Elutionspool wurde ebenfalls durch CEX-HPLC untersucht. Die entsprechende Analyse für mAb02 ist in Abbildung 20 dargestellt.

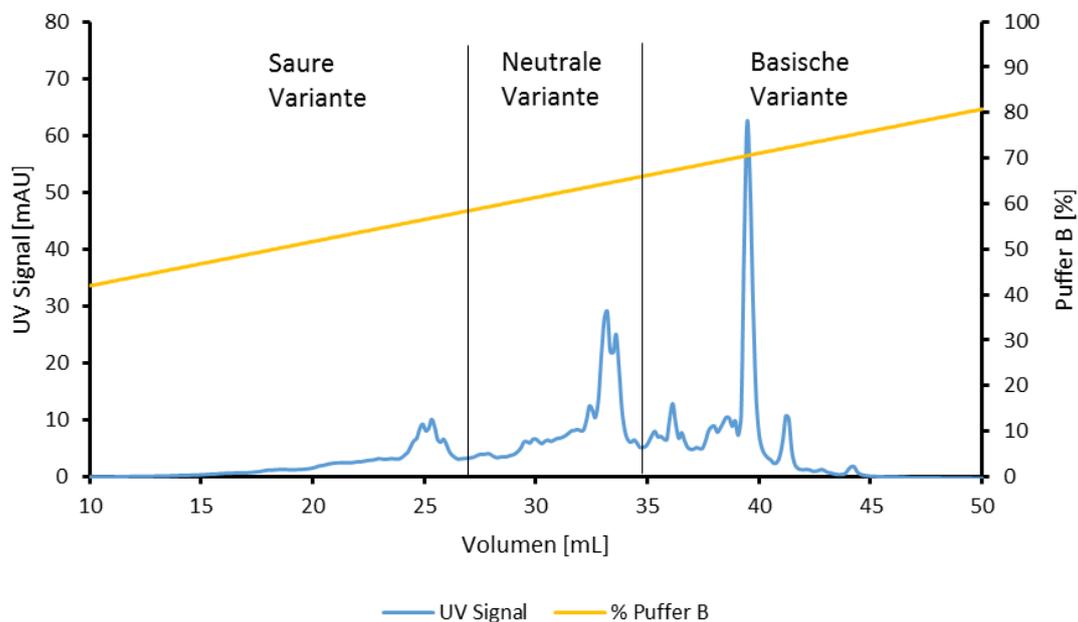


Abbildung 20: CEX-HPLC Analyse von mAb02. Säule: YMC Biopro SP-F. Puffer A: 8,8 mmol/L Essigsäure, 10,0 mmol/L MES, 15,5 mmol/L MOPSO, pH 5,0. Puffer B: 18,4 mmol/L HEPES, 7,2 mmol/L TAPS, 7,7 mmol/L CHES pH 9,5. Flussrate 0,7 mL/min, 40 - 90 % Puffer B in 43 CV.

3 Ergebnisse

Die CEX-Analyse des Antikörpers mAb02 zeigt die Heterogenität der Probe, da mehr als 20 unterschiedlich geladene Varianten gefunden wurden. Eine genaue Differenzierung jeder Variante ist durch diese Analyse nicht möglich. An dieser Stelle wurde als Vereinfachung eine Klassifizierung der Varianten eingeführt, welche in Abbildung 20 gezeigt ist. Gering geladene Spezies wurde als „saure Variante“ zusammengefasst. Die darauffolgenden Peaks wurden als „neutrale Spezies“ zusammengefasst und als Zielprotein oder Zielprodukt definiert. Die stark geladenen Spezies wurden als „basische Variante“ bezeichnet. Auch eine alternative Klassifizierung mit einer zusätzlichen Subgruppe mit der Spezies bei einem Elutionsvolumen von 36 mL wäre möglich. Aufgrund des geringen Anteils dieser Spezies wurde jedoch auf die Herstellung von Präparaten dieser Varianten verzichtet.

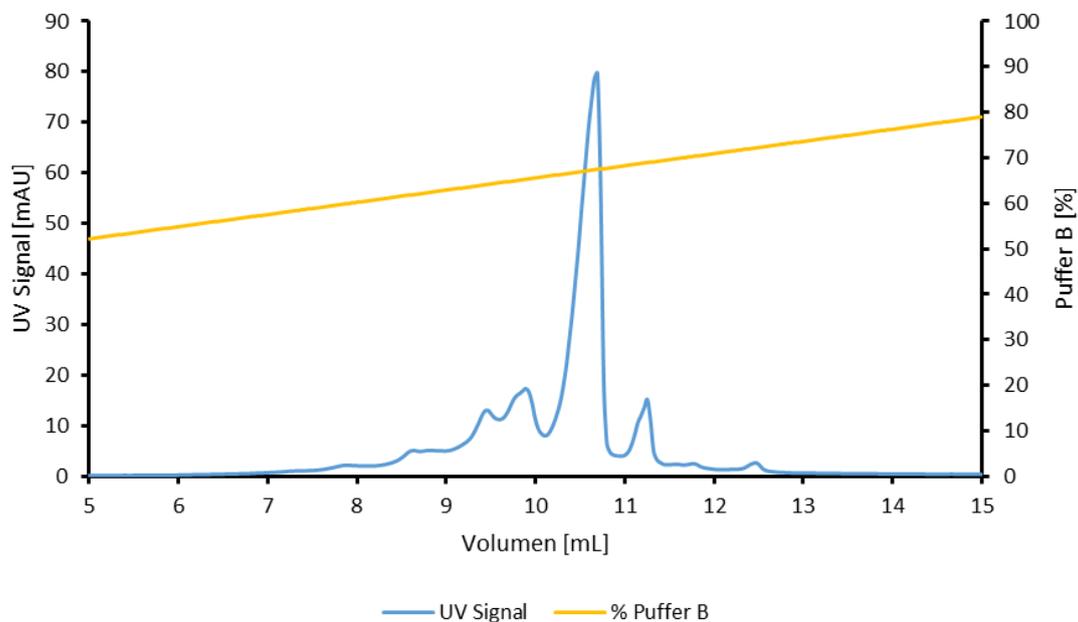


Abbildung 21: CEX-HPLC Analyse von mAb05. Säule: YMC Biopro SP-F. Puffer A: 8,8 mmol/L Essigsäure, 10,0 mmol/L MES, 15,5 mmol/L MOPSO, pH 5,0. Puffer B: 18,4 mmol/L HEPES, 7,2 mmol/L TAPS, 7,7 mmol/L CHES pH 9,5. Flussrate 0,7 mL/min, 50 - 80 % Puffer B in 14 CV.

Die CEX-Analyse des monoklonalen Antikörpers mAb05 ist in Abbildung 21 dargestellt. Neben der Hauptspezies bei 10,5 mL Elutionsvolumen sind sieben weitere Ladungsvarianten zu erkennen, wobei eine Zuordnung aufgrund der geringen Auflösung schwierig ist. Im Vergleich zu mAb02 ist die Probe jedoch deutlich homogener und dadurch für den direkten Einsatz in Modellierungsexperimenten geeignet.

3 Ergebnisse

3.5 Charakterisierung des Donnan-Effektes unter der Verwendung des DIX-Modells

3.5.1 Berechnung des Einflusses der Proteinladung auf den Donnan-Effekt

In Abschnitt 2.6.2 wurde gezeigt, dass der Einfluss der Proteinladung auf den Donnan-Effekt mathematisch berücksichtigt werden kann. Das Donnan-Verhältnis r_D , welches für die Berechnung des DIX-Modells benötigt wird, kann unter Berücksichtigung des Einflusses des Proteins (Gleichung (33)) und ohne (Gleichung (40)) berechnet werden. Das Vernachlässigen des Proteins hat den Vorteil, dass die Gleichung (40) implizit ist und direkt gelöst werden kann. Der Einfluss dieser Vereinfachung auf den r_D -Wert soll in diesem Kapitel untersucht werden. Für beide Gleichungen wurde r_D für eine niedrige und hohe Na^+ -Konzentration berechnet. Bei Gleichung (33) wurde diese Rechnung iterativ in Microsoft Excel gelöst. Das Ergebnis ist in Abbildung 22 dargestellt.

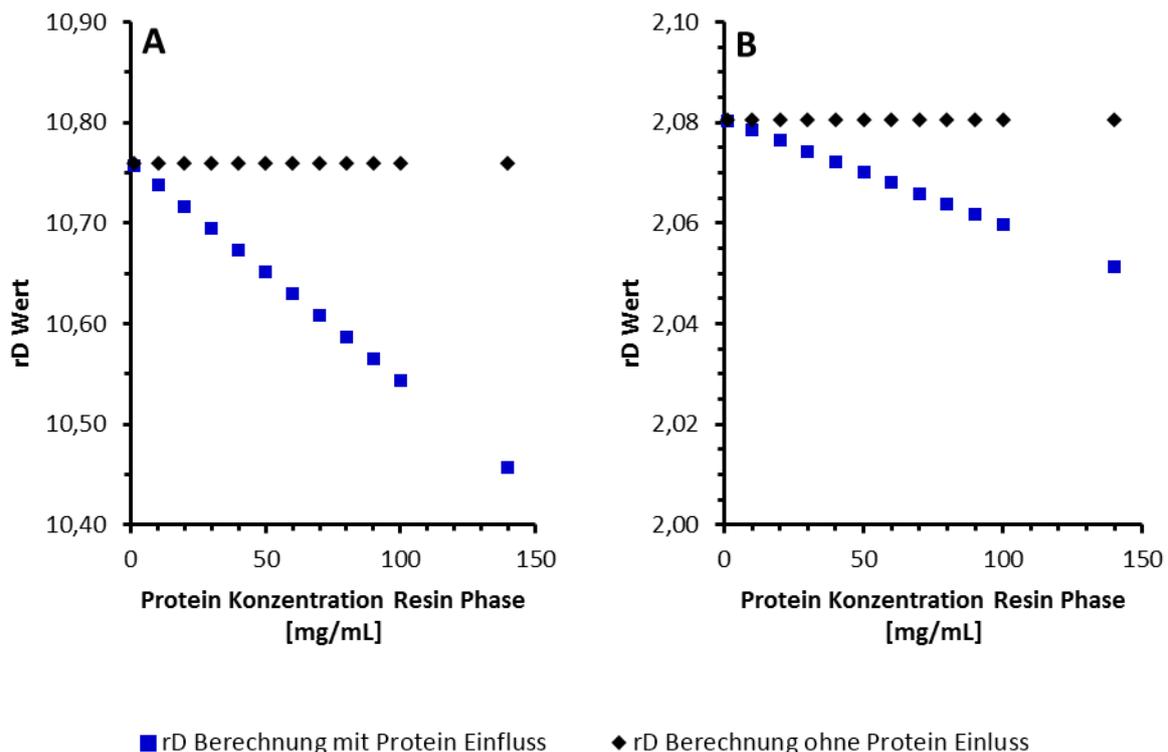


Abbildung 22: Berechnung des Einflusses der Proteinladung und Proteinkonzentration auf den r_D -Wert bei Na^+ -Konzentrationen von 30 mmol/L (A) und 200 mmol/L (B). Berechnung von r_D unter Berücksichtigung des Proteins erfolgte mit Gleichung (33) und unter Vernachlässigung des Proteins mit Gleichung (40). Na^+ -Konzentration A: 30 mmol/L; B: 200 mmol/L; pH-Wert: 6,0, N(carboxyl): 6,5; Anzahl der bestimmten Aminosäuren des Proteins: N(Amine): 7,53, N(Histidine): 3,65; N(Ntermini): 4,0; $\Delta G_p/RT$: 10,7; $\Delta G_s/RT$: 0,548; Lambda: 0,32 mol/mL Resin.

3 Ergebnisse

Die Abbildung zeigt, dass der Einfluss der Proteinladung mit steigender Proteinkonzentration zunimmt, da ein steigender Unterschied des r_D -Wertes zwischen beiden Kurven bei zunehmender Proteinkonzentration erkennbar ist. Weiterhin zeigen die Berechnungen, dass der Unterschied für eine geringe Salzkonzentration (Abbildung 22 A) größer ist, als für eine hohe Salzkonzentration (Abbildung 22 B). Dies ist auf die geringe Anzahl an Gesamtladungen für niedrige Salzkonzentrationen und den größeren r_D -Wert zurückzuführen (siehe Abbildung 25). In beiden Fällen ist erkennbar, dass für geringe Proteinkonzentrationen < 1 mg/mL kein Einfluss der Proteinladung auf den r_D -Wert festzustellen ist. Da alle Modellierungsexperimente bei diesen niedrigen Proteinbeladungen durchgeführt werden, hat eine Vernachlässigung der Proteinbeladung auf den r_D -Wert keinen Einfluss. Auch bei hohen Proteinbeladungen > 150 mg/mL ist der Einfluss der Proteinladung gering, sodass auch hier den Einfluss möglicherweise vernachlässigbar wäre.

3.5.2 Berechnung der Ligandendichte unter Verwendung des DIX-Modells

Die Ligandendichte ist ein Schlüsselparameter in der Modellierung, weshalb eine korrekte Berechnung erfolgen muss. Die in Abschnitt 2.6.5 hergeleitete Gleichung (64) beinhaltet das DIX-Modell und berechnet die Abhängigkeit der Ligandendichte vom pH-Wert innerhalb der Pore. So ist diese abhängig vom r_D -Wert und damit vom pH-Wert, der Salzkonzentration und der Ligandendichte selbst. Letzteres erfordert eine iterative Lösung der Gleichung. Das Ergebnis ist in Abbildung 23 dargestellt.

3 Ergebnisse

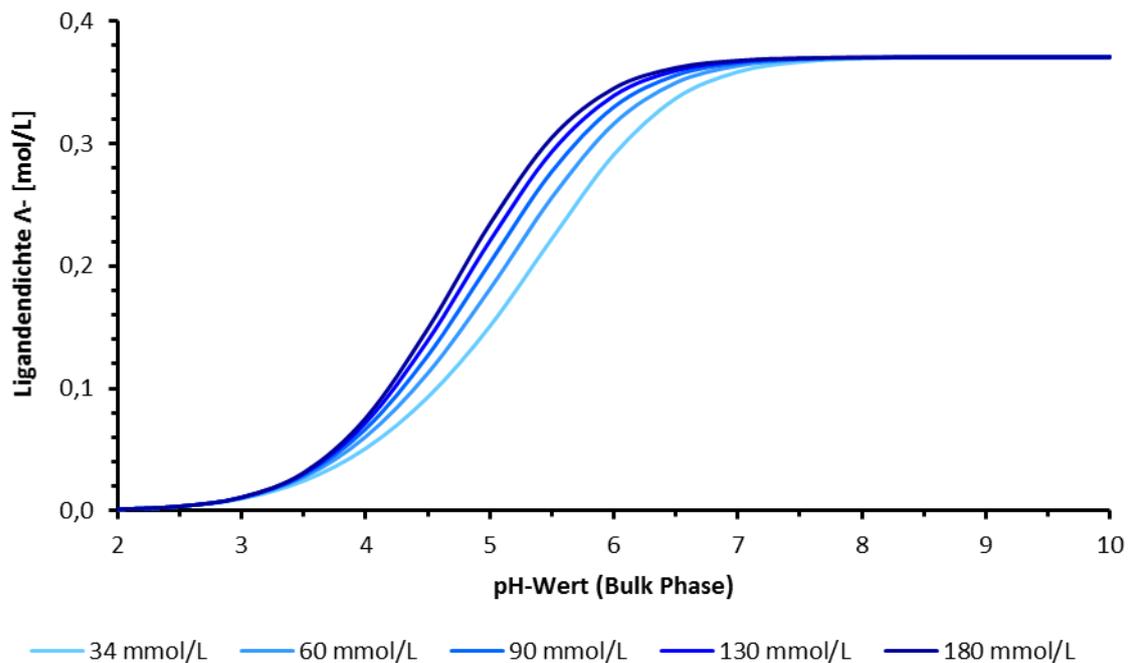


Abbildung 23: Berechnung der Ligandendichte Λ^- in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Na^+ -Konzentration in der Bulk-Phase für Prototyp Resin 1 (100 % COO-Liganden).

Die Abbildung zeigt die Ligandendichte in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Salzkonzentrationen aus Abschnitt 3.7 für Prototyp Resin 1, einem Carboxyl-Resin. Bei höheren Salzkonzentrationen von 180 mmol/L nähert sich die Kurve asymptotisch der idealen Titrationskurve des Liganden an, also der Kurve, bei der keine Donnan-Effekte betrachtet werden. Dies ist auf den sinkenden r_D -Wert für hohe Salzkonzentrationen zurückzuführen (siehe Abbildung 25). Für niedrige Salzkonzentrationen verschiebt sich die Kurve zu höheren pH-Werten und besitzt eine geringere Steigung.

Der Zusammenhang zwischen Ligandendichte und den Bedingungen der Resin-Phase wird deutlich, wenn diese gegen den pH-Wert der Resin-Phase anstelle des pH-Wertes der Bulk-Phase aufgetragen wird. Dies ist für die Prototyp Resins 1 bis 4 in Abbildung 24 gezeigt.

3 Ergebnisse

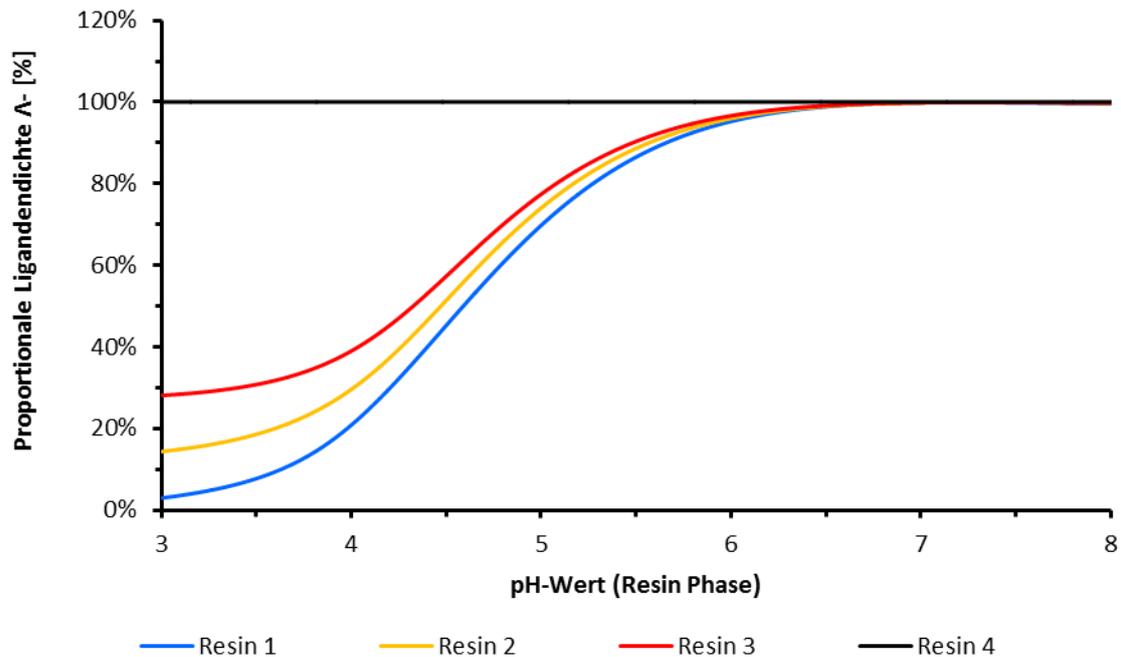


Abbildung 24: Berechnung der prozentualen Ligandendichte Λ^- in Abhängigkeit des pH-Wertes in der Resin-Phase für Prototyp Resins 1 bis 4 (unterschiedliche $\text{COO}^- / \text{SO}_3^-$ -Zusammensetzung).

Der Vergleich von Abbildung 23 und Abbildung 24 verdeutlicht den Einfluss des r_D -Wertes auf die Ligandendichte. Im Gegensatz zu Abbildung 23 (Betrachtung pH-Wert der Bulk-Phase) sind die Kurven beim pH-Wert der Resin-Phase nicht von der Salzkonzentration abhängig. Diese Abhängigkeit fließt nun indirekt über den pH-Wert der Resin-Phase ein, der von der Salzkonzentration und der Ligandendichte abhängig ist (siehe Gleichung (34)).

Die vier verschiedenen Prototyp Resins 1 bis 4 unterscheiden sich nur durch die Anteile an COO^- - und SO_3^- -Liganden. Die Gesamtzahl an Liganden ist nahezu identisch (siehe Tabelle 11). Entsprechend zeigt Abbildung 24, dass für das Carboxyl-Resin 1 die Ligandendichte für niedrige pH-Werte gegen null geht. Für die gemixten Resins 2 und 3 findet eine Dissoziation der Carboxylgruppen statt, jedoch verhindert der SO_3^- -Anteil eine vollständige Entladung des Resins. Prototyp Resin 4 besteht ausschließlich aus SO_3^- -Liganden, weshalb eine Dissoziation erst bei sehr niedrigen pH-Werten ($\text{pH} < 2$) stattfindet. In diesem Projekt wurden alle Experimente bei einem pH-Wert $> 4,75$ durchgeführt, weshalb diese Dissoziation vernachlässigt wurde. Der pK_s -Wert der Liganden ist in diesen Berechnungen von der Ionenstärke unabhängig. Eine

3 Ergebnisse

entsprechende Berücksichtigung über die Davis-Gleichung würde die Kurven leicht ändern (Davis, 1962).

3.5.3 Berechnung der Bedingungen der Resin-Phase bezüglich pH-Wert und Ionenstärke

Nach der Beschreibung der Ligandendichte werden im folgenden Kapitel die daraus berechneten weiteren Parameter des DIX-Modells beschrieben. Eine Kennzahl des Modells ist das Donnan-Verhältnis r_D , welches den Konzentrierungsfaktor des Gegenions zwischen Bulk- und Resin-Phase aufgrund des Donnan-Effektes beschreibt (siehe Gleichung (40)). Der r_D -Wert ist von der Ligandendichte, dem pH-Wert und der Salzkonzentration abhängig. Abbildung 25 zeigt diese Abhängigkeiten für Prototyp Resin 1 und 4.

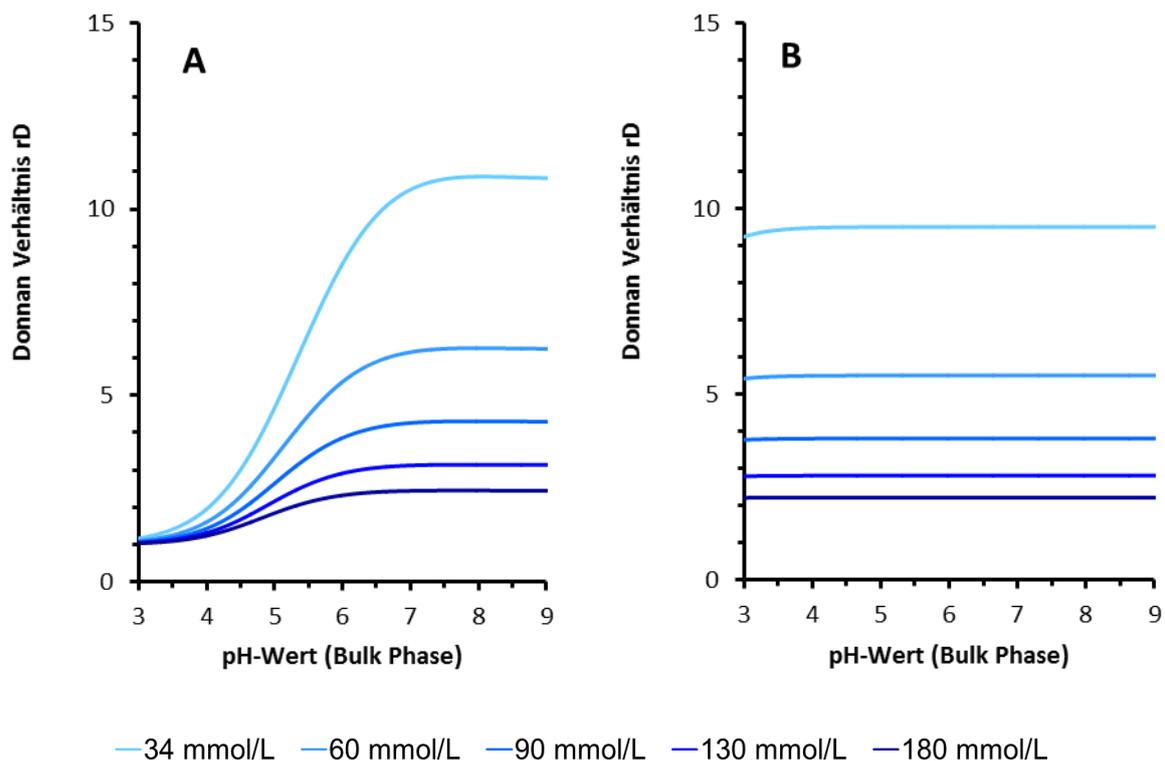


Abbildung 25: Berechnung des Zusammenhangs zwischen dem Donnan-Verhältnis r_D und dem pH-Wert der Bulk-Phase in Abhängigkeit von der Salzkonzentration der Bulk-Phase für Prototyp Resin 1 (A) und Resin 4 (B).

In Abbildung 25 ist der r_D -Wert in Abhängigkeit vom pH-Wert der Bulk-Phase und den Salzkonzentrationen aus Abschnitt 3.7 gezeigt. Die Berechnungen wurden für das Carboxyl-Resin 1 (Abbildung 25 A) und das SO_3 -Resin 4 (Abbildung 25 B)

3 Ergebnisse

durchgeführt. Bei beiden Resins steigt der r_D -Wert mit sinkender Salzkonzentration. Dies ist auf die gleichbleibende Anzahl an Liganden zurückzuführen, wobei die Ladung der Liganden durch entsprechende Gegenionen ausgeglichen werden muss (siehe Gleichung (23)). Für höhere Salzkonzentrationen wird r_D stetig kleiner. Für sehr kleine Salzkonzentrationen geht r_D gegen unendlich. Übersteigt die Ionenstärke die Ligandendichte um ein Vielfaches, ist der Einfluss vernachlässigbar. Dies zeigt, dass der Donnan-Effekt vor allem bei niedrigen Ionenstärken zu deutlichen Unterschieden zwischen Bulk- und Resin-Phase führt. Für höhere Salzkonzentrationen wird der Einfluss geringer. Abbildung 25 A zeigt die Abhängigkeit des r_D -Wertes von der Dissoziation der Carboxy-Liganden von Resin 1. Durch die Entladung des Resins sinkt der aus der Ladung der Liganden resultierende r_D -Wert. Bei Resin 4 tritt dieser Effekt in dem untersuchten Bereich nicht ein.

Ein r_D -Wert größer eins führt zu einer Akkumulation von Gegenionen. Dies ist in Abbildung 26 dargestellt.

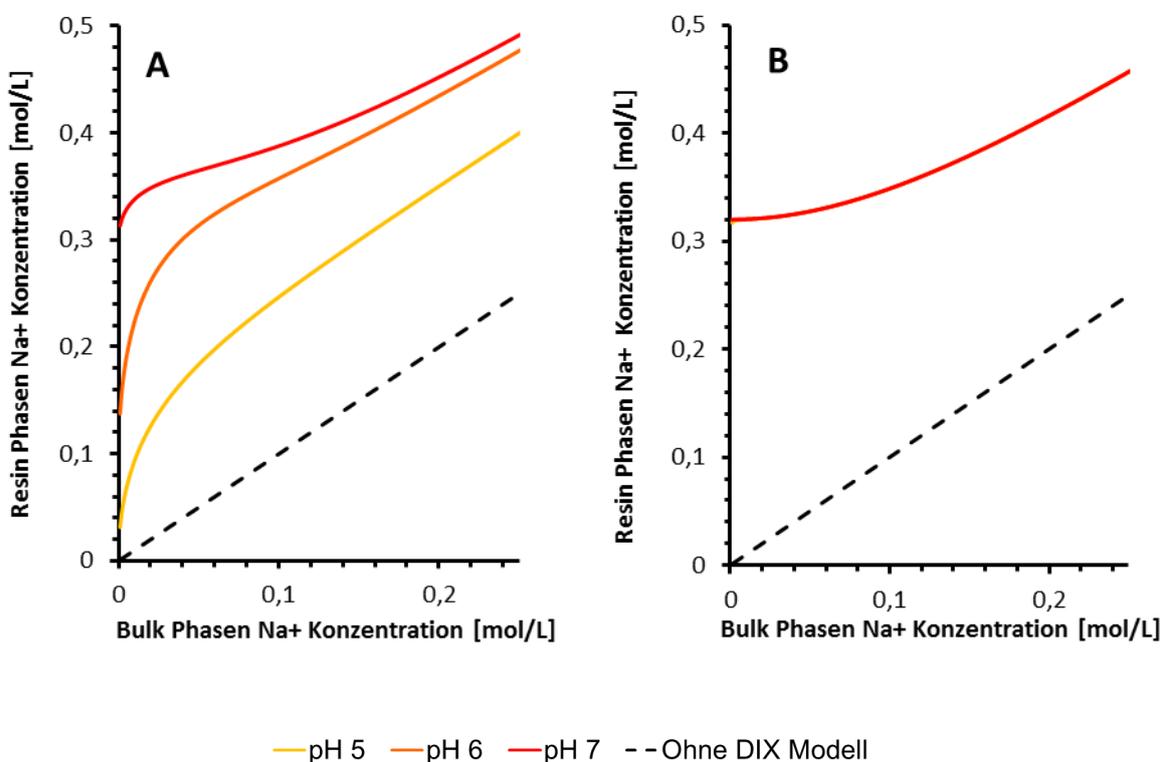


Abbildung 26: Berechnung der Na⁺-Konzentration in der Bulk- und Resin-Phase in Abhängigkeit vom pH-Wert für Prototyp Resin 1 (A) und Resin 4 (B).

3 Ergebnisse

In Abbildung 26 ist die Na^+ -Konzentration der Resin-Phase gegen die Na^+ -Konzentration der Bulk-Phase in Abhängigkeit von drei pH-Werten ($\text{pH} = 5 / 6 / 7$) gezeigt. Die Berechnungen wurden für das Carboxyl-Resin 1 (Abbildung 26 A) und das SO_3 -Resin 4 (Abbildung 26 B) durchgeführt. Der Graph veranschaulicht, dass die Na^+ -Konzentration größer als die Ligandendichte zu dem jeweiligen pH-Wert ist. Dabei ist der Unterschied zwischen der Anzahl an Liganden und der Na^+ -Konzentration in der Resin-Phase auf die Menge an Cl^- -Ionen zurückzuführen, welche zusätzlich in der Resin-Phase enthalten sind (siehe Gleichung (23)). Für den starken Kationentauscher aus Abbildung 26 B nähert sich die Na^+ -Konzentration der Resin-Phase der Ligandendichte an, wenn die Na^+ -Konzentration der Bulk-Phase gegen null geht. Bei diesen Bedingungen befindet sich die minimale Menge an Na^+ -Konzentration in der Resin-Phase, die für den Ausgleich der Ladungen der Liganden notwendig ist. Da beim starken Kationentauscher keine Abhängigkeit der Ligandendichte vom pH-Wert gegeben ist, verlaufen alle drei Kurven identisch. Für den schwachen Kationentauscher aus Abbildung 26 A ist die Ligandendichte vom pH-Wert abhängig (siehe Abbildung 23), weshalb auch die Na^+ -Konzentration für verschiedene pH-Werte unterschiedlich sind. Für $\text{pH} 5$ in der Bulk-Phase und einer Salzkonzentration nahe null geht ebenfalls die Ligandendichte gegen null. Dies führt zu einem minimalen Unterschied an Na^+ -Konzentration zwischen Bulk- und Resin-Phase. Für höhere pH-Werte wird der schwache Kationentauscher vollständig entladen und zeigt so ein ähnliches Verhalten wie Resin 4.

Abbildung 26 zeigt den Unterschied der Annahmen des SD-Modells und des DIX-Modells. Die gestrichelte Linie in beiden Graphen zeigt die Na^+ -Konzentration, wenn die Bedingungen der Resin-Phase mit denen der Bulk-Phase gleichgesetzt werden. Es wird deutlich, dass eine solche Annahme zu großen Unterschieden zwischen dem DIX-Modell und dem SD-Modell führt.

Die identischen Berechnungen geben ebenfalls Aufschluss über den pH-Wert innerhalb der Pore. Dieser ist in Abbildung 27 dargestellt.

3 Ergebnisse

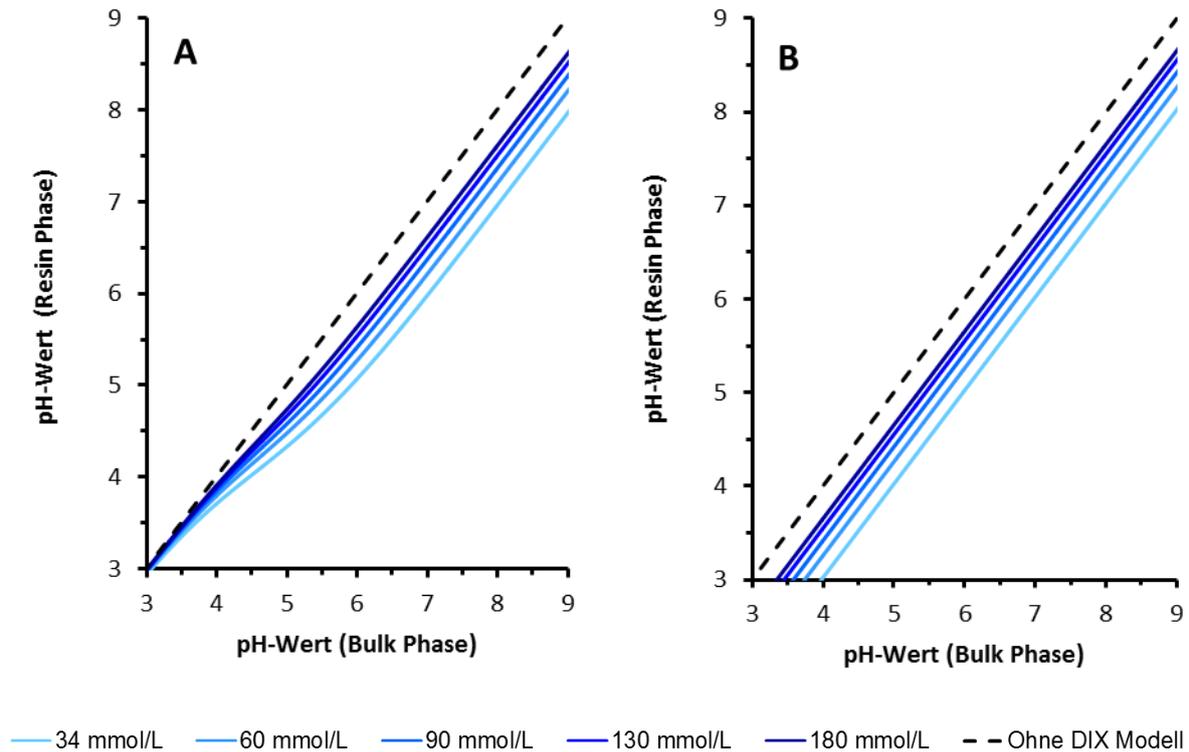


Abbildung 27: Berechnung des Zusammenhangs zwischen dem pH-Wert der Resin-Phase und dem pH-Wert der Bulk-Phase in Abhängigkeit von der Salzkonzentration der Bulk-Phase für Prototyp Resin 1 (A) und Resin 4 (B).

Abbildung 27 zeigt den Zusammenhang zwischen dem pH-Wert in der Resin-Phase und dem pH-Wert in der Bulk-Phase in Abhängigkeit von der Salzkonzentration. Die Berechnungen wurden für das Carboxyl-Resin 1 (Abbildung 27 A) und das SO_3 -Resin 4 (Abbildung 27 B) durchgeführt. Es ist erkennbar, dass der pH-Wert der Resin-Phase mit sinkender Na^+ -Konzentration stärker vom pH-Wert der Bulk-Phase abweicht. Der Grund dafür ist die Akkumulation von Gegenionen in der Resin-Phase. Hierbei werden neben den Na^+ -Ionen auch H^+ -Ionen aufgenommen. Die absolute Konzentration an H^+ -Ionen ist geringer, jedoch hat dieser Effekt einen Einfluss auf den pH-Wert. Bei einer Na^+ -Konzentration von 34 mmol/L führt dies zu einem Unterschied von einer pH-Einheit bei Verwendung von Resin 4 (Abbildung 27 B). Für Resin 4 ist diese Differenz aufgrund der konstanten Ligandendichte unabhängig vom pH-Wert der Bulk-Phase. Bei Resin 1 wird die Differenz zwischen pH-Wert der Resin- und Bulk-Phase mit absinkender Ligandendichte geringer (Abbildung 27 A). Die Rückschlüsse der Verteilung der Na^+ -Ionen aus Abbildung 26 können somit auf den pH-Wert übertragen werden.

3 Ergebnisse

3.6 Modellierung der Trennung von Antikörper-Monomer, -Dimer und -Aggregat Spezies auf einem starken Kationentauscher

In diesem Abschnitt wurde die Modellierung mit dem SMA Modell von Simon Kluters durchgeführt. Die experimentelle Arbeit sowie die Modellierung mit dem DIX-Modell wurden selbst durchgeführt.

In diesem Kapitel wird die Trennung von Antikörper-Monomer, -Dimer und einer HMW-Spezies auf Eshmuno® CPX untersucht. Die experimentellen Daten werden mit dem SD-Modell und dem DIX-Modell beschrieben und die erhaltenden Parameter miteinander verglichen. Die Daten wurden teilweise von Kluters et. al publiziert (Kluters et al., 2016). Diese Publikation beinhaltet ebenfalls den Scale-Up unter Verwendung der Modellierungsparameter des SD-Modells.

3.6.1 Herstellen der mAb05 Monomer-, Dimer- und Aggregatprobe

Für die Untersuchung wird eine Antikörper-Probe, welche aus Monomer-, Dimer- und Aggregaten besteht, verwendet. Es wurde mAb05 gewählt, da dieser einen geringen Anteil an Ladungsvarianten enthält. Das Protein A-Eluat wurde mit der in Abschnitt 2.5.3 beschriebenen Methode behandelt, um die Bildung von Dimeren und Aggregaten auszulösen. Das Ergebnis ist in Abbildung 28 dargestellt.

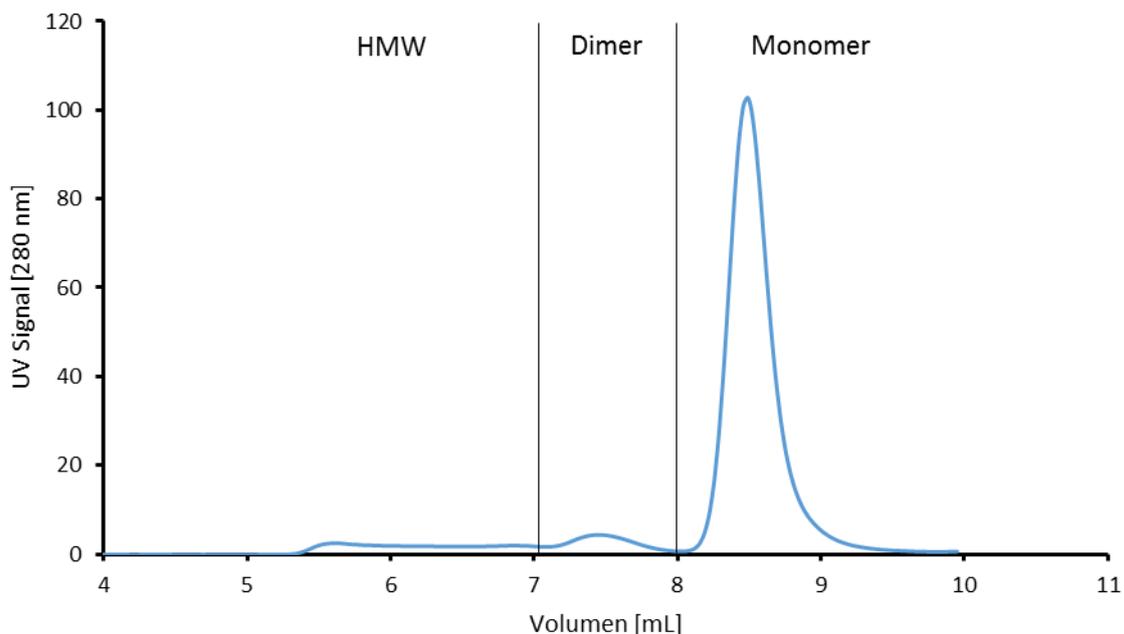


Abbildung 28: SE-HPLC Analyse der aggregierten mAb05-Probe. Chromatographiesäule: Biosep SEC s3000, Flussrate: 1 mL/min. Probenmenge: ca. 100 µg, Laufpuffer: 0,02 mol/L Na₂PO₄ + 0,3 mol/L NaCl + 0,03% Na₃N, pH 7 (Kluters et al., 2016).

3 Ergebnisse

Die SE-HPLC-Analyse aus Abbildung 28 zeigt neben dem Monomer-Peak einen signifikanten Anteil an Dimeren und HMW-Spezies. HMW-Spezies waren in der Ausgangsprobe nicht zu erkennen. Der HMW-Peak ist in mehrere Sub-Peaks unterteilt und ist daher heterogen. Der Anteil an HMW beträgt ca. 12 % der gesamten Peakfläche. Im Vergleich zur Ausgangsprobe in Abbildung 18 B ist eine deutliche Zunahme an Dimer zu erkennen. Der Dimer-Peak ist eindeutig zuzuordnen und beträgt 6 % der gesamten Peakfläche. Der Monomer-Anteil beträgt somit 82 %. Diese Probe wurde für die nachfolgenden Modellierungsexperimente verwendet.

Die Modellierung erfolgte in diesem Kapitel ausschließlich mit pH-Gradienten. Dabei wurden fünf Salzkonzentrationen mit jeweils vier Gradientensteigungen untersucht und insgesamt 20 Experimente durchgeführt. Die SE-HPLC-Analyse jedes Experimentes ergab anschließend den genauen Retentionszeitpunkt jeder Spezies. Der Retentionszeitpunkt wurde mit dem pH-Wert zu diesem Zeitpunkt korreliert. Dieser Datensatz wurde mit dem SD-Modell und auch mit dem DIX-Modell beschrieben.

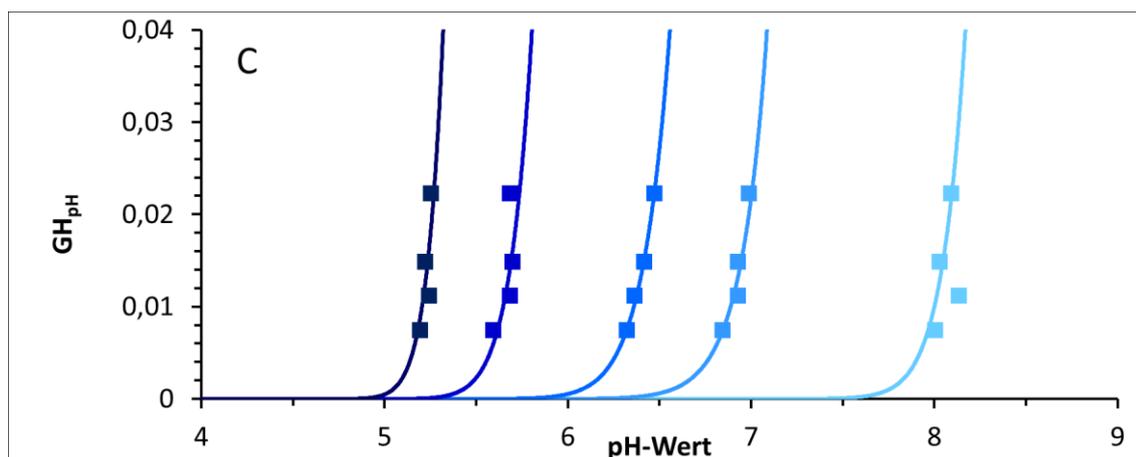
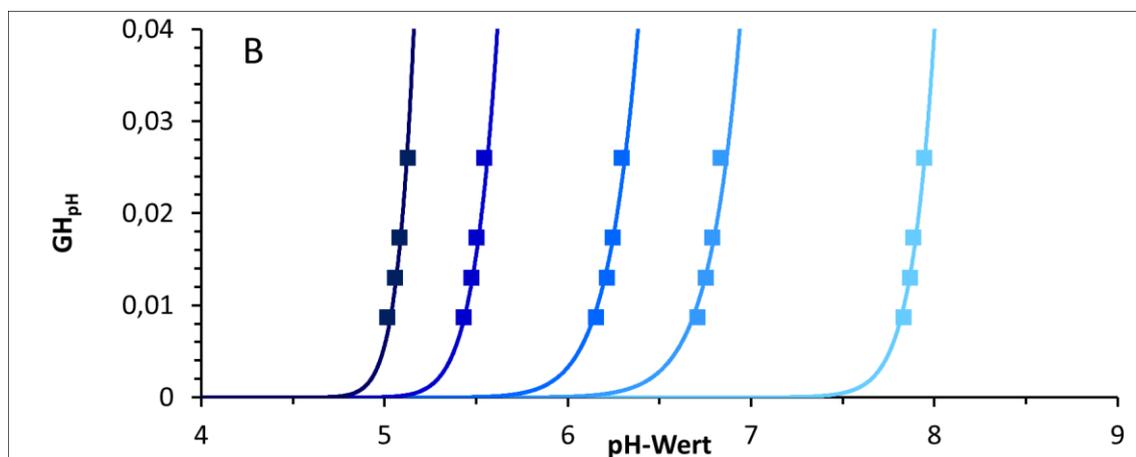
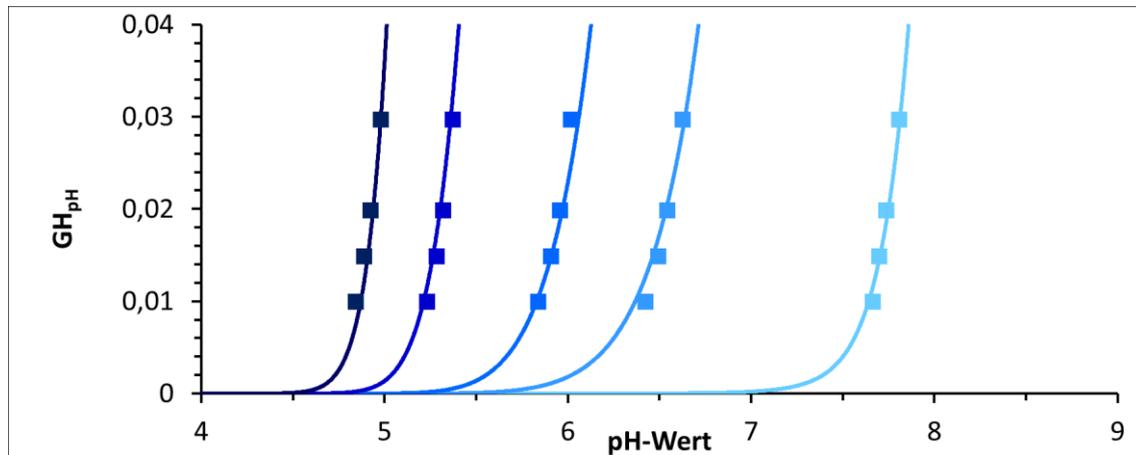
3.6.2 Modellierung der experimentellen Daten unter Anwendung des SD-Modells

Das Ergebnis für das SD-Modell ist in Abbildung 29 dargestellt. Der Graph zeigt eine sehr gute Korrelation zwischen experimentellen Datenpunkten und den berechneten Kurven des SD-Modells. Einzelne Datenpunkte, wie z.B. bei der HMW-Spezies bei 50 mmol/L, 80 CV Gradientensteigung, liegen außerhalb des Trends. Eine Erklärung für die größere Variation der HMW-Spezies könnte die Heterogenität der Ausgangsprobe sein. Auch die schwierige und subjektive SEC-Analyse der HMW-Spezies kann einen Einfluss haben. Die experimentellen Daten für das Monomer und Dimer zeigen jedoch eindeutige Trends, die der Form der mathematischen Kurven entspricht. Der Elutionsbereich des Monomers liegt zwischen pH 4,85 bis 7,81. Das Dimer bindet etwas stärker und eluiert zwischen pH 5,02 und 7,95. Am stärksten bindet die HMW-Spezies, sie eluiert zwischen pH 5,20 und 8,10.

Die Bestimmung der Parameter wurde über die Curve Fit-Funktion der Software Berkeley Madonna® durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass die Wahl der GUESS-Werte einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis hat. Weiterhin wurde beobachtet, dass mehrere Ergebnisse mit ähnlich gutem Korrelationswert erzielt werden können. Dies ist ein Hinweis auf ein unterdefiniertes System, bei dem zu wenige Datenpunkte für eine zu große Anzahl an Parametern gegeben sind. Diese

3 Ergebnisse

Problematik wird in Abschnitt 3.7 weiter erläutert. Die Parameter der besten Korrelation sind in Tabelle 20 dargestellt.



■ 50 mmol/L ■ 80 mmol/L ■ 110 mmol/L ■ 170 mmol/L ■ 230 mmol/L

Abbildung 29: Modellierung von mAb05-Monomer (A), -Dimer (B) und -Aggregaten (C). Ergebnis der Korrelation zwischen experimentellen Datenpunkte und berechneten Kurven unter Anwendung des SD-Modells (Klutets et al., 2016).

3 Ergebnisse

Tabelle 20. Übersicht der berechneten Parameter der Modellierung von mAb05 unter der Verwendung des SD-Modells (Klutets et al., 2016)

Protein	$\Delta G_S^0/RT$	$\Delta G_P^0/RT$	N (carb)	N (his)	N(Nterm)	N(Amine)
			pK _s = 4,45	pK _s = 6,0	pK _s = 7,5	pK _s = 10,4
Monomer	1,92	18,02	14,54	1,30	2,58	18,63
Dimer	1,92	26,47	22,45	2,39	3,59	28,56
HMW	1,92	29,53	28,41	3,12	3,80	35,57

Die bestimmten Parameter aus Tabelle 20 zeigen die Modellparameter des SD-Modells. Da $\Delta G_S^0/RT$ proteinunabhängig ist, wurde dieser Parameter für alle Proteine gleichgesetzt. $\Delta G_P^0/RT$ zeigt steigende Werte von Monomer über Dimer zu HMW. $\Delta G_P^0/RT$ spiegelt nicht-ionische Wechselwirkungen und die Änderung der Entropie des Proteins mit dem Resin wieder, weshalb mit steigender Proteingröße dieser Parameter ebenfalls zunimmt. Die Anzahl N_i der einzelnen Aminosäuren reflektiert die beteiligten Aminosäuren zur Bindung des Proteins. Die Werte aus Tabelle 20 zeigen ebenfalls steigende Werte von Monomer zur HMW-Spezies für jede Aminosäure. Dies bedeutet, dass bei größer werdenden Proteinkomplexen mehr Aminosäureseitenketten an das Resin binden und so die Bindung verstärken. Eine Ausnahme ist die Carboxylgruppe, die dem Protein eine zusätzliche negative Ladung gibt. Die Elutions-pH-Werte bestätigen die Trends der bestimmten Modellparameter. Das Monomer eluiert bei 110 mmol/L Na⁺, 40 CV Gradientensteigung bei einem pH-Wert von pH 6,02, wohingegen das Dimer bei einem höheren pH-Wert von pH 6,30 eluiert. Die HMW Spezies bindet mit einem Elutions-pH-Wert von 6,48 am stärksten.

3.6.3 Modellierung der experimentellen Daten unter Anwendung des DIX-Modells

Der gleiche Datensatz wie in Kapitel 3.6.2 wurde ebenfalls mit dem DIX-Modell beschrieben. Die Daten ändern sich nicht, da die Messwerte auf die Bedingungen der Bulk-Phase bezogen werden. So wird beispielsweise der pH-Wert immer in der Pufferphase gemessen. Die Korrelation der experimentellen Daten und der berechneten Kurven des DIX-Modells ist in Abbildung 30 gezeigt. Auch mit dem DIX-

3 Ergebnisse

Modell wurde eine gute Korrelation erreicht. Die Ergebnisse der Berechnungen sind Tabelle 21 zusammengefasst.

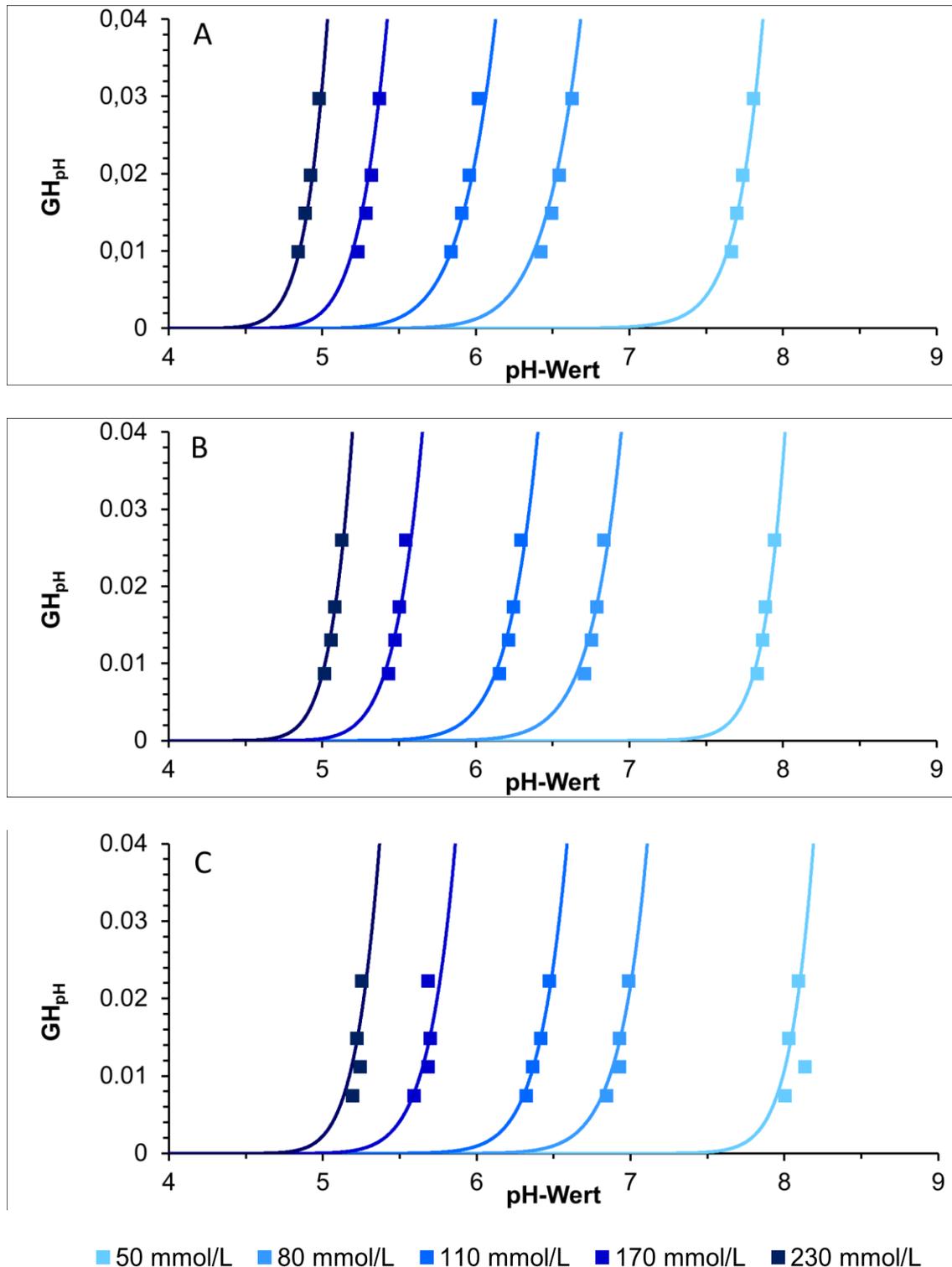


Abbildung 30: Modellierung von mAb05-Monomer (A), -Dimer (B) und -Aggregaten (C). Ergebnis der Korrelation zwischen experimentellen Datenpunkte und berechneten Kurven unter Anwendung des DIX-Modells.

3 Ergebnisse

Tabelle 21: Übersicht der berechneten Parameter der Modellierung von mAb05 unter der Verwendung des DIX-Modells.

Protein	$\Delta G_S^0/RT$	$\Delta G_P^0/RT$	N (carb)	N(his)	N(Nterm)	N(Amine)
			$pK_s = 4,45$	$pK_s = 6,0$	$pK_s = 7,5$	$pK_s = 10,4$
Monomer	0,20	8,98	29,82	3,99	4,00	33,18
Dimer	0,20	11,26	37,53	5,58	5,44	41,79
HMW	0,20	11,85	40,62	7,07	5,55	45,62

Die in Tabelle 21 gezeigten Werte der Modellierung mit dem DIX-Modell entsprechen den Trends des SD-Modells. So wird beim $\Delta G_P^0/RT$ -Werte steigende Werte mit steigender Proteingröße ermittelt. Auch bei der Anzahl der am Austausch beteiligten Aminosäuren ist dieser Trend vorhanden.

3.6.4 Vergleich der Ergebnisse der Modellierung von mAb05 mit dem SD- und DIX-Modell

Im Folgenden werden die Ergebnisse des SD-Modells aus Tabelle 20 und die des DIX-Modells aus Tabelle 21 verglichen. Es wurde beobachtet, dass bei beiden Modellierungen Trends ermittelt werden konnten. So stieg bei beiden Modellen der $\Delta G_P^0/RT$ -Wert von Monomer über Dimer zu der HMW-Spezies. Auffällig ist, dass für den $\Delta G_P^0/RT$ -Wert und für den $\Delta G_S^0/RT$ -Wert beim DIX-Modell kleinere Werte gefunden werden. Auch der Unterschied der einzelnen $\Delta G_P^0/RT$ -Werte ist beim DIX-Modell kleiner. Für beide Modelle wurde eine höhere Anzahl an beteiligten Aminosäuren mit steigender Proteingröße beobachtet. Mit der Anzahl an beteiligten Aminosäuren kann unter Verwendung von Gleichung (17) die Anzahl der Bindungsstellen ν berechnet werden. Beim DIX-Modell wird von keiner Bindung des Proteins ausgegangen, weshalb dieser Parameter als Anzahl an Austauschladungen ν definiert wurde. Die unterschiedliche Benennung schließt den Vergleich beider Parameter nicht aus. Ein Vergleich aller drei Proteine für beide Modelle ist in Abbildung 31 gezeigt.

3 Ergebnisse

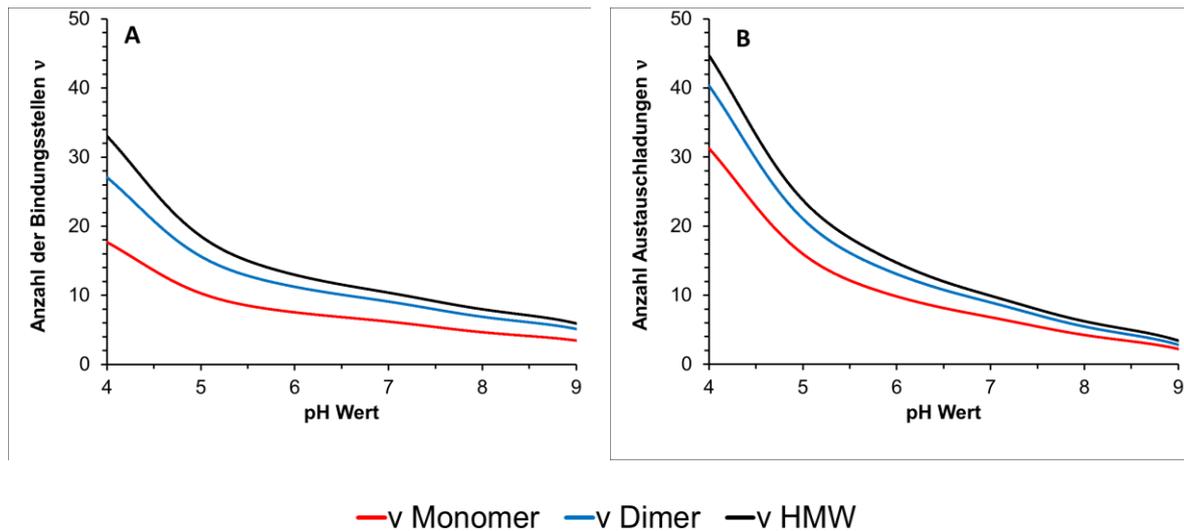


Abbildung 31: Anzahl der Bindungsstellen v des SD-Modells (A) (Kluters et al., 2016) und Anzahl der Austauschladungen v des DIX-Modells (B) für mAb05-Monomer, -Dimer und -HMW der Modellierung mit CPX.

Der Vergleich der v -Kurven aus Abbildung 31 zeigt den bereits beobachteten Trend. Je größer das Protein, desto größer ist v . Dies ist für das SD-Modell und auch das DIX-Modell gültig. Beim DIX-Modell ist der v -Wert wesentlich größer. Das DIX-Modell sagt somit einen größeren Austausch an Ladungen des Proteins mit dem Ionentauscher voraus. Bei der Korrelation der v -Kurve mit der Nettoladung des Proteins fällt auf, dass die theoretische Nettoladung größer ist (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt wurde bereits in der Literatur beschrieben (Schmidt et al., 2014). Eine mögliche Folgerung ist, dass die v -Werte des DIX-Modells näher an der Nettoladung liegen. Weiterhin zeigen die v -Kurven, dass in dem untersuchten pH-Bereich laut beider Modelle keine vollständige Entladung des Proteins stattfindet. Der theoretische pI , an dem die Nettoladung des Proteins null ist, liegt bei pH 7,5. Dies verdeutlicht erneut, dass die v -Kurven mit der Titrationskurve der Nettoladung korrelieren, jedoch nicht identisch sind.

3 Ergebnisse

3.7 Modellierung von mAb05 auf Carboxy-, SO₃- und gemixten Kationentauschern

In diesem Kapitel wird die Retention von mAb05 Monomer auf Carboxy-, SO₃-, und gemixten Kationentauschern untersucht. Die experimentellen Daten werden mit dem SD-Modell und dem DIX-Modell beschrieben und die erhaltenden Parameter miteinander verglichen. Ziel ist die Entwicklung und Verifizierung des DIX-Modells für schwache Kationentauscher.

Die Prototyp-Resins wurden so ausgewählt, dass sie sich nur durch die Zusammensetzung der unterschiedlichen Liganden unterscheiden. Andere Parameter, wie die Ligandendichte oder die Porosität sind nahezu identisch (siehe Tabelle 11). So können Unterschiede der Ergebnisse auf die Liganden-Zusammensetzung zurückgeführt werden.

Der Datensatz besteht aus fünf pH-Gradienten bei konstanter Salzkonzentration und drei Salzgradienten bei konstantem pH-Wert. Der oberste Elutions-pH-Wert des Datensatzes wird aus der notwendigen Menge an Na⁺-Ionen des Puffers und der Bindungsstärke des Proteins erhalten. Es liegt je nach Resin zwischen pH 7,48 (Resin 1) und pH 7,68 (Resin 4). Der geringste Elutions-pH-Wert wurde auf pH 5 festgelegt und entspricht dem Salzgradienten bei pH 5. Für alle Bedingungen wurden jeweils vier Gradientensteigungen (40, 60, 80 und 120 CV) gemessen. Der Datensatz wurde identisch für Prototyp Resin 1 bis 4 aufgenommen. Insgesamt wurden 128 Experimente durchgeführt und somit 32 Datenpunkte pro Resin.

3.7.1 Vergleich der Elutionsbedingungen hinsichtlich pH-Wert und Salzkonzentration von mAb05 auf Prototyp Resin 1 bis 4

Unterschiede der Liganden-spezifischen Eigenschaften von Prototyp Resins 1 bis 4, wie z.B. der Bindungsstärke, können durch die Elutions-Zeitpunkte betrachtet werden. Ein Vergleich ist in Abbildung 32 dargestellt. Abbildung 32 A zeigt die Abhängigkeit des Elutions-pH-Wertes von einer konstanten Na⁺-Konzentration bei einer Gradientenlänge von 40 CV. Es wird deutlich, dass bei der geringsten Na⁺-Konzentration von 34 mmol/L Resin 1 das Protein am schwächsten bindet. Mit zunehmenden Anteil an SO₃-Liganden nimmt die Bindungsstärke zu. Dieser Trend wird mit zunehmender Na⁺-Konzentration relativiert. Bei einer Na⁺-Konzentration von

3 Ergebnisse

180 mmol/L liegen die Elutions-pH-Werte bei ca. 5,2 und sind nahezu identisch. Folglich hat sich die Bindungsstärke verändert und ist in diesem Bereich sehr ähnlich. Für Elutions-pH-Werte kleiner pH 5,2 müssen die Daten der Salzgradienten betrachtet werden. In Abbildung 32 B ist der Salzgradient bei einem konstanten pH-Wert von 5 dargestellt. Im Vergleich zu niedrigen Na⁺-Konzentration wurde der Trend der Bindungsstärke umgekehrt. Bei Resin 1 wird eine höhere Elutions-Na⁺-Konzentration benötigt, es bindet daher stärker als Resin 4. Die Veränderung kann auf die Titration der COO-Gruppe und die sich dadurch ändernde Ligandendichte zurückgeführt werden. Es ist möglich, dass eine zu hohe Ligandendichte die Bindungsstärke von Proteinen abschwächt oder eine mögliche hydrophobe Wechselwirkung durch den Wegfall der Ladung der COO-Gruppe bei niedrigen pH-Werten entsteht.

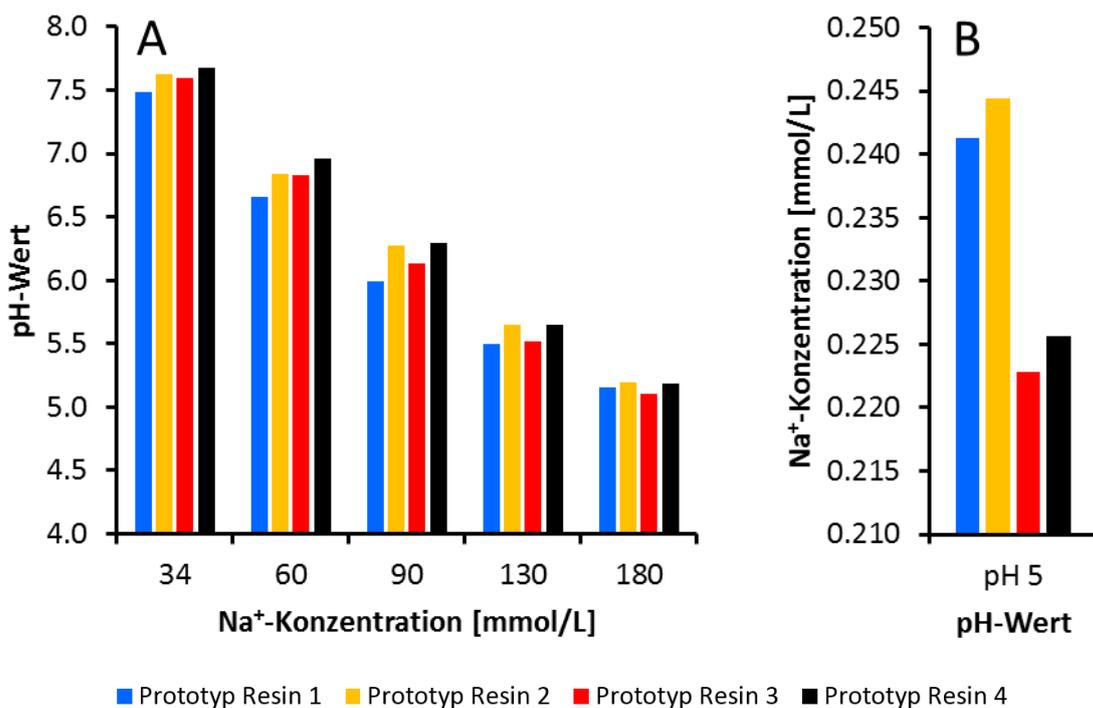


Abbildung 32: Vergleich der Elutionsbedingungen der pH-Gradienten (A) und Salzgradienten bei pH 5 (B) von mAb05 auf Prototyp Resin 1 - 4 bei einer Gradientensteigung von 40 CV.

3 Ergebnisse

3.7.2 Modellierung der Daten unter Verwendung des SD-Modells

Zu Beginn wurde der Datensatz mit dem SD-Modell beschrieben. Das Ergebnis ist in Abbildung 33 dargestellt. Für den starken Kationentauscher in Abbildung 33 B und D wurde eine gute Korrelation zwischen den experimentellen Daten und den mathematischen Kurven erreicht. Eine kleine Abweichung ist für die Salzgradienten bei pH 7 zu erkennen. Ein möglicher Grund dafür könnte eine geringfügige Abweichung des pH-Wertes sein. Abbildung 33 F zeigt eine gute Korrelation der gefitteten Anzahl an Bindungsstellen ν und den separat bestimmten Daten der $\log(\text{GH}_{\text{Salz}})/\log(c_{\text{s, elu}})$ -Auswertung. Die Modelparameter sind in Tabelle 22 dargestellt und sind vergleichbar mit ähnlichen Datensätzen (Klutens et al., 2016).

3 Ergebnisse

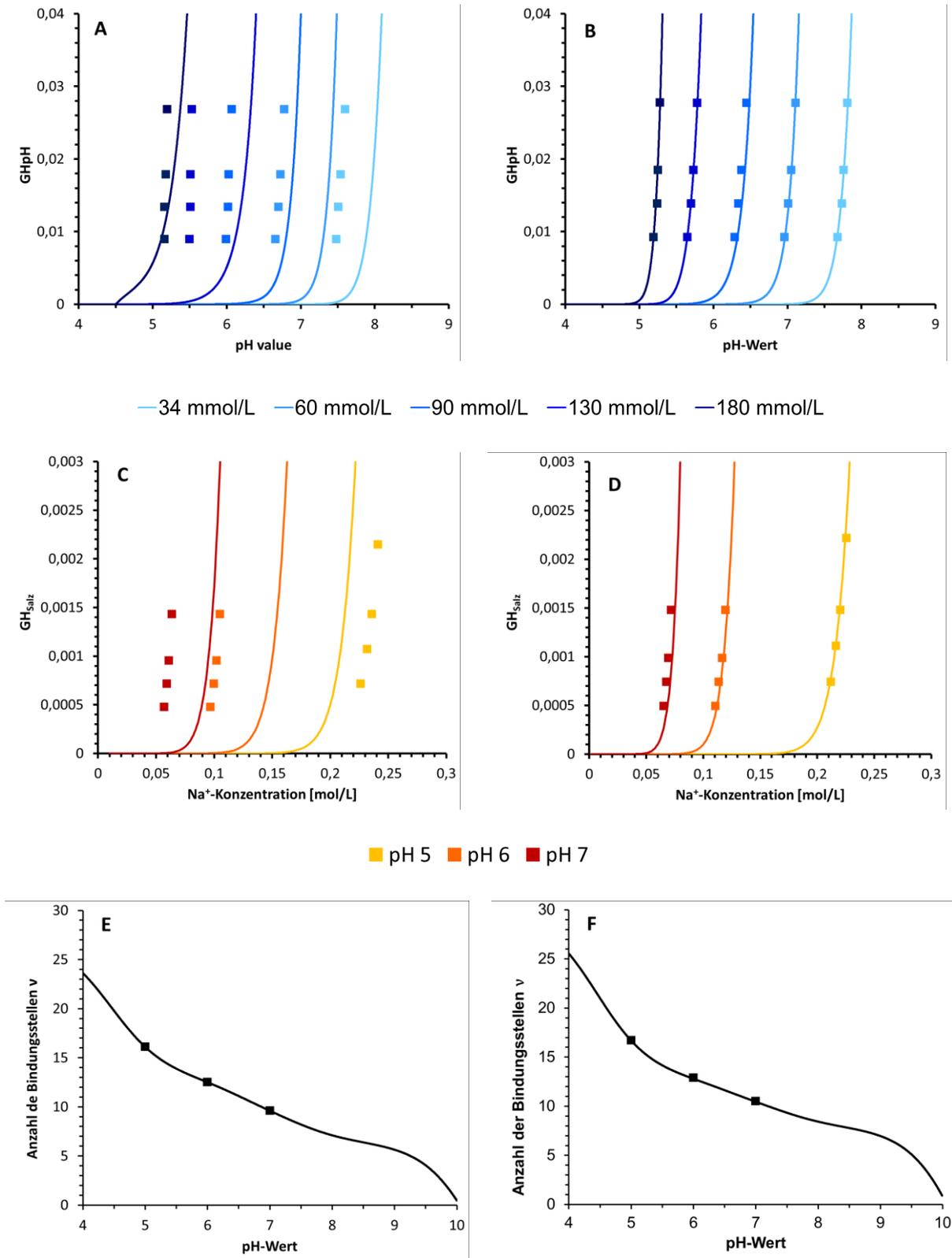


Abbildung 33: Modellierung von mAb05 auf Prototyp Resins 1 (A, C, E) und 4 (B, D, F) unter Verwendung des SD-Modells. Bei der Bestimmung der Parameter werden Daten aus pH-Gradienten bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (A, B), Salzgradienten bei verschiedenen pH-Werten (C, D) und Daten aus einer separaten $\log(GH)/\log(IR)$ Auswertung (E, F) verwendet. Die Graphen E und F zeigen die Anzahl der Bindungsstellen v in Relation zum pH-Wert.

3 Ergebnisse

Tabelle 22: Ergebnis der Modellierung von mAb05 auf Prototyp Resin 1 und 4 unter Verwendung des SD-Modells.

Parameter	Resin 1	Resin 4
$\Delta G_p^0 / RT$	22,78	32,33
$\Delta G_s^0 / RT$	1,47	1,64
N _{Carboxy} (pK _s = 4,5)	14,30	16,93
N _{Amine} (pK _s = 10,4)	20,62	24,77
N _{Histidine} (pK _s = 6,5)	3,63	2,65
N _{N-termini} (pK _s = 7,5)	3,12	2,57

Für Resin 1 wurde für die Berechnung der Ligandendichte der COO-Gruppen eine Henderson-Hasselbalch-Gleichung mit einem pK_s-Wert von 4,5 verwendet (Helfferich, 1962). Abbildung 33 zeigt, dass die Korrelation für die Daten der pH-Gradienten (Abbildung 33 A) und für die Daten der Salzgradienten (Abbildung 33 C) sehr schlecht ist. Die Parameter aus Tabelle 22 sind daher wenig aussagekräftig. Eine Veränderung des pK_s-Wertes des Liganden führte zu keiner Verbesserung der Korrelation. Nur durch die Vernachlässigung der Daten der separat durchgeführten $\log(\text{GH}_{\text{Salz}})/\log(c_{\text{s, elu}})$ -Auswertung konnte eine gute Korrelation der $\text{GH}_{\text{pH}}/\text{pH}_{\text{elu}}$ - bzw. $\text{GH}_{\text{Salz}}/c_{\text{s, elu}}$ -Daten erreicht werden. Da die separate Bestimmung der v-Werte einer anderen Auswertemethode entspricht und daher die Parameter ineinander überführbar sein sollten, ist eine solche Maßnahme nicht zulässig.

3.7.3 Modellierung der Daten unter Verwendung des DIX-Modells

Für die Beschreibung des Datensatzes aus Kapitel 3.7.2 wurde das erweiterte DIX-Modell entwickelt. Das DIX-Modell berücksichtigt die Bedingungen in der Resin-Phase und ist im Gegensatz zum SD-Modell in der Lage, den Einfluss der Salzkonzentration und des pH-Wertes der Resin-Phase auf die Dissoziation des Liganden zu berücksichtigen. Es wurden mehrere Varianten getestet, unter anderem die Berücksichtigung von Aktivitätskoeffizienten. Das in Abbildung 34 gezeigte Ergebnis für die Prototyp-Resins 1 bis 4 entspricht der finalen mathematischen Grundlage, die in Abschnitt 2.6.2 erläutert wurde.

3 Ergebnisse

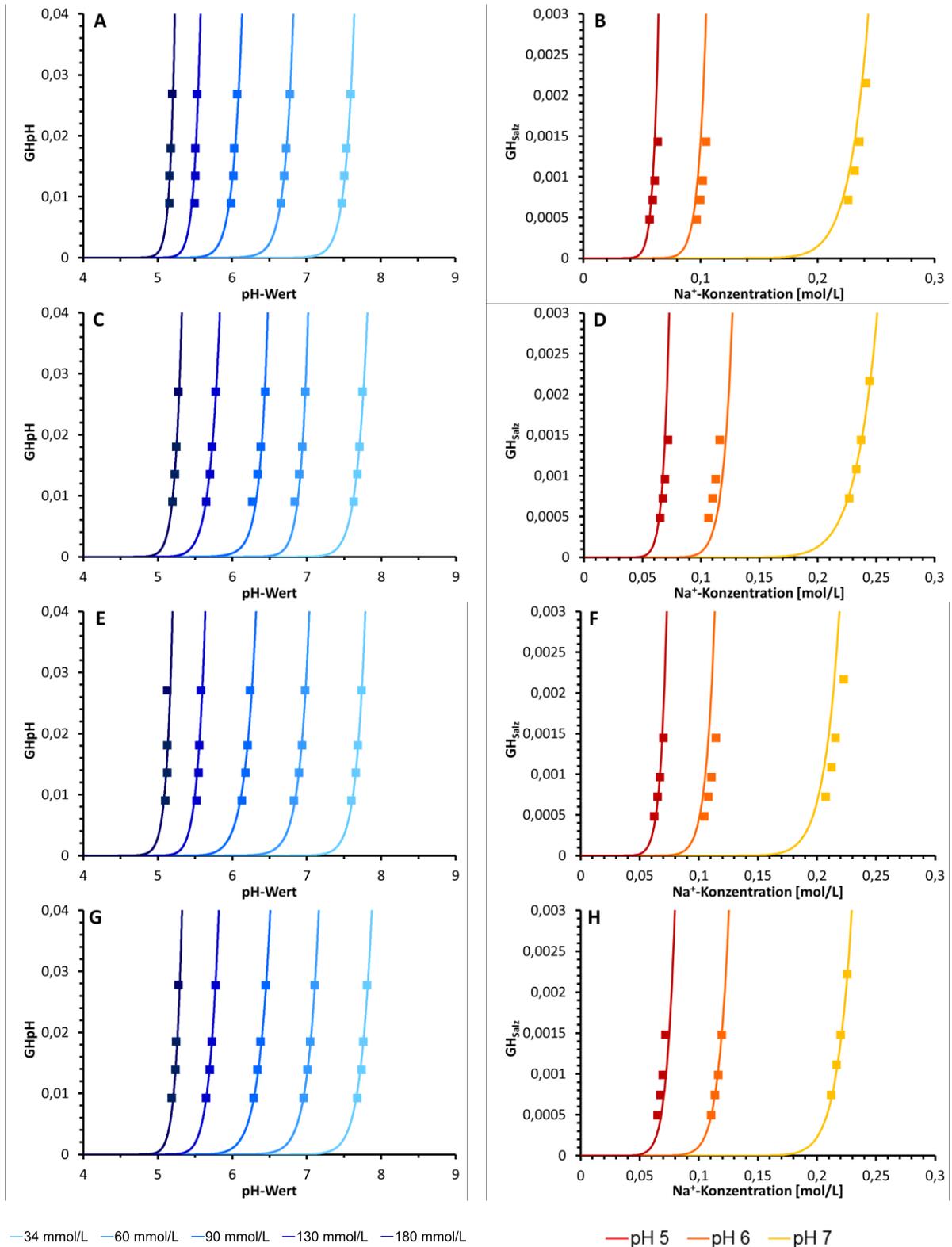


Abbildung 34: Modellierung von mAb05 auf Prototyp Resins 1 (A, B), 2 (C, D), 3 (E, F) und 4 (G, H) unter Verwendung des entwickelten DIX-Modells. Bei der Bestimmung der Parameter werden Daten aus pH-Gradienten bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (linke Seite), Salzgradienten bei verschiedenen pH-Werten (rechte Seite) verwendet.

3 Ergebnisse

Abbildung 34 zeigt die Modellierung unter Verwendung des DIX-Modells für Prototyp 1 bis 4. Für alle Resins ist die Regression zwischen den experimentellen Daten und berechneten Kurven sehr gut. Dies ist für die pH-Gradienten und auch für die Salzgradienten gültig. Kleine Abweichungen der Salzgradienten, z.B. bei pH 5 (Abbildung 34 F) oder pH 6 (Abbildung 34 D), sind auf nicht vermeidbare pH-Wert-Schwankungen während des Experimentes zurückzuführen. Die Gründe dafür sind Messungenauigkeiten der pH-Elektrode, hervorgerufen z.B. durch Temperaturschwankungen und „Driften“ der Elektroden-Kalibrierung während der Experimente. Eine begründbare Anpassung der pH-Werte im Bereich $< \text{pH } 0,05$ würde die Abweichungen eliminieren, jedoch wurde auf diese Modifikation der Daten verzichtet.

Ein Vergleich von Abbildung 33 A und B und Abbildung 34 A und C verdeutlicht, dass das DIX-Modell im Gegensatz zum SD-Modell den Datensatz von Resin 1 sehr gut beschreiben kann. Auch für Resin 2 und 3 kann der Anteil an Carboxy-Gruppen gut beschrieben werden. Das Experiment zeigt, dass das komplexere DIX-Modell für die Beschreibung der Ligandendichte Abhängigkeit der Carboxy-Gruppen geeignet ist. Die bestimmten Modell-Parameter für die Modellierung mit dem DIX-Modell sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23: Ergebnis der Modellierung von mAb05 auf Prototyp Resin 1 bis 4 unter Verwendung des DIX-Modells.

Parameter	Resin 1	Resin 2	Resin 3	Resin 4
$\Delta G_p^0 / RT$	31,90	33,46	23,62	14,43
$\Delta G_s^0 / RT$	0,48	0,70	0,20	-0,10
$N_{\text{Carboxy}} (\text{pK}_s = 4,5)$	65,34	30,66	57,32	51,61
$N_{\text{Amine}} (\text{pK}_s = 10,4)$	75,24	63,92	68,81	60,01
$N_{\text{Histidine}} (\text{pK}_s = 6,5)$	4,45	6,90	4,26	5,30
$N_{\text{N-termini}} (\text{pK}_s = 7,5)$	3,32	2,04	4,00	3,86
$N_{\text{Aspartate}} (\text{pK}_s = 4,0)$	0,00	22,79	3,38	2,29

3 Ergebnisse

Die bestimmten Modellparameter zeigen, dass die Werte für SO_3^- - und COO^- -Tauschern sehr unterschiedlich sind. Dies ist insbesondere für die $\Delta G_P^0/RT$ -Werte und $\Delta G_S^0/RT$ -Werte gültig. Der $\Delta G_S/RT$ -Wert von Resin 4 ist im Vergleich zu den anderen Resins negativ. Abbildung 35 zeigt die $\Delta G_P^0/RT$ -Werte und $\Delta G_S^0/RT$ -Werte in Abhängigkeit vom SO_3 -Anteil.

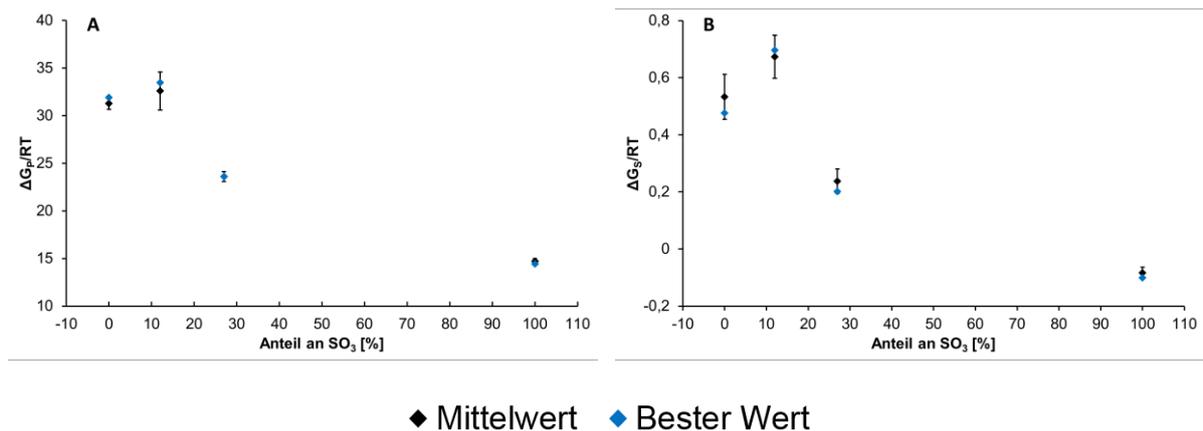


Abbildung 35: $\Delta G_P^0/RT$ -Werte (A) und $\Delta G_S^0/RT$ -Werte (B) im Verhältnis zum SO_3 -Anteil von Prototyp Resin 1 – 4 für die Modellierung von mAb05.

Für den $\Delta G_P^0/RT$ -Wert und $\Delta G_S^0/RT$ -Wert sind abnehmende Werte mit steigendem SO_3 -Anteil erkennbar. Die Werte von Resin 2 weichen vom allgemeinen Trend ab, besitzen jedoch auch größere Standardabweichungen. Ein Grund für die Abweichung zum allgemeinen Trend könnten die leicht abweichenden Bindungsstärken sein (siehe Abbildung 32). Auch hier fällt Resin 2 leicht aus dem Trend.

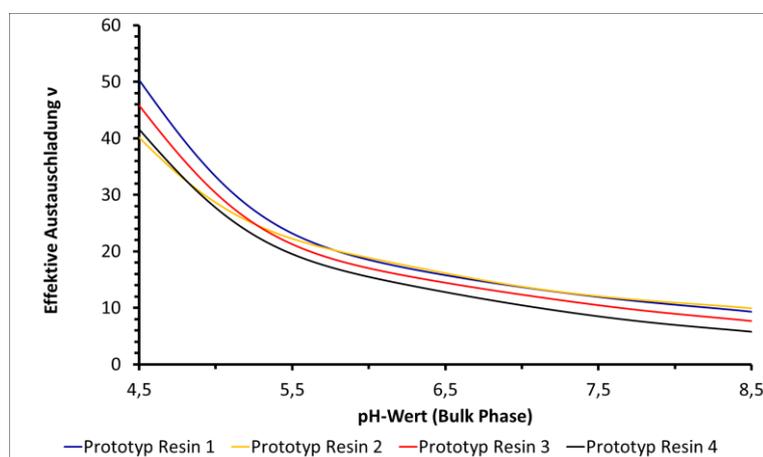


Abbildung 36: Anzahl der effektiven Austauschladungen v von Prototyp Resin 1 - 4 der DIX-Modellierung von mAb05.

3 Ergebnisse

Mit den Werten der beteiligten Aminosäuren aus Tabelle 23 kann die effektive Austauschladung ν berechnet werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 36 dargestellt. Die Kurven von Resin 1, 3 und 4 verlaufen sehr ähnlich und unterscheiden sich lediglich in der Höhe der Werte. Die Werte unterscheiden sich stark und liegen dabei zwischen 50 und 5. Nur Resin 2 hat eine unterschiedliche Steigung im Vergleich zu den anderen Resins und unterliegt dabei erneut nicht dem allgemeinen Trend.

Die Kombination aus $\Delta G_P^0/RT$ -Wert, $\Delta G_S^0/RT$ -Wert und der effektiven Austauschladung ν erlaubt die Berechnung der Gleichgewichtskonstanten K_{eq} unter Verwendung von Gleichung (15). Das Ergebnis ist in Abbildung 37 dargestellt.

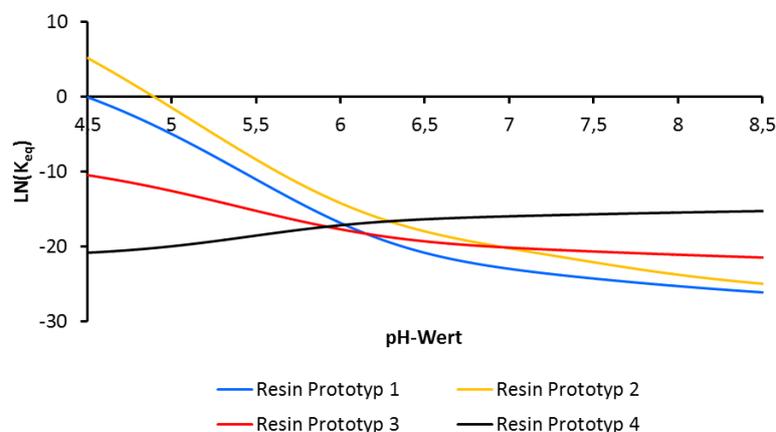


Abbildung 37: Vergleich der Gleichgewichtskonstante K_{eq} der Prototyp Resins 1 bis 4 der Modellierung von mAb05 unter Verwendung des DIX-Modells.

Die Berechnung der Gleichgewichtskonstanten K_{eq} ergibt unterschiedliche Ergebnisse. Während Resin 1 bis 3 einen Trend mit abfallendem Wert bei steigenden pH-Werten zeigen, steigt der Wert für Resin 4 zunächst an und bleibt ab pH 6,5 nahezu konstant. Dies deutet auf den Einfluss der Ligandendichten-Abhängigkeit von Resin 1 bis 3 hin. Auch fällt auf, dass Resin 1 bis 3 keinem bestimmten Trend bezüglich der Höhe der Kurven oder des Kurvenverlaufes folgen. Es ist auffällig, dass die Werte von Resin 3 immer zwischen den Werten von Resin 1 und 4 liegen. Unter der Annahme, dass Resin 2 von allen Trends leicht abweicht, deutet dies auf eine möglicherweise anteilige Zusammensetzung des Wertes in Abhängigkeit der Liganden-Zusammensetzung hin. Diese Annahme wird im nachfolgenden Kapitel behandelt.

3 Ergebnisse

3.7.4 Verbindung der Ergebnisse der Modellierung unter Verwendung des DIX-Modells mit einem Modell für zusammengesetzte Systeme

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.7.3 deuten auf eine anteilige Zusammensetzung der Modellparameter für die COO/SO₃-gemixten Resins hin. Diese Beobachtung wird in diesem Kapitel mit einem geeigneten Modell überprüft.

Melis et al. veröffentlichten ein Modell für ein System mit zwei unterschiedlichen Ligandentypen (Melis et al., 1995). Auch wenn die Liganden in diesem System in ihrer chemischen Struktur gleich sind, führte die Einführung des Modells zu einer besseren Korrelation des Modells zu den experimentellen Daten. Das Modell geht von einer anteiligen Berechnung der Gleichgewichtskonstante K_{eq} aus.

$$\overline{K}_{eq} = (K_1)^{p_1} (K_2)^{p_2} \quad (78)$$

Die Indizes 1 und 2 stehen für die Ligandentypen 1 und 2. K ist die Gleichgewichtskonstante und p der prozentuale Anteil des Ligandentypen. Das Ergebnis der Berechnungen aus Gleichung (78) für Prototyp Resin 1 bis 4 ist in Abbildung 38 dargestellt.

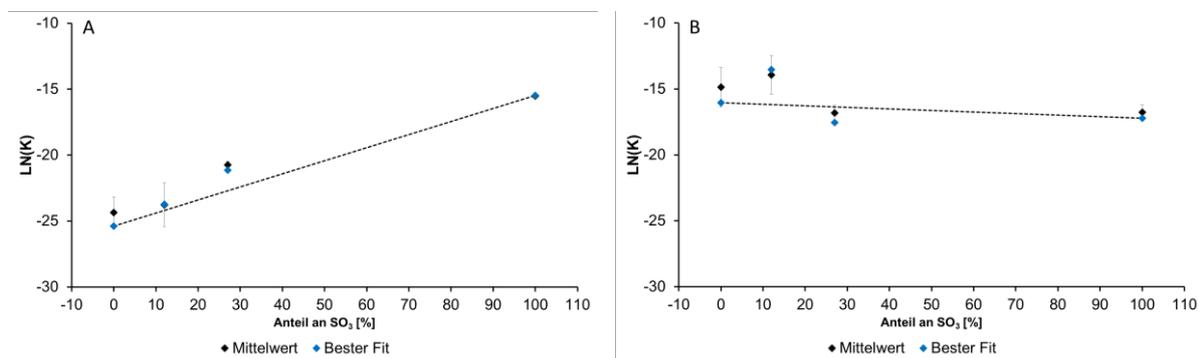


Abbildung 38: Berechnung der Gleichgewichtskonstante K_{eq} für Prototyp Resin 1 bis 4 unter Verwendung des Modells von Melis et al. (Melis et al., 1995) und den Werten aus der Modellierung mit dem DIX-Modell für pH 7 (A) und pH 5 (B).

Der Graph zeigt, dass die Werte der Modellierung mit dem DIX-Modell aus Abschnitt 3.7.3 dem Melis Modell im Allgemeinen folgen. Jedoch treten bei beiden gemixten Resins kleine Abweichungen auf. Die Korrelation verändert sich, wenn anstelle des besten Ergebnisses aus der Modellierung der Mittelwert der besten Ergebnisse verwendet wird. Dies ist letztendlich eine Frage der Auswertung in der Modellierung.

3 Ergebnisse

Für die vollständige Übertragung des Modells müssen die Formeln genauer betrachtet werden. Die Standard-Gibbs-Enthalpie für die jeweilige Reaktion wird über die relativen Anteile beschrieben.

$$\Delta \bar{G}^{\circ} = p_1 \bar{G}_1^{\circ} + p_2 \bar{G}_2^{\circ} \quad (79)$$

Im DIX-Modell ist die Gleichgewichtskonstante und die dazugehörige freie Gibbs-Enthalpie in einen Salz- ($\Delta G_S^0/RT$) und Proteinteil ($\Delta G_P^0/RT$) aufgeteilt. Auch die effektive Austauschladung ν ist für jedes Resin individuell. Dies führt zu einer Veränderung der Gleichung (79):

$$\Delta \bar{G}^{\circ} = -\Delta \bar{G}_p^{\circ} + \bar{\nu} \Delta \bar{G}_s^{\circ} = p_1 (-\Delta G_{p,1}^0 + \nu_1 \Delta G_{s,1}^0) + p_2 (-\Delta G_{p,2}^0 + \nu_2 \Delta G_{s,2}^0) \quad (80)$$

Für die individuellen freien Gibbs-Enthalpien folgt:

$$\Delta \bar{G}_p^{\circ} = p_1 \Delta G_{p,1}^0 + p_2 \Delta G_{p,2}^0 \quad (81)$$

und

$$\bar{\nu} \Delta \bar{G}_s^{\circ} = p_1 \nu_1 \Delta G_{s,1}^0 + p_2 \nu_2 \Delta G_{s,2}^0 \quad (82)$$

Gleichung (81) und (82) wurden in die Modellierung mit dem DIX-Modell für die gemixten Resins übernommen. Die darauffolgende Auswertung konnte nur global durchgeführt werden, was bedeutet, dass die Datenpunkte aller Resins gleichzeitig berechnet werden mussten. Dies erhöht die benötigte Rechenzeit und verschlechtert die Bestimmung der einzelnen Modellparameter.

Die Auswertung ergab, dass eine Beschreibung der gemixten Resins möglich ist. Eine erneute Nachbestimmung der ν -Werte der gemixten Resins resultierte in einer geringen Verbesserung der Regression. Das Ergebnis der GH_{pH} - und GH_{IR} -Graphen ist in Abbildung 39 gezeigt.

3 Ergebnisse

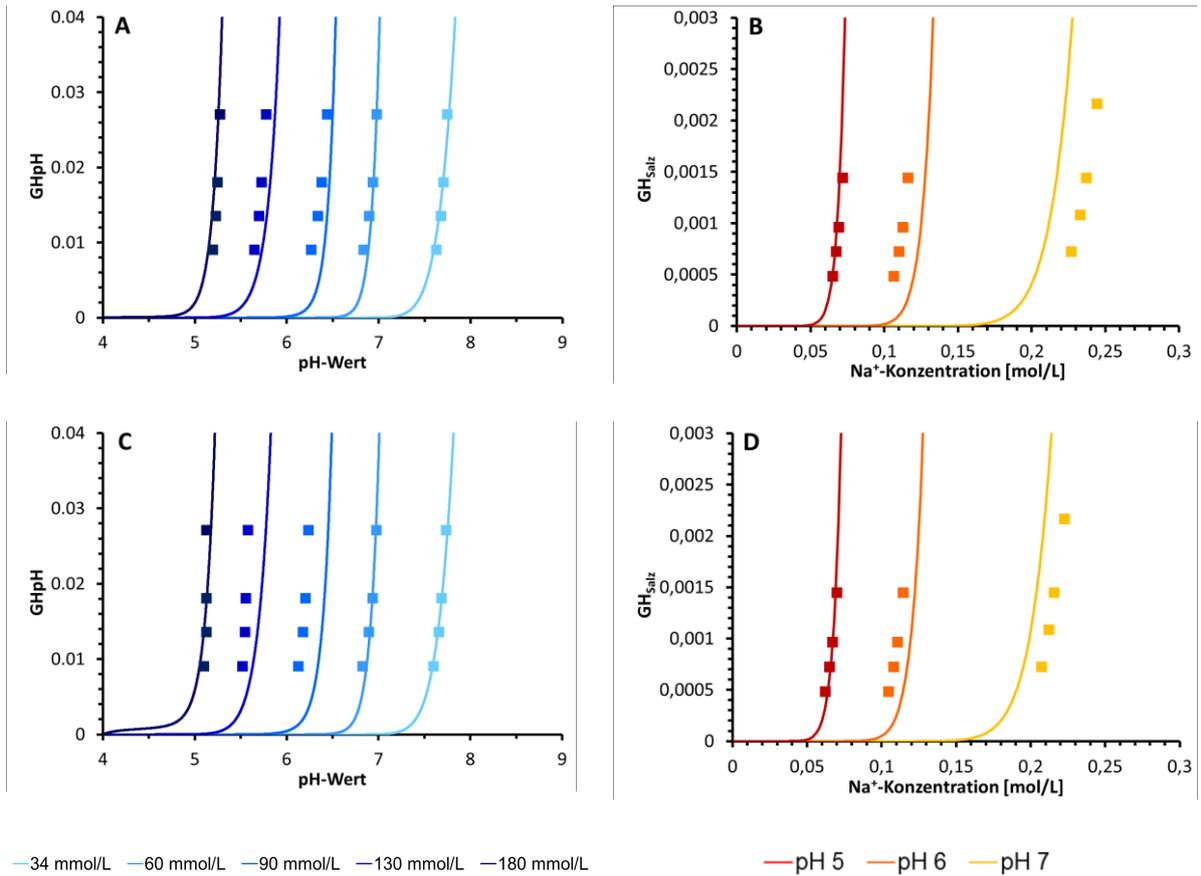


Abbildung 39: Berechnung der Retentionswerte der pH-Gradienten (A, C) und Salzgradienten (B, D) gemixten Prototyp Resins 2 (A, B) und 3 (C, D) unter Verwendung des Melis Modells auf Basis der Werte der Prototyp Resins 1 und 4.

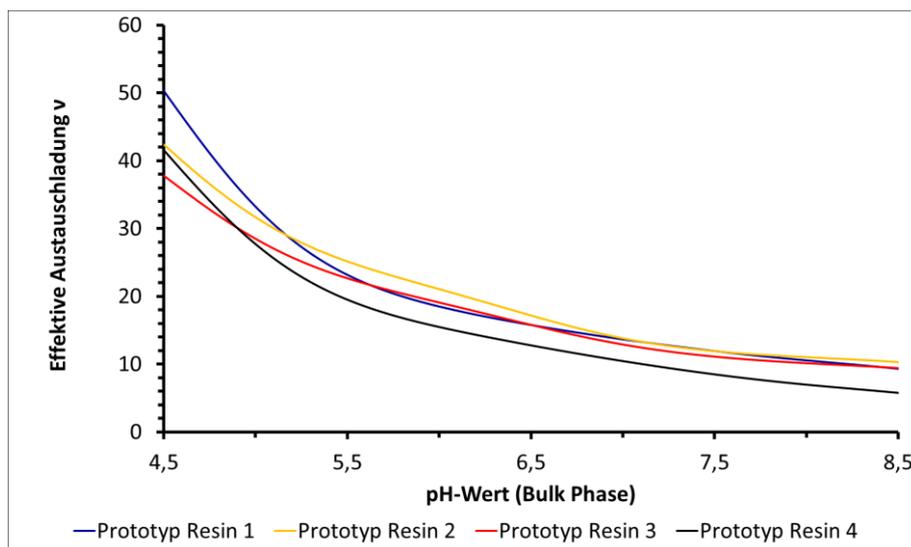


Abbildung 40: Anzahl der effektiven Austauschladungen v von Prototyp Resin 1 - 4 der Berechnung mit dem Melis Modell .

3 Ergebnisse

Die Auswertung ergab, dass die Korrelation der Datenpunkte mit dem DIX-Modell bei Anwendung des Melis Modells gering schlechter wurde. Die Qualität konnte leicht verbessert werden, indem die v -Kurven der gemixten Resins 2 und 3 neu bestimmt wurden. Das Ergebnis ist in Abbildung 40 dargestellt.

Zusammenfassend ist das Modell von Melis et al. für die Beschreibung der gemixten Resins unter Einschränkungen geeignet.

3.7.5 Vergleich der Ergebnisse der Modellierung des Prototyp Resins 4 von mAb05 mit dem SD- und DIX-Modell

In Kapitel 3.7.3 wurde festgestellt, dass für schwache Kationentauscher das im Vergleich zum SD-Modell komplexere DIX-Modell verwendet werden muss. Für den starken Kationentauscher (Prototyp-Resin 4) wurde mit beiden Modellen eine sehr gute Korrelation erreicht. In folgendem Kapitel sollen die Ergebnisse der Modellierung von mAb05 verglichen werden.

Die Ergebnisse für das SD-Modell sind in Tabelle 22 dargestellt, die des DIX-Modells in Tabelle 23. Auffällig ist die unterschiedliche Anzahl an teilnehmenden Aminosäuren. Die Berechnung der Anzahl der Bindungsstellen bzw. effektiven Austauschladung v ist in Abbildung 41 A gezeigt.

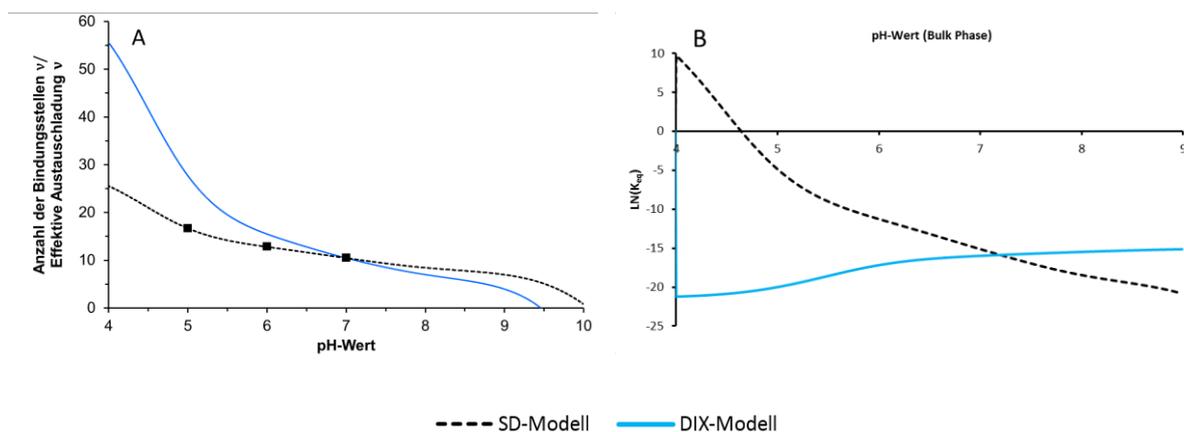


Abbildung 41: Berechnung der Anzahl der Bindungsstellen bzw. effektiven Austauschladung v (A) und der Gleichgewichtskonstante K_{eq} (B) für die Modellierung von mAb 05 auf Prototyp Resin 4 unter Verwendung des SD- und DIX-Modells.

Die v -Kurven in Abbildung 41 A verlaufen unterschiedlich. Der Schnittpunkt mit der x-Achse und auch die Werte bei niedrigen pH-Werten sind verschieden. Dabei ist

3 Ergebnisse

auffällig, dass die Werte des DIX-Modells einer erwarteten Titrationskurve entsprechen (Daten nicht gezeigt). Die Kurve des SD-Modells verläuft deutlich flacher.

Ein Vergleich der Gleichgewichtskonstanten K_{eq} ist in Abbildung 41 B dargestellt. Auch hier ist der Kurvenverlauf stark verschieden. Die Steigung der Kurve des SD-Modells nimmt mit steigenden pH-Wert ab, während die des DIX-Modells ansteigt und ab ca. pH 7 nahezu konstant verläuft.

Trotz der Ähnlichkeit der Gleichungen (51) und (52) zeigt der Vergleich der beiden Modelle ausgeprägte Unterschiede in den Modellparametern. Beide Modelle können den Datensatz gut beschreiben, was auf die konstante Ligandendichte zurückzuführen ist.

3.7.6 In silico Simulation von Chromatogrammen der mAb05 Retention auf Prototyp Resin 1 bis 4 unter Verwendung des DIX-Modells

Ziel der Modellierung von chromatographischen Trennungen ist neben der Charakterisierung der Trennung die Vorhersage von Chromatogrammen. Eine solche Simulation besteht aus zwei Teilen: Zum einen wird der Retentionszeitpunkt durch das entsprechende Adsorptionsmodell, in dieser Arbeit SD- oder DIX-Modell, vorhergesagt und zum anderen die Form des Peaks, welche maßgeblich durch den Massentransfer beeinflusst wird. Hierfür wird in dieser Arbeit das *Lumped-Rate* Modell verwendet (siehe Abschnitt 2.6.9). Die benötigten Modellparameter, wie beispielsweise der k_{eff} -Wert, werden aus den entsprechenden Chromatogrammen bestimmt. Eine alleinige Vorhersage des Chromatogramms ohne eine separate Berechnung des Massentransferkoeffizienten ist folglich nicht möglich. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Massentransferkoeffizient im Anschluss an die Simulation nach dem verifizierenden Experiment aus dem Chromatogramm bestimmt.

Zur Verifizierung der Ergebnisse des DIX-Modells aus Abschnitt 3.7.3 wurden Simulationen unter Verwendung der Werte aus Tabelle 21 durchgeführt. Zu Beginn sollte überprüft werden, ob die bestimmten Werte der Modellparameter in Kombination mit dem *Lumped-Rate* Modell zu den Chromatogrammen führen, welche zur Kalibrierung des Modells verwendet wurden. Es handelt sich also um eine Rückprobe, ob die durchgeführten Berechnungen korrekt sind. Das Ergebnis für Prototyp Resin 1 und 3 für drei unterschiedliche Salzkonzentrationen ist in Abbildung 42 gezeigt.

3 Ergebnisse

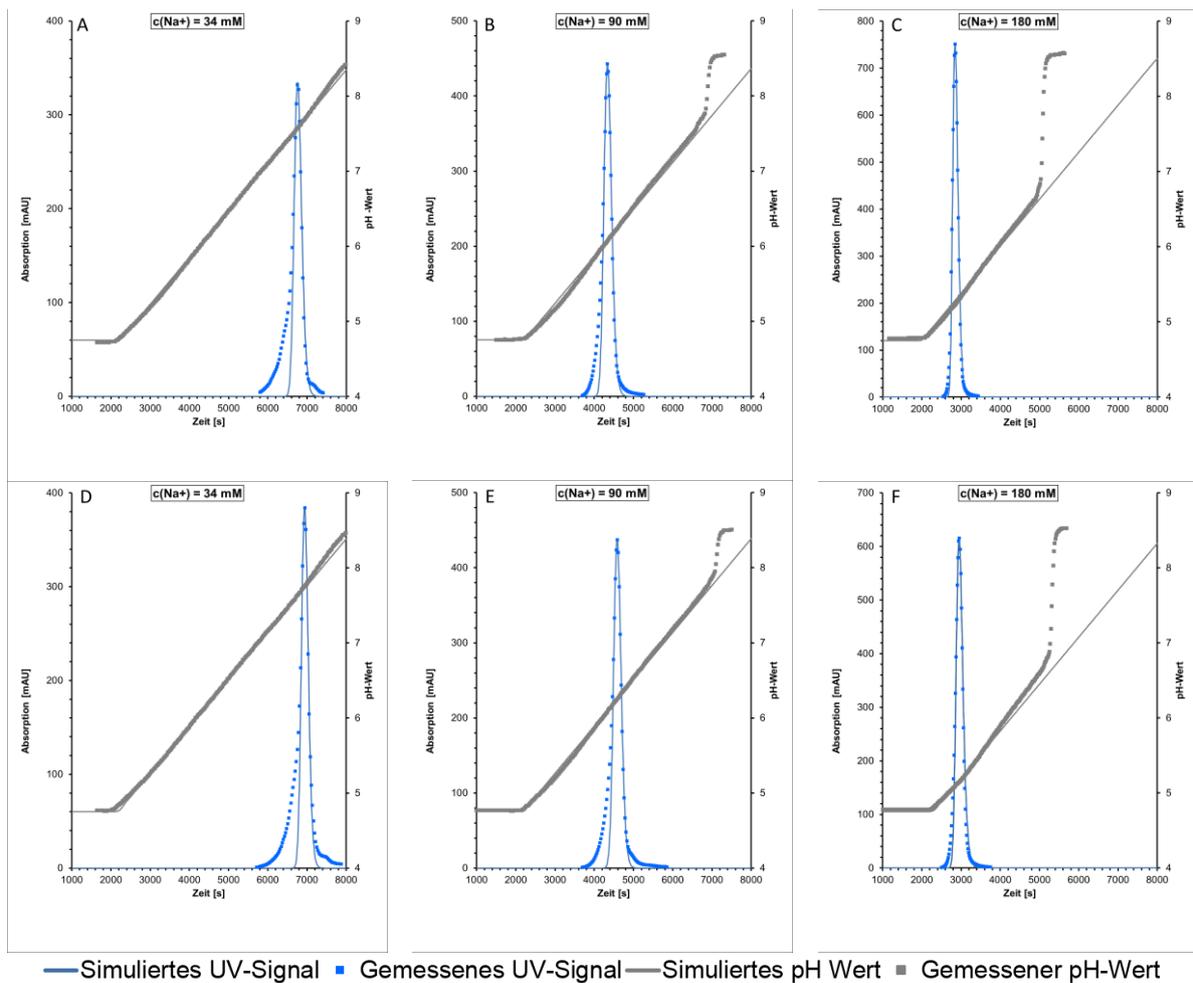


Abbildung 42: Simulation von pH-Gradienten bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen für Resin 1 (A, B, C) und Resin 3 (D, E, F) mit den jeweiligen experimentellen Datenpunkten. pH-Gradient 4,75 bis 8,5; Salzkonzentrationen: 34 (A, D), 90 (B, E) und 180 mmol/L (C, F), $N = 20$, $D_{ax} = 1,13e-3$, $k_{eff}(A) = 1,87e-5$, $k_{eff}(B) = 1,88e-5$, $k_{eff}(C) = 2,13e-5$, $k_{eff}(D) = 2,44e-5$, $k_{eff}(E) = 2,25e-5$, $k_{eff}(F) = 1,59e-5$, Gradientenlänge: 40 CV, Flussrate: 1 mL/min.

Abbildung 42 zeigt, dass für beide Prototyp-Resins die Simulation die experimentellen Datenpunkte sehr gut reflektiert. Kleine Abweichungen des UV-Signals am Anfang und Ende der Peaks sind vor allem bei niedrigen Salzkonzentrationen zu erkennen. Diese sind jedoch durch die Heterogenität an Ladungsvarianten der Probe zu erklären (siehe Abbildung 21). Da nur der Hauptpeak modelliert wurde, kann auch nur dieser in der Simulation berechnet werden. Auch der pH-Wert zeigt für hohe Salzkonzentrationen kleine Abweichungen zum simulierten pH-Wert, was durch stärkere Schwankungen der Linearität des pH-Gradienten durch sich verschiebende pK_s -Werte erklärt werden kann. Die bestimmten Massentransferkoeffizienten sind zwischen den zwei Resins nur

3 Ergebnisse

geringfügig verschieden und es ist kein klarer Trend zu erkennen. Die entsprechenden Simulationen wurden ebenfalls erfolgreich für die zwei anderen Prototyp-Resins 2 und 4 durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Es wird festgehalten, dass die Werte des DIX-Modells zu der korrekten Voraussage der Retentionszeiten in der Simulation führen.

Im Anschluss wurden weitere Simulationen durchgeführt, wobei der pH-Wert und die Salzkonzentration variiert wurden. Das Ergebnis für Prototyp Resin 2 und 4 ist in Abbildung 43 dargestellt.

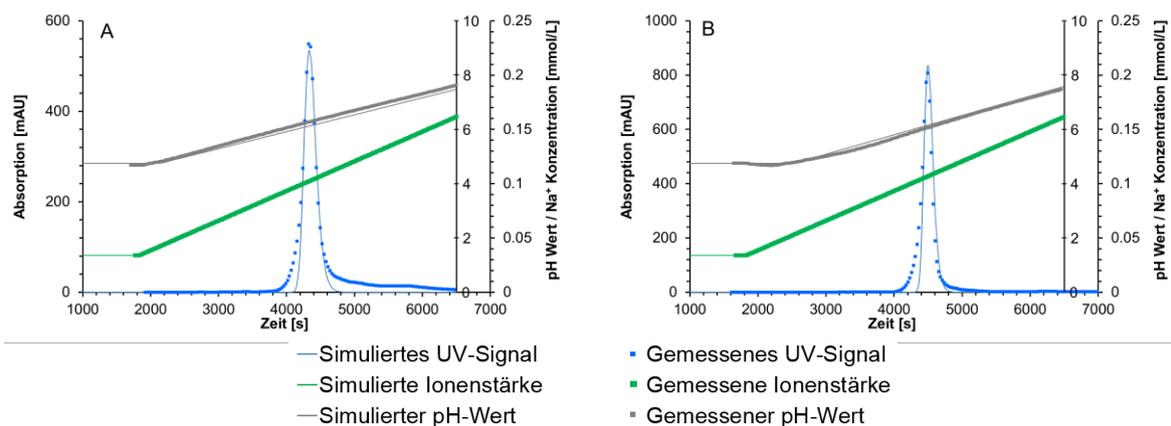


Abbildung 43: Simulation eines dualen Gradienten auf Prototyp Resin 2 (A) und 4 (B), pH-Wert: 4,75-8,5, Na⁺-Konzentration: 34-200 mmol/L, Gradientenvolumen = 40 CV; Flussrate = 119 cm/h, N (Segmente)= 20, $D_{ax} = 1,18e-3$, $k_{eff} = 2,11e-5$ (A), $k_{eff} = 2,12e-5$ (B).

Der Graph zeigt, dass die Simulation für beide Prototypen erfolgreich war. Bei Resin 2 gibt es eine unterschiedliche Verzögerung zwischen Salz- und pH-Gradienten, die durch das verwendete *Lumped-Rate* Modell nicht dargestellt werden kann und manuell im Nachhinein angepasst wurde. Da die Gradienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten beginnen, stimmen die Kombination aus Salzkonzentration und pH-Wert und auch die Gradientensteigungen nicht mit der initialen Simulation überein. Ähnliche Effekte sind in Abbildung 58 gezeigt. Das finale Ergebnis zeigt jedoch, dass nach der Anpassung des pH-Wertes und der Salzkonzentration an die experimentellen Daten die Simulation zu einem sehr ähnlichen Ergebnis kommt.

Die Simulation des dualen Gradienten mit Prototyp Resin 4 zeigt diese unterschiedliche Verzögerung der Gradienten nicht und ergibt eine hohe Übereinstimmung zwischen der Simulation und den experimentellen Daten. Erneut entstehen kleine Abweichungen des UV-Signals durch Ladungsvarianten.

3 Ergebnisse

Das Ergebnis zeigt, dass die Simulation von Chromatogrammen dualer Gradienten auf den Carboxy-haltigen Prototypen (1-3) nur eingeschränkt möglich ist, da die unterschiedliche Verzögerung von Salz- und pH-Gradienten zu Abweichungen führt. Bei alleinigen Salz- oder pH-Gradienten entsteht dieser Effekt nicht und eine korrekte Simulation ist möglich.

3 Ergebnisse

3.8 Modellierung der Trennung von Antikörper Ladungsvarianten auf Carboxy- und SO₃-Tauschern

In diesem Abschnitt wurde die experimentelle Arbeit unter meiner Anleitung von Carolin Stange, Felix Seelinger und Jan Hedrich unterstützt, deren Abschlussarbeiten ich während meiner Promotion mitbetreute. Die Herstellung der Probe sowie die Durchführung der Modellierungsexperimente erfolgte im Rahmen der Bachelorarbeit von Carolin Stange (Stange, 2016). Die Modellierung der Daten wurde von Carolin Stange und in der Masterarbeit von Felix Seelinger gezeigt (Seelinger, 2017). Bei den hier gezeigten Ergebnissen handelt es sich überarbeitete oder selbst erstellte Ergebnisse des Datensatzes aus der Bachelorarbeit von Carolin Stange.

In diesem Kapitel wird die Trennung von Antikörper-Ladungsvarianten auf Eshmuno® CPX und Prototyp-Resin 1 untersucht. Die experimentellen Daten werden mit dem SD-Modell und dem DIX-Modell beschrieben und die erhaltenden Parameter miteinander verglichen. Die Trennung von Antikörper-Ladungsvarianten ist komplexer als die Trennung von Monomer und Dimeren, da die Moleküle nur sehr geringe Unterschiede aufweisen. Die Optimierung der Trennung dieser Ladungsvarianten war ein Teilaspekt dieses Projektes.

3.8.1 Herstellung der Antikörper Ladungsvarianten-Proben

Für die Untersuchungen wurde ein Antikörper mit einem signifikanten Anteil an Ladungsvarianten benötigt, weshalb mAb02 gewählt wurde. Dieser enthält zahlreiche stark unterschiedliche Ladungsvarianten, die in drei Hauptgruppen klassifiziert werden können (siehe Abbildung 20). Für die Modellierung müssen Präparate jeder Hauptgruppe hergestellt werden. Ladungsvarianten können vor allem nahe des pI aufgetrennt werden (Khawli et al., 2010). Aus diesem Grund wurde ein Salzgradient bei pH 7 auf Eshmuno® CPX gewählt. Das Ergebnis ist in Abbildung 44 dargestellt. Es wurden zusätzliche andere Bedingungen gewählt, wie z.B. pH-Gradienten bei niedrigen Gegenion-Konzentrationen, jedoch war das Ergebnis der Trennung schlechter als beim Salzgradient. Auch andere Resins, wie z.B. Prototyp Resin 4, wurden getestet, erreichten jedoch nicht die Auftrennung wie Eshmuno® CPX. Die gewählten Bedingungen haben den Nachteil, dass die Bindekapazität bei pH 7 aufgrund der geringeren Proteinladung geringer als beispielsweise bei pH 5 ist.¹ Aus

¹ siehe Data Sheet Eshmuno® CPX, https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-DE-Site/de_DE/-/EUR/ShowDocument-Pronet?id=201211.023 (19.07.2017)

3 Ergebnisse

diesem Grund war die Proteinbeladung auf 20 mg/mL Säulenvolumen begrenzt, was hier ca. 350 mg Protein entspricht. Der Chromatographie-Lauf wurde mehrfach wiederholt, um eine ausreichende Menge Probenmaterial für die anschließenden Untersuchungen zu erhalten.

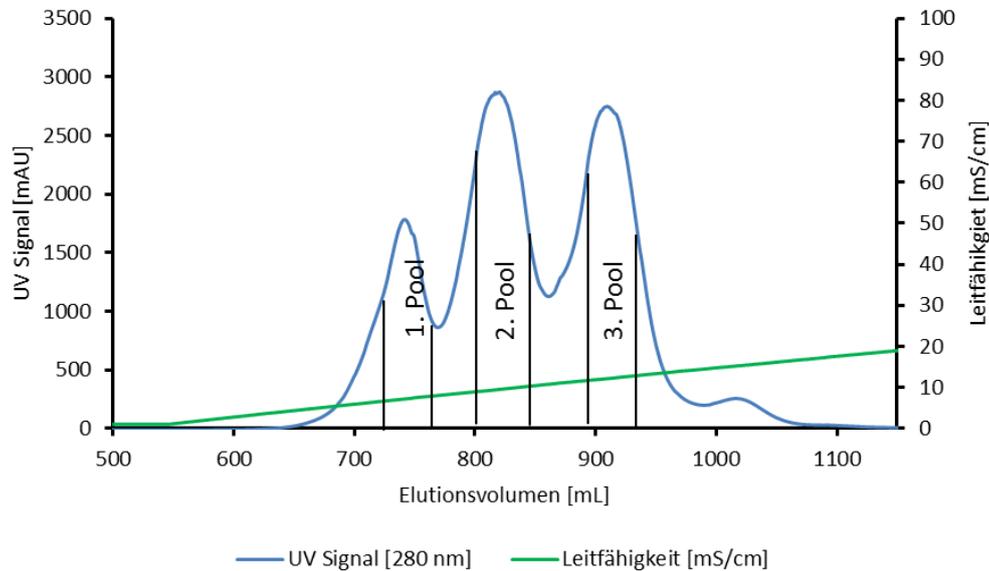


Abbildung 44: Aufreinigung von mAb02 Protein A-Eluat zur Isolierung der Ladungsvarianten. Puffer A: 25 mM MOPSO, pH 7. Puffer B: 25 mM MOPSO, 200 mM NaCl, pH 7. Gradientenvolumen: 50 CV, Chromatographiesäule: 17 mL Eshmuno® CPX (Stange, 2016).

Im Chromatogramm aus Abbildung 44 sind die drei Hauptgruppen der Ladungsvarianten deutlich erkennbar. Auch eine weitere vierte Variante ist abtrennbar. Eine weitere Spezies zwischen dem zweiten und dritten Peak ist erkennbar, welche nicht vollständig abgetrennt wird. Der Vergleich des Chromatogramms mit der CEX-HPLC-Analyse aus Abbildung 20 verdeutlicht, dass die präparative Auftrennung schlechter ist. Dies ist auf die Beschaffenheit der präparativen Säule zurückzuführen. Aufgrund des gleichen Trennmechanismus sind die Chromatogramme jedoch ähnlich. Das Chromatogramm aus Abbildung 44 wurde in drei Peaks eingeteilt, wobei jeweils die Peakspitze zu einem Pool zusammengefasst wurde. Die Fraktionen zwischen den drei Hauptpeaks wurden verworfen, da sie zu einem großen Anteil aus Mischungen bestanden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige Subspezies, die in der CEX-HPLC-Analyse sichtbar nicht, durch diesen Vorgang entfernt wurden. Die drei Pools wurden erneut durch CEX-HPLC untersucht, das Ergebnis ist in Abbildung 45 dargestellt.

3 Ergebnisse

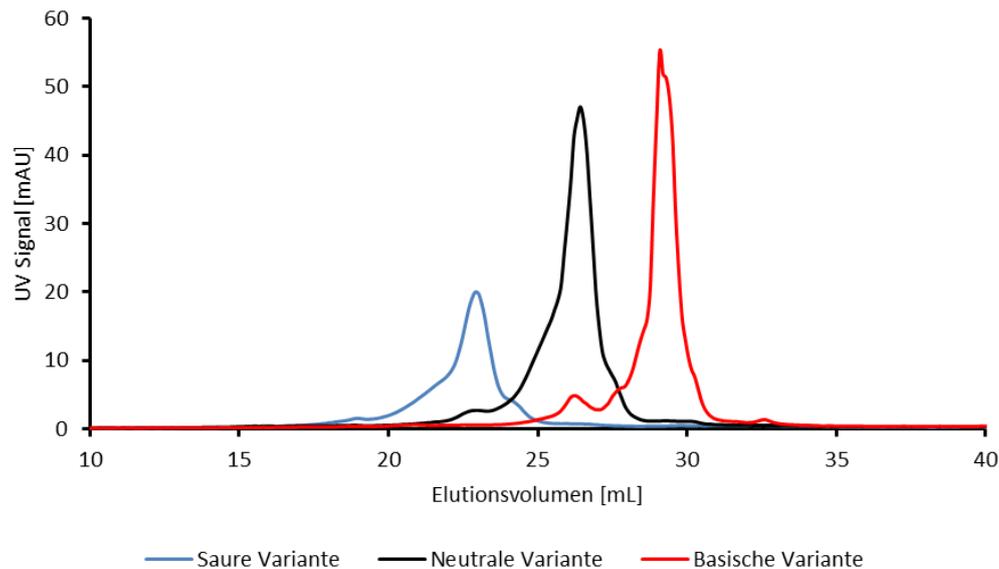


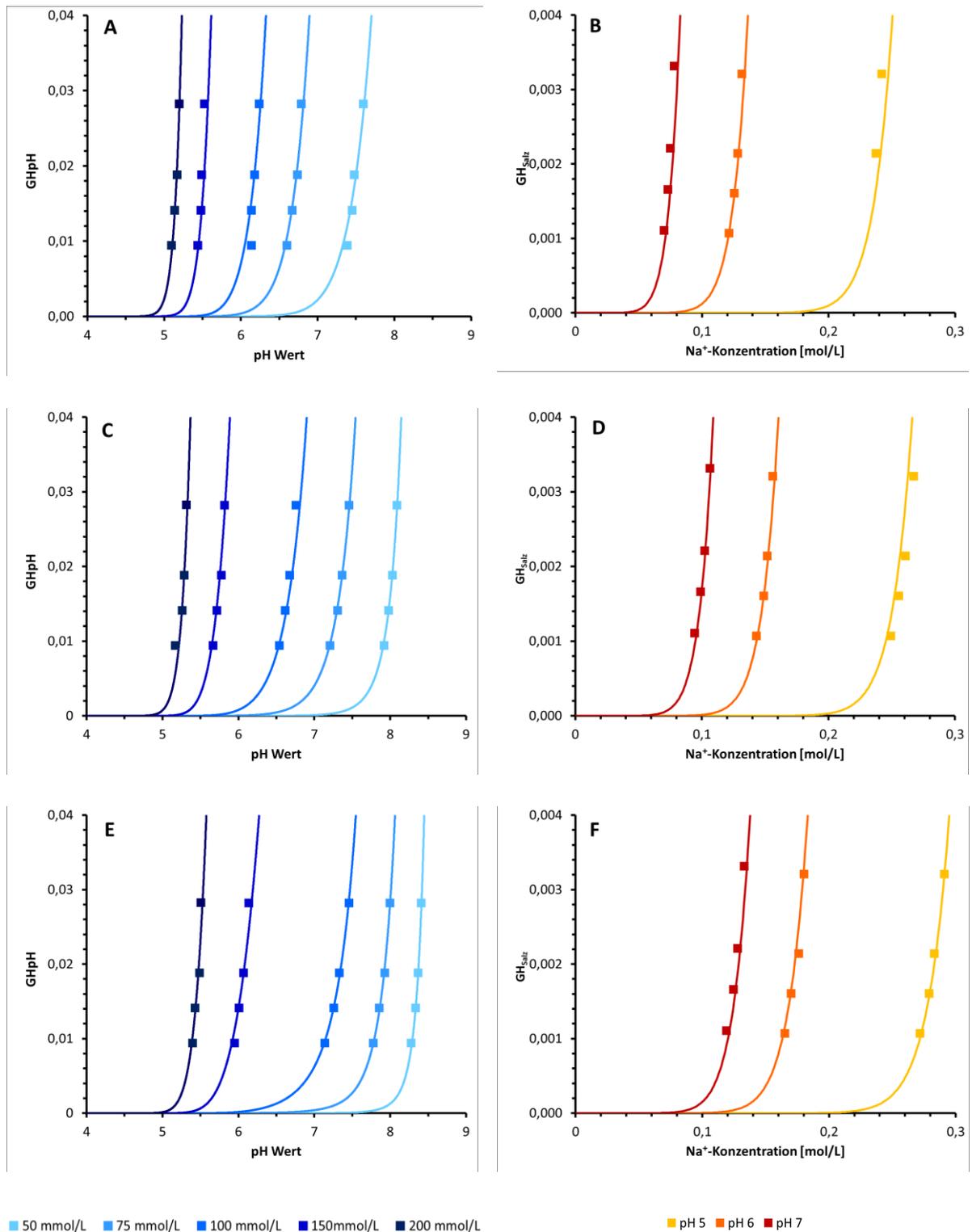
Abbildung 45: CE-HPLC Analyse von mAb05. Säule: YMC Biopro SP-F. Puffer A: 8,8 mmol/L Essigsäure, 10,0 mmol/L MES, 15,5 mmol/L MOPSO, pH 5,0. Puffer B: 18,4 mmol/L HEPES, 7,2 mmol/L TAPS, 7,7 mmol/L CHES pH 9,5. Flussrate 0,7 mL/min, 25 - 100 % Puffer B in 45 CV (Stange, 2016).

Die CEX-HPLC Analyse aus Abbildung 45 ähnelt dem Chromatogramm aus Abbildung 20. Es zeigt die deutliche Trennung der drei Hauptladungsvarianten. Die Analyse zeigt zudem, dass bei konservativ gewähltem „Pooling“ alle Fraktionen einen kleinen Anteil anderer Varianten enthalten. Der Hauptpeak ist deutlich zu erkennen, was den Einsatz der Probe in den Modellierungsexperimenten ermöglicht.

3.8.2 Modellierung der Daten experimentellen Daten des Eshmuno® CPX unter der Verwendung des SD-Modells

Die Modellierungsexperimente erfolgten mit pH- und Salzgradienten. Es wurden fünf Salzkonzentrationen und drei pH-Werte mit jeweils vier Gradientensteigungen getestet. Pro Ladungsvariante und Chromatographie Material wurden 32 Experimente durchgeführt. Die Gesamtzahl an Experimenten lag bei 192. Diese Angabe ist für die Diskussion zwischen experimentellen Aufwand und Nutzen wichtig. Das Ergebnis für Eshmuno® CPX und der Modellierung mit dem SD-Modell ist in Abbildung 46 dargestellt.

3 Ergebnisse



■ 50 mmol/L ■ 75 mmol/L ■ 100 mmol/L ■ 150mmol/L ■ 200 mmol/L

■ pH 5 ■ pH 6 ■ pH 7

Abbildung 46: Modellierung der mAb02-Ladungsvarianten aus Abschnitt 3.8.1 auf Eshmuno® CPX mit Hilfe des SD-Modells. pH-Gradienten Daten (A, C, E) und Salzgradienten Daten (B, D, F) für die saure Variante (A, B), neutrale Variante (C, D) und basische Variante (E, F) (Seelinger, 2017).

3 Ergebnisse

Die in Abbildung 46 dargestellten Daten zeigen den breiten Messbereich dieses Experimentes. Einzelne Daten, wie z.B. die der sauren Variante bei pH 5, wurden als Ausreiser identifiziert und aus dem Datensatz entfernt, da sie mit einem neuen Pufferansatz durchgeführt wurden und daher nur bedingt vergleichbar sind. Die Daten der pH-Elution wurden bei der sauren Variante von pH 5,1 bis 7,6 erhoben. Die neutrale Variante eluiert zwischen pH 5,2 und 8,1. Am stärksten bindet die basische Variante, sie eluiert zwischen pH 5,4 und 8,4. Bei Betrachtung der Salzgradienten wurden Daten zwischen 70 mmol/L Na⁺-Ionen (saure Variante bei pH 7 und 120 CV Gradientensteigung) und 291 mmol/L Na⁺-Ionen (basische Variante bei pH 5 und 40 CV Gradientensteigung) aufgenommen. So ist der Datenbereich größer als der der Modellierung von mAb05 in Abschnitt 3.6.1. Dies liegt vor allem an der größeren Bindungsstärke von mAb02 und den damit höheren Elutions-pH-Werten bei gleicher Ionenstärke. Es wurden im Vergleich zu der Modellierung von mAb05 in Abschnitt 3.6.1 Daten mit Salzelutionen aufgenommen, um die Variabilität der Parameterbestimmung der Modellierung zu verringern.

Abbildung 46 zeigt, in welchem pH-Bereich eine optimale Trennung der drei Varianten möglich ist. Beim Vergleich der Daten der pH-Elution (Abbildung 46 A, C, E) wird deutlich, dass der größte Unterschied zwischen den Varianten im Bereich von pH 6 bis 7 ist. Diese Erkenntnis ist für die spätere Optimierung der Trennung wichtig (siehe Abschnitt 3.8.7).

Die berechneten Kurven der Modellierung unter der Verwendung des SD-Modells zeigen eine sehr gute Korrelation zu den experimentellen Daten. Die theoretischen Kurven schneiden in fast allen Fällen die experimentellen Datenpunkte. Einzelne Ausnahmen in den pH-Gradienten sind auf Messungenauigkeiten der online pH-Messung zurückzuführen. Bei den Salzgradienten gibt es wenige Abweichungen im Bereich von pH 5 und pH 7. Hier sind Schwankungen des pH-Wertes beim Start des Salzgradienten ausschlaggebend. Kleine Abweichungen führen bei dieser Messung zu Messfehlern. Die bestimmten Parameter des SD-Modells sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

3 Ergebnisse

Tabelle 24: Ergebnis der Modellierung von mAb02 auf Eshmuno® CPX unter der Verwendung des SD-Modells (Seelinger, 2017).

Protein	$\Delta G_S^0/RT$	$\Delta G_P^0/RT$	N (carb)	N (his)	N(Nterm)	N(tyr)	N(amine)
			pK _s =4,5	pK _s =6,5	pK _s =7,5	pK _s =9,5	pK _s =10,4
Saure Variante	1,14	18,13	20,45	2,07	1,04	4,09	27,03
Neutrale Variante	1,14	17,79	19,29	1,66	1,62	18,58	26,52
Basische Variante	1,14	15,96	20,09	0,72	2,16	16,83	27,41

Die bestimmten Parameter aus Tabelle 24 zeigen einige Trends. So war es möglich, den $\Delta G_S^0/RT$ -Wert für alle drei Varianten gleich zu setzen. Dieser bezieht sich auf das Gegenion, welches vom Protein unabhängig ist. Ein identischer Wert bestätigt die Theorie. Für den $\Delta G_P^0/RT$ -Wert wurden Werte bestimmt, die denen der Modellierung von mAb05 mit dem SD-Modell sehr ähnlich sind (siehe Tabelle 20). Dabei hat die saure Variante mit 18,1 den größten Wert und damit die stärkste, nicht ionische Interaktion. Dies ist besonders hervorzuheben, da die saure Variante unter allen gemessenen Bedingungen die schwächste Bindung aufweist. Die $\Delta G_P^0/RT$ -Werte der anderen beiden Varianten nehmen jeweils mit der Bindungsstärke ab, wobei die Werte nicht so stark unterschiedlich sind wie beispielsweise bei der Monomer-, Dimer- und Aggregat Modellierung (siehe Tabelle 20). Bei der Anzahl an beteiligten Aminosäuren sind keine großen Unterschiede der die Varianten festzustellen, allerdings ist die Anzahl der Aminosäure Tyrosin ist bei der sauren Variante geringer. Dies könnte auf die Limitierung von Daten bei hohen pH-Werten für diese Spezies zurückzuführen sein.

3.8.3 Modellierung der experimentellen Daten des Eshmuno® CPX unter der Verwendung des DIX-Modells

Der identische Datensatz aus Kapitel 3.8.2 wurde ebenfalls mit dem DIX-Modell ausgewertet. Die experimentellen Daten werden nicht beeinflusst, da nur die

3 Ergebnisse

mathematische Beschreibung der theoretischen Kurvenverläufe verändert wird. Das Ergebnis ist in Abbildung 47 dargestellt.

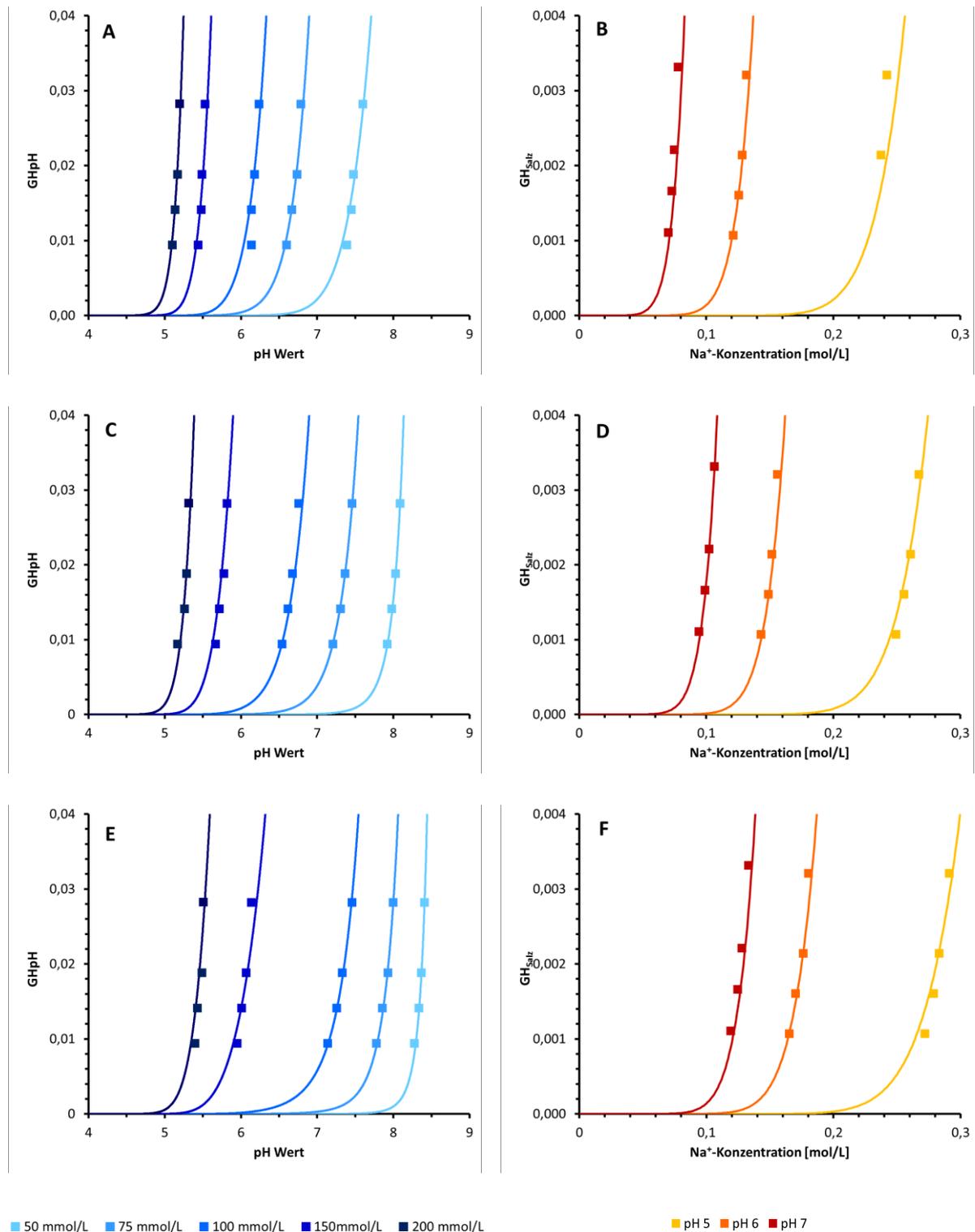


Abbildung 47: Modellierung der mAb02-Ladungsvarianten aus Abschnitt 3.8.1 auf Eshmuno® CPX mit Hilfe des DIX-Modells. pH-Gradienten-Daten (A, C, E) und Salzgradienten Daten (B, D, F) für die saure Variante (A, B), neutrale Variante (C, D) und basische Variante (E, F).

3 Ergebnisse

Die Modellierung mit dem DIX-Modell aus Abbildung 47 zeigt nahezu identische Kurvenverläufe im Vergleich zum SD-Modell aus Abbildung 46. Auch mit dem DIX-Modell können alle experimentellen Daten sehr gut beschrieben werden. Kleine Unterschiede sind beispielsweise in der Steigung einiger Kurven, z.B. bei 200 mmol/L Na⁺-Ionen, sichtbar. Auch die Beschreibung der Salzgradienten ist leicht unterschiedlich. Dies ist z.B. bei den Daten bei pH 5 sichtbar. Diese Unterschiede können durch die Bestimmung der Modellparameter in der Software Berkeley Madonna® zurückzuführen sein. Es wurde beobachtet, dass bereits kleine Unterschiede in den GUESS-Werten Abweichungen im Ergebnis der Parameterbestimmung verursacht. Dies ist für das SD- und das DIX-Modell zutreffend.

Tabelle 25: Ergebnis der Modellierung von mAb02 auf Eshmuno® CPX unter der Verwendung des DIX-Modells.

Protein	$\Delta G_S^0/RT$	$\Delta G_P^0/RT$	N (carb)	N (his)	N (Nterm)	N (tyr)	N (amine)
			pK _s =4,5	pK _s =6,5	pK _s =7,5	pK _s =9,5	pK _s =10,4
Saure Variante	0,19	12,09	27,95	3,52	1,36	0,00	34,50
Neutrale Variante	0,19	12,65	26,58	3,29	2,02	35,56	34,86
Basische Variante	0,19	11,43	24,58	1,89	3,34	27,98	33,11

Die bestimmten Parameter des DIX-Modells sind in Tabelle 25 zusammengefasst. Bei Verwendung des DIX-Modells konnte der $\Delta G_S^0/RT$ -Wert vereinheitlicht werden. Er ist geringer als im SD-Modell (siehe Tabelle 24). Bei den $\Delta G_P^0/RT$ -Werten wurde beobachtet, dass dieser im Vergleich zum SD-Modell zwischen den einzelnen drei Varianten kaum verschieden ist. Da die Varianten sehr ähnlich sind, ist dies ein erklärbares Ergebnis. Im DIX-Modell ist der $\Delta G_P^0/RT$ -Wert niedriger als im SD-Modell. Bei der Anzahl an beteiligten Aminosäuren ist auffällig, dass die Werte der drei Proteine, wie im SD-Modell, sehr ähnlich sind. Erneut ist die Anzahl von Tyrosin der sauren Spezies wesentlich geringer. Allgemein sind die Werte der Aminosäuren

3 Ergebnisse

größer als im SD-Modell, was auf einen stärkeren Einfluss der ionischen Interaktion hindeutet.

3.8.4 Vergleich der Ergebnisse der Modellierung des starken Ionentauschers Eshmuno® CPX von mAb02 mit dem SD- und DIX-Modell

In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse der Modellierung der experimentellen Daten des Eshmuno® CPX mit dem SD-Modell und dem DIX-Modell verglichen werden. Beide Modelle beschreiben die experimentellen Daten mit hoher Genauigkeit. Bei den bestimmten Modellparametern sind große Unterschiede zu erkennen. Der $\Delta G_s^0/RT$ -Wert konnte mit beiden Modellen global beschrieben werden und ist somit unabhängig vom Protein. Auffällig ist, dass dieser Wert im DIX-Modell mit 0,19 geringer ist als im SD-Modell mit 1,14, womit der Unterschied der Standard-Gibbs-Enthalpien des Salzes im DIX-Modell geringer ist. Das Gleiche ist für den $\Delta G_P^0/RT$ -Wert gültig. Auch hier wurden für das DIX-Modell geringere Werte bestimmt, wobei sie sich im Gegensatz zum SD-Modell die Werte für die einzelnen Proteine nur sehr gering unterscheiden. Dies lässt auf eine vergleichbare, nicht ionische Wechselwirkung der drei Ladungsvarianten schließen. Weiterhin ist die Anzahl der beteiligten Aminosäuren für beide Modelle unterschiedlich. Mit Hilfe von Gleichung (17) kann mit den Werten der v -Wert berechnet werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 48 dargestellt.

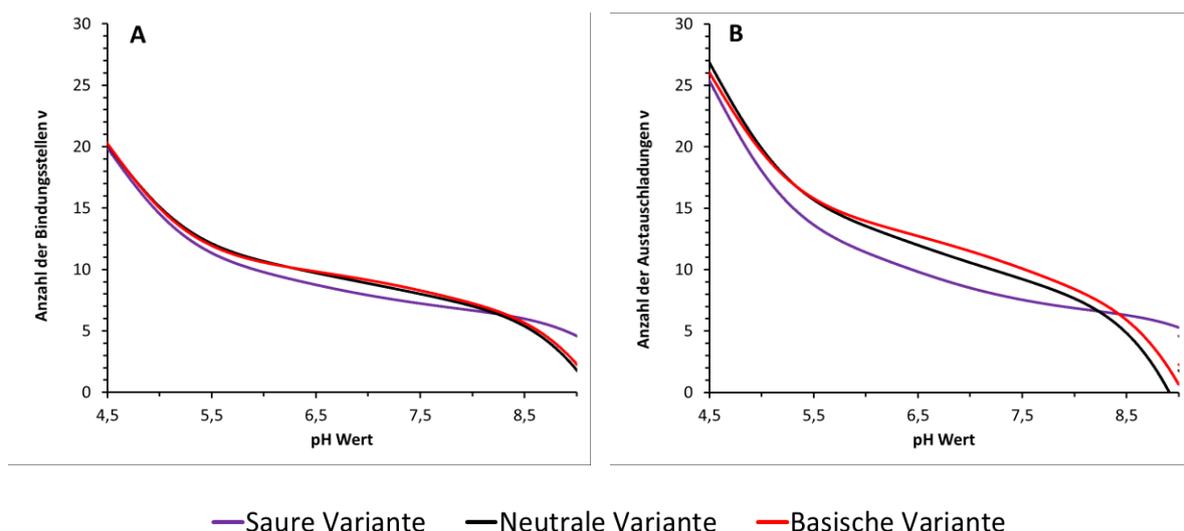


Abbildung 48: Anzahl der Bindungsstellen v des SD-Modells (A) und Anzahl der Austauschladungen v des DIX-Modells (B) für die mAb02 Ladungsvarianten der Modellierung auf Eshmuno® CPX. Kurven des SD-Modells: (Seelinger, 2017)

3 Ergebnisse

Die Berechnung der Anzahl an Bindungsstellen ν des SD-Modells in Abbildung 48 A zeigt die Unterschiede der drei Ladungsvarianten. Im Bereich unter pH 5 verlaufen die Kurven fast identisch. Unterschiede entstehen ab pH 6. In diesem Bereich verläuft die Kurve der sauren Ladungsvariante unter den anderen Kurven, was eine schwächere Interaktion bedeutet. Erneute Unterschiede sind im Bereich über pH 8,5 sichtbar. Dies ist eine Folge der unterschiedlichen Anzahl von Tyrosin. Es muss jedoch beachtet werden, dass über pH 8 keine experimentellen Daten vorliegen.

Die Berechnung der Anzahl an Austauschladungen ν des DIX-Modells in Abbildung 48 B zeigt ein ähnliches Schema, wobei die Kurven höher verlaufen als beim SD-Modell. Dies lässt auf eine stärkere ionische Wechselwirkung schließen. Auch ist der Unterschied zwischen den Ladungsvarianten im Bereich von pH 5,5 bis 8,0 stärker ausgeprägt. Insbesondere die neutralen und basischen Ladungsvarianten unterscheiden sich hier deutlicher als beim SD-Modell. Im Bereich über pH 8,5 tritt der gleiche Effekt auf, wobei das Fehlen von Tyrosin bei der sauren Spezies der Grund für den unterschiedlichen Kurvenverlauf ist.

Ein weiterer Parameter beider Modelle ist Gleichgewichtskonstante K , welche aus $\Delta G_P^0/RT$, $\Delta G_S^0/RT$ und ν zusammengesetzt ist (siehe Gleichung (15)). Ein Vergleich beider Modelle ist in Abbildung 49 dargestellt.

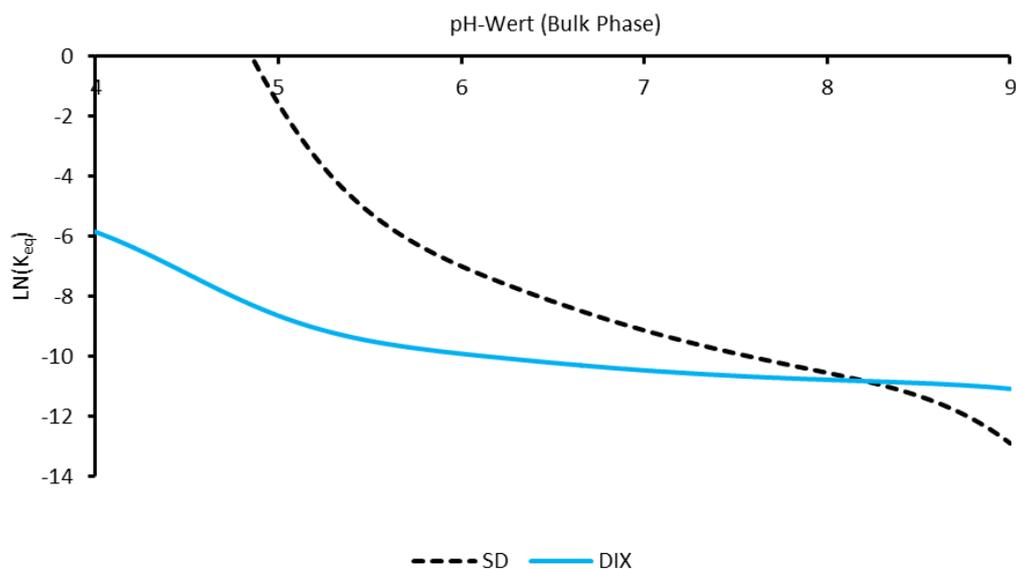


Abbildung 49: Vergleich der Gleichgewichtskonstante K_{eq} der sauren Spezies über den pH-Wert der Bulk-Phase des SD- und DIX-Modells auf Eshmuno® CPX.

3 Ergebnisse

Der Vergleich der Gleichgewichtskonstanten K über den pH-Wert der Bulk-Phase aus Abbildung 49 zeigt unterschiedliche Kurvenverläufe für die beiden Modelle. Dies beweist, dass die unterschiedlich bestimmten Parameter beider Modelle auch bei der Berechnung der Gleichgewichtskonstanten zu unterschiedlichen Ergebnissen führen und sich nicht ausgleichen.

Durch die Kombination aller Parameter kann mit Gleichung (51) für das SD-Modell bzw. Gleichung (52) für das DIX-Modell der Verteilungskoeffizient A des Proteins berechnet werden. Ein Vergleich ist in Abbildung 50 dargestellt.

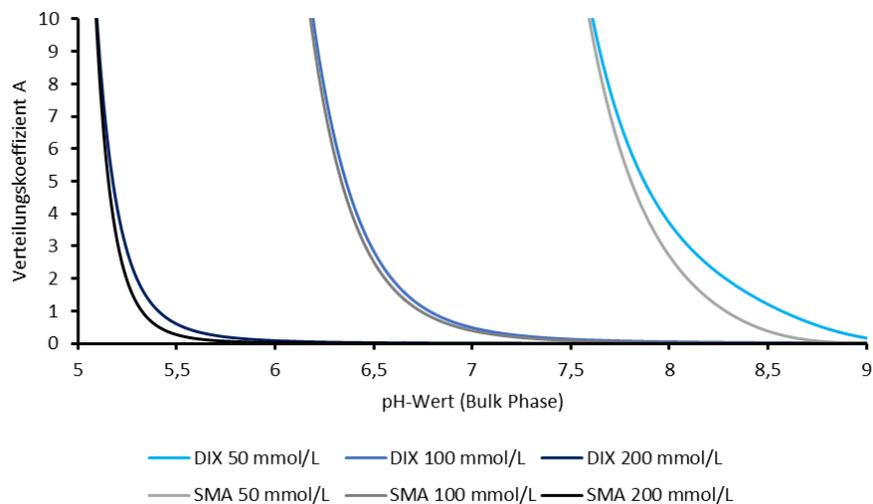


Abbildung 50: Vergleich des Verteilungskoeffizienten A der sauren Spezies über den pH-Wert der Bulk-Phase des SD- und DIX-Modells für drei verschiedene Na^+ -Konzentrationen auf Eshmuno® CPX.

In Abbildung 50 wurde der Verteilungskoeffizient der sauren Spezies für drei verschiedene Salzkonzentrationen berechnet. Die Modelle weisen auch hier leichte Unterschiede auf. Bei allen drei verwendeten Salzkonzentrationen berechnet das DIX-Modell einen höheren Verteilungskoeffizienten. Insbesondere bei 50 mmol/L sind Unterschiede festzustellen. Ein höherer Verteilungskoeffizient lässt auf eine stärkere Bindung schließen.

3.8.5 Modellierung der experimentellen Daten von Prototyp Resin 1 unter der Verwendung des DIX-Modells

Die Experimente aus dem vorherigen Abschnitt wurden neben dem Eshmuno® CPX auch mit dem Prototyp Resin 1 durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 51 dargestellt.

3 Ergebnisse

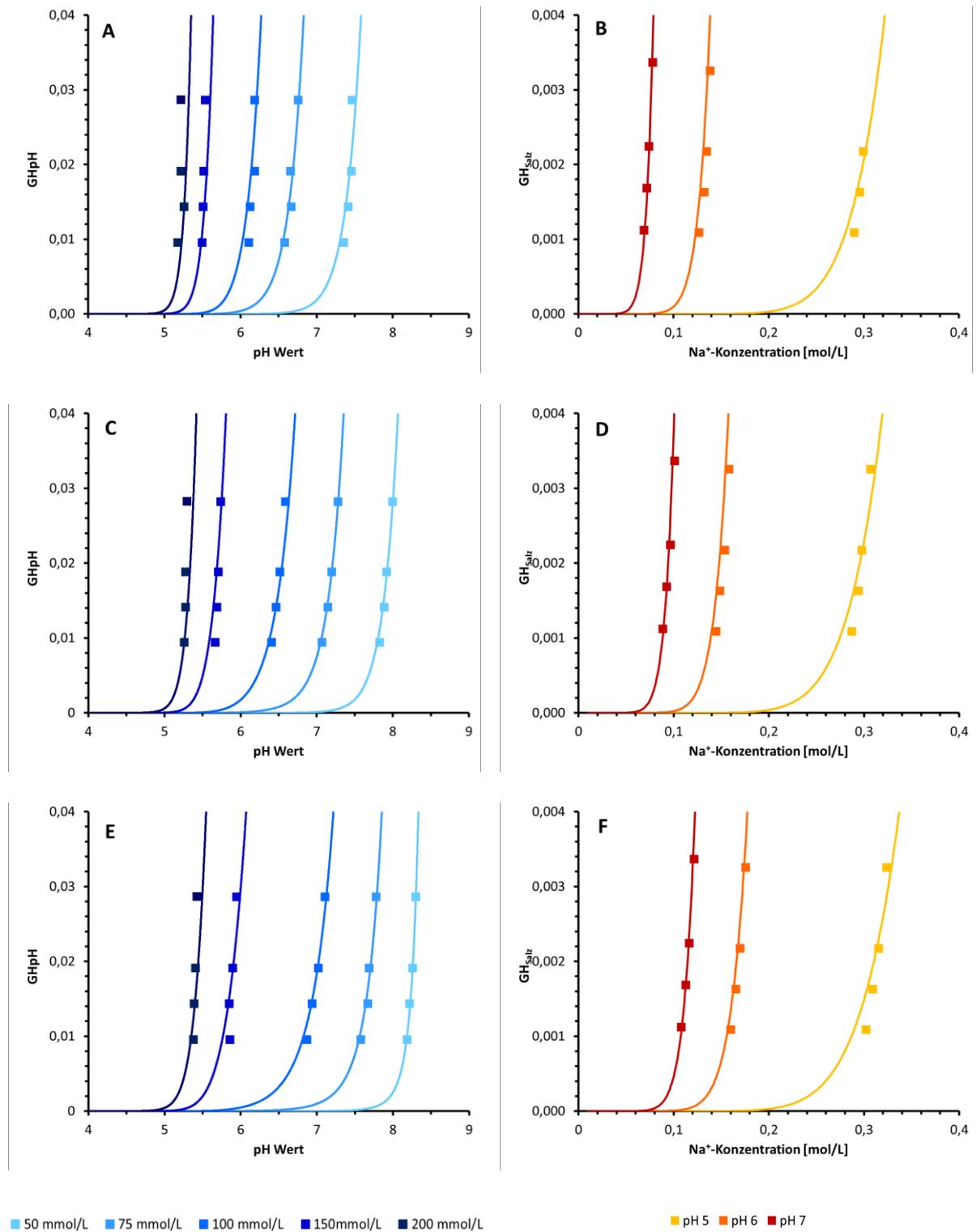


Abbildung 51: Modellierung der mAb02-Ladungsvarianten aus Abschnitt 3.8.1 auf Prototyp Resin 1 mit Hilfe des DIX-Modells. pH-Gradienten-Daten (A, C, E) und Salzgradienten-Daten (B, D, F) für die saure Variante (A, B), neutrale Variante (C, D) und basische Variante (E, F).

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Modellierung der mAb02-Ladungsvarianten und dem Prototyp Resin 1 aus Abbildung 51 zeigt die Korrelation der experimentellen Daten und der angepassten Modellkurven. Die experimentellen Daten zeigen einige kleinere Abweichungen, die nicht durch die theoretischen Kurvenverläufe dargestellt werden können. Als Beispiel sind hier die Unterschiede der sauren Varianten zwischen 60 CV und 80 CV pH-Gradienten zu nennen. Weiterhin entfällt einer der Datenpunkte bei pH 5 aufgrund einer Fehlfunktion des Äkta-Systems.

Die Daten der pH-Elution sind bei der sauren Variante pH 5,18 bis 7,47. Die neutrale Variante eluiert zwischen pH 5,67 und 8,00. Am stärksten bindet die basische Variante, sie eluiert zwischen pH 5,38 und 8,30. Bei den Salzgradienten wurden Daten zwischen 69 mmol/L Na⁺-Ionen (saure Variante bei pH 7 und 120 CV Gradientensteigung) und 323 mmol/L Na⁺-Ionen (basische Variante bei pH 5 und 40 CV Gradientensteigung) aufgenommen. Der größte Unterschied der drei Varianten ist bei den pH-Gradienten zwischen pH 6 und pH 7 erkennbar. Bei den Salzgradienten ist der Unterschied des Gradienten bei pH 6 mit 120 bis 140 mmol/L Na⁺-Ionen am stärksten.

Zusammenfassend zeigt Abbildung 51 eine sehr gute Regression der Datenpunkte zu den theoretischen Kurven. Dies ist für alle drei Ladungsvarianten gültig. Die bestimmten Parameter sind in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26: Ergebnis der Modellierung von mAb02 auf dem Prototyp Resin 1 unter der Verwendung des DIX-Modells.

Protein	$\Delta G_S^0/RT$	$\Delta G_P^0/RT$	N(carb) pK _s =4,5	N(his) pK _s =6,5	N(Nterm) pK _s =7,5	N(tyr) pK _s =9,5	N(amine) pK _s =10,4
Saure Variante	0,60	21,62	43,76	2,56	1,98	1,31	51,52
Neutrale Variante	0,60	20,50	38,09	1,94	2,73	2,93	46,19
Basische Variante	0,60	19,10	34,54	1,68	1,94	23,40	43,74

3 Ergebnisse

Die in Tabelle 26 dargestellten Modellparameter zeigen einige Auffälligkeiten. Der $\Delta G_s^0/RT$ -Wert konnte für alle drei Varianten gleichgesetzt werden und liegt bei 0,60. Der $\Delta G_P^0/RT$ -Wert zeigt einen Trend mit sinkenden Werten von der sauren zur basischen Variante und liegt zwischen 21,6 und 19,1. Der gleiche absinkende Trend kann für die Carboxy-, Histidin- und Amin-Aminosäuren beobachtet werden. Bei Tyrosin liegen die Werte zwischen 2,93 und 23,40, die drei Varianten unterscheiden sich also stark.

3.8.6 Vergleich der Ergebnisse der Modellierung des Eshmuno® CPX und Prototyp-Resin 1 von mAb02 mit dem DIX-Modell

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Modellierung von mAb02 des Eshmuno® CPX aus Kapitel 3.8.3 und Prototyp-Resin 1 aus Kapitel 3.8.5 unter Verwendung des DIX-Modells miteinander verglichen.

Die ermittelten Werte aus Tabelle 25 für Eshmuno® CPX bzw. Tabelle 26 für Prototyp-Resin 1 zeigen, dass bei Eshmuno® CPX für den $\Delta G_s^0/RT$ -Wert und für den $\Delta G_P^0/RT$ -Wert jeweils kleinere Werte bestimmt wurden. Für beide Resins konnte der $\Delta G_s^0/RT$ -Wert für alle drei Ladungsvarianten gleichgesetzt werden. Ebenfalls wurde für beide Resins ein sinkender Trend des $\Delta G_P^0/RT$ -Wertes von der sauren Spezies zur basischen Spezies bestimmt. Die bei Verwendung des Eshmuno® CPX kleineren generierten $\Delta G_P/RT$ -Werte lassen auf eine geringere nicht ionische Interaktion schließen. Der kleinere Wert für $\Delta G_s^0/RT$ zeigt einen geringeren Unterschied der Gibbs-Enthalpien für das SO_3 -Resin. Dies liegt möglicherweise an einer geringeren Interaktion der Na^+ -Ionen mit den Liganden. Die am Austausch teilnehmenden Aminosäuren wurden für das Eshmuno® CPX mit geringerer Anzahl bestimmt, was auf eine geringere ionische Interaktion der Proteine mit dem Resin schließen lässt. Unter Verwendung von Gleichung (17) kann die Anzahl an Austauschladungen v berechnet werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 52 dargestellt.

3 Ergebnisse

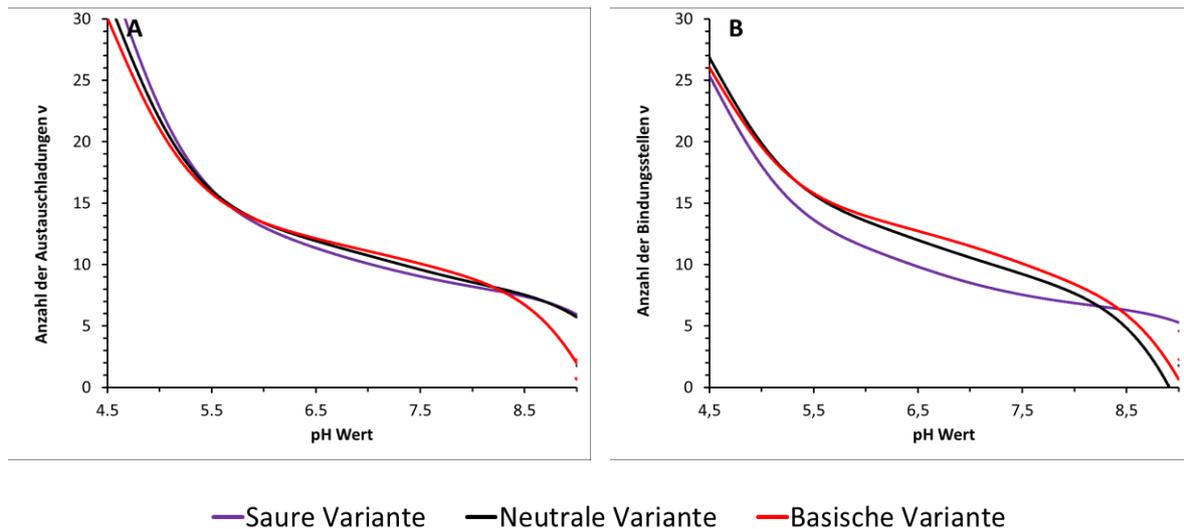


Abbildung 52: Anzahl der Austauschladungen v von Prototyp Resin 1 (A) und Eshmuno® CPX (B) für die mAb02-Ladungsvarianten der Modellierung mit dem DIX-Modell.

In Abbildung 52 sind die Kurven der Anzahl an Austauschladungen v für Prototyp Resin 1 (A) und Eshmuno® CPX (B) für die drei mAb02-Ladungsvarianten gezeigt. Für Prototyp Resin 1 zeigen die drei Varianten sehr ähnliche Kurvenverläufe unterhalb von pH 5,5. Danach unterscheidet sich die Kurve der sauren Variante stark von den übrigen Varianten. Eine Auftrennung aller drei Varianten ist im Bereich von pH 7,0 bis 8,0 zu erkennen. Ein ähnlicher Kurvenverlauf ist auch für Eshmuno® CPX in Abbildung 52 B zu erkennen. Hier unterscheidet sich die saure Variante noch stärker, auch im niedrigen pH-Wert Bereich. Eine Auftrennung der Varianten ist zwischen pH 6,0 und 8,0 zu erkennen. Der Vergleich der beiden Graphen zeigt, dass die beschreibenden Kurven der Anzahl an Austauschladungen v des Prototyp Resins 1 im Bereich unter pH 5,5 über denen von Eshmuno® CPX verläuft. Für höhere pH-Werte dreht sich dieser Trend um. Dies lässt eine stärkere Interaktion bei pH 5 sowie eine schwächere Interaktion bei beispielsweise pH 7 des Prototyp Resins 1 vermuten. Bestätigt wird dieser Trend durch die Elutions-pH-Werte bzw. Na^+ -Konzentrationen. Ein Vergleich ist in Abbildung 53 dargestellt.

3 Ergebnisse

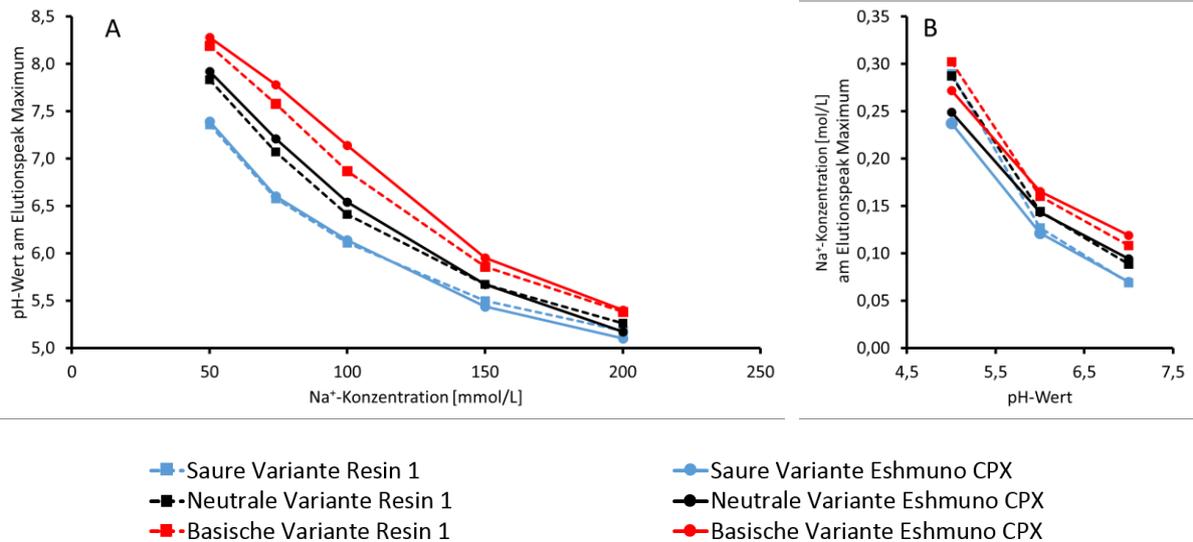


Abbildung 53: Vergleich der Elutionsbedingungen von mAb02 der pH-Gradienten (A) und Salzgradienten (B) von Prototyp Resin 1 und Eshmuno® CPX.

Abbildung 53 zeigt den Vergleich der Elutions-pH-Werte der pH-Gradienten (A) und Na⁺-Konzentrationen der Salzgradienten (B) für Prototyp Resin 1 und Eshmuno® CPX. Der Graph zeigt, dass die Elutions-pH-Werte von Eshmuno® CPX über denen von Prototyp Resin 1 liegen. Jedoch ist auch ersichtlich, dass der Unterschied für größere Salzkonzentrationen geringer wird. Größere Salzkonzentrationen entsprechen geringeren Elutions-pH-Werten. Dieser Trend wird durch die Salzgradienten bei konstantem pH-Wert in Abbildung 53 B bestätigt. Bei pH 5 liegt die Elutions-Na⁺-Konzentration des Prototyp Resin 1 schließlich über dem des Eshmuno® CPX. Dies zeigt, dass die Dissoziation der Carboxy-Gruppen zu einer Reduktion an geladenen Liganden führt, was die Bindung des Proteins entgegen der Erwartung zu verstärken scheint. Diese Aussage trifft ebenfalls auf die anderen beiden Ladungsvarianten zu. Eine Erklärung dieses Effektes sind mögliche hydrophobe Interaktionen der entladenen Liganden mit dem Protein, die durch die Assoziation eines H⁺-Ions aktiviert wird.

Neben der Anzahl an Austauschladungen ν ist ein weiterer wichtiger Parameter die Gleichgewichtskonstante K_{eq} . Ein Vergleich der K_{eq} -Werte beider Resins ist in Abbildung 54 dargestellt.

3 Ergebnisse

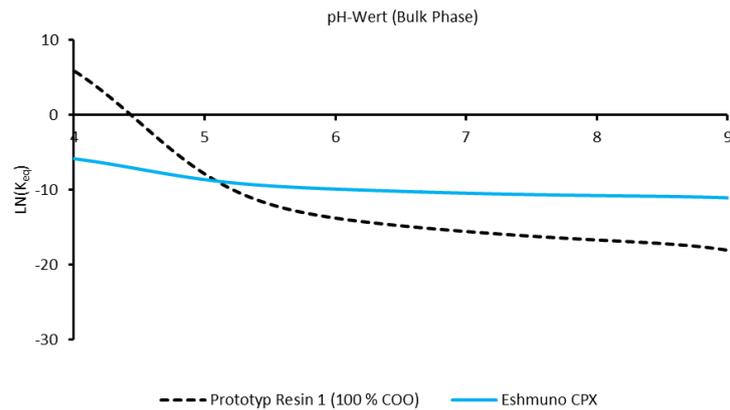


Abbildung 54: Vergleich der Gleichgewichtskonstante K_{eq} der sauren Spezies über den pH-Wert der Bulk-Phase des DIX-Modells von Prototyp Resin 1 und Eshmuno® CPX.

Der Vergleich der Gleichgewichtskonstanten K_{eq} des Prototyp Resins 1 und des Eshmuno® CPX aus Abbildung 54 zeigt stark unterschiedliche Kurvenverläufe. Während der Wert des Eshmuno® CPX über den pH-Wert nur leicht variiert, verändert er sich beim Prototyp Resins 1 sehr stark. Weiterhin werden bei Prototyp Resins 1 positive als auch negative Werte erhalten, was auf eine Veränderung der Austauschreaktion schließen lässt.

3.8.7 *In silico* Simulation und Optimierung der Trennung der drei mAb02-Ladungsvarianten auf Prototyp Resin 1

Nach der Bestimmung der Modellparameter in Abschnitt 3.8.5 wird in diesem Kapitel die Optimierung der Trennung der drei Ladungsvarianten durch *in silico*-Simulation von Chromatogrammen diskutiert. Für die *in silico*-Simulation wird das *Lumped-Rate* Modell aus Abschnitt 2.6.9 verwendet. Die Berechnung der Chromatogramme erfolgte in Berkeley Madonna®, wobei das Programm keine Funktion zur Optimierung der Peak-Trennung enthält. Die berechneten Chromatogramme wurden dazu mit Microsoft Excel in PeakFit importiert und die jeweilige Peak-Auflösung berechnet. Die Optimierung der Trennung erfolgte in einem iterativen Verfahren und ist sehr zeitaufwendig. Der Prozess könnte in Zukunft durch die Verwendung einer anderen Software oder die Verknüpfung verschiedener Software-Pakete vereinfacht und beschleunigt werden. Die Massentransferkoeffizienten wurden während der Optimierung konstant gehalten, da sie aufgrund diverser Abhängigkeiten sehr schwer

3 Ergebnisse

zu berechnen sind. In den darauffolgenden verifizierenden Experimenten wurden die Massentransferkoeffizienten an die experimentellen Daten angepasst.

Zur ersten Charakterisierung der Trennung wurden verschiedene Salzgradienten bei konstanten pH-Werten berechnet. Eine Übersicht ist in Abbildung 55 dargestellt.

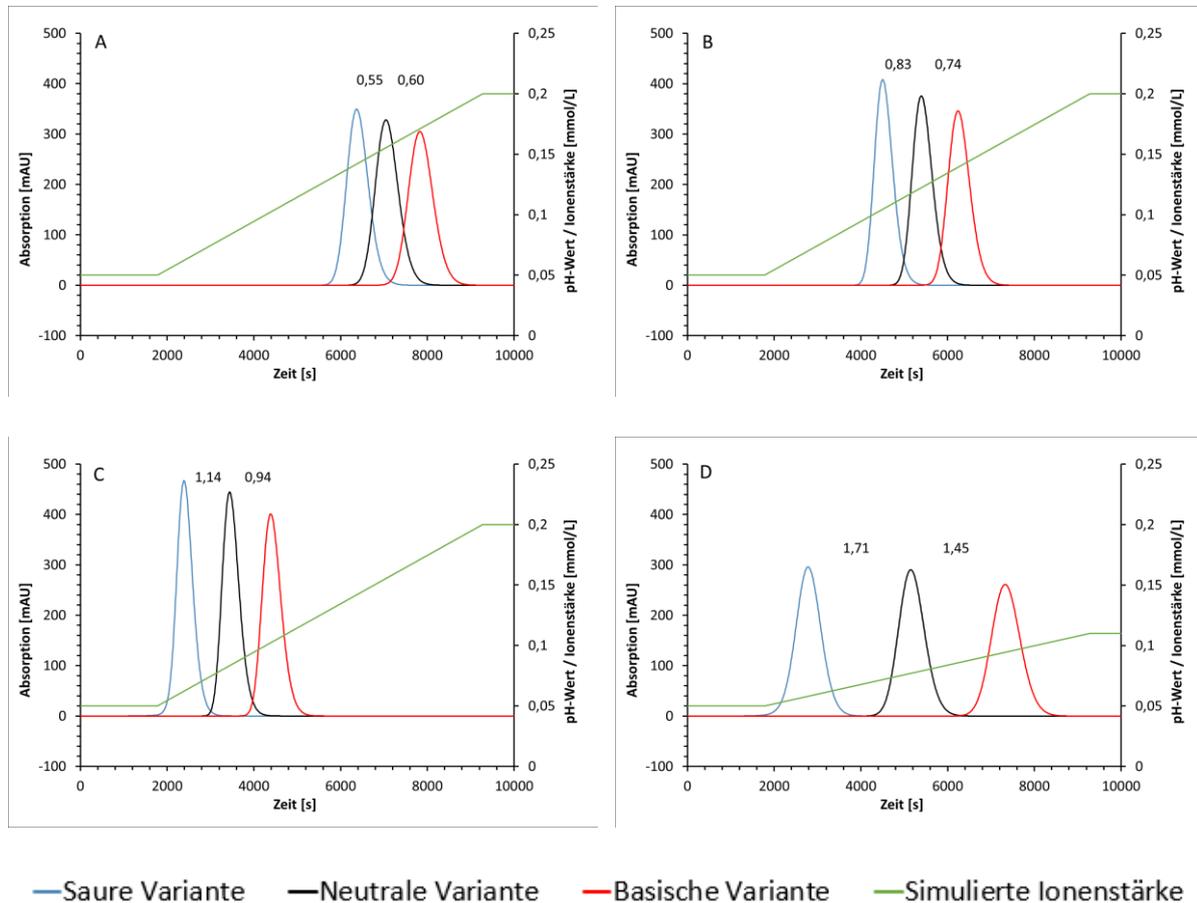


Abbildung 55: Simulation der Trennung der mAb02 Ladungsvarianten auf Prototyp Resin 1 unter Verwendung eines Salzgradienten bei pH 5,5 (A), pH 6 (B) und bei pH 7 (C, D). Gradientenlänge: 50 CV, Flussrate: 1 mL/min, $k_{\text{eff}} = 1 \cdot 10^{-5}$ cm/s, N (Segmente)= 20, $D_{\text{ax}} = 1,18 \cdot 10^{-3}$.

Abbildung 55 verdeutlicht, dass die Trennung der drei Ladungsvarianten stark vom pH-Wert abhängig ist. Bei einem niedrigen pH-Wert von 5,5 (Abbildung 55 A) beträgt die Auflösung 0,55 bzw. 0,60. Je höher der pH-Wert gewählt ist, desto geringer sind die Salzkonzentrationen zum Elutions-Zeitpunkt und desto besser wird die Trennung. Für pH 7 eluiert die saure Spezies bereits zu Beginn des Gradienten (Abbildung 55 C) und die Auflösung der Trennung konnte auf 1,14 bzw. 1,94 verbessert werden. Dies entspricht etwa den Bedingungen, die in Abschnitt 3.8.1 zur Herstellung der Probe verwendet wurden. Die Trennung kann weiter optimiert werden, indem die

3 Ergebnisse

Salzkonzentration des Elutionspuffers verringert wird (Abbildung 55 D). So können Auflösungen von 1,71 bzw. 1,45 erreicht werden. Der Nachteil dieser Bedingungen ist der hohe pH-Wert und die damit sehr geringe Bindekapazität von ca. 20 mg/mL Resin (Daten nicht gezeigt). Eine Alternative zur Verbesserung der Bindebedingungen stellen pH-Gradienten dar. Eine Übersicht der getesteten Bedingungen ist in Abbildung 56 dargestellt.

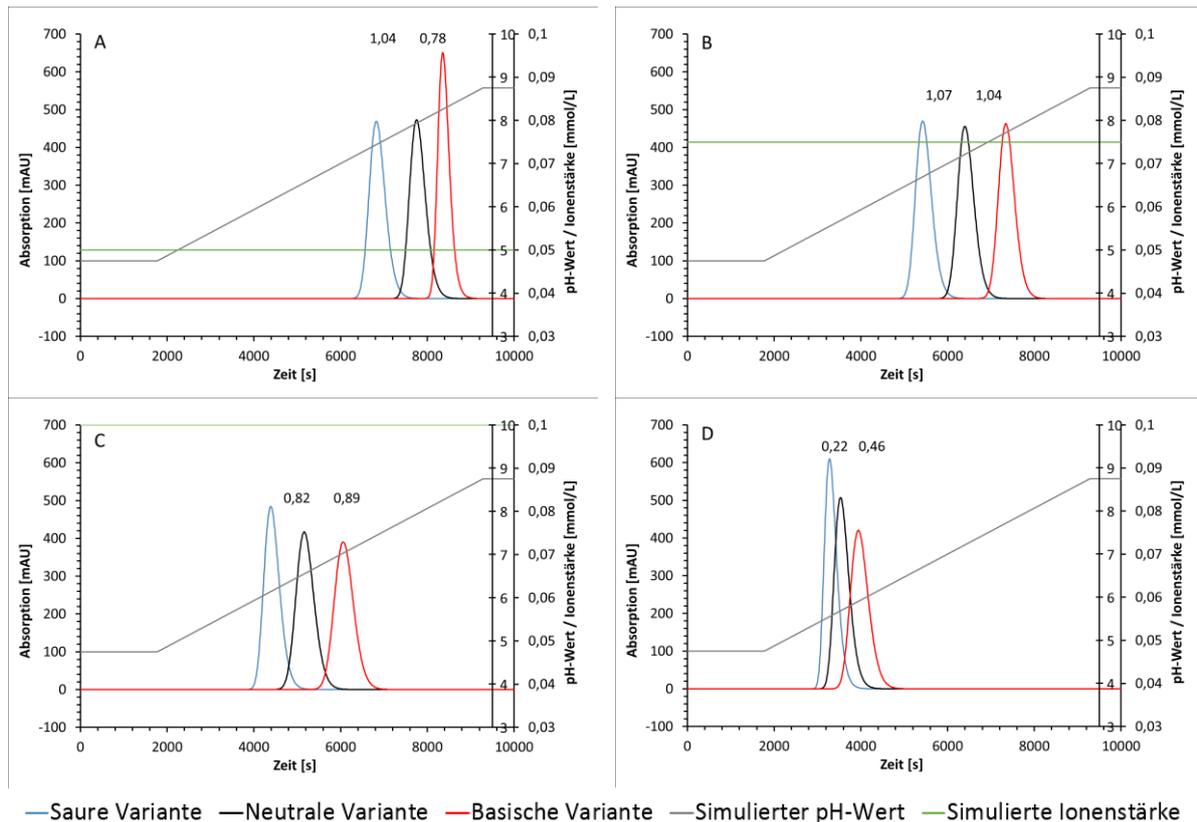


Abbildung 56: Simulation der Trennung der mAb02 Ladungsvarianten auf Prototyp Resin 1 unter Verwendung eines pH-Gradienten bei 50 mmol/L (A), 75 mmol/L (B), 100 mmol/L (C) und 150 mmol/L (D). Gradientenlänge: 50 CV, Flussrate: 1 mL/min, $K_{eff} = 1 \cdot 10^{-5}$ cm/s, N (Segmente) = 20, $D_{ax} = 1,18e-3$.

Abbildung 56 zeigt unterschiedliche Auflösungen von Trennung je nach pH-Bereich. Für die geringste Salzkonzentration von 50 mmol/L werden Auflösungen von 1,04 und 0,78 erreicht (Abbildung 56 A). Wird die Salzkonzentration auf 100 mmol/L erhöht, wird die Auflösung zwischen der neutralen und basischen Variante auf 1,04 (Abbildung 56 B) erhöht. Bei einer weiteren Erhöhung wird jedoch die Auflösung verschlechtert (Abbildung 56 C, D). Dies verdeutlicht, dass das Optimum der Trennung im Bereich von 100 mmol/L Na^+ -Ionen bzw. einem pH-Wert von 6,5 - 8,0 liegt.

3 Ergebnisse

Die pH-Gradienten beginnen bei stark bindenden Bedingungen und somit hohen DBC-Werten, jedoch ist die Auflösung schlechter als für die Salzgradienten. Eine Erhöhung des pH-Wertes zu Beginn des Gradienten in Abbildung 56 A würde die Gradientensteigung verringern und damit die Auflösung erhöhen, was hier nicht zielführend wäre, da erneut die DBC sinken würde. Als Lösung kann die Kombination von Salz- und pH-Gradienten, sogenannten dualen Gradienten, angewendet werden. Hier können die Bedingungen sehr individuell angepasst werden und komplizierte Trennprobleme gelöst werden (Lee et al., 2015). Es wurden sowohl parallele duale Gradienten, mit steigenden pH-Wert und steigender Salzkonzentration, als auch antiparallele duale Gradienten untersucht. Das beste Ergebnis ist in Abbildung 57 dargestellt.

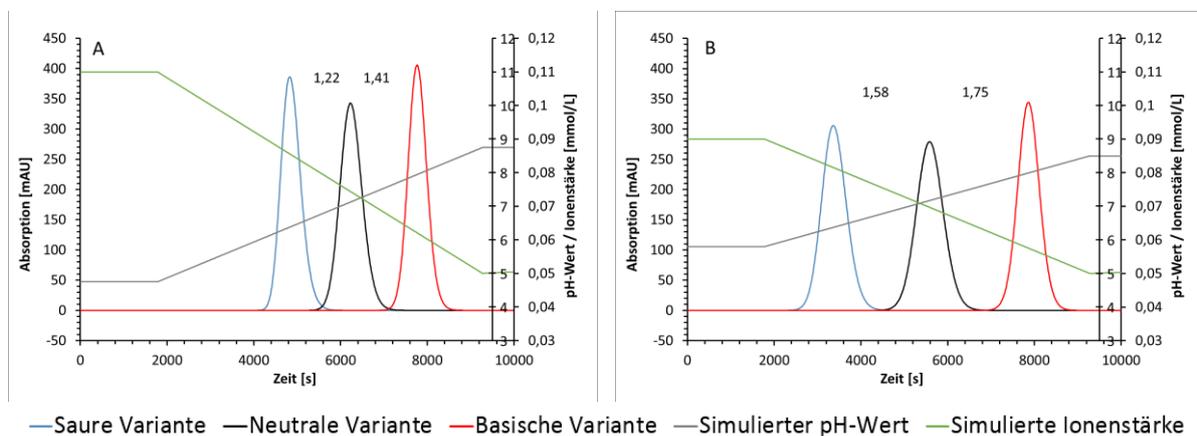


Abbildung 57: Simulation der Trennung der mAb02 Ladungsvarianten auf Prototyp Resin 1 unter Verwendung dualer Gradienten von A: 110 auf 50 mmol/L und pH 4,75 auf 8,75; B: 90 auf 50 mmol/L und pH 5,8 auf 8,5. Gradientenlänge: 50 CV, Flussrate: 1 mL/min, $k_{\text{eff}} = 1 \cdot 10^{-5}$ cm/s, N (Segmente)= 20, $D_{\text{ax}} = 1,18 \cdot 10^{-3}$.

Die Einführung dualer Gradienten verbessert die Auflösung auf 1,22 bzw. 1,41 (Abbildung 57 A). Dabei erweist sich der antiparallele Gradient als effektiv. In einem letzten Schritt wurden die Bedingungen des Bindepuffers leicht angepasst und so eine Basislinien-Trennung der drei Varianten erreicht (Abbildung 57 B). Die Auflösung beträgt nun 1,58 bzw. 1,75 und ist somit auch verbessert im Vergleich zur Verwendung des optimierten Salzgradienten aus Abbildung 55 A. Nach der *in silico*-Optimierung erfolgt die experimentelle Überprüfung der simulierten Chromatogramme. Dies ist sehr wichtig, da sich die Chromatogramme durch die Veränderung der Massentransferkoeffizienten ändern können. Die experimentelle Durchführung des simulierten dualen Gradienten aus Abbildung 57 B ist in Abbildung 58 A dargestellt.

3 Ergebnisse

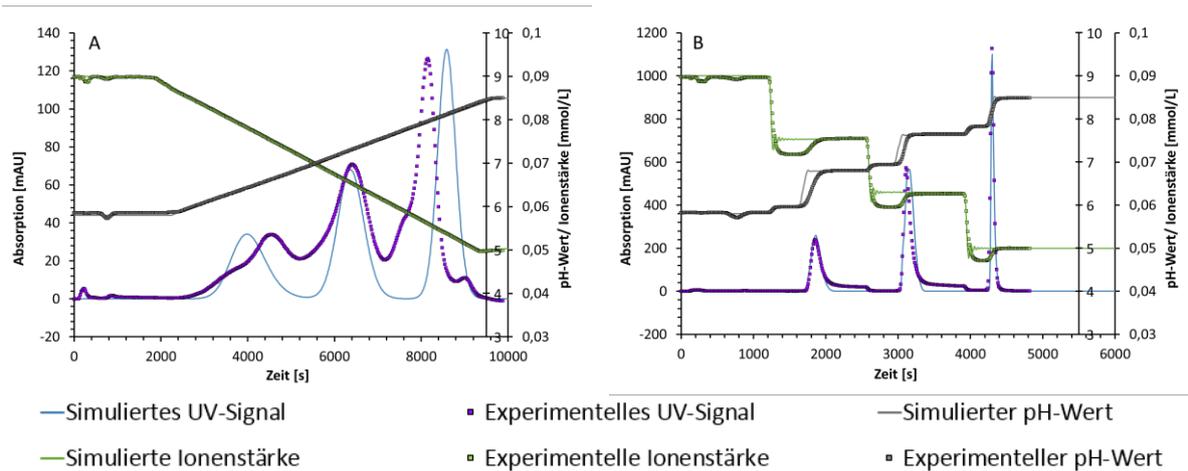


Abbildung 58: Simulation der Trennung der mAb02 Ladungsvarianten auf Prototyp Resin 1 unter Verwendung einer Dualen Gradienten (A) bei einer Gradientensteigung von 50 CV und einer Stufenelution (B) von 0 % auf 36 %, 67 % und 100 % Elutionspuffer. Bindepuffer: 90 mmol/L, pH 5,8, Elutionspuffer: 50 mmol/L, 8,5; Flussrate: 1 mL/min, Stufenlänge: 15 CV, Massentransferkoeffizienten: A: $k_{\text{eff}}(\text{Spezies 1}) = 5 \cdot 10^{-6}$ cm/s; $k_{\text{eff}}(\text{Spezies 2}) = 1 \cdot 10^{-5}$ cm/s; $k_{\text{eff}}(\text{Spezies 3}) = 1,2 \cdot 10^{-5}$ cm/s; B: $k_{\text{eff}}(\text{Spezies 1}) = 7,7 \cdot 10^{-5}$ cm/s; $k_{\text{eff}}(\text{Spezies 2}) = 9,0 \cdot 10^{-5}$ cm/s; $k_{\text{eff}}(\text{Spezies 3}) = 3,7 \cdot 10^{-5}$ cm/s, N (Segmente) = 20, $D_{\text{ax}} = 1,18 \cdot 10^{-3}$.

Das Experiment aus Abbildung 58 A verdeutlicht, dass die Simulation dualer Gradienten auf Prototyp Resin 1 sehr schwierig ist. Das Problem sind die unterschiedlichen Verzögerungen des Starts der beiden Gradienten. Dieses Phänomen wurde bereits in Abschnitt 3.2 beschrieben. In diesem Experiment führt es dazu, dass nicht gewollte Kombinationen aus pH-Wert und Salzkonzentration entstehen. Trotz der Anpassung der simulierten Parameter ist die Korrelation mit den experimentellen nicht zu jedem Zeitpunkt zufriedenstellend.

Mit dem gleichen Puffersystem wurde weiterhin eine Stufenelution ausgelegt und experimentell überprüft. Das Ergebnis ist in Abbildung 58 B dargestellt. Auch hier kommt es zu Abweichungen, die für den Carboxytauscher typisch sind. Jede Stufe kann experimentell in zwei Stufen unterteilt werden, was die Simulation kompliziert. Dennoch können durch die Anpassung der simulierten Kurve und die Einführung entsprechender Verzögerungen eine gute Korrelation zu den experimentellen Daten erreicht werden.

3 Ergebnisse

3.9 Modellierung von Carboxy-Mixed-Mode-Tauschern mit unterschiedlicher Aminosäure-Modifikation

In diesem Abschnitt wurde die experimentelle Arbeit unter meiner Anleitung von Jonas Martin Maria Koch unterstützt, dessen Abschlussarbeit ich während meiner Promotion mitbetreute. Herr Koch führte die Modellierungsexperimente durch und modellierte den Datensatz mit einem MMC Modell (Koch, 2017). Im Rahmen der Bachelorarbeit erfolgte weiterhin eine Auswertung mit kombiniertem MMC/DIX-Modell mit individuellem n und globalisiertem K_s -Wert. Bei den hier gezeigten Auswertungen des Datensatzes von Jonas Koch handelt es sich um selbst durchgeführte Überarbeitungen und Erweiterungen der Auswertung mit dem MM/DIX-Modell.

In diesem Kapitel wird das entwickelte DIX-Modell auf Mixed-Mode (MM)-Chromatographie angewandt. Hierzu wird ein bereits bestehendes MM Modell durch die Beschreibung der im der Resin-Phase befindlichen Salz-Ionen über den r_D -Wert erweitert. Die Beschreibung der Ligandendichte erfolgt äquivalent zum DIX-Modell über den pH-Wert der Resin-Phase (siehe Abschnitt 2.6.5).

Für die Untersuchungen werden die Prototyp Resins 6 bis 9 verwendet, welche als Ligand die Aminosäuren Valin oder Leucin immobilisiert haben. Resin 6 bis 8 enthalten Valin bei unterschiedlichen Ligandendichten. Durch die Auswahl dieser Resin ist eine Charakterisierung des Einflusses der Ligandendichte und Hydrophobizität möglich.

Es wurden sechs pH-Gradienten bei unterschiedlicher Salzkonzentration sowie drei Salzgradienten bei unterschiedlichem pH-Wert aufgenommen. Die Gradientensteigungen betragen 40, 60, 80 und 120 CV. Der Datensatz beinhaltet 144 Datenpunkte und reicht von pH 4,99 (250 mmol/L Na⁺, 120 CV Gradientensteigung, Resin 6) bis pH 7,60 (50 mmol/L Na⁺, 40 CV Gradientensteigung, Resin 9).

3.9.1 Modellierung mit Salz- und pH-abhängigen K_s -Wert und einem n -Wert pro Resin

Das MM Modell enthält im Vergleich zum DIX-Modell zwei zusätzliche Parameter, den Interaktionsparameter des Salzes für hydrophobe Wechselwirkungen K_s und die Anzahl an hydrophoben Bindungen n . Lee et al. publizierten eine empirische Gleichung für K_s (Lee et al., 2017a). Diese Beschreibung führt für den vorhandenen Datensatz zu einer schlechten Korrelation zwischen den berechneten Kurven und den experimentellen Daten. Daraufhin wurde der K_s -Wert für jede Bedingung individuell bestimmt. Der n -Wert wurde für jedes Resin konstant gehalten, da ansonsten der

3 Ergebnisse

Freiheitsgrad der Modellierung den Datensatz übersteigen würdet. Das Ergebnis der Regression der Daten ist in Abbildung 59 gezeigt. Die bestimmten Parameter werden in Abbildung 60 zusammengefasst.

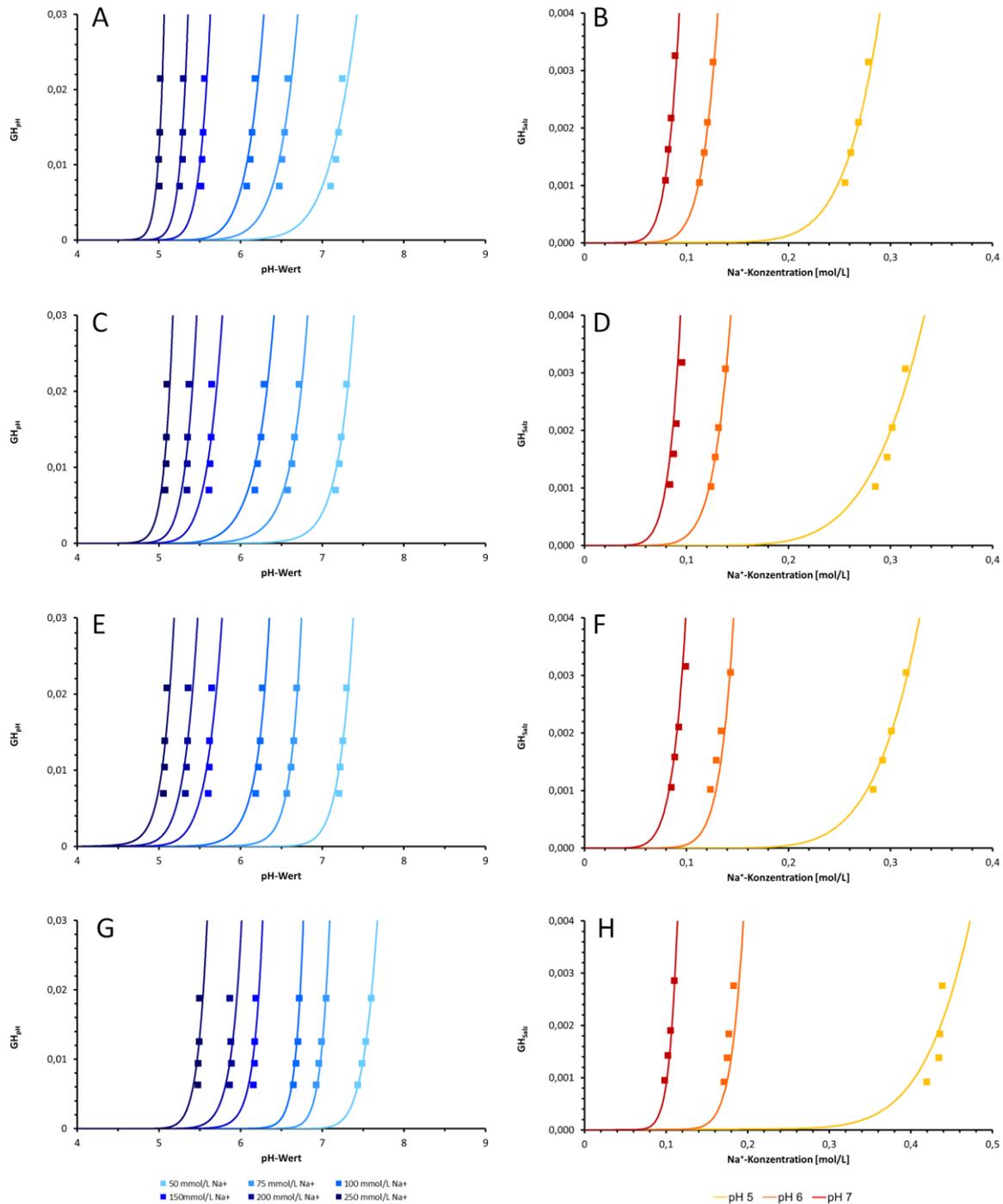


Abbildung 59: Modellierung von mAb05 auf Prototyp Resins 6 (A, B), 7 (C, D), 8 (E, F) und 9 (G, H) unter Verwendung des MMC/DIX-Modells und individuellem K_S -Wert. Bei der Bestimmung der Parameter werden Daten aus pH-Gradienten bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (linke Seite), Salzgradienten bei verschiedenen pH-Werten (rechte Seite) verwendet.

3 Ergebnisse

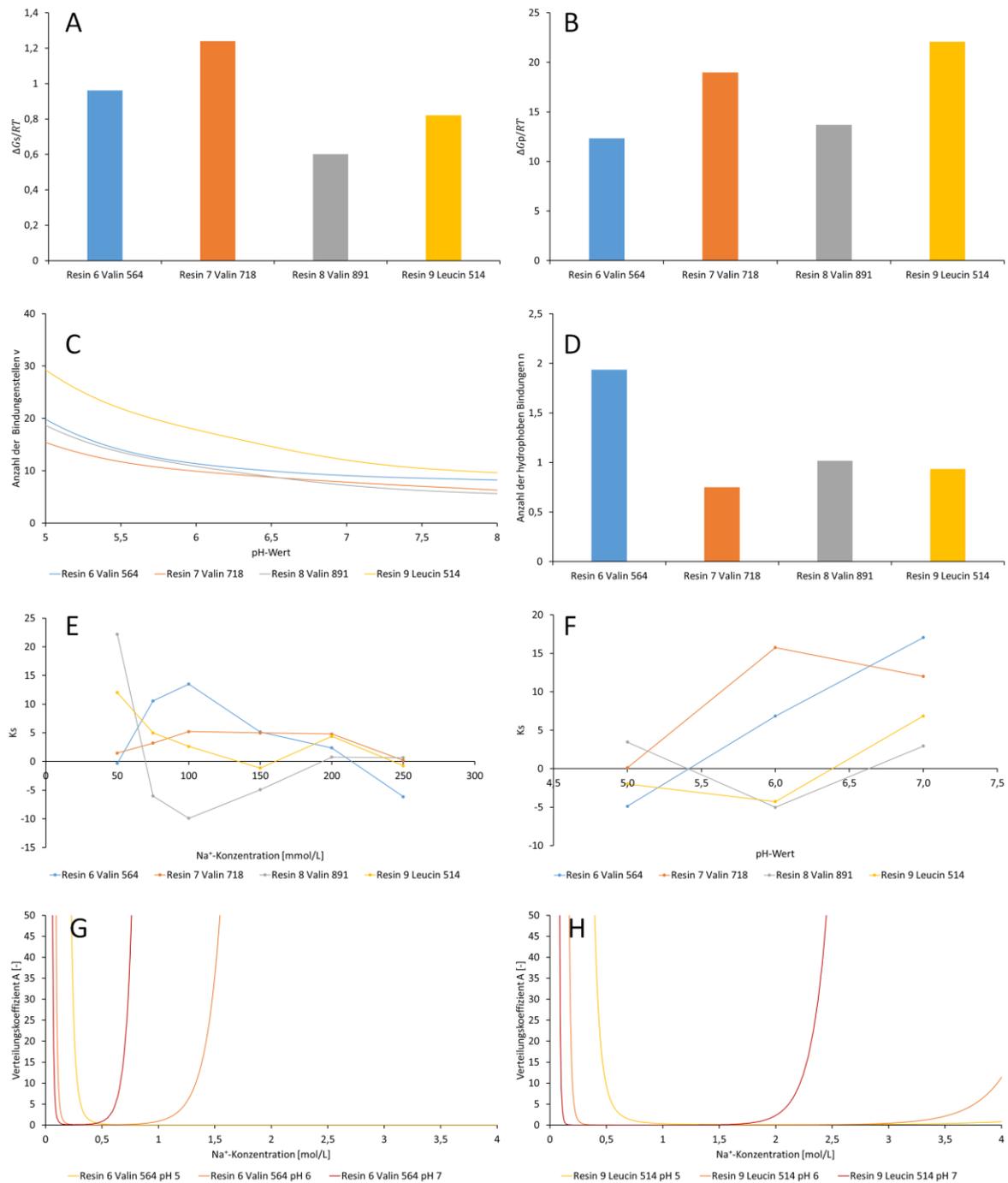


Abbildung 60: Bestimmte Parameter der Modellierung (A - F) und der Verteilungskoeffizient A (G, H) von mAb05 auf Prototyp Resins 6, 7, 8 und 9 unter Verwendung des MMC/DIX-Modells und individuellem K_s -Wert.

3 Ergebnisse

Abbildung 59 zeigt, dass die Kombination des MM Modells von Lee et al. in Kombination mit dem DIX-Modell zu einer guten Korrelation zwischen den experimentellen Daten und dem Modellkurven führt. Kleine Abweichungen sind bei Resin 9 bei pH 5 sowie bei einigen pH-Gradienten zu erkennen. Werden die in Abbildung 60 zusammengefassten Parameter betrachtet, ist erkennbar, dass die gute Korrelation der Daten aufgrund des großen Freiheitsgrades durch die individuellen Modellparameter entsteht. Dies ist vor allem beim Vergleich der Valin-Resins erkennbar. So variiert der $\Delta G_P^0/RT$ -Wert zwischen 12,3 (Resin 6) und 18,9 (Resin 8) ohne erkennbaren Trend (Abbildung 60 B). Gleiches gilt für den $\Delta G_S^0/RT$ -Wert (Abbildung 60 A). Die v -Kurven der Valin-Resins zeigen einen ähnlichen Verlauf, wobei die v -Kurve von Prototyp Resin 9 oberhalb der drei anderen Kurven verläuft (Abbildung 60 C). Der n -Wert beschreibt die Anzahl hydrophober Liganden und sollte für Valin im Vergleich zu Leucin theoretisch kleiner sind. Die bestimmten Werte liegen jedoch zwischen 1,93 (Resin 6) und 0,75 (Resin 7) und verlaufen ohne erkennbaren Trend. Resin 6 mit der niedrigsten Ligandendichte und dem weniger hydrophoben Liganden zeigt dabei den größten Wert (Abbildung 60 D). Die bestimmten K_S -Werte sind sowohl positiv als auch negativ und unterschieden sich zwischen den einzelnen Resins stark. Ein allgemeiner Trend, der für eine globale, empirische Beschreibung des Wertes notwendig wäre, ist weder für die Salzabhängigkeit (Abbildung 60 E) noch in Relation zum pH-Wert (Abbildung 60 F) zu erkennen. Der berechnete Verteilungskoeffizient A für Resin 6 und 9 zeigt ebenfalls Auffälligkeiten in Form von ineinander verschobenen „U-Kurven“. So steigt die Kurve von pH 7 vor den Kurven von pH 6 für hohe Salzkonzentrationen an.

Zusammengefasst zeigt das Ergebnis, dass das Modell in der Lage ist die experimentellen Daten zu beschreiben, jedoch der Freiheitsgrad zu groß ist, sodass die einzelnen Parameter große Variationen zeigen und die erwarteten Trends nicht erkennbar sind.

3.9.2 Modellierung mit globalen K_S -Wert und Salz- und pH-abhängigen n -Wert

In Folge der Ergebnisse des vorherigen Abschnittes wurde der K_S -Wert für alle Resins globalisiert und individuelle n -Werte bestimmt. Das Ergebnis der Regression ist in Abbildung 61 gezeigt. Die bestimmten Parameter sind in Abbildung 62 zusammengefasst.

3 Ergebnisse

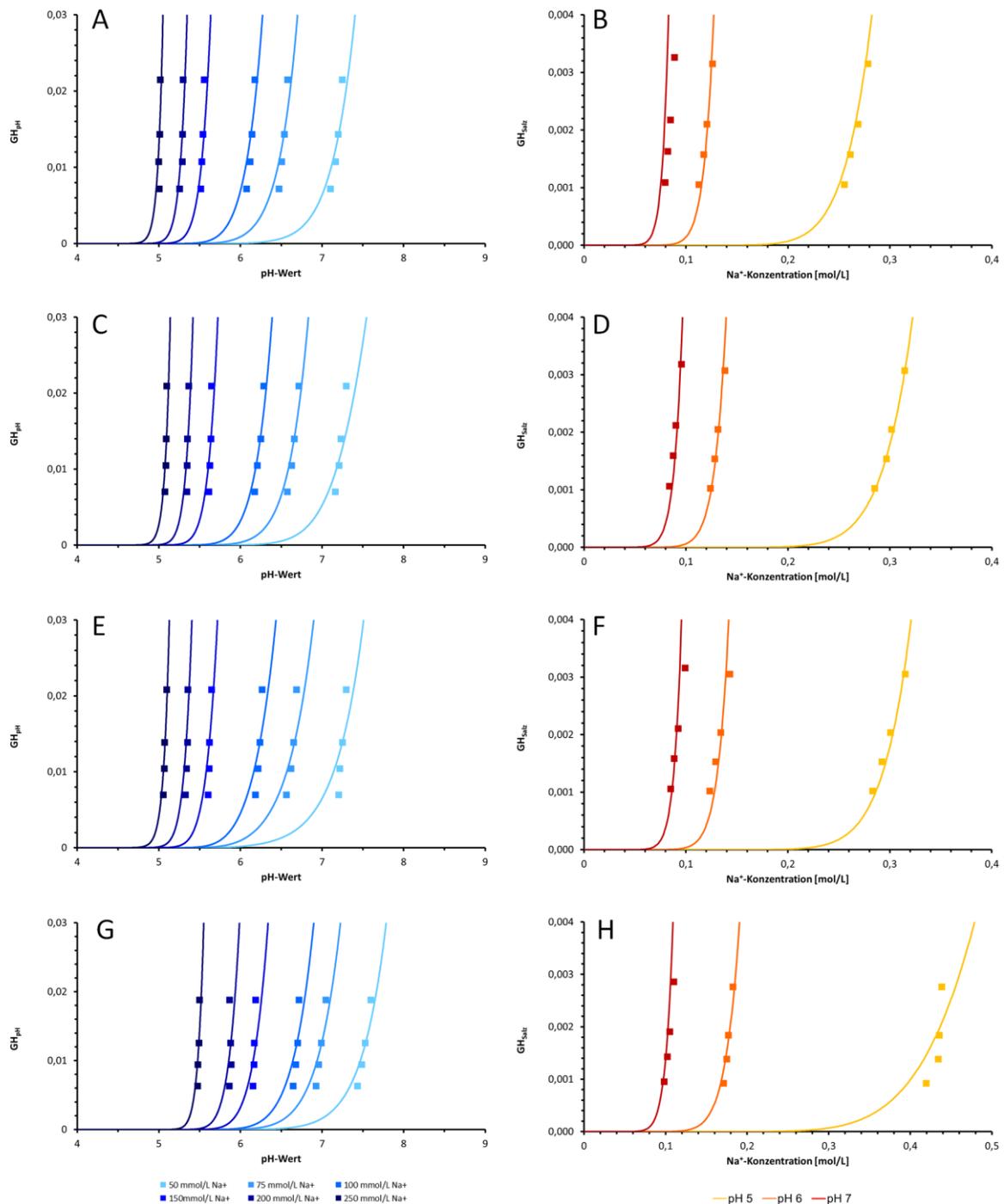


Abbildung 61: Modellierung von mAb05 auf Prototyp Resins 6 (A, B), 7 (C, D) 8 (E, F) und 9 (G, H) unter Verwendung des MMC/DIX-Modells und individuellem n-Wert. Bei der Bestimmung der Parameter werden Daten aus pH-Gradienten bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (linke Seite), Salzgradienten bei verschiedenen pH-Werten (rechte Seite) verwendet.

3 Ergebnisse

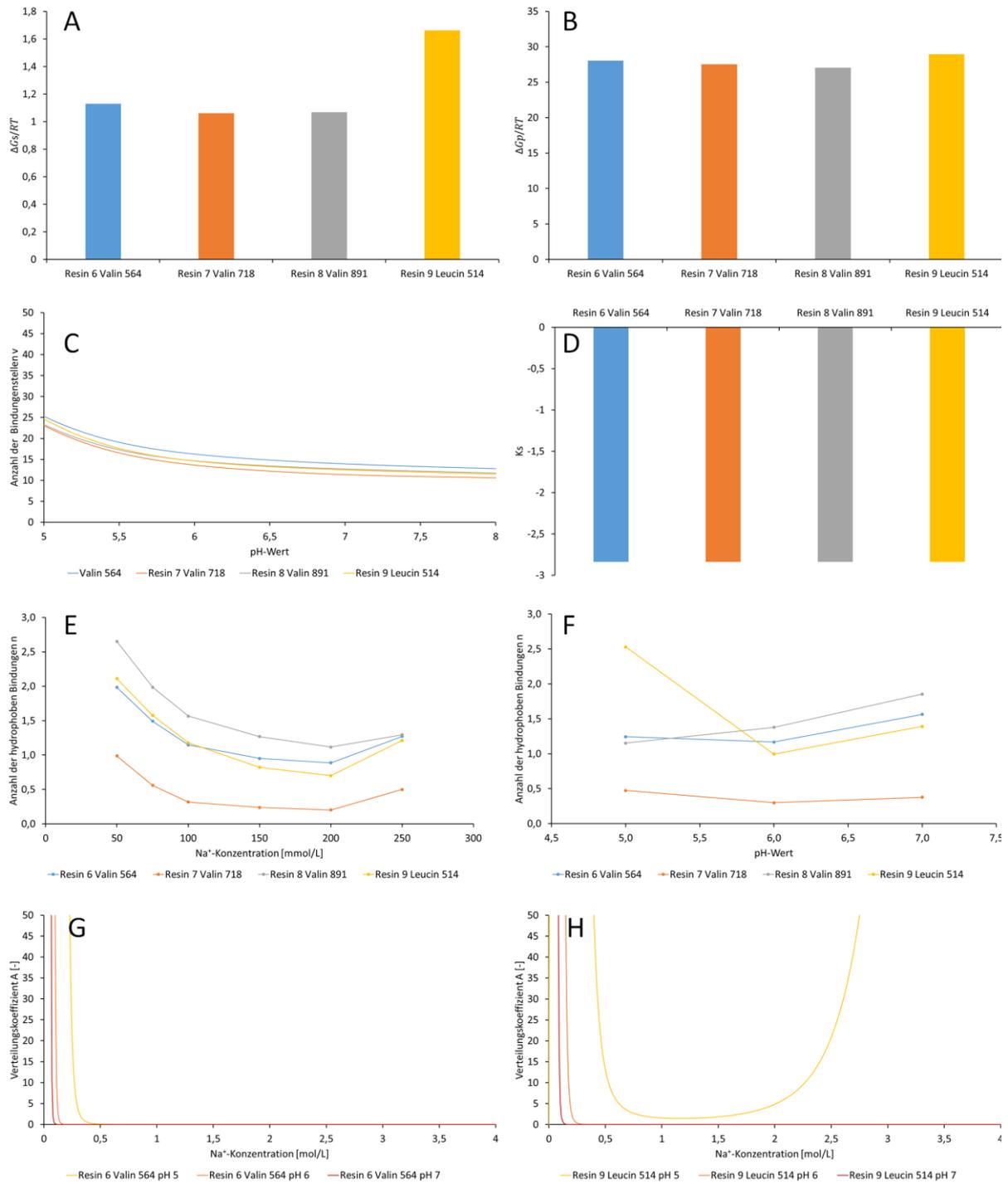


Abbildung 62: Bestimmte Parameter der Modellierung (A - F) und der Verteilungskoeffizient A (G, H) von mAb05 auf Prototyp Resins 6, 7, 8 und 9 unter Verwendung des MMC/DIX-Modells und individuellem n-Wert.

3 Ergebnisse

Abbildung 61 zeigt die Korrelation der Daten mit individuellem n -Wert. Im Vergleich zu dem individuellem K_S -Wert aus Abbildung 59 ist die Korrelation leicht geringer, was vor allem in den pH-Gradienten erkennbar ist. Ein Grund hierfür könnte der globalisierte K_S -Wert für alle Resins sein und der daher eingeschränkte Freiheitsgrad zwischen den einzelnen Resins. Die Vereinheitlichung des K_S -Wertes hat einen positiven Einfluss auf die Variabilität der bestimmten Parameter, welche in Abbildung 62 gezeigt sind. So ist beispielsweise der $\Delta G_S^0/RT$ -Wert nahezu konstant bei 1,0 für die Valin Resins 6 bis 8. Der $\Delta G_S^0/RT$ -Wert des Leucin-Resins 9 ist mit 1,66 leicht höher (Abbildung 62 A). Der $\Delta G_P^0/RT$ -Wert ist zwischen 27,0 (Resin 8) und 28,9 (Resin 9) nahezu konstant (Abbildung 62 B). Auch die v -Kurven verlaufen sehr ähnlich (Abbildung 62 C). Der K_S -Wert wurde für alle Resins simultan auf einen Wert von -2,8 bestimmt (Abbildung 62 D). Interessant sind vor allem die ermittelten n -Werte. So wird eine „U-Kurve“ für die Abhängigkeit zur Salzkonzentration bestimmt (Abbildung 62 E). Für die pH-Abhängigkeit ist der Wert mit Ausnahme des Leucin-Resins bei pH 5 nahezu konstant (Abbildung 62 F). Dies lässt darauf schließen, dass der n -Wert in Abhängigkeit der Salzkonzentration global beschrieben werden kann. Für eine Korrelation wurde mit dem Programm TableCurve 2D folgende empirische Form als geeignet definiert:

$$n_i = A_i + B_i(c_S^B) + C_i(c_S^B)^2 \quad (83)$$

Für Resin 6 wurde mit dem in Abbildung 62 folgendes Ergebnis bestimmt: $A = 3,01$, $B = -25,3$ und $C = 73,4$.

Die berechneten Werte des Verteilungskoeffizienten A für Resin 6 (Abbildung 62 G) und Resin 9 (Abbildung 62 H) sind leicht unterschiedlich. Nur bei Resin 9 ist eine „U-Kurve“ für pH 5 zu erkennen. Dies stimmt mit den experimentellen Beobachtungen überein, dass das Protein bei pH 5 und 2,0 mol/L NaCl nicht an die Säule bindet (Daten BA Jonas Koch).

3.9.3 Modellierung mit globalen K_S -Wert und empirischer Beschreibung des n -Wertes

Mit der in Gleichung (83) beschriebenen empirischen Gleichung wurde der Datensatz erneut gefittet. Das Ergebnis der Korrelation ist in Abbildung 63 gezeigt. Die bestimmten Werte sind in Abbildung 64 zusammengefasst.

3 Ergebnisse

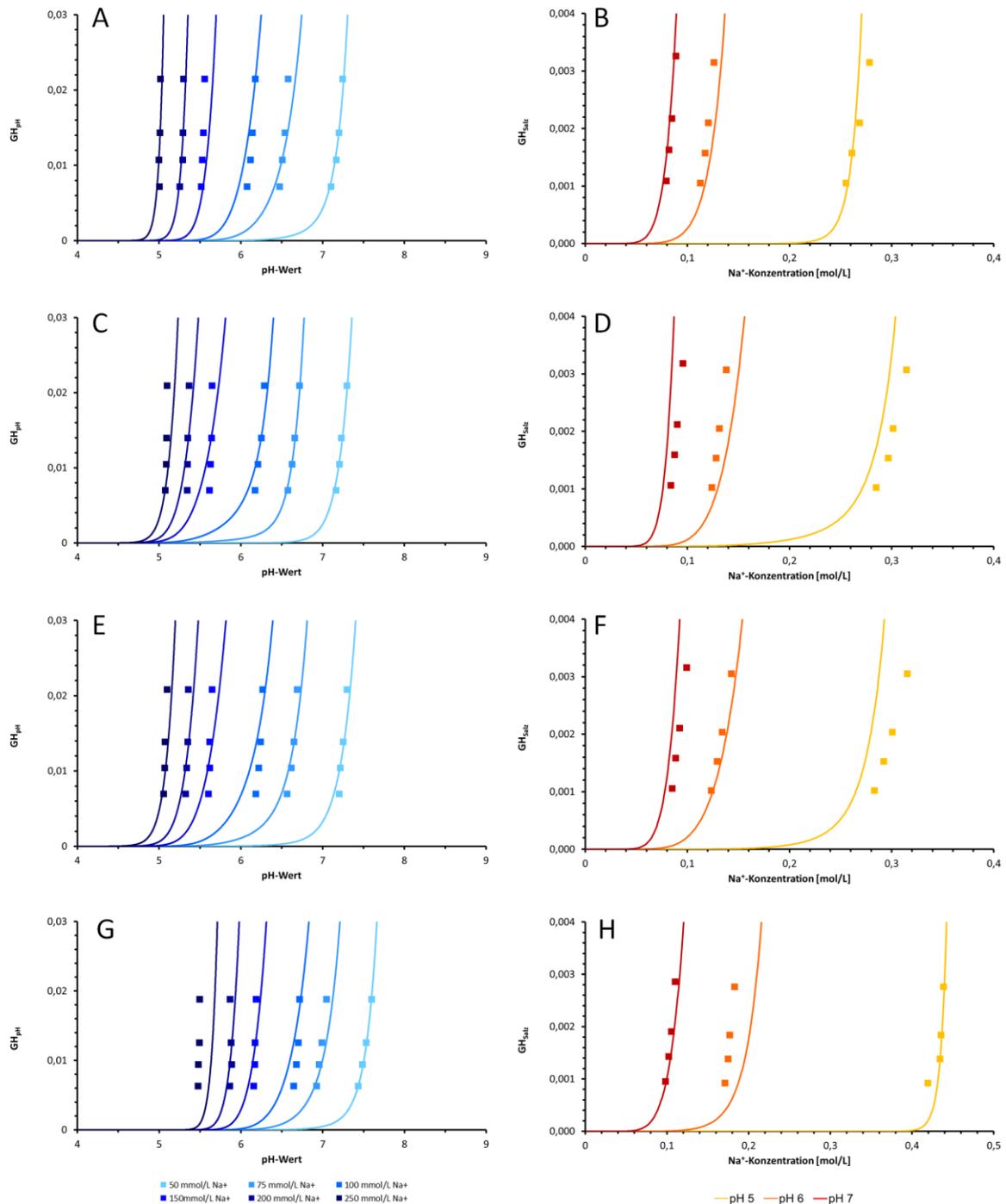


Abbildung 63: Modellierung von mAb05 auf Prototyp Resins 6 (A, B), 7 (C, D) 8 (E, F) und 9 (G, H) unter Verwendung des MMC/DIX-Modells und einer empirischen Beschreibung des n-Wertes. Bei der Bestimmung der Parameter werden Daten aus pH-Gradienten bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (linke Seite), Salzgradienten bei verschiedenen pH-Werten (rechte Seite) verwendet.

3 Ergebnisse

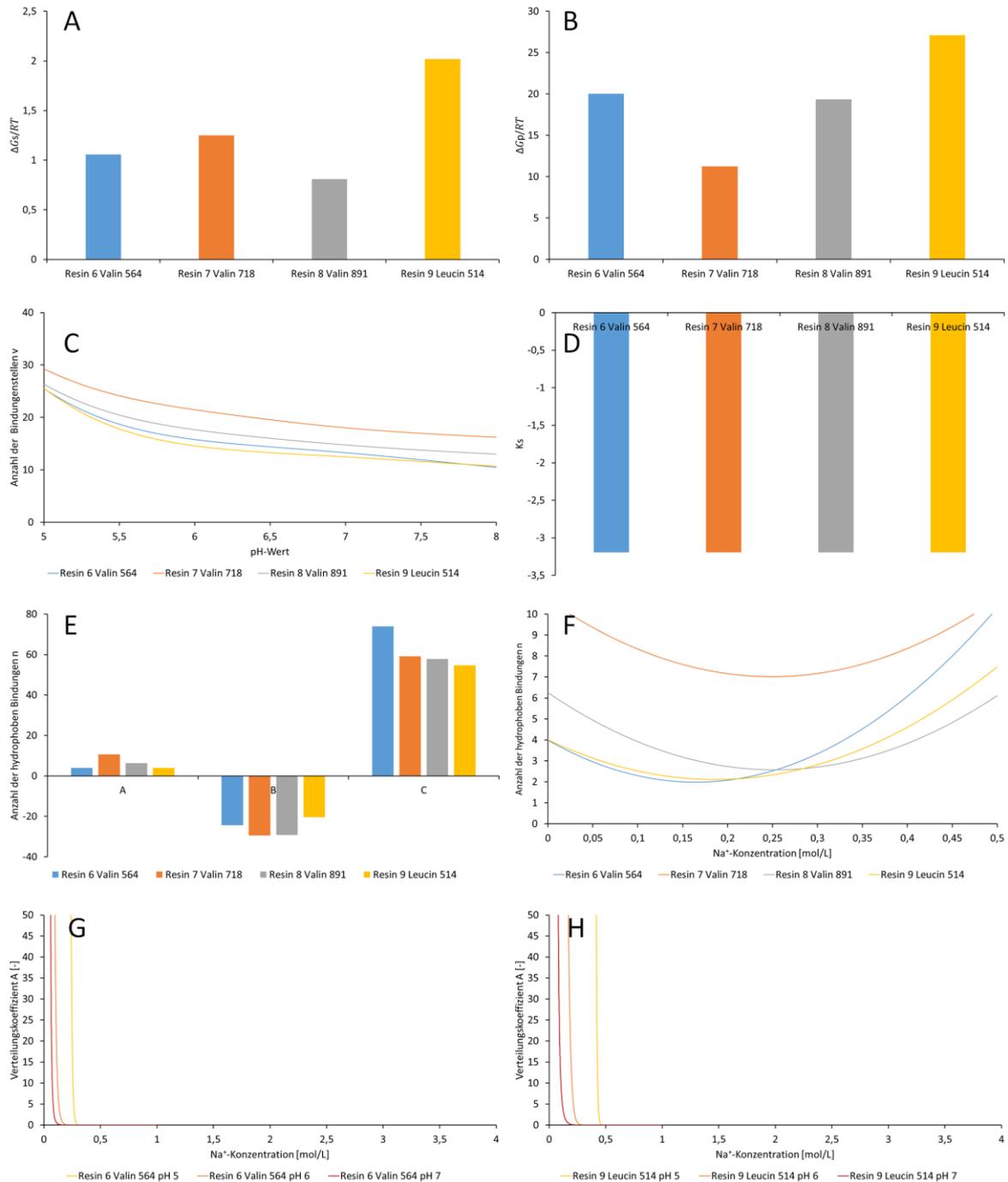


Abbildung 64: Bestimmte Parameter der Modellierung (A - F) und der Verteilungskoeffizient A (G, H) von mAb05 auf Prototyp Resins 6, 7, 8 und 9 unter Verwendung des MMC/DIX-Modells und einer empirischen Beschreibung des n-Wertes.

3 Ergebnisse

Das Ergebnis der Regression der experimentellen Daten und dem Modell mit der empirischen Beschreibung des n -Wertes in Abbildung 63 zeigt, dass die Korrelation leicht schlechter ist. Dies zeigen vor allem die Daten der Salzgradienten bei pH 5 von Resin 7 und 8 sowie die des pH-Gradienten von Resin 9. Die geringere Korrelation resultiert aus der deutlichen Reduktion der Freiheitsgrade des Systems. Die empirische Beschreibung lässt keine individuellen Werte zu, was beispielsweise für die Daten von pH 5 von Resin 9 notwendig wäre (siehe Abbildung 62 F). Die bestimmten Parameter unterschieden sich ebenfalls von denen aus Abschnitt 3.9.2. So variiert der $\Delta G_s^0/RT$ -Wert zwischen den einzelnen Valin Resins stärker. Der $\Delta G_s^0/RT$ -Wert von Resin 9 liegt oberhalb der Valin-Resins (siehe Abbildung 64 A). Der $\Delta G_P^0/RT$ -Wert von Resin 7 wird nun leicht unterhalb des Wertes der anderen Valin-Resins bestimmt (Abbildung 64 B). Auch die v -Kurven unterscheiden sich im Vergleich zur vorherigen Auswertung mit individuellen n -Werten stärker und verlaufen beispielsweise für Resin 7 leicht höher (Abbildung 64 C). Der bestimmte K_s -Wert ist mit -3,1 nahezu identisch zu dem in Abbildung 62. Der größte Unterschied zeigt sich in den n -Werten und den empirischen Parametern zu deren Beschreibung (Abbildung 64 E, F). Die Kurven der n -Werte verlaufen sehr unterschiedlich und sind allgemein höher als bei der vorherigen Auswertung. Insbesondere Resin 7 folgt hier nicht dem allgemeinen Trend. Die hohen n -Werte führen bei den berechneten Verteilungskoeffizienten dazu, dass anstelle der „U-Kurven“ aus Abbildung 62 keine alleinige hydrophobe Bindung bei hohen Salzkonzentrationen stattfindet (Abbildung 64 G, H).

4 Diskussion

4.1 Vergleich homogener und diskontinuierlicher Puffersysteme

Nachdem die Ergebnisse in Abschnitt 3.1 dargestellt wurden, wird in diesem Kapitel diskutiert, welche Vorteile ein diskontinuierliches Puffersystem im Vergleich zum bestehenden homogenen Puffersystem bietet. Der erste Vorteil und Unterschied besteht darin, dass die Herstellung der Puffer des diskontinuierlichen Systems weniger Zeit beansprucht, da jede Puffersubstanz nur einmal eingewogen werden muss. Die Berechnungen haben gezeigt, dass die Konzentrationen der Puffersubstanzen zwischen den beiden Systemen stark unterschiedlich sind. In dem hier beschriebenen Beispiel benötigt das homogene Puffersystem 64 mmol/L Puffersubstanzen, das diskontinuierliche 78 mmol/L. Der wichtigste Diskussionspunkt ist, ob eines der beiden Puffersysteme eine positive Auswirkung auf die Auftrennung von Proteinen in einer pH-Gradienten-Elution hat. Für die Beantwortung dieser Frage wurden zwei vergleichbare Puffersysteme mit identischer Pufferkapazität berechnet. Die zum Einstellen des pH-Wertes benötigte Menge an Na^+ -Ionen in Puffer A und B sind für beide Systeme identisch. Eine mögliche Erklärung ist, dass für einen linearen pH-Gradienten eine lineare Zunahme an benötigten Na^+ -Ionen gegeben sein muss. Die benötigte Menge an Na^+ -Ionen steht in direkter Korrelation zur Pufferkapazität. Zusammenfassend wird festgehalten, dass die Voraussetzung für einen linearen pH-Gradienten ausschließlich die entsprechende Pufferkapazität an einer bestimmten Stelle des pH-Wertes ist. Wie diese erreicht wird, hat keinen Einfluss auf die benötigte Menge an Na^+ -Ionen.

Mit Fortschreiten des Projektes wurden sowohl homogene als auch diskontinuierliche Puffersysteme verwendet und weitere Ergebnisse erzielt. Es wurde kein Vorteil in der Auftrennung während der Elution des Proteins festgestellt. Es wurde beobachtet, dass bei höheren Salzkonzentrationen (ca. > 200 mmol/L) eine Verschlechterung der Linearität der Puffersysteme einsetzt. Dies liegt unter anderem an der Verschiebung der pK_s -Werte in Abhängigkeit von der Ionenstärke. Entsprechende Korrekturen können in der Berechnung durch das Hinzufügen der Aktivitätskoeffizienten erreicht werden. Für diese Berechnungen ist ein diskontinuierliches Puffersystem notwendig (Wittkopp et al., DRAFT). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein homogenes

4 Diskussion

Puffersystem bei höheren Salzkonzentrationen hinsichtlich der Linearität weniger störungsanfällig ist.

4.2 Untersuchung von pH-Gradienten auf starken und schwachen Kationentauschern

In Abschnitt 3.2 wurden homogene und diskontinuierliche pH-Gradienten auf Prototyp Resin 1, einem schwachen Kationentauscher und Prototyp Resin 4, einem starken Kationentauscher, untersucht. Es wurde beobachtet, dass die pH-Gradienten auf den starken Kationentauschern linear verlaufen. Für den schwachen Kationentauscher wurden mehrere Abweichungen festgestellt. Für pH-Gradienten mit konstanter Na^+ -Ionen-Konzentration war der Beginn des pH-Gradienten im Vergleich zum starken Kationentauscher stärker verzögert (siehe Abbildung 15). Für duale Gradienten konnte ein Abfall des pH-Wertes bei Beginn des pH-Gradienten beobachtet werden, der von der Gradientensteigung (siehe Abbildung 16) und von der Ionenstärke (siehe Abbildung 17) abhängig ist. Dies zeigt, dass die Dissoziation des Carboxy-Liganden nicht der Grund für die Abweichungen sein kann. Vielmehr ist der Einfluss der Gegenionen zu nennen. Bei SO_3 -Resins haben beide mögliche Gegenionen H^+ und Na^+ eine ähnliche Affinität zum Resin. Carboxy-Liganden haben hingegen eine höhere Affinität zu H^+ -Ionen (Harland, 1994). Bei Salzgradienten werden H^+ -Ionen mit Na^+ -Ionen als Gegenion ausgetauscht. Dies hat aufgrund der minimalen Konzentration der H^+ -Ionen beim starken Kationentauscher kaum einen Effekt. Schwache Kationentauscher binden vermehrt H^+ -Ionen. Die Freisetzung dieser H^+ -Ionen hat einen größeren Effekt als bei starken Kationentauschern und kann eine mögliche Erklärung für die in Abschnitt 3.2 beobachteten Effekte sein.

Zusammenfassend wird festgehalten, dass duale Gradienten bei schwachen Kationentauschern nicht für Modellierungsexperimente geeignet sind. Die verschiedenen Abweichungen führen zu nicht vorhersagbaren Kombinationen von Ionenstärke und pH-Wert. Für pH-Gradienten bei konstanter Na^+ -Konzentration tritt ebenfalls eine Abweichung in Form einer zusätzlichen Verzögerung auf, jedoch beeinflusst diese nicht die Linearität des Gradienten.

4.3 Methode zur Analyse von Antikörper-Ladungsvarianten

Die in den Abschnitten 2.9 bzw. 3.4.3 beschriebene Methode zur Analyse von mAb-Ladungsvarianten mit Hilfe eines diskontinuierlichen Puffersystems konnte erfolgreich implementiert werden. Während der Entwicklung wurden verschiedene Pufferkapazitäten und Ionenstärken getestet, wobei die gewählte Kombination einen guten Kompromiss zwischen pH-Gradienten-Stabilität und Peaktrennung gewährleistete. Je nach Trennproblematik kann die Gradientenlänge bzw. -steigung so angepasst werden, dass eine geeignete Differenzierung der einzelnen Spezies möglich ist. So wurde bei mAb02 die Länge des Gradienten verlängert.

Mit beiden getesteten Antikörper-Präparaten konnten gute Ergebnisse erzielt werden. Die Analysen ergaben einen signifikanten Anteil an Ladungsvarianten bei beiden Proben. Die Analysenmethode ermöglicht keine Unterscheidung von Sequenzvarianten, den Varianten mit einer tatsächlich unterschiedlichen Aminosäuren-Zusammensetzung und anderen Ladungsvarianten, die beispielsweise durch verschiedene Glykosylierungsmuster entstehen. Weiterhin sind Strukturvarianten denkbar, die aufgrund der unterschiedlichen Tertiärstruktur des Proteins unterschiedliche Retentionszeiten in der Analyse zeigen.

Eine alternative Messmethode wäre die isoelektrische Fokussierung, welche eine Zuordnung des isoelektrischen Punktes ermöglicht. Kapillar-Elektrophoresen bieten hierbei bessere Auflösungen der Peaks als die klassische Gel-Elektrophorese. Zur weiteren Analyse der einzelnen Varianten wäre ebenfalls die Massenspektroskopie geeignet.

4 Diskussion

4.4 Charakterisierung des Donnan-Effektes unter Verwendung des DIX-Modells

4.4.1 Einfluss der Proteinladung auf den Donnan-Effekt

Das DIX-Modell unterscheidet zwischen der Bulk- und Resin-Phase und ermöglicht so die Berechnung der Bedingungen innerhalb der Resin-Poren. Die Grundlage hierfür ist die Bilanzierung der Ladungen zwischen den beiden Phasen (Gleichung (21)) sowie innerhalb der Resin-Phase (Gleichung (23)). Die beteiligten Ladungen sind dabei die Salzionen, die geladenen Liganden des Resins und das geladene Protein. Zur Vereinfachung der Berechnung wurde in Abschnitt 3.5.1 der Einfluss der Ladung des Proteins überprüft. Es zeigt, dass der Einfluss für geringe Salzkonzentrationen größer ist als für hohe. Für beide Salzkonzentrationen ist der Einfluss bei Proteinkonzentrationen von 1 mg/mL vernachlässigbar. Die Modellierungsversuche wurden mit Konzentrationen von < 1 mg/mL durchgeführt. Die Vereinfachung der Vernachlässigung der Ladung der Proteine hat so keinen Einfluss. Die Berechnungen ergaben, dass auch für hohe Proteinkonzentrationen von 150 mg/mL der Einfluss auf den r_D -Wert gering ist.

4.4.2 Berechnung der Bedingungen der Resin-Phase

Das DIX-Modell ermöglicht die Berechnung von Na^+ -Konzentrationen und pH-Werten innerhalb der Resin-Phase. Diese bestimmen den Dissoziationsgrad der Liganden. So entsteht ein komplexer Zusammenhang zwischen Ligandendichte, pH-Wert und Na^+ -Konzentration. Die Berechnungen zeigten unterschiedliche Bedingungen der Resin-Phase und der Bulk-Phase (siehe Abschnitt 3.5). Der Donnan-Effekt führt bei Verwendung eines Kationentauschers zur Akkumulation von Kationen, also Na^+ -Ionen und H^+ -Ionen (siehe Abbildung 25). Die zusätzliche Aufnahme von Cl^- -Ionen verstärkt diesen Effekt.

Für die Na^+ -Ionen in der Resin-Phase wurden Konzentrationsunterschiede festgestellt, die maximal der Konzentration der Liganden entsprechen. Umgekehrt entspricht die minimale Na^+ -Konzentration der Ligandendichte (siehe Abbildung 26). Im SD-Modell wird die Annahme getroffen, dass die Na^+ -Konzentration der Ligandendichte entspricht (Helfferich, 1962). Die Berechnungen zeigen, dass diese Annahme nur zutrifft, wenn die Na^+ -Konzentration der Bulk-Phase gegen null geht. Für höhere

4 Diskussion

Salzkonzentrationen ist die Na^+ -Konzentration der Resin-Phase größer als die Ligandendichte. Die Berechnungen zeigen weiterhin, dass der pH-Wert der Resin-Phase immer geringer als der pH-Wert der Bulk-Phase ist (siehe Abbildung 27). Unter den in diesem Projekt verwendeten Na^+ -Konzentrationen kann dieser Unterschied bis zu einer pH-Einheit entsprechen. Für niedrige Na^+ -Konzentrationen bzw. für Resins mit höheren Ligandendichten kann dieser Unterschied weiter ansteigen. Die Annahme des SD-Modells, die pH-Werte beider Phasen gleichzusetzen, kann so zu starken Unterschieden zwischen dem SD-Modell und dem DIX-Modell führen.

Die Berechnungen verdeutlichen die Unterschiede des SD-Modells und des DIX-Modells hinsichtlich der Konzentrationen der beteiligten Ionen. Dies ist für die Gegenionen, Na^+ -Ionen und H^+ -Ionen und für die Co-Ionen, Cl^- -Ionen und OH^- -Ionen, gültig. Die Aufnahme an Cl^- -Ionen wird im SD-Modell vernachlässigt, was einer der Unterschiede der beiden Modelle ist (Helfferich, 1962). Die Untersuchungen zeigen, dass für die Verteilung von Proteinen zwischen Bulk- und Resin-Phase unterschiedliche Ergebnisse der beiden Modelle zu erwarten sind.

4.5 Modellierung der Trennung von Antikörper-Monomer, -Dimer und -Aggregaten unter der Verwendung des SD-Modells und DIX-Modells

Die Trennung von Antikörper-Monomer, -Dimer und –Aggregaten konnte mit dem SD-Modell (Abbildung 29) und mit dem DIX-Modell (Abbildung 30) erfolgreich beschrieben werden. Für beide Modelle wurde eine sehr gute Korrelation zwischen den experimentellen Daten und den mathematischen Kurven erreicht. Jedoch wurde während der Bestimmung der Parameter bei beiden Modellen festgestellt, dass die Anzahl an Datenpunkten nicht ausreichend sein könnte. Dies kann durch eine starke Variation der Modellparameter nach dem Curve Fit beobachtet werden. Das Ergebnis ist stark von den vorgegebenen GUESS-Werten abhängig und so nur eingeschränkt reproduzierbar. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass in dem vorhandenen Datensatz nur pH-Gradienten verwendet wurden, weshalb für die weiteren Datensätze auch Elutionsdaten aus Salzgradienten hinzugefügt wurden (siehe Abschnitt 3.7 und 3.8).

Der Vergleich der Auswertungen des SD-Modells und des DIX-Modells ergaben, dass beide Modelle verschiedene Werte für die gleichen Parameter berechnen. Dies ist für die beiden Gibbs-Enthalpien und für den ν -Wert gültig. Dieses Ergebnis ist zu erwarten, da beide Modelle unterschiedliche Annahmen enthalten, die Auswirkungen auf das Ergebnis haben. Auch die Definition einiger Parameter, wie beispielsweise der Ligandendichte, ist unterschiedlich.

Die Auswertung der Daten zeigt jedoch, dass das einfachere SD-Modell für die Beschreibung der Daten des starken Kationentauschers ausreicht. Die komplexeren Berechnungen des DIX-Modells ergeben keinen Vorteil bei der Korrelation der Daten, da sie vor allem bei der Ligandendichte unterschiedlich sind und diese für den starken Kationentauscher konstant sind.

4 Diskussion

4.6 Modellierung von Carboxy-, SO_3^- - und gemixten Kationentauschern

Die Modellierung von Carboxy-haltigen Resins war der Hauptbestandteil dieser Arbeit. Anhand dieses Datensatzes wurde das erweiterte DIX-Modell und dessen verschiedene Variationen entwickelt. Das Ziel dabei war die korrekte Beschreibung von schwachen Liganden.

4.6.1 Modellierung der Daten mit dem SD-Modell

Die Modellierung des Datensatzes mit dem SD-Modell wurde am Anfang der Untersuchungen durchgeführt. Abbildung 33 zeigt den Vergleich der Modellierungen von Prototyp Resin 1 und 4. Wie bereits in bei der Trennung der mAb05 Aggregate und Fragmente in Abschnitt 3.6, wird bei Anwendung des SD-Modells für den starken Kationentauscher eine gute Übereinstimmung zwischen experimentellen Daten und dem Modell erhalten. Im Gegensatz dazu ist es mit dem Modell nicht möglich, den Datensatz des schwachen Kationentauschers zu beschreiben. In mehreren Variationen des Modells wurde im Anschluss versucht, die Regression zu verbessern. So wurde beispielsweise der Parameterraum vergrößert. Die Beschreibung der GH_{pH} - bzw. GH_{Salz} -Daten ist ausschließlich durch eine sehr hohe Anzahl an Carboxy- und Amin-haltigen Aminosäuren möglich. Dieses Ergebnis stimmte nicht mit den v -Daten der doppellogarithmischen Auswertung $\log(\text{GH}_{\text{Salz}})/\log(c_{\text{s, elu}})$ überein (Schmidt et al., 2014). Daraufhin wurden weitere Variationen, wie beispielsweise eine Veränderung des pK_s -Werts des Liganden oder der Aminosäuren, untersucht. Auch wurde die Beschreibung der Ligandendichte durch den Ansatz von Pabst et al. getestet (Pabst und Carta, 2007). Keine dieser Veränderungen führte zur einer Verbesserung der Regression.

Zusammenfassend wird festgehalten, dass das SD-Modell nicht für die Modellierung von schwachen Liganden geeignet ist. Der Grund dafür ist die Annahme des Modells, dass der pH-Wert am Liganden (Resin Phase) dem des Puffers (Bulk Phase) entspricht. Ein wichtiger Parameter der Modellierung ist die Ligandendichte, welche bei einem schwachen Kationentauscher von dem Dissoziationsgrad des Liganden abhängig ist. Da der Dissoziationsgrad vom pH-Wert in der Resin-Phase abhängig ist, kann dieser durch die Annahme des Modells nicht korrekt beschrieben werden.

4 Diskussion

4.6.2 Modellierung der Daten mit dem DIX-Modell und dessen Herleitung

Durch die Schlussfolgerungen aus der Modellierung mit dem SD-Modell wurde ein Modell benötigt, welches die Resin- und Bulk-Phasen einer Chromatographiesäule unterscheidet. In der Literatur werden zahlreiche Ansätze zur Beschreibung des Donnan-Effektes beschrieben. Zu Beginn wurde das SD-Modell mit einer vereinfachten Herleitung des Donnan-Potentials verknüpft (Cantor und Schimmel, 1980). Eine stringente Herleitung wurde von Jansen et al. in Form des von ihnen benannten DIX-Modells veröffentlicht (Jansen et al., 1996). Das Modell wurde im Rahmen dieser Arbeit auf die Trennung von Proteinen erweitert, was ein zentrales Arbeitspaket dieser Dissertation darstellt (Wittkopp et al., 2018). Die Gleichungen von Jansen et al. wurden durch Parameter erweitert, welche die Konzentration und Ladung des Proteins beschrieben. Dadurch wurde die Veränderung des Donnan-Potentials in Abhängigkeit der Proteinladung implementiert.

Die anschließende Anwendung der Gleichungen zeigte, dass aufgrund zahlreicher Abhängigkeiten von verschiedenen Parametern vom pH-Wert das Gleichungssystem nicht direkt gelöst werden kann. Durch iterative Berechnungen wurde gezeigt, dass der Einfluss der Proteinladung auf das Donnan-Potential vernachlässigbar ist (siehe Abschnitt 4.4.2). Dies vereinfacht das benötigte Gleichungssystem, jedoch ist eine direkte Lösung weiterhin nicht möglich. Der Grund dafür ist die Abhängigkeit des Donnan-Potentials von der Ligandendichte, welche abhängig vom pH-Wert der Resin-Phase ist. Letzteres kann nur mit dem Donnan-Potential berechnet werden. Es wurde eine Iteration der Ligandendichte und des r_D -Wertes in das Modellierungsprogramm eingefügt, was eine verlängerte Berechnungszeit verursacht, weshalb eine Auswertung mit dem DIX-Modell im Vergleich zum SD-Modell einen größeren zeitlichen Rahmen beansprucht.

Die Auswertung der Daten mit dem DIX-Modell zeigt, dass die Berücksichtigung der Bedingungen der Resin-Phase im Vergleich zum SD-Modell zu einer Verbesserung der Regression des Prototyp Resins 1 führen (siehe Abbildung 34). Dies ist ebenfalls für die anderen Carboxy-haltigen Prototyp Resins 2 und 3 gültig. Das DIX-Modell liefert eine ausreichend gute Beschreibung der Ligandendichte-Abhängigkeit unter der Verwendung von nur einem pK_s -Wert für den Liganden. Wie bereits in Abschnitt 3.6.3 dargestellt, ist auch die Beschreibung eines starken Kationentauschers möglich. Dies

4 Diskussion

zeigt, dass das DIX-Modell in der Lage ist, eine Zusammensetzung aus COO- und SO₃-haltigen Resins zu beschreiben.

Die Ergebnisse der Modellierung zeigen, dass beim SD-Modell und DIX-Modell unterschiedliche Werte der Gibbs-Enthalpien erzielt werden. Dies ist auf die unterschiedliche Herleitung und verschiedene Annahmen zurückzuführen. Während der verschiedenen Auswertungen des Datensatzes mit dem DIX-Modell wurde für den $\Delta G_p^0/RT$ -Wert und auch für den $\Delta G_s^0/RT$ -Wert ein linearer Zusammenhang ermittelt. Durch das gezielte Auswählen von Fit-Ergebnissen ist es möglich, diesen linearen Zusammenhang zu erhalten, ohne die Regression in einer signifikanten Größenordnung zu verschlechtern. Für das finale Ergebnis wurde auf eine Selektion der Ergebnisse verzichtet, da dieser lineare Zusammenhang Spekulation ist. Aus diesem Grund wurden die jeweils besten Ergebnisse für jedes Resin statistisch ausgewertet (siehe Abbildung 35). Auffällig ist das Ergebnis von Resin 2, welches nicht dem allgemeinen Trend folgt. Dieser Trend ist kein Artefakt der Auswertung, da bereits in den experimentellen Daten Resin 2 Auffälligkeiten zeigt (siehe Abbildung 32). Der Grund für die Abweichungen konnte nicht abschließend geklärt werden. Es wird jedoch vermutet, dass das DIX-Modell von einem homogenen Donnan-Potential, also einer homogenen Verteilung an Liganden, ausgeht. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten bei der Synthese von COO- und SO₃-Liganden könnte es sein, dass dies, insbesondere für Resins mit geringen Anteilen, nicht gegeben ist. Auch eine unterschiedliche Qualität der Packung oder allgemeine Abweichungen in der Synthese des Resins könnten Faktoren darstellen.

4.6.3 Berechnung der Retentionszeit von gemixten Resins

Der lineare Trend der Gibbs-Enthalpien war der Ausgangspunkt für Überlegungen, ob eine Berechnung gemixter Resins auf Basis der Parameter der jeweiligen COO- und SO₃-Resins möglich ist. Hierfür wurde ein von Melis et al. publiziertes Modell für die Bindung von Ionen an zwei unterschiedliche Liganden verwendet (Melis et al., 1995). Die Anwendung auf die Chromatographie von Proteinen ist dabei ein besonderer Fall, da Proteine, im Gegensatz zu Ionen, eine pH-abhängige, multiple Ladung besitzen. Im DIX-Modell wird diese Ladung durch den ν -Wert reflektiert, welcher die Anzahl an effektiven Austauschladungen beschreibt. Die Auswertung mit dem DIX-Modell ergab, dass der ν -Wert für die Prototyp Resins 1 bis 4 unterschiedlich ist (siehe Abbildung 36).

4 Diskussion

Das Melis Modell beschreibt eine lineare Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten von der jeweiligen Zusammensetzung der Liganden (siehe Gleichung (78)). Für die Anwendung des DIX-Modells muss die Gleichgewichtskonstante in ihre drei Bestandteile $\Delta G_p^0/RT$ -Wert, $\Delta G_s^0/RT$ -Wert und ν -Wert aufgeteilt werden. Dabei wurde festgestellt, dass nur die Summe aus $\Delta G_s^0/RT$ -Wert und ν -Wert für gemixte Resins berechnet werden kann. Eine getrennte Beschreibung des $\Delta G_s^0/RT$ -Werts ist nur möglich, wenn der ν -Wert bekannt ist. Dies ist entweder der Fall, wenn der ν -Wert sich zwischen den gemixten und reinen Resins nicht unterscheidet oder der ν -Wert bereits zuvor bestimmt wurde. So ist bei einem separaten ν -Wert keine Berechnung von beliebigen Liganden-Zusammensetzungen möglich.

Um das Problem zu lösen, wurden zahlreiche Fits mit dem Ziel durchgeführt, einen gemeinsamen ν -Wert für alle vier Resins zu bestimmen. Dies konnte nur mit einer nicht akzeptablen Verschlechterung der Regression erreicht werden. Die Auswertung mit dem Melis Modell erfolgte schließlich mit den ν -Werten aus der DIX-Auswertung. Die Beschreibung der gemixten Resins ist mit Einschränkungen der Regression möglich. Eine Verbesserung konnte durch erneutes Anpassen des ν -Wertes erreicht werden.

Das Ergebnis zeigt, dass das Melis Modell unter Einschränkungen für die Berechnung der gemixten Resins geeignet ist. Eine Vorhersage von nicht zuvor gemessenen Liganden-Zusammensetzungen ist jedoch nicht möglich, da eine Voraussage des ν -Wertes nicht möglich ist.

4.6.4 Simulation von Chromatogrammen

Im Anschluss an die Modellierung erfolgte die Simulation von Chromatogrammen unter Verwendung der bestimmten Parameter und eines *Lumped-Rate* Modells. Zu Beginn wurden die Chromatogramme des Datensatzes simuliert, die für die Bestimmung der Modellparameter verwendet wurden. Diese Rückprobe zeigt, ob die durchgeführten Berechnungen korrekt und die getroffenen Annahmen vertretbar sind. Das Ergebnis in Abbildung 42 zeigte, dass die simulierten Chromatogramme in allen Fällen mit den experimentellen Daten übereinstimmten. Das erweiterte DIX-Modell führt zum richtigen Ergebnis und die Modellparameter reflektieren die experimentellen Daten. Das verwendete *Lumped-Rate* Modell bildet die Chromatogramme in ausreichender Qualität ab, auch wenn dieser Ansatz vereinfacht ist. Die Verwendung eines

4 Diskussion

komplexeren *General-Rate* Modell ist nicht notwendig (Schmidt-Traub et al., 2012). Die bestimmten Massentransferkoeffizienten unterschieden sich in Abhängigkeit des Elutions-pH-Wertes und der Ionenstärke. Eine Vorhersage dieser Werte über die Korrelation zum HETP-Wert ist möglich, wurde aber in diesem Zusammenhang nicht durchgeführt (Hedrich et al., DRAFT).

Im Anschluss wurden die Prozessparameter pH-Wert und Ionenstärke variiert und ein dualer Gradient berechnet. Die Experimente aus Abbildung 43 zeigten, dass für das Carboxy-haltige Resin 2 und für den starken Ionentauscher Resin 4 die experimentellen Daten durch die Simulation dargestellt werden konnten. Die durch die COO-Liganden verursachte Verzögerung des Startes des pH-Gradienten wurde in mehreren Experimenten beobachtet (siehe Abschnitt 3.2 und 3.8.7) und kann durch das Anpassen der Simulation abgebildet werden. Das Ergebnis zeigt, dass die Modellparameter innerhalb des kalibrierten Bereiches beliebige Kombinationen an pH-Wert und Salzkonzentration abbilden können. Dies bestätigt die Konsistenz des entwickelten DIX-Modells.

4.7 Modellierung der Trennung von Antikörper-Ladungsvarianten auf Carboxy- und SO₃-Tauschern

Nachdem das DIX-Modell in den Abschnitten 3.6 und 3.7 erfolgreich angewendet wurde, wurde das Modell auf die Trennung von Ladungsvarianten übertragen. Der verwendete mAb02-Antikörper besteht aus mehreren Ladungsvarianten, wobei in einer präparativen Trennung drei Hautspezies gezeigt wurden (siehe Abbildung 44). Die drei Hautspezies wurden in einem Vorversuch getrennt, wobei jede Fraktion aus mehreren Spezies zusammensetzt ist (siehe Abbildung 45). Die drei Varianten wurden separat in den Modellierungsexperimenten untersucht. Die Experimente wurden zum Vergleich auf Eshmuno® CPX und Prototyp Resin 1 durchgeführt, wobei pH-Gradienten und Salzgradienten für die Elution verwendet wurden.

4.7.1 Modellierung der experimentellen Daten des Eshmuno® CPX unter der Verwendung des SD-Modells

In einem ersten Schritt wurden die experimentellen Daten der Auftrennung der Ladungsvarianten auf Eshmuno® CPX mit dem SD-Modell korreliert. Der Datensatz konnte durch das SD-Modell gut beschrieben werden und die Korrelation lieferte eine sehr gute Regression (siehe Abbildung 46). Der $\Delta G_s^0/RT$ -Wert konnte für alle drei Ladungsvarianten gemeinsam beschrieben werden ohne die Qualität der Regression zu beeinflussen (siehe Tabelle 24). Für den $\Delta G_p^0/RT$ -Wert wurde ein Trend mit abnehmenden Werten von Variante 1 zu 3 beobachtet. Der ν -Wert wurde mit den Werten aus der $\log(GH_{\text{Salz}})/\log(c_{s,\text{elu}})$ -Auswertung korreliert, was die Variabilität der bestimmten Parameter reduziert.

Die Auswertung zeigte, dass für die Beschreibung der experimentellen Daten das SD-Modell sehr gut geeignet ist. Das SD-Modell hat im Gegensatz zum DIX-Modell den Vorteil, dass es durch das Hinzufügen einiger Parameter in das SMA Modell übergeht. Auf diese Weise können auch hohe Proteinbeladungen außerhalb des linearen Isothermen Bereiches berechnet werden. Aus diesem Grund wurde diese Auswertung mit dem SD-Modell für die weitere Arbeit in studentischen Projekten verwendet, die beispielsweise hohe Proteinbeladungen und den Scale-Up untersuchten ((Hedrich et al., DRAFT), siehe auch Lab Project Jan Hedrich, Bachelorarbeit Carolin Stange und Masterarbeit Felix Seelinger).

4 Diskussion

4.7.2 Modellierung der experimentellen Daten des Eshmuno® CPX unter der Verwendung des DIX-Modells

Zum Vergleich der Modellierung mit dem SD-Modell wurde der Datensatz des Eshmuno® CPX ebenfalls mit dem DIX-Modell ausgewertet. Die Korrelation der Daten zeigte eine vergleichbar gute Regression im Vergleich zum SD-Modell (siehe Abbildung 47). Wie im SD-Modell konnte der $\Delta G_s^0/RT$ -Wert für alle drei Varianten gemeinsam beschrieben werden, er war jedoch niedriger. Auch der $\Delta G_p^0/RT$ -Wert wurde im Vergleich zum SD-Modell niedriger ermittelt, variierte jedoch zwischen den einzelnen Varianten weniger stark. Ähnliche Tendenzen der Gibbs-Enthalpien wurden bereits beim Vergleich der Modelle in Abschnitt 3.7 beobachtet.

Der Unterschied der Gibbs-Enthalpien muss durch eine entsprechende Änderung der Anzahl am Austausch beteiligter Aminosäuren ausgeglichen werden. Der Vergleich der ν -Werte in Abbildung 48 bestätigt dies. Die ermittelten ν -Werte des SD-Modells sind allgemein niedriger und unterscheiden sich untereinander weniger als die des DIX-Modells. Für beide Modelle wurden jedoch die größten Unterschiede im Bereich von pH 6,0 bis 7,5 gezeigt.

Die Kombination der ermittelten Modellparameter ermöglicht die Berechnung der Gleichgewichtskonstante K_{eq} . Der Vergleich der Werte der beiden Modelle in Abbildung 49 zeigt, dass die Modelle unterschiedliche Werte berechnen. Bei der Berechnung des Verteilungskoeffizienten (siehe Abbildung 50) hat dieser jedoch einen ähnlichen Verlauf. Die Erklärung hierfür ist, dass für die Berechnung des Verteilungskoeffizienten ebenfalls die Salzkonzentration in der Resin-Phase und der ν -Wert benötigt wird. Da sich hier die Modelle in den Werten unterscheiden, muss auch die Gleichgewichtskonstante unterschiedlich sein.

Der Vergleich der Modelle bestätigte die Ergebnisse der Modellierungen aus den Abschnitten 3.6 und 3.7 und die Aussage, dass für die Modellierung von Daten starker Kationentauscher das SD-Modell als auch das DIX-Modell geeignet sind. Aufgrund der geringeren Komplexität des SD-Modells und der Möglichkeit der Berechnung hoher Proteinkonzentrationen über die Erweiterung zum SMA Modell ist die Anwendung des SD-Modells geeigneter.

4 Diskussion

4.7.3 Modellierung der experimentellen Daten von Prototyp Resin 1 unter der Verwendung des DIX-Modells

In Abschnitt 3.7 wurde gezeigt, dass das SD-Modell nicht für die Modellierung von schwachen Kationentauschern geeignet ist, weshalb der mAb02-Datensatz nur mit dem DIX-Modell beschrieben wurde. Das Ergebnis der Korrelation in Abbildung 51 zeigt eine gute Regression zwischen den Modellkurven und der experimentellen Daten. Auch für Prototyp Resin 1 konnte der $\Delta G_s^0/RT$ -Wert für alle drei Varianten gemeinsam beschrieben werden (siehe Tabelle 26) und für den $\Delta G_P^0/RT$ -Wert ein abnehmender Wert von Variante 1 zu 3 ermittelt werden. Der $\Delta G_P^0/RT$ -Wert war im Vergleich zum Eshmuno® CPX höher, was die Ergebnisse der Tendenzen der Gibbs-Enthalpien zwischen schwachen und starken Kationentauschern aus Abschnitt 3.7 bestätigt. Der Vergleich der ν -Werte zeigt für Prototyp Resin 1 kleinere Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten. Der allgemeine Trend von steigenden Werten von saurer Spezies zur basischen Spezies hin bleibt jedoch erhalten. Die unterschiedlichen Werte der Modellparameter führen zu unterschiedlichen Abhängigkeiten von K_{eq} , was die Ergebnisse aus Abschnitt 3.7 bestätigen (vgl. Abbildung 54 und Abbildung 37).

Die Unterschiede der Trennung der Ladungsvarianten zwischen Prototyp Resin 1 und Eshmuno® CPX wurden neben den Modellparametern auch in den Salzkonzentrationen bzw. pH-Werten der Elutionspeak-Maxima sichtbar (Abbildung 53). Eshmuno® CPX bindet im oberen pH-Bereich alle drei Ladungsvarianten stärker als Prototyp Resin 1 (Abbildung 53 A). Bei pH 5 ist dieser Trend umgekehrt und Prototyp Resin 1 hat die deutlich stärkere Bindung (Abbildung 53 B). Dies lässt den Schluss zu, dass die Dissoziation des COO-Liganden die Bindung des Proteins verstärkt, was möglicherweise durch entstehende hydrophobe Wechselwirkungen verursacht wird. Entsprechende Versuche wurden innerhalb des Projektes von betreuten Studenten durchgeführt und bestätigen diese Vermutung (siehe Bachelorarbeit David Wohlfahrt).

Der Vergleich der Elutionspeak-Maxima zeigt, dass die Abstände der Peakspitzen bei Eshmuno® CPX größer ist, vor allem im Bereich von pH 6 bis 7. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass Eshmuno® CPX für die Auftrennung der mAb02-Ladungsvarianten geeigneter ist. Eingeschränkt wird diese Aussage durch die nicht evaluierten Peakformen, welche ebenfalls von der Salzkonzentration abhängig sind (Hedrich et al., DRAFT).

4 Diskussion

4.7.4 *In silico* Simulation und Optimierung der Trennung der drei mAb02-Ladungsvarianten auf Prototyp Resin 1

Mit den Ergebnissen der Modellierung von mAb02 auf Prototyp Resin 1 aus Abschnitt 3.8.5 wurden Simulationen durchgeführt. Das Ziel war die Definition der Prozessparameter für die beste Trennung der Ladungsvarianten. Die Optimierung erfolgte anhand der Unterschiede in den Elutionspeak-Maxima. Der Einfluss der Änderung der Peakform konnte nicht untersucht werden, da zu diesem Zeitpunkt und für diesen Datensatz keine Berechnung der Massentransferkoeffizienten verfügbar waren. Diese wurde am Ende des Projektes anhand des Datensatzes für Eshmuno® CPX entwickelt (Hedrich et al., DRAFT).

Bereits die Auswertung der Retentionsdaten zeigte, dass eine Trennung der Ladungsvarianten im Bereich von pH 6 bis 7 möglich ist. Diese bestätigte die Simulation von Salzgradienten bei verschiedenen pH-Werten (siehe Abbildung 55). Die beste Trennung konnte bei pH 7 beobachtet werden, wobei die Trennung durch eine geeignete Wahl an Salzkonzentrationen in Puffer A und B optimiert werden kann. Gleiche Bedingungen wurden ebenfalls für die Herstellung der Probe für die Modellierung verwendet (siehe Abbildung 44). Ein Nachteil ist die geringere Bindekapazität nahe des isoelektrischen Punktes des Proteins, weshalb sich diese Bedingungen nicht für Produktionsmaßstäbe eignen.

Die Bindekapazität wird allgemein für Kationentauschern bei niedrigeren pH-Werten erhöht. Aus diesem Grund wurden in einem nächsten Schritt pH-Gradienten bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen untersucht, wobei vergleichbar gute Trennungen erreicht wurden (siehe Abbildung 56). Der große Vorteil ist, dass das Protein bei niedrigen pH-Wert gebunden wird, jedoch die Trennung bei höheren pH-Werten erfolgt und somit in einem pH-Bereich, indem die Varianten unterschiedlich sind. Die beste Trennung konnte bei einer Salzkonzentration von 75 mmol/L erreicht werden. Da sich die Trennung für niedrigere als auch für höhere Salzkonzentrationen verschlechtert, gibt es ein Optimum für die Trennung, welches nicht möglichst nahe am isoelektrischen Punkt ist, wie teilweise in Publikationen gezeigt (Khawli et al., 2010). Auch der Vergleich der Retentionsdaten aus der Modellierung lässt diese Schlussfolgerung zu (Abbildung 53).

Der nächste Schritt zur Optimierung der Trennung war die Kombination aus Salzgradienten und pH-Gradienten zu dualen Gradienten. Auf diese Weise kann der

4 Diskussion

Elutions-Zeitpunkt innerhalb des pH-Gradienten auf einen beliebigen pH-Wert eingestellt werden. Es wurde beobachtet, dass bei Prototyp Resin 1 antiparallele Gradienten zu besseren Auflösungen führen als reine pH- oder Salzgradienten (siehe Abbildung 57). Durch die Anpassung des pH-Wertes von Puffer A und B kann die Trennung auf den gesamten pH-Gradienten ausgedehnt und so die Trennung optimiert werden. Dieser Vorteil dualer Gradienten wurde bereits in der Literatur beschrieben (Lee et al., 2015).

Im Anschluss an die Simulation erfolgten zwei verifizierende Experimente, wobei sowohl der optimierte, duale Gradient als auch eine hieraus entsprungene Stufenelution untersucht wurde. Die experimentellen Daten des dualen Gradienten zeigten, dass für die saure Variante und auch für die basische Variante kleine Abweichungen der Elutionspeak-Maxima entstehen (siehe Abbildung 58 A). Der Grund für die Abweichungen könnte der verzögerte Start des pH-Gradienten im Vergleich zum Salzgradienten sein. Ähnliche Effekte wurden bereits in Abbildung 15 beobachtet. Eine Lösung könnte die Berechnung der Verteilung der Puffersubstanzen innerhalb der Bulk- und Resin-Phase sowie die Aufnahme in die Simulationsdatei sein, wobei die Puffersubstanzen zuerst charakterisiert werden müssen. Auch ein Einfluss der unterschiedlichen Selektivität zwischen starken und schwachen Ionentauschern kann nicht ausgeschlossen werden. In diesem Projekt wurden alle Selektivitäten einheitlich auf 1 gesetzt, was möglicherweise für einen schwachen Kationentauscher nicht geeignet ist. Da die Selektivitäten abhängig von der Ligandendichte und somit auch vom Dissoziationsgrad schwacher Kationentauscher sind, ist eine Bestimmung komplex (Gregor und Bregman, 1951). Die unterschiedlichen Selektivitäten könnten auch der Grund für die Austauscheffekte sein, die in der Stufenelution beobachtet wurden (siehe Abbildung 58 B). Eine Reduktion der Na^+ -Konzentration führte hier zu einem mehrstufigen Anstieg des pH-Wertes. Die Effekte konnten durch die Anpassung der Simulation ausgeglichen und so die Regression des UV-Signals verbessert werden, jedoch ist eine Optimierung ohne verifizierende Experimente auf dieser Stufe des Modells nicht möglich, da die Abweichungen nicht in der initialen Simulation berücksichtigt sind. Das DIX-Modell stellt jedoch eine gute Grundlage für die möglicherweise nötigen Erweiterungen in der Abhängigkeit der Selektivität und der Berücksichtigung der Puffersubstanzen dar.

4.8 Modellierung von Carboxy-Mixed-Mode-Tauschern mit unterschiedlicher Aminosäure-Modifikation

Die Kombination des entwickelten DIX-Modells und dessen Gleichungen zur Beschreibung des Donnan-Effektes mit einem Modell für Mixed-Mode (MM)-Chromatographie stellt den Abschluss und einen möglichen Ausblick dieser Arbeit dar. In den Kapiteln 3.7 und 3.8 wurde gezeigt, dass das entwickelte DIX-Modell vor allem für die Modellierung von schwachen Liganden geeignet ist. Die meisten kommerziell erhältlichen Mixed-Mode Materialien beinhalten Carboxylgruppen, weshalb auch hier die Einführung des Donnan-Effektes sinnvoll ist. Der Datensatz für die Modellierung mit dem Mixed-Mode Modell bestand aus vier Resins mit jeweils sechs pH-Gradienten bei unterschiedlicher Salzkonzentration und drei Salzgradienten bei unterschiedlichen pH-Wert. Die Resins wurden systematisch mit gleichen Liganden und unterschiedlicher Ligandendichte bzw. gleicher Ligandendichte und unterschiedlichem Liganden ausgesucht.

4.8.1 Modellierung mit Salz- und pH-abhängigen K_s -Wert und einem n-Wert pro Resin

In der ersten gezeigten Auswertung wurde der K_s -Wert für jede Bedingung individuell beschrieben und der n-Wert für jedes Resin vereinheitlicht. Die Graphen und die bestimmten Parameter sind in Abbildung 59 bzw. Abbildung 60 dargestellt. Die Auswertung zeigt, dass die Regression zwischen den experimentellen Datenpunkten und den Modellkurven sehr gut ist. Während der Auswertung wurde festgestellt, dass die Variabilität der bestimmten Parameter sehr groß ist, was in Abbildung 60 erkennbar ist. Parameter, wie der $\Delta G_p^0/RT$ -Wert und der n-Wert, sind zwischen den Resins unterschiedlich und es ist kein Trend ermittelbar. Die große Variabilität der Parameter ist besonders ausgeprägt in den ermittelten K_s -Werten. Die Kurven der einzelnen Resins sind hier sowohl in der Höhe als auch im allgemeinen Trend für deren Relation zur Salzkonzentration als auch zum pH-Wert unterschiedlich. Dies ist erstaunlich, da der K_s -Wert von der stationären Phase unabhängig sein sollte (Nfor et al., 2010). Auch die bestimmten Abhängigkeiten für den Verteilungskoeffizienten für Prototyp Resin 6 und 9 zeigen, dass die Auswertung nicht die Realität widerspiegelt. Die Kurven sind ineinander verschoben und weisen nicht den theoretischen Verlauf in Form einer „U-Kurve“ auf, welche für sinkende pH-Werte nach oben verschoben ist (Lee et al., 2017a). Die Auswertung zeigt, dass eine individuelle Beschreibung des K_s -wertes nur bedingt möglich ist. Dies liegt vor allem daran, dass der Einfluss des K_s -wertes und

4 Diskussion

des n -Wertes auf die $\text{GH}_{\text{pH/pH}}$ - bzw. $\text{GH}_{\text{Salz/Salz}}$ -Konzentration-Kurven Auswirkungen haben. Aus diesem Grund ist eine Vielzahl an Kombinationen beider Parameter möglich, die mit Hilfe des vorhandenen Datensatzes nicht unterschieden werden können. Eine Lösung für dieses Problem wären Datenpunkte bei sehr hohen Salzkonzentrationen, bei denen ionische Wechselwirkungen vernachlässigbar sind und ausschließlich hydrophobe Wechselwirkungen stattfinden. Die Aufnahme dieser Daten ist jedoch schwierig und reflektiert nicht den üblichen Arbeitsbereich von Mixed-Mode-Resins.

4.8.2 Modellierung mit globalen K_s -Wert und Salz- und pH-abhängigen n -Wert

Aufgrund der gesammelten Erkenntnisse aus der ersten Auswertung wurde die Bestimmung der Modellparameter verändert. Der K_s -Wert wurde global für alle Resins beschrieben, was die Variabilität der einzelnen Parameter und die Unterschiede zwischen den einzelnen Resins verringern sollte. Anstelle individueller K_s -Werte wurden nun individuelle n -Werte bestimmt. Das Ergebnis der Regression ist in Abbildung 61 gezeigt. Es wurde beobachtet, dass die Regression durch die Veränderung der individuellen Parameter nicht verschlechtert wird. Ein Vorteil zeigt sich bei den bestimmten Modellparametern, welche in Abbildung 62 zusammengefasst wurden. Sowohl beim $\Delta G_s^0/RT$ -Werte als auch für den $\Delta G_p^0/RT$ -Wert wurden ähnliche Parameter mit allgemeinen Trends bestimmt. So ist der $\Delta G_p^0/RT$ -Wert für alle Prototypen sehr ähnlich und der $\Delta G_s^0/RT$ -Werte unterscheidet sich nur zwischen den Valin-Resins 6 bis 8 und dem Leucin-Resin 9. Auch die v -Kurven sind sehr ähnlich, was mit der Annahme übereinstimmt, dass der v -Wert im DIX-Modell keine Interaktion mit dem Resin beschreibt, sondern die Ladung des Proteins in der Resin-Phase widerspiegelt (Wittkopp et al., 2018). Bei den bestimmten n -Werten zeigt diese Auswertung unterschiedliche Verläufe im Gegensatz zu den Werten der individuellen K_s -Werte. So ist die Abhängigkeit in Relation zur Salzkonzentration für alle Prototypen sehr ähnlich und in Form einer „U-Kurve“. Bei der Abhängigkeit zur Salzkonzentration ist bis auf den Wert von pH 5 des Resins 9 eine konstante Abhängigkeit zu erkennen. Diese Verläufe lassen die Schlussfolgerung zu, dass eine salzabhängige Beschreibung des n -Wertes in Form einer empirischen Gleichung möglicherweise erreichbar wäre. Dies wurde in der darauffolgenden Auswertung untersucht. Auch bei den bestimmten Abhängigkeiten für den Verteilungskoeffizienten zeigt diese Auswertung Kurvenverläufe, die mit der Theorie übereinstimmen. Für pH 5 wurden „U-

4 Diskussion

Kurven“ bestimmt, was auf eine Bindung des Proteins bei Salzkonzentrationen > 3 mol/L hindeutet. Diese Bereiche der Graphen sind nur unter Vorbehalt gültig, da in diesem Bereich keinerlei Datenpunkte existieren und es sich um eine Voraussage mithilfe unter niedrigerer Salzkonzentration bestimmter Parameter handelt.

4.8.3 Modellierung mit globalen K_S -Wert und empirischer Beschreibung des n -Wertes

Für die Anwendung der bestimmten Modellparameter in einer Simulation ist es notwendig, jeden Modellparameter in Abhängigkeit der variablen Prozessparameter, wie beispielsweise des pH-Wertes und der Salzkonzentration, beschreiben zu können. So ist eine individuelle Beschreibung der n -Werte wie in der vorherigen Auswertung ungeeignet, wenn anschließend Prozessparameter optimiert werden sollen. Infolgedessen wurde eine weitere Auswertung durchgeführt, in der der n -Wert mit Hilfe der empirischen Gleichung (83) beschrieben wurde. Die Gleichung beschreibt die Abhängigkeit des n -Wertes von der Salzkonzentration. Gleichzeitig wird die Annahme getroffen, dass der n -Wert vom pH-Wert unabhängig ist. Das Ergebnis der Regression ist in Abbildung 63 gezeigt. Die Einführung der empirischen Gleichung führte zu einer Abnahme der Regression. Der Grund dafür könnte der weiterhin globalisierte K_S -Wert sein, wobei dieser theoretisch unabhängig vom Resin beschrieben werden können sollte. Der Vergleich der neuen Parameter in Abbildung 64 mit denen aus der vorherigen Auswertung zeigt, dass die empirische Beschreibung des n -Wertes zu einer Veränderung der anderen Modellparameter, wie des $\Delta G_s^0/RT$ -Wertes, des $\Delta G_p^0/RT$ -Wertes und des ν -Wertes, führt. Dies zeigt, dass bei der empirischen Beschreibung eine hohe Variabilität besteht. Die Kurven des n -Wertes verlaufen unterschiedlichen und zeigen nicht den erwarteten Trend der theoretischen Hydrophobizitäten der Prototypen.

Die Auswertung zeigt, dass die verwendete empirische Gleichung nicht zur gleichen Qualität der Regression führt und deshalb nur beding geeignet ist. Weitere Möglichkeiten wären, den n -Wert in Abhängigkeit vom Elutions-pH-Wertes zu berechnen. Auch weitere Untersuchungen zur Variabilität des K_S -Wertes sind denkbar. Eine empirische Beschreibung des K_S -Wertes hätte den Vorteil, da sie weder vom verwendeten Resin noch vom Protein abhängig ist. Dadurch könnte die allgemeine Variabilität der Bestimmung der Modellparameter verringert werden. Abbildung 59 E zeigt, dass eine Bestimmung dieser Abhängigkeit nicht trivial möglich ist. Eine bereits

4 Diskussion

publizierte Abhängigkeit des K_S -Wertes von Lee et al. führte zu einer schlechten Regression und konnte daher nicht angewendet werden (Lee et al., 2017a).

Allgemein zeigten die Untersuchungen zur Mixed-Mode-Chromatographie, dass die Einführung des DIX-Modells möglich ist. Dabei entstehen jedoch theoretische als auch praktische Fragestellungen bzw. Herausforderungen. So wurde beispielsweise nicht herausgearbeitet, wie hydrophobe Wechselwirkungen begründbar sind, wenn keine Interaktion des Proteins mit der stationären Phase im DIX-Modell postuliert wird. Die praktische Anwendung zeigt, dass das Mixed-Mode Modell eine große Anzahl an variablen Parametern besitzt, was eine systematische Auswertung mehrerer Resins erschwert. Insbesondere allgemeine Trends sind aufgrund der hohen Variabilität einzelner Parameter nur schwer darstellbar. Auch der gleiche Einfluss mehrerer Parameter, wie beispielsweise des n -Wertes und des K_S -Wertes, auf die Modellkurven erschwert die Auswertung. Diese Problematik ist allerdings keine Eigenschaft des DIX-Modells, sondern des Mixed-Mode Modells. Eine allgemeine Beschreibung des K_S -Wertes wäre für zukünftige Untersuchungen hilfreich und würde die Variabilität des Modells verringern.

5 Zusammenfassung

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 Ionenaustauschchromatographie-Materialien, welche Liganden mit Carboxy-Gruppen tragen. 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 Austauschmodell (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, beinhaltet das SD-Modell 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-Austauschmodell (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 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.

5 Zusammenfassung

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 wird 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.

6 Literaturverzeichnis

Fremde Publikationen

- [1] Adams, G.P., and Weiner, L.M. (2005). Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 23, 1147.
- [2] Ahamed, T., Chilamkurthi, S., Nfor, B.K., Verhaert, P.D., van Dedem, G.W., van der Wielen, L.A., Eppink, M.H., van de Sandt, E.J., and Ottens, M. (2008). Selection of pH-related parameters in ion-exchange chromatography using pH-gradient operations. *J Chromatogr A* 1194, 22-29.
- [3] Ahmadi, M., Bryson, C.J., Cloake, E.A., Welch, K., Filipe, V., Romeijn, S., Hawe, A., Jiskoot, W., Baker, M.P., and Fogg, M.H. (2015). Small Amounts of Sub-Visible Aggregates Enhance the Immunogenic Potential of Monoclonal Antibody Therapeutics. *Pharm Res* 32, 1383-1394.
- [4] Anspach, F.B. (2001). Endotoxin removal by affinity sorbents. *J Biochem Biophys Methods* 49, 665-681.
- [5] Arosio, P., Rima, S., and Morbidelli, M. (2013). Aggregation Mechanism of an IgG2 and two IgG1 Monoclonal Antibodies at low pH: From Oligomers to Larger Aggregates. *Pharm Res* 30, 641-654.
- [6] Asenjo, J.A., and Andrews, B.A. (2004). Is there a rational method to purify proteins? From expert systems to proteomics. *Journal of Molecular Recognition* 17, 236-247.
- [7] Beatson, R., Sproviero, D., Maher, J., Wilkie, S., Taylor-Papadimitriou, J., and Burchell, J.M. (2011). Transforming growth factor- β 1 is constitutively secreted by chinese hamster ovary cells and is functional in human cells. *Biotechnol Bioeng* 108, 2759-2764.
- [8] Beck, A., Wagner-Rousset, E., Bussat, M.-C., Lokteff, M., Klinguer-Hamour, C., Haeuw, J.-F., Goetsch, L., Wurch, T., Dorsselaer, A.V., and Corvaia, N. (2008). Trends in Glycosylation, Glycoanalysis and Glycoengineering of Therapeutic Antibodies and Fc-Fusion Proteins. *Curr Pharm Biotechnol* 9, 482-501.
- [9] Bessa, J., Boeckle, S., Beck, H., Buckel, T., Schlicht, S., Ebeling, M., Kiialainen, A., Koulov, A., Boll, B., Weiser, T., *et al.* (2015). The Immunogenicity of Antibody Aggregates in a Novel Transgenic Mouse Model. *Pharm Res* 32, 2344-2359.
- [10] Bjork, I., Petersson, B.A., and Sjoquist, J. (1972). Some physiochemical properties of protein A from *Staphylococcus aureus*. *European journal of biochemistry / FEBS* 29, 579-584.

6 Literaturverzeichnis

- [11] Boardman, N.K., and Partridge, S.M. (1955). Separation of neutral proteins on ion-exchange resins. *Biochem J* 59, 543-552.
- [12] Borg, N., Brodsky, Y., Moscariello, J., Vunnum, S., Vedantham, G., Westerberg, K., and Nilsson, B. (2014). Modeling and robust pooling design of a preparative cation-exchange chromatography step for purification of monoclonal antibody monomer from aggregates. *J Chromatogr A* 1359, 170-181.
- [13] Breedveld, F.C. (2000). Therapeutic monoclonal antibodies. *The Lancet* 355, 735-740.
- [14] Brooks, C.A., and Cramer, S.M. (1992). Steric mass-action ion exchange: Displacement profiles and induced salt gradients. *AIChE J* 38, 1969–1978.
- [15] Cantor, C.R., and Schimmel, P.R. (1980). *The behavior of biological macromolecules* (San Francisco: W. H. Freeman).
- [16] Carrasquillo, J.A., Krohn, K., Beaumier, P., McGuffin, R., Brown, J., Hellström, K., Hellström, I., and Larson, S. (1984). Diagnosis of and therapy for solid tumors with radiolabeled antibodies and immune fragments. *Cancer treatment reports* 68, 317-328.
- [17] Chaudhuri, R., Cheng, Y., Middaugh, C.R., and Volkin, D.B. (2014). High-Throughput Biophysical Analysis of Protein Therapeutics to Examine Interrelationships Between Aggregate Formation and Conformational Stability. *AAPS J* 16, 48-64.
- [18] Chen, J., Tetrault, J., Zhang, Y., Wasserman, A., Conley, G., DiLeo, M., Haimes, E., Nixon, A.E., and Ley, A. (2010). The distinctive separation attributes of mixed-mode resins and their application in monoclonal antibody downstream purification process. *J Chromatogr A* 1217, 216-224.
- [19] Chen, J., Yang, T., and Cramer, S.M. (2008). Prediction of protein retention times in gradient hydrophobic interaction chromatographic systems. *J Chromatogr A* 1177, 207-214.
- [20] Chumsae, C., Gaza-Bulsecu, G., Sun, J., and Liu, H. (2007). Comparison of methionine oxidation in thermal stability and chemically stressed samples of a fully human monoclonal antibody. *J Chromatogr B* 850, 285-294.
- [21] Close, E.J., Salm, J.R., Bracewell, D.G., and Sorensen, E. (2014). Modelling of industrial biopharmaceutical multicomponent chromatography. *Chem Eng Res Des* 92, 1304-1314.
- [22] Davis, C.W. (1962). *Ion Association* (London: Butterworths).

6 Literaturverzeichnis

[23] Debye, P., and Hückel, E. (1923). *Physik Z* 24.

[24] Donnan, F.G. (1911). Theorie der Membrangleichgewichte und Membranpotentiale bei Vorhandensein von nicht dialysierenden Elektrolyten. Ein Beitrag zur physikalisch-chemischen Physiologie. *Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie* 17, 572-581.

[25] Ecker, D.M., Jones, S.D., and Levine, H.L. (2015). The therapeutic monoclonal antibody market. *mAbs* 7, 9-14.

[26] Elgundi, Z., Reslan, M., Cruz, E., Sifniotis, V., and Kayser, V. (2016). The state-of-play and future of antibody therapeutics. *Adv Drug Del Rev*.

[27] FDA (2011). *Guidance for Industry Process Validation: General Principles and Practices* 1edn.

[28] Fekete, S., Beck, A., Fekete, J., and Guillarme, D. (2015a). Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part I: salt gradient approach. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 102, 33-44.

[29] Fekete, S., Beck, A., Fekete, J., and Guillarme, D. (2015b). Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part II: pH gradient approach. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 102, 282-289.

[30] Foltz, I.N., Karow, M., and Wasserman, S.M. (2013). Evolution and Emergence of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *What Cardiologists Need to Know* 127, 2222-2230.

[31] Gagnon, P., Nian, R., Leong, D., and Hoi, A. (2015). Transient conformational modification of immunoglobulin G during purification by protein A affinity chromatography. *J Chromatogr A* 1395, 136-142.

[32] Gao, S.X., Zhang, Y., Stansberry-Perkins, K., Buko, A., Bai, S., Nguyen, V., and Brader, M.L. (2011). Fragmentation of a highly purified monoclonal antibody attributed to residual CHO cell protease activity. *Biotechnol Bioeng* 108, 977-982.

[33] Gernaey, K.V., Lantz, A.E., Tufvesson, P., Woodley, J.M., and Sin, G. (2010). Application of mechanistic models to fermentation and biocatalysis for next-generation processes. *Trends Biotechnol* 28, 346-354.

6 Literaturverzeichnis

- [34] Gerstner, J.A., Bell, J.A., and Cramer, S.M. (1994). Gibbs free energy of adsorption for biomolecules in ion-exchange systems. *Biophys Chem* 52, 97-106.
- [35] Goldstein, L. (1976). Kinetic Behavior of Immobilized Enzyme Systems. In *Methods Enzymol*, K.Mosbach, ed. (New York: Academic Press), p. 397.
- [36] Gomez, M.I., Lee, A., Reddy, B., Muir, A., Soong, G., Pitt, A., Cheung, A., and Prince, A. (2004). Staphylococcus aureus protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat Med* 10, 842-848.
- [37] Gregor, H.P. (1951). Gibbs-Donnan Equilibria in Ion Exchange Resin Systems. *J Am Chem Soc* 73, 642-650.
- [38] Gregor, H.P., and Bregman, J.I. (1951). Studies on ion-exchange resins. IV. Selectivity coefficients of various cation exchangers towards univalent cations. *Journal of Colloid Science* 6, 323-347.
- [39] Gritti, F., and Guiochon, G. (2012). Mass transfer kinetics, band broadening and column efficiency. *J Chromatogr A* 1221, 2-40.
- [40] Guiochon, G., and Beaver, L.A. (2011). Separation science is the key to successful biopharmaceuticals. *J Chromatogr A* 1218, 8836-8858.
- [41] Günther, A.R., Santoro, M.M., and Rogana, E. (1997). pH titration of native and unfolded β -trypsin: evaluation of the D D G0 titration and the carboxyl pK values. *Braz J Med Biol Res* 30, 1281-1286.
- [42] Hanke, A.T., and Ottens, M. (2014). Purifying biopharmaceuticals: knowledge-based chromatographic process development. *Trends Biotechnol* 32, 210-220.
- [43] Harland, C.E. (1994). *Ion Exchange: Theory and Practice* (Royal Society of Chemistry).
- [45] Helfferich, F.G. (1962). *Ion Exchange* (Dover Publications).
- [46] Herter, S., Birk, M.C., Klein, C., Gerdes, C., Umana, P., and Bacac, M. (2014). Glycoengineering of Therapeutic Antibodies Enhances Monocyte/Macrophage-Mediated Phagocytosis and Cytotoxicity. *The Journal of Immunology* 192, 2252-2260.
- [47] Heumann, K.G., and Baier, K. (1982). Chloride distribution coefficient on strongly basic anion-exchange resin: Dependence on co-ion in alkali fluoride solutions. *Chromatographia* 15, 701-703.

6 Literaturverzeichnis

- [48] Holstein, M.A., Nikfetrat, A.A., Gage, M., Hirsh, A.G., and Cramer, S.M. (2012). Improving selectivity in multimodal chromatography using controlled pH gradient elution. *Journal of chromatography A* 1233, 152-155.
- [49] Hou, K.C., and Zaniewski, R. (1990). Endotoxin removal by anion-exchange polymeric matrix. *Biotechnol Appl Biochem* 12, 315-324.
- [50] Huuk, T.C., Hahn, T., Doninger, K., Griesbach, J., Hepbildikler, S., and Hubbuch, J. (2017). Modeling of complex antibody elution behavior under high protein load densities in ion exchange chromatography using an asymmetric activity coefficient. *Biotechnology journal* 12.
- [51] Ingham, J. (2007). *Chemical engineering dynamics : an introduction to modelling and computer simulation*, 3rd, completely rev. ed edn (Weinheim Chichester: Wiley-VCH ;John Wiley, distributor).
- [52] Jansen, M.L., Houwers, J., Straathof, A.J.J., Van Der Wielen, L.A.M., Luyben, K.C.A.M., and Van Den Tweel, W.J.J. (1997). Effect of dissociation equilibria on ion-exchange processes of weak electrolytes. *AIChE J* 43, 73-82.
- [53] Jansen, M.L., Straathof, A.J.J., van der Wielen, L.A.M., Luyben, K.C.A.M., and van den Tweel, W.J.J. (1996). Rigorous model for ion exchange equilibria of strong and weak electrolytes. *AIChE J* 42, 1911-1924.
- [54] Johnson, K.A., Paisley-Flango, K., Tangarone, B.S., Porter, T.J., and Rouse, J.C. (2007). Cation exchange-HPLC and mass spectrometry reveal C-terminal amidation of an IgG1 heavy chain. *Anal Biochem* 360, 75-83.
- [55] Khawli, L.A., Goswami, S., Hutchinson, R., Kwong, Z.W., Yang, J., Wang, X., Yao, Z., Sreedhara, A., Cano, T., Tesar, D., *et al.* (2010). Charge variants in IgG1: Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats. *mAbs* 2, 613-624.
- [56] Kirdar, A.O., Green, K.D., and Rathore, A.S. (2008). Application of Multivariate Data Analysis for Identification and Successful Resolution of a Root Cause for a Bioprocessing Application. *Biotechnol Progr* 24, 720-726.
- [59] Köhler, G., and Milstein, C. (2005). Pillars Article: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256 (5517): 495–497. *The Journal of Immunology* 174, 2453-2455.
- [60] Kontermann, R.E. (2012). Dual targeting strategies with bispecific antibodies. *mAbs* 4, 182–197.

6 Literaturverzeichnis

- [61] Kröner, F., and Hubbuch, J. (2013). Systematic generation of buffer systems for pH gradient ion exchange chromatography and their application. *J Chromatogr A* 1285, 78–87.
- [62] Laskowski, M., and Scheraga, H.A. (1954). Thermodynamic Considerations of Protein Reactions. 1,2 I. Modified Reactivity of Polar Groups. *J Am Chem Soc* 76, 6305-6319.
- [63] Latypov, R.F., Hogan, S., Lau, H., Gadgil, H., and Liu, D. (2012). Elucidation of Acid-induced Unfolding and Aggregation of Human Immunoglobulin IgG1 and IgG2 Fc. *J Biol Chem* 287, 1381-1396.
- [64] Lee, Y.F., Graalfs, H., and Frech, C. (2016). Thermodynamic modeling of protein retention in mixed-mode chromatography: An extended model for isocratic and dual gradient elution chromatography. *Journal of chromatography A* 1464, 87-101.
- [65] Lee, Y.F., Kluters, S., Hillmann, M., von Hirschheydt, T., and Frech, C. (2017a). Modeling of bispecific antibody elution in mixed-mode cation-exchange chromatography. *Journal of separation science*, n/a-n/a.
- [66] Lee, Y.F., Kluters, S., Hillmann, M., Von Hirschheydt, T., and Frech, C. (2017b). Understanding bispecific antibody separation in mixed-mode chromatography.
- [67] Lee, Y.F., Schmidt, M., Graalfs, H., Hafner, M., and Frech, C. (2015). Modeling of dual gradient elution in ion exchange and mixed-mode chromatography. *J Chromatogr A* 1417, 64-72.
- [68] Lendero, N., Vidič, J., Brne, P., Frankovič, V., Štrancar, A., and Podgornik, A. (2008). Characterization of ion exchange stationary phases via pH transition profiles. *J Chromatogr A* 1185, 59-70.
- [69] Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A., Kiss, R., and Amanullah, A. (2010). Cell culture processes for monoclonal antibody production. *mAbs* 2, 466-477.
- [70] Lingg, N., Tan, E., Hintersteiner, B., Bardor, M., and Jungbauer, A. (2013). Highly linear pH gradients for analyzing monoclonal antibody charge heterogeneity in the alkaline range. *J Chromatogr A* 1319, 65-71.
- [71] Liu, H.F., Ma, J., Winter, C., and Bayer, R. (2010). Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *mAbs* 2, 480-499.
- [72] Lodi, G., Storti, G., Pellegrini, L.A., and Morbidelli, M. (2017). Ion Exclusion Chromatography: Model Development and Experimental Evaluation. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 56, 1621-1632.

6 Literaturverzeichnis

[73] Lu, Y., Williamson, B., and Gillespie, R. (2009). Recent Advancement in Application of Hydrophobic Interaction Chromatography for Aggregate Removal in Industrial Purification Process. *Curr Pharm Biotechnol* 10, 427-433.

[74] Lyubarskaya, Y., Houde, D., Woodard, J., Murphy, D., and Mhatre, R. (2006). Analysis of recombinant monoclonal antibody isoforms by electrospray ionization mass spectrometry as a strategy for streamlining characterization of recombinant monoclonal antibody charge heterogeneity. *Anal Biochem* 348, 24-39.

[75] Manning, M.C., Chou, D.K., Murphy, B.M., Payne, R.W., and Katayama, D.S. (2010). Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. *Pharm Res* 27, 544-575.

[76] Melis, S., Cao, G., and Morbidelli, M. (1995). A New Model for the Simulation of Ion Exchange Equilibria. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 34, 3916-3924.

[77] Melter, L., Butte, A., and Morbidelli, M. (2008). Preparative weak cation-exchange chromatography of monoclonal antibody variants I. Single-component adsorption. *J Chromatogr A* 1200, 156-165.

[78] Merchant, A.M., Zhu, Z., Yuan, J.Q., Goddard, A., Adams, C.W., Presta, L.G., and CarterPaul (1998). An efficient route to human bispecific IgG. *Nat Biotech* 16, 677-681.

[79] Mollerup, J.M. (2014). Chemical Engineering Thermodynamics and Protein Adsorption Chromatography. *Journal of Chemical & Engineering Data* 59, 991-998.

[80] Mollerup, J.M., Hansen, T.B., Frederiksen, S.S., and Staby, A. (2010). Thermodynamic modeling of chromatographic separation. *Adv Chromatogr* 48, 57-97.

[81] Mollerup, J.M., Hansen, T.B., Kidal, S., Sejergaard, L., and Staby, A. (2007). Development, modelling, optimisation and scale-up of chromatographic purification of a therapeutic protein. *Fluid Phase Equilib* 261, 133-139.

[82] Morrison, C. (2017). Fresh from the biotech pipeline - 2016. *Nat Biotech* 35, 108-112.

[83] Müller-Späth, T., Ströhlein, G., Aumann, L., Kornmann, H., Valax, P., Delegrange, L., Charbaut, E., Baer, G., Lamproye, A., Jöhnck, M., *et al.* (2011). Model simulation and experimental verification of a cation-exchange IgG capture step in batch and continuous chromatography. *J Chromatogr A* 1218, 5195-5204.

[84] Nagai, H., Kuwabara, K., and Carta, G. (2008). Temperature Dependence of the Dissociation Constants of Several Amino Acids. *Journal of Chemical & Engineering Data* 53, 619-627.

6 Literaturverzeichnis

- [85] Nfor, B.K., Noverraz, M., Chilamkurthi, S., Verhaert, P.D., van der Wielen, L.A., and Ottens, M. (2010). High-throughput isotherm determination and thermodynamic modeling of protein adsorption on mixed mode adsorbents. *Journal of chromatography A* 1217, 6829-6850.
- [86] Osberghaus, A., Hepbildikler, S., Nath, S., Haindl, M., von Lieres, E., and Hubbuch, J. (2012). Optimizing a chromatographic three component separation: A comparison of mechanistic and empiric modeling approaches. *J Chromatogr A* 1237, 86-95.
- [87] Pabst, T.M., and Carta, G. (2007). pH transitions in cation exchange chromatographic columns containing weak acid groups. *J Chromatogr A* 1142, 19-31.
- [88] Pedersen, L., Mollerup, J., Hansen, E., and Jungbauer, A. (2003). Whey proteins as a model system for chromatographic separation of proteins. *J Chromatogr B* 790, 161-173.
- [89] Peterson, S., and Gowen, E. (1953). Equilibria between Aromatic Acids and Weak Base Anion Exchangers. *Industrial & Engineering Chemistry* 45, 2584-2586.
- [90] Peterson, S., and Jeffers, R.W. (1952). Equilibria between Aliphatic Acids and a Strong Base Anion Exchanger¹. *J Am Chem Soc* 74, 1605-1606.
- [91] Pfister, D., and Morbidelli, M. (2015). Mass transfer coefficients determination from linear gradient elution experiments. *J Chromatogr A* 1375, 42-48.
- [92] Ramon, J., Saez, V., Baez, R., Aldana, R., and Hardy, E. (2005). PEGylated Interferon- α 2b: A Branched 40K Polyethylene Glycol Derivative. *Pharm Res* 22, 1375-1387.
- [93] Rathore, A.S. (2009). Roadmap for implementation of quality by design (QbD) for biotechnology products. *Trends Biotechnol* 27, 546-553.
- [94] Rathore, A.S., and Winkle, H. (2009). Quality by design for biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol* 27, 26-34.
- [95] Reichert, J.M. (2017). Antibodies to watch in 2017. *mAbs* 9, 167-181.
- [96] Ritzén, U., Rotticci-Mulder, J., Strömberg, P., and Schmidt, S.R. (2007). Endotoxin reduction in monoclonal antibody preparations using arginine. *J Chromatogr B* 856, 343-347.

6 Literaturverzeichnis

[97] Rodgers, K.R., and Chou, R.C. (2016). Therapeutic monoclonal antibodies and derivatives: Historical perspectives and future directions. *Biotechnol Adv* 34, 1149-1158.

[98] Rosenberg, A.S. (2006). Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J* 8, E501-507.

[99] Sahin, E., Grillo, A.O., Perkins, M.D., and Roberts, C.J. (2010). Comparative Effects of pH and Ionic Strength on Protein–Protein Interactions, Unfolding, and Aggregation for IgG1 Antibodies. *J Pharm Sci* 99, 4830-4848.

[100] Salis, A., Boström, M., Medda, L., Cugia, F., Barse, B., Parsons, D.F., Ninham, B.W., and Monduzzi, M. (2011). Measurements and Theoretical Interpretation of Points of Zero Charge/Potential of BSA Protein. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 27, 11597-11604.

[101] Saunders, M.S., Vierow, J.B., and Carta, G. (1989). Uptake of phenylalanine and tyrosine by a strong-acid cation exchanger. *AIChE J* 35, 53-68.

[102] Scatchard, G. (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions *Ann N Y Acad Sci* 51, 660-672.

[103] Schmidt-Traub, H., Schulte, M., and Seidel-Morgenstern, A. (2012). *Preparative Chromatography* (Wiley).

[104] Schmidt, M., Hafner, M., and Frech, C. (2014). Modeling of salt and pH gradient elution in ion-exchange chromatography. *J Sep Sci* 37, 5-13.

[106] Seifert, D.B., and Phillips, J.A. (1999). The Production of Monoclonal Antibody in Growth-Arrested Hybridomas Cultivated in Suspension and Immobilized Modes. *Biotechnol Progr* 15, 655-666.

[107] Sharifi, J., Khawli, L.A., Hornick, J.L., and Epstein, A.L. (1998). Improving monoclonal antibody pharmacokinetics via chemical modification. *The quarterly journal of nuclear medicine : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR)* 42, 242-249.

[108] Shen, H., and Frey, D.D. (2004). Charge regulation in protein ion-exchange chromatography: Development and experimental evaluation of a theory based on hydrogen ion Donnan equilibrium. *J Chromatogr A* 1034, 55-68.

[109] Shukla, A.A., Hubbard, B., Tressel, T., Guhan, S., and Low, D. (2007). Downstream processing of monoclonal antibodies--application of platform approaches. *J Chromatogr B* 848, 28-39.

6 Literaturverzeichnis

- [110] Shukla, A.A., and Thömmes, J. (2010). Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends Biotechnol* **28**, 253-261.
- [111] Sofer, G., Lister, D.C., and Boose, J.A. (2003). Virus inactivation in the 1990s - And into the 21st century: Part 6, inactivation methods grouped by virus, Vol 16.
- [112] Spassov, V.Z., and Bashford, D. (1999). Multiple-site ligand binding to flexible macromolecules: Separation of global and local conformational change and an iterative mobile clustering approach. *J Comput Chem* **20**, 1091-1111.
- [113] Spassov, V.Z., and Yan, L. (2008). A fast and accurate computational approach to protein ionization. *Protein Science : A Publication of the Protein Society* **17**, 1955-1970.
- [114] Spens, E., and Häggström, L. (2007). Defined protein and animal component-free NS0 fed-batch culture. *Biotechnol Bioeng* **98**, 1183-1194.
- [115] Staby, A., Jacobsen, J.H., Hansen, R.G., Bruus, U.K., and Jensen, I.H. (2006). Comparison of chromatographic ion-exchange resins: V. Strong and weak cation-exchange resins. *J Chromatogr A* **1118**, 168-179.
- [116] Staby, A., Rathore, A.S., and Ahuja, S. (2017). Preparative chromatography for separation of proteins.
- [117] Ståhlberg, J. (1999). Retention models for ions in chromatography. *Journal of chromatography A* **855**, 3-55.
- [119] Stenholm, Å., Lindgren, H., and Shaffie, J. (2006). Comparison of amine-selective properties of weak and strong cation-exchangers. *J Chromatogr A* **1128**, 73-78.
- [120] Strube, J., Grote, F., Josch, J.P., and Ditz, R. (2011). Process Development and Design of Downstream Processes. *Chem Ing Tech* **83**, 1044-1065.
- [121] Sweadner, K.J., Forte, M., and Nelsen, L.L. (1977). Filtration removal of endotoxin (pyrogens) in solution in different states of aggregation. *Appl Environ Microbiol* **34**, 382-385.
- [122] Tanford, C. (1961). *Physical chemistry of macromolecules* (Wiley).
- [123] Tanford, C., and Roxby, R. (1972). Interpretation of protein titration curves. Application to lysozyme. *Biochemistry* **11**, 2192-2198.

6 Literaturverzeichnis

[124] Telikepalli, S.N., Kumru, O.S., Kalonia, C., Esfandiary, R., Joshi, S.B., Middaugh, C.R., and Volkin, D.B. (2014). Structural Characterization of IgG1 mAb Aggregates and Particles Generated Under Various Stress Conditions. *J Pharm Sci* 103, 796-809.

[125] Urbansky, E.T., and Schock, M. (2000). Understanding, Deriving, and Computing Buffer Capacity. *J Chem Educ*.

[126] Varadaraju, H., Schneiderman, S., Zhang, L., Fong, H., and Menkhaus, T.J. (2011). Process and economic evaluation for monoclonal antibody purification using a membrane-only process. *Biotechnol Prog* 27, 1297-1305.

[127] Vázquez-Rey, M., and Lang, D.A. (2011). Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes. *Biotechnol Bioeng* 108, 1494–1508.

[128] Vermeulen, T., M. D. LeVan, N. K. Hiester, and G. Klein (1984). *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. In, R.H.P.a.D. W.Green, ed. (McGraw-Hill).

[129] Vlasak, J., and Ionescu, R. (2008). Heterogeneity of Monoclonal Antibodies Revealed by Charge-Sensitive Methods. *Curr Pharm Biotechnol* 9, 468-481.

[130] Wagner-Rousset, E., Fekete, S., Morel-Chevillet, L., Colas, O., Corvaia, N., Cianférani, S., Guillarme, D., and Beck, A. (2017). Development of a fast workflow to screen the charge variants of therapeutic antibodies. *J Chromatogr A* 1498, 147-154.

[131] Wang, W. (2005). Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int J Pharm* 289, 1-30.

[132] Wang, W., Erbe, A.K., Hank, J.A., Morris, Z.S., and Sondel, P.M. (2015). NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* 6.

[133] Wang, W., Nema, S., and Teagarden, D. (2010). Protein aggregation—Pathways and influencing factors. *Int J Pharm* 390, 89-99.

[134] Weiner, L.M., Surana, R., and Wang, S. (2010). Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 10, 317.

[135] Wilson, M.J., Haggart, C.L., Gallagher, S.P., and Walsh, D. (2001). Removal of tightly bound endotoxin from biological products. *J Biotechnol* 88, 67-75.

[138] Witzig, T.E., Flinn, I.W., Gordon, L.I., Emmanouilides, C., Czuczman, M.S., Saleh, M.N., Cripe, L., Wiseman, G., Olejnik, T., and Multani, P.S. (2002). Treatment

6 Literaturverzeichnis

with ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy in patients with rituximab-refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical oncology* 20, 3262-3269.

[140] Woof, J.M., and Burton, D.R. (2004). Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat Rev Immunol* 4, 89-99.

[141] Wu, A.M., and Senter, P.D. (2005). Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotech* 23, 1137-1146.

[142] Wu, J., Jiao, P., Zhuang, W., Zhou, J., and Ying, H. (2016). Modified DIX model for ion-exchange equilibrium of l-phenylalanine on a strong cation-exchange resin. *Chin J Chem Eng* 24, 1386-1391.

[143] Yamamoto, S., Nakanishi, K., and Matsuno, R. (1988). Ion-exchange chromatography of proteins (New York: M. Dekker).

[144] Yamamoto, S., Nakanishi, K., Matsuno, R., and Kamikuno, T. (1983). Ion-exchange chromatography of proteins - Prediction of Elution Curves and Operating Conditions. I. Theoretical Considerations. *Biotechnol Bioeng* 25, 1465-1483.

[145] Yigit, C., Welsch, N., Ballauff, M., and Dzubiella, J. (2012). Protein Sorption to Charged Microgels: Characterizing Binding Isotherms and Driving Forces. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 28, 14373-14385.

[146] Yoo, S.M., and Ghosh, R. (2012). Simultaneous removal of leached protein-A and aggregates from monoclonal antibody using hydrophobic interaction membrane chromatography. *J Membr Sci* 390, 263-269.

[147] Zhang, Q., Goetze, A.M., Cui, H., Wylie, J., Tillotson, B., Hewig, A., Hall, M.P., and Flynn, G.C. (2016). Characterization of the co-elution of host cell proteins with monoclonal antibodies during protein A purification. *Biotechnol Progr* 32, 708-717.

[148] Zhang, Q., Goetze, A.M., Cui, H., Wylie, J., Trimble, S., Hewig, A., and Flynn, G.C. (2014). Comprehensive tracking of host cell proteins during monoclonal antibody purifications using mass spectrometry. *mAbs* 6, 659-670.

[149] Zhang, T., Bourret, J., and Cano, T. (2011). Isolation and characterization of therapeutic antibody charge variants using cation exchange displacement chromatography. *J Chromatogr A* 1218, 5079-5086.

[150] Zheng, J.Y., and Janis, L.J. (2006). Influence of pH, buffer species, and storage temperature on physicochemical stability of a humanized monoclonal antibody LA298. *Int J Pharm* 308, 46-51.

6 Literaturverzeichnis

[151] Zhou, J.X., Dermawan, S., Solamo, F., Flynn, G., Stenson, R., Tressel, T., and Guhan, S. (2007). pH–conductivity hybrid gradient cation-exchange chromatography for process-scale monoclonal antibody purification. *J Chromatogr A* 1175, 69-80.

Abschlussarbeiten

[58] Koch, J.M.M. (2017). Modellierung von Mixed-Mode-Chromatographie Materialien. In Institut für Biochemie (HS Mannheim).

[105] Seelinger, F. (2017). Optimization and scale-up of charge variants separation of mAbs in cation exchange chromatography. In Institut für Biochemie (HS Mannheim).

[118] Stange, C. (2016). Optimierung der Auftrennung von Ladungsvarianten eines monoklonalen Antikörpers durch mathematische Modellierung. In Institut für Biochemie (HS Mannheim).

[139] Wohlfart, D. (2016). Entwicklung einer Methode zur Aufreinigung monoklonaler Antikörper. In Institut für Biochemie (HS Mannheim).

Eigene Publikationen

[44] Hedrich, J., Wittkopp, F., and Frech, C. (DRAFT). Determining mass transfer coefficients from linear gradient experiments.

[57] Kluters, S., Wittkopp, F., Johnck, M., and Frech, C. (2016). Application of linear pH gradients for the modeling of ion exchange chromatography: Separation of monoclonal antibody monomer from aggregates. *Journal of separation science* 39, 663-675.

[136] Wittkopp, F., Hedrich, J., Peeck, L., and Frech, C. (DRAFT). Calculation of linear pH gradient buffer compositions for elevated salt concentrations using a discontinuous buffer system.

[137] Wittkopp, F., Peeck, L., Hafner, M., and Frech, C. (2018). Modeling and simulation of protein elution in linear pH and salt gradients on weak, strong and mixed cation exchange resins applying an extended Donnan ion exchange model (article in press). *J Chromatogr A*.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau monoklonaler Antikörper und deren moderne Weiterentwicklung für therapeutische Anwendungen (Elgundi et al., 2016).	2
Abbildung 2: Schematischer Aufbau einer mAb Produktion durch Zellkultur im Produktionsmaßstab (Shukla und Thömmes, 2010).	6
Abbildung 3: Schematische Aufbau eines mAb Aufreinigungsverfahrens im Produktionsmaßstab (Shukla und Thömmes, 2010).	7
Abbildung 4: Wichtige Prozesse und deren Parameter bei der chromatographischen Trennung von Proteinen (Hanke und Ottens, 2014).	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung der unschädlichen Ansätze der Prozessentwicklung von chromatographischen Trennungen von Proteinen (Hanke und Ottens, 2014).	10
Abbildung 6: Schematische Verteilung eines geladenen Proteins zwischen Bulk- und Resin-Phase unter Berücksichtigung des DIX-Modells (Wittkopp et al., 2018). 31	
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Prozesses von der Aufnahme der experimentellen Daten zur Modellierung und <i>in silico</i> -Simulation.....	45
Abbildung 8: Schematische Darstellung des <i>Lumped-Rate</i> Modells zur <i>in silico</i> -Simulation von Ionen und Proteinen in Säulen-Chromatographie (Ingham, 2007).	46
Abbildung 9: Berechnungen zum Verlauf der Konzentration der protonierten Spezies B der Puffersubstanzen in einem homogenen Puffersystem. Pufferkonzentrationen: Essigsäure: 15,6 mmol/L, MES: 12,2 mmol/L, MOPSO: 3,7 mmol/L; HEPES 9,7 mmol/L; TAPS: 7,6 mmol/L; CHES: 15,1 mmol/L.	51
Abbildung 10: Berechnungen zum Verlauf der Konzentration der protonierten Spezies B der Puffersubstanzen in einem diskontinuierlichen Puffersystem. Pufferrezept: Puffer A: 14,1 mmol/L Essigsäure; 23,4 mmol/ MES 25,6 mmol/L NaCl, 8,4 mmol/L NaOH; pH 4,75. Puffer B: 28,1 mmol/L MOPSO, 12,2 mmol/L TAPS, 34 mmol/L NaOH, pH 8,5.	52
Abbildung 11: Berechnungen zum Verlauf der einzelnen Pufferkapazitäten in einem diskontinuierlichen Puffersystem. Pufferrezept: Puffer A: 14,1 mmol/L Essigsäure; 23,4 mmol/ MES 25,6 mmol/L NaCl, 8,4 mmol/L NaOH; pH 4,75. Puffer B: 28,1 mmol/L MOPSO, 12,2 mmol/L TAPS, 34 mmol/L NaOH, pH 8,5.53	
Abbildung 12: pH-Gradient eines diskontinuierlichen Puffersystems. Pufferrezept: Puffer A: 14,1 mmol/L Essigsäure; 23,4 mmol/ MES 25,6 mmol/L NaCl, 8,4 mmol/L NaOH; pH 4,75. Puffer B: 28,1 mmol/L MOPSO, 12,2 mmol/L TAPS, 34 mmol/L NaOH, pH 8,5. Flussrate: 1 mL/min, Prototyp 4, Gradientenlänge: 40 CV.	54
Abbildung 13: Vergleich eines diskontinuierlichen und homogenen Puffersystems pH 4 bis pH 10. Säule: BioPro SP-F, Anlage: Äkta Micro, Flussrate 0,65 mL/min,	

7 Abbildungsverzeichnis

- Probe: 600 µg mAb05, Gradientenvolumen: 60 CV. Homogenes Puffersystem
Puffer A und B: 6,5 mmol/L Essigsäure; 4,6 mmol/L MES; 1,8 mmol/L MOPSO;
3,4 mmol/L HEPES; 3,7 mmol/L TAPS; 3,9 mmol/L CHES; 4,5 mmol/L CAPS.
Diskontinuierliches Puffersystem Puffer A: 7,4 mmol/L Essigsäure; 8,9 mmol/L
MES; 10,3 mmol/L MOPSO. Puffer B: 13,3 mmol/L HEPES; 6,5 mmol/L TAPS;
5,2 mmol/L CHES, 3,7 mmol/L CAPS (Wohlfart, 2016)..... 55
- Abbildung 14: Vergleich des pH-Gradienten zwischen einem starken
Kationentauscher (Prototyp Resin 4) und einem schwachen Kationentauscher
(Prototyp Resin 1) unter Verwendung folgendes Pufferrezeptes: Puffer A:
14,1 mmol/L Essigsäure; 23,4 mmol/L MES 25,6 mmol/L NaCl, 8,4 mmol/L NaOH;
pH 4,75. Puffer B: 28,1 mmol/L MOPSO, 12,2 mmol/L TAPS, 34 mmol/L NaOH,
pH 8,5. Flussrate: 1 mL/min, Gradientenlänge: 30 CV. 56
- Abbildung 15: Vergleich des pH-Gradienten auf einem schwachen Kationentauscher
(Prototyp Resin 1). Flussrate: 1 mL/min, Gradientenlänge: 10 / 20 / 30 CV.
Puffersystem: 19 mmol/L Essigsäure, 16 mmol/L MES, 14 mmol/L MOPS,
5,5 mmol/L HEPES, 20 mmol/L TAPS, 5 mmol/L Bernsteinsäure..... 57
- Abbildung 16: Dualer Gradient von 20 - 600 mmol/L NaCl und pH 5 - 9 unter
Verwendung von Prototyp Resin 1, Flussrate 1 mL/min, Puffersystem: 10
mmol/L Bernsteinsäure; 10 mmol/L Essigsäure; 13,5 mmol/L MES; 9,2 mmol/
MOPSO; 12,5 mmol/L HEPES; 13,5 mmol/L TAPS; 16,6 mmol/L CHES..... 58
- Abbildung 17: Dualer Gradient von pH 5 - 9 bei verschiedenen Salzkonzentrationen
unter Verwendung von Prototyp Resin 1, Flussrate 1 mL/min,
Gradientensteigung: 30 CV, Puffersystem: 10 mmol/L Succinat; 10 mmol/L
Essigsäure; 13,5 mmol/L MES; 9,2 mmol/L MOPSO; 12,5 mmol/L HEPES; 13,5
mmol/L TAPS; 16,6 mmol/L CHES..... 59
- Abbildung 18: SE-HPLP-Analyse von mAb02 (A) und mAb05 (B). Chromatographie
Säule: Tosoh TSKgel SuperSW mAb, Flussrate: 0,5 mL/min. Probenmenge: ca.
100 µg. Laufpuffer: 0,02 mol/L Na₂PO₄ + 0,3 mol/L NaCl + 0,03 % Na₃N, pH 7.
..... 61
- Abbildung 19: Vergleich des Einflusses der Pufferkapazität auf den Elution-pH-Wert
und die Auftrennung von mAb05. HPLC-Säule: Biopro SP-F, Probe: 100 µg
mab05, Flussrate: 1 mL/min, pH-Gradient von pH 4 auf pH 10 in 90 min,
System: HP1050, Puffersystem: Puffer A: 3,77 mmol/L Essigsäure, 8,17 mmol/L
MES, 5,12 mmol/L MOPSO, 4,02 mmol/L Na-Formiat, pH 4; Puffer B: 9,72
mmol/L HEPES, 3,2 mmol/L TAPS, 5,30 mmol/L CHES, pH 10. 62
- Abbildung 20: CEX-HPLC Analyse von mAb02. Säule: YMC Biopro SP-F. Puffer A:
8,8 mmol/L Essigsäure, 10,0 mmol/L MES, 15,5 mmol/L MOPSO, pH 5,0. Puffer
B: 18,4 mmol/L HEPES, 7,2 mmol/L TAPS, 7,7 mmol/L CHES pH 9,5. Flussrate
0,7 mL/min, 40 - 90 % Puffer B in 43 CV..... 63
- Abbildung 21: CEX-HPLC Analyse von mAb05. Säule: YMC Biopro SP-F. Puffer A:
8,8 mmol/L Essigsäure, 10,0 mmol/L MES, 15,5 mmol/L MOPSO, pH 5,0. Puffer
B: 18,4 mmol/L HEPES, 7,2 mmol/L TAPS, 7,7 mmol/L CHES pH 9,5. Flussrate
0,7 mL/min, 50 - 80 % Puffer B in 14 CV..... 64

7 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 22: Berechnung des Einflusses der Proteinladung und Proteinkonzentration auf den r_D -Wert bei Na^+ -Konzentrationen von 30 mmol/L (A) und 200 mmol/L (B). Berechnung von r_D unter Berücksichtigung des Proteins erfolgte mit Gleichung (33) und unter Vernachlässigung des Proteins mit Gleichung (40). Na^+ -Konzentration A: 30 mmol/L; B: 200 mmol/L; pH-Wert: 6,0, N(carboxyl): 6,5; Anzahl der bestimmten Aminosäuren des Proteins: N(Amine): 7,53, N(Histidine): 3,65; N(Ntermini): 4,0; $\Delta G_p/RT$: 10,7; $\Delta G_s/RT$: 0,548; Λ : 0,32 mol/mL Resin. 65
- Abbildung 23: Berechnung der Ligandendichte Λ^- in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Na^+ -Konzentration in der Bulk-Phase für Prototyp Resin 1 (100 % COO-Liganden). 67
- Abbildung 24: Berechnung der prozentualen Ligandendichte Λ^- in Abhängigkeit des pH-Wertes in der Resin-Phase für Prototyp Resins 1 bis 4 (unterschiedliche COO- / SO_3^- -Zusammensetzung). 68
- Abbildung 25: Berechnung des Zusammenhangs zwischen dem Donnan-Verhältnis r_D und dem pH-Wert der Bulk-Phase in Abhängigkeit von der Salzkonzentration der Bulk-Phase für Prototyp Resin 1 (A) und Resin 4 (B). 69
- Abbildung 26: Berechnung der Na^+ -Konzentration in der Bulk- und Resin-Phase in Abhängigkeit vom pH-Wert für Prototyp Resin 1 (A) und Resin 4 (B). 70
- Abbildung 27: Berechnung des Zusammenhangs zwischen dem pH-Wert der Resin-Phase und dem pH-Wert der Bulk-Phase in Abhängigkeit von der Salzkonzentration der Bulk-Phase für Prototyp Resin 1 (A) und Resin 4 (B). ... 72
- Abbildung 28: SE-HPLC Analyse der aggregierten mAb05-Probe. Chromatographiesäule: Biosep SEC s3000, Flussrate: 1 mL/min. Probenmenge: ca. 100 μg , Laufpuffer: 0,02 mol/L Na_2PO_4 + 0,3 mol/L NaCl + 0,03% Na_3N , pH 7 (Kluters et al., 2016). 73
- Abbildung 29: Modellierung von mAb05-Monomer (A), -Dimer (B) und -Aggregaten (C). Ergebnis der Korrelation zwischen experimentellen Datenpunkte und berechneten Kurven unter Anwendung des SD-Modells (Kluters et al., 2016).. 75
- Abbildung 30: Modellierung von mAb05-Monomer (A), -Dimer (B) und -Aggregaten (C). Ergebnis der Korrelation zwischen experimentellen Datenpunkte und berechneten Kurven unter Anwendung des DIX-Modells. 77
- Abbildung 31: Anzahl der Bindungsstellen v des SD-Modells (A) (Kluters et al., 2016) und Anzahl der Austauschladungen v des DIX-Modells (B) für mAb05-Monomer, -Dimer und -HMW der Modellierung mit CPX. 79
- Abbildung 32: Vergleich der Elutionsbedingungen der pH-Gradienten (A) und Salzgradienten bei pH 5 (B) von mAb05 auf Prototyp Resin 1 - 4 bei einer Gradientensteigung von 40 CV. 81
- Abbildung 33: Modellierung von mAb05 auf Prototyp Resins 1 (A, C, E) und 4 (B, D, F) unter Verwendung des SD-Modells. Bei der Bestimmung der Parameter werden Daten aus pH-Gradienten bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (A,

7 Abbildungsverzeichnis

- B), Salzgradienten bei verschiedenen pH-Werten (C, D) und Daten aus einer separaten $\log(\text{GH})/\log(\text{IR})$ Auswertung (E, F) verwendet. Die Graphen E und F zeigen die Anzahl der Bindungsstellen ν in Relation zum pH-Wert..... 83
- Abbildung 34: Modellierung von mAb05 auf Prototyp Resins 1 (A, B), 2 (C, D), 3 (E, F) und 4 (G, H) unter Verwendung des entwickelten DIX-Modells. Bei der Bestimmung der Parameter werden Daten aus pH-Gradienten bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (linke Seite), Salzgradienten bei verschiedenen pH-Werten (rechte Seite) verwendet. 85
- Abbildung 35: $\Delta G_P^0/RT$ -Werte (A) und $\Delta G_S^0/RT$ -Werte (B) im Verhältnis zum SO_3^- -Anteil von Prototyp Resin 1 – 4 für die Modellierung von mAb05. 87
- Abbildung 36: Anzahl der effektiven Austauschladungen ν von Prototyp Resin 1 - 4 der DIX-Modellierung von mAb05. 87
- Abbildung 37: Vergleich der Gleichgewichtskonstante K_{eq} der Prototyp Resins 1 bis 4 der Modellierung von mAb05 unter Verwendung des DIX-Modells. 88
- Abbildung 38: Berechnung der Gleichgewichtskonstante K_{eq} für Prototyp Resin 1 bis 4 unter Verwendung des Modells von Melis et al. (Melis et al., 1995) und den Werten aus der Modellierung mit dem DIX-Modell für pH 7 (A) und pH 5 (B). .. 89
- Abbildung 39: Berechnung der Retentionswerte der pH-Gradienten (A, C) und Salzgradienten (B, D) gemixten Prototyp Resins 2 (A, B) und 3 (C, D) unter Verwendung des Melis Modells auf Basis der Werte der Prototyp Resins 1 und 4. 91
- Abbildung 40: Anzahl der effektiven Austauschladungen ν von Prototyp Resin 1 - 4 der Berechnung mit dem Melis Modell 91
- Abbildung 41: Berechnung der Anzahl der Bindungsstellen bzw. effektiven Austauschladung ν (A) und der Gleichgewichtskonstante K_{eq} (B) für die Modellierung von mAb 05 auf Prototyp Resin 4 unter Verwendung des SD- und DIX-Modells. 92
- Abbildung 42: Simulation von pH-Gradienten bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen für Resin 1 (A, B, C) und Resin 3 (D, E, F) mit den jeweiligen experimentellen Datenpunkten. pH-Gradient 4,75 bis 8,5; Salzkonzentrationen: 34 (A, D), 90 (B, E) und 180 mmol/L (C, F), $N=20$, $D_{\text{ax}}=1,13\text{e-}3$, $k_{\text{eff}}(\text{A})=1,87\text{e-}5$, $k_{\text{eff}}(\text{B})=1,88\text{e-}5$, $k_{\text{eff}}(\text{C})=2,13\text{e-}5$, $k_{\text{eff}}(\text{D})=2,44\text{e-}5$, $k_{\text{eff}}(\text{E})=2,25\text{e-}5$, $k_{\text{eff}}(\text{F})=1,59\text{e-}5$, Gradientenlänge: 40 CV, Flussrate: 1 mL/min. 94
- Abbildung 43: Simulation eines dualen Gradienten auf Prototyp Resin 2 (A) und 4 (B), pH-Wert: 4,75-8,5, Na^+ -Konzentration: 34-200 mmol/L, Gradientenvolumen = 40 CV; Flussrate = 119 cm/h, N (Segmente)= 20, $D_{\text{ax}}=1,18\text{e-}3$, $k_{\text{eff}}=2,11\text{e-}5$ (A), $k_{\text{eff}}=2,12\text{e-}5$ (B). 95
- Abbildung 44: Aufreinigung von mAb02 Protein A-Eluat zur Isolierung der Ladungsvarianten. Puffer A: 25 mM MOPSO, pH 7. Puffer B: 25 mM MOPSO,

7 Abbildungsverzeichnis

200 mM NaCl, pH 7. Gradientenvolumen: 50 CV, Chromatographiesäule: 17 mL Eshmuno® CPX (Stange, 2016).....	98
Abbildung 45: CE-HPLC Analyse von mAb05. Säule: YMC Biopro SP-F. Puffer A: 8,8 mmol/L Essigsäure, 10,0 mmol/L MES, 15,5 mmol/L MOPSO, pH 5,0. Puffer B: 18,4 mmol/L HEPES, 7,2 mmol/L TAPS, 7,7 mmol/L CHES pH 9,5. Flussrate 0,7 mL/min, 25 - 100 % Puffer B in 45 CV (Stange, 2016).	99
Abbildung 46: Modellierung der mAb02-Ladungsvarianten aus Abschnitt 3.8.1 auf Eshmuno® CPX mit Hilfe des SD-Modells. pH-Gradienten Daten (A, C, E) und Salzgradienten Daten (B, D, F) für die saure Variante (A, B), neutrale Variante (C, D) und basische Variante (E, F) (Seelinger, 2017).	100
Abbildung 47: Modellierung der mAb02-Ladungsvarianten aus Abschnitt 3.8.1 auf Eshmuno® CPX mit Hilfe des DIX-Modells. pH-Gradienten-Daten (A, C, E) und Salzgradienten Daten (B, D, F) für die saure Variante (A, B), neutrale Variante (C, D) und basische Variante (E, F).....	103
Abbildung 48: Anzahl der Bindungsstellen ν des SD-Modells (A) und Anzahl der Austauschladungen ν des DIX-Modells (B) für die mAb02 Ladungsvarianten der Modellierung auf Eshmuno® CPX. Kurven des SD-Modells: (Seelinger, 2017)	105
Abbildung 49: Vergleich der Gleichgewichtskonstante K_{eq} der sauren Spezies über den pH-Wert der Bulk-Phase des SD- und DIX-Modells auf Eshmuno® CPX. 106	
Abbildung 50: Vergleich des Verteilungskoeffizienten A der sauren Spezies über den pH-Wert der Bulk-Phase des SD- und DIX-Modells für drei verschiedene Na^+ -Konzentrationen auf Eshmuno® CPX.	107
Abbildung 51: Modellierung der mAb02-Ladungsvarianten aus Abschnitt 3.8.1 auf Prototyp Resin 1 mit Hilfe des DIX-Modells. pH-Gradienten-Daten (A, C, E) und Salzgradienten-Daten (B, D, F) für die saure Variante (A, B), neutrale Variante (C, D) und basische Variante (E, F).....	108
Abbildung 52: Anzahl der Austauschladungen ν von Prototyp Resin 1 (A) und Eshmuno® CPX (B) für die mAb02-Ladungsvarianten der Modellierung mit dem DIX-Modell.....	111
Abbildung 53: Vergleich der Elutionsbedingungen von mAb02 der pH-Gradienten (A) und Salzgradienten (B) von Prototyp Resin 1 und Eshmuno® CPX.....	112
Abbildung 54: Vergleich der Gleichgewichtskonstante K_{eq} der sauren Spezies über den pH-Wert der Bulk-Phase des DIX-Modells von Prototyp Resin 1 und Eshmuno® CPX.	113
Abbildung 55: Simulation der Trennung der mAb02 Ladungsvarianten auf Prototyp Resin 1 unter Verwendung eines Salzgradienten bei pH 5,5 (A), pH 6 (B) und bei pH 7 (C, D). Gradientenlänge: 50 CV, Flussrate: 1 mL/min, $k_{eff} = 1 \cdot 10^{-5}$ cm/s, N (Segmente)= 20, $D_{ax} = 1,18e-3$	114

7 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 56: Simulation der Trennung der mAb02 Ladungsvarianten auf Prototyp Resin 1 unter Verwendung eines pH-Gradienten bei 50 mmol/L (A), 75 mmol/L (B), 100 mmol/L (C) und 150 mmol/L (D). Gradientenlänge: 50 CV, Flussrate: 1 mL/min, $k_{\text{eff}} = 1 \cdot 10^{-5}$ cm/s, N (Segmente)= 20, $D_{\text{ax}} = 1,18 \cdot 10^{-3}$ 115
- Abbildung 57: Simulation der Trennung der mAb02 Ladungsvarianten auf Prototyp Resin 1 unter Verwendung dualer Gradienten von A: 110 auf 50 mmol/L und pH 4,75 auf 8,75; B: 90 auf 50 mmol/L und pH 5,8 auf 8,5. Gradientenlänge: 50 CV, Flussrate: 1 mL/min, $k_{\text{eff}} = 1 \cdot 10^{-5}$ cm/s, N (Segmente)= 20, $D_{\text{ax}} = 1,18 \cdot 10^{-3}$... 116
- Abbildung 58: Simulation der Trennung der mAb02 Ladungsvarianten auf Prototyp Resin 1 unter Verwendung einer Dualen Gradienten (A) bei einer Gradientensteigung von 50 CV und einer Stufenelution (B) von 0 % auf 36 %, 67 % und 100 % Elutionspuffer. Bindepuffer: 90 mmol/L, pH 5,8, Elutionspuffer: 50 mmol/L, 8,5; Flussrate: 1 mL/min, Stufenlänge: 15 CV, Massentransferkoeffizienten: A: $k_{\text{eff}}(\text{Spezies 1}) = 5 \cdot 10^{-6}$ cm/s; $k_{\text{eff}}(\text{Spezies 2}) = 1 \cdot 10^{-5}$ cm/s; $k_{\text{eff}}(\text{Spezies 3}) = 1,2 \cdot 10^{-5}$ cm/s; B: $k_{\text{eff}}(\text{Spezies 1}) = 7,7 \cdot 10^{-5}$ cm/s; $k_{\text{eff}}(\text{Spezies 2}) = 9,0 \cdot 10^{-5}$ cm/s; $k_{\text{eff}}(\text{Spezies 3}) = 3,7 \cdot 10^{-5}$ cm/s, N (Segmente)= 20, $D_{\text{ax}} = 1,18 \cdot 10^{-3}$ 117
- Abbildung 59: Modellierung von mAb05 auf Prototyp Resins 6 (A, B), 7 (C, D), 8 (E, F) und 9 (G, H) unter Verwendung des MMC/DIX-Modells und individuellem K_{S} -Wert. Bei der Bestimmung der Parameter werden Daten aus pH-Gradienten bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (linke Seite), Salzgradienten bei verschiedenen pH-Werten (rechte Seite) verwendet..... 119
- Abbildung 60: Bestimmte Parameter der Modellierung (A - F) und der Verteilungskoeffizient A (G, H) von mAb05 auf Prototyp Resins 6, 7, 8 und 9 unter Verwendung des MMC/DIX-Modells und individuellem K_{S} -Wert. 120
- Abbildung 61: Modellierung von mAb05 auf Prototyp Resins 6 (A, B), 7 (C, D) 8 (E, F) und 9 (G, H) unter Verwendung des MMC/DIX-Modells und individuellem n-Wert. Bei der Bestimmung der Parameter werden Daten aus pH-Gradienten bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (linke Seite), Salzgradienten bei verschiedenen pH-Werten (rechte Seite) verwendet..... 122
- Abbildung 62: Bestimmte Parameter der Modellierung (A - F) und der Verteilungskoeffizient A (G, H) von mAb05 auf Prototyp Resins 6, 7, 8 und 9 unter Verwendung des MMC/DIX-Modells und individuellem n-Wert. 123
- Abbildung 63: Modellierung von mAb05 auf Prototyp Resins 6 (A, B), 7 (C, D) 8 (E, F) und 9 (G, H) unter Verwendung des MMC/DIX-Modells und einer empirischen Beschreibung des n-Wertes. Bei der Bestimmung der Parameter werden Daten aus pH-Gradienten bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (linke Seite), Salzgradienten bei verschiedenen pH-Werten (rechte Seite) verwendet. 125
- Abbildung 64: Bestimmte Parameter der Modellierung (A - F) und der Verteilungskoeffizient A (G, H) von mAb05 auf Prototyp Resins 6, 7, 8 und 9 unter Verwendung des MMC/DIX-Modells und einer empirischen Beschreibung des n-Wertes. 126

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über verwendete Instrumente.	15
Tabelle 2: Übersicht über verwendete Computerprogramme.	15
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.	16
Tabelle 4: pH-Pufferrezept für Abschnitt 3.6: Modellierung der Trennung von Antikörper-Monomer, -Dimer und HMW Spezies auf einem starken Kationentauscher.	20
Tabelle 5: pH-Pufferrezept für Abschnitt 3.7: Modellierung von mAb05 auf Carboxy-, SO ₃ - und gemixten Kationentauschern.	21
Tabelle 6: Salzgradienten Pufferrezept für Abschnitt 3.7: Modellierung von mAb05 auf Carboxy-, SO ₃ - und gemixten Kationentauschern.	21
Tabelle 7: pH-Pufferrezept für Abschnitt 3.8: Modellierung der Trennung von Antikörper Ladungsvarianten auf Carboxy- und SO ₃ -Tauschern.....	22
Tabelle 8: Salzgradienten Pufferrezept für Abschnitt 3.8: Modellierung der Trennung von Antikörper Ladungsvarianten auf Carboxy- und SO ₃ -Tauschern.	22
Tabelle 9: pH Pufferrezept für Abschnitt 3.9: Modellierung von Carboxy-Mixed-Mode-Tauschern mit unterschiedlicher Aminosäure-Modifikation.	23
Tabelle 10: Salzgradienten Pufferrezept für Abschnitt 3.9: Modellierung von Carboxy-Mixed-Mode-Tauschern mit unterschiedlicher Aminosäure-Modifikation.....	23
Tabelle 11: Übersicht zur Ligandenzusammensetzung und Ligandendichte der verwendeten präparativen Ionenaustauschchromatographie-Resins.	24
Tabelle 12: Übersicht zur Ligandenzusammensetzung und Ligandendichte der verwendeten, präparativen Mixed-Mode Chromatographie-Resins.....	25
Tabelle 13: Übersicht zu den verwendeten HPLC-Säulen.....	25
Tabelle 14: Verwendete monoklonale Antikörper.	26
Tabelle 15: Puffer für Protein A-Chromatographie.....	26
Tabelle 16: Ablaufschema der LGE Experimente.	27
Tabelle 17: Ablaufschema der LGE-Experimente.....	44
Tabelle 18: pH-Pufferrezept für die CEX-HPLC-Analyse.....	50
Tabelle 19: Übersicht der Porositäten der verwendeten Chromatographie-Resins (Koch, 2017).....	60
Tabelle 20. Übersicht der berechneten Parameter der Modellierung von mAb05 unter der Verwendung des SD-Modells (Klutets et al., 2016).....	76

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 21: Übersicht der berechneten Parameter der Modellierung von mAb05 unter der Verwendung des DIX-Modells.	78
Tabelle 22: Ergebnis der Modellierung von mAb05 auf Prototyp Resin 1 und 4 unter Verwendung des SD-Modells.	84
Tabelle 23: Ergebnis der Modellierung von mAb05 auf Prototyp Resin 1 bis 4 unter Verwendung des DIX-Modells.	86
Tabelle 24: Ergebnis der Modellierung von mAb02 auf Eshmuno® CPX unter der Verwendung des SD-Modells (Seelinger, 2017).	102
Tabelle 25: Ergebnis der Modellierung von mAb02 auf Eshmuno® CPX unter der Verwendung des DIX-Modells.	104
Tabelle 26: Ergebnis der Modellierung von mAb02 auf dem Prototyp Resin 1 unter der Verwendung des DIX-Modells.	109

9 Lebenslauf

ÜBERSICHT

Name:	Felix Wittkopp
Geburtsdatum:	12.09.1988
Geburtsort:	Stuttgart
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Familienstand:	Ledig
Vater:	Dirk Wittkopp
Mutter:	Beate Wittkopp

SCHULISCHER WERDEGANG

09/1999 – 06/2008 Allgemeine Hochschulreife, Albert-Einstein-Gymnasium in Böblingen
Schwerpunkte Deutsch, Mathematik, Englisch, Chemie und Erdkunde
Abschlussnote: 2,2

AKADEMISCHER WERDEGANG

10/2014 - 10/2017 Promotion zum Dr. sc. hum. am Institut für Biochemie der Hochschule Mannheim
Kooperationsprojekt mit Merck Millipore und der medizinischen Fakultät Mannheim
der Universität Heidelberg.

09/2012 – 05/2014 Master of Science in Biotechnology, Hochschule Mannheim
Englischsprachiger Master mit dem Fokus auf Bioprocess Development
Abschlussnote: 1,2 mit Auszeichnung

03/2009 – 08/2012 Bachelor of Science der Biotechnologie, Hochschule Mannheim
Schwerpunkt: Industrielle Biotechnologie
Abschlussnote: 1,8

PUBLIKATIONEN

- 10/2015 S. Kluters, F. Wittkopp, M. Jöhnck, C. Frech, Application of linear pH gradients for the modeling of ion exchange chromatography: Separation of monoclonal antibody monomer from aggregates, Journal of Separation Science
- Wittkopp, F., Hafner, M., Peeck, L., and Frech, C. (2017a). Modeling and simulation of protein elution in linear pH and salt gradients on weak, strong and mixed cation exchange resins applying an extended Donnan Ion Exchange (DIX) model.
- Hedrich, J., Wittkopp, F., and Frech, C. (2017). Determining mass transfer coefficients from linear gradient experiments (DRAFT).
- Wittkopp, F., Hedrich, J., Peeck, L., and Frech, C. (2017b). Calculation of linear pH gradient buffer compositions for elevated salt concentrations using a discontinuous buffer system (DRAFT).

9 Lebenslauf

BERUFLICHER WERDEGANG

- Ab 12/2017 Scientist Chromatographie bei Roche Roche Diagnostics GmbH in Penzberg
Pharmaceutical Research and Early Development, Abteilung Downstream Processing
- 05/2014 – 10/2014 Angestellter bei Roche Diagnostics GmbH in Penzberg über headywayholding GmbH
Pharmaceutical Research and Early Development, Abteilung Downstream Processing
- 11/2013 – 04/2014 Masterarbeit bei Roche Diagnostics GmbH in Penzberg
Pharmaceutical Research and Early Development, Abteilung Downstream Processing
Thema: Depletion of product related impurities in new antibody formats.
- 09/2013 – 10/2013 Lab Project bei Roche Diagnostics GmbH in Penzberg
Pharmaceutical Research and Early Development, Abteilung Downstream Processing
Thema: Investigations of the Donnan Effect in high concentrated formulations.
- 03/2012 – 07/2012 Bachelorarbeit am Institut für Biochemie an der Hochschule Mannheim
Thema: Herstellung und Charakterisierung von artifiziellen Antikörper - Aggregaten
für die Extraktion in reversen Mizellensystemen.
- 08/2011 – 01/2012 Praktisches Studiensemester bei Mediagnost GmbH in Reutlingen
Thema: Validierung unterschiedlicher Elutionsbedingungen bei der Protein A
Chromatographie hinsichtlich der Aktivität der Antikörper.
- 07/2008 – 08/2008 Praktikum, bei BioRegio STERN Management GmbH
Praktikum im Bereich der Wirtschaftsförderung in der Biotechnologie und
Medizintechnik im Raum Stuttgart.

POSTER

- 11/2016 Modeling of anion-exchange chromatography: Influence of ligand density on
Donnan equilibrium and protein separation, ISPPP, Salzburg, Österreich
- 06/2016 Modeling of linear pH and salt gradient elution on weak cation exchange resins,
PREP Symposium, Philadelphia, USA
- Modeling of anion-exchange chromatography: Influence of ligand densities on
protein separation, PREP Symposium, Philadelphia, USA

AWARDS

- 07/2016 Best Poster Award Honorable Mention, PREP Symposium, Philadelphia, USA

10 Danksagungen

Zu Beginn möchte ich mich bei Prof. Dr. Hafner für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die organisatorische Unterstützung bedanken.

In besonderem Maße bedanke mich auch bei Prof. Dr. Christian Frech für die breite Unterstützung, die zahllosen Anregungen und Diskussionen, die gemeinsamen Berechnungen und die Möglichkeit meine Arbeit auf internationalen Konferenzen vorzustellen.

Ferner möchte ich mich bei den Kollegen von Merck KGaA in Darmstadt, insbesondere bei Dr. Lars Peeck, Dr. Michael Schulte, Dr. Romas Skudas und Dr. Matthias Jöhnck für die Unterstützung des während gesamten Projektes bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin Christian Koch für die breite Unterstützung im Labor und Andrea Benz für die organisatorische Unterstützung.

Auch bedanken möchte ich mich bei den Doktoranden des Biochemie Labors Gabriela Sanchez Reyes, Simon Kluters und Yi Feng Lee.

Mein Dank gilt ebenfalls den von mir betreuten Studenten Tim Berger, Jonas Koch, David Wohlfahrt, Felix Seelinger, Anne Farken, Jan Hedrich, Carolin Stange, Irina Paul und Maja Beirow.

Schlussendlich bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Biochemie Labors der Fachhochschule Mannheim Sabine Funk, Dr. Marc Potempa und Elke Gebauer.

„Tu es oder tu es nicht. Es gibt kein Versuchen.“

Yoda, Star Wars: Das Imperium schlägt zurück