

Magnettechnologische Reinigung von Gonadotropin aus Pferdeserum

zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (Dr.-Ing.)

der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte
DISSERTATION

von
Dipl. Biol. Christine Müller
aus Kaiserslautern

Referent: Prof. Dr. M. Franzreb

Korreferent: Prof. Dr. C. Syldatk

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2011

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 2008 bis 2011 im Institut für Funktionelle Grenzflächen am Karlsruher Institut für Technologie.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr.-Ing. Matthias Franzreb, für seine stets hervorragende Betreuung, außerordentliche Unterstützung in Form von vielen konstruktiven Diskussionen und Verbesserungsvorschlägen sowie den Freiraum zur Verwirklichung eigener Ideen.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Christoph Syldatk für die Übernahme des Korreferates. Ich danke dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi) für die Förderung des Verbundprojektes. Bei den Mitgliedern des Verbundprojektes möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Darüberhinaus bedanke ich mich bei Elena Heidenreich, Kerstin Appenzeller, Patricia Müller und Kai Schwer, die im Rahmen ihrer Diplomarbeit oder Praktika mich in meiner Arbeit stets konstruktiv unterstützten.

Besonderer Dank gilt den Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Prozesstechnik partikelbasierter Grenzflächen“ für die entspannte Arbeitsatmosphäre, Freundschaft und Unterstützung. Insbesondere gilt mein Dank Ingo Fischer, Sibylle Heidt, Tobias Müller, Martin Silvestre und Jonas Wohlgemuth.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich mit viel Geduld durch meine gesamte Ausbildung begleitet haben.

Ich versichere wahrheitsgemäß, die Dissertation bis auf die angegebene Hilfe selbständig angefertigt, alle benutzten Hilfsmittel vollständig und genau angegeben und alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten anderer und eigenen Veröffentlichungen unverändert oder mit Änderungen entnommen wurde.

Christine Müller

Zusammenfassung

Bei biotechnologischen Prozessen existiert ein zunehmender Bedarf an kostengünstigen und effizienten Verfahren der Bioproduktaufarbeitung, wobei ein wichtiger Gesichtspunkt dabei die Reduktion der Prozessschritte im sogenannten Downstream-Processing (DSP) ist. Eine vielversprechende Möglichkeit hierzu ist die Reinigung von Bioprodukten direkt aus Biorohsuspensionen durch den Einsatz magnetischer Sorbentien in Kombination mit einer Hochgradienten-Magnetseparation (HGMS). Die Immobilisierung von Ionenaustauschergruppen oder Affinitätsliganden auf den magnetischen Sorbentien ermöglicht eine selektive Abtrennung der Zielkomponente aus der Suspension. Das als „High Gradient Magnetic Fishing“ (HGMF) bezeichnete Verfahren vereint die Arbeitsschritte der Fest-Flüssig Trennung und der ersten Reinigung des Zielmoleküls. Innerhalb des letzten Jahrzehntes wurden zahlreiche HGMF-Laborstudien zur Reinigung von Proteinen aus verschiedenen Ausgangsmedien, wie z.B. Zellhomogenisate oder Molke, veröffentlicht. Bis heute fehlt aber ein kommerzielles HGMF-System bzw. ein Anwendungsfall mit direkter praktischer Relevanz. Im Gegensatz hierzu finden magnetische Sorbentien aber zahlreiche kommerzielle Anwendungen im Bereich der Bioanalytik, wie z.B. zur Isolation von Nukleinsäuren.

In Anbetracht dieses Stands der Technik war das Ziel der vorliegenden Dissertation die Reinigung des Glykoproteins „equine chorionic gonadotropin“ (eCG) unter dem Einsatz magnetischer Anionenaustauschersorbentien im Pilotmaßstab bis ca. 100 L zu untersuchen und den Prozess hinsichtlich seiner Ausbeute und Produktreinheit zu optimieren. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit war die hydrodynamische Charakterisierung und Inbetriebnahme einer in Kooperation mit Verbundpartnern konstruierten und kommerzialisierten HGMF-Anlage. Der realisierte Maßstab der Anlage liegt bei einem Fassungsvermögen des magnetischen Filters von 100 g magnetischer Sorbentien und erlaubt hierdurch die Reinigung des Proteins eCG aus ca. 110 L Serum pro Zyklus.

Das Glykoprotein eCG findet häufig Anwendung zur Steuerung des Reproduktionszyklus in landwirtschaftlichen Nutzbetrieben und wird derzeit konventionell aus dem Blut trächtiger Stuten mittels verschiedener Präzipitationsmethoden und anschließenden chromatographischen Trennschritten gewonnen. Zur Demonstration der Effizienz des HGMF-Verfahrens wurden zunächst diese konventionellen Reinigungsschritte zur Isolation von eCG aus Serum etabliert und auf die Anwendung magnetischer Anionenaustauscher, die von Verbundpartner zur Verfügung gestellt wurden, übertragen. Durch die Anwendung magnetischer Sorbentien anstelle

konventioneller Chromatographiemedien konnte eine Steigerung der Ausbeute um ca. 17 % erreicht werden, wobei der im Anschluss an den HGMF-Prozess durchgeführte Bioassay (Firma Biologika GmbH, Dessau-Roßlau, Deutschland) den Erhalt der biologischen Aktivität bestätigte. Mit einer Gesamtausbeute von 40 % ist das HGMF-Verfahren mit konventioneller Vorreinigung jedoch nicht wirtschaftlich.

Das Ausgangsmittel Pferdeserum ist aufgrund der hohen Leitfähigkeit von 10-13 mS cm⁻¹ und der hohen Proteinkonzentration von 50-60 mg ml⁻¹ nicht für eine direkte eCG-Reinigung an Anionenaustauschermaterialien geeignet. Versuche im Labormaßstab zeigten, dass ausreichende Sorptionsbedingungen bei einer Leitfähigkeit von ca. 1 mS cm⁻¹ und einer Gesamtproteinkonzentration von < 1 mg mL⁻¹ vorliegen. Durch eine Vereinfachung der in der Literatur beschriebenen konventionellen Schritte zum Erreichen dieser Werte konnte eine Reduktion des Ethanolverbrauchs um zwei Drittel sowie eine Verkürzung der Prozessdauer der benötigten Vorreinigung um 20 Stunden erreicht werden. Die anschließende automatisierte Reinigung des eCG an der HGMF-Pilotanlage führte zu einem Produkt mit einer spezifischen Aktivität von bis zu 1300 IU mg⁻¹ im Bioassay, was die für den Einsatz in der Reproduktionsmedizin geforderten Vorraussetzungen von einer Reinheit des eCG von ≥ 1000 IU mg⁻¹ erfüllt. Mit diesem optimierten Prozess konnten allein unter Berücksichtigung des zweiten Eluates Gesamtausbeuten von bis zu 56 % erreicht werden, bei einem Konzentrierungs- bzw. Aufreinigungsfaktor von bis zu 6,6 bzw. 2650. Werden die im ersten und dritten Eluat gewonnenen eCG-Mengen zusätzlich berücksichtigt, errechnet sich ein Erhalt der biologischen Aktivität des ursprünglich im Serum enthaltenen eCGs von über 60 %, wobei die Reinheit dieser weiteren Eluate nicht den Grad des zweiten Eluates erreicht. Die Verluste an Menge und Aktivität des eCG treten dabei größtenteils im Zuge der Vorreinigung auf, der Ausbeuteverlust innerhalb des HGMF-Prozesses beträgt dagegen lediglich 5-10 %.

Eine direkte Gegenüberstellung der Effizienz magnetischer Sorbentien im Vergleich zu konventionellen Chromatographiemedien unter Verwendung einer nach vereinfachter Vorreinigung erhaltenen eCG-Lösung zeigt, dass durch Einsatz der magnetischen Anionenaustauschersorbentien eine 22 % höhere Ausbeute erzielt werden konnte. Der Aufreinigungsfaktor konnte bezogen auf das zweite Eluat um den Faktor 1,4, der Konzentrierungsfaktor um den Faktor 2,8 gesteigert werden. Die spezifische Aktivität der jeweiligen Eluate betrug 581 IU_{ELISA} mg⁻¹ nach Reinigung an konventionellen Chromatographiemedien bzw. 1951 IU_{ELISA} mg⁻¹ nach Reinigung an magnetischen Anionenaustauschern.

Ein weiterer Gesichtspunkt in Hinblick auf die Produktivität und Wirtschaftlichkeit des HGMF-Prozesses ist die Partikelrückgewinnung aus dem magnetischen Filter sowie die Wiederverwendbarkeit der magnetischen Anionenaustauschersorbentien. Bei einem Einsatz von 100 g magnetischer Sorbentien in einem mit verdünntem Serum simulierten Reinigungsprozess gingen lediglich 0,3 % der eingesetzten Partikel über den Ablauf des Separators verloren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Rezyklierbarkeit der magnetischen Anionenaustauschersorbentien mindesten 70 Zyklen beträgt.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass zumindest für das untersuchte Beispiel der Gewinnung von eCG aus Serum, der HGMF-Prozess einer konventionellen Reinigung über Fest-Flüssig-Trennung und Chromatographie im Hinblick sowohl auf Ausbeute als auch Reinheit überlegen ist und zudem die magnetischen Sorbentien eine gute Beständigkeit zeigten. Der HGMF-Prozess ist somit eine interessante Alternative zur Proteinreinigung aus komplexen Medien, wobei mit dem in Kooperation entwickelten Separator erstmals ein kommerzielles Gerät zur Durchführung des Verfahrens mit bis zu 100 g Sorbensmaterial je Zyklus verfügbar ist.

Abstract

Biotechnological processes increasingly require low-cost and efficient bioproduct processing methods, a major aspect being the reduction of process steps in so-called downstream processing (DSP). A highly promising option consists in the purification of bioproducts directly from raw biological suspensions by using magnetic sorbents in combination with high-gradient magnetic separation (HGMS). Immobilization of ion exchanger groups or affinity ligands on magnetic sorbents allows for a selective separation of the target component from the suspension. The method that is also referred to as “High-gradient Magnetic Fishing” (HGMF) combines the steps of solid-liquid separation with the first purification of the target molecule. In the past decade, numerous HGMF laboratory studies relating to the purification of proteins from various starting media, such as cell homogenates and whey, were published. However, a commercial HGMF system or application of direct practical relevance is still lacking. In contrast to this, numerous commercial applications of magnetic sorbents are encountered in bioanalysis, e.g. for the isolation of nucleic acids.

In view of this state of the art, the present Ph.D. thesis was aimed at studying purification of the equine chorionic gonadotropin (eCG) glycoprotein by means of magnetic anion exchanger sorbents on the pilot scale of up to about 100 l and at optimizing the process in terms of yield and product purity. The thesis also focused on hydrodynamic characterization and commissioning of a commercial HGMF plant constructed in cooperation with industry partners. The plant is equipped with a magnetic filter containing 100 g of magnetic sorbents that allow for the separation of the eCG protein from about 110 l serum per cycle.

The eCG glycoprotein is frequently used to control the reproduction cycle on farms and is presently extracted conventionally from the blood of mares in foal using various precipitation methods and subsequent chromatographic separation. To demonstrate the efficiency of the HGMF method, these conventional purification steps for the isolation of eCG from serum were established first and transferred to the application of magnetic anion exchangers made available by the cooperation partners. Use of the magnetic sorbents instead of conventional chromatography media caused the yield to increase by about 17 %. The bioassay performed after the HGMF process (Company Biologika GmbH, Dessau-Roßlau, Germany) confirmed the conservation of biological activity. With a total yield of 40 %, the HGMF process with conventional precleaning, however, is not economically efficient.

Due to the high conductivity of 10-13 mS cm⁻¹ and the high protein concentration of 50-60 mg ml⁻¹, the horse serum starting medium is not suited for direct eCG purification on anion exchanger materials. It was demonstrated by tests on the laboratory scale that sorption conditions are satisfactory at a conductivity of about 1 mS cm⁻¹ and a total protein concentration of < 1 mg ml⁻¹. By a simplification of the conventional steps described in literature to reach these values, ethanol consumption was reduced by two thirds and process duration of the precleaning step required was shortened by 20 hours. Subsequent automatic purification of the eCG in the HGMF pilot plant led to a product with a specific activity of up to 1300 IU mg⁻¹ in the bioassay, which meets the requirement of an eCG purity of ≥ 1000 IU mg⁻¹ for use in reproduction medicine. With this optimized process, total yields of up to 56 % from the second eluate alone were reached at a concentration and purification factor of up to 6.6 and 2650, respectively. When considering the eCG quantities separated from the first and third eluates in addition to that extracted from the second eluate, more than 60 % of the biological activity of eCGs originally contained in the serum were conserved, with the purity of these other eluates not reaching that of the second eluate. The losses of quantity and activity of the eCG largely occur during preliminary cleaning, the loss of yield during the HGMF process amounts to 5-10 % only.

Direct comparison of the efficiency of magnetic sorbents with that of conventional chromatography media using an eCG solution obtained after simplified preliminary cleaning shows that the yield reached with magnetic anion exchanger sorbents is 22 % higher. With respect to the second eluate, the purification factor was increased by a factor of 1.4, the concentration factor was enhanced by a factor of 2.8. Specific activity of the eluate amounted to 581 IU_{ELISA} mg⁻¹ after cleaning on conventional chromatography media and to 1951 IU_{ELISA} mg⁻¹ after cleaning on magnetic anion exchangers.

Other important aspects in terms of productivity and economic efficiency of the HGMF process are particle recovery from the magnetic filter and reusability of the magnetic anion exchanger sorbents. When using 100 g of magnetic sorbents in a cleaning process simulated with diluted serum, only 0.3 % of the particles used were lost via the separator discharge. It was also demonstrated that the recyclability of the magnetic anion exchanger sorbents amounts to 70 cycles at least.

To sum up, it must be stated that, for the studied example of the extraction of eCG from serum at least, the HGMF process is superior to conventional cleaning by solid-liquid separation and chromatography in terms of both yield and purity. Moreover, the magnetic sorbents were found to be highly stable. Hence, the HGMF process is an interesting alternative to protein separation from complex media. With the separator developed together with the cooperation partners, a first

commercial device is now available for the execution of the process with up to 100 g of sorbent material per cycle.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung und Zielsetzung | 1 |
| 2 | Grundlagen und Stand des Wissens | 3 |
| 2.1 | Konventionelle Verfahren der Bioproduktaufarbeitung | 3 |
| 2.2 | Verfahren zur direkten Abtrennung von Bioprodukten aus Suspensionen | 6 |
| 2.3 | Einsatz magnetischer Sorbentien in der Bioproduktaufarbeitung | 7 |
| 2.4 | Grundlagen der Magnetseparation | 9 |
| 2.4.1 | High Gradient Magnetic Separation (HGMS) | 9 |
| 2.4.2 | Magnetische Kenngrößen | 12 |
| 2.4.2.1 | Magnetische Flussdichte und Induktion | 12 |
| 2.4.2.2 | Magnetische Feldstärke und Permeabilität | 13 |
| 2.4.2.3 | Polarisation und Suszeptibilität | 13 |
| 2.4.3 | Magnetisierungsverhalten und Magnetisierungskurve | 14 |
| 2.5 | Prinzip der Proteinisolierung durch Sorption an Festphasen | 15 |
| 2.5.1 | Ionenaustauschchromatographie | 17 |
| 2.6 | High Gradient Magnetic Fishing (HGMF) | 19 |
| 2.6.1 | Kenndaten des HGMF-Prozesses | 20 |
| 2.7 | Eigenschaften des Zielproteins equines Choriongonadotropin | 22 |
| 2.7.1 | Wirkmechanismus | 22 |
| 2.7.2 | Equines Choriongonadotropin (eCG) | 24 |
| 2.7.3 | Konventionelle Isolation | 26 |
| 2.7.4 | Rekombinante Herstellung | 28 |
| 2.8 | Kenngrößen der Proteinreinigung | 30 |
| 3 | Experimenteller Teil | 32 |
| 3.1 | Chemikalien | 32 |
| 3.2 | Magnetische Mikrosorbentien | 32 |
| 3.2.1 | Magnetisierbare Polyvinylalkohol Partikel (M-PVA) | 32 |
| 3.2.2 | Magnetisierbare Polysaccharid Partikel | 33 |
| 3.3 | Charakterisierung der magnetischen Mikrosorbentien | 33 |
| 3.3.1 | Magnetisierung | 34 |
| 3.3.2 | Partikelgrößenverteilung | 34 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.3.3 | Elektronenmikroskopische Aufnahmen | 34 |
| 3.3.4 | Proteinbindekapazität | 34 |
| 3.3.5 | Wiederverwendbarkeit der Partikel | 35 |
| 3.3.6 | Gravimetrische Bestimmung der Partikelkonzentration | 35 |
| 3.4 | Analytische Methoden | 35 |
| 3.4.1 | Gesamtprotein | 35 |
| 3.4.2 | Equines Choriongonadotropin (eCG) | 36 |
| 3.4.3 | Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) | 36 |
| 3.4.4 | Western Blot | 37 |
| 3.4.5 | Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-ToF-MS) | 38 |
| 3.4.6 | Enzymatische Deglykolisierung von Glykoproteinen | 39 |
| 3.5 | Reinigung von equinem Choriongonadotropin (eCG) aus Serum im Labormaßstab | 39 |
| 3.5.1 | Reinigung von eCG aus Serum | 39 |
| 3.5.1.1 | Konventionelle Reinigung von eCG | 40 |
| 3.5.1.2 | Vereinfachte Reinigung von eCG | 40 |
| 3.5.2 | Optimierung der Vorreinigung von eCG aus Serum | 40 |
| 3.5.3 | Ligandenscreening | 41 |
| 3.5.4 | Optimierung der Elutionsbedingungen | 42 |
| 3.5.5 | Optimierung der Partikelkonzentration | 43 |
| 3.5.6 | Binde- und Elutionskinetik | 43 |
| 3.6 | Proteinreinigung mit Hilfe der automatisierten HGMF-Laboranlage im 180 mL Maßstab | 43 |
| 3.7 | Hydrodynamische Charakterisierung der HGMF-Pilotanlage | 46 |
| 3.7.1 | HGMF-Pilotanlage | 46 |
| 3.7.2 | Pumpenkennlinie | 47 |
| 3.7.3 | Bestimmung des Volumens der Filterkassette | 48 |
| 3.7.4 | Bestimmung des Totvolumens und der Verweilzeit über Tracerversuche | 48 |
| 3.7.5 | Bestimmung der Kapazität des magnetischen Filters | 48 |
| 3.7.6 | Bestimmung des Partikelverbleibes | 49 |
| 3.7.7 | Optimierung der Waschschritte im automatisierten HGMF-Prozess | 49 |
| 3.8 | Proteinreinigung mit Hilfe der automatisierten HGMF-Pilotanlage im 1 L Maßstab | 50 |
| 4 | Ergebnisse und Diskussion | 52 |
| 4.1 | Konventionelle Reinigung | 52 |
| 4.1.1 | Ligandenscreening | 55 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.2 | Charakterisierung der magnetischen Anionenaustauschersorbentien | 59 |
| 4.2.1 | Magnetisierung | 59 |
| 4.2.2 | Partikelgrößenverteilung | 60 |
| 4.2.3 | Elektronenmikroskopische Aufnahmen | 62 |
| 4.3 | Übertragung konventioneller eCG-Reinigung auf magnetische Sorbentien | 63 |
| 4.4 | Optimierung der Reinigung von eCG im Labormaßstab | 65 |
| 4.4.1 | Grobe Vorreinigung des Serums zur Isolation von eCG | 65 |
| 4.4.2 | Optimierung der vorgelagerten Prozessschritte | 67 |
| 4.4.3 | Vereinfachte Reinigung von eCG im Labormaßstab | 71 |
| 4.4.4 | Optimierung der Wasch- und Elutionsbedingungen | 75 |
| 4.4.5 | Optimierung der Partikelkonzentration | 77 |
| 4.4.6 | Sorptionsisotherme von eCG an M-PVA-DEAP Partikeln | 78 |
| 4.4.7 | Adsorptions- und Desorptionskinetik | 80 |
| 4.4.8 | Wiederverwendbarkeit der Partikel | 81 |
| 4.5 | Hydrodynamische Charakterisierung der HGFM-Pilotanlage | 84 |
| 4.5.1 | Pumpenkennlinie | 84 |
| 4.5.2 | Tracerversuche | 85 |
| 4.5.3 | Bestimmung der Kapazität des magnetischen Filters | 88 |
| 4.5.4 | Optimierung der Waschschrte im HGFM-Prozess | 89 |
| 4.6 | Isolierung von eCG mit Hilfe der HGFM-Pilotanlage | 90 |
| 4.6.1 | Erster HGFM-Prozesses: Bestimmung der maximalen Bindekapazität | 92 |
| 4.6.2 | Zweiter HGFM-Prozesses: Multibatchbetriebsweise mit Partikelrezyklierung | 93 |
| 4.6.3 | Dritter HGFM-Prozesses | 98 |
| 4.6.4 | Vierter HGFM-Prozesses | 100 |
| 4.7 | Aktivitätsbestimmung <i>in vivo</i> | 102 |
| 4.8 | Bestimmung des Partikelverlustes im HGFM-Prozess | 104 |
| 4.9 | Effizienz des HGFM-Prozesses zur Reinigung von eCG | 105 |
| 4.10 | Weitere Vorteile der vereinfachten eCG-Vorreinigung | 109 |
| 4.11 | Analyse des Reinigungsprozesses mittels MALDI-ToF-MS | 111 |
| 4.11.1 | Deglykolisierung | 119 |
| 5 | Fazit und Ausblick | 124 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 127 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 7 | Anhang | 135 |
| 7.1 | Modifikation der Lösungsmittelfällung | 135 |
| 7.2 | DoE-Arbeitsblätter der Optimierung vorgelagerter Prozessschritte | 136 |
| 7.3 | Bandenintensität im SDS-Page unter dem Einfluss von Ethanol | 137 |
| 7.4 | Programmstruktur des Reinigungsprozesses an der HGMF-Laboranlage | 138 |
| 7.5 | Programmstruktur des Reinigungsprozesses an der HGMF-Pilotanlage | 139 |
| 7.6 | Messung der Fließeigenschaften | 140 |
| 7.7 | Optimierung der Waschschrirte im automatisierten HGMF-Prozess | 141 |
| 7.8 | Ligandenscreening | 141 |
| 7.9 | Formelzeichen und Symbole | 143 |
| 7.10 | Verwendete Abkürzungen | 144 |

1 Einleitung und Zielsetzung

Eine Vielzahl biotechnologischer Prozesse beinhaltet die Abtrennung und Reinigung biologischer Wertprodukte aus unterschiedlichen Ausgangsmitteln, wie z.B. Fermentationsbrühen, pflanzlichen Zellaufschlüssen oder tierischen Seren. Entsprechende Prozesse erfordern im Rahmen der Bioproduktaufarbeitung („Downstream-Processing“) einen mehrstufigen Reinigungsprozess, um das Produkt in der geforderten Reinheit zu erhalten. Die benötigten Verfahrensschritte bestehen gewöhnlich aus einer Filtration, Zentrifugation oder Sedimentation zur Entfernung der Feststoffanteile aus der vorliegenden Suspension mit anschließender chromatographischer Trennung. Die Vielzahl der benötigten Reinigungsschritte trägt jedoch zu einer Erhöhung der Betriebskosten und zu einem erheblichen Produktverlust, z.B. durch Adsorption an die abgetrennten und verworfenen Bestandteile, bei.

Ein aussichtsreicher Weg zur Vereinfachung der Aufarbeitung von Bioprodukten ist die Isolierung der Produkte direkt aus feststoffhaltigen Lösungen durch Sorption an geeignete Sorbentien. Verfahren, die in diesem Zusammenhang eine Verkürzung konventioneller Prozesse ermöglichen, sind die „Aqueous Two Phase Separation“ (ATPS) [Janson & Rydén 1998; Kula & Selber, 1999] und die „Expanded Bed Adsorption“ (EBA) [Kennedy, 2001]. Eine weitere Möglichkeit der direkten Bioproduktisolierung besteht in der Verwendung magnetischer Mikrosorbentien in Kombination mit Magnetseparatoren. Die Immobilisierung von Affinitätsliganden auf den magnetischen Mikropartikeln ermöglicht eine selektive Abtrennung der Zielkomponente. In einem ersten Schritt werden die magnetischen Mikrosorbentien zur Bindung der Zielkomponente dem Ausgangsmittel zugegeben, wobei die große spezifische Oberfläche der magnetischen Sorbentien eine schnelle Bindung des Produktes ermöglicht. Im Anschluss werden die beladenen magnetischen Sorbentien mittels Magnetseparation selektiv vom Rest der Lösung abgetrennt. Die nach dem Verwerfen des Überstandes folgenden Wasch- und Elutionsschritte liefern das Zielprodukt in gereinigter und oftmals auch aufkonzentrierter Form. Das Prinzip der Bioproduktaufarbeitung unter dem Einsatz magnetischer Sorbentien, das sogenannte „High Gradient Magnetic Fishing“ (HGMF), wurde bereits mehrfach im Labormaßstab demonstriert. Der Begriff „High Gradient Magnetic Fishing“ leitet sich dabei aus dem Sorptionsschritt im Batch Reaktor („Fishing“) und der anschließenden Hochgradienten-Magnetseparation ab [Hubbuch, 2001].

Magnetfilter mit einem Separationsvolumen von bis zu 16 mL wurden bereits im Jahr 2001 [Hubbuch et al., 2001] zur direkten Isolation von Proteasen aus Fermentationsbrühen eingesetzt.

In späteren Arbeiten am Forschungszentrum Karlsruhe wurden erstmals etwas größere, automatisierte Magnetseparatoren entwickelt [Hoffmann, 2003] sowie Versuche zur Reinigung von Proteinen im 46 mL Separationsmaßstab durchgeführt [Ebner, 2006; Meyer, 2004]. Bis zum jetzigen Zeitpunkt existiert aber keine kommerzielle Anwendung von Magnetpartikeln im technischen Maßstab. Ein kommerzielles „scale-up“ erfordert ein Verfahren zur Herstellung magnetischer Sorbentien im Kilogramm-Maßstab sowie die Entwicklung eines speziell für eine biotechnologische Anwendung geeigneten Magnetseparators mit einem Filtervolumen von mindestens 1 L, entsprechend einem pro Zyklus behandelbaren Suspensionsvolumen von ca. 20 bis 100 L.

Aufbauend auf den genannten Vorarbeiten, war das Ziel dieser Arbeit die Entwicklung und Erprobung eines HGMF-Verfahrens im halbtechnischen Maßstab, das die Reinigung des kommerziell relevanten Glykoproteinhormons „equine chorionic gonadotropin“ (eCG) aus Serum erlaubt. Gonadotropin-Präparate finden in landwirtschaftlichen Nutzbetrieben Anwendung zur Steuerung des Reproduktionszyklus. Für die Anwendung in der Reproduktionsmedizin werden Dosierungen von ca. 500-3000 IU pro Tier benötigt, bei einer geforderten Reinheit des eingesetzten Präparats von $> 1000 \text{ IU mg}^{-1}$ [Frey und Löscher, 2009].

Im ersten Abschnitt der Arbeit sollten als Reverenz zur Beurteilung der Effizienz der magnetotechnologischen Reinigung konventionelle Reinigungsmethoden für das Serumprotein eCG mittels verschiedener Fällungsmethoden und anschließenden chromatographischen Trennschritten etabliert werden. Der zweite Abschnitt umfasste die Untersuchung der Eignung unterschiedlicher magnetischer Anionenaustauschersorbentien zur Reinigung des Proteins, wobei von Verbundpartnern synthetisierte sowie kommerzielle magnetische Mikrosorbentien eingesetzt werden sollten. Ein in einer Kooperation des Karlsruher Instituts für Technologie, der Firma chemagen Biopolymer AG und der Firma ABBIS bio process automation im Verlauf der Dissertation entwickelter Durchfluss-Magnetseparator sollte die Reinigung des Proteins im Maßstab bis zu 100 L Serum ermöglichen. Die Aufgabenstellung für den dritten Abschnitt der Arbeit beinhaltete daher die hydrodynamische Charakterisierung des entwickelten Durchfluss-Magnetseparators sowie die Optimierung der Reinigung des Proteins eCG unter Einsatz eines HGMF-Prozesses. Schwerpunkte waren hierbei die eingehende Charakterisierung des mittels HGMF gewonnen Produkts hinsichtlich Reinheit und biologischer Aktivität sowie die Beurteilung der Effizienz des Verfahrens gegenüber der etablierten Säulenchromatographie. Die Arbeit wurde im Rahmen des Verbundvorhabens „ProGonado“ des Bundesministeriums für Wirtschaft und Technologie durchgeführt.

2 Grundlagen und Stand des Wissens

2.1 Konventionelle Verfahren der Bioproduktaufarbeitung

Biotechnologische Prozesse bestehen meist aus der Isolation löslicher Biomoleküle aus feststoffhaltigen Ausgangsmitteln, wie Fermentationsbrühen, pflanzlichen Zellaufschlüssen oder tierischen Seren. Konventionelle Verfahren der Aufarbeitung von Bioprodukten beinhalten als ersten echten Reinigungsschritt häufig chromatographische Trennverfahren im Festbett, wobei eine Entfernung der Feststoffbestandteile aus der Biosuspension voraus gehen muss.

Die aufeinanderfolgenden Teilschritte der Bioproduktaufarbeitung werden als Downstream-Processing (DSP) bezeichnet. Der Prozess lässt sich in die folgenden vier Teilbereiche gliedern [Ladisch, 2001; Harrison et al., 2003]:

- Fest-flüssig Trennung durch beispielsweise Filtration, Zentrifugation oder Sedimentation
- Isolation des Zielproduktes durch Adsorption, Fällung, Ultrafiltration, Lösungsmittelextraktion
- Feinreinigung des Produktes durch chromatographische Verfahren
- Veredelung („Polishing“) durch Kristallisation, Trocknung sowie die Entfernung von Viren oder Pyrogenen durch Sterilfiltration

Die Vielzahl der Schritte eines konventionellen DSP Verfahrens führen zu hohen Betriebs- und Investitionskosten sowie zu einem Produktverlust im Rahmen jedes durchgeführten Verfahrensschrittes. Abbildung 2.1 veranschaulicht den Produktverlust als Konsequenz eines vielstufigen Reinigungsverfahrens am Beispiel von Proteinen. Selbst bei einer hohen stufenspezifischen Ausbeute an Zielprodukt von 95 % beträgt die Gesamtausbeute nach 10 Reinigungsschritten lediglich 60 %. Bei einer niedrigeren Stufenausbeute von z.B. 75 % beträgt die Gesamtausbeute nach 10 Schritten nur noch 5 % des ursprünglich in der Ausgangslösung vorhandenen Produktes.

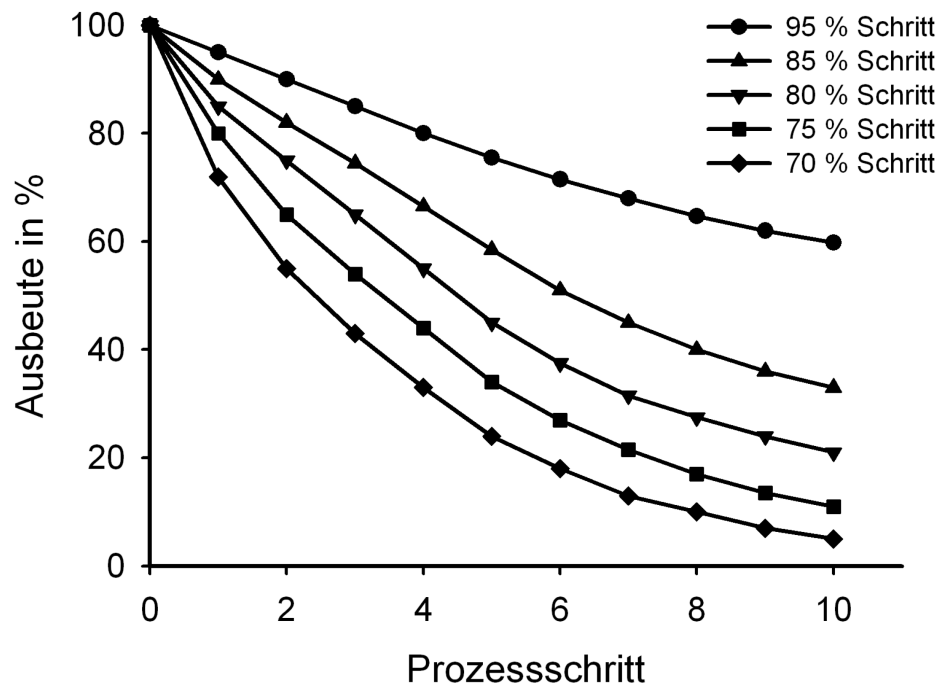


Abbildung 2.1: Theoretische Ausbeute eines mehrstufigen Reinigungsprozesses von Proteinen. Jede Kurve repräsentiert einen mehrstufigen Prozess, mit der in der Legende aufgeführten mittleren Stufenausbeute pro vorgenommenen Reinigungsschritt [nach Williams, 2001]

Neben den oftmals hohen Kosten der einzelnen Verfahrensschritte im DSP ist ein weiteres Problem das an Chromatographie- oder Filtrationsmedien auftretende Fouling, durch unzureichende Entfernung suspendierter Feststoffe im Prozessschritt der fest-flüssig Trennung, was die Standzeit der Materialien verkürzt [Amersham Pharmacia Biotech, 2000].

Abbildung 2.2 zeigt ein Schema der üblichen, konventionellen Reinigung löslicher rekombinanter Proteine aus Zellen. Die Extraktion des Zielproteins ist dabei abhängig von dessen Lokalisation.

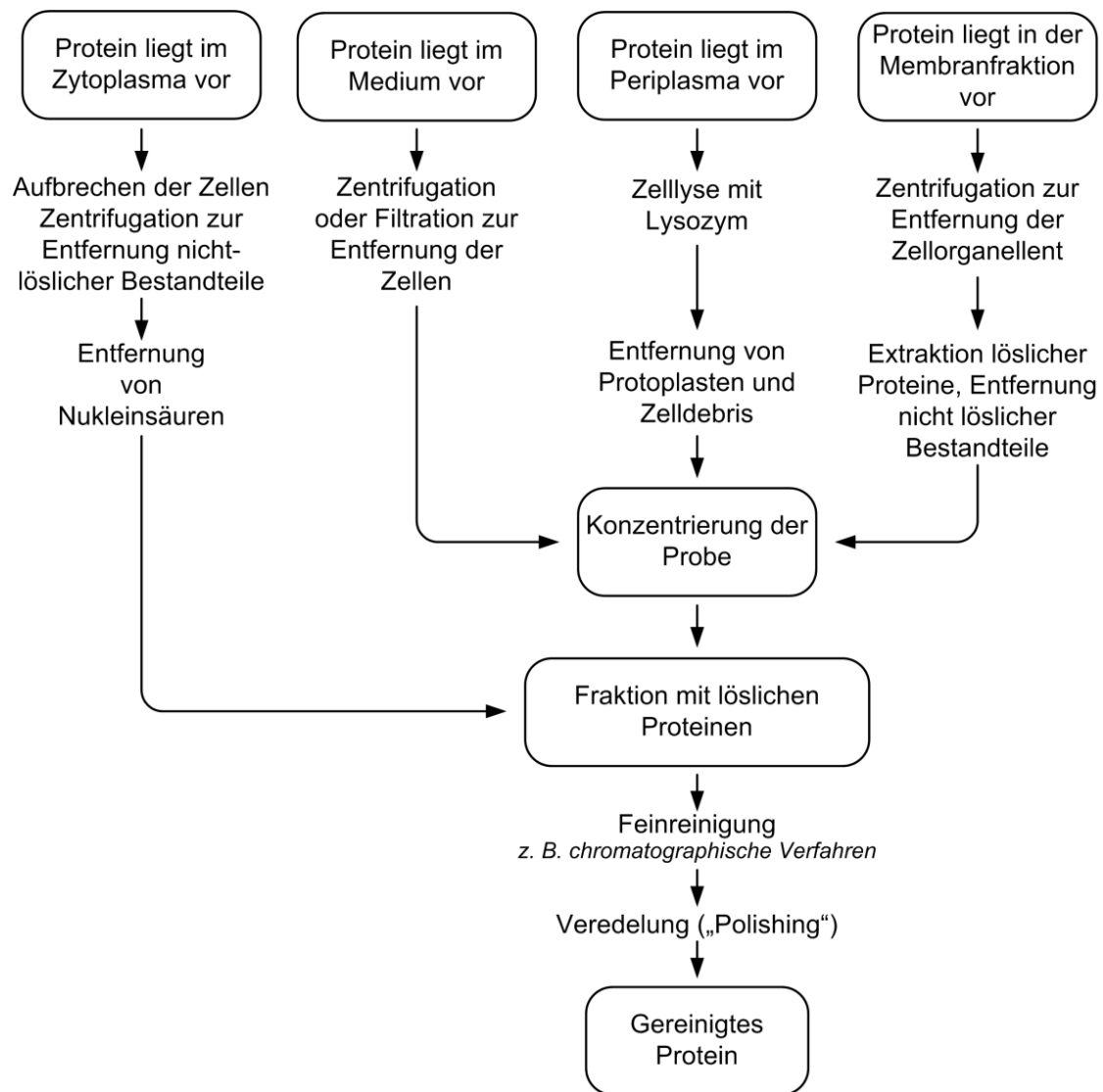


Abbildung 2.2: Schemata der Reinigungsprozesse für lösliche rekombinante Proteine, die sich im Zytoplasma befinden, ins Medium ausgeschieden werden, bzw. sich im Periplasma oder der Membranfraktion befinden. Der erste Schritt beinhaltet die Freisetzung des Zielproteins sowie die Entfernung ungelöster Bestandteile wie Zellen oder Zelldebris. Im Anschluss folgen konventionelle mehrstufige Reinigungsschritte [nach Scopes, 2001]

Tabelle 2.1 zeigt den Absatzmarkt ausgewählter rekombinant hergestellter Biopharmazeutika im Jahr 2001. Der Weltmarkt für Biopharmazeutika überschritt 2005 bereits 40 Billionen US-Dollar, was einer Verdreifachung innerhalb der vorangegangenen vier Jahre darstellt [Melmer, 2005].

Tabelle 2.1: Absatzmarkt ausgewählter Biopharmazeutika [Melmer, 2005]

| Produkt | Indikation | Absatzmarkt in US\$ Millionen |
|------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| Erythropoietin | Anämie | 6803 |
| Insulin | Diabetes | 4017 |
| Interferon beta | Multiple Sklerose, Hepatitis | 2087 |
| Interferon alpha | Krebs, Hepatitis | 1832 |
| Monoklonale Antikörper | unterschiedlich | 1751 |
| Wachstumshormone | Wachstumsstörungen | 1706 |
| Interleukin | Krebs, Immunologie | 184 |
| Wachstumsfaktoren | Wundheilung | 115 |
| Impfstoffe | unterschiedlich | 50 |

2.2 Verfahren zur direkten Abtrennung von Bioprodukten aus Suspensionen

Moderne Verfahrensansätze zur direkten Bioproduktaufarbeitung, die in der Lage sind mehrere ursprünglich unabhängige Prozessschritte in einer Stufe zu kombinieren, werden zur Zeit in vielen aktuellen Forschungsarbeiten untersucht. Zu diesen Verfahren gehört die in den folgenden Kapiteln ausführlich diskutierte Anwendung magnetischer Mikrosorbentien, aber auch der Einsatz wässriger Zweiphasensysteme („Aqueous Two-Phase Systems“ – ATPS) sowie die „Expanded Bed Adsorption“ (EBA).

Das ATPS-Verfahren beruht auf der Trennung von Proteinen zwischen zwei nicht mischbaren flüssigen Phasen. Klassischerweise entstehen diese durch das Lösen zweier Polymere (z.B. Polyethylenglykol, Dextran) in Wasser, oder eines Polymers (z.B. Polyethylenglykol) und eines geeigneten Salzes (z.B. Kalium-, Natriumphosphat) [Janson & Rydén, 1998]. Feststoffbestandteile der Biorohsuspension werden in der einen Phase gesammelt, während das Zielprotein sowie eventuell andere Proteine sich in der anderen Phase anreichern [Kula & Selber, 1999]. Eine eingehende Beschreibung der Anwendung des ATPS-Extraktionsverfahrens findet sich in der Arbeit von *Becker* [2009].

Die Expanded Bed Adsorption (EBA) ist ein skalierbares Verfahren, das eine Kombination der Schritte der Reinigung und der Konzentrierung des Proteins direkt aus feststoffhaltigen Suspensionen ermöglicht. EBA findet Anwendung bei der Reinigung von Proteinen, welche von scherpempfindlichen Zelllinien exprimiert werden. Der Reinigungsschritt der Fest-Flüssig-Trennung wie Zentrifugation oder Membranfiltration führt im Fall scherpempfindlicher Zellen zu deren Depletion und zu einer daraus resultierenden Verunreinigung des Produktes durch einen hohen Anteil an Fremdprotein. Im Fall der EBA entfällt dieser Reinigungsschritt.

Der Arbeitsgang der EBA unterteilt sich in folgende Schritte [Kennedy, 2001]:

- Herstellung des sedimentierten Bettes des Sorbens. (Zur Gewährleistung einer hinreichenden Bindungseffizienz, sollte eine Höhe von mind. 15 cm gewährleistet sein)
- Äquilibrierung des Sorbens mit Probenpuffer und Auftragen der Rohsuspension
- Auswaschen nicht gebundener Bestandteile, wie verbleibende Zellen oder Zelltrümmer
- Elution des Proteins im sedimentierten Festbett im Gegenstrom, wodurch eine Aufkonzentrierung des Proteins ermöglicht wird
- Regeneration des Adsorbent („cleaning in place“)

2.3 Einsatz magnetischer Sorbentien in der Bioproduktaufarbeitung

Die Verwendung magnetischer Mikrosorbentien in der Biotechnologie stellt eine weitere Alternative zur konventionellen mehrstufigen Bioproduktaufarbeitung aus ungeklärten Suspensionen dar.

Die nicht-porösen Sorbentien neigen im Gegensatz zu konventionellen in der Chromatographie eingesetzten porösen Materialien oder den porösen Sorbentien der Expanded Bed Adsorption nicht zum Fouling. Dies resultiert in einer höheren Wiederverwendbarkeit der magnetischen Mikrosorbentien, bedingt durch eine leichtere Reinigung des Materials. Bedingt durch das Fouling entstehen mit zunehmendem Einsatz der Materialien anwachsende Druckverluste über die Chromatographiemedien und ein dadurch bedingter Rückgang des Volumenstroms, ungeachtet der Verwendung partikelfreier Prozessströme [Amersham Pharmacia Biotech, 2000].

Eine entsprechend große Oberfläche der unporösen Materialien wird durch den Einsatz magnetischer Mikrosorbentien von nur wenigen μm erreicht. Kommerzielle Magnetpartikel besitzen in der Regel eine Größe von z.B. 1-3 μm bzw. 0,7-2,6 μm (Firma chemagen Biopolymer AG, Baesweiler, Deutschland bzw. Merck Chemie SAS, Fontenay-sous-Bois, Frankreich).

Erste Anwendungen magnetischer Materialien zur Isolation von Proteinen mit Hilfe von Affinitätsliganden finden sich bereits in den 1970er Jahren [Dunnill & Lilly, 1974]. Die ersten kommerziell erhältlichen Materialien Enzacryl FEO-(M) (Koch Light Laboratories Ltd., Colnbrook, GB) und Magnogel[®] (IBF, Villeneuve, France) wurden bereits Ende der 70er Jahre vertrieben [Franzreb et al., 2006]. Später wurden noch bis heute erhältliche hochwertigere Materialien wie BioMag[®] Advanced Magnetics, Cambridge, USA), Dynabeads[®] (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland) und Estapor[®] M (Merck Chemie SAS, Fontenay-sous-Bois Cedex, Frankreich) entwickelt.

Inzwischen ist die Abtrennung von Nukleinsäuren [Berensmeier, 2006, Olsvik et al., 1994], Proteinen [Heebøll-Nielsen et al., 2004, Meyer et al., 2007] aber auch ganzen Zellen wie z.B. Bakterien [Safarik & Safariková, 2002] mittels magnetischer Mikropartikel im analytischen Bereich Stand der Technik. Die Handhabung der Magnetpartikel erfolgt dabei in der Regel manuell unter dem Einsatz von Permanentmagneten.

Abbildung 2.3 zeigt schematisch die Verfahrensschritte für die Isolierung eines Biomoleküls mit Hilfe magnetischer Mikrosorbentien.

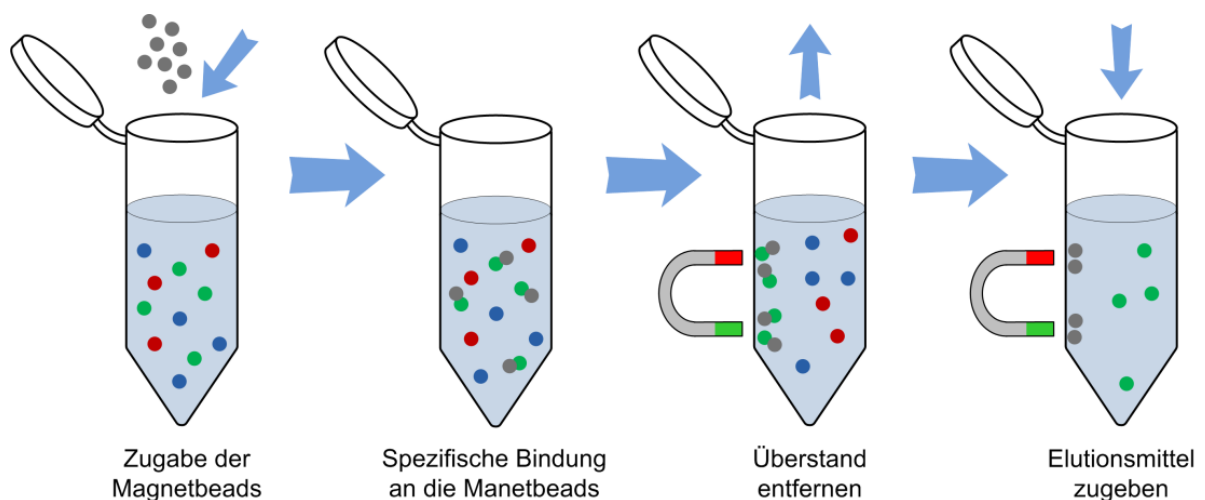


Abbildung 2.3: Bioproduktaufarbeitung im Labormaßstab

Im ersten Schritt werden die Magnetpartikel mit einer spezifischen Funktionalisierung zur Bindung des Zielproteins dem Ausgangsmedium zugegeben. Die Bindung des Produktes erfolgt bei intensiver Durchmischung der Partikel-/Biomolekül-Suspension, z.B. im Thermomixer. Anschließend werden die beladenen Magnetpartikel mittels eines Handmagneten selektiv zurückgehalten und vom Rest der Lösung abgetrennt. Die anschließende Elution liefert das feststofffreie Zielprodukt.

Erste Arbeiten an der Technischen Universität Dänemarks in Lyngby [Hubbuch et al., 2001 und 2002], beschreiben den Einsatz kleinerer Magnetfilter (bis zu 16 mL). Schwerpunkte dieser Arbeiten bildeten die Partikelfunktionalisierung sowie die Erprobung des Verfahrens für neue Zielprodukte. Die verwendete Apparatechnik beschränkte sich jedoch auf einfache Laborgeräte und der Maßstab verblieb im mL-Bereich. In den späteren Arbeiten am Forschungszentrum Karlsruhe wurden erstmals etwas größere Magnetseparatoren entwickelt und eingesetzt [Hoffmann, 2003] sowie Versuche zur Isolation von His-getagtem GFP (460 mL (Arbeitsvolumen Kugelseparator) und 46 mL) [Ebner, 2006] und Proteinen aus Molke (46 mL) [Meyer, 2004] durchgeführt. Beide Arbeiten zur Isolation von Proteinen mit Hilfe magnetischer Mikrosorbentien wurden mit Hilfe von Magnetseparatoren mit schaltbaren Permanentmagneten durchgeführt.

Magnetische Sorbentien mit unterschiedlichen Funktionalisierungen werden inzwischen von vielen Unternehmen vermarktet, wie z. B. magnetische Silicapartikel der Firmen Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland) und Invitrogen GmbH (Darmstadt, Deutschland), oder magnetische Sorbentien auf Basis von Polyvinylalkohol (Firma chemagen Biopolymer AG, Baesweiler, Deutschland).

Zur Isolation von Nukleinsäuren existieren bereits zahlreiche kommerzielle Systeme auf Basis der Magnet-Bead-Technologie, wie z.B. von Firmen wie Roche, Grenzach, Deutschland (MagNA Pure-Systeme), chemagen Biopolymer AG, Baesweiler, Deutschland (MSM I, Prepito, Star) oder Beckman Coulter, Brea, USA (Biomek[®] 3000).

2.4 Grundlagen der Magnetseparation

2.4.1 High Gradient Magnetic Separation (HGMS)

Die Hochgradienten-Magnetseparation (HGMS) ist eine effektive Alternative zu konventionellen Methoden der Fest-Flüssig-Trennung magnetischer Partikel, wie beispielsweise Sedimentation oder Tiefenfiltration. Magnetische Trennverfahren wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts zur Anreicherung von Eisenerz eingesetzt [Oberteuffer, 1974]. Die Weiterentwicklung des Verfahrens ermöglichte die Abtrennung selbst schwach magnetischer Teilchen im Mikrometerbereich. Bedingt durch das Arbeiten mit viel höheren Feldgradienten entwickelte sich der Begriff der Hochgradienten-Magnetseparation [Pfister, 1979]. Die eigentliche Hochgradienten-Magnetseparation wurde erstmalig von *Kolm* [1971], unter der Verwendung einer Abscheidematrix aus feinen Filamenten eines ferromagnetischen Materials, beschrieben.

Abbildung 2.4 stellt das Grundprinzip der HGMS dar. In den Bereich eines äußeren Magnetfeldes wird eine mit einer magnetisierbaren Abscheidematrix (symbolisiert durch einen einzelnen

Drahtquerschnitt) gefüllte Filterkammer eingebracht. Diese Matrix besteht aus bis zur Sättigung magnetisiertem ferromagnetischem Material (z.B. Stahlwolle, feine Netze oder auch perforierte Scheiben), durch welche das äußere Magnetfeld in ihrer Umgebung gebündelt wird, was auf der Oberfläche der Matrix Bereiche generiert, die auf para-, ferri- bzw. ferromagnetische Partikel stark anziehend wirken. Während des Separationszykluses werden die sich im Zulauf befindlichen magnetischen Feststoffe an die Matrix angelagert und die partikelfreie (bzw. frei von magnetischen Partikeln) Suspension verlässt das System (Ablauf). Ist die Aufnahmekapazität der Filtermatrix erschöpft, wird die Zufuhr der Suspension gestoppt. Nach Abschalten des Magnetfeldes werden die Partikel ausgespült. Anschließend kann ein neuer Abscheidezyklus beginnen [Franzreb, 2003].

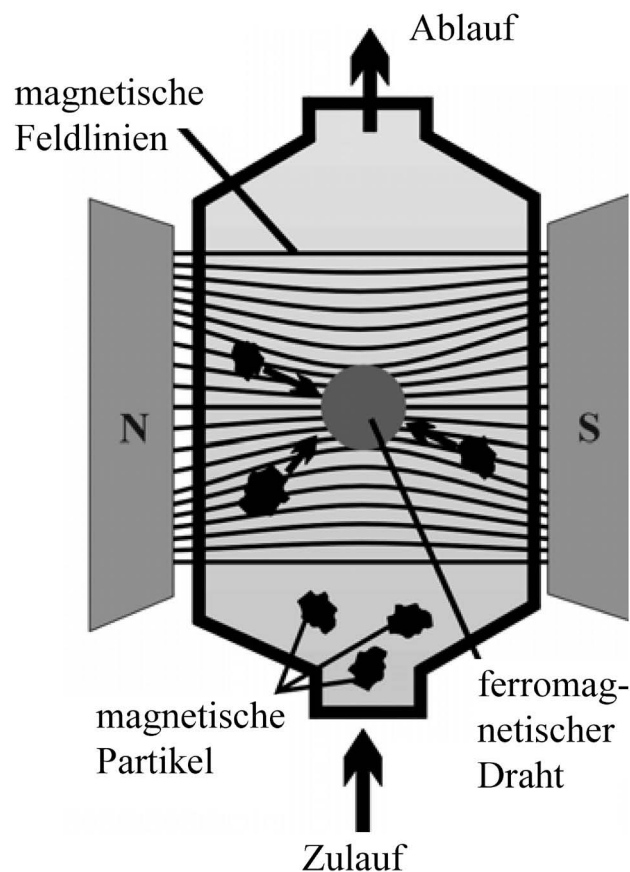


Abbildung 2.4: Grundprinzip der Hochgradienten-Magnetseparation [Franzreb, 2003]

Hinsichtlich der Anordnung zwischen Flüssigkeitsströmung, Draht und Magnetfeld lassen sich wie anhand Abbildung 2.5 ersichtlich, 3 Konfigurationen unterscheiden [Svoboda, 1987].

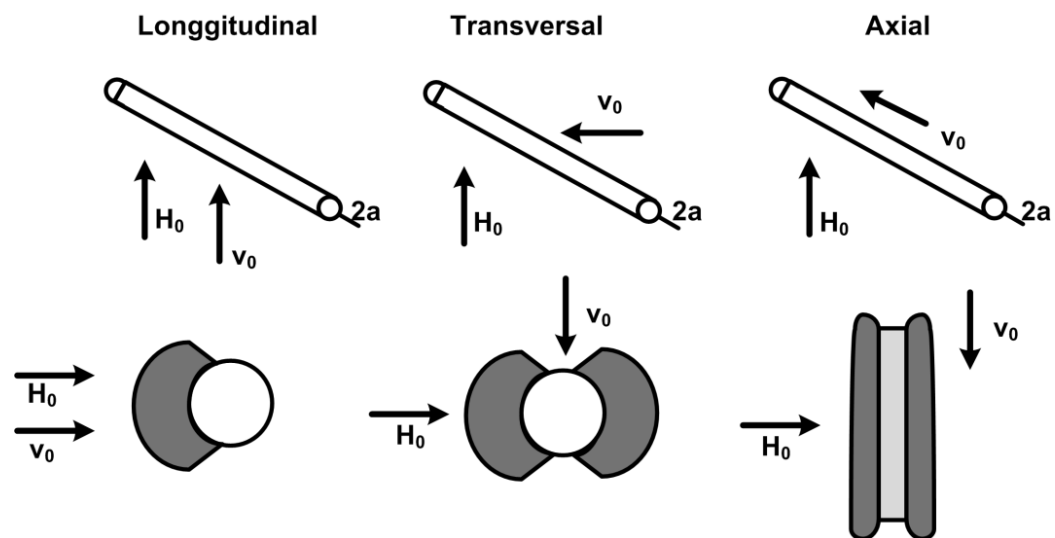


Abbildung 2.5: Geometrische Grundkonfigurationen der Anordnung zwischen Draht, Magnetfeld und Strömungsrichtung sowie zugehörige Partikelanlagerungsbereiche

In einer sogenannten longitudinalen Anordnung verläuft die Strömung parallel zur Magnetfeldrichtung, die wiederum senkrecht auf der Drahtachse steht. Die induzierten Magnetpole des Drahts liegen damit zentral auf der strömungszugewandten bzw. der strömungsabgewandten Drahtseite, wobei es im Falle nicht zu hoher Reynoldszahlen nahezu ausschließlich zu Partikelanlagerung auf der Staustromseite kommt. Neben der longitudinalen Anordnung sind als Grenzfälle des geometrischen Aufbaus in der HGMS noch die transversale und die axiale Anordnung zu nennen. Bei der transversalen Anordnung stehen die Strömungsrichtung, das Magnetfeld und die Drahtachse jeweils senkrecht aufeinander. Die Partikelabscheidung erfolgt in diesem Fall in zwei Anlagerungsbereichen, die gegenüber dem Staupunkt an der strömungszugewandten Drahtseite um $\pm 90^\circ$ verdreht sind. Bei einer axialen Anordnung verläuft die Strömung parallel zur Drahtachse. Die Anlagerungen bilden sich hierbei in der Magnetfeldebene entlang des Drahtes.

Die Eigenschaft magnetischer Felder auf eine Materie eine Kraft auszuüben ist die Grundlage aller Typen von Magnetseparatoren. Gleichung 2.1 zeigt den allgemeinen Zusammenhang für diese Magnetkraft F_m .

$$F_m = \mu_0 \cdot V_P \cdot M_P \cdot \nabla H \quad \text{Gleichung 2.1}$$

Mit der Permeabilitätskonstante des Vakuums μ_0 , dem Partikelvolumen V_P , der Partikelmagnetisierung M_P und dem Gradienten der magnetischen Feldstärke am Ort des Partikels ∇H .

Die Partikelmagnetisierung lässt sich wiederum über die magnetische Suszeptibilität κ und die magnetische Feldstärke H (Gleichung 2.2) ausdrücken:

$$M_P = \kappa \cdot H \quad \text{Gleichung 2.2}$$

mit der Volumensuszeptibilität κ . Die Suszeptibilität variiert über mehrere Größenordnungen für unterschiedliche Substanzen. Im Falle dia- und paramagnetischer Substanzen stellt sie eine Konstante dar, wohingegen sie für ferro- und ferrimagnetische Substanzen unter anderem eine Funktion der Feldstärke sowie der Partikelform und -größe ist. Da die Art der abzutrennenden Partikeln in der Regel bekannt ist, bilden die Einflussgrößen auf die innerhalb des Separators erzielbare Magnetkraft die vorherrschende magnetische Feldstärke sowie deren Gradient.

2.4.2 Magnetische Kenngrößen

Zum Verständnis der Funktionsweise verwendeter Magnetfilter werden im Folgenden Grundlagen des Magnetismus und der Magnetseparation erläutert. Die Auswahl folgt hierbei der didaktischen Herangehensweise innerhalb der Habilitationsschrift zur „Magnettechnologie in der Verfahrenstechnik wässriger Medien“ von *Franzreb* [2003].

2.4.2.1 Magnetische Flussdichte und Induktion

In der Umgebung eines stromdurchflossenen Leiters mit der Stromstärke I herrscht ein Magnetfeld (B), dessen Feldlinien auf einer zum Stromleiter senkrechten, ebenen Fläche konzentrische Kreise bilden. Wird dem Leiter ein äußeres Magnetfeld überlagert, so dass er orthogonal zu dessen Feldlinien gerichtet ist, übt das superpositionierte Feld auf den Leiter der Länge L eine Kraft F aus, die senkrecht zur Stromrichtung steht. Den Quotienten

$$B = \frac{F}{I \cdot L} \quad \text{Gleichung 2.3}$$

nennt man den Betrag der magnetischen Induktion oder Flussdichte des magnetischen Felds. Wenn ein Leiter der Länge $L = 1$ m, der von einem Strom $I = 1$ A durchflossen wird, in einem Magnetfeld die Kraft 1 N erfährt, so besitzt das Feld die Stärke 1 Tesla. Die magnetische Flussdichte B ist ein Vektor, dessen Richtung derjenigen des Magnetfeldes entspricht und der senkrecht zur Kraft- und Stromrichtung steht. Das magnetische Feld kann somit durch die Wirkung beschrieben werden, die es auf einen stromdurchflossenen Leiter ausübt. Für die Einheit der magnetischen Flussdichte folgt demnach:

$$1 \frac{N}{A \cdot m} = 1 \frac{W \cdot s}{A \cdot m^2} = 1 \frac{V \cdot s}{m^2} = 1 \text{ Tesla} \quad \text{Gleichung 2.4}$$

2.4.2.2 Magnetische Feldstärke und Permeabilität

Ursache des magnetischen Feldes ist die magnetische Feldstärke H in A/m, wobei die Richtung von H derjenigen der magnetischen Flussdichte B entspricht. Innerhalb einer stromdurchflossenen Spule wird ihr Betrag wie folgt definiert:

$$H = I \cdot \frac{n}{L} \quad \text{Gleichung 2.5}$$

mit der Länge der Spule L und der Anzahl der Windungen n .

Zwischen der magnetischen Flussdichte und der magnetischen Feldstärke besteht folgender linearer Zusammenhang:

$$B = \mu_0 \cdot \mu_r \cdot H \quad \text{Gleichung 2.6}$$

mit der magnetische Feldkonstante (bzw. Vakuumpermeabilität) μ_0 und der Permeabilitätszahl μ_r .

2.4.2.3 Polarisierung und Suszeptibilität

Das Einbringen einer Substanz in ein magnetisches Feld bewirkt eine Veränderung der magnetischen Flussdichte innerhalb der Materie von dem Anfangswert B_{Vakuum} auf einen neuen Wert B_{Materie} . Je nachdem, ob die magnetische Flussdichte innerhalb der Materie erhöht oder erniedrigt wird, bezeichnet man den Stoff als para- oder diamagnetisch. Die Änderung der magnetischen Induktion ΔB wird magnetische Polarisierung J genannt.

$$J = \kappa \cdot \mu_0 \cdot H \quad \text{Gleichung 2.7}$$

Mit der magnetischen Suszeptibilität κ , wobei

$$\kappa = \mu_r - 1 \quad \text{Gleichung 2.8}$$

Je nach Größe der Permeabilitätszahl μ_r werden die Stoffe mit konstanter Suszeptibilität in zwei Gruppen eingeteilt:

Stoffe mit $\mu_r > 1$ bzw. $\kappa > 0$ heißen paramagnetisch und verstärken das Magnetfeld.

Stoffe mit $\mu_r < 1$ bzw. $\kappa < 0$ werden diamagnetisch genannt und schwächen das umgebende Magnetfeld.

2.4.3 Magnetisierungsverhalten und Magnetisierungskurve

In der Technik wird der Einfluss eines Magnetfeldes auf ferro- bzw. ferrimagnetische Substanzen meist mit der scheinbaren Erhöhung der Feldstärke, der Magnetisierung M in A/m, beschrieben:

$$M = \Delta H = H_{\text{Materie}} - H_{\text{Vakuum}} \quad \text{Gleichung 2.9}$$

Durch eine vollständige Ausrichtung der atomaren magnetischen Dipole unter der magnetischen Kraftwirkung des Magnetfeldes wird die Sättigungspolarisation J_s bzw. Sättigungsmagnetisierung M_s (Maximalwert der Magnetisierung bei ferro- bzw. ferrimagnetischen Stoffen) erreicht.

Die magnetischen Eigenschaften ferro- bzw. ferrimagnetischer Substanzen lassen sich aus den Magnetisierungskurven (Abbildung 2.6) dieser Stoffe ablesen.

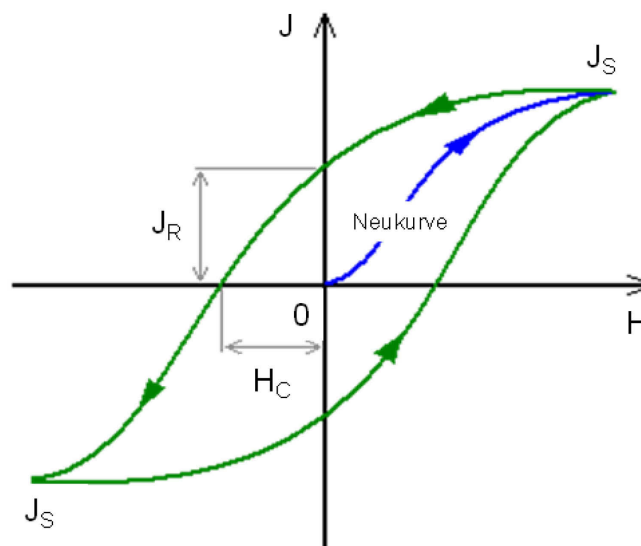


Abbildung 2.6: Magnetisierungskurve (Hystereseschleife) einer ferromagnetischen Substanz ausgehend vom Zustand der magnetischen Sättigung [nach Böhm & Vob, 1999]

Wird die Feldstärke ausgehend von einem zur magnetischen Sättigung ausreichenden Wert bis auf einen Wert von Null verringert, verbleibt in der Regel eine Remanenz J_R , d.h. die Polarisation verschwindet auch ohne äußeres Feld nicht vollständig. Um die Polarisation bzw. die Magnetisierung auf null abzusenken bedarf es eines, dem ursprünglichen Feld entgegengesetzten,

Feldes der Stärke H_C , die als Koerzitivfeldstärke bezeichnet wird. Die Form der Magnetisierungskurven ist normalerweise neben den Materialeigenschaften auch stark von der eingesetzten Probenform und deren Ausrichtung zum Magnetfeld abhängig. Von der Form unabhängige Magnetisierungskurven lassen sich durch die Verwendung ringförmig geformter Materialproben gewinnen. Fällt die Magnetisierungskurve zu einer Linie zusammen, besitzt der ferro- oder ferrimagnetische Stoff keine Remanenz ($J_R = 0$ und $H_C = 0$).

2.5 Prinzip der Proteinisolierung durch Sorption an Festphasen

Die Isolation von Biomolekülen entsprechend ihrer unterschiedlichen spezifischen Eigenschaften ist eine aus der Chromatographie bekannte Vorgehensweise. Das Prinzip beruht auf der Immobilisierung geeigneter Liganden an die stationäre Phase (Matrix). Bei der Matrix handelt es sich um einen Feststoff mit kleiner Korngröße (30-100 μm) zur Verringerung der Diffusionswege und zum daraus resultierenden Erzielen einer hohen Trennstufenzahl [Meyer, 2003]. Verschiedene Substanzen wie z.B. Silicagel, Aluminiumoxid, Hydroxylapatit oder Agarose wurden bereits in der Chromatographie eingesetzt. Die Voraussetzung der Immobilisierung eines geeigneten Liganden an die Matrix verlangt deren chemische Modifizierung. Eine Vielzahl an Aktivierungsmethoden können *Hermanson et al.* [1992] entnommen werden. Der Ligand kann dabei direkt, oder über einen Spacer (Abstandhalter) an die Matrixoberfläche immobilisiert werden. Der Spacer bewirkt eine bessere Zugänglichkeit des zu bindenden Moleküls an den Liganden sowie eine Verringerung der sterischen Behinderung der Zielmoleküle. Ein idealer Spacer besitzt eine Länge von 6-10 Kohlenstoffatomen in der Molekülkette [Richter, 2003].

Die am häufigsten in der Chromatographie eingesetzten Prinzipien zur Separation von Biomolekülen sind in Tabelle 2.2 dargestellt.

Tabelle 2.2: Techniken zur Reinigung von Biomolekülen in der Chromatographie [Handbook GE Healthcare, 2007]

| Eigenschaft | Technik |
|------------------------|---|
| Ligandenspezifität | Affinitätschromatographie (AC) |
| Größe | Größenausschlusschromatographie (SEC) |
| Hydrophobe Interaktion | Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) Umkehrphasenchromatographie (RPC) |
| Oberflächenladung | Ionenaustauschchromatographie (IEX) |

Die AC erfordert Liganden, mit einer spezifischen Bindungsaffinität gegenüber dem Zielmolekül. Die biologische Interaktion erfolgt beispielsweise mit Lektinen zur Reinigung von Glykoproteinen, Antikörpern zur Reinigung von Antigenen oder Nukleinsäuren zur Reinigung von komplementären Basensequenzen oder Histonen. Das poröse Trägermaterial der SEC gewährleistet eine Trennung von Molekülen unterschiedlicher Größe. Moleküle einer bestimmten Größe können nicht in das Porensystem eintreten und wandern dadurch schnell mit der mobilen Phase durch das Gelbett. Kleinere Moleküle dagegen können in die Gelporen eindringen, was zu einer längeren Verweildauer führt. Die SEC eignet sich besonders für einen Pufferwechsel von Biomolekülen, die empfindlich auf Veränderung des pH-Wertes, oder der Änderung der Konzentration an Kofaktoren und Metallionen reagieren. Die HIC ist der ideale Folgeschritt an beispielweise eine Präzipitation mit Ammoniumsulfat. Die zur Reinigung verwendeten hydrophoben Regionen von Proteinen (hydrophobe Aminosäure-Reste), werden im wässrigen Milieu von einem geordneten Film aus Wassermolekülen maskiert. In Folge des eingesetzten Ammoniumsulfates wird diese Ordnung verringert. Ebenfalls auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht die RPC. Die mobile Phase setzt sich aus einem wässrigen Puffer mit einem polaren Lösungsmittel wie Methanol oder Acetonitril zusammen. Die stationäre Phase ist dabei inert. Die IEX nutzt die unterschiedlich starke elektrostatische Bindung des ladungstragenden Biomoleküls und den geladenen Gruppen der Ionenaustauschermatrix [Richter, 2003].

In der Literatur finden sich Angaben für den isoelektrischen Punkt (pI) des aus Serum zu reinigenden Glykoproteins eCG (equine chorionic gonadotropin) von 1,8 [Allen & Stewart, 1993]. Auf Basis des extrem niedrigen pI-Wertes des Proteins wurden Ionenaustauschermaterialien zur Isolation des Proteins verwendet (siehe Kapitel 2.5.1). Eine Alternative zu Ionenaustauschchromatographie bietet im Fall des Glykoproteins eCG die Reinigung über Affinitätschromatographie unter der Verwendung von Lektinen. Lektine sind Glykoproteine, die in der Lage sind selektiv Glykokonjugate zu binden, die Bindung des Zuckerliganden erfolgt über die Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne (carbohydrate recognition domain, CRD) [Köttgen, 2003]. Lektine besitzen unterschiedliche Affinität bezüglich verschiedener Glykokonjugate. In der klassischen Chromatographie finden Mannose/Glucose-bindende Lektine am häufigsten Anwendung, z.B. Concanavalin A (isoliert aus *Canavalia ensiformis*), oder Lentil Lectin (isoliert aus *Lens culinaris*) [Handbook GE Healthcare, 2007]. Ferner werden beispielsweise Sialinsäure- und Fukose-bindende Lektine (isoliert aus *Triticum vulgare* bzw. *Ulex europeus*) eingesetzt [Yakovleva et al., 2010]. Jedoch handelt es sich bei allen Serumproteinen, mit Ausnahme des

Albumins um Glykoproteine, wodurch eine Isolation eines spezifischen Glykoproteins, unter der Verwendung von Lektinen nicht möglich ist [Buchta, 2010].

2.5.1 Ionenaustauschchromatographie

Die Durchführung einer Ionenaustauschchromatographie (IEX) zur Reinigung von Proteinen wurde erstmals im Jahr 1960 vorgestellt. Heute ist die IEX eine der am häufigsten verwendeten Technik zur Reinigung von Proteinen, Peptiden, Nukleinsäuren und anderen geladenen Biomolekülen [Handbook GE Healthcare, 2007].

Das Prinzip der Ionenaustauschchromatographie beruht auf der reversiblen Adsorption geladener gelöster Moleküle an immobilisierte Ionenaustauschgruppen entgegengesetzter Ladung. Die geladenen Gruppen sind dabei kovalent an die Matrix gebunden. Die Eigenschaften der Matrix sind mit bestimmend für die Effizienz, Kapazität sowie die chemische Stabilität. Zu Beginn fanden synthetische Harze, bestehen aus einer hydrophoben Polymermatrix substituiert mit ionischen Gruppen, aufgrund ihrer hohen Kapazitäten für kleine Ionen z.B. Anwendungen in der Wasseraufbereitung. Angesichts der geringen Porendurchmesser dieses Matrixtypen, ist eine ausreichende Kapazität für Proteine und andere Makromoleküle jedoch nicht gewährleistet [Amersham Biosciences, 2002]. Die ersten Ionenaustauscher, bestehend aus einer Cellulose-Matrix, für die Reinigung von Makromolekülen wurden von *Peterson & Sober* [1956] entwickelt. Später entwickelte Ionenaustauscher auf der Grundlage von Dextran, gefolgt von denen auf der Grundlage von Agarose und vernetzter Cellulose waren die ersten Ionenaustauschermatrizes in Kugelform kombiniert mit hoher Porosität, was zu verbesserten Fließeigenschaften und höheren Kapazitäten für Makromoleküle, im Vergleich zu der unregelmäßig geformten Cellulose-Matrix, führte [Amersham Biosciences, 2002].

Bezüglich der funktionellen Gruppe können Ionenaustauscher in starke und schwache Ionenaustauscher unterteilt werden (Tabelle 2.3). Die Ionenaustauschkapazität der schwachen Ionenaustauscher ist abhängig vom vorliegenden pH-Wert, während die funktionellen Gruppen der starken Ionenaustauscher über einen weiten pH-Bereich ihre Ladung behalten [Handbook GE Healthcare, 2007]. Starke Anionenaustauscher tragen Hydroxypropyldiethylaminoethyl- und Trimethylaminoethyl-Gruppen, starke Kationenaustauscher Sulfomethyl- und Sulfopropyl-Gruppen. Für schwache Anionen- bzw. Kationenaustauscher ist eine Diethylaminoethyl- bzw. Carboxylgruppe charakteristisch. Der Einsatz starker Ionenaustauscher erfolgt in der Regel zur Auftrennung von Biomolekülen in Form schwacher Elektrolyte, während schwache Ionenaustauscher zu Reinigung starker Elektrolyte eingesetzt werden.

Tabelle 2.3: Funktionelle Gruppen von Ionenaustauschern [Richter, 2003]

| Anionenaustauscher | Funktionelle Gruppe |
|---|---|
| Hydroxypropyldiethylaminoethyl (stark) | $ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{CH}_3 \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ -\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH}_3 \quad \text{OH} \end{array} $ |
| Trimethylaminoethyl (stark) | $ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ / \\ -\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+ \\ \backslash \\ \text{CH}_3 \\ \quad \quad \backslash \\ \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array} $ |
| Diethylaminoethyl (schwach) | $ \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ / \\ -\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+ \\ \backslash \\ \text{H} \quad \text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array} $ |
| Kationenaustauscher | Funktionelle Gruppe |
| Sulfomethyl (stark) | $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$ |
| Sulfopropyl (stark) | $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$ |
| Carboxymethyl (schwach) | $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ |

Viele der zu isolierenden Biomoleküle besitzen sowohl eine negative als auch eine positive Nettoladung, abhängig vom vorliegenden pH-Wert (Abbildung 2.7). Der Zusammenhang zwischen pH-Wert und der Oberflächennettoladung der amphoterischen Proteine ist in Abbildung 2.7 aufgezeigt.

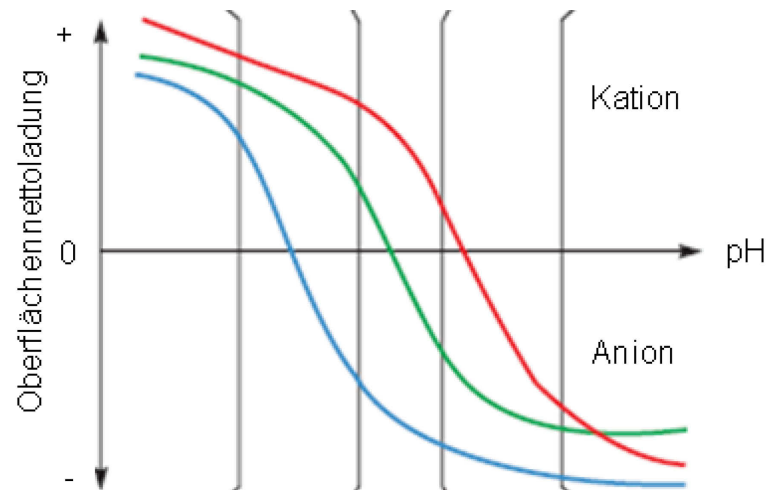


Abbildung 2.7: Einfluss des pH-Wertes auf die Nettoladung unterschiedlicher Proteine [Handbook GE Healthcare, 2007]

Der pH-Wert, bei dem das Protein keine Nettoladung besitzt wird als isoelektrischer Punkt (pI) bezeichnet. Oberhalb des pI-Wertes besitzt das Protein eine positive, unterhalb eine negative Oberflächennettoladung. Die Selektivität des Isolationsverfahrens, bezüglich des Zielproteins, kann über eine Variation des pH-Arbeitsbereiches erreicht werden.

2.6 High Gradient Magnetic Fishing (HGMF)

Magnetische Sorbentien können mit in der Chromatographie erprobten konventionellen Liganden derivatisiert werden, um entsprechend sorptiv wirkende Oberflächen zu generieren. Vorteile der magnetischen Sorbentien sind die hohe spezifische Oberfläche, die geringe Foulinganfälligkeit sowie die einfache Abtrennbarkeit. Das Prinzip der Isolation von Biomolekülen unter der Verwendung magnetischer Mikrosorbentien wurde in Abschnitt 2.3 dargestellt. Der Einsatz der magnetischen Sorbentien im technischen Maßstab unter der Verwendung einer Hochgradienten-Magnetseparation (Kapitel 2.4.1), wird als „high gradient magnetic fishing“ (HGMF) bezeichnet. Der Begriff des „high gradient magnetic fishing“ wurde erstmals von *Hubbuck et al.* [2001] geprägt.

Der Prozess des HGMF lässt sich in zwei wesentliche Schritte unterteilen. Im ersten Schritt erfolgt batchweise die Sorption des Zielproteins in einem durchmischten Reaktionsgefäß, im zweiten Schritt erfolgt die Abtrennung der magnetischen Sorbentien aus der an Zielprotein angereicherten Ausgangslösung durch das Pumpen der Suspension durch den Hochgradienten-Magnetseparator. Die Sorbentien werden im Filter zurückgehalten, wohingegen nichtmagnetische Feststoffe den Filter ungehindert passieren können.

Die im HGMF-Prozess verwendeten, unporösen Sorbentien neigen nicht nur, wie bereits erwähnt, weniger zum Fouling wie konventionelle poröse Materialien (Kapitel 2.3), es tritt zudem keine intrapartikuläre Diffusionslimitierung auf [Hoffmann, 2002]. Die Verminderung der unspezifischen Oberfläche bedingt durch die unporöse Struktur der magnetischen Sorbentien wird durch die im Vergleich zu anderen Chromatographiemedien geringere Partikelgröße kompensiert.

2.6.1 Kenndaten des HGMF-Prozesses

Die Filterkapazität, d.h. die Menge an magnetischen Sorbentien, die in einen Separationsprozess eingesetzt werden können, ist ein wichtiger Parameter für die Produktivität/Rentabilität des HGMF-Prozesses. Die Eigenschaften des für den HGMF-Prozess eingesetzten Filters sind neben z.B. dem angelegten Magnetfeld oder der Eigenschaften der verwendeten magnetischen Sorbentien verantwortlich für die Kapazität des jeweiligen Filters.

Die Produktivität P des HGMF-Verfahrens, d.h. die Masse an isoliertem Protein m_{prot} pro Zeit- und Volumeneinheit (t_{zyklus} und V_{sep}), ist abhängig vom Volumen des eingesetzten Magnetseparators. Die Masse an isoliertem Protein m_{prot} pro Zyklus entspricht dem Produkt aus der Gleichgewichtsbeladung an Zielprotein Q_{ZP}^* und der maximalen Menge an Partikeln, die der Separator aufnehmen kann.

$$P = \frac{m_{prot}}{t_{zyklus} \cdot V_{sep}} = \frac{Q_{ZP}^* \cdot m_{zyklus}}{t_{zyklus} \cdot V_{sep}} \quad \text{Gleichung 2.10}$$

Die Filterkapazität σ ist definiert als die im Filter zurückgehaltene Menge an Partikeln (m_{zyklus}) pro Volumeneinheit des Filters V_{sep} :

$$\sigma = \frac{m_{zyklus}}{V_{sep}} \quad \text{Gleichung 2.11}$$

Für die Bestimmung der Produktivität müssen weiterhin die für den Aufarbeitungszyklus benötigten Prozesszeiten berücksichtigt werden. Hierzu zählen die benötigten Zeiten des Batch-Adsorptionsschrittes sowie die Wasch- und Elutionsschritte. Die Filterbeladungszeit ist abhängig vom Volumen der Sorptionslösung V_{zyklus} , der Filterquerschnittsfläche A und der Filtergeschwindigkeit v_0 .

$$t_{Filter} = \frac{V_{Zyklus}}{v_0 \cdot A} \quad \text{Gleichung 2.12}$$

Aus Gleichung 2.10 und Gleichung 2.12 ergibt sich allgemein für die Produktivität des HGMF-Verfahrens:

$$P = \frac{Q_{ZP}^* \cdot \sigma}{t_{fix} + \frac{V_{Zyklus}}{v_0 \cdot A}} \quad \text{Gleichung 2.13}$$

mit $t_{zyklus} = t_{fix} - t_{Filterbeladung}$ Gleichung 2.14

t_{fix} beinhaltet die Wasch- und Elutionszeiten und ist aufgrund des konstanten Filtervolumens ebenfalls konstant.

Im günstigsten Fall beträgt das Kapazitätsverhältnis QV für das Zielprotein 1. Bei dem Kapazitätsverhältnis handelt es sich um den Quotienten aus der Anzahl der zur Verfügung gestellten Adsorptionsplätze zu der Anzahl aus der Suspension zu isolierender Zielmoleküle $c_{ZP,0} \cdot V_{Zyklus}$. Aus der Masse der eingesetzten Partikel m_{Zyklus} und deren maximaler Arbeitskapazität $Q_{max,ZP}$ folgt:

$$QV = \frac{m_{Zyklus} \cdot Q_{max,ZP}}{V_{Zyklus} \cdot c_{ZP,0}} \quad \text{Gleichung 2.15}$$

Im Fall von $QV = 1$ ergibt sich:

$$V_{Zyklus} = \frac{m_{Zyklus} \cdot Q_{max,ZP}}{c_{ZP,0}} \quad \text{Gleichung 2.16}$$

Aus Gleichung 2.10 und Gleichung 2.16 ergibt sich für die Produktivität:

$$P = \frac{Q_{ZP}^* \cdot \sigma}{t_{fix} + \frac{Q_{max,ZP} \cdot \sigma \cdot V_{Sep}}{c_{ZP,0} \cdot v_0 \cdot A_{Sep}}} \quad \text{Gleichung 2.17}$$

In den bereits in Kapitel 2.3 erwähnten Arbeiten am ehemaligen Forschungszentrum Karlsruhe wurden Magnetseparatoren mit ferromagnetischem Drahtgewebe als Filtermatrix eingesetzt. Ziel

war die Isolation von His-getagtem GFP [Ebner, 2006] bzw. Proteinen aus Molke [Meyer, 2004]. In weiteren Arbeiten, wie z.B. von Hubuch & Thomas [2002], kamen ebenfalls ferromagnetische Drahtgewebe als Filtermatrix zum Einsatz.

Die Verwendung ferromagnetischer perforierter Scheiben als Filtermatrix stellt eine interessante und leicht reinigbare Alternative dar. Die Verwendung eines Magnetseparators mit einer solchen Filtermatrix zur Isolation von Proteinen aus ungeklärten Suspensionen wird erstmals in *Brown* [2008] und *Müller et al.* [2011] beschrieben.

2.7 Eigenschaften des Zielproteins equines Choriongonadotropin

In der vorliegenden Arbeit wird die Eignung des HGMF-Prozesses zur Isolierung von Glykoproteinen aus Serum am Beispiel des Proteins equines Choriongonadotropin (eCG) aufgezeigt. Gonadotropin-Präparate wie Intergonan[®] der Firma Intervet Deutschland GmbH (Unterschleißheim, Deutschland), oder Pregmagon[®] der Firma IDT Biologika GmbH (Dessau-Rosslau, Deutschland) finden in landwirtschaftlichen Nutzbetrieben eine häufige Anwendung zur Steuerung des Reproduktionszyklus. Bei Schweinen wird durch die Gabe eCG-haltiger Präparate die Brunstsynchronisation erreicht, bei Rindern und Schafen wird das Präparat zur Induktion der Superovulation eingesetzt. Für die Anwendung in der Tierzucht werden Dosierungen von ca. 500-3000 IU pro Tier benötigt, bei einer geforderten Reinheit des eingesetzten Präparats von > 1000 IU mg⁻¹. Zur Stimulation der Superovulation beim Rind werden 2000-3000 IU, zur Stimulation des Follikelwachstums bei Sauen sowie Schafen werden 500-750 IU pro Tier eingesetzt [Frey & Löscher, 2009]. Die technische Gewinnung Gonadotropin-haltiger Extrakte aus dem Blut trächtiger Stuten erfolgt aktuell nach den in Kapitel 2.7.3 beschriebenen Prozessabläufen.

2.7.1 Wirkmechanismus

Infolge der Hydrophilität von Proteinen können diese die Zellmembran nicht durchdringen, ihre Wirkung wird daher über Rezeptoren in der Zellmembran vermittelt (Abbildung 2.8).

Bei den spezifischen Rezeptoren handelt es sich um Transmembran-Proteinkomplexe. Die Bindung des Hormons an den Rezeptor bewirkt eine Konformationsänderung des Proteinkomplexes, die über ein G-Protein die Adenylatcyklase aktivieren. Es sind ebenfalls Mechanismen der Signaltransduktion bekannt, bei denen Kalzium, Inositoltriphosphat und Proteinkinase C involviert sind. Ihre Integration in die klassische Adenylatcyklase-abhängige Signaltransduktion ist jedoch nicht vollständig geklärt [Sairam, 1989].

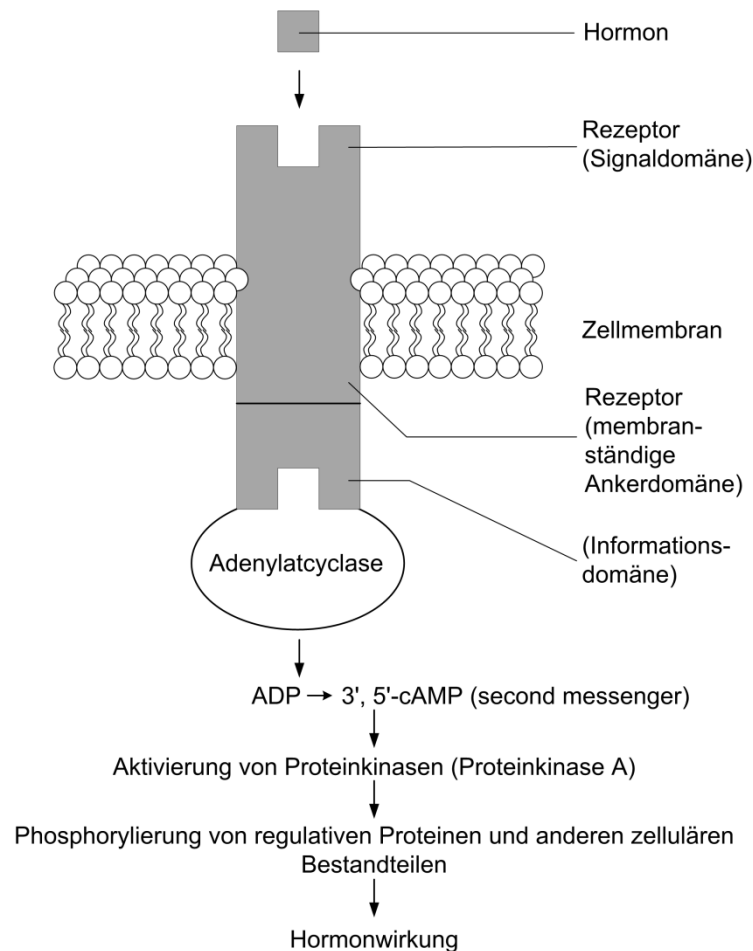


Abbildung 2.8: Wirkungsweise der Glykoprotein-hormone über die Bindung an einen Rezeptor in der Zellmembran und Aktivierung eines intrazellulären Informationssystems [nach Frey & Löscher, 2009]

Die Choriongonadotropine wie eCG wirken in der Trächtigkeit auf die Ovarien des Muttertieres ein und stellen so eine ausreichende Progesteronsekretion in bestimmten Phasen der Frühgravidität sicher.

Im Gegensatz zu den Gonadotropinen FSH (follikelstimulierendes Hormon) und LH (Luteinisierendes Hormon) werden Choriongonadotropine extrahypophysär gebildet. eCG wird ausschließlich in der Plazenta sekretiert, die Bildung ist daher im Gegensatz zu LH und FSH nicht durch das Gonadotropin-releasing-Hormon (GnRH) kontrolliert [Frey & Löscher, 2009].

Gonadotrope Hormone der Plazenta sind außer beim Mensch und Pferd nicht nachgewiesen. Bei Schweinen, Schafen und Rindern spielt anscheinend Prostaglandin E₂ die Rolle eines luteotropen Hormons [Faber & Haid, 1995].

2.7.2 Equines Choriongonadotropin (eCG)

Bei dem equine Choriongonadotropin handelt es sich um ein heterodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 60 kDa. eCG ist aus zwei nicht-kovalent gebundenen Untereinheiten, der α - und der β - Untereinheit, aufgebaut [Allen & Stewart, 1993]. Die Bildung erfolgt zwischen dem 40. und 140. Tag der Trächtigkeit in den fetalen trophoblastische Zellen der Stute. Die Menge und die biologische Aktivität des eCG während der Schwangerschaft variieren sehr stark und sind zudem von Stute zu Stute unterschiedlich, wobei die Konzentration an eCG zwischen dem 60. und dem 90. Tag der Schwangerschaft am höchsten ist [Virmani et al., 2003; Aggarwal et al., 1980]. eCG gehört wie LH und FSH zu der Familie der Glykoproteinhormone und besitzt sowohl LH- als auch FSH-Aktivität [Moore & Ward, 1980].

Während die α -Untereinheit eine Homologie von 68-79 % mit der α -Untereinheit des Gonadotropins anderer Säugetierarten aufweist, unterscheiden sie sich in ihrer β -Untereinheit. Demzufolge wird die Reaktionsspezifität durch die β -Untereinheit determiniert [Allen & Stewart, 1993]. Mit einem Molekulargewicht von 43 kDa besitzt die β -Untereinheit ein etwas höheres Molekulargewicht wie die 17 kDa schwere α -Untereinheit. Getrennt voneinander weisen die beiden Untereinheiten keine biologische Aktivität auf [Christakos & Bahl, 1979; Ward et al., 1982; Papkoff, 1974].

Der niedrige isoelektrische Punkt des eCG von 1,8 ist auf den hohen Anteil von 10 % des Aminokohlenhydrats Sialinsäure zurückzuführen [Allen & Stewart, 1993], der Glykananteil beträgt 41,7 %, wobei neben Sialinsäure als weitere Hauptbestandteile auch D-Galaktose (10,6-12 %), N-Acetylglukosamin (9-10,5 %), D-Mannose (2,0-2,3 %), N-Acetylgalactosamin (3-3,5 %) und L-Fucose (0,6-0,9 %) auftreten. Der Kohlenhydratanteil der α -Untereinheit beträgt 20,6 %, der der β -Untereinheit 45,8 % [Christakos & Bahl, 1979].

eCG ist über einen längeren Zeitraum bei einem pH zwischen 4-8 stabil, niedrigere pH-Werte bewirken, dass die nicht-kovalente Bindungsstärke zwischen den Untereinheiten abnimmt und Reste der Sialinsäure abgespalten werden, was beides eine Reduktion der biologischen Aktivität des Hormons zur Folge hat [González et al., 1998].

Da Glykoproteine unterschiedliche Glykane tragen können, unterscheidet man auch deren Glykoformen. Je nach Art der Bindung an das Protein können bei eCG O-glykosidisch und N-glykosidisch gebundene Glykane unterschieden werden [Legardinier et al., 2005a; Damm et al., 1990]. Die O-glykosidisch gebundenen O-Glykane sind dabei an das Sauerstoffatom eines Serin- oder Threoninrestes des Proteins gebundenen [Bousfield et al., 2001]. Bei der β -Untereinheit sind bisher sechs O-glykosidisch und eine N-glykosidisch gebundene Glykanstrukturen aufgeklärt. Die

O-Glykane sind im Fall von eCG größtenteils über N-Acetylgalactosamin, anstelle Mannose oder Fucose, mit den Hydroxylgruppen von Serin oder Threonin verknüpft [Damm et al., 1990].

Im Gegensatz dazu trägt die α -Untereinheit lediglich zwei N-glykosidisch gebundene Glykanstrukturen. Die N-Glykane sind je über eine Glykosidbindung mit der Aminosäure Asparagin verbunden [Legardinier et al., 2005a]. Abbildung 2.9 zeigt die für eCG typischen O- und N-glykosidisch gebundenen Glykanstrukturen nach Legardinier et al [2005a].

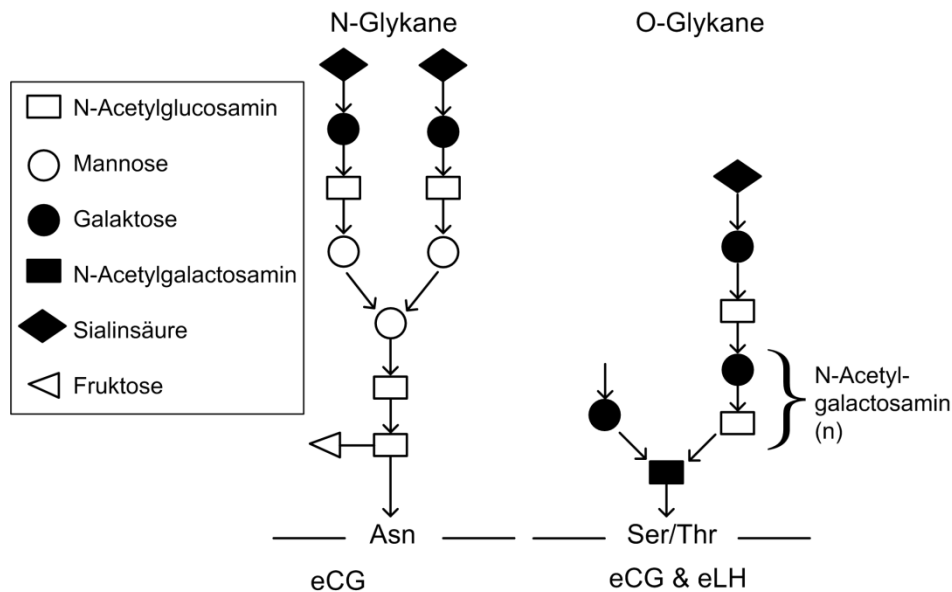


Abbildung 2.9: Typische Struktur der O- bzw. N-glykosidisch gebundenen Glykanstrukturen von eCG [nach Legardinier et al., 2005a]

Studien von Ryan et al. [1988] in *in vitro* Assays zeigten, dass durch die Beseitigung der Glykanstrukturen die Bindung der Gonadotropine an den Rezeptor nicht beeinflusst, jedoch die biologische Wirkung deutlich herabgesetzt wird. Die Signalkaskade nach Binden des Glykoproteins an den Membranrezeptor der jeweiligen Zielzelle ist Abbildung 2.8 zu entnehmen. Bei der Signaltransduktion sind dabei die N-glykosidisch gebundenen Glykanstrukturen von entscheidender Rolle. Nach Beseitigung dieser Glykanstrukturen von einer oder beiden Untereinheiten konnte nach der Bindung an den entsprechenden Rezeptor keine Aktivierung der Adenylatcyclase verzeichnet werden [Keutmann et al., 1983]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Abspaltung der Sialinsäurereste der Gonadotropine zu einer Reduktion der Plasma-Halbwertszeit, bedingt durch eine vermehrte Bindung an das Mannose-bindende Lektin und der dadurch resultierenden Ausscheidung, führt [Ryan et al., 1988]. Bei dem equinen Choriongonadotropin resultieren 10 % des Glykangehaltes aus Sialinsäureresten, ohne deren Elimination beträgt die Plasma-Halbwertszeit des Hormons zwei Tage [Sairam, 1989].

2.7.3 Konventionelle Isolation

In der Literatur finden sich zwei noch heute gängige Verfahren zur Isolation von eCG aus Serum, welche sich beide den extrem niedrigen isoelektrischen Punkt des Proteins zu Nutze machen. Der erste Prozess wurde bereits 1967 von *Gospodarowicz & Papkoff* [1967] beschrieben.

Bei diesem Verfahren wird das Serum zunächst durch die Zugabe von 0,5 M meta-Phosphorsäure auf pH 3 eingestellt. Der resultierende Niederschlag wird abzentrifugiert und verworfen. Der pH-Wert des Überstands wird anschließend wieder auf 4,5 angehoben und im Volumenverhältnis 1:1 mit eiskaltem Ethanol vermischt. Die Inkubation erfolgt über eine Dauer von zwei Stunden bei 4 °C. Hierdurch kommt es zur Bildung eines zweiten Niederschlags, der ebenfalls dekantiert wird. In einem nächsten Schritt erfolgt eine weitere Zugabe von eiskaltem Ethanol (70 % v/v), bei dem das gewünschte Protein eCG ausfällt. Der resultierende Niederschlag wird nach 12 Stunden wieder durch Zentrifugation geerntet, dialysiert und lyophilisiert. Im Anschluss folgen chromatographische Trennschritte wie Gel- und Ionenaustauschchromatographie zur weiteren Reinigung des eCG-Intermediates. Das nach insgesamt vier Reinigungsschritten an Kationenaustauschern gereinigte eCG zeigte eine biologische Aktivität von 13800-17700 IU mg⁻¹, mit einer Ausbeute von 3-5 IU L⁻¹.

In der Literatur finden sich des Öfteren Variationen der Reinigungsmethode nach *Gospodarowicz & Papkoff* [1967]. Diese betreffen in der Regel die Molarität der verwendeten meta-Phosphorsäure sowie die Inkubationszeiten der vorgenommenen Ethanol-Fällungen. Eine Variation der oben genannten Methode stellt zum Beispiel die Reinigungsmethode nach *Aggarwal et al.* [1980] dar. Das Serum wird durch Zugabe von 0,2 M meta-Phosphorsäure auf pH 3 eingestellt. Der nach Zentrifugation gewonnene Überstand wird auf einen pH von 7,5 angehoben und im Volumenverhältnis 1:1 mit eiskaltem Ethanol (50 % v/v) präzipitiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4 °C erfolgt eine erneute Zentrifugation, dem Überstand wird eiskaltes Ethanol (75 % v/v) zugegeben. Der resultierende Niederschlag wird nach 12 Stunden durch erneute Zentrifugation geerntet, dialysiert und lyophilisiert. Im Anschluss folgen wiederum chromatographische Trennschritte wie Gel- und Ionenaustauschchromatographie zur weiteren Reinigung des eCG-Intermediates. Das gereinigte eCG zeigte eine biologische Aktivität von 1500-3450 IU mg⁻¹.

Allerdings werden durch die aufgeführten Verfahren kaum mehr als 60 % Ausbeute erreicht, da bei den Fällungsschritten und der angewandten Dialyse ein hoher Verlust an eCG zu verzeichnen ist [González et al., 1998].

Eine weitere Methode der Lösungsmittelfällung wird von *Cartland & Nelson* [1937] beschrieben. Hier werden 50 % (v/v) Aceton zu dem gewonnenen Plasma, welches zuvor auf einen pH von 7,4 eingestellt wurde, gegeben. Nach 16 Stunden erfolgt eine Zentrifugation, dem resultierenden Überstand wird nach einer Reduktion des pH-Wertes auf pH 6 erneut Aceton (50 % v/v) zugeführt, es folgt eine weitere Inkubation über einen Zeitraum von 16 Stunden. Nach erneuter Zentrifugation erfolgt die Zugabe von 70 % v/v Aceton zu dem resultierenden Überstand (pH 6). Der resultierende Niederschlag wird nach 16 Stunden mittels Zentrifugation gesammelt, mit Alkohol und Ether gewaschen und anschließend lyophilisiert. Für eine weitere Reinigung wird das gewonnene Lyophilisat in 10 % Aceton resuspendiert, unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation verworfen. Dem Überstand (pH 6) wird wiederum Aceton (50% v/v) zugegeben. Nach 16-stündiger Inkubation erfolgt eine erneute Zentrifugation, die Acetonkonzentration im Überstand wird auf 65 % (v/v) angehoben. Nach 16 Stunden wird das gewonnene Präzipitat wiederum mit Alkohol und Ether gewaschen und anschließend lyophilisiert. Das so gewonnene eCG zeigte eine Aktivität von 140 Ratteneinheiten pro mg mit einer Gesamtausbeute von 60-90 % bezüglich des eingesetzten Plasmas.

Eine Alternative zur Lösungsmittelfällung wurde von *González et al.* [1989] vorgeschlagen. Durch Einstellen eines pH-Werts von 4 mittels Essigsäure werden nahezu alle Serumproteine in eine kationische Form überführt, während eCG weiter anionisch vorliegt. Anschließend wird das Serum mittels Ultrafiltration und anschließender Diafiltration konditioniert. Die weitere Reinigung erfolgt mittels Anionenaustauschchromatographie. Das gereinigte eCG zeigte eine biologische Aktivität von $3960 \pm 630 \text{ IU mg}^{-1}$.

Die Möglichkeit einer direkten chromatographischen Reinigung von Gonadotropin aus dem Serum schwangerer Zebrastuten (zCG) wird ebenfalls beschrieben [McFarlane et al., 1991]. Der erste Schritt ist eine Reinigung über eine Affi-Gel-Blue Säule. Im Anschluss an die Elution wird die eCG-haltige Fraktion dialysiert und lyophilisiert. Das Lyophilisat wird anschließend in einer 0,9 %-igen Natriumchloridlösung resuspendiert und auf einen pH von 4 mit meta-Phosphorsäure eingestellt. Nach anschließender Zentrifugation wird der gewonnene Überstand an Sephadex G-25 entsalzt. Die weitere Reinigung erfolgt mittels Concanavalin A-Säule und Ionenaustauschchromatographie.

2.7.4 Rekombinante Herstellung

Vergleichbar zu anderen pharmakologisch interessanten Verbindungen, finden sich in der Literatur Verfahren zur rekombinanten Herstellung des Glykoproteins eCG. Der hohe Glykolisierungsgrad von 41,7 % des eCG [Christakos & Bahl, 1979] erschwert jedoch ein rekombinantes Verfahren. Vergleichbar zu anderen Glykoproteinen tragen die Glykostrukturen bekanntermaßen zur Funktion und Aktivität des Hormones bei [Moore & Ward, 1980; Cooke et al., 1996; Legardinier et al., 2005a].

Legardinier et al. [2005b] gelang 2005 die rekombinante Herstellung von eCG in zwei verschiedenen Insektenzelllinien („Mimic cells“ und Sf9-Zellen). Bei *in vitro* Tests zeigte das so gewonnene rekombinante Protein eCG sowohl LH- also auch FSH-Aktivität. *In vivo* konnte jedoch keine Aktivität nachgewiesen werden. Eine Begründung ist das Fehlen des carboxyterminalen Peptides (CTP) der β -Untereinheit (Abbildung 2.10), welches entscheidend für die Rezeptorbindung und Signaltransduktion ist [Chen et al., 1992]. Die Abwesenheit des CTP führt möglicherweise zu einer schnellen Inaktivierung des Hormones im Plasma [Legardinier et al., 2005b; Ginther et al., 1974].

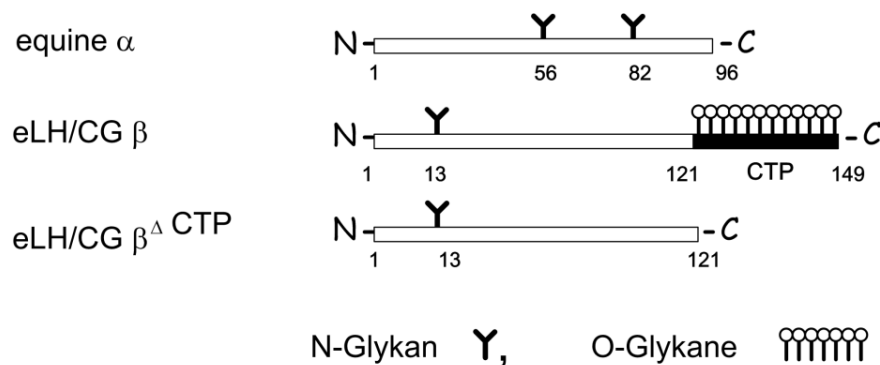


Abbildung 2.10: Position der N- und O- Glykane der equinen α - (oben) und β - Untereinheit von eLH bzw. eCG (mitte) und rekombinantem eLH bzw. eCG (unten) [nach Legardinier et al., 2005a]

Hypophysäre Glykoproteinhormone wie die Gonadotropine besitzen zahlreiche Disulfidbrücken (fünf in der α - und sechs in der β -Untereinheit). Biosynthetische Untersuchungen zeigten, dass Oligosaccharide eine wichtige Rolle bei der Formation der Disulfidbrückenbildung einnehmen. Die Expression von Glykoproteinhormonen ist aufgrund des defizienten Glykosylierungsmechanismus von Bakterien in diesen Organismen nicht möglich [Strickland & Pierce, 1983].

Im Gegensatz dazu stehen in der Humanmedizin für hFSH, hLH und hCG rekombinante Wirkstoffe zur Verfügung. Die erste genehmigte Anwendung der rekombinanten FSH-Produkte

(Herstellung in Chinesische-Hamster-Ovarzellen (CHO-Zellen)) Gonal F[®] (1995) und Puregon[®] (1996) war die Behandlung der Sterilität bei Frauen. Natürliche Quellen, wie der Harn postmenopausaler Frauen, konnte den steigenden Bedarf an FSH nicht mehr decken [Dingerman et al., 2002; Lunenfeld, 2004]. Zur Herstellung einer Ampulle HMG (humanes Menopausengonadotropin) werden beispielsweise 2-3 L, bzw. 6-9 L Harn für eine Ampulle hFSH benötigt [Lunenfeld, 2004].

Ein weiterer Faktor ist die höhere Qualität des rekombinanten Produktes, da der aus Harn gereinigte Wirkstoff nie ganz frei von LH war. Seit Dezember 2000 ist auch ein rekombinantes LH zugelassen. Das Produkt (Luveris[®]) wird aus gentechnisch modifizierter Hefe (*S. cerevisiae*) gewonnen. Rekombinantes hCG (Herstellung in CHO-Zellen) ist in Form von rekombinanten Choriogonadotropin alpha (Ovitrelle[®]) zugelassen [Dingerman et al., 2002]. Analog zu eCG induziert hCG die Superovulation bei weiblichen Individuen sowie die Testosteronsekretion bei männlichen Individuen [Dingerman et al., 2002].

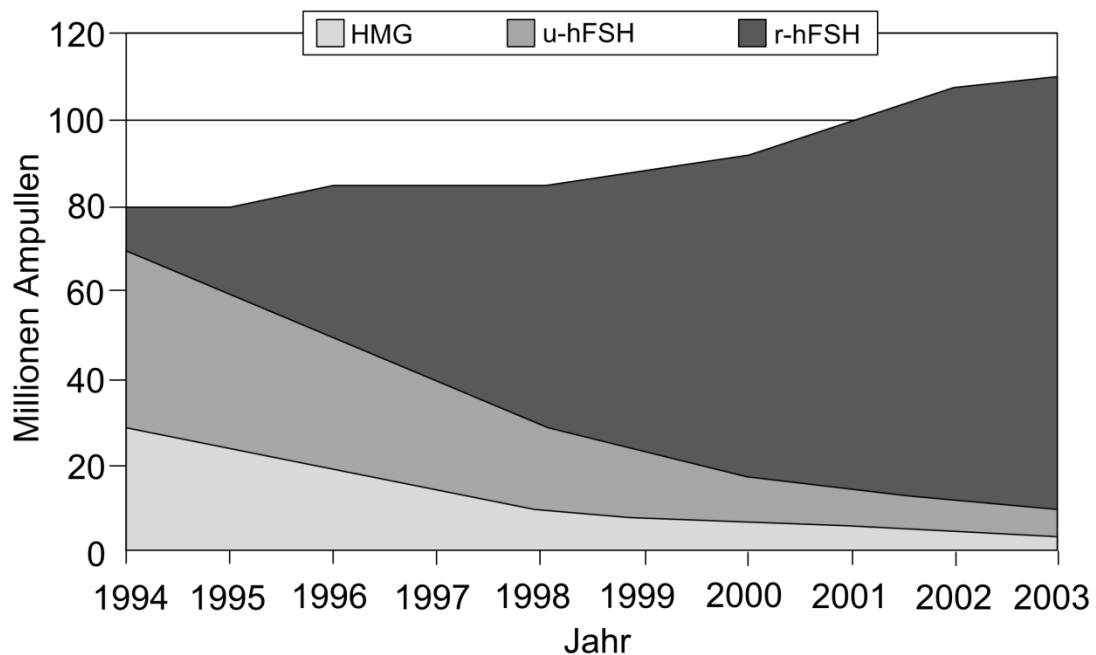


Abbildung 2.11: Weltmarktentwicklung für Gonadotropine. HMG: humanes Menopausengonadotropin; u-hFSH: aus Harn isoliertes humanes FSH; r-hFSH: rekombinantes humanes FSH [nach Lunenfeld, 2004]

Abbildung 2.11 verdeutlicht die Weltmarktentwicklung für Gonadotropine. Bedingt durch die Verfügbarkeit an rekombinant hergestellten humanen Gonadotropin-Präparaten, kommt es zu einem Rückgang des Bedarfs an konventionell isolierte Gonadotropinen. 2003 wurden lediglich 20×10^6 Ampullen aus Harn isolierter Gonadotropine hergestellt.

2.8 Kenngrößen der Proteinreinigung

Reinheit

Die Reinheit R einer Proteinlösung ist definiert als der Massenanteil des Zielproteins $m_{\text{Zielprotein}}$ an der Gesamtmasse aller enthaltenen Proteine $m_{\text{Gesamtprotein}}$:

$$R = \frac{m_{\text{Zielprotein}}}{m_{\text{Gesamtprotein}}} \quad \text{Gleichung 2.18}$$

Reinigungsfaktor

Der Reinigungsfaktor RF beschreibt das Verhältnis der Reinheit des erhaltenen Eluats zu der Reinheit der Biosuspension vor der Reinigung in Bezug auf das Zielprotein:

$$RF = \frac{R_{\text{Eluat}}}{R_{\text{Biorohsuspension}}} \quad \text{Gleichung 2.19}$$

Ausbeute

Die Ausbeute Y ist das Verhältnis der Masse des gewonnenen Zielproteins im Eluat zur Masse des Zielproteins in der Ausgangslösung vor der Proteinreinigung:

$$Y = \frac{m_{\text{Zielprotein,Eluat}}}{m_{\text{Zielprotein,Biorohsuspension}}} \quad \text{Gleichung 2.20}$$

Aufkonzentrierungsfaktor

Der Aufkonzentrierungsfaktor AF beschreibt das Verhältnis der Konzentration des Zielproteins im Eluat bezogen auf die Konzentration des Zielproteins in der Ausgangslösung vor der Proteinreinigung:

$$AF = \frac{c_{\text{Zielprotein,Eluat}}}{c_{\text{Zielprotein,Biorohsuspension}}} \quad \text{Gleichung 2.21}$$

Kapazitätsverhältnis

Das dimensionslose Kapazitätsverhältnis QV wird definiert als Quotient aus der Anzahl der angebotenen Adsorptionsplätze zu der Anzahl der in der Rohlösung vorhandenen Sorptivmoleküle der Zielkomponente i . Das Kapazitätsverhältnis der verschiedenen Komponenten in einem Gemisch unterscheidet sich, sofern deren Maximalbeladungen und Startkonzentrationen vor der Adsorption nicht identisch sind.

$$QV_i = \frac{m \cdot q_{max,i}}{L \cdot c_{i,0}} \quad \text{Gleichung 2.22}$$

Produktivitätsfaktor

Als Produktivitätsfaktor PF ist das Produkt aus Ausbeute Y und Reinheit R in Bezug auf die Zielkomponente definiert:

$$PF = Y \cdot R \quad \text{Gleichung 2.23}$$

3 Experimenteller Teil

3.1 Chemikalien

Das Serum trächtiger Stuten wurde von dem Haflingergestüt Meura, Deutschland bereitgestellt. Iodacetamid, APS (Ammoniumperoxodisulfat) und EDTA (Ethylen-diamin-tetraacetat) wurden von Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA) bezogen. Essigsäure, meta-Phosphorsäure, Glutardialdehyd und Ethanol (EtOH) stammten von der Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland). Alle anderen Chemikalien sowie die verwendeten Proteine Rinderserumalbumin (BSA) und eCG wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Trypsin stammte von der Firma Promega (Mannheim, Deutschland). Die gebrauchsfertigen Kits zur Durchführung des ELISA wurden von den Firmen DRG Diagnostics (Marburg, Deutschland) und Senova (Jena, Deutschland) bereitgestellt. Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte mittels eines Bicinchoninsäure Assay Kits der Firma Pierce Ltd (Rockford, USA). Die enzymatische Deglykosylierung von Serumproteinen wurde mit Hilfe des „enzymatic protein deglycosylation kit“ der Firma Sigma-Aldrich Co (St. Louis, USA) durchgeführt. Pregmagon[®] wurde von der Firma Biologika GmbH (Dessau-Rosslau, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

3.2 Magnetische Mikrosorbentien

Für die Versuche zur Reinigung von eCG aus Serum wurden die unter Abschnitt 3.2.1 und Abschnitt 3.2.2 aufgeführten magnetischen Partikel verwendet.

3.2.1 Magnetisierbare Polyvinylalkohol Partikel (M-PVA)

Die magnetischen Grundpartikel bestehen aus einer Matrix aus quervernetztem Polyvinylalkohol (M-PVA), welche anschließend carboxyliert wurde. Die Partikel wurden von der Firma chemagen Biopolymer AG, Baesweiler, Deutschland bezogen. Die Herstellungsweise der M-PVA Partikel ist [Oster et al., 2001] zu entnehmen. Die Partikel mit einer endständigen Carboxygruppe besitzen einen Magnetitgehalt von 50-60 %, der Quervernetzungsgrad beträgt 8 %. Die Partikel sind in einem pH-Bereich größer pH 4 stabil.

Die Herstellung der verwendeten magnetischen Anionenaustauschermaterialien wurde von INNOVENT e.V. Technologieentwicklung (Jena, Deutschland) durchgeführt. Für die Herstellung von Anionenaustauscherpartikeln wurden die carboxylierten M-PVA Partikel in H₂O_{dd}

aufgenommen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des Imidreagens 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hydrochlorid (EDC) in einem Molverhältnis von 1:2. Die Partikel wurden in dieser Lösung für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die anschließende Funktionalisierung erfolgte durch die Zugabe von N,N-Diethyl-1,3-propandiamin (DEAP-Funktionalisierung) für 4-5 Stunden unter Rühren bei Raumtemperatur im Molverhältnis 1:2. Die fertiggestellten Sorbentien wurden dreimal in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gewaschen und gelagert.

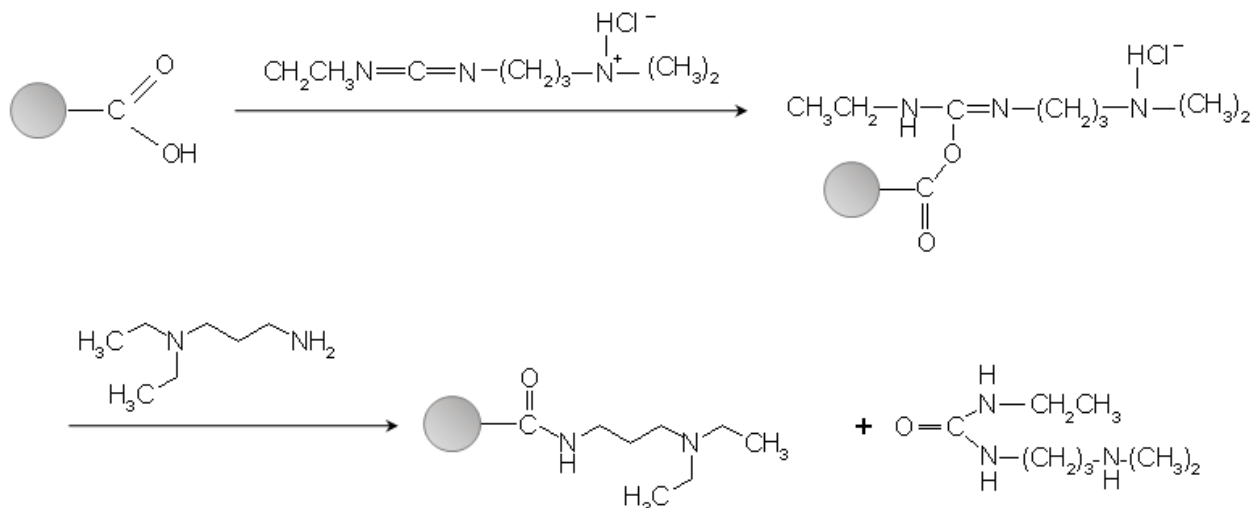


Abbildung 3.1: Reaktionsschema zur Funktionalisierung magnetischer Mikrosorbentien mit DEAP

3.2.2 Magnetisierbare Polysaccharid Partikel

Die magnetischen Grundpartikel der Firma Bio Toolomics (Durham, UK) bestehen aus einer Matrix aus quervernetzten Polysacchariden und Magnetit. Die Partikel sind für kurze Zeit bei einem pH von 2-14 stabil und besitzen eine Langzeitstabilität bei einem pH von 6-12. Verwendet wurden Sorbentien mit Anionenaustauscherfunktionalität (funktionelle Gruppe: $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) sowie Mixed-Mode Liganden (anionische und hydrophobe Gruppen).

3.3 Charakterisierung der magnetischen Mikrosorbentien

Die Eigenschaften der kommerziell bezogenen Partikel wurden mit Hilfe verschiedener Verfahren charakterisiert. Hierzu gehörten die Bestimmung der Magnetisierung und elektronenmikroskopische Aufnahmen. Des Weiteren erfolgten die Bestimmung der Proteinbindekapazität sowie Untersuchungen zur Wiederverwertbarkeit der Partikel.

3.3.1 Magnetisierung

Die Magnetisierung der Partikel als Funktion der angelegten Feldstärke wurde mit Hilfe eines Alternating-Gradient Magnetometers (AGM) bestimmt (Fa. Princeton Measurements, New York, USA).

3.3.2 Partikelgrößenverteilung

Die Bestimmung der Größenverteilung der magnetischen Partikel erfolgte mit Hilfe des Ankersmid's EyeTech Particle Size and Shape Analyser (Ankersmid Lab, Oosterhout, Niederlande).

3.3.3 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Form und Größe der verwendeten Partikel wurden mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen an einem „environmental scanning electron microscope“ (ESEM) XL 30 FEG (Philips, Niederlande) bestimmt.

3.3.4 Proteinbindekapazität

Zur Bestimmung der maximalen Bindekapazität und der Selektivität der eingesetzten Partikel wurden Sorptionsisothermen mit vorgereinigter eCG-Lösung (pH 4) (Kapitel 3.5.1.2) verwendet. Die Versuche wurden in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei Raumtemperatur im Thermomixer durchgeführt. Es wurden Partikelkonzentrationen von 0,4-20 g L⁻¹ eingesetzt. Die Konzentration der Proteinlösung betrug 0,018 mg mL⁻¹ (180 IU_{ELISA} mL⁻¹). Die Partikel wurden dreimal in 500 µL Äquilibrierungspuffer gewaschen. Nach Entnahme des Puffers erfolgte die Zugabe von 1 mL Proteinlösung. Nach 20-minütiger Inkubation wurde der Überstand abgenommen und dessen Konzentration an eCG bestimmt. Die Auswertung der Adsorptionsisothermen erfolgte nach der Langmuir-Gleichung.

$$Q^* = \frac{Q_{max} \cdot C^*}{K_D + C^*} \quad \text{Gleichung 3.1}$$

Q^* steht für die Gleichgewichtsbeladung und C^* für die Gleichgewichtskonzentration des Proteins im Überstand. Q_{max} und K_D stellen die Maximalbeladung und die Gleichgewichtskonstante dar.

3.3.5 Wiederverwendbarkeit der Partikel

Für einen Einsatz der magnetischen Mikrosorbentien in einer kommerziellen Anwendung spielt die Betrachtung der Wirtschaftlichkeit eine entscheidende Rolle. Die Langzeitstabilität der Partikel wurde über insgesamt 50 Reinigungszyklen in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen untersucht. Die Versuchsbeschreibung ist Kapitel 3.5.3 zu entnehmen, nach Schritt 4 erfolgte eine Regeneration der Partikel in 1 M Natriumchlorid Lösung. Eingesetzt wurden 5 g L^{-1} Partikel. In einem weiteren Versuch wurde die Langzeitstabilität der Partikel unter gleichen Versuchsbedingungen, jedoch ohne die anschließende Regeneration der Partikel mit Natriumchlorid untersucht, d.h. nach Schritt 4 folgte direkt wieder Schritt 1.

3.3.6 Gravimetrische Bestimmung der Partikelkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration der in Suspension vorliegenden Magnetpartikel erfolgte mittels Dreifachbestimmung in 1,5 mL Glasbehältnissen (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland). Die Gefäße wurden leer ausgewogen (Laborwage MC5, Sartorius, Göttingen, Deutschland) und anschließend mit je 500 μL Partikelsuspension gefüllt. Die Verdunstung der Flüssigkeit erfolgte über Nacht bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ im Trockenschrank (VE400 Wärmeschrank, Memmert, Schwabach, Deutschland), zum Abkühlen wurden die Gefäße für eine Stunde im Exsikkator aufbewahrt. Durch das Differenzgewicht der jeweiligen Behältnisse, welches durch ein erneutes einwiegen bestimmt wurde, konnte die Partikelkonzentration ermittelt werden.

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 Gesamtprotein

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Bicinchoninsäure (BCA) Assay der Fa. Pierce Ltd, Rockford, Illinois, USA. Die kolometrische Methode basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Absorption wurde bei 560 nm an einem Mikrotiterplattenphotometer (Tecan Infinite F 200, Männedorf, Schweiz) bestimmt.

Die Gesamtproteinkonzentration der Proben nach HPLC (Kapitel 3.5.3), den Versuchen zur Proteinbindekapazität (Kapitel 3.3.4) und zur Wiederverwertbarkeit (Kapitel 3.3.5) wurden mittels NanoDrop (NanoDrop ND 1000, peQLab, Erlangen, Deutschland) bestimmt.

3.4.2 Equines Choriongonadotropin (eCG)

Die Bestimmung der eCG-Konzentration der Proben erfolgte mittels eines Sandwich-ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“). Dabei ist auf die Oberflächen der Mikrotiterstreifen ein primärer („capture“) Antikörper gebunden. Das zu detektierende Protein aus der zugegebenen Probe bindet an den immobilisierten Antikörper. Nach mehrfachem Waschen (Ultrawash II automatic washer/aspirator, Dynatech Laboratories, Chantilly, USA) erfolgt die Zugabe des sekundären Antikörpers welcher mit einem Enzym (Meerrettich-Peroxidase) konjugiert ist. Die Enzymaktivität wird durch Zugabe des Substrates TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin), welches beim Abbau ein farbiges Substrat entwickelt, bestimmt. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe einer Stopplösung beendet.

Für die Ermittlung der eCG-Konzentration wurden Kits der Fa. DRG Diagnostics (Marburg, Deutschland) und Senova (Jena, Deutschland) eingesetzt, der Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des four parameter logistic (4-PL) Models:

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^{-Hillslope}} \quad \text{Gleichung 3.2}$$

EC_{50} wird als halbmaximale effektive Konzentration bezeichnet. Der sogenannte *Hillslope* kennzeichnet die Steigung der Kurve an ihrem Wendepunkt. *min* bzw. *max* bezeichnen das Minimum bzw. das Maximum der Kurve.

Die Bestimmung der biologischen Aktivität erfolgte im Rattenovar-Test durch die Firma IDT Biologika GmbH (Dessau-Roßlau, Deutschland). Bei den jeweiligen Proben wurde die Leitfähigkeit einer physiologischen Kochsalzlösung eingestellt.

3.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die Auftrennung der Proteinproben zur Analyse der Zusammensetzung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher SDS-Page nach *Laemmli* [1970]. Die Elektrophorese wurde in einem Elektrophoresesystem der Fa. Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland) durchgeführt. Die Proteinproben wurde auf einem 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgel mit einem 5 %-igen Sammelgel (8x7 cm) gelelektrophoretisch aufgetrennt (Laufpuffer: Tris-Glycin-Puffer). Als Größenstandard wurde der „AllBlue“ Marker der Fa. Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland) eingesetzt. Die Proteingele wurden anschließend entweder geblottet

(Kapitel 3.4.4), mit Coomassie-Brilliantblue R-250- (Merk, Darmstadt, Deutschland), Silber- oder Fuchsin-Färbelösung gefärbt.

Tris-Glycin-Puffer (1x): Tris 5 mM, Glycin 50 mM, SDS 0,1 % (v/v)

Durch die letztgenannte Färbung des Gels mit Schiffs Reagenz lassen sich spezifisch Glykoproteine wie das Zielprotein eCG nachweisen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 30 min in Fixierungslösung inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit H_2O_{MilliQ} wurde das Gel in Inkubationslösung transferiert (30 min). Nach zweimaligem Waschen mit H_2O_{MilliQ} wurde das Gel mit Schiffsreagenz über Nacht gefärbt. Das Prinzip der Färbung beruht auf der Reaktion des Schiffs Reagenz mit den mit Periodat oxidierten Glykoproteinen.

Fixierungslösung: MeOH 70 %, Essigsäure 10 %

Inkubationslösung: Periodsäure 1 %, Essigsäure 30 %

Fuchsinfärbelösung: Fuchsin-schweflige Säure (Schiffs Reagenz)
Fuchsin 10 % in H_2O_{MilliQ} , Zugabe von schwefliger Säure, bis die rote Färbung verschwunden ist

3.4.4 Western Blot

Die Vorbereitung der Proben und die elektrophoretische Auftrennung ist Kapitel 3.4.3 zu entnehmen. Nach Ende der Gelelektrophorese erfolgte die Äquilibration der Gele in Towbin-Puffer. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe eines Elektroblotters (Semi-Dry-Blotter, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) für 1,5 h bei 85 mA auf eine PVDF-Membran (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) transferiert. Vor Applikation der jeweiligen Antikörper wurde die Membran in Blocking-Puffer für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe des primären Antikörpers (Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland) erfolgte in einer 1:2000 Verdünnung in Blocking-Puffer. Die Inkubation fand über Nacht bei 4 °C statt. Vor Applikation des sekundären Antikörpers (1:5000 Verdünnung in Blocking-Puffer, 1 h bei Raumtemperatur) wurden die Membranen fünfmal je 5 min mit Waschpuffer (TBS/T) gewaschen. Durch die Konjugation des Zweitantikörpers mit Meerrettich-Peroxidase erfolgte die Detektion der Proteine mittels Chemilumineszenz gemäß den Herstellerangaben (ECL Plus Detektionssystem, Amersham, Freiburg, Deutschland). Die Auswertung der Western Blot Daten erfolgte mittels Lumi-Imager F1TM (Boehringer, Mannheim, Deutschland).

Towbin-Puffer: Tris 25 mM, Glycin 192 mM, MeOH 20 % (v/v), pH 8,3

Blocking-Puffer: Magermilchpulver 5 % (m/v), Tween-20 0,1 % (v/v) in 1x TBS

Waschpuffer (TBS/T): Tween-20 0,1 % (v/v) in 1x TBS

3.4.5 Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-ToF-MS)

Bei der MALDI-ToF-MS wird ein gepulster Laser mit einem Flugzeit-Massenspektrometer gekoppelt. Durch den gepulsten Laserstrahl entstehen diskrete Ionenpakete, bestimmt wird die Ionenflugzeit zwischen Quelle und Detektor. Die zu analysierenden Proteine wurden aus dem SDS-Page ausgeschnitten und für 10 min in H₂O_{MilliQ} gewaschen. Anschließend folgten Waschschrte mit Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (10 mM) und Acetonitril (1:1 mit 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer) für je 10 min. In einem folgenden Schritt erfolgte die Reduktion der Disulfidbindungen mit Dithiothreitol (10 mM DTT in 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer) für 15 min bei 60 °C. Die anschließende Alkylierung der SH-Gruppen erfolgt abgedunkelt mit 55 mM Iodacetamid für 15 min. Im Folgenden werden die Gelstücke abwechselnd mit 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer und Acetonitril/10 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (1:1) für 10 min entfärbt. Nach dem Eindampfen der Lösung in einem SpeedVac Konzentrador (Eppendorf concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), wurden die Gelstücke in einer Trypsinlösung reäquilibriert. Im Anschluss wurden diese mit 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer überschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10-minütiger Inkubation der Proben im Ultraschallbad (Ultrasonic Cleaner, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) wurden 0,5 µl dieser Lösung mit 0,5 µl 4-Hydroxy- α -Cyano-Zimtsäure Matrix (10 mg ml⁻¹ in Acetonitril:Trifluoressigsäure 1:1) versetzt und auf einem MALDI-Probenteller co-kristallisiert. Die Aufnahme der Spektren erfolgte an einem 4800 Plus Analyzer time-of-flight Massenspektrometer (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). Die Sequenzierung der einzelnen Peptide erfolgte im positiven Reflektormodus in einem Bereich von 800.000 - 4000.000 Da. Die Kalibrierung erfolgte mit einem externen Standard der Firma Applied Biosystems, Foster City, USA (4700 Proteomics Analyzer Mass Standards Kit).

Die Massenbestimmung einzelner Fraktionen erfolgte mit Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxymzimsäure) und 2,5-Dihydroxybenzoesäure. Je 10 mg ml⁻¹ der Matrix wurde mit Acetonitril:Trifluoressigsäure (1:1) versetzt. 0,5 µl der jeweiligen Probe wurden mit 0,5 µl Matrix verdünnt und auf einem MALDI-Probenteller co-kristallisiert.

3.4.6 Enzymatische Deglykolisierung von Glykoproteinen

Die enzymatische Deglykolisierung von Serumproteinen wurde mit Hilfe des „enzymatic protein deglycosylation kit“ der Firma Sigma-Aldrich Co (St. Louis, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Des Weiteren wurde mit den im Kit vorhandenen Proteinen eine in-Gel Deglykolisierung mit anschließender MALDI-ToF-Analyse durchgeführt. Die Proben wurden bis zum Einsatz des SpeedVac Konzentratoren (Eppendorf concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), analog zu Kapitel 3.4.5 behandelt. Anschließend wurden die Gelstücke mit 1 µL Enzym reäquilibriert und für 30 min bei 37 °C inkubiert, mit H₂O_{MilliQ} überschichtet und weitere 16-18 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Gelstücke bei 4000 rpm zentrifugiert der Überstand wurde dekantiert, durch 200 µl H₂O_{MilliQ} ersetzt und für 30 min im Ultraschallbad (Ultrasonic Cleaner, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Nach der Entnahme des Überstandes erfolgten zwei weitere Waschschrirte mit H₂O_{dd} und folgender 30-minütiger Inkubation im Ultraschallbad. Anschließend wurden die Gelstücke mit Acetonitril/10 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (1:1) für 5 min gewaschen. Nach dem Eindampfen der Lösung in einem SpeedVac Konzentratoren, wurden die Gelstücke in einer Trypsinlösung reäquilibriert. Im Anschluss wurden diese mit 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer überschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die weitere Behandlung der Proben erfolgte analog zu Kapitel 3.4.5.

3.5 Reinigung von equinem Choriongonadotropin (eCG) aus Serum im Labormaßstab

3.5.1 Reinigung von eCG aus Serum

Das für die Reinigung von eCG verwendete Blut wurde zwischen Tag 50 und 100 der Trächtigkeit von Haflingerstuten (Haflingergestüt Meura, Meura, Deutschland) entnommen. Das daraus gewonnene Serum wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Serum besaß eine Wertigkeit von 200-400 Mauseinheiten (ME) pro mL. Der derzeitige Stand der Technik für die Reinigung des Proteins eCG ist ein bereits 1967 entwickeltes Verfahren nach *Gospodarowicz und Papkoff* [1967] (Kapitel 3.5.1.1). Bei diesem Verfahren handelt es sich um einen mehrstufigen Fällungsprozess mit anschließender chromatographischer Reinigung. Die Reinigung von eCG wurde zunächst nach dem bereits etablierten Prozess durchgeführt und anschließend optimiert (Kapitel 3.5.1.2).

3.5.1.1 Konventionelle Reinigung von eCG

Die Versuche zur die Reinigung von eCG wurden im 500 mL Maßstab wie folgt vorgenommen:

1. Serum mit 0,5 M meta-Phosphorsäure auf pH 3 einstellen
2. Zentrifugation bei 14300 x g, 10 min, Raumtemperatur
3. Überstand mit 1 M NaOH auf pH 4,5 einstellen
4. Zugabe von eiskaltem EtOH (50 % v/v), Inkubation bei 4 °C über einen Zeitraum von 2 Stunden
5. Zentrifugation bei 14300 x g, 20 min, 4 °C
6. Zugabe von eiskaltem EtOH (75 % v/v), Inkubation bei 4 °C über einen Zeitraum von 20 Stunden
7. Abgießen des Überstandes, Aufnahme des Pellets in H₂O_{MilliQ}
8. Dialyse des Pellets gegen H₂O_{MilliQ}, Lyophilisierung des Dialysates
9. Reinigung an Anionenaustauschermaterialien (Kapitel 3.5.3)

Die Versuchsdurchführung bis einschließlich Schritt 7 wird im Folgenden als konventionelle Vorreinigung des Proteins eCG bezeichnet.

3.5.1.2 Vereinfachte Reinigung von eCG

Die Versuche wurden im 2 L Maßstab durchgeführt, die Reinigung wurde analog zu (Kapitel 3.5.1.1) Schritt 1-5 durchgeführt. Zur folgenden Ultra-/Diafiltration wurde ein Crossflow-System der Firma Sartorius (Göttingen, Deutschland) eingesetzt.

Die nach der ersten EtOH-Fällung gewonnene eCG-Lösung wurde bis zu einem Konzentrationsfaktor von 4 ultrafiltriert und anschließend diskontinuierlich gegen H₂O_{MilliQ} an einer Zellulosemembran diafiltriert (10000 MWCO Hydrosart, Sartorius, Göttingen, Deutschland). Das resultierende ultra-/diafiltrierte Produkt wurde direkt an magnetischen Anionenaustauschermaterialien gereinigt (Kapitel 3.5.3). Die Versuchsdurchführung bis einschließlich der Ultra-/Diafiltration wird im Folgen als vereinfachte Vorreinigung des Proteins eCG bezeichnet.

3.5.2 Optimierung der Vorreinigung von eCG aus Serum

Mit Hilfe des Prinzips der optimalen Versuchsplanung wurden die Methoden der konventionellen (Kapitel 3.5.1.1) und vereinfachten (Kapitel 3.5.1.2) Reinigung von eCG vor Einsatz der Ionenaustauschermaterialien optimiert. Von Interesse waren dabei die Faktoren pH-Wert der

meta-Phosphorsäure Fällung, der durch Ultrafiltration eingestellte Konzentrationsfaktor sowie das Verhältnis der Leitfähigkeiten (LF_0/LF) auf die Reinheit des eCG im Endprodukt (bestimmt in eCG pro Gesamtprotein in $IU\ mg^{-1}$). Die Aufstellung des Versuchsplanes und dessen Auswertung wurde mit Hilfe des Programmes MODDE 9.0 (Firma Umetrics Inc., San Jose, USA) durchgeführt. Verwendet wurden je 200 mL Serum mit einer Wertigkeit von $200\ ME\ mL^{-1}$.

Tabelle 4.1: Nomenklatur der drei Einflussfaktoren pH, Konzentrationsfaktor (CF) und Leitfähigkeit (LF_0/LF)

| Einflussfaktor | -1 | 0 | 1 |
|----------------|----|-----|----|
| pH | 3 | 3,5 | 4 |
| CF | 1 | 2 | 5 |
| LF_0/LF | 1 | 5 | 10 |

Bei den in Tabelle 4.1 aufgeführten Leveln -1, 0 und 1 handelt es sich um die Standardlevel innerhalb der Versuchsschemata, sie werden für jeden der Einflussparameter so gewählt, dass sie dessen relevanten Bereich gut repräsentieren. Als Modellform für die Optimierung wurde das Response Surface Modell (RSM), als Design CCF (central composite face centeres) gewählt.

3.5.3 Ligandenscreening

Analog zu der in der Literatur angeführten weitergehenden Reinigung von eCG wurde zunächst die säulenchromatographische Trennung mit einem Äkta Purifier (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Mehrere Anionenaustauschermaterialien (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) wurden bezüglich ihrer Bindungskapazität gegenüber eCG untersucht. Verwendet wurden sowohl starke (Q Sepharose Fast Flow (Q FF), Q Sepharose XL (Q XL), Mono Q) als auch schwache (DEAE Sepharose Fast Flow) Anionenaustauscher-Materialien. Die Säulen hatten ein Volumen von 1 mL bzw. 5 mL (Mono Q) und wurden vor der Chromatographie mit Äquilierungspuffer äquilibriert. Q FF wurde als optimaler Ligand ermittelt, eine Säule mit einem Säulenvolumen (CV) von 20 mL wurde für alle folgenden Experimente verwendet. Die Elution erfolgte mit einem ansteigenden NaCl-Gradienten (Elutionspuffer). Die aufgefangenen Proben wurden bezüglich ihrer eCG-Aktivität im ELISA (Kapitel 3.4.2) getestet.

Optimale Puffer Systeme:

Äquilierungspuffer: Natriumacetat 0,02 M, pH 4,5

Elutionspuffer: Natriumacetat 0,02 M, NaCl 1 M, pH 4,5

Flussrate: 0,8 - 1 mL min⁻¹ (1 mL CV), 2 mL min⁻¹ (20 mL CV)

Fraktionsvolumen: 1 mL (1 mL CV), 5 mL (20 mL CV)

Nachfolgend wurden magnetische Mikrosorbentien (Kapitel 3.2.1) mit Anionenaustauscherfunktionalität eingesetzt. Das Screening nach geeigneten Liganden an M-PVA Partikeln wurde von der Firma INNOVENT e.V. Technologieentwicklung (Jena, Deutschland) durchgeführt, wobei sich die N,N-diethylammonium-Gruppe (DEAP-Funktionalisierung) als bester Ligand herausstellte.

Die Reinigung von eCG mit Hilfe magnetischer Mikrosorbentien mit DEAP-Funktionalisierung wurde wie folgt durchgeführt:

1. Partikel dreimal für je 5 min mit Waschpufferpuffer waschen
2. Inkubation der Partikel mit vorgereinigter eCG Lösung für 20 min
3. Wiederholung von Schritt 1
4. Zweimalige Elution mit Elutionspuffer für je 20 min

Zwischen jedem Wasch-, Beladungs-, und Elutionsschritt wurden die Partikel magnetisch separiert, um eine Abtrennung des Überstandes zu ermöglichen. Die Durchmischung der Partikel mit dem jeweiligen Fluid erfolgte im Thermomixer (Modell Comfort, Eppendorf, Hamburg) bei 1000 rpm, bei größeren Volumina wurde mit Hilfe eines Glasstabes von Hand gerührt.

Optimale Puffersysteme:

Waschpuffer: Natriumacetat 0,01 M, pH 4,5

Elutionspuffer: Natriumdihydrogenphosphat 0,01 M, Dinatriumhydrogenphosphat 0,01 M, Natriumchlorid 0,3 M, pH 8

Die Reinigung von eCG wurde jeweils mit Proben nach konventioneller (Kapitel 3.5.1.1) und vereinfachter (Kapitel 3.5.1.2) Vorreinigung durchgeführt. Die kommerziellen Partikel der Firma Bio Toolomics (Durham, UK) (Kapitel 3.2.2) wurden nur in Separationsversuchen mit eCG aus konventioneller Vorreinigung (Kapitel 3.5.1.1) eingesetzt.

3.5.4 Optimierung der Elutionsbedingungen

Die Versuche wurden in 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäßen im Fall der magnetischen Sorbentien, bzw. im 1 mL Bettvolumen im Fall der verwendeten Säulenmaterialien durchgeführt. Im Fall der magnetischen Anionenaustauschersorbentien wurde, wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben, unter der Verwendung von eCG-Lösung nach vereinfachter Vorreinigung, verfahren. Die

Konzentration an eCG im abgetrennten Überstand nach der Inkubation der Protein-Lösung sowie der Elutionüberstand wurde mittels ELISA bestimmt.

Die Optimierung des geeignet Elutionspuffer (Phosphatpuffer, pH 8) erfolgte lediglich mit den unter Kapitel 3.2.1 beschriebenen M-PVA Partikeln (Herstellung und Funktionalisierung durch Projektpartner chemagen Biopolymer AG, Baesweiler, Deutschland und INNOVENT e. V. Technologieentwicklung, Jena, Deutschland), der ermittelte Puffer wurde auch für die kommerziellen Anionenaustauschermaterialien der Firma Bio Toolomics (Durham, UK) (Kapitel 3.2.2) verwendet. Die Optimierung der Elutionsbedingungen erfolgte durch Variation der Salzkonzentration des Elutionspuffers von 0-1 M Natriumchlorid.

Zur Optimierung der Elutionsbedingungen an den 1 mL Chromatographiematerialien mit Anionenaustauscherfunktionalität wurde Q FF als Referenzmaterial verwendet. Eingesetzt wurde ein Natriumacetat-Puffer verschiedener Molarität und pH (0,05 M NaAc, pH 5,5; 0,05 M NaAc, pH 4,5; 0,02 M NaAc, pH 4,5) Bis-Tris- (0,07 M, pH 6) und Tris-Puffer (0,02 M, pH 4,5) mit je 1 M NaCl.

3.5.5 Optimierung der Partikelkonzentration

Die Versuche wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an M-PVA Partikeln (0,2-10 g L⁻¹) unter dem in Kapitel 3.5.3 beschriebenen Prozess mit eCG-Lösung nach vereinfachter (Kapitel 3.5.1.2) Vorreinigung durchgeführt.

3.5.6 Binde- und Elutionskinetik

Zur Messung der Bindekinetik des vorgereinigte eCG (Kapitel 3.5.1.2) wurden Proben des Sorptionsüberstandes in unterschiedlichen Zeitabständen (30 s – 20 min) gezogen und deren eCG-Gehalt gestimmt. In einer zweiten Versuchsreihe zur Bestimmung der Elutionskinetik wurden die M-PVA Partikel für 20 min mit Protein beladen, die folgenden Elutionszeiten wurden variiert (60 s– 20 min). Die Partikelkonzentration betrug je 5 g L⁻¹ M-PVA Partikel.

3.6 Proteinreinigung mit Hilfe der automatisierten HGMF-Laboranlage im 180 mL Maßstab

Der verwendete Durchfluss-Separator (Abbildung 3.2) mit einem Elektromagneten (Firma Steinert, Köln, Deutschland) ist eine gemeinsame Entwicklung des Karlsruher Institut für

Technologie (Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland) und der Firma chemagen Biopolymer AG (Baesweiler, Deutschland).

Die Filterkammer des Magnetseparators fasst ein Volumen von 180 mL und beinhaltet magnetisierbare Rotor- und Statorscheiben (Kapitel 3.7.1), die im magnetischen Feld angeordnet sind. Die Flussdichte des luftgekühlten Elektromagneten beträgt 0,28 T im Zentrum der Bohrung. Die Luftkühlung wurde mit 9 Axiallüftern 60 x 60 x 25 mm (nicht abgebildet) der Firma embpapst GmbH & Co. KG realisiert.



Abbildung 3.2: Automatisierte HGMF-Laboranlage inklusive Peripherie

Vor Versuchsbeginn wurde der Separator mit Waschpuffer gefüllt. Im Rahmen der Reinigung des Proteins eCG aus konventionell vorgereinigtem Serum (Kapitel 3.5.1.1) fand in einem externen Behältnis (B1) unter Rühren die Batchadsorption des Zielproteins an die magnetischen Mikrosorbentien über einen Zeitraum von 20 min statt. Die Abbildungen 3.2 und 3.3 zeigen das ein Photo und das Verfahrensschema (Fließbild) der HGMF-Laboranlage.

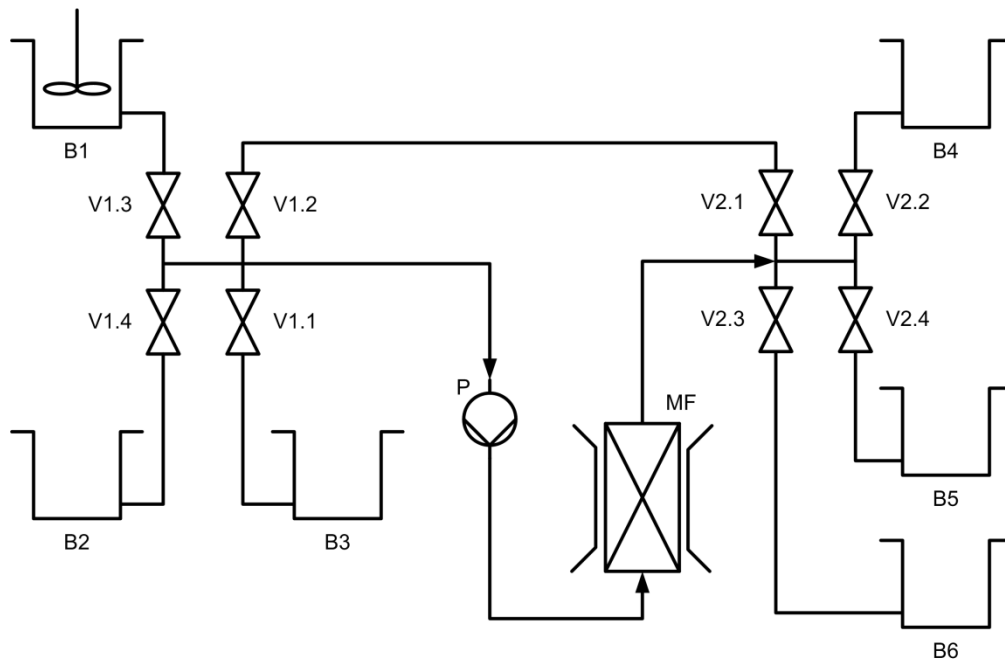


Abbildung 3.3: Fließschema der HGMF-Laboranlage. B1: Partikel-/Proteinsuspension, B2: Elutionspuffer, B3: Waschpuffer, B4: Abfall, B5: Durchfluss, B6: Produkt, V: Ventil, P: Pumpe, MF: magnetischer Filter

Die Partikel-/Proteinsuspension wurde mittels einer Schlauchpumpe (P) und bei eingeschaltetem Magnetfeld über das Ventil V1.3 durch den magnetischen Filter (MF) gepumpt, wobei die mit Zielprotein beladenen Partikel zurückgehalten wurden. Der Volumenstrom betrug ca. 150 mL min^{-1} . Der Sorptionsüberstand wurde über das Ventil V2.2 aus dem System gepumpt. Bei weiterhin eingeschaltetem Magnetfeld wurde das System mit 600 mL Waschpuffer über Ventil V1.1 durchspült. Anschließend wurde die Pumpe gestoppt und die Partikel bei ausgeschaltetem Magnetfeld durch schnelle Rotation des Rotors des Rotor-/Stator Segmentes für 1 min in Waschpuffer resuspendiert. Nachfolgend wurden die Partikel bei geschlossenem Rezyklierungskreislauf (Ventil V1.2 und Ventil V2.1) und eingeschaltetem Magnetfeld „eingesammelt“. Insgesamt wurden drei Waschschrte durchgeführt, die Ausschleusung des verbrauchten Waschpuffers erfolgte über Ventil V2.2. Die Elution des gebundenen Zielproteins erfolgte in drei aufeinanderfolgenden Elutionszyklen mit je 600 mL Elutionspuffer analog zu den vorangegangenen Waschschrten. Hierbei wurde der Elutionspuffer über Ventil V1.4 in das System gepumpt und über Ventil V2.3 in einem Behälter aufgefangen.

Waschpuffer: Natriumacetat 0,01 M, pH 4,5

Elutionspuffer: Natriumdihydrogenphosphat 0,01 M, Dinatriumhydrogenphosphat 0,01 M, Natriumchlorid 0,3 M, pH 8

3.7 Hydrodynamische Charakterisierung der HGMF-Pilotanlage

3.7.1 HGMF-Pilotanlage

Der für die Reinigung von eCG verwendete Durchfluss-Separator ist eine gemeinsame Entwicklung des Karlsruher Institut für Technologie (Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland), und den Firmen chemagen Biopolymer AG (Baesweiler, Deutschland) und ABBIS bio process automation (Wiesbaum, Deutschland). Der für das System benötigte wassergekühlte Elektromagnet wurde von der Firma Steinert (Köln, Deutschland) angefertigt. Durch die Kühlung des Magneten wurde erreicht, dass die Wandtemperatur des Magneten auch im Dauerbetrieb nicht über 20 °C steigt, wodurch ein Einsatz im Zusammenhang mit temperaturempfindlichen Proteinen erst möglich wurde. Abbildung 3.4 zeigt die für die Reinigung von eCG eingesetzten automatisierte HGMF-Anlage sowie eine schematische 3-D Ansicht eines Querschnitts durch den Elektromagneten mit eingesetzter Filterkammer.



Abbildung 3.4: Photo der automatisierten HGMF-Pilotanlage inklusive Peripherie und 3D-Schnittzeichnung (© ABBIS bio process automation, Wiesbaum, Deutschland) des Elektromagneten mit integrierter Filterkammer

Die Filterkammer des Magnetseparators fasst ein Volumen von 980 mL. Die Filtermatrix beinhaltet magnetisierbare Rotor- und Statorscheiben, die im magnetischen Feld angeordnet sind.

Die Flussdichte des Elektromagneten beträgt 0,25 T im Zentrum der Bohrung des Elektromagneten. Die stationären Statorscheiben sind alternierend zu den beweglichen Rotorscheiben auf einer beweglichen Welle angebracht. Das verwendete Rotor-/Stator Prinzip gewährleistet eine homogene Durchmischung der Suspension, d.h. effiziente Wasch- und Elutionsschritte sowie eine vollständige Wiedergewinnung der Partikel [Peuker et al., 2010]. Abbildung 3.5 zeigt eine Schemazeichnung des Rotor-/Stator Magnetseparators.

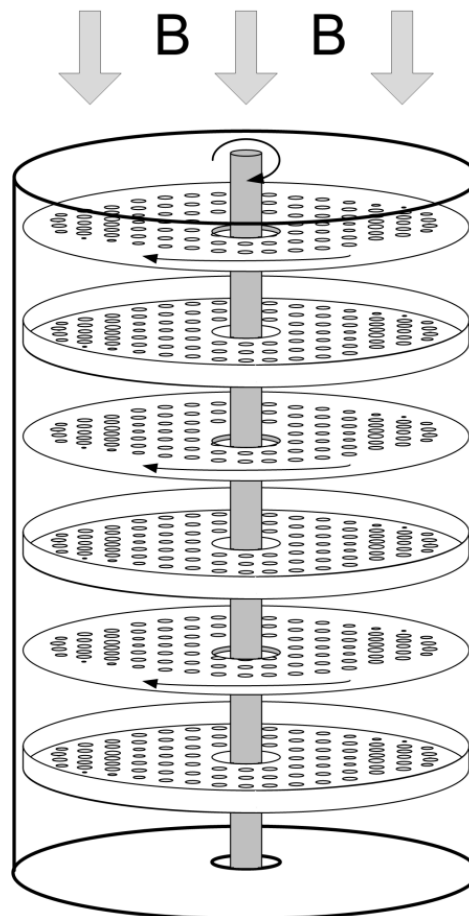


Abbildung 3.5: Schemazeichnung des Rotor-/Stator Magnetseparator

Eine eingehende Beschreibung des verwendeten Rotor-/Stator Prinzips ist in der Patentschrift von Franzreb und Reichert [2006] zu finden. Ein Fließbild der HGMF-Pilotanlage ist Abbildung 3.6 (Kapitel 3.8) zu entnehmen.

3.7.2 Pumpenkennlinie

Für die in das HGMF-System integrierte Schlauchpumpe (Modell TP 4000, Thölen Pumpen GmbH, Kevelaer, Deutschland) wurde das Fördervolumen pro Zeiteinheit in Abhängigkeit von der Pumpleistung im Saug- und Druckbetrieb ermittelt. Da die Unterschiede in der Viskosität der

verwendeten Medien vernachlässigt werden kann, wurde das geförderte Volumen in den späteren Versuchen mit Wasser bestimmt.

3.7.3 Bestimmung des Volumens der Filterkassette

Die Bestimmung des Fassungsvermögens der Filterkassette sowie der Volumina der Zulauf- bzw. Ablaufleitung des Separators erfolgte gravimetrisch aus der erhaltenen Flüssigkeitsmenge mit Hilfe einer Laborwaage (Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland).

3.7.4 Bestimmung des Totvolumens und der Verweilzeit über Tracerversuche

Für die Versuchsdurchführung wurde in das bestehende System eine Leitfähigkeitsmesszelle TetraCon[®] DU/T (WTW, Weilheim, Deutschland) am Ablauf des Separators integriert. Der Separator wurde zu Beginn mit H₂O_{MilliQ} gespült, bis ein konstantes Leitfähigkeitssignal erreicht wurde. Anschließend wurde eine 15 mM Natriumchloridlösung durch den Separator gepumpt. Nach Erreichen des stationären Zustandes wurde wieder H₂O_{MilliQ} durch den Separator gepumpt. Der Versuch wurde mehrmals unter der Verwendung unterschiedlicher Durchsätze (200, 610, 1020 mL min⁻¹) und unter der Verwendung von 0 bzw. 10 % Rührerleistung (0-120 rpm) durchgeführt.

Die Verweilzeitsummenfunktion $F(t)$ und die Verweilzeitdichtefunktion $E(t)$ wurden aus dem aufgenommenem Leitfähigkeitssignal mittels Gleichung 3.3 und Gleichung 3.4 bestimmt [Levenspiel, 1999]. Mit dem Volumenstrom \dot{V} in m³ s⁻¹, der Flussrate des Tracers \dot{m} in kg s⁻¹ und der Austrittskonzentration des Tracers C_{step} .

$$F(t) = \frac{\dot{V}}{\dot{m}} C_{step} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

$$E(t) = \frac{dF}{dt} \quad \text{Gleichung 3.4}$$

3.7.5 Bestimmung der Kapazität des magnetischen Filters

Die Filterkapazität wurde unter der Verwendung von 100 g carboxylierter M-PVA Partikel (Firma chemagen Biopolymer AG, Baesweiler, Deutschland) und Waschpuffer (0,01 M Natriumacetat, pH 4,5) untersucht. Die Partikel wurden in einem externen Behältnis in 20 L Puffer suspendiert. Anschließend wurde die Suspension bei einem Fluss von 1020 mL min⁻¹ und eingeschaltetem

Magnetfeld durch den Filter gepumpt. Zur Simulation eines Reinigungsprozesses wurde ein automatisiertes Versuchsprotokoll mit insgesamt acht Waschschritten gestartet. Die Partikelkonzentration im Ablauf der verschiedenen Schritte wurde gravimetrisch bestimmt (Kapitel 3.3.6).

3.7.6 Bestimmung des Partikelverbleibes

Die Bestimmung des Verbleibes an Partikeln im Separator nach Abschluss eines HGMF-Prozesses erfolgte gravimetrisch aus der Differenzmessung zwischen der eingesetzten und aus dem Separator ausgeschleusten Partikelmenge wie unter (Kapitel 3.3.6) beschrieben.

3.7.7 Optimierung der Waschschrritte im automatisierten HGMF-Prozess

Im Anschluss an die Batch-Adsorption und das Beladen des Filters mit der Magnetpartikel-/Proteinsuspension befinden sich ungebundene Fremdproteine in der Filterkammer. Zur Gewährleistung der Elimination des nicht gebundenen Proteins folgen mehrere automatisierte Waschschrritte. Die Optimierung der Waschschrritte erfolgte durch den Einsatz verschiedener Volumina (3200, 2700 und 2200 mL) an Waschpuffer und 10 g (5 g L^{-1}) carboxylierter Polyvinylalkohol Partikel (Fa. chemagen Biopolymer AG, Baesweiler, Deutschland) in einem automatisierten Prozess über 10 Waschzyklen. Die Waschschrritte wurden analog zu dem in Kapitel 3.8 beschriebenen Verfahren durchgeführt.

Als Proteinlösung wurde Leerserum (Serum ohne das Zielprotein eCG) und Leerserum welches mit Waschpuffer auf eine Proteinkonzentration der vorgereinigten eCG-Lösung ($\approx 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) (Kapitel 3.5.1.2) eingestellt wurde verwendet. Die Auswertung erfolgte über eine Gesamtproteinbestimmung in den Abläufen der einzelnen Waschschrritte.

3.8 Proteinreinigung mit Hilfe der automatisierten HGMF-Pilotanlage im 1 L Maßstab

Das Fließbild der in Kapitel 3.7.1 beschriebenen HGMF-Pilotanlage ist in Abbildung 3.6 dargestellt.

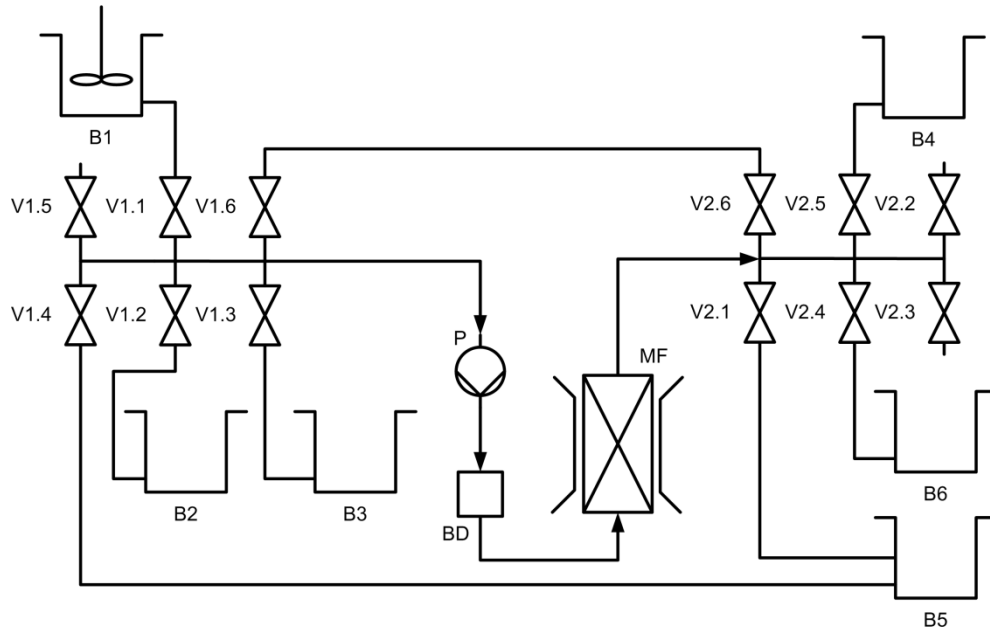


Abbildung 3.6: Fließschema der HGMF-Pilotanlage. B1: Partikel-/Proteinsuspension, B2: Waschpuffer, B3: Elutionspuffer, B4: Durchfluss, B5: Abfall, B6: Produkt, V: Ventil, P: Pumpe, BD: Blasendetektor, MF: magnetischer Filter

Vor Versuchsbeginn wurde der Separator mit Waschpuffer gefüllt. Im Rahmen der Reinigung des Proteins eCG aus vorgereinigtem Serum (Kapitel 3.5.1.2) wurde zunächst ein Batch-Adsorptionsschritt für 20 min unter Rühren in einem externen Behälter (B1) durchgeführt. Im Anschluss wurde die Magnetpartikel-/Proteinsuspension mit einem Fluss von 1020 mL min^{-1} und eingeschaltetem Magnetfeld mit einer Schlauchpumpe (P) durch den magnetischen Filter gepumpt (V1.1). Die magnetischen mit Protein beladenen Partikel sammelten sich im Filter, der Sorptionsüberstand wurde über das Ventil V2.5 aus dem System gepumpt. Nach Beladen des Separators mit magnetischen Partikeln wurde der Prozessstrom unterbrochen. Die weitere Proteinreinigung erfolgte über einen automatisierten Prozess mit computergesteuerter Schaltung von Ventilen, Rührer, Magnet und Pumpe:

Bei eingeschaltetem Magnetfeld wurde das System mit 2700-3200 mL Waschpuffer über Ventil V1.2 befüllt. Anschließend wurde die Pumpe gestoppt und die Partikel bei ausgeschaltetem Magnetfeld für 1 min in Waschpuffer resuspendiert. Nachfolgend wurden die Partikel bei geschlossenem Rezyklierungskreislauf (Ventil V1.6 und Ventil V2.6) und eingeschaltetem Magnetfeld für 2 min „eingesammelt“. Insgesamt wurden drei aufeinanderfolgende Waschschr

durchgeführt, wobei die Verdrängung des verbrauchten Waschpuffers über Ventil V2.1 erfolgte. Die Elution des gebundenen Zielproteins erfolgte in drei aufeinanderfolgenden Elutionszyklen mit je 1800 mL Elutionspuffer analog zu den vorangegangenen Waschschritten. Hierbei wurde der Elutionspuffer über Ventil V1.3 in das System gepumpt und über Ventil V2.4 in einem Behälter (B6) aufgefangen. Anschließend folgten zwei Waschschrritte, analog zu den vorangegangenen Waschschrritten, zum Waschen der Partikel.

Das Ausschleusen der Partikel aus dem System erfolgte manuell mit der Pumpeinstellung „rückwärts“ über Ventil V1.1.

Waschpuffer: Natriumacetat 0,01 M, pH 4,5

Elutionspuffer: Natriumdihydrogenphosphat 0,01 M, Dinatriumhydrogenphosphat 0,01M, Natriumchlorid 0,3 M, pH 8

4 Ergebnisse und Diskussion

Die Entwicklung eines technischen Verfahrens zur Isolation von Proteinen aus Prozessströmen mittels Hochgradienten-Magnetseparation erforderte nach der Auswahl eines geeigneten, an M-PVA Partikeln immobilisierten Liganden durch den Projektpartner INNOVENT e. V. (Jena, Deutschland), die Optimierung der Sorptions- und Elutionsbedingungen im Labormaßstab, die Übertragung der gewonnenen Daten auf den technischen Maßstab (scale-up), die verfahrenstechnische Charakterisierung der für das scale-up entwickelten HGMF-Pilotanlage sowie die Optimierung des Prozessablaufes im technischen Maßstab.

Im Folgenden wird neben der zu Vergleichszwecken dienenden Darstellung der Ergebnisse konventioneller Verfahren zur Isolation des Proteins eCG, das systematische Vorgehen für die Entwicklung eines Prozesses unter der Verwendung magnetischer Mikrosorbentien unter Berücksichtigung der angeführten Teilaspekte vorgestellt.

4.1 Konventionelle Reinigung

Ein noch heute gängiges Verfahren zur Reinigung von eCG aus Serum wurde erstmalig bereits 1967 von *Gospodarowicz & Papkoff* vorgestellt. Der mehrstufige Reinigungsprozess beinhaltet einen Säurefällungsschritt (mit meta-Phosphorsäure (HPO_3)) sowie zwei Fällungen mit unterschiedlichen Volumenkonzentrationen (50 % und 75 %) an Ethanol mit anschließender Dialyse und Gelfiltration zur groben Vorreinigung des eCG. Im Anschluss folgen je nach gewünschter Reinheit bis zu vier Reinigungen an Kationenaustauschermaterialien. Aufgrund des niedrigen pI-Wertes des Proteins eCG von 1,8 [Allen & Stewart, 1993] wurden zur weiteren Reinigung des eCG Anionenaustauschermaterialien (siehe Kapitel 4.1.1) verwendet. Die Ergebnisse mehrerer Versuche zur groben Reinigung des eCG nach konventionellem Schema sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Die Berechnung der Ausbeute, des Aufreinigungs- und Konzentrierungsfaktors ist Kapitel 2.8 zu entnehmen. Bei den in der Tabelle angegebenen Daten handelt es sich um die Mittelwerte aus drei Wiederholungsversuchen.

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Daten für die konventionelle Vorreinigung von eCG aus Serum durch Präzipitation nach *Gospodarowicz & Papkoff* [1967]

| Schritt | Protein [mg/mL] | eCG [IU _{ELISA} /mL] | Volumen [mL] | Ausbeute [%] | Aufreinigungs- faktor | Konzentrierungs- faktor |
|----------------------|--------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|----------------------------|
| Serum | 60±0,5 | 38±17 | 500 | 100 | 1 | 1 |
| HPO ₃ ppt | 14±5,6 | 23±3,4 | 620 | 73±18 | 2,5±2,1 | 0,59±0,2 |
| Lyophilisat | 1,1±0,3 | 123±37 | 91 | 53±7,8 | 180±100 | 3,2±2,7 |

In den Versuchen konnten Ausbeuten an eCG von ca. 50 % erreicht werden, wobei für größere Maßstäbe mit höheren Ausbeuten gerechnet werden kann, da sich die notwendigen mechanischen Separationsschritte mit geringeren Verlusten durchführen lassen. Bezogen auf das gewonnene Lyophilisat wurde ein mittlerer Aufreinigungsfaktor von 180 und eine mittlere Aufkonzentrierung des eCG im Lyophilisat um einen Faktor 3 erreicht. Der Stufenverlust an eCG durch die vorgenommenen Ethanol-Fällungen (50 % und 75 % v/v) sind in der Tabelle nicht aufgeführt. Die hohe Ethanol-Konzentration verhinderte eine Detektion der Aktivität der Probe mittels ELISA.

Die Lyophilisate zeigten eine durchschnittliche spezifische Aktivität von 130 IU_{ELISA} mg⁻¹. In der Literatur finden sich Reinheitswerte für durch Präzipitation gewonnenes eCG von 638 IU mg⁻¹ *in vivo* [Gospodarowicz & Papkoff, 1967], wobei die Determination der *in vivo* Aktivität nach *Cole & Erway* [1941] erfolgte. Die ermittelten Aktivitäten können jedoch nicht direkt miteinander verglichen werden. Es besteht dennoch eine Korrelation zwischen den Ergebnissen des Immunoassays und des *in vivo* Bioassays. In späteren Versuchen stellte sich heraus, dass in den durchgeführten ELISA-Assays ca. 30 % geringere Aktivitäten detektiert werden, wie in dem durch die Firma IDT Biologika (Dessau-Rosslau, Deutschland) durchgeführten Bioassay. In einer umfangreichen Studie mit insgesamt acht teilnehmenden Laboren aus unterschiedlichen Staaten findet auch *Lecompte et al.*, [1998], dass Bio- und Immunoassay eine gute Korrelation aufweisen, solange der Sialinsäuregehalt des eCG nicht verändert und eine geeignete Norm für die Kalibrierung verwendet wurde. Die Korrelation kann durch harsche Behandlungsschritte jedoch verändert werden, da Bio- und Immunoassay unterschiedliche Epitope des eCG verwenden. Daher kann eine Veränderung der Molekülstruktur einen der Tests beeinflussen, während im anderen Assay keine Abweichungen erkennbar sind.

Abbildung 4.1 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese nach Auftragung eines kommerziellen eCG-Präparates der Firma Merck [10000 IU ml⁻¹] sowie wieder resuspendiertes Lyophilisat nach grober Vorreinigung [Gospodarowicz & Papkoff, 1967]. Das kommerzielle eCG-Produkt sowie

das aus Serum isolierte eCG zeigen im mit Coomassie-gefärbten Gel Proteinbanden auf Höhe von circa 45 kDa sowie je eine schwache Bande bei einem Molekulargewicht von circa 20 kDa.

Aufgrund des hohen Kohlehydratanteils des Glykoproteins eCG von 41,7 % [Christakos & Bahl, 1979] ist eine genaue Gewichtsbestimmung des Proteins im Rahmen einer SDS-Gelelektrophorese schwierig. Glykoproteine mit mehr als 10 % Kohlehydratanteil binden weniger SDS als normale Proteine, wodurch sie weniger negativ geladen sind. Sie wandern dadurch im SDS-Page langsamer und erscheinen dadurch schwerer [Moore & Ward, 1980]. In der Literatur finden sich Angaben für das Molekulargewicht der α -Untereinheit des Proteins von 16 und 20 kDa bzw. von 41 und 44 kDa für die β -Untereinheit [Christakos & Bahl, 1979]. Die Färbung mit Schiffs-Reagenz zeigte in beiden Proben je eine Glykoprotein-Bande auf Höhe der β -Untereinheit (45 kDa) auf. Ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht auf Höhe der α -Untereinheit konnte nicht nachgewiesen werden.

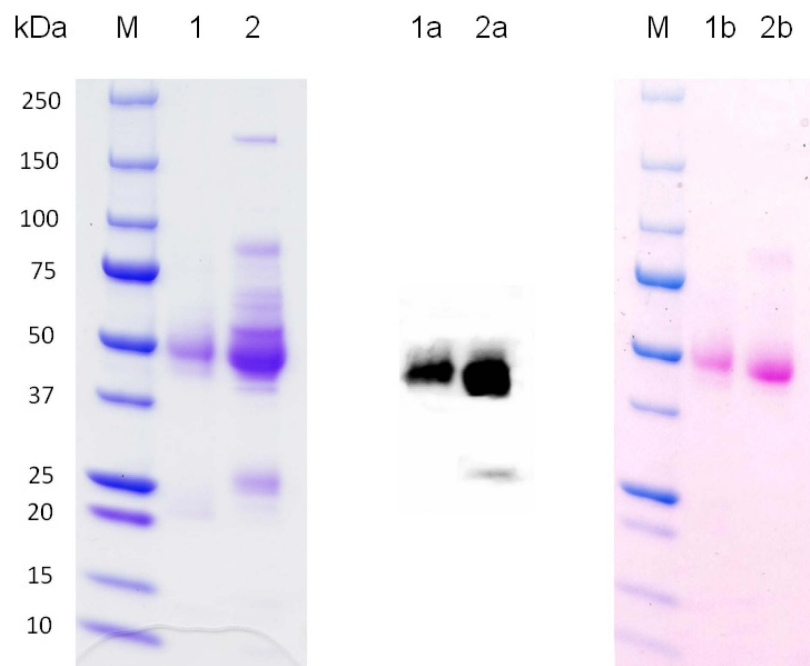


Abbildung 4.1: SDS-Gelelektrophorese (links und rechts) und Western Blot (mitte) eines kommerziellen eCG-Präparates und von grob gereinigtem eCG aus Serum. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über ein 12 %-iges SDS-PAGE mit 5 %-igem Sammelgel, mit anschließender Coomassie- (links) und Fuchsin-Färbung (rechts), bzw. Nachweis von eCG mit entsprechenden Antikörpern (Fa. Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland) (mitte). M: Marker (Firma Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland); 1, 1a, 1b: kommerzielles eCG (Merck, Darmstadt, Deutschland) [70 IU]; 2, 2a, 2b: Lyophilisat nach Resuspension in $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$ [10 μg Gesamtprotein].

Zur Bestätigung der Ergebnisse der SDS-Page wurde ein Western Blot (Abbildung 4.1) durchgeführt. Mit einem spezifischen Antikörpern (Firma Acris Antibodies GmbH, Herford,

Deutschland) gegen das Protein eCG konnte ein Bande auf Höhe der β -Untereinheit (ca. 45 kDa) sowohl im kommerziellen eCG-Präparat (1a) als auch im Lyophilisat (2a) detektiert werden.

4.1.1 Ligandenscreening

Das Screening nach geeigneten Liganden konventioneller Chromatographiemedien wurde mit den in Tabelle 4.2 aufgeführten Anionenaustauscher-Liganden durchgeführt. Das Eingesetzte Q XL-Material zeigte unter Einsatz des kommerziellen eCG-Präparates Pregmagon[®] (IDT Biologika GmbH, Dessau-Rosslau, Deutschland) eine schlechte Trennleistung und wurde daher nicht zur weiteren Reinigung des Lyophilisates eingesetzt.

Tabelle 4.2: Isolierung von eCG unter der Verwendung verschiedener Anionenaustauschermaterialien

| Reinigungs- schritt | Protein [mg/mL] | eCG [IU _{ELISA} /mL] | Volumen [mL] | Ausbeute [%] | Aufreinigungs- faktor | Konzentrierungs- faktor |
|------------------------|--------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|----------------------------|
| Serum | 61,8 | 52,8 | 67 | 100 | 1 | 1 |
| HPO ₃ ppt | 10,9 | 42,2 | 80,4 | 95,9 | 4,53 | 0,8 |
| Lyophilisat | 0,58 | 69,5 | 16,3 | 32,7 | 139 | 1,23 |
| Q FF | 0,13 | 66,7 | 3 | 5,7 | 601 | 1,26 |
| Serum | 51,6 | 36,8 | 165 | 100 | 1 | 1 |
| HPO ₃ ppt | 22,5 | 28,4 | 198 | 92,6 | 1,8 | 0,8 |
| Lyophilisat | 1,32 | 485 | 3,7 | 29,6 | 518 | 13,2 |
| DEAE | 0,43 | 60,7 | 2,5 | 2,5 | 201 | 1,7 |
| Serum | 56 | 40 | 50 | 100 | 1 | 1 |
| HPO ₃ ppt | 18,5 | 29,6 | 60 | 88,9 | 2,2 | 0,7 |
| Lyophilisat | 1,25 | 308 | 3,3 | 51,3 | 345 | 7,7 |
| Mono Q | 0,31 | 133 | 3,5 | 23,2 | 599 | 3,3 |

Es konnte gezeigt werden, dass unter Verwendung des MonoQ-Materials die höchste Stufen- als auch Gesamtausbeute von 56 % bzw. 23 % an eCG erreicht werden konnte. Die Materialien Q FF und DEAE zeigten eine Stufenausbeute von je 17 % mit einer auf das zuvor eingesetzte Serum bezogenen Ausbeute von lediglich 5,7 % bzw. 2,5 %. Mit den starken Anionenaustauschern Q FF und Mono Q konnte ein Aufreinigungsfaktor von 600 und eine Aufkonzentrierung des eCG um den Faktor 1,3 bzw. 3,3 erreicht werden. Unter der Verwendung des schwachen

Anionenaustauschers DEAE konnte lediglich ein Aufreinigungsfaktor von 200 und eine Aufkonzentrierung des eCG um den Faktor 1,7 erzielt werden. Das erhaltene Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Verwendung des Mono Q Material für die Reinigung des Proteins eCG am geeignetsten ist.

Im Rahmen der Durchführung der in der Literatur beschriebenen Prozesse zur Reinigung von eCG aus Serum konnte eCG mit einer spezifischen Aktivität von $462 \text{ IU}_{\text{ELISA}} \text{ mg}^{-1}$ (bestimmt nach der Reinigung an Q FF) gewonnen werden. Das Verfahren ist aber schon aufgrund der bereits durch die drei benötigten Präzipitationsschritte erlittenen Verluste an Zielprotein ($53 \% \pm 7,8 \%$ Ausbeute, Tabelle 4.1) nicht wirtschaftlich.

In der Literatur werden für die Isolation von eCG aus Serum mittels Präzipitation und darauf folgender mehrerer chromatographischer Reinigungsschritten spezifische Aktivitäten von 10000-17700 $\text{IU}_{\text{in vivo}} \text{ mg}^{-1}$ [Christakos & Bahl, 1979; Gospodarowicz & Papkoff, 1967] erreicht. Jedoch konnten die dargelegten spezifischen Aktivitäten erst nach 2 bzw. 3 Chromatographieschritten an IEX-Materialien (Vgl. Tabelle 4.19) erreicht werden.

Exemplarisch für das durchgeführte Säulenscreening werden im Folgenden die erhaltenen Resultate der Reinigung des Lyophilisates an Q FF aufgeführt. Abbildung 4.2 zeigt das Elutionsdiagramm an Q FF des Proteins eCG. Aufgrund der vorgenommenen Filtration und dem daraus resultierenden Stufenverlust von 15 %, vor der Injektion der Probe auf die Säule lag die absolute Beladung der Säule bei $850 \text{ IU}_{\text{ELISA}}$.

Bei einer Retentionszeit von 3,24 min konnte ein kleiner Durchflusspeak von 2,4 mAU detektiert werden. Im ersten Elutionspeak wurde mittels ELISA das Zielprotein eCG nachgewiesen werden. Das Protein eCG wurde nach 13,7 min von der Säule eluiert, was einer korrigierten Retentionszeit von 7,65 min entspricht. Die Höhe des eCG-Elutionspeaks betrug 66,5 mAU. Ein weiterer kleiner Elutionspeak wurde nach 24,2 min detektiert, was korrigiert einer Retentionszeit von 18,4 min entspricht (Abbildung 4.2).

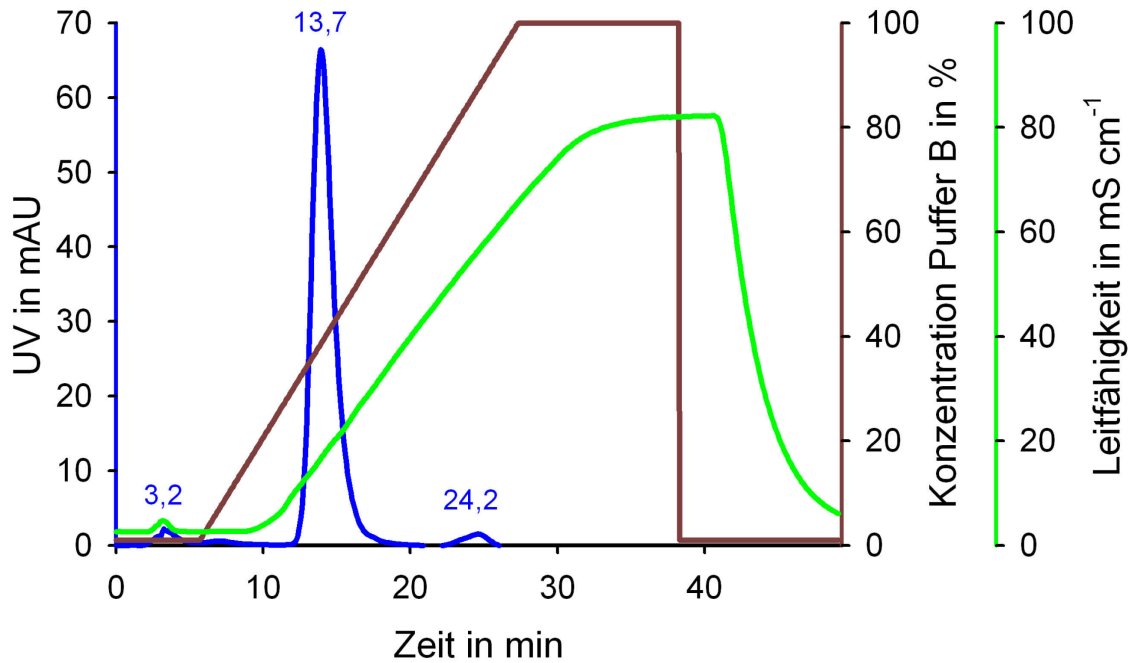


Abbildung 4.2: Elutionsdiagramm an Q FF des Proteins eCG bei einer absoluten Beladung von 850 IU_{ELISA}. Linearer Gradient: 0,01-1 M NaCl über 20 Säulenvolumen; Fluss: 0,8 mL min⁻¹. Äquilibrations- und Probenaufnahmepuffer: 0,02 M Ammoniumacetat, pH 4,5; Elutionspuffer (Puffer B): 0,02 M Ammoniumacetat, 1 M NaCl, pH 4,5. UV Detektion bei 280 nm

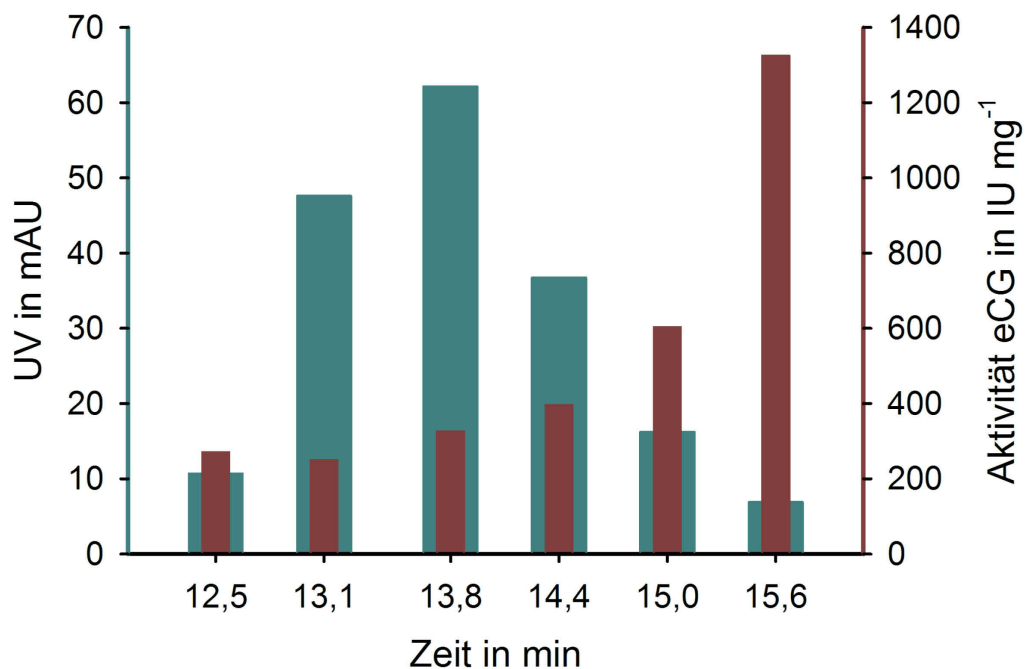


Abbildung 4.3: Vergleich von UV-Signal und eCG-Aktivität in IU pro mg Gesamtprotein der gesammelten Fraktionen des eCG-Peaks nach Elution an Q FF. Die Daten für Zeit in min und UV-Signal in mAU sind Mittelwerte der Messdaten der jeweiligen Fraktion

Die Gegenüberstellung des UV-Signals und der Reinheit des eCG in IU pro mg Gesamtprotein (Abbildung 4.3) zeigt, dass das Protein eCG im abfallenden Elutionspeak konzentrierter vorliegt. Eine Auftragung der Gesamtproteinkonzentration in mg mL^{-1} gegen die Konzentration an eCG in mg mL^{-1} (Abbildung 4.4) verdeutlicht, dass neben dem Zielprotein eCG eine mengenmäßig deutlich überwiegende Anzahl weiterer Proteine bei den gewählten linearen Elutionsbedingungen eluiert wurden.

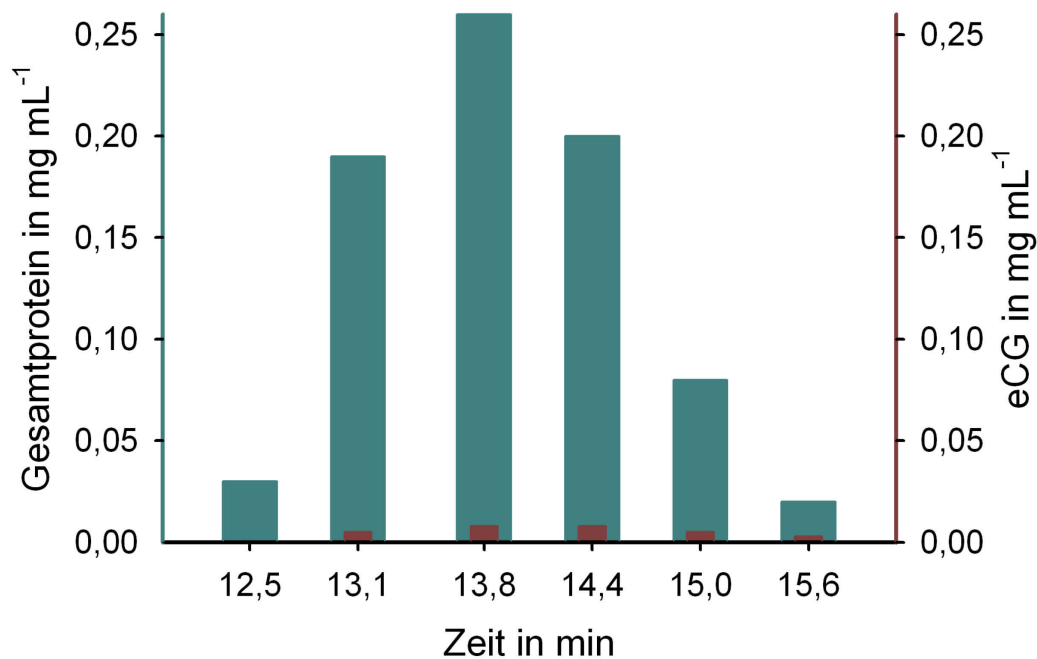


Abbildung 4.4: Vergleich der Gesamtproteinkonzentration in mg mL^{-1} gegen die Konzentration an eCG in mg mL^{-1} der gesammelten Fraktionen des eCG-Peaks nach Elution an Q FF. Die Daten für Zeit in min sind Mittelwerte der Messdaten der jeweiligen Fraktion.

Das Zielprotein eCG wurde bei einer Retentionszeit von 13,7 min und einer Natriumchloridkonzentration von $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ (30 % Puffer B) von der Chromatographiesäule eluiert (Abbildung 4.2). Eine Veränderung der gewählten Elutionsbedingungen, beispielsweise die Elution des Zielproteins unter Verwendung eines stufenweisen Gradienten, könnte zu einer besseren Trennung des Elutionspeaks und somit zu einer höheren Reinheit in mg mL^{-1} des Zielproteins eCG führen. Die Elutionsbedingungen wurden im Rahmen dieser Dissertation jedoch nicht weiter optimiert, da das Ziel nicht die Optimierung konventioneller Reinigungsprozesse zur Gewinnung von eCG aus Serum, sondern die Entwicklung eines Prozesses zur Anwendung eCG-selektiver magnetischer Mikrosorbentien war.

4.2 Charakterisierung der magnetischen Anionenaustauschersorbentien

Die M-PVA Partikel die von dem Projektteilnehmer chemagen zur Verfügung gestellt wurden sowie die kommerziell erworbenen M-Polysaccharid Partikel der Firma Bio Toolomics (Durham, UK) wurden bezüglich ihrer magnetischen Eigenschaften, ihrer Partikelgrößenverteilung und ihrer äußeren Gestalt untersucht. Diese Ergebnisse liefern Erkenntnisse über das Verhalten der beiden Sorbentien bei der Hochgradienten-Magnetseparation.

4.2.1 Magnetisierung

Die ermittelte Magnetisierungskurve für die verwendeten M-PVA Grundpartikel mit DEAP-Funktionalisierung ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Der Literaturwert für die Sättigungsmagnetisierung von reinem Magnetit liegt bei $92 \text{ Am}^2 \text{ kg}^{-1}$ [Svoboda, 1987], die Sättigungsmagnetisierung der M-PVA Partikel (Tabelle 4.3) belegt einen Magnetitgehalt der M-PVA Partikel von über 40 %.

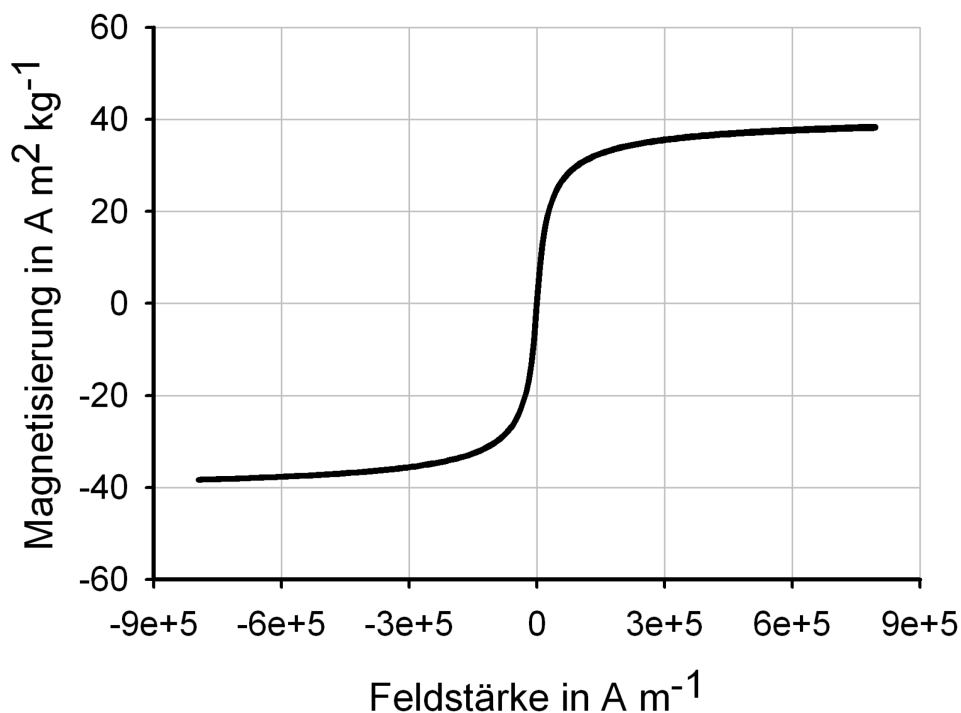


Abbildung 4.5: Typische Magnetisierungskurve für DEAP-Partikel

Eine Übersicht über alle untersuchten Partikelsorten bezüglich der Sättigungsmagnetisierung M_S und Remanenzmagnetisierung M_R ist in Tabelle 4.3 dargestellt.

Tabelle 4.3: Magnetisierungseigenschaften der verwendeten magnetischen Partikel

| Partikeltyp | Sättigungsmagnetisierung | Remanenzanteil |
|------------------------------|--|----------------|
| | M_S [$\text{Am}^2 \text{kg}^{-1}$] | M_R/M_S [%] |
| M-PVA (IEX-Ligand) | 38,4 | 1,07 |
| M-Polysaccharid (IEX-Ligand) | 9,77 | 15,4 |

Die M-PVA Partikel weisen im Gegensatz zu den magnetischen Polysaccharid Partikeln einen geringen Remanenzanteil von 1,07 % auf, was für die Wiedergewinnung der Partikel aus dem Filter im Anschluss an das HGMS-Verfahren von Bedeutung ist. Die verwendeten M-Polysaccharid Partikel zeigten einen wesentlich höheren Remanenzanteil M_R/M_S von ca. 15 %. Diese Sorbentien wurden aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften lediglich im Labormaßstab eingesetzt.

4.2.2 Partikelgrößenverteilung

Die spezifische Bindekapazität im Hinblick auf das zu reinigende Protein pro Masseneinheit Partikel hängt zum einen von der Wahl eines geeigneten Liganden sowie den gewählten Separationsbedingungen, wie z.B. dem pH-Wert, und zum anderen von der Partikelgröße ab. Um eine möglichst große Oberfläche zu erhalten, sollten die unporösen Partikel eine Größe von nur wenigen μm aufweisen. Zur Gewährleistung einer möglichst reproduzierbaren Reinigung des Zielproteins sollte die Partikelgrößenverteilung zudem möglichst monodispers sein.

Abbildung 4.6 zeigt die Partikelgrößenverteilung der im HGMF-Prozess verwendeten M-PVA Partikel sowie der im Labormaßstab eingesetzten M-Polysaccharid Partikel. Die Verteilungsfunktion wurde dabei auf das Volumen $q_3(x)$ bezogen. Die M-PVA Partikel besitzen einen mittleren volumenbezogenen Durchmesser $x_{3,0}$ von 4,5 μm , die M-Polysaccharid Partikel von 51,2 μm .

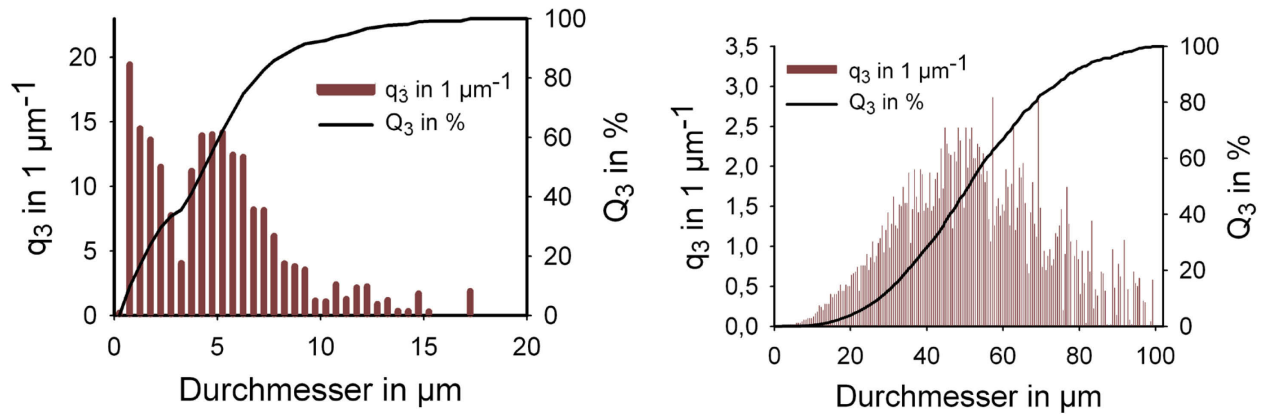


Abbildung 4.6: Partikelgrößenverteilung der M-PVA Partikel (links) und M-Polysaccharid Partikel (rechts)

Die mittleren längenbezogenen ($x_{1,0}$), oberflächenbezogenen ($x_{2,0}$) sowie volumenbezogenen ($x_{3,0}$) Durchmesser der verwendeten Partikel sind in Tabelle 4.4 dargestellt. Die Definition der Größen ist den Gleichungen 4.1, 4.2 und 4.3 zu entnehmen.

$$x_{1,0} = \frac{\sum dL}{\sum dN} \quad \text{Gleichung 4.1}$$

$$x_{2,0} = \sqrt{\frac{\sum dV}{\sum dN}} \quad \text{Gleichung 4.2}$$

$$x_{3,0} = \sqrt[3]{\frac{\sum dV}{\sum dN}} \quad \text{Gleichung 4.3}$$

L bezeichnet die Partikellänge des Querschnittes, V das Partikelvolumen und N die Anzahl der aufsummierten Partikel.

Tabelle 4.4: Partikelgröße der verwendeten magnetischen Partikel

| Partikeltyp | Partikelgröße $x_{1,0}$ [µm] | Partikelgröße $x_{2,0}$ [µm] | Partikelgröße $x_{3,0}$ [µm] |
|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| M-PVA (IEX-Ligand) | 0,92 | 1,51 | 4,49 |
| M-Polysaccharid (IEX-Ligand) | 28,6 | 42,4 | 51,2 |

Bei einer auf das Volumen bezogenen Verteilungsfunktion werden größere Partikel stärker gewichtet, d. h. die entsprechende Verteilungskurve ist zu größeren Partikeln hin verschoben. Die volumenbezogenen Durchmesser der Partikel sind wie erwartet größer wie die ermittelten Querschnittslängen. Besonders im Fall der M-Polysaccharid Partikel deutet dies auf eine weite Partikelverteilung hin.

Die M-PVA Partikel besitzen mit $0,92 \mu\text{m}$ bzw. $4,49 \mu\text{m}$ eine wesentlich geringere längenbezogene Größe, bzw. einen wesentlich geringeren volumenbezogenen Durchmesser, wie die untersuchten M-Polysaccharid Partikel der Firma Bio Toolomics (Durham, UK). Das erhaltene Resultat deutet darauf hin, dass die M-PVA Partikel des Projektpartners chemagen Biopolymer AG (Baesweiler, Deutschland) aufgrund ihrer wesentlich geringeren Größe und der daraus resultierenden größeren spezifischen Oberfläche im Vergleich zu den M-Polysaccharid Partikeln für den Reinigungsprozess von Proteinen im HGMF-Prozess besser geeignet sind.

4.2.3 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen lässt sich ein Eindruck über die Form und die Größe der verwendeten Partikel gewinnen. Die Abbildungen 4.7 und 4.8 zeigen die Aufnahmen der M-PVA bzw. M-Polysaccharid Partikel mit IEX-Ligand.

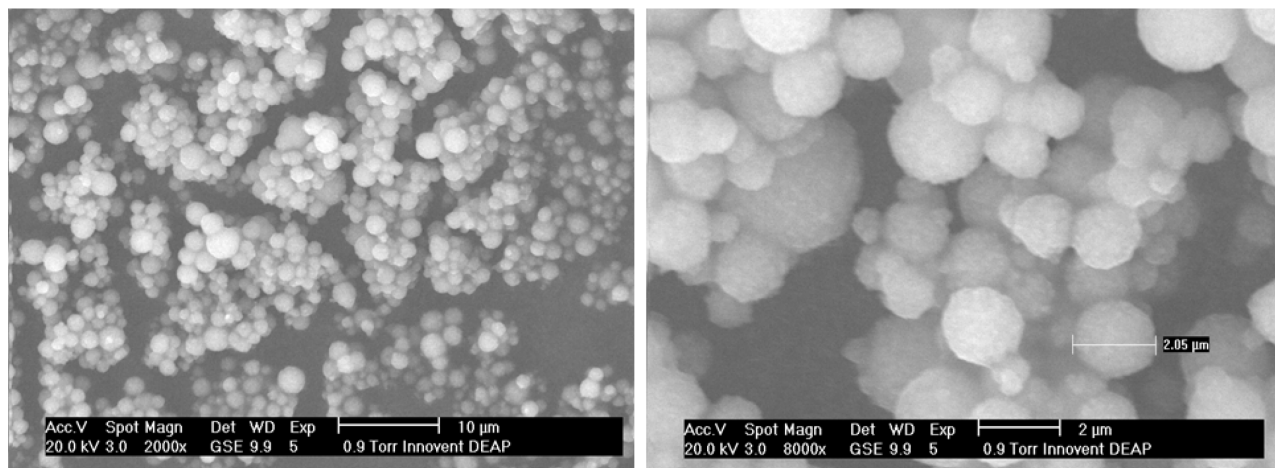


Abbildung 4.7: Elektronenmikroskopische Aufnahme (ESEM) der M-PVA Partikel bei unterschiedlicher Vergrößerung

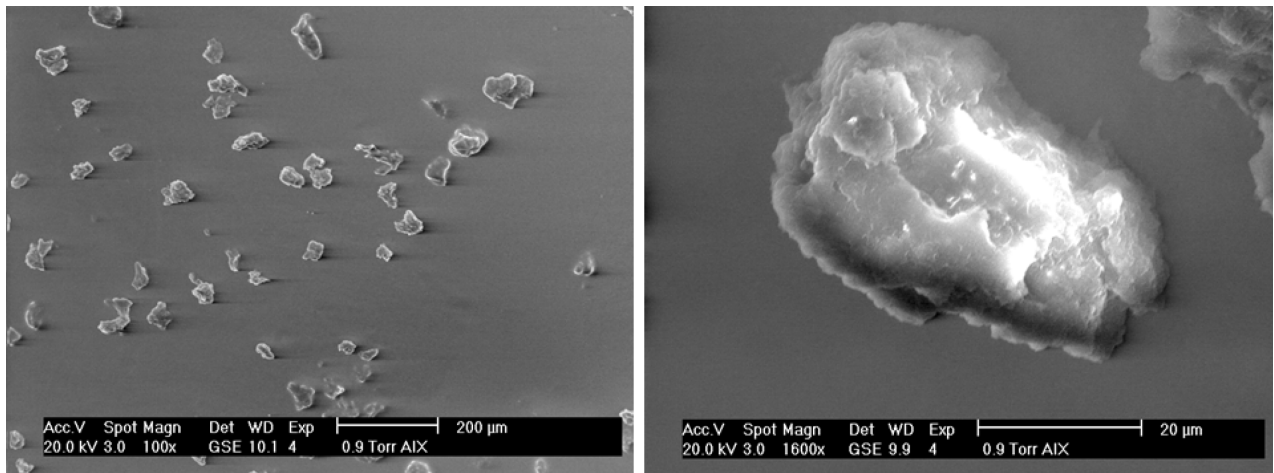


Abbildung 4.8: Elektronenmikroskopische Aufnahme (ESEM) der M-Polysaccharid Partikel

Die M-PVA Partikel besitzen im Gegensatz zu den M-Polysaccharid Partikeln eine ideale Kugelform, mit annähernd gleichem Durchmesser. Des Weiteren weisen die M-Polysaccharid Partikel keine glatte Oberfläche auf, was auf eine im Vergleich zu den M-PVA Partikeln höhere Fouling-Anfälligkeit hinweist, was zu einer geringeren Wiederverwendbarkeit der Partikel führen würde.

4.3 Übertragung der konventionellen eCG-Reinigung auf magnetische Sorbentien

Im Vorfeld der Versuche zur eCG-Reinigung mittels magnetischer Sorbentien wurde die unter Kapitel 4.1 geschilderte Methode zur groben Reinigung von eCG nach *Gospodarowicz & Papkoff* [1967] durch Säure- und Lösungsmittelfällung im Labormaßstab unter Verwendung von 500 mL Serum etabliert. Die Versuchsdurchführung ist Kapitel 3.5.1.1 zu entnehmen. Für die anschließende Reinigung von eCG an der HGFM-Laboranlage (Kapitel 3.6) wurden insgesamt 10 L Ausgangsserum eingesetzt. Durch den Einsatz der HGFM-Laboranlage konnte eine Erhöhung des Separationsvolumens von 22,5 mL Labormaßstab auf 400 mL erreicht werden. Eingesetzt wurden 6 g L^{-1} (22,5 mL Separationsvolumen) bzw. 5 g L^{-1} (400 mL Separationsvolumen) M-PVA-DEAP Partikel. Für die Versuchsdurchführung im Labormaßstab wurde das erhaltene Diafiltrat im Verhältnis 1:1 geteilt, die ermittelte Standardabweichung bezieht sich auf den anschließend durchgeführten Doppelansatz.

Die in Tabelle 4.5 angegebenen Massenbilanzen für Gesamtprotein und eCG beziehen sich jeweils auf das eingesetzte Ultra-/Diafiltrat (UF/DF). Die unterschiedlichen Elutionsvolumina im HGFM-Prozess resultierten aus Varianzen im Zuleitungssystem des Elutionspuffers.

Die Versuche im 22,5 mL Labormaßstab und 400 mL Sorptionsmaßstab im HGMF-Prozess zeigten, dass die Reinigung von eCG aus Serum mit Hilfe magnetischer Sorbentien durchführbar ist. Mit einer Ausbeute von 38,2 bzw. 40,4 % des ursprünglich in Serum vorhandenen eCG, liegen die erzielten Ausbeuten bei der Verwendung magnetischer Sorbentien deutlich höher, wie bei dem Einsatz chromatographischer Verfahren (Kapitel 4.1.1). Im Labormaßstab konnte im Gegensatz zum HGMF-Prozess ein wesentlich höherer Aufreinigungsfaktor erreicht werden. Der vergleichsweise hohe Proteingehalt im Eluat des HGMF-Prozesses deutet darauf hin, dass die Waschschrte aufgrund des Totvolumens der HGMF-Pilotanlage nicht ausreichend waren, um ungebundene Fremdproteine aus dem System komplett zu eliminieren.

Tabelle 4.5: Zusammenfassung der Daten der Reinigung von eCG aus grob vorgereinigtem Serum nach *Gospodarowicz & Papkoff*[1967] mit anschließender Reinigung an magnetischen Sorbentien

| Schritt | Protein [mg/mL] | eCG [IU _{ELISA} /mL] | Volumen [mL] | Ausbeute [%] | Aufreinigungs- faktor | Konzentrierungs- faktor |
|-------------------------|--------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|----------------------------|
| Serum | 56,9 | 48,6 | 250 | 100 | 1 | 1 |
| HPO ₃ ppt | 9,08 | 40 | 295 | 97 | 5,2 | 0,82 |
| UF/DF | 0,36 | 249 | 22,5 | 46 | 809 | 5,1 |
| Sorptions- überstand | 0,29±0,05 | 19,1±9,8 | 22,5 | | | |
| Eluat (22,5 mL) | 0,06±0,02 | 310±14,3 | 15 | 38,2±1,8 | 6250±1749 | 6,4±0,29 |
| Massenbilanz [%] | 99,1±0,08 | 99,1±0,16 | | | | |
| Serum | 55,8 | 15,3 | 10000 | 100 | 1 | 1 |
| HPO ₃ ppt | 21,4 | 11,1 | 11430 | 82,9 | 0,74 | 0,72 |
| UF/DF | 0,68 | 170 | 400 | 44,4 | 357 | 40,3 |
| Durchfluss | 0,11 | 7,09 | 417 | 1,93 | | |
| Eluat I (400 mL) | 0,33 | 7,8 | 160 | 0,8 | 33,8 | 0,51 |
| Eluat II (400 mL) | 0,31 | 211 | 150 | 20,7 | 975 | 13,8 |
| Eluat III (400 mL) | 0,23 | 120 | 240 | 18,9 | 748 | 7,9 |
| Massenbilanz [%] | 73,8 | 95,5 | | | | |

Die im Anschluss an den HGMF-Prozess vorliegenden Eluate wiesen nach einer Diafiltration mit anschließender Lyophilisierung eine spezifische Aktivität von 540 IU_{ELISA} mg⁻¹ auf. Im Fall des aufgezeigten Versuches im 22,5 mL Sorptionsmaßstab wurde die spezifische Aktivität nicht bestimmt. In Vorversuchen mit einem Sorptionsmaßstab von 35 mL (Daten nicht gezeigt) konnte eine spezifische Aktivität von 362 IU_{ELISA} mg⁻¹ bzw. 509 IU_{ROT} mg⁻¹ ermittelt werden. Die

Durchführung des Rattenovartests (ROT) bestätigte die biologische Aktivität des durch magnetische Sorbentien isolierten eCG *in vivo*. Einen Rückgang der biologischen Aktivität hätte z.B. die Abnahme der nicht kovalenten Bindungen der beiden Untereinheiten bewirkt. Liegen die beiden Untereinheiten des Proteins getrennt voneinander vor, so kann keine biologische Aktivität des Proteins nachgewiesen werden [Farmer & Papkoff, 1979]. Des Weiteren kann der niedrige pH-Wert der durchgeführten meta-Phosphorsäure Fällung eine Abspaltung der Sialinsäurereste bewirken, da eine Langzeitstabilität des eCG nur zwischen pH 4-8 gewährleistet ist [González et al., 1998]. Die Entfernung der endständigen Sialinsäurereste des Proteins bewirkt eine Verkürzung der Plasma-Halbwertszeit und so dessen Wirkstärke *in vivo*. Die Reduktion der Plasma-Halbwertszeit beruht auf der vermehrten Bindung des Proteins nach Abspaltung der Sialinsäurereste an das Mannose-bindende Lektin und der dadurch resultierenden Ausscheidung [Ryan et al., 1988]. Eine Detektion des Proteins *in vitro* ist jedoch weiterhin möglich.

Die systematische Prozessentwicklung zur Realisierung eines wirtschaftlichen Prozesses zur Reinigung von eCG mit magnetischen IEX-Sorbentien, insbesondere der Minimierung der Verluste an Zielprotein in den durchgeführten Reinigungsschritten, wird im Folgenden vorgestellt.

4.4 Optimierung der Reinigung von eCG im Labormaßstab

Das für die Isolation von eCG benötigte Ausgangsmedium Pferdeserum ist aufgrund der hohen Leitfähigkeit von 10-13 mS cm⁻¹ und der hohen Proteinkonzentration von 50-60 mg ml⁻¹ nicht für die direkte Reinigung an IEX-Materialien geeignet. Der Einsatz von IEX-Sorbentien erfordert daher, wie u. a. aus den vorhergehenden Kapiteln ersichtlich, eine mehrstufige Vorreinigung des Ausgangsserums, mit dem Ziel einer Reduktion der Leitfähigkeit bis in einen Bereich von 1 mS cm⁻¹ und der Gesamtproteinkonzentration unter 1 mg mL⁻¹. Eine entsprechende Reduktion ist nach dem klassischen Vorreinigungsschema möglich, führt jedoch zu hohen Produktverlusten. Ausgangspunkt der im Folgenden beschriebenen Optimierungsversuche war daher der Wunsch nach einer Reduktion der Anzahl der notwendigen Vorreinigungsschritte verbunden mit einer Verringerung des Produktverlustes und der Prozesskosten.

4.4.1 Grobe Vorreinigung des Serums zur Isolation von eCG

Das Zielprotein eCG besitzt mit einem pI-Wert von 1,8 [González et al., 1998] einen im Gegensatz zu vielen anderen im Serum vorliegenden Proteinen sehr niedrigen isoelektrischen Punkt. Die meisten andere Serumproteinen wie equines FSH (pI: 4,6) [Sherwood et al., 1970], equines Serumalbumin (pI: 4,65-4,9) [Monkos, 2005], oder equines Immunglobulin G (pI: 7)

[Wang et al., 2008] weisen einen höheren isoelektrischen Punkt auf. Als effizienteste Methode zur groben Vorreinigung des Serums stellte sich daher eine Säurefällung (pH 3) mit 0,5 M meta-Phosphorsäure heraus, die zu einer Abtrennung von 70-80 % der in Serum vorhandener Fremdproteine, bei einem Verlust von 10-15 % des Zielproteins, führte (Vgl. Tabelle 4.1). Eine direkte Isolation des eCG nach der Säurefällung mit anschließender Ultra-/Diafiltration war aufgrund des nach wie vor zu hohen Proteingehaltes von $15 \pm 4,8 \text{ mg mL}^{-1}$ (Tabelle 4.1) und der daraus resultierenden konkurrierenden Adsorption weiterer Serumproteine mit magnetischen Anionenaustauschersorbentien nicht möglich (Abbildung 4.9). Die Separationsversuche wurden im 1 mL Labormaßstab durchgeführt.

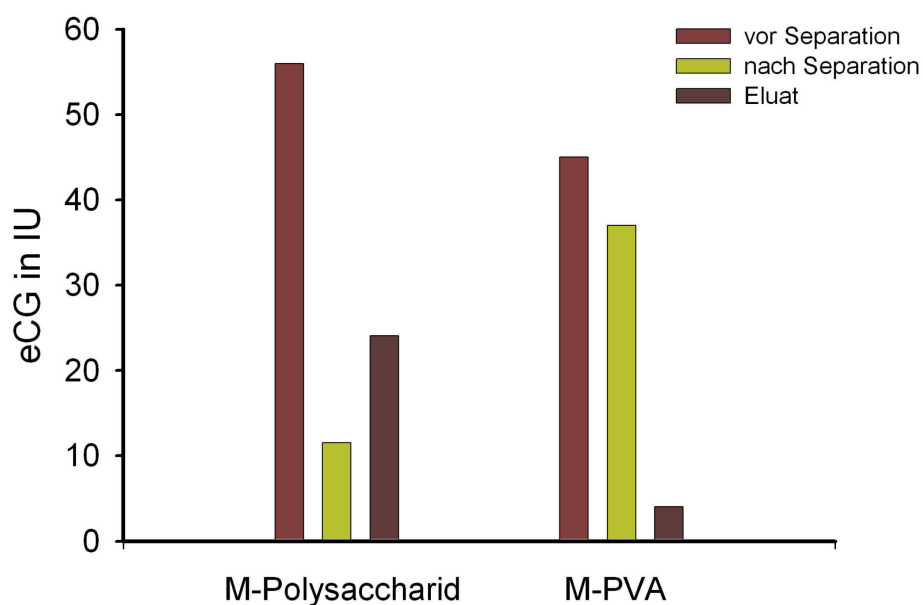


Abbildung 4.9: Separation von eCG aus Serum mit vorheriger meta-Phosphorsäurefällung und Ultra/Diafiltration

Von den im Separationsversuch eingesetzten 56 IU eCG konnten mit den verwendeten magnetischen Polysaccharid-Partikeln 79 % sorbiert und 44 % wieder eluiert werden. Die M-PVA Partikel erreichten eine Ausbeute bezüglich des Bindungsschrittes an eCG von 18 %. Das gebundene eCG konnte zu 50 % wieder eluiert werden.

Der Gesamtproteingehalt betrug im Fall der M-Polysaccharid Partikel vor der Separation $12,5 \text{ mg mL}^{-1}$, nach der Separation 9 mg mL^{-1} und $6,1 \text{ mg mL}^{-1}$ im Eluat, bzw. 7 mg mL^{-1} , $4,7 \text{ mg mL}^{-1}$ und $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ im Fall der verwendeten M-PVA Partikel. Die Reinheit des eCG in IU mg^{-1} in den einzelnen Reinigungsschritten ist in Abbildung 4.10 dargestellt.

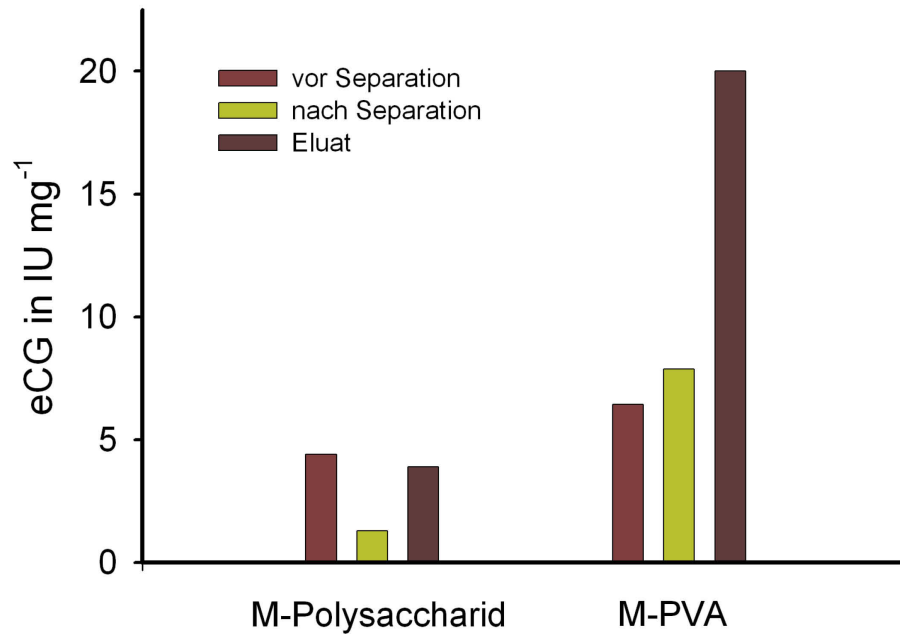


Abbildung 4.10: Reinheit des eCG in IU pro mg Gesamtprotein in den einzelnen Separationsschritten nach vorheriger meta-Phosphorsäurefällung und Ultra/Diafiltration

Durch die Verwendung der M-Polysaccharid Partikel konnte im Vergleich zu den M-PVA Partikeln eine höhere Ausbeute an eCG erzielt werden (Abbildung 4.9). Die M-Polysaccharid Partikel wiesen jedoch eine wesentlich geringere Spezifität gegenüber dem Zielprotein eCG auf (Abbildung 4.10). In den in den folgenden Kapiteln angeführten Versuchsreihen kamen aufgrund ihrer hohen Spezifität gegenüber eCG ausschließlich die im Rahmen des Verbundprojektes funktionalisierten M-PVA Partikel (Kapitel 3.2.1) zum Einsatz.

Die erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, dass für eine erfolgreiche Anwendung magnetischer IEX-Sorbentien zur Reinigung von eCG noch mindestens eine weitere Fällung benötigt wird. Die Konsequenz eines mehrstufigen Reinigungsprozesses ist neben einem erhöhten Kostenfaktor durch die benötigten Betriebs- und Investitionskosten, ein Produktverlust des zu reinigenden Proteins in jedem durchgeführten Verfahrensschritt (Vgl. Abbildung 2.1). Die Entwicklung eines wirtschaftlichen Gesamtprozesses setzt daher eine Kostenoptimierung sowie eine Minimierung des Produktverlustes in den vorgelagerten Prozessschritten voraus.

4.4.2 Optimierung der vorgelagerten Prozessschritte

Aus den Ergebnissen des vorhergehenden Abschnittes wird deutlich, dass vor dem Einsatz magnetischer Anionenaustauschersorbentien zur Reinigung von eCG aus Serum mindestens zwei Präzipitationsschritte zur Verringerung der Fremdproteinkonzentration benötigt werden.

In der Literatur finden sich mit der Ethanol [Gospodarowicz & Papkoff, 1997, Aggarwal et al., 1980] und Aceton-Fällung [Cartland & Nelson, 1937] zwei gängige Lösungsmittelfällungen zur Reinigung von eCG aus Serum, während beispielweise die Präzipitation mit Ammoniumsulfat häufig zur Isolation von Immunoglobulinen aus Plasma eingesetzt wird [Habeed & Francis, 1976]. Für den anschließenden Präzipitationsschritt nach der meta-Phosphorsäure Fällung wurde eine Fällung mit Ethanol (50 % v/v), was dem bisherigen Stand der Technik der konventionellen groben Reinigung von eCG entspricht, gewählt [Gospodarowicz & Papkoff, 1997, Aggarwal et al., 1980]. Das Zielprotein eCG präzipitiert erst ab einer Volumenkonzentration von 60 % Ethanol, während die meisten anderen Serumproteine bei einer geringeren Konzentration des Lösungsmittels präzipitieren [Cartland & Nelson, 1937].

Mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung (engl. Design of experiments, DoE) wurden die einzelnen vorgelagerten Prozessschritte, wie die Präzipitation mit meta-Phosphorsäure, die Fällung mit 50 Volumenprozent Ethanol sowie eine optionale Fällung mit 75 Volumenprozent Ethanol, optimiert. Das DoE wurde dabei in zwei Abschnitten durchgeführt, wobei sämtliche Versuchsansätze des ersten Abschnittes im zweiten Abschnitt weiter behandelt wurden. Im ersten Abschnitt wurde der Einfluss der pH-Einstellung durch die Zugabe von meta-Phosphorsäure bei unterschiedlicher Aufkonzentrierung des Serums und unterschiedlicher Ausgangsleitfähigkeit untersucht. Im zweiten Versuchsteil wurden die aus dem ersten DoE-Versuch resultierenden Proben zwei weiteren Lösungsmittel-Fällungen (50 und 75 % Ethanol v/v) unterzogen. Hierbei sollte analysiert werden, wie sich die zuvor ausgewählten Parameter auf die weitere, für die Reinigung des Zielproteins eCG an magnetischer AIX-Sorbentien, benötigte Vorreinigung auswirken. Die Nomenklatur der drei gewählten Einflussgrößen: (i) pH-Werteinstellung mit meta-Phosphorsäure, (ii) Konzentrationsfaktor in der Ultra-/Diafiltration und (iii) Grad der Entsalzung in der Ultra-/Diafiltration sind Kapitel 3.5.2 zu entnehmen. Relevant für die Auswertung war die Reinheit des grob vorgereinigten eCG bestimmt in IU pro mg Gesamtprotein. Der für die Versuchsdurchführung erstellte Versuchsplan sowie die ermittelten 17 Einzelergebnisse für das Verhältnis von eCG zu Gesamtprotein (IU mg^{-1}), eCG (IU mL^{-1}) und Gesamtprotein (mg mL^{-1}) sind im Anhang unter 7.2 aufgelistet.

Abbildung 4. 11 zeigt das Ergebnis der statistischen Auswertung der Optimierung der meta-Phosphorsäure Fällung im sogenannte „response contour plot“.

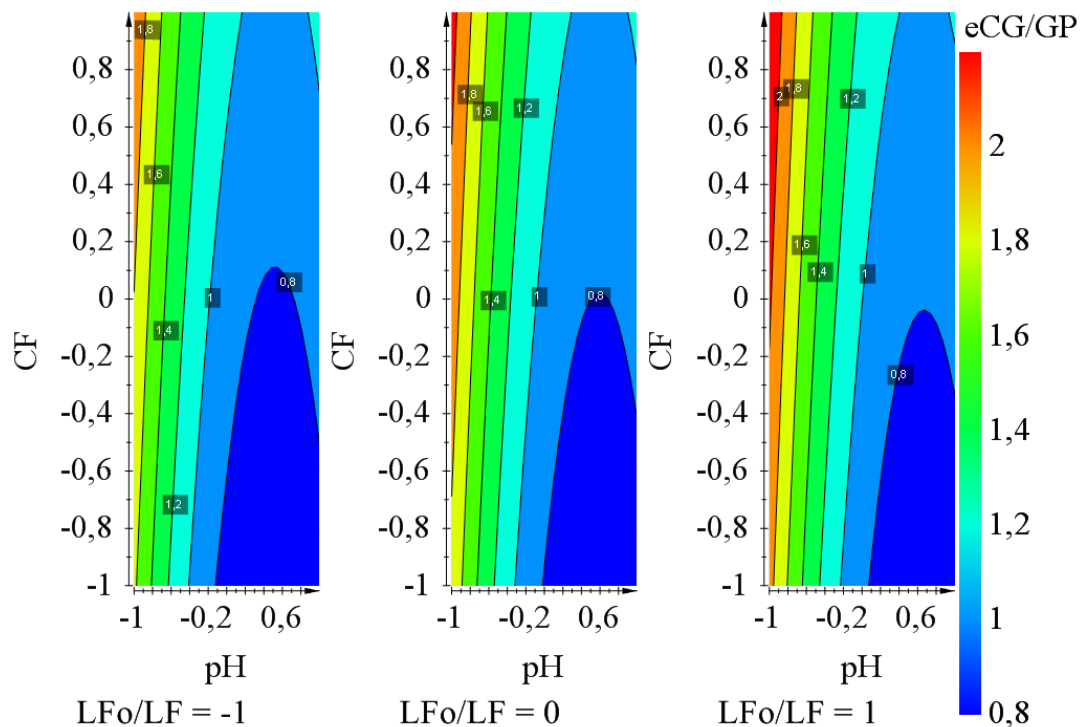


Abbildung 4. 11: Response contour plot. Die Farbe rot markiert in diesem Modell die höchste Reinheit an eCG (ermittelt in eCG pro mg Gesamtprotein). Blaue Bereiche stehen hingegen für Versuchsparameter, die in Ultra-/Diafiltraten geringerer Reinheit resultieren [Müller, 2010]

Abbildung 4. 11 verdeutlicht, dass das höchste Verhältnis von eCG zu Gesamtprotein in IU pro mg (eCG/GP) bei einer geringen Leitfähigkeit zu erwarten ist, das heißt, wenn die Leitfähigkeit LF durch Diafiltration auf ein Zehntel des Anfangswertes LF_0 reduziert wurde. Gleichzeitig soll durch Ultrafiltration ein hoher Konzentrationsfaktor eingestellt werden ($CF > 0,6$). Der pH des Serums sollte durch meta-Phosphorsäure auf einen Wert von 3 eingestellt werden.

Der Einzelversuch N7 (Anhang, Abbildung 7.1), lieferte mit $2,38 \text{ IU}_{\text{ELISA}} \text{ mg}^{-1}$ die höchste Reinheit. Dies bestätigt dass ein hoher Konzentrationsfaktor sowie eine geringe Leitfähigkeit erforderlich sind, um das Zielprotein eCG in möglichst reiner Form zu gewinnen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die untersuchten Parameter Konzentrationsfaktor (CF) und Leitfähigkeit (LF_0/LF), im Gegensatz zu dem eingestellten pH-Wert nach der meta-Phosphorsäure Fällung, einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die Reinheit des eCG in IU mg^{-1} Gesamtprotein besitzen. Der Konzentrationsfaktor verläuft im „response contour plots“ nahezu parallel zur y-Achse, was auf einen geringen Einfluss in diesem Bereich auf die Reinheit des eCG hinweist. Zudem konnte Versuch N3 (Anhang, Abbildung 7.1), bei dem eine hohe Leitfähigkeit eingestellt wurde, mit $2,03 \text{ IU}_{\text{ELISA}} \text{ mg}^{-1}$ die zweithöchste Reinheit an eCG detektiert werden.

Im Folgenden Versuch der statistischen Versuchsauswertung, wurden die resultierenden Proben des ersten DoE-Versuches zur weiteren Reinigung von eCG zwei Ethanol-Fällungen unterzogen. Die erste Präzipitation erfolgte über einen Zeitraum von 2 h durch die Zugabe von 50 % v/v Ethanol. Im Anschluss erfolgte die zweite Ethanol-Fällung mit 75 % v/v Ethanol über 20 h.

Abbildung 4. 12 zeigt das Ergebnis der statistischen Auswertung der Optimierung der Versuchsbedingungen der im Reinigungsprozess angewandten meta-Phosphorsäure Fällung mit anschließender mehrfacher Ethanol-Fällung im sogenannte „response contour plot“.

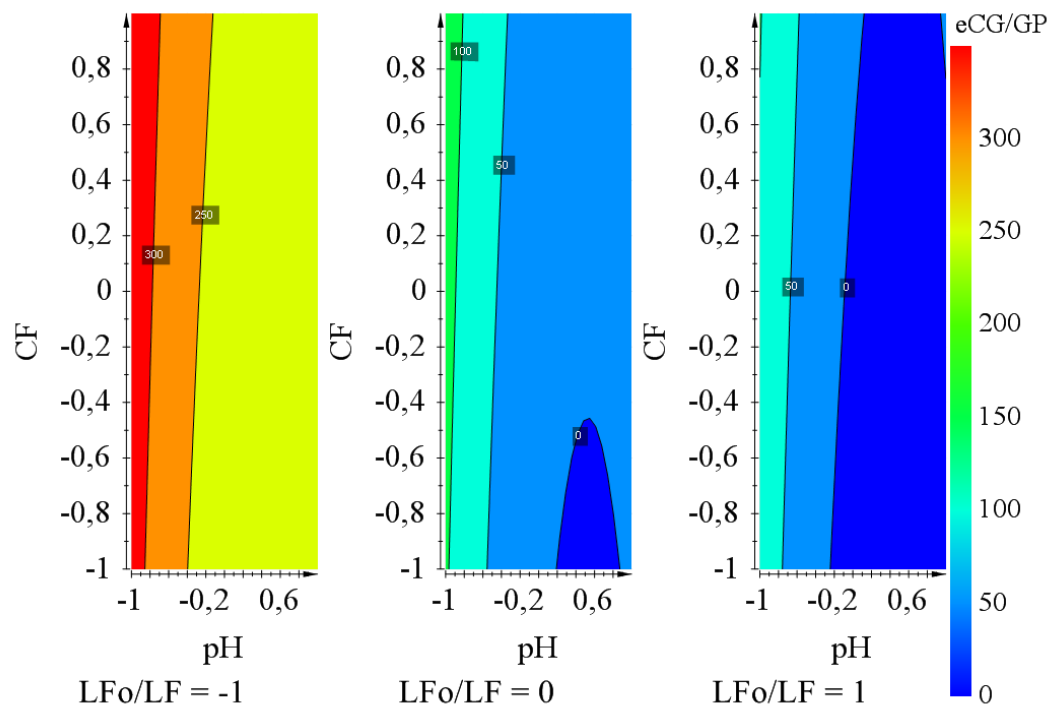


Abbildung 4. 12: Response contour plot. Die Farbe rot markiert in diesem Modell die höchste Reinheit an eCG (ermittelt in eCG pro mg Gesamtprotein). Blaue Bereiche stehen hingegen für Versuchsparameter, die in Ultra-/Diafiltraten geringerer Reinheit resultieren [Müller, 2010]

Der aufgeführte „response contour plot“ (Abbildung 4. 12) verdeutlicht, dass eine hohe Reinheit an eCG durch einen niedrigen pH-Wert in Folge der meta-Phosphorsäurefällung, einem hohen Konzentrationsfaktor (CF) und einer hohen Leitfähigkeit (LF_0/LF) erzielt werden konnte. Bei niedrigen pH-Werten (nahe pH 3) hingegen kann der Einfluss des Konzentrationsfaktors aufgrund der Parallelität zur y-Achse vernachlässigt werden konnte.

Die höchste Reinheit an eCG von 237-388 IU mg^{-1} konnte in den durchgeführten Teilversuchen N1-N4 detektiert werden (Anhang, Abbildung 7.2), bei denen keine Diafiltration der Proteinlösung durchgeführt ($LF_0/LF = -1$) wurde.

Eine Gegenüberstellung der Abbildungen 4.11 und 4.12 zeigt, dass in beiden Versuchsansätzen ein kleiner pH-Wert eine hohe Reinheit des Zielproteins eCG lieferte. Das Optimum ist jedoch im Gegensatz zu dem Versuchsansatz ohne anschließende Ethanol-Fällung (Abbildung 4. 11) bei vorgenommener Ethanol-Fällung (Abbildung 4. 12) bei einer höheren Leitfähigkeit zu finden.

Antichaotrope Salze, wie z.B. Ammoniumsulfat, können zum Fällen von gelösten Proteinen eingesetzt werden, wobei das Prinzip der Fällung auf einer Störung der Hydrathülle der Proteine beruht. Chaotrope Salze hingegen verhindern die Aggregation von Proteinen und halten sie so in Lösung. Die Analyse der erhaltenen Einzelergebnisse (Anhang, Abbildung 7.2) zeigt, dass ein niedriger Reinheitsgrad des eCG in IU mg^{-1} insbesondere auf das Vorhandensein eines hohen Fremdproteingehaltes im Anschluss an die durchgeführten Ethanol-Präzipitationen zurückzuführen ist. Der günstige Einfluss einer unverändert hohen Leitfähigkeit auf den eCG-Reinheitsgrad nach den Fällungsschritten, könnte somit durch das Vorhandensein größerer Konzentrationen antichaotroper Ionen im Anschluss an die Säurefällung begründet sein. Der Säurefällungsschritt zu Beginn erfolgt unter der Verwendung von meta-Phosphorsäure. Bei Phosphat (PO_4^{3-}) handelt es sich um ein antichaotropes Ion und besitzt somit einen unterstützenden Effekt auf die Fällung der Fremdproteine.

Abbildung 4. 12 gibt weiterhin Auskünfte ob weitere Versuche in Richtung der höchsten Reinheit an eCG realisierbar sind. Es konnte gezeigt werden, dass die höchsten Reinheit an eCG in Richtung kleinerer pH-Werte liegen. Folglich könnte durch eine pH-Einstellung auf einen Wert kleiner 3 mit meta-Phosphorsäure ein noch reineres Produkt erhalten werden. Eine weitere Annäherung an den isoelektrischen Punkt des Proteins von 1,8 [Moore & Ward, 1980], würde jedoch auch zu einer Präzipitation des Zielproteins führen.

4.4.3 Vereinfachte Reinigung von eCG im Labormaßstab

Die Versuchsdurchführung im Labormaßstab (Tabelle 4.6) zeigte, dass die Fällung mit meta-Phosphorsäure und einer Ethanol-Fällung (50 % v/v) mit anschließender Ultra-/Diafiltration eine weitgehende Reinigung von eCG mit Hilfe magnetischer Anionenaustauschersorbentien ermöglicht. Eine weitere Reduktion der Volumenkonzentration an Ethanol im Rahmen der durchgeführten Präzipitation konnte aufgrund des mit der Verringerung der Konzentration an Ethanol (% v/v) korrespondierenden steigenden Konzentration an Gesamtprotein nicht realisiert werden (Tabelle 4.7). Bei den in Tabelle 4.6 dargestellten Daten handelt es sich um einen Dreifachansatz unter der Verwendung von jeweils 5 g L^{-1} Partikel.

Tabelle 4.6: Zusammenfassung der Daten der vereinfachten Reinigung von eCG aus grob gereinigtem Serum

| Schritt | Protein [mg/mL] | eCG [IU _{ELISA} /mL] | Volumen [mL] | Ausbeute [%] | Aufreinigungs- faktor | Konzentrierungs- faktor |
|-------------------------|--------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|----------------------------|
| Serum | 66±6,1 | 49±8,6 | 378 | 100 | 1 | 1 |
| HPO ₃ ppt | 8,5±2,1 | 41±14 | 441 | 90±9,7 | 6,4 | 0,8±0,2 |
| UF/DF | 0,8±0,5 | 184±14 | 77 | 71±9,6 | 310±200 | 3,7±0,8 |
| Sorptions- überstand | 0,33±0,02 | 8±5,4 | 77 | | | |
| Eluat I | 0,6±0,08 | 774±46 | 15 | 58±9,2 | 1738±138 | 16±0,9 |
| Eluat II | 0,17±0,01 | 120±11 | 15 | 9±0,84 | 924±49 | 2,5±0,23 |
| Massen- bilanz [%] | 99,4±0,04 | 99±0,16 | | | | |

Es konnten Ausbeuten bezüglich des im Serum vorhandenen eCG von durchschnittlich 67 % erreicht werden, ein mittlerer Aufreinigungsfaktor von 1738 sowie eine mittlere Aufkonzentrierung des Zielproteins eCG um den Faktor 16 wurde im zweiten Eluat erzielt.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden die Eluate bis zu einer Leitfähigkeit von ca. 1 mS cm⁻¹ diafiltriert und lyophilisiert, aus dem resultierenden Trockengewicht wurden spezifische Aktivitäten von 1735 IU_{ELISA} mg⁻¹ bis 2166 IU_{ELISA} mg⁻¹ ermittelt. Eine Bestimmung der biologischen Aktivität *in vivo* der erhaltenen Eluate wurde nicht durchgeführt.

Abbildung 4.13 zeigt exemplarisch die gelelektrophoretische Trennung von Proben der einzelnen Isolationsschritte der vereinfachten Vorreinigung von eCG aus Serum. Das Resultat der Gelelektrophorese des grob vorgereinigten eCG nach klassischer Reinigung [Gospodarowicz & Papkoff, 1997] ist Abbildung 4.1 zu entnehmen. Die Fraktion der Ethanol-Fällung wurde nicht im SDS-ingesetzt, da nachgewiesen werden konnte, dass Ethanol eine Schwächung der Bandenintensität im SDS-Page hervorruft (Anhang, Abbildung 7.3).

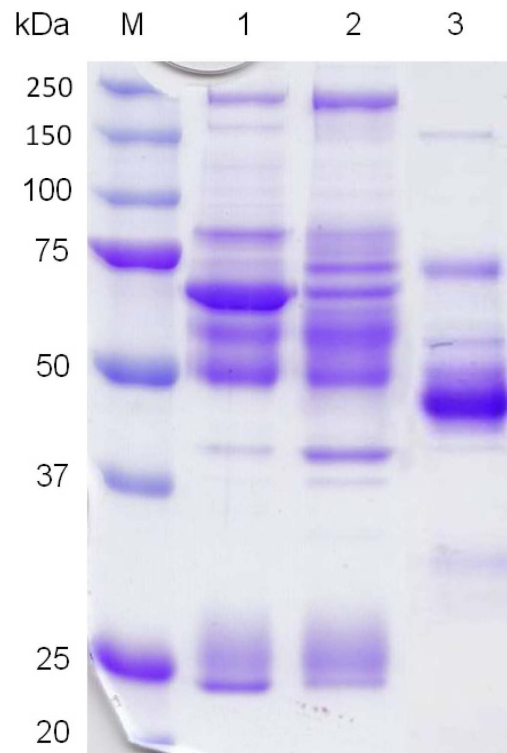


Abbildung 4.13: SDS-Gelelektrophorese der vereinfachten Reinigung von eCG. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über ein 12 %-iges SDS-PAGE mit 5 %-igem Sammelgel, mit anschließender Coomassie-Färbung. Auftragung von je 10 μg Gesamtprotein. M: Marker (Firma Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland); 1: Serum; 2: Überstand nach meta-Phosphorsäure Präzipitation; 3: Ultra-/Diafiltrat

Fraktion 3 (Abbildung 4.13) zeigt mehrere Proteine mit einem Molekulargewicht von 50-45 kDa. Die durchschnittliche spezifische Aktivität von eCG im Ultra-/Diafiltrat beträgt $217 \text{ IU}_{\text{ELISA}} \text{ mg}^{-1}$. Die Intensität und der damit korrelierende Proteingehalt der jeweiligen Proteinbande lässt darauf schließen, dass es sich bei den detektierten Banden nicht ausschließlich um die β -Untereinheit des Zielproteins eCG handeln kann, sondern dass die starke Bande bei 45 kDa auch Fremdproteine beinhaltet. Mittels Massenspektrometrie und anschließendem Datenbankabgleich konnte das im Ultra-/Diafiltrat dominierende Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 45 kDa als saures-alpha-1-Glykoprotein identifiziert werden (Kapitel 4.11).

Versuche zur Optimierung der durchgeführten Ethanol-Fällung der vereinfachten Vorreinigung von eCG aus Serum wurden unter dem Einsatz unterschiedlicher Volumenprozent an Ethanol durchgeführt (Tabelle 4.7). Die weitere Reinigung erfolgte unter der Verwendung von 5 g L^{-1} Partikeln.

Tabelle 4.7: Einfluss der eingesetzten Volumenprozent an Ethanol bei vorgenommener Präzipitation auf die Ausbeute an eCG in % bezüglich des eingesetzten Serums. Die Fällung wurde mit 50 % v/v (1), 40 % v/v (2) und 30 % v/v (3) Ethanol durchgeführt

| Schritt | Protein [mg/mL] | eCG [IU _{ELISA} /mL] | Volumen [mL] | Ausbeute [%] | Aufreinigungs- faktor | Konzentrierungs- faktor |
|-------------------------|--------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|----------------------------|
| Serum | 56,8 | 44,8 | 500 | 100 | 1 | 1 |
| HPO ₃ ppt | 17 | 32,3 | 575 | 82,8 | 2,4 | 0,7 |
| UF/DF (1) | 0,4 | 129 | 120 | 68,8 | 407 | 2,9 |
| Sorptions- überstand | 0,33 | 6,3 | 120 | 3,38 | | |
| Eluat I (1) | 0,21 | 440 | 25 | 49 | 2652 | 9,8 |
| Eluat II (1) | 0,09 | 52,6 | 15 | 3,5 | 740 | 1,2 |
| Massen- bilanz [%] | 96,3 | 81,4 | | | | |
| UF/DF (2) | 0,8 | 137 | 120 | 73,5 | 217 | 3,1 |
| Sorptions- überstand | 0,75 | 7,9 | 120 | 4,23 | | |
| Eluat I (2) | 0,25 | 445 | 25 | 49,7 | 2255 | 9,9 |
| Eluat II (2) | 0,05 | 20,9 | 15 | 1,4 | 529 | 0,5 |
| Massen- bilanz [%] | 101 | 75,2 | | | | |
| UF/DF (3) | 3,6 | 115 | 120 | 61,7 | 40,5 | 2,6 |
| Sorptions- überstand | 3,3 | 90,2 | 120 | 48,3 | | |
| Eluat I (3) | - | 73,2 | 25 | 8,2 | - | - |
| Eluat II (3) | - | - | 15 | 0 | - | - |
| Massen- bilanz [%] | 91,7 | 91,5 | | | | |

Bezogen auf das eingesetzte Serum konnten beim Einsatz von 50 und 40 Volumenprozent Ethanol eine Ausbeute von 49 % bzw. 49,7 % erreicht werden. Die Verringerung der Konzentration an Ethanol auf 40 % v/v mit anschließender Ultra-/Diafiltration führte jedoch mit 172 IU mg⁻¹ im Vergleich zu 321 IU mg⁻¹ (50 % v/v Ethanol) zu einem Produkt mit geringerer Reinheit. Bei der

Fällung mit 30 % Ethanol (v/v) konnte nach der abschließenden Sorption an M-PVA-DEAP Partikel lediglich eine Ausbeute von 8 % bestimmt werden. Eine Fällung mit verringerter Ethanol-Konzentration führte somit zu einem Anstieg der Gesamtproteinkonzentration in der Vorlage des Sorptionsschrittes und damit zu einem Rückgang der eCG-Sorptionseffizienz.

4.4.4 Optimierung der Wasch- und Elutionsbedingungen

Die positive Ladung des verwendeten Anionenaustauschers mit DEAP-Funktionalisierung beruht auf der Protonierung des tertiärenamins zu einer quartären Ammoniumverbindung im sauren Milieu (Abbildung 3.1). Als Puffersystem zur Äquilibrierung und zum Waschen der Partikel wurde deshalb ein Essigsäure/Acetat-Puffer (0,01 M Natriumacetat pH 4,5) gewählt.

Tabelle 4.8 zeigt das Ergebnis der Isolation des eCG aus grob vorgereinigtem Serum mit anschließender Ultra-/Diafiltration (UF/DF) unter der Verwendung der M-PVA Partikel mit DEAP-Funktionalisierung. Der Versuch wurde im 1 mL Maßstab unter dem Einsatz von 5 g L⁻¹ Partikeln durchgeführt.

Tabelle 4.8: Einfluss des Waschpuffers auf die einzelnen Schritte der Reinigung von eCG unter Verwendung der M-PVA Partikel

| Parameter | eCG [IU] | Protein [mg] | eCG Gehalt [%] |
|--------------------|----------|--------------|----------------|
| UF/DF | 186 | 0,37 | 100 |
| Sorptionsüberstand | 4,9 | 0,29 | 2,6 |
| Wasch 1 | nn | nn | - |
| Wasch 2 | nn | nn | - |
| Wasch 3 | nn | nn | - |

nn: nicht nachweisbar

Durch die Verwendung des Natriumacetat-Puffers konnte mit 97,4 % eine fast vollständige Separation des eCG aus dem vorgelegten Feedstock erreicht werden. Die folgenden drei Waschschrte zur Elimination ungebundener Fremdproteine führten zu keiner Desorption des gebundenen Zielproteins eCG.

Die Optimierung der Elutionsbedingungen erfolgte unter dem Einsatz eines 0,01 M Phosphatpuffers (pH 8) mit unterschiedlicher Konzentration an Natriumchlorid im 1 mL Maßstab (Abbildung 4.14).

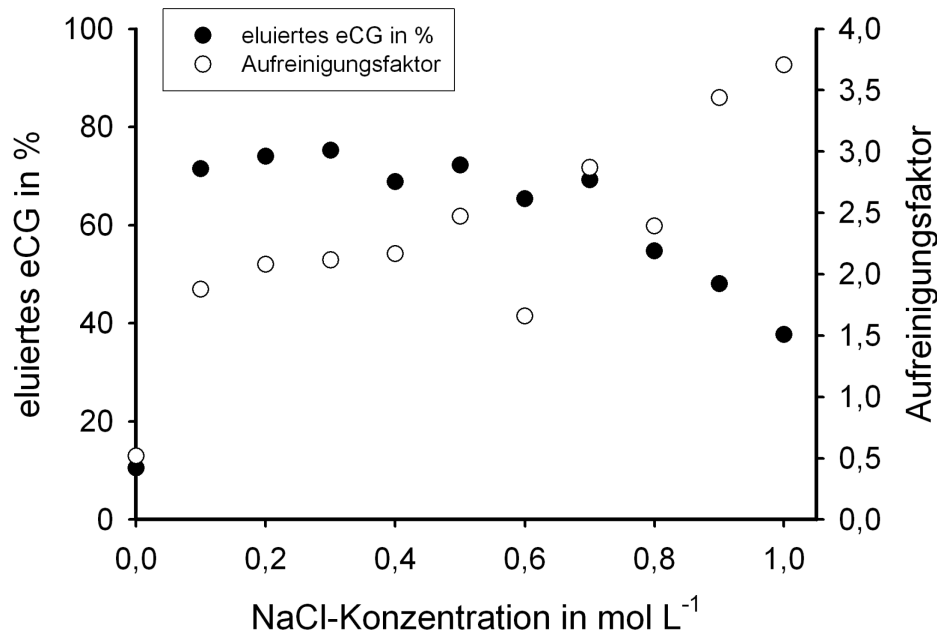


Abbildung 4.14: Optimierung der Desorption von eCG unter Verwendung von 0,01 M Phosphatpuffer (pH 8) und Variation der NaCl-Konzentration Partikelkonzentration 5 g L⁻¹

Ungeachtet der Variation der Natriumchlorid-Konzentration des Elutionspuffers wurde aus den Ergebnissen der ELISA-Messwerte eine maximale eluierbare Menge an eCG von lediglich ca. 75 % ermittelt (Abbildung 4.14). Im zweiten Elutionsschritt konnten lediglich 0-9 % des noch gebundenen eCG desorbiert werden (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren zeigte sich eine scheinbare Reduktion der Elutionsstärke des Phosphatpuffers mit zunehmender Konzentration an Natriumchlorid. In folgenden Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die Ionenstärke des Elutionspuffers die Resultate des ELISA beeinträchtigt. Der Störeffekt der in der Probe vorliegenden Komponenten wird als Matrixeffekt bezeichnet. Es ist bekannt, dass verschiedene Anionen und Kationen, Tenside, Proteine, Lipide, Lösungsmittel und andere organische Verbindungen Immunoassays, beeinflussen können [Hintemann, 2006].

Die Reduktion dieser Matrixeffekte kann beispielweise über eine möglichst hohe Verdünnung der Probe und damit auch der Matrix erfolgen [Deng et al., 2003]. Die resultierende Verringerung der Probenmenge erfordert eine ausreichende Sensitivität des ELISA-Assay, so dass die Nachweisgrenze für den Analyten nicht unterschritten wird. Im Fall des nachzuweisenden Proteins eCG konnte allein durch eine entsprechende Verdünnung der Probe mit Probenpuffer keine

Reduktion der Matrixeffekte erzielt werden. Erst eine Diafiltration der Proben führte zur Eliminierung der unerwünschten Matrixeffekte. Aufgrund des geringen Probenvolumens des Eluates der Optimierungsversuche von 500 μl wurde in diesen Fällen jedoch auf eine nachfolgende Diafiltration verzichtet. Bei größeren Elutionsvolumina im Labormaßstab (ab 15 mL) und nach der Reinigung des eCG im HGMPF-Prozess erfolgte jedoch ein Ultra-/Diafiltrationsschritt zur Reduktion der Matrixeffekte im ELISA-Assay.

Die Verwendung eines 0,01 M Phosphatpuffers (pH 8) mit einer Natriumchloridkonzentration von 0,3 mol L⁻¹ führte in Desorptionsversuchen im größeren Maßstab, mit anschließender Diafiltration der Probe, zu einer gemessenen Elutionseffizienz von 89-96 % des Zielproteins eCG (Kapitel 4.6). Es ist daher davon auszugehen, dass die wahre Elutionseffizienz der Desorptionsversuche im 500 μL Maßstab ebenfalls in diesem Bereich lag, und dass die eCG-Gehalte der Eluate um 20-30 % zu gering gemessen wurden. Da dies jedoch in einer Versuchsreihe zu gleichem Maße alle Proben betrifft, bleiben die Aussagen der Optimierungsversuche auch in Anbetracht dieser Tatsache gültig. Die Elution des Zielproteins eCG bei einer Natriumchloridkonzentration von 0,3 mol L⁻¹ zeigte sich auch bei Versuchen der klassischen Chromatographie an Anionenaustauschermaterialien (Abbildung 4.2).

Des Weiteren konnte mit steigender Ionenstärke neben dem Rückgang der eCG-Konzentration im Eluat ebenfalls ein Rückgang der Gesamtproteinkonzentration detektiert werden. Der im Vergleich stärkere Rückgang der Gesamtproteinkonzentration führt sogar zu einer Steigerung des Aufreinigungsfaktors. Eine mögliche Erklärung für den Rückgang der Proteinkonzentration im Eluat ist eine hydrophobe Interaktion von Teilen des Gesamtproteins mit der M-PVA Matrix. Die Verwendung eines Puffers mit hoher Salzkonzentration fördert die Adsorption der Proteine auf der hydrophoben Matrix.

4.4.5 Optimierung der Partikelkonzentration

Ziel des Versuches war die Bestimmung der optimalen Partikelkonzentration, bei der eine vollständige Sorption des sich in vorgereinigtem Serum befindlichen eCG erreicht werden kann. Bei einer eingesetzten Partikelkonzentration von 2,5-6 g L⁻¹ (Abbildung 4.15) konnte nahezu das gesamte eCG gebunden werden.

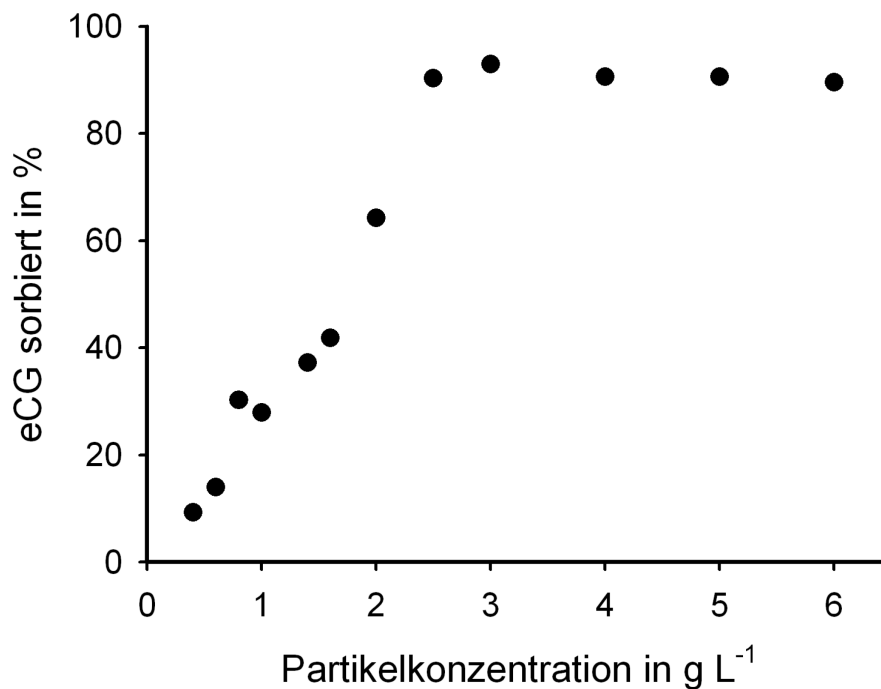


Abbildung 4.15: Einfluss der Konzentration DEAP-funktionalisierter M-PVA Partikel auf die Isolation von eCG

Die Filterkapazität ist bestimmend für die Produktivität bzw. Rentabilität des HGMPF-Prozesses. Durch den Einsatz von beispielsweise 3 g L⁻¹ Sorbentien im technischen Maßstab wäre die Filterkapazität nicht so schnell erschöpft wie bei einem Einsatz von 5 g L⁻¹, entsprechend könnte mit einem Separationszyklus mehr Serum gereinigt werden. Dennoch wurde in weiteren Versuchen im Labormaßstab sowie in den Versuchen zum scale-up eine Partikelkonzentration von 4-4,5 g L⁻¹ eingesetzt. Den Grund hierfür liefert der schwankende eCG-Gehalt des verwendeten Serums, was auf das Stadium der Trächtigkeit des jeweiligen Spendertieres zurückzuführen ist. Die Verwendung von z.B. 4,5 g L⁻¹ (siehe z.B. Kapitel 4.5.3) garantiert eine nahezu vollständige Sorption des eCG auch für hochwertige Serumfraktionen.

4.4.6 Sorptionsisotherme von eCG an M-PVA-DEAP Partikeln

Abbildung 4.16 zeigt die Adsorptionsisotherme von eCG unter der Verwendung von M-PVA Partikeln mit DEAP-Funktionalisierung. Ausgehend von mittels des vereinfachten Vorgehens vorgereinigtem Serum konnte eine maximale Beladung (q^*) von 3,2 mg g⁻¹ erreicht werden, bei einem K_D -Wert von 0,0012 mg mL⁻¹.

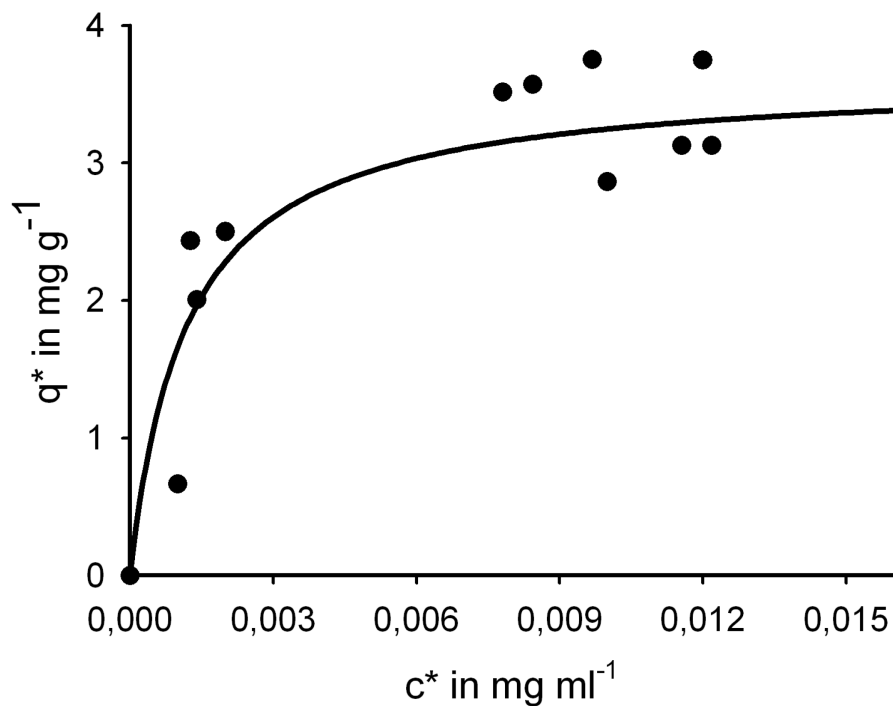


Abbildung 4.16: Adsorptionsisotherme für eCG unter der Verwendung von M-PVA Partikeln mit DEAP-Funktionalisierung. Die Anpassung erfolgte nach Langmuir, die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software Sigma Plot 11.0

In Versuchen im Millilitermaßstab konnten unter der Verwendung von eCG-haltigen Proben mit einem höheren Reinheitsgrad, z.B. nach konventioneller Vorreinigung des Serums (Kapitel 3.5.1.1) wesentlich höhere Beladungen, von bis zu 38 mg g^{-1} , erreicht werden. Im Vergleich dazu liefert die durchgeführte vereinfachte Vorreinigung von eCG ein Produkt mit einem größeren Anteil an Fremdprotein, d.h. einem geringeren Reinheitsgrad. Die vergleichsweise geringe anhand der Adsorptionsisotherme ermittelte maximale Beladung von $3,2 \text{ mg g}^{-1}$ deutet auf eine konkurrierende Sorption der vorhandenen Fremdproteine hin. Im Überstand konnten im Rahmen der Messgenauigkeit keine Änderungen der Gesamtproteinkonzentration detektiert werden.

Eine wichtige Größe zur Charakterisierung eines Ionenaustauschers ist dessen Totalkapazität, d.h. die Konzentration der ladungstragenden Gruppen innerhalb des Materials. Die Totalkapazität kommerzieller klassischer Chromatographiemedien liegt im Fall des ebenfalls schwachen Anionenaustauschers DEAE bei $3\text{-}4 \text{ mmol g}^{-1}$ (DEAE Sephadex, GE Healthcare, Uppsala, Schweden), im Fall der verwendeten magnetischen Mikrosorbentien mit DEAP-Funktionalisierung konnten Totalkapazitäten von ca. $1,3 \text{ mmol g}^{-1}$ nachgewiesen werden (INNOVENT e.V. Technologieentwicklung, Jena, Deutschland).

4.4.7 Adsorptions- und Desorptionskinetik

Zur Gewährleistung einer schnellen Prozessführung ist die Optimierung zeitintensiver Schritte im Rahmen eines Reinigungszyklus essentiell. Zu den zeitaufwendigsten Schritten der Reinigung von Proteinen aus Biosuspensionen unter der Verwendung magnetischer Sorbentien zählen die Beladungs- und Elutionszeiten. Die Untersuchung der Bindungskinetik für eCG an DEAP-funktionalisierte M-PVA Partikel ist in Abbildung 4.17 dargestellt. Untersucht wurde die adsorbierte Menge an eCG zwischen 30 s und 20 min.

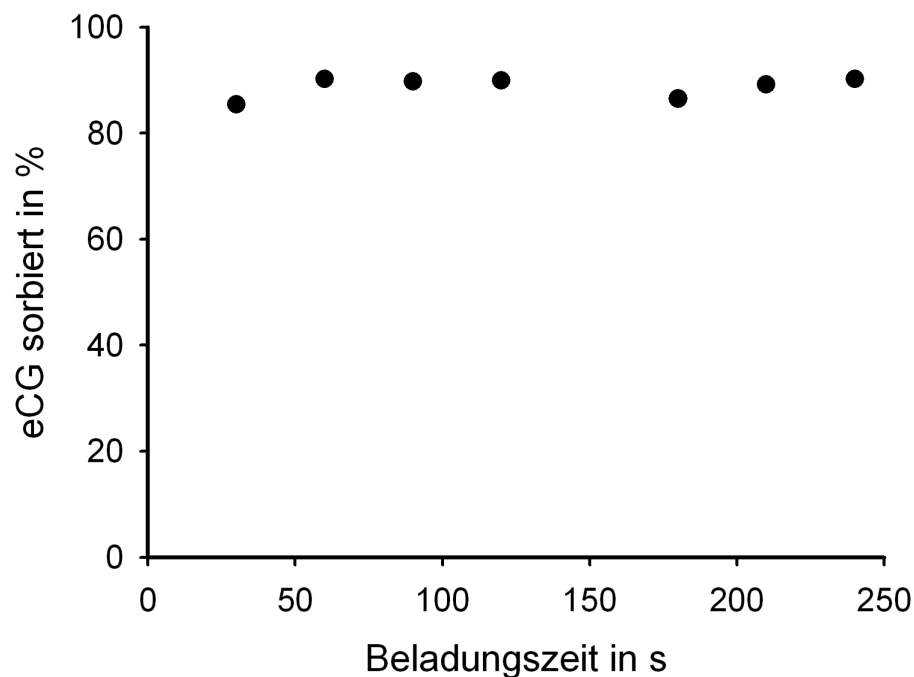


Abbildung 4.17: Kinetik der eCG-Bindung an DEAP-funktionalisierte M-PVA Partikel

Es ist zu erkennen, dass bereits nach einer Beladungszeit von 60 s 90 % des vorhandenen eCG gebunden wurde. Kontrollversuche nach einer Beladungszeit von 10 bzw. 20 min zeigten, dass eine Verlängerung der Bindezeit zu einer 97 %-igen bzw. 98 %-igen Adsorption des eCG führten.

Des Weiteren wurde die Desorptionszeit des Proteins eCG untersucht (Abbildung 4.18). Untersucht wurde die eluierte Menge an eCG zwischen 60 s und 20 min. Nach 4 min ist mit 80 % fast die maximal eluierbare Menge an eCG erreicht. Ein Kontrollversuche nach einer Elutionszeit von 20 min zeigte eine eluierte Menge an eCG von 89 %.

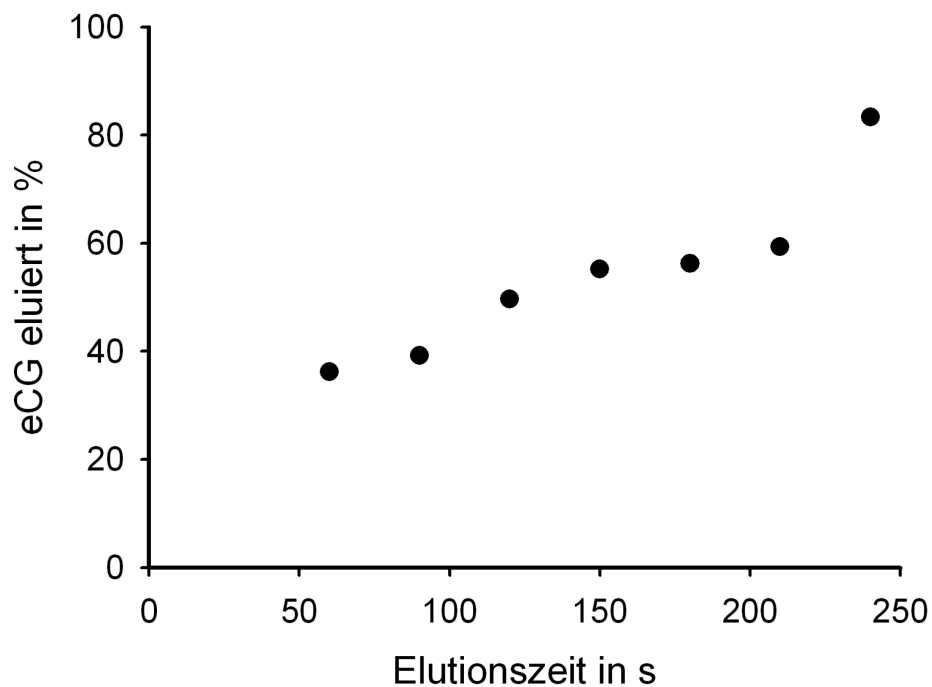


Abbildung 4.18: Kinetik der eCG-Elution an DEAP-funktionalisierte M-PVA Partikel

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist bei geeigneter Durchmischung der Suspension, die Isolation von eCG mit den verwendeten Sorbentien bei einer Beladungszeit von 30-60 s bzw. Elutionszeit von 4 min durchzuführen.

4.4.8 Wiederverwendbarkeit der Partikel

Eine Bedingung für die industrielle Anwendung magnetischer Mikrosorbentien, ist ihre vielfache Wiederverwendbarkeit. Ein häufiger Austausch der Sorbentien würde zu einer Erhöhung der Prozesskosten und so zu einer Minderung der Rentabilität des Prozesses führen. Aus diesem Grund wurden Versuche zum mehrfachen Einsatz der DEAP-funktionalisierten M-PVA Partikel durchgeführt. Aufgrund der hohen Leitfähigkeit ($10-13 \text{ mS cm}^{-1}$) und des hohen Proteingehaltes des Serums (ca. 50 mg ml^{-1}), konnte keine direkte Reinigung von eCG an den IEX-Materialien vorgenommen werden (Kapitel 4.4). Die Reinigung von eCG über mehrere Zyklen wurde vielmehr, wie unter Kapitel 3.3.5 beschrieben, mit vorgereinigtem Serum vorgenommen. Betrachtet wurde die Wiederverwendbarkeit der Partikel nach vorgenommener Regeneration mit 1 M NaCl-Lösung nach jedem Elutionsschritt (Abbildung 4.19) sowie die Wiederverwendbarkeit ohne an die Elution anschließenden Regenerationsschritt (Abbildung 4.20). Im ersten Fall konnten bis zu Zyklus 45 mit Ausnahme der Zyklen 19 und 20 nur leichte Variationen der Ausbeute detektiert werden (Abbildung 4.19). Bezogen auf das eingesetzte grob gereinigte Serum ergab sich

eine mittlere Ausbeute von 61,4 % (Zyklus 1-44: 62,5 %). Die in den ELISA-Assays detektierten niedrigen Konzentrationen an eCG in den Eluaten sind auf den Störeffekt der in der Probe vorliegenden Komponenten (Matrixeffekt) zurückzuführen (Vgl. Kapitel 4.4.4, Abbildung 4.14). Es ist davon auszugehen, dass die reale Ausbeute an eCG nach Elimination der Matrixeffekte bei ca. 90 % liegt. Im Anschluss an Zyklus 44 konnte ein Rückgang der Ausbeute verzeichnet werden. Der Kapazitätsverlust ist möglicherweise auf die in den Separationsschritten verlorenen Partikel (Menge nicht bestimmt) oder auf eine verminderte Proteinbindefähigkeit der Partikel zurückzuführen. Die Verluste von an den Pipettenspitzen haftenden Partikeln wurden durch den wiederholten Einsatz der verwendeten Pipettenspitze minimiert. Auf eine Wiedergewinnung der Partikel aus den verwendeten Wasch- und Elutionspuffern wurde im Rahmen des Versuches verzichtet.

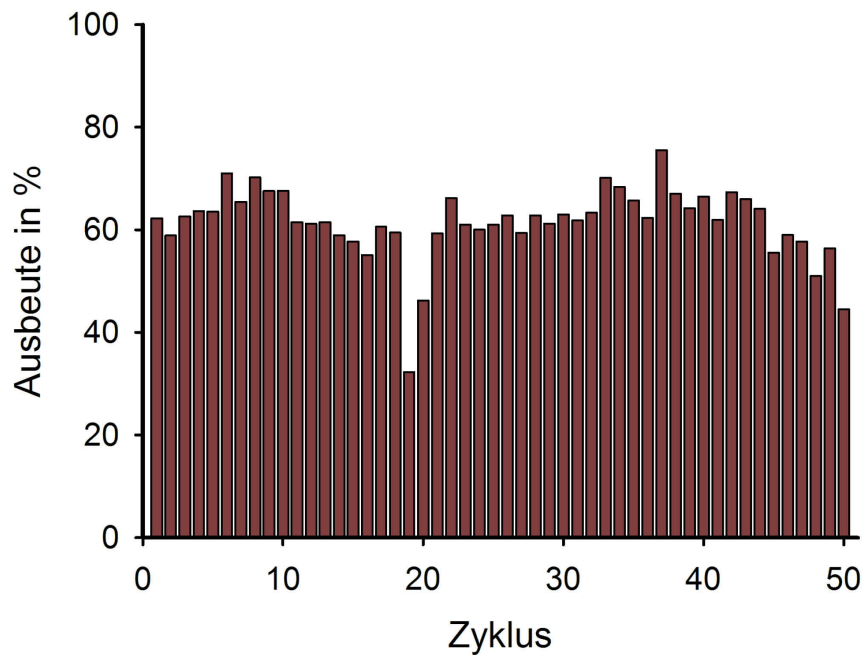


Abbildung 4.19: Reinigung von eCG aus grob vorgereinigtem Serum unter Wiederverwendung magnetischer DEAP-funktionalisierter M-PVA Partikel über 50 Zyklen. Die Regeneration der Sorbentien erfolgte nach jedem Zyklus mit 1 M Natriumchloridlösung, mit anschließendem dreimaligem Waschen der Partikel mit 0,01 M Natriumacetatpuffer pH 4,5

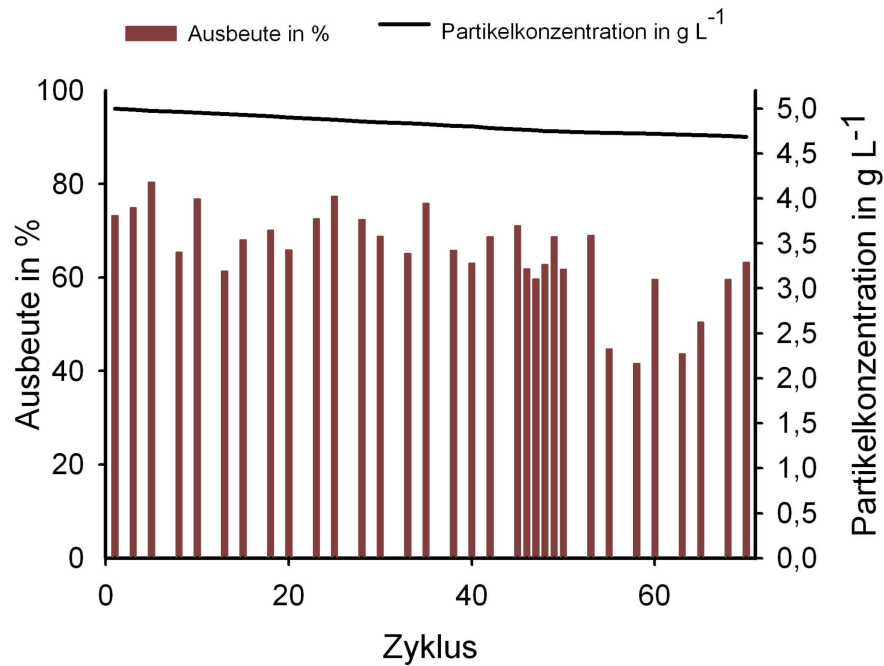


Abbildung 4.20: Reinigung von eCG aus grob vorgereinigtem Serum unter Wiederverwendung magnetischer DEAP-funktionalisierter M-PVA Partikel über 70 Zyklen. Es erfolgte keine Regeneration der Sorbentien nach jedem Zyklus

Abbildung 4.20 verdeutlicht, dass eine Regeneration der Partikel nach jedem Elutionsschritt für die Reinigung des eCG nicht erforderlich ist. Zur Klärung, ob der Kapazitätsverlust auf eine Minderung der Proteinbindekapazität der Partikel zurückzuführen ist, wurden weitere 20 Zyklen durchgeführt. Die Verluste von an den Pipettenspitzen haftenden Partikeln, wurden wiederum durch den wiederholten Einsatz der verwendeten Pipettenspitze minimiert. Auf eine Wiedergewinnung der Partikel aus den verwendeten Wasch- und Elutionspuffern wurde auch in diesem Versuche verzichtet.

Bezogen auf das eingesetzte grob gereinigte Serum ergab sich eine mittlere Ausbeute von 61,2 %, bei einem Verlust von 6,4 % Partikel. In den durchgeführten Zyklen 55-65 konnte ein Rückgang der Bindekapazität bezüglich des Zielproteins eCG detektiert werden. Die folgenden Zyklen 68 und 70 zeigten jedoch mit einer Ausbeute von 60 bzw. 63 % eine erneute Zunahme der Proteinbindekapazität der Partikel. Das Ergebnis lässt darauf schließen dass die Wiederverwendbarkeit der verwendeten Anionenaustauschersorbentien bei mindestens 70 Zyklen liegt, wobei der geringe Absolutwert der gemessenen Elutionsausbeute wiederum auf eine fehlende Korrektur der bereits diskutierte Matrixeffekte zurückgeführt werden kann.

Die Abbildungen 4.19 und 4.20 zeigen einen wellenförmigen Verlauf der erzielten Ausbeute. Es zeigte sich, dass eCG aus einer zu Versuchsbeginn frisch aufgetauten, kühlen Proteinlösung besser separiert wird, wie aus einer raumtemperierten am Ende eines Versuchstages.

Aus den Versuchen der Wiederverwendung der IEX-Sorbentien lässt sich folgern, dass die Partikel für einen industriellen Einsatz geeignet sind. Voraussetzung ist wie in den Versuchen im mL-Maßstab eine effektive Separation bzw. Wiedergewinnung der Partikel im scale-up des HGMF-Prozesses.

4.5 Hydrodynamische Charakterisierung der HGMF-Pilotanlage

Zur Verwirklichung des Vorhabens der Reinigung vom eCG im großen Maßstab wurde im Rahmen des Verbundprojektes ein geeigneter Durchflusseparator entwickelt (Kapitel 3.7.1). Vor dem Einsatz der HGMF-Pilotanlage zur Reinigung von eCG erfolgte deren verfahrenstechnische Charakterisierung zur Bestimmung der optimalen Prozessparameter.

4.5.1 Pumpenkennlinie

Nach Erstellung der Pumpenkennlinie (Abbildung 4.21) zeigte sich, dass die Pumpe im Druckbetrieb eine höhere Leistung wie im Saugbetrieb lieferte, was zu einer Änderung des ursprünglichen Hydraulikplanes führte. Ziel war es, die Filterkammer im Druck- anstelle eines Saugbetriebes zu fahren. Neben der so erreichten Steigerung des maximalen Durchsatzes garantiert diese Betriebsweise auch eine weitgehende Blasenfreiheit. Im Druckbetrieb konnte ein Durchsatz von bis zu $1,3 \text{ L min}^{-1}$ erreicht werden, während im Saugbetrieb lediglich ein Durchsatz von $1,1 \text{ L min}^{-1}$ erzielt werden konnte.

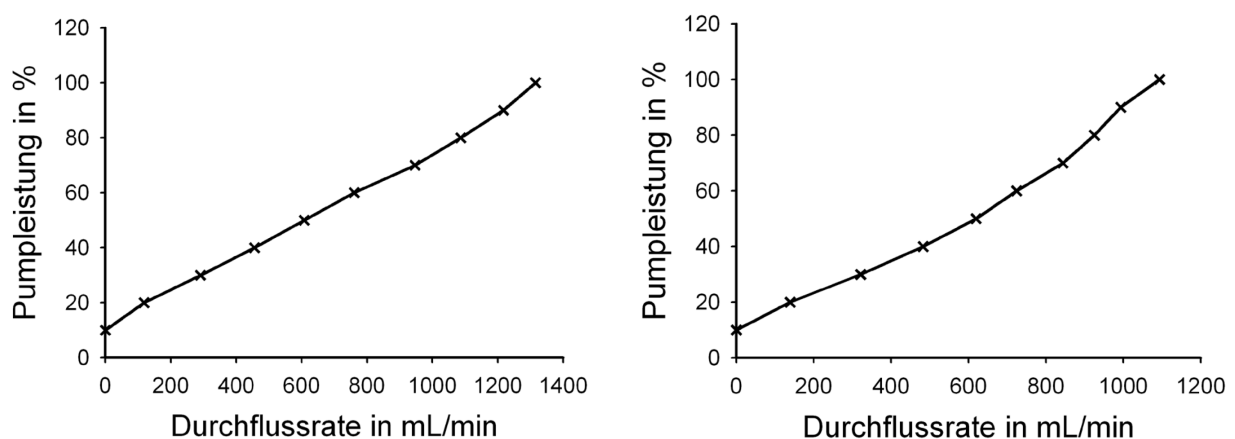


Abbildung 4.21: Pumpenkennlinie der HGMF-Pilotanlage im Druckbetrieb (links) und Saugbetrieb (rechts)

4.5.2 Tracerversuche

Die Bestimmung des Verweilzeitverhaltens der HGMF-Pilotanlage erfolgte bei verschiedenen Pumpeinstellungen über Tracerversuche wie unter 3.7.4 beschrieben. Das Verweilzeitverhalten des Separators wurde in Abbildung 4.22 und Abbildung 4.23 exemplarisch bei 50 % der Pumpleistung im Saugbetrieb, was einem Fluss von 610 mL min^{-1} entspricht, aufgezeigt.

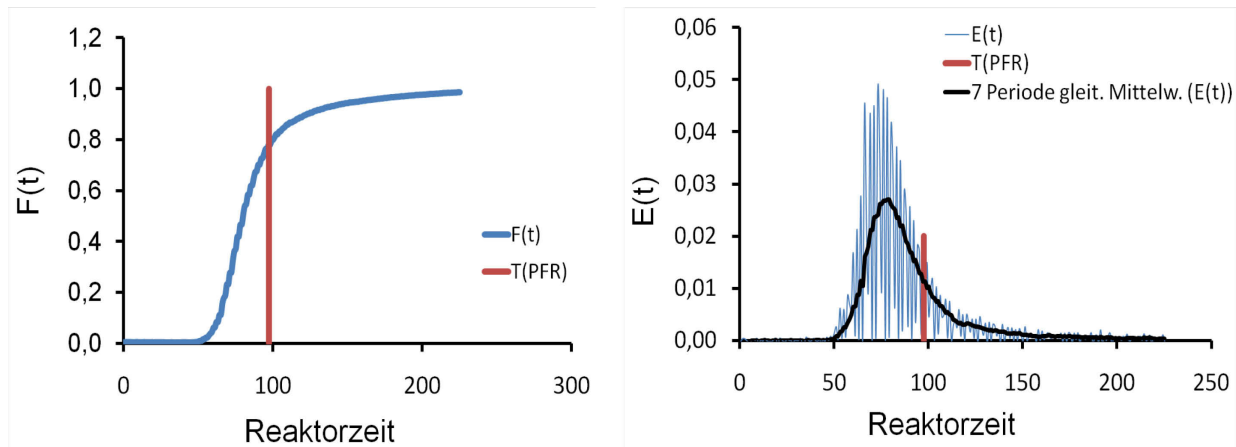


Abbildung 4.22: Verweilzeitsummenkurve und Verweilzeitverteilung bei Beaufschlagung des Systems mit einer 10 mM NaCl-Lösung. Gewählt wurden ein Fluss von 610 mL min^{-1} und eine maximale Leitfähigkeit von 1 mS cm^{-1} . Die rot eingezeichneten Linien zeigen die theoretischen Werte im Falle eines idealen Propfstromreaktors

Abbildung 4.22 zeigt, dass im Fall des Füllens des Systems mit einer 10 mM NaCl-Lösung eine mittlere Verweilzeit von 86 s resultiert. Ausgehend von einem zuvor bestimmten inneren Reaktorvolumen von 980 mL errechnet sich hieraus ein theoretisches Totvolumen des Separators von 116 mL. Wird dagegen die Salzlösung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{Milli-Q}}$ verdrängt, so konnten eine mittlere Verweilzeit von 79 s (Abbildung 4.23) und ein Totvolumen von 191 mL bestimmt werden. Die Ursache für das größere gemessene Totvolumen ist vermutlich die langsamere Verdrängung der dichteren salzhaltigen Lösung durch im Aufstrom durch den Reaktor strömendes $\text{H}_2\text{O}_{\text{Milli-Q}}$.

Die in Abbildung 4.23 und 4.24 aufgeführten Daten beziehen sich auf Experimente, bei denen das Ein- und Ausschleusen der NaCl-Lösung ohne zusätzliche Vermischung durch Einsatz des Rührens erfolgte. Im Rahmen realer Bioseparationsversuche zur Reinigung von eCG erfolgt während der Wasch- und Elutionsschritte eine zusätzliche Durchmischung der verwendeten Puffer durch den Einsatz eines Rührers zur Reduktion des Totvolumens der HGMF-Pilotanlage. Auch wenn diese zusätzliche Durchmischung in der Regel nicht während des Einschleusens der Puffer, sondern in einer anschließenden Phase ohne Pumpbetrieb erfolgte, so geben die folgenden

Verweilzeitversuche unter Rühren doch einen quantitativen Eindruck, wie sehr die Totvolumina durch Einsatz des Rotor-/Statorsystems verringert werden können.

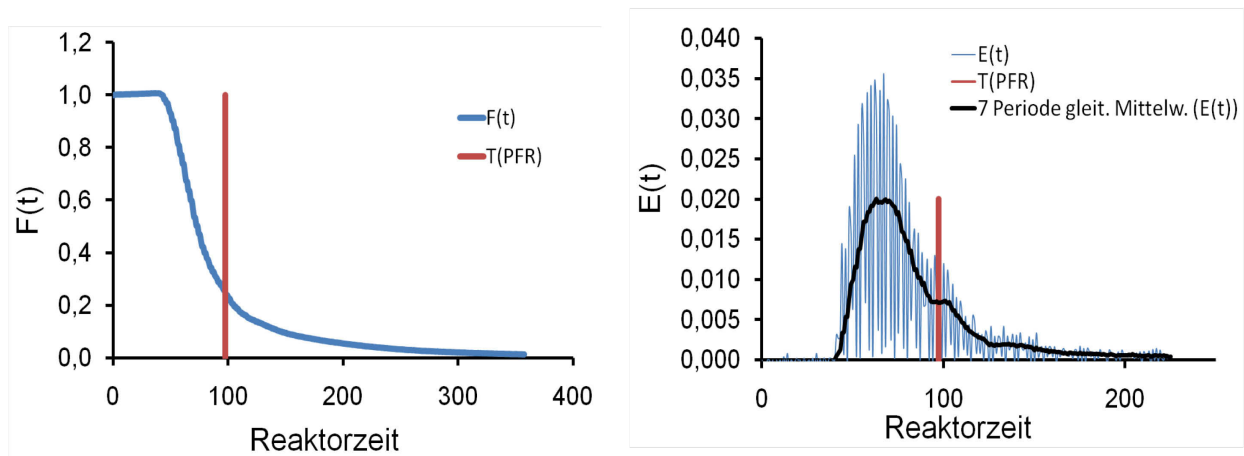


Abbildung 4.23: Verweilzeitsummenkurve und Verweilzeitverteilung bei Verdrängung der 10 mM NaCl-Lösung aus dem System durch $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$. Gewählt wurden ein Fluss von 610 mL min^{-1} . Die rot eingezeichneten Linien zeigen die theoretischen Werte im Falle eines idealen Propfstromreaktors

Das Verweilzeitverhalten bei Einsatz des Separators unter 10 % Rührleistung wurde in Abbildung 4.24 und 4.25 erneut exemplarisch bei 50 % der Pumpleistung im Saugbetrieb (Fluss: 610 mL min^{-1}) aufgezeigt.

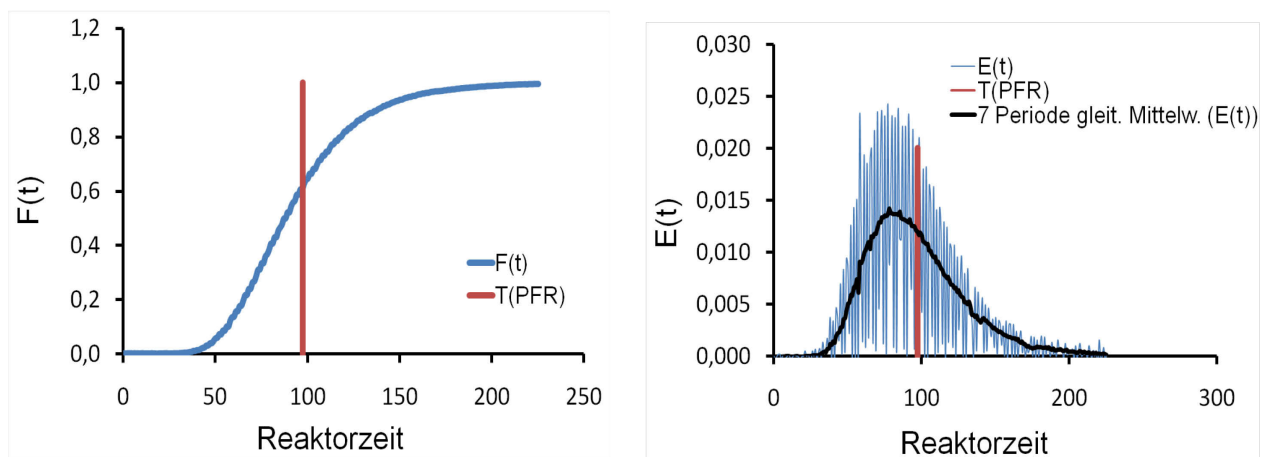


Abbildung 4.24: Verweilzeitsummenkurve und Verweilzeitverteilung bei Beaufschlagung des Systems mit einer 10 mM NaCl-Lösung und einer Rührerleistung von 10 %. Gewählt wurden ein Fluss von 610 mL min^{-1} und eine maximale Leitfähigkeit von 1 mS cm^{-1} . Die rot eingezeichneten Linien zeigen die theoretischen Werte im Falle eines idealen Propfstromreaktors

Anhand Abbildung 4.24 ist zu erkennen, dass im Fall des Füllens des Systems mit einer 10 mM NaCl-Lösung eine mittlere Verweilzeit von 93 s resultiert. Ausgehend von einem inneren

Reaktorvolumen von 980 mL errechnet sich hieraus ein theoretisches Totvolumen des Separators von 50 mL.

Wurde nun wie in Abbildung 4.25 dargestellt die Salzlösung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$ verdrängt, so konnten eine mittlere Verweilzeit von 92 s und ein Totvolumen von 56 mL bestimmt werden.

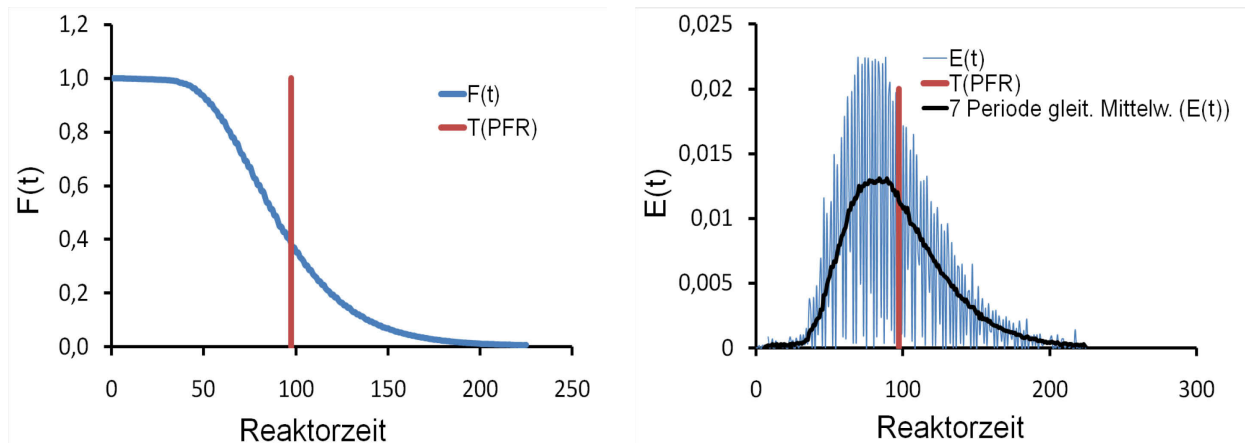


Abbildung 4.25: Verweilzeitsummenkurve und Verweilzeitverteilung bei Verdrängung der 10 mM NaCl-Lösung aus dem System durch $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$ und einer Rührerleistung von 10 %. Gewählt wurden ein Fluss von 610 mL min^{-1} . Die rot eingezeichneten Linien zeigen die theoretischen Werte im Falle eines idealen Propfstromreaktors

Das heißt, bereits durch eine zusätzliche Vermischung der Suspension durch den Einsatz von 10% der Rührerleistung konnte eine Verringerung des Totvolumens um einen Faktor 3 im Fall der Beaufschlagung des Systems mit 10 mM NaCl-Lösung, bzw. Faktor 3,6 im Fall der Verdrängung der 10 mM NaCl-Lösung durch $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$ erreicht werden.

Tabelle 4.9 fasst die Daten des ermittelten Verweilzeitverhaltens sowie des Totvolumens bei unterschiedlichem Volumenstrom mit und ohne Einsatz des in das System integrierten Rührers zusammen.

Es ist zu erkennen, dass bereits bei einer Rührerleistung von 10 % und einem Volumenstrom von 1020 mL min^{-1} eine vollständige Durchmischung der eingesetzten Lösungen zu verzeichnen ist.

Des Weiteren wurden Tracerversuche unter den im HGMPF-Prozess gewählten Bedingungen zur Reinigung von eCG durchgeführt. Die Resultate sind Kapitel 4.6 zu entnehmen.

Tabelle 4.9: Bestimmung der mittleren Verweilzeit und des Totvolumens bei Beaufschlagung des Systems mit einer 10 mM NaCl-Lösung (1) sowie bei Verdrängung der 10 mM NaCl-Lösung durch H₂O_{MilliQ} (2)

| Fluss [mL/min] | Rührer [%] | mittlere Verweilzeit [s] (1) | Totvolumen [mL] (1) | mittlere Verweilzeit [s] (2) | Totvolumen [mL] (2) |
|-------------------|---------------|------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| 200 | 0 | 211 | 266 | 193 | 327 |
| 200 | 10 | 288 | 208 | 220 | 237 |
| 610 | 0 | 86 | 116 | 79 | 191 |
| 610 | 10 | 93 | 50 | 92 | 56 |
| 1020 | 0 | 55 | 68 | 58 | 14 |
| 1020 | 10 | 60 | 0 | 61 | 0 |

4.5.3 Bestimmung der Kapazität des magnetischen Filters

Die Beladungskapazität des magnetischen Filters spielt eine entscheidende Rolle für das Leistungsvermögen des entwickelten Verfahrens zur Reinigung von eCG. Unter idealen Bedingungen beträgt das Rückhaltevermögen des Filters in Bezug auf die in der Partikel-/Proteinsuspension eingesetzten Partikel, bis zum Erreichen der Filterkapazität 100 %. Bei Erreichen der Filterkapazität kommt es zu einem Durchbruch der Partikel und alle nachfolgenden in den Filter eintretenden Partikel werden nicht mehr zurückgehalten. Der zur Reinigung von eCG verwendete magnetische Filter wurde auf eine Arbeitskapazität von 100 g carboxylierter M-PVA Partikel untersucht, das Durchbruchverhalten des magnetischen Filter wurde nicht bestimmt, da die Rückhalteeffizienz des magnetischen Filters nach Beladung mit 100 g M-PVAc Partikel praktisch die gewünschten 100 % betrug.

Zur Simulation eines realen Reinigungsprozesses wurde ein automatisierter Prozess mit acht aufeinanderfolgenden Waschzyklen simuliert. Da der Viskositätsunterschied von Serum [Kamke & Walcher, 1994] oder grob gereinigtem Serum gegenüber Wasser vernachlässigt werden kann (Anhang, Tabelle 7.6), wurde für die Simulation lediglich Waschlösung (0,01 M Ammoniumacetat, pH 4,5) eingesetzt. Tabelle 4.10 zeigt exemplarisch einen automatisierten Waschzyklus, die Beaufschlagung des Systems mit Partikel-/Waschlösungssuspension sowie das Ausspülen der Partikel erfolgten manuell.

Tabelle 4.10: Prozessschritt eines simulierten Waschzyklus

| Prozessschritt | Prozessdauer [s] |
|--|------------------|
| Einschleusen des Waschpuffers | 180 |
| Resuspendieren der Partikel | 120 |
| Pause | 5 |
| Separation der Partikel | 50 |
| Spülen des Rezyklierungskreislaufes (Loop) | 120 |

Der Partikelverlust im Ablauf des Filters wurde anschließend gravimetrisch auf 0,3 % bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von mindestens 100 g magnetischer Sorbentien (mit einer Größe von 1-3 μm) als Arbeitskapazität angenommen werden kann, da ein Partikelverlust von lediglich 0,3 % im Rahmen eines Reinigungszyklus tolerierbar ist.

Bei einem Versuch zur Isolation von eCG aus grob vorgereinigtem Serum an der HGMF-Pilotanlage konnte eine maximale Beladung von 27000 IU g^{-1} M-PVA Partikel (2,7 mg g^{-1}) erreicht werden (Kapitel 4.6, Tabelle 4.13). Im ELISA-Assay konnte eine mittlere Konzentration von ca. 100 IU ml^{-1} eCG im Ultra-/Diafiltrat, bei einer Konzentrierung des Ultra-/Diafiltrates auf ein viertel des Volumens des eingesetzten Serums, detektiert werden. Unter diesen Voraussetzungen gewährleistet der Einsatz von 100 g M-PVA Partikeln eine Reinigung von ca. 27 L grob vorgereinigten Serums (entspricht ca. 110 L Serum) pro Zyklus.

4.5.4 Optimierung der Waschschrte im HGMF-Prozess

Nach Beladen des magnetischen Filters mit der Partikel-/Proteinsuspension befinden sich neben den magnetischen Sorbentien ungebundene Bestandteile im Filter. Die Verdrängung der ungebundenen Bestandteile gewährleistet den Erhalt eines reinen Produktes im Anschluss an den Elutionsschritt. Zur Simulation eines realen Reinigungsprozesses wurden 5 g L^{-1} carboxylierter M-PVA Partikel, Leerserum sowie Leerserum welches mit Waschpuffer (0,01 M Ammoniumacetat, pH 4,5) auf eine Gesamtproteinkonzentration des im Reinigungsprozess eingesetzten Ultra-/Diafiltrates verdünnt wurde verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass bei der Produktaufarbeitung von Biomolekülen direkt aus Serum mindestens fünf Waschschrte mit je 3200 mL Waschpuffer benötigt würden, um ungebundene Bestandteile weitestgehend aus dem Filter vollständig zu eliminieren (Abbildung 4.26).

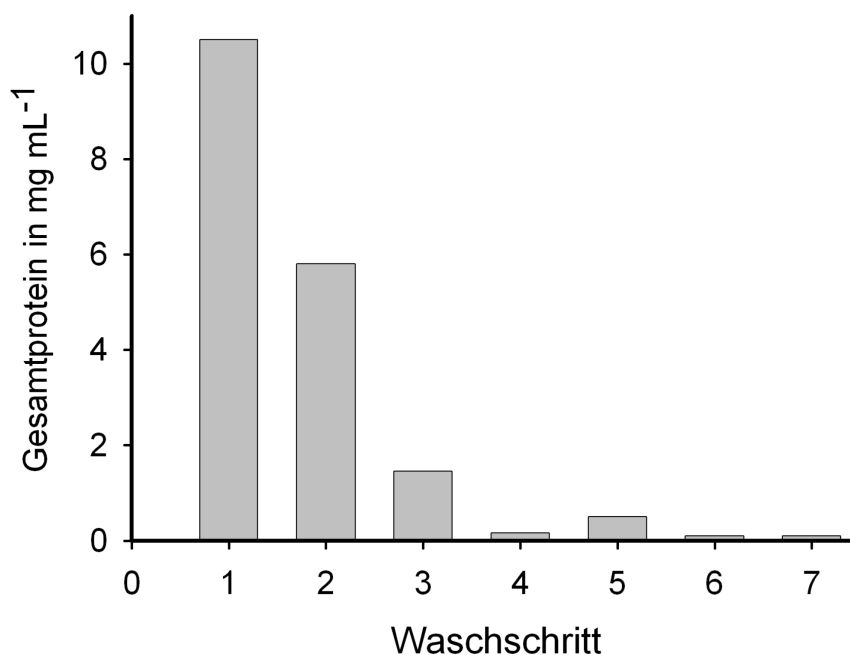


Abbildung 4.26: Proteinkonzentration im Ablauf des Separators nach den einzelnen Waschsritten, unter der Verwendung von Leerserum

Im Fall des bereits vorgereinigten Ultra-/Diafiltrats werden demgegenüber lediglich drei Waschschriffe mit 2700 mL benötigt, bis im Ablauf des Filters mittels BCA-Assay kein Protein mehr nachgewiesen werden konnte. Die Versuchsdaten sind Tabelle 7.7 im Anhang zu entnehmen.

4.6 Isolierung von eCG mit Hilfe der HGMF-Pilotanlage

Ausgehend von den im Labormaßstab optimierten Bedingungen der Reinigung des Proteins eCG folgte im nächsten Schritt die technische Umsetzung des Verfahrens. Durch den Einsatz der im Rahmen des Verbundprojektes konstruierten HGMF-Pilotanlage konnte eine Erhöhung des Separationsvolumens auf 980 mL erreicht werden. Die für den Betrieb der Anlage benötigten Mengen an M-PVA Partikeln wurden vom Projektpartner chemagen Biopolymer AG (Baesweiler, Deutschland) synthetisiert und vom Projektpartner INNOVENT e.V. Technologieentwicklung (Jena, Deutschland) zu Anionenaustauschersorbentien (DEAP-Funktionalisierung) funktionalisiert.

Die im Labormaßstab ermittelten Versuchsparameter zur Reinigung von eCG sind in Tabelle 4.11 dargestellt.

Tabelle 4.11: Ausgangsdaten zu Reinigung von eCG aus grob vorgereinigten Serum

| Parameter | Gewählte Bedingung |
|-----------------------|--|
| Partikelkonzentration | 4,5 g L ⁻¹ |
| Äquilibrierungspuffer | 0,01 M Natriumacetat, pH 4,5 |
| Waschpuffer | 0,01 M Natriumacetat, pH 4,5 |
| Elutionspuffer | 0,01 M Natriumdihydrogenphosphat, 0,01 M Dinatriumhydrogenphosphat, 0,3 M Natriumchlorid, pH 8 |

Das für die Durchführung der HGMF-Prozesse verwendete Versuchsprotokoll, am Beispiel der Reinigung von 20 L Ultra-/Diafiltrat, ist in Tabelle 4.12 dargestellt.

Tabelle 4.12: Reinigungsschritte für die Isolation von eCG aus grob vorgereinigtem Serum an der HGMF-Pilotanlage

| Prozessschritt | Prozessdauer [s] |
|---|---|
| Einschleusen von 20 L Ultra-/Diafiltrat unter der Verdrängung des im System vorgelegten Puffers | 1176 |
| Einschleusen Waschpuffer 1, ausschleusen Sorptionsüberstand Resuspendieren u. Separation der Partikel | 475 |
| Einschleusen Waschpuffer 2, ausschleusen Waschpuffer 1 Resuspendieren u. Separation der Partikel | 475 |
| Einschleusen Waschpuffer 3, ausschleusen Waschpuffer 2 Resuspendieren u. Separation der Partikel | 475 |
| Einschleusen Elutionspuffer 1, ausschleusen Waschpuffer 3 Resuspendieren u. Separation der Partikel | 655 |
| Einschleusen Elutionspuffer 2, ausschleusen Elutionspuffer 1 Resuspendieren u. Separation der Partikel | 655 |
| Einschleusen Elutionspuffer 3, ausschleusen Elutionspuffer 2 Resuspendieren u. Separation der Partikel | 655 |
| Einschleusen Waschpuffer 4, ausschleusen Elutionspuffer 3 Resuspendieren u. Separation der Partikel | 655 |
| Einschleusen Waschpuffer 5, ausschleusen Waschpuffer 4 Resuspendieren u. Separation der Partikel | 655 |
| Ausspülen der Partikel | Abh. von der eingesetzten Partikelmenge |
| Summe (ohne Ausspülen der Partikel) | 90 min |

Kapitel 7.5 (Anhang) listet den vollständigen Ablauf der programmierten Reinigungszyklen an der HGMF-Pilotanlage auf.

Unter Verwendung der in Kapitel 3.7 beschriebenen HGMF-Pilotanlage wurden 4 Versuche zur Reinigung von eCG durchgeführt. Die Resultate sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

4.6.1 Erster HGMF-Prozess: Bestimmung der maximalen Bindekapazität

Ziel des ersten Versuches war nicht das Erreichen möglichst hoher Ausbeutewerte, sondern die Bestimmung der maximalen Bindekapazität der Sorbentien im HGMF-Prozess. Tabelle 4.13 zeigt das Ergebnis des ersten Versuches. Insgesamt wurden 18,4 L Ultra-/Diafiltrat eingesetzt, was einem Volumen von 85,8 L Ausgangsserum entsprach sowie 20 g ($\approx 1 \text{ g L}^{-1}$) Sorbentien.

Tabelle 4.13: Zusammenfassung der Daten für die Reinigung von eCG im ersten HGMF-Prozess

| Schritt | Protein [mg/mL] | eCG [IU _{ELISA} /mL] | Volumen [mL] | Ausbeute [%] |
|-----------------------|--------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|
| Serum | 57,8 | 37,6 | 85800 | 100 |
| HPO ₃ ppt | 6,32 | 26,7 | 86980 | 72 |
| UF/DF | 0,5 | 108 | 18355 | 61,5 |
| Durchfluss | 0,34 | 68,9 | 20850 | 44,6 |
| Wasch I | 0,12 | 15,9 | 3200 | 1,57 |
| Wasch II | 0,07 | 7,22 | 3200 | 0,72 |
| Wasch III | 0,06 | 5,68 | 3200 | 0,56 |
| Eluat I | 0,02 | 14,5 | 1200 | 0,54 |
| Eluat II | 0,31 | 217 | 1200 | 8,08 |
| Eluat III | 0,28 | 226 | 1200 | 8,41 |
| Massen- bilanz [%] | 93,9 | 106 | | |

Im durchgeführten Versuch an der HGMF-Anlage konnte eine maximale Beladung von 2,7 mg eCG pro g Partikel erreicht werden. Aus der im Eppendorf-Maßstab ermittelten Sorptionsisotherme (Abbildung 4.16) ergibt sich für die im Durchfluss gemessene Restkonzentration an eCG von 70 IU_{ELISA} mL⁻¹ (entsprechend ca. 0,007 mg mL⁻¹) eine zugehörige Gleichgewichtsbeladung von 3 mg g⁻¹, wobei die Isothermendaten eine relativ große

Schwankungsbreite besitzen. Im Rahmen der erreichten Messgenauigkeit lassen sich somit die eCG-Bindungsergebnisse des HGMF-Prozesses im 20 L Maßstab aus den Daten der im Millilitermaßstab bestimmten Isotherme abschätzen.

Das im Batch-Adsorptionsschritt gebundene Zielprotein eCG (545358 IU) konnte im Verlauf von drei Elutionszyklen (Summe der Eluate I-III: 549000 IU) vollständig wiedergewonnen werden. Die in der Tabelle angegebenen Massenbilanzen für Gesamtprotein und eCG beziehen sich jeweils auf das eingesetzte Ultra-/Diafiltrat.

4.6.2 Zweiter HGMF-Prozess: Multibatchbetriebsweise mit Partikelrezyklierung

Tabelle 4.14 zeigt Daten des zweiten HGMF-Prozesses, in dem nacheinander vier Vorlagen von je 4589 mL abgearbeitet wurden, wobei zwischen den Zyklen eine automatisierte Partikelrückgewinnung und -rezyklierung erfolgte. Hierzu wurde der Durchfluss, die Eluate sowie die Überstände der Waschschriffe des ersten HGMF-Prozesses (Tabelle 4.13) vereinigt und einer erneuten Ultra-/Diafiltration unterzogen. Jeweils ein Viertel des Volumens des Ultra-/Diafiltrats wurde für die einzelnen HGMF-Zyklen (1-4) verwendet. Die unterschiedlichen Volumina des Durchflusses resultieren aus den unterschiedlichen Mengen an Waschpuffer, die für das Nachspülen des Batch-Gefäßes, in dem die Sorption stattfand, verwendet wurden. Nach jedem Zyklus wurden die Partikel mit neuem Feedstock (Ultra-/Diafiltrat) aus dem Separator gespült und nach Beendigung der Batchadsorption wurde die Partikel-/Proteinsuspension bei angeschaltetem Magnetfeld durch den Separator gepumpt. Die Partikelkonzentration betrug $4,5 \text{ g L}^{-1}$. Die in der Tabelle angegebenen Massenbilanzen für Gesamtprotein und eCG beziehen sich jeweils auf das eingesetzte Ultra-/Diafiltrat. Die im Prozess ermittelte Beladung der Sorbentien betrug pro Zyklus ca. 1,8 mg eCG pro g Partikel, bei einer eCG-Konzentration im Durchfluss von nur $1,6\text{-}1,8 \text{ IU mL}^{-1}$. Die Sorption des eCG an M-PVA-DEAP Partikel erfolgte somit im HGMF-Prozess mit höherer Affinität, als dies aufgrund der Isotherme (Abbildung 4.16) zu erwarten war. Eine mögliche Ursache hierfür sind verbesserte Eigenschaften der für den zweiten HGMF-Prozess verwendeten Partikelcharge. Die Bestimmung der eCG-Konzentration in den Elutionsproben erfolgte nach einer erneuten Diafiltration, bei der eine Leitfähigkeit von ca. 1 mS cm^{-1} eingestellt wurde, da in Vorversuchen im Labormaßstab eine Beeinflussung des ELISA-Assay durch den hohen Salzgehalt des Elutionspuffers nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 4.14: Zusammenfassung der Daten zur Reinigung von eCG aus Serum im zweiten HGMP-Prozess, unter Durchführung einer vierfachen Partikelrezyklierung (1-4)

| Schritt | Protein [mg/mL] | eCG [IU _{ELISA} /mL] | Volumen [mL] | HGMP- Ausbeute [%] | HGMP- Aufreinigungs- faktor | HGMP- Konzentrierungs- faktor |
|------------------|--------------------|----------------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| UF/DF | 0,45 | 81 | 4589 | 100 | 1 | 1 |
| Durchfluss (1) | 0,22 | 1,6 | 6200 | 2,59 | | |
| Wasch I (1) | 0,04 | 0,62 | 3200 | 0,53 | | |
| Wasch II,III (1) | 0,02 | 0 | 3200 | - | | |
| Eluat I (1) | 0,01 | 1,19 | 1800 | 0,6 | 1,19 | 0,02 |
| Eluat II (1) | 0,08 | 148 | 1800 | 71,4 | 10,3 | 1,82 |
| Eluat III (1) | 0,03 | 29,2 | 1800 | 15,3 | 5,85 | 0,36 |
| Massenbilanz [%] | 103 | 90,7 | | | | |
| Durchfluss (2) | 0,19 | 1,6 | 7500 | 3,23 | | |
| Wasch I (2) | 0,01 | 0,3 | 3200 | 0,01 | | |
| Wasch II,III (2) | 0,02 | 0 | 3200 | - | | |
| Eluat I (2) | 0,06 | 6,11 | 1800 | 3,0 | 0,62 | 0,08 |
| Eluat II (2) | 0,1 | 150 | 1800 | 73,1 | 8,07 | 1,86 |
| Eluat III (2) | 0,03 | 21,9 | 1800 | 10,6 | 3,64 | 0,27 |
| Massenbilanz [%] | 93,5 | 89,9 | | | | |
| Durchfluss (3) | 0,17 | 1,8 | 5750 | 2,79 | | |
| Wasch I (3) | 0,01 | 0,3 | 3200 | 0,01 | | |
| Wasch II,III (3) | 0 | 0 | 3200 | - | | |
| Eluat I (3) | 0,02 | 3,38 | 1800 | 1,6 | 0,85 | 0,04 |
| Eluat II (3) | 0,08 | 185 | 1800 | 89,7 | 13,2 | 2,29 |
| Eluat III (3) | 0,03 | 31,9 | 1800 | 15,4 | 5,31 | 0,39 |
| Massenbilanz [%] | 60,8 | 107 | | | | |
| Durchfluss (4) | 0,18 | 2,1 | 6750 | 3,89 | | |
| Wasch I (4) | 0,04 | 0,45 | 3200 | 0,39 | | |
| Wasch II,III (4) | 0,02 | 0 | 3200 | - | | |
| Eluat I (4) | 0,02 | 7,82 | 1800 | 3,8 | 2,61 | 0,1 |
| Eluat II (4) | 0,06 | 179 | 1800 | 86,7 | 17,9 | 2,21 |
| Eluat III (4) | 0,04 | 29,5 | 1800 | 14,3 | 3,84 | 0,36 |
| Massenbilanz [%] | 76,6 | 109 | | | | |

Im zweiten HGMF-Prozess konnte allein durch das zweite Eluat eine mittlere Ausbeute von 72 % im ersten und zweiten Zyklus, bzw. von 88 % im dritten und vierten Zyklus erreicht werden. Bezogen auf das zweite Eluat (Eluat II) entspricht dies einer 19 %-igen Steigerung der Ausbeute im dritten und vierten Zyklus. Im Zuge der vereinfachten Vorreinigung von eCG aus Serum konnten im Ultra-/Diafiltrat mittlere Ausbeuten von ca. 70 % erreicht werden (z.B. Tabelle 4.6). Überträgt man dieses Ergebnis auf den Gesamtprozess bestehend aus vereinfachter Vorreinigung und anschließendem HGMF-Prozess, so können bei ausschließlicher Verwendung des zweiten Eluates Gesamtausbeuten von ca. 62 % erwartet werden. Im Falle der Berücksichtigung aller Eluate steigt dieser Wert auf ca. 70 %, jedoch bei abnehmender Reinheit des eCG-Produktes.

Das adsorbierte eCG konnte im Rahmen der ersten beiden HGMF-Prozesse nicht vollständig eluiert werden (% eluiert: 88,5 % (1); 89,5 % (2)), im Zuge folgender Rezyklierungen der Sorbentien kam es aber anscheinend zu einer Elution des gebundenen eCG aus vorangegangenen Batchadsorptionsschritten (%-eluiert: 109 % (3); 104 % (4)), was auch durch die Massenbilanzen für eCG des Zyklus 3 und 4 ersichtlich wird.

Bezogen auf das zweite Eluat konnte ein HGMF-Aufreinigungsfaktor von 8-18 erreicht werden, das Zielprotein eCG wurde im HGMF-Prozess um einen Faktor 1,8-2,3 aufkonzentriert. Im Gegensatz zu den im mL-Maßstab durchgeführten Versuchen wird im HGMF-Prozess das sorbierte eCG erst im zweiten Elutionsschritt desorbiert. Begründet ist dies durch die Rückvermischung des dritten eingeschleusten Waschpuffers mit dem ersten eingeschleusten Elutionspuffer im Separator. Die Rückvermischung von Wasch- und Elutionspuffer führt zu einer verminderten Elutionsstärke des Elutionspuffers. Tracerversuche unter Realbedingungen zeigten, dass im Fall des Füllens des Separators mit Elutionspuffer und der Verdrängung des Waschpuffers eine mittlere Verweilzeit von 57 s resultiert. Ausgehend von einem inneren Reaktorvolumen von 980 mL errechnet sich hieraus ein theoretisches Totvolumen von 27 mL. Wurde dagegen der Elutionspuffer mit Waschpuffer verdrängt, konnte eine mittlere Verweilzeit von 74 s und ein theoretisches Totvolumen von 55 mL bestimmt werden. Die vergleichsweise starke Differenz des ermittelten Verweilzeitverhaltens im Gegensatz zu den ermittelten Totvolumina des Wasch- und Elutionsschrittes resultieren aus der unterschiedlich gewählten Zulaufgeschwindigkeit von 1000 bzw. 610 mL min⁻¹ im HGMF-Prozess.

Das zweite Eluat des ersten (1) und zweiten (2) Zyklus (Tabelle 4.14) wurde je bis zu einer Leitfähigkeit von 1 mS cm⁻¹ dialysiert und lyophilisiert. Über die Bestimmung des Trockengewichtes konnte eine spezifische Aktivität von 494 IU_{ELISA} mg⁻¹ bzw. 928 IU_{ELISA} mg⁻¹ ermittelt werden. Das zweite Eluat des ersten Zyklus zeigte mit 494 IU_{ELISA} mg⁻¹ eine im

Vergleich zu anderen Versuchen im Labormaßstab und scale-up eine geringe spezifische Aktivität, was auf einen möglichen Wägefehler hindeutet.

Abbildung 4.27 zeigt exemplarisch den Verlauf der Konzentration an eCG in IU mL⁻¹ und Gesamtprotein in mg mL⁻¹ des zweiten Rezyklierungsversuches. Die Werte bei einem Ablaufvolumen von 0 L entsprechen der eingesetzten Ausgangslösung Ultra-/Diafiltrat (UF/DF). Die aufgezeigten Konzentrationen von eCG in IU mL⁻¹ und Gesamtprotein in mg mL⁻¹ entsprechen der jeweiligen Konzentration einer Sammelprobe, die während des genannten Prozessabschnittes entnommen wurde. Die vergleichsweise niedrige Gesamtproteinkonzentration im Durchfluss (Abschnitt I) beruht auf einer Verdünnung der Ausgangslösung mit Waschpuffer zur vollständigen Entleerung des Vorlagengefäßes (siehe auch Tabelle 4.14). Bereits durch den durchgeführten ersten Waschschrift nach der Separation konnten ungebundenes Fremdprotein aus dem magnetischen Filter ausgewaschen werden. Durch die zuvor erwähnte Rückvermischung von Wasch- und Elutionspuffer im Zuge des ersten Elutionsschrittes und einer daraus resultierenden verminderten Elutionsstärke des Puffers, ist in der ersten Elutionsfraktion ein geringerer eCG- und Gesamtproteingehalt als in der zweiten Elutionsfraktion nachzuweisen.

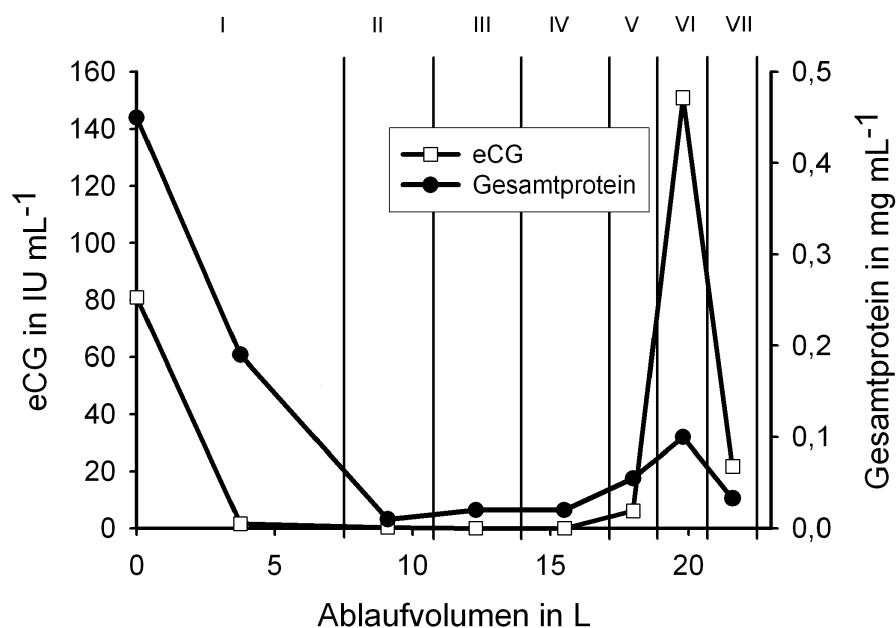


Abbildung 4.27: Verlauf der eCG- und Gesamtproteinkonzentration im Verlauf der verschiedenen Prozessschritte im HGMPF-Prozess am Beispiel des zweiten Rezyklierungsversuches. Die Werte bei einem Ablaufvolumen von 0 L entsprechen der Ausgangslösung (UF/DF). I: Durchfluss, II: Waschpuffer I ein, III: Waschpuffer II ein; IV: Waschpuffer III ein, V: Elutionspuffer I ein; VI: Elutionspuffer II ein, VII: Elutionspuffer III ein

Das in Abbildung 4.28 dargestellte Gel zeigt die Proteinmuster der verschiedenen Abschnitte zur Reinigung von eCG am Beispiel der Proben des zweiten (2) Rezyklierungsversuches. Die eingesetzten Proben wurden zuvor mittels SpeedVac, unter der Berücksichtigung der bereits für die eCG-Analytik vorgenommenen Aufkonzentrierung der Elutionsproben, um den gleichen Faktor eingengt. Zur Quantifizierung wurde von jeder Probe ein äquivalentes Volumen aufgetragen.

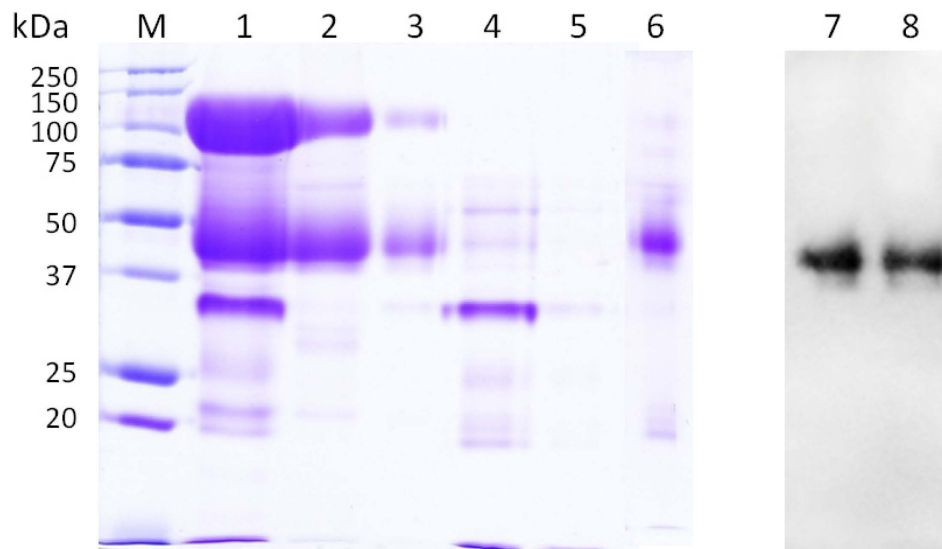


Abbildung 4.28: Reinigung von eCG aus vorgereinigtem Serum (Ultra-/Diafiltrat) unter der Verwendung magnetischer Anionenaustauscher (DEAP-Partikel) am Beispiel des Prozesses der mehrfachen Partikelrezyklierung. Die nach dem HGMF-Lauf erhalten Proben wurden mittels SpeedVac um den gleichen Faktor eingengt, zur Quantifizierung wurde ein äquivalentes Probenvolumen aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über ein 12 %-iges SDS-PAGE mit 5 %-igem Sammelgel, mit anschließender Coomassie-Färbung, bzw. Nachweis von eCG mit entsprechenden Antikörpern (Firma Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland). M: Marker (Firma Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland); 1: Ultra-/Diafiltrat, 2: Durchfluss; 3: Eluat I; 4: Eluat II, 5: Eluat III, 6: kommerzielles eCG (Merck, Darmstadt, Deutschland) [70 IU]; Western Blot: 7: Eluat II; 8: kommerzielles eCG (Merck, Darmstadt, Deutschland) [70 IU]

Das zweite Eluat (Fraktion 4) weist auf der Höhe von ca. 45 sowie 20 kDa Proteinbanden auf. Das Molekulargewicht entspricht dem der β - bzw. α -Untereinheit des Zielproteins eCG. Im ersten Eluat konnte ebenfalls ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 45 kDa nachgewiesen werden. Bei einer Konzentration des Proteins eCG im ersten Eluat von lediglich $6,11 \text{ IU}_{\text{ELISA}} \text{ mL}^{-1}$ (Tabelle 4.14) kann es sich bei dem detektierten Protein jedoch nicht um die β -Untereinheit des eCG handeln. Zudem weist das zweite Eluat (Fraktion 4) eine deutliche Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa auf. Bei diesem Protein bzw. Proteingemisch handelt es sich demnach um die Hauptverunreinigung im Reinigungsprozess von eCG mit Hilfe von

magnetischen Sorbentien mit Anionenaustauscherfunktionalität. Ein folgender tryptischer Verdau der Proteinbande mit anschließender massensepektrometischer Untersuchung führte jedoch zu keiner Spezifizierung (Kapitel 4.11, Abbildung 4.35). Im Western Blot (Abbildung 4.28) konnte mit einem spezifischen Antikörper gegen das Protein eCG (Firma Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland) eine Bande auf Höhe der β -Untereinheit (ca. 40 kDa) sowohl im zweiten Eluat (7) als auch im kommerziellen eCG-Präparat (8) nachgewiesen werden.

4.6.3 Dritter HGMP-Prozesses

Im dritten HGMP-Prozess wurde grob vorgereinigte eCG-Lösung (Ultra-/Diafiltrat) aus insgesamt 10 L Serum eingesetzt. Die Partikelkonzentration betrug $4,5 \text{ g L}^{-1}$. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4.15 dargestellt.

Tabelle 4.15: Zusammenfassung der Daten für die Reinigung von eCG aus Serum unter der Verwendung magnetischer Anionenaustauschersorbentien im dritten HGMP-Prozess

| Schritt | Protein [mg/mL] | eCG [IU _{ELISA} /mL] | Volumen [mL] | Ausbeute [%] | Aufreinigungs- faktor | Konzentrierungs- faktor |
|-----------------------|--------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|----------------------------|
| Serum | 55,2 | 32 | 10000 | 100 | 1 | 1 |
| HPO ₃ ppt | 5,5 | 26,7 | 11100 | 92,8 | 8,4 | 0,8 |
| UF/DF | 0,48 | 93,3 | 2285 | 66,7 | 335 | 2,9 |
| Durchfluss | 0,26 | 23 | 2700 | 19,3 | | |
| Wasch I | 0,01 | 0,58 | 2700 | 0,49 | | |
| Wasch II,III | 0 | 0 | 2700 | - | | |
| Eluat I | 0,01 | 2,85 | 1800 | 1,6 | 442 | 0,1 |
| Eluat II | 0,05 | 77,7 | 1800 | 43,7 | 2679 | 2,43 |
| Eluat III | 0,01 | 0 | 1800 | 0 | - | - |
| Massen- bilanz [%] | 77,4 | 97 | | | | |

Im dritten Versuch an der HGMP-Pilotanlage konnte eine Gesamtausbeute von 45,3 % erreicht werden. Bezogen auf das zweite Eluat (Eluat II in Tabelle) betrug der Aufreinigungsfaktor 2679 bei einer Aufkonzentrierung des Zielproteins eCG um den Faktor 2,43.

Die in der Tabelle angegebenen Massenbilanzen von 77,4 % für Gesamtprotein und 97 % für eCG beziehen sich jeweils auf das eingesetzte Ultra-/Diafiltrat (UF/DF). Die erreichte Beladung der Sorbentien betrug 1,5 mg eCG pro g Partikel, 95,8 % des gebundenen eCG konnte wieder eluiert

werden. Die spezifische Aktivität des zweiten Eluates betrug $136 \text{ IU}_{\text{ELISA}} \text{ mg}^{-1}$. Die niedrige spezifische Aktivität des Endproduktes ist zumindest teilweise auf das im Vergleich zu den Versuchen im Labormaßstab (Tabelle 4.6) und im zweiten HGMF-Prozess (Tabelle 4.14) niedrige Verhältnis der Partikelmenge zu Eluatvolumen zurückzuführen. Eine geringe Partikelkonzentration während des Elutionsschrittes bedingt, dass im Eluat einer niedrigen Produktkonzentration eine unverändert hohe Salzkonzentration des Elutionspuffers gegenüber steht. Dieses ungünstige Verhältnis äußert sich zunächst in geringen eCG-Konzentrationen im Eluat und führt auch nach einer Ultra-/Diafiltration und Lyophilisation zu niedrigen spezifischen Aktivitäten.

Das in Abbildung 4.29 dargestellte Gel zeigt das Proteinmuster der Reinigung von eCG im dritten HGMF-Prozess (Tabelle 4.15) aus grob vorgereinigtem Serum. Die Probenvorbereitung erfolgte analog zu dem vorgehen für die Gelelektrophorese des zweiten HGMF-Versuches. Vergleichbar zu dem in Abbildung 4.28 aufgezeigten Gel, weist das zweite Eluat (Fraktion 4) schwache Proteinbanden auf Höhe von ca. 45 und 20 kDa sowie eine stärkere Bande bei 30 kDa auf.

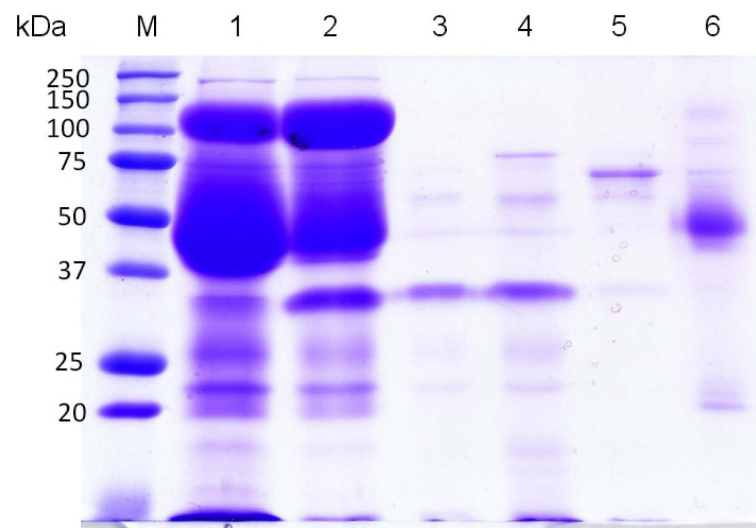


Abbildung 4.29: Reinigung von eCG aus vorgereinigtem Serum (Ultra-/Diafiltrat) unter der Verwendung magnetischer Anionenaustauscher (DEAP-Partikel). Die nach dem HGMF-Lauf erhaltenen Proben wurden mittels SpeedVac um den gleichen Faktor eingengt, zur Quantifizierung wurde ein äquivalentes Probenvolumen aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über ein 12 %-iges SDS-PAGE mit 5 %-igem Sammelgel, mit anschließender Coomassie-Färbung. M: Marker (Firma Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland); 1: Ultra-/Diafiltrat, 2: Durchfluss; 3: Eluat I; 4: Eluat II, 5: Eluat III, 6: kommerzielles eCG (Merck, Darmstadt, Deutschland) [70 IU]

4.6.4 Vierter HGMF-Prozesses

Die Durchführung des vierten HGMF-Prozesses erfolgte nach der Vereinigung und erneuter Ultra-/Diafiltration der Fraktionen des zweiten HGMF-Prozesses (Tabelle 4.14). Die eingesetzte Partikelkonzentration betrug 3 g L^{-1} . Die im Vergleich zu den beiden vorangegangenen HGMF-Prozessen vergleichsweise niedrige Konzentration an magnetischen Sorbentien beruhte auf der maximal zur Verfügung stehenden Menge an 60 g DEAP-funktionalisierter Partikel. Die erreichte Beladung der Sorbentien betrug $1,3 \text{ mg eCG pro g Partikel}$, $93,1 \%$ des gebundenen eCG konnte wieder eluiert werden. Es konnte bezogen auf den eingesetzten Feedstock (UF/DF) im zweiten Eluat ein HGMF-Aufreinigungsfaktor von $37,8$ mit einer HGMF-Aufkonzentrierung des Zielproteins um den Faktor $5,65$ erreicht werden. Die HGMF-Ausbeute an eCG lag bei $66,9 \%$. Das zweite Eluat wurde bis zu einer Leitfähigkeit von 1 mS cm^{-1} dialysiert und lyophilisiert. Unter Annahme der Ausbeute einer vereinfachten Vorreinigung von 70% (Tabelle 4.6) ergibt sich eine theoretische Gesamtausbeute des vierten HGMF-Prozesses von 47% .

Tabelle 4.16: Zusammenfassung der Daten für die Reinigung von eCG aus grob vorgereinigtem Serum mit Hilfe von Anionenaustauschern im vierten HGMF-Prozess

| Schritt | Protein [mg/mL] | eCG [IU _{ELISA} /mL] | Volumen [mL] | HGMF- Ausbeute [%] | HGMF- Aufreinigungs- faktor | HGMF- Konzentrierungs- faktor |
|-----------------------|--------------------|----------------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| UF/DF | 0,26 | 53,5 | 19840 | 100 | 1 | 1 |
| Durchfluss | 0,23 | 14 | 21400 | | | |
| Wasch I | 0,02 | 0,45 | 2700 | | | |
| Wasch II,III | 0,02 | 0 | 2700 | | | |
| Eluat I | 0,01 | 13,4 | 1800 | 2,3 | 5,9 | 0,25 |
| Eluat II | 0,04 | 302 | 1800 | 51,3 | 37,8 | 5,65 |
| Eluat III | 0,01 | 66,5 | 1800 | 11,3 | 29,1 | 1,24 |
| Eluat IV | 0,03 | 11,9 | 1800 | 2 | 2,09 | 0,22 |
| Massen- bilanz [%] | 101,7 | 95,1 | | | | |

Über die Bestimmung des Trockengewichtes konnte eine spezifische Aktivität von $598 \text{ IU}_{\text{ELISA}} \text{ mg}^{-1}$ ermittelt werden. In Anbetracht der eingesetzten hohen Partikelmenge von 60 g und der hierdurch bedingten hohen Partikelkonzentration während der Elution liegen die erreichte Produktkonzentration im Eluat und vor allem die erreichte spezifische Aktivität des Lyophilisates

zunächst unter den Erwartungen. Hauptursache für die unterdurchschnittliche Effizienz des vierten HGMF-Versuches ist vermutlich, dass für die benötigten 60 g funktioneller Magnetpartikel auch Partikelchargen zweiter Wahl in den Partikelpool einbezogen werden mussten. Diese Partikelchargen zeigten bereits in Vorversuchen geringere Bindungsaffinitäten als die in Abbildung 4.16 dargestellten Daten.

Ein zweiter Grund ist eventuell, dass die in Kapitel 4.4.4 für eine Partikelkonzentration von 5 g L⁻¹ bestimmten optimalen Elutionsbedingungen für eine Partikelkonzentration von 55,6 g L⁻¹, wie im vorliegenden Fall während der Elution, nicht mehr gelten. Dennoch ist davon auszugehen, dass durch eine weitere Ausschöpfung der Arbeitskapazität des eingesetzten magnetischen Filters die Ergebnisse noch verbessert werden können. Diese liegt bei mindestens 100 g M-PVA Partikel (Kapitel 4.5.3). Ausgehend von einem Einsatz von 100 g qualitativ hochwertiger M-PVA-DEAP Partikel kann von einer spezifischen Aktivität im Lyophilisat von deutlich über 1000 IU_{ELISA} mg⁻¹ ausgegangen werden, was der gesetzlich geforderten Reinheit entspricht.

Das in Abbildung 4.30 dargestellte Gel zeigt das Proteinmuster der Reinigung von eCG im vierten HGMF-Prozess (Tabelle 4.16).

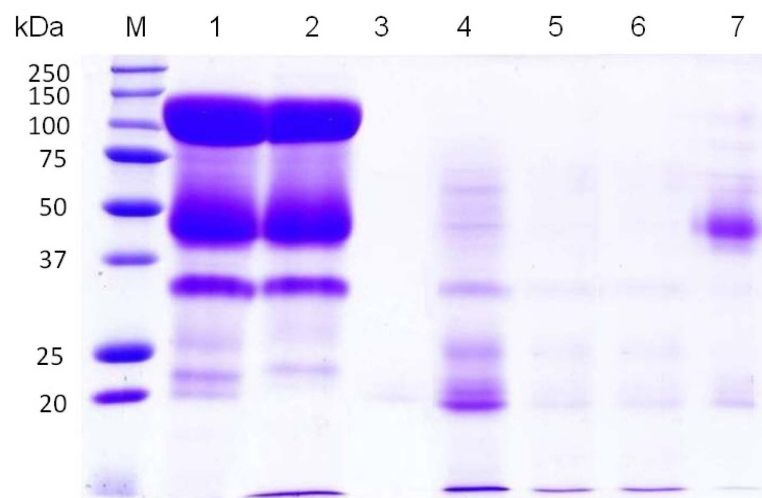


Abbildung 4.30: Reinigung von eCG aus vorgereinigtem Serum (Ultra-/Diafiltrat) unter der Verwendung magnetischer Anionenaustauscher (DEAP-Partikel). Die nach dem HGMF-Lauf erhaltenen Proben wurden mittels SpeedVac um den gleichen Faktor eingengt, zur Quantifizierung wurde ein äquivalentes Probenvolumen aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über ein 12 %-iges SDS-PAGE mit 5 %-igem Sammelgel, mit anschließender Coomassie-Färbung. M: Marker (Firma Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland); 1: Ultra-/Diafiltrat, 2: Durchfluss; 3: Eluat I; 4: Eluat II, 5: Eluat III, Eluat IV; 7: kommerzielles eCG (Merck, Darmstadt, Deutschland) [70 IU]

Vergleichbar zu der in Abbildung 4.28 und 4.29 aufgezeigten Gelen, weist das zweite Eluat (Fraktion 4) wiederum mehrere schwache Proteinbanden unter anderem auf Höhe von ca. 45 und 20 kDa auf.

4.7 Aktivitätsbestimmung *in vivo*

Das Glykoproteinohormon eCG wird häufig in der Reproduktionsmedizin eingesetzt, wobei abhängig von der Gattung unterschiedliche Mengen des Hormons benötigt werden. eCG wird beispielsweise zur Stimulation der Superovulation für den Embryotransfer beim Rind (2000-3000 IU), zur Stimulation des Follikelwachstums bei Sauen nach dem Absetzen der Ferkel (500-750 IU) oder der Vorlegung der Zuchtsaison bei saisonal cyclischen Schafrassen (500-750 IU) verwendet. Aufgrund der langen Eliminationshalbwertszeit des eCG ist in der Regel nur eine Injektion erforderlich [Frey & Löscher, 2009]. Im Rahmen des Verbundprojektes „ProGonado“ wurde eine Reinheit des Präparates von $> 1000 \text{ IU mg}^{-1}$ *in vivo* für eine spätere Applikation gefordert.

Die Erhaltung der biologischen Aktivität im Anschluss an die Reinigung des Proteins eCG mit Hilfe magnetischer Mikrosorbentien im Labormaßstab konnte bereits nachgewiesen werden (Kapitel 4.3). Des Weiteren folgte der Nachweis der biologischen Aktivität des im technischen Maßstab an der HGMF-Pilotanlage gereinigten eCGs. Eingesetzt wurden die in Tabelle 4.17 aufgezeigten Proben des zweiten HGMF-Prozesses (Zyklus 1 und 2). Die Aktivitätsbestimmung *in vivo* erfolgte durch die Firma IDT Biologika GmbH (Dessau-Roßlau, Deutschland).

Tabelle 4.17: Bestimmung der biologischen Aktivität des zweiten Eluates des ersten (1) und zweiten (2) HGMF-Zyklus der vierfachen Partikelzyklisierung (Tabelle 4.14) im Rattenovar-Test (ROT)

| Schritt | Protein [mg/mL] | eCG [IU _{ROT} /mL] | Volumen [mL] | Ausbeute [%] | Aufreinigungs- faktor | Konzentrierungs- faktor |
|--------------|--------------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|----------------------------|
| Serum | 52 | 51,2 | 21450 | 100 | 1 | 1 |
| UF/DF | 0,45 | 105 | 4589 | 44 | 237 | 2,05 |
| Eluat II (1) | 0,13 | 340 | 1800 | 55,8 | 2656 | 6,6 |
| Eluat II (2) | 0,17 | 343 | 1800 | 56,3 | 2049 | 6,7 |

Die durchgeführten Bioassays (ROT) (Tabelle 4.17) bestätigten den Erhalt der biologischen Aktivität des durch magnetische Sorbentien isolierten eCG an der HGMF-Pilotanlage *in vivo*.

Der Verlust der biologischen Aktivität durch die vereinfachte Vorreinigung bis zum Ultra-/Diafiltrat (UF/DF, Tabelle 4.17) lässt sich auf die zwei vollzogenen Präzipitationsschritte zurückführen. Das Protein eCG ist über einen längeren Zeitraum bei einem pH-Wert zwischen 4-8 stabil. Die durchgeführte Präzipitation mit meta-Phosphorsäure (pH 3) kann zu einer Abspaltung der Sialinsäurereste des Proteins führen [González et al., 1998]. Die folgende Ethanol-Fällung beruht auf der Konkurrenz des organischen Lösungsmittels Ethanol mit den Wassermolekülen der Hydrathülle des Proteins, bis hin zu deren Verdrängung. Die Präzipitation von Proteinen mit organischen Lösungsmitteln ist häufig mit einem Verlust der Aktivität verbunden, in dem sie eine partielle Entfaltung der Proteine, durch die Beeinträchtigung der intramolekularen hydrophoben Wechselwirkungen, induzieren [Pingoud & Urbanke, 1997]. Die *in vivo* bestimmte Aktivität von $105 \text{ IU}_{\text{ROT}} \text{ mL}^{-1}$ scheint jedoch aufgrund der geringen Aktivität und der daraus resultierenden Ausbeute von lediglich 44 % im Vergleich zu den resultierenden Ausbeuten in den beiden zweiten Eluaten (II) von ca. 56 % fehlerbehaftet. Hierzu kommt, dass die Eluate I und III noch zusätzliches eCG enthalten, so dass die über ROT bestimmte Gesamtausbeute sicherlich über 60 % liegen würde. Ein weiterer Hinweis auf eine möglicherweise noch höhere biologische Aktivität liefert die Auswertung des ROT. Die *in vivo* bestimmte Aktivität der Eluate lag oberhalb der Wirksamkeit der zugelassenen eCG-Präparate, mit denen die Standardgerade erstellt wurde. In Folge dessen wurde die eCG-Konzentration rechnerisch ermittelt, in dem sie aus dem durchschnittlichen Ovargewicht der Messung und aus dem Ovargewicht des höchsten Standards interpoliert wurde.

Tabelle 4.18: Zusammenfassung der Resultate des ROT (Tabelle 4.17) und ELISA (Tabelle 4.14) des HGMF-Prozesses der mehrfachen Partikelrezyklierung

| Schritt | Ausbeute [% _{ROT}] | Ausbeute [% _{ELISA}] |
|--------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Serum | 100 | 100 |
| Eluat II (1) | 55,8 | 38,2 |
| Eluat II (2) | 56,3 | 39,1 |

Insgesamt konnte im Bioassay im Vergleich zum durchgeführten ELISA-Assay eine 30 % höhere Aktivität bezüglich des durch HGMF gewonnenen Eluates detektiert werden (Tabelle 4.18). Bezogen auf die Ergebnisse des Rattenovar-Tests konnte eine spezifische Aktivität von $600 \text{ IU}_{\text{ROT}} \text{ mg}^{-1}$ (Eluat II (1)) bzw. $1273 \text{ IU}_{\text{ROT}} \text{ mg}^{-1}$ (Eluat II (2)) ermittelt werden. Die vergleichsweise geringe spezifische Aktivität des Eluat II (1) ist möglicherweise auf einen Fehler in der gravimetrischen Bestimmung zurückzuführen (s. auch Kapitel 4.6).

Im zweiten Zyklus des vierfachen HGMF-Versuches konnte somit die geforderte Reinheit des eCG von $> 1000 \text{ IU mg}^{-1}$ im Bioassay erreicht werden. Die bisherigen Ergebnisse beziehen sich jeweils nur auf das zweite Eluat des jeweiligen HGMF-Prozesses. Eine Steigerung der Ausbeute kann weiterhin durch die Vereinigung der drei resultierenden Eluate des jeweiligen HGMF-Prozesses erzielt werden, jedoch hätte dies einen Rückgang der spezifischen Aktivität zur Folge. Des Weiteren konnte im Rahmen der vierfachen Partikelrezyklierung eine Steigerung der Ausbeute sowie des Aufreinigungsfaktors von Zyklus zu Zyklus nachgewiesen werden, was mit einem Anstieg der biologischen Aktivität korreliert (Tabelle 4.14). Eine Bedingung für die industrielle Umsetzung des entwickelten HGMF-Prozesses zu Reinigung von eCG ist, neben der vielfachen Wiederverwendbarkeit der Partikel (s. Kapitel 4.4.8), ein Produkt mit einer Reinheit von $> 1000 \text{ IU mg}^{-1}$ *in vivo*. Es konnte gezeigt werden, dass das durchgeführte Verfahren beide Bedingungen erfüllt.

4.8 Bestimmung des Partikelverlustes im HGMF-Prozess

Neben den bereits genannten Bedingungen wie Wiederverwendbarkeit der Partikel (Kapitel 4.4.8) und der Erfüllung der für die Reproduktionsmedizin und im Rahmen des Verbundprojektes geforderten Reinheit des Protein eCG (s. Kapitel 4.7), ist die Minimierung des Verlustes an Partikeln im Rahmen eines HGMF-Prozesses eine weitere Bedingung eines wirtschaftlichen Prozesses.

Die Arbeitskapazität des magnetischen Filters wurde bereits in Kapitel 4.5.3 bestimmt. Bei dem Einsatz von 100 g M-PVAc Partikel konnte lediglich ein Verlust von 0,3 % Partikel im Ablauf detektiert werden. Dahingegen konnten im Rahmen der ersten drei HGMF-Prozesse unter dem Einsatz von je nur 20 g Partikel (Kapitel 4.6) keine Partikelverluste nachgewiesen werden. Im vierten HGMF-Prozess unter der Verwendung von 60 g Partikel (Kapitel 4.6) konnte optisch eine geringfügige Partikelmenge im Ablauf des Separators nachgewiesen werden, die Menge wurde jedoch nicht bestimmt.

Im Fall eines industriellen HGMF-Verfahrens resultiert ein Partikelverlust jedoch nicht nur durch einen Austrag von Partikeln über die Durchfluss- und die Waschfraktionen, sondern auch durch ein unvollständiges Ausspülen von Partikeln im Zuge der Partikelrezyklierung am Ende des Prozesses. Im Separator verbliebene Partikel würden im Zuge anschließender Reinigungsschritte in der Regel verloren gehen. Der Verbleib an Partikeln im Anschluss an den HGMF-Prozess wurde durch Differenzbildung der eingesetzten Partikelmenge und der Partikelmenge nach Ausschleusen der Partikel aus dem Separator, auf 1,3-1,8 % bestimmt. Durch Reinigung des Separators sowie der Filterronden und der Rückführung der an den Elementen haftenden Partikel

(Abbildung 4.31), konnten jedoch lediglich ca. 0,05 % der eingesetzten Partikel wiedergefunden werden.



Abbildung 4.31: Deckel der Filterkammer und Filterrunden nach Ausspülen der Partikel aus dem Separator

Die geringe Wiederfindungsrate an Partikeln nach Reinigung der Filterelemente lässt darauf schließen, dass der über Differenzbildung gravimetrisch bestimmte Verlust an Partikel fehlerbehaftet ist. In früheren Arbeiten wurde im Rahmen eines HGMP-Prozesses an der ebenfalls mit dem Rotor-/Statorsystem arbeitenden HGMP-Laboranlage ein Partikelverbleib von ca. 0,2 % bestimmt. Der Verbleib an Partikeln im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten HGMP-Prozesse liegt schätzungsweise in der gleichen Größenordnung.

Bei der zur Reinigung von eCG eingesetzten HGMP-Pilotanlage handelt es sich um einen im Rahmen des Verbundprojektes „ProGonado“ entwickelten Prototypen. Im Zuge der durchgeführten Versuchsreihen wurden Optimierungsmöglichkeiten für die HGMP-Anlage erarbeitet. Bisher werden das obere und untere Gewinde der Filterkammer nicht durch eine Dichtung vom Medium im Inneren des Separators getrennt, wodurch sich Partikel im Gewinde ablagern können. Die Verwendung spaltfreier PTFE-Dichtungen vor den Schraubgewinden der Separatorhülse, sollte eine Reduktion des Partikelverlustes gewährleisten. Des Weiteren sollte in nachfolgenden Modellen eine Rotor-/Stator-Konstruktion über ein fixes Rotorelement und zwei links und rechts einpassbare Statorn mit stapelförmigem Aufbau von Halbkreiselementen realisiert werden, was zu einer optimierten Reinigung der Filterelemente führt.

4.9 Effizienz des HGMP-Prozesses zur Reinigung von eCG

Die in den vorangegangenen Kapiteln vorgestellte vereinfachte Reinigung von eCG durch die Verwendung magnetischer Mikrosorbentien im HGMP-Prozess (Kapitel 4.6) führt zu einer

Reduktion des Bedarfs an Ethanol um zwei Drittel, ebenso verkürzt sich die Prozessdauer durch die Einsparung der zweiten Ethanol-Fällung um 20 Stunden. Des Weiteren wurde eine Reduktion von 5 Prozessschritten im Vergleich zur konventionellen Reinigung nach *Gospodarowicz & Papkoff* [1967] erreicht (Tabelle 4.19).

Die für die aufgeführte Reinigung von eCG verwendeten Seren besaßen eine Wertigkeit von 100-140 IU_{ROT} mL⁻¹ im Falle von *Gospodarowicz & Papkoff* [1967] und 200 ME mL⁻¹ im Falle dieser Arbeit, was etwa 53 IU_{ROT} mL⁻¹ entspricht (3,8 ME mL⁻¹ = 1 IU_{ROT} mL⁻¹). Seren mit einer Wertigkeit von 400 ME mL⁻¹ (105 IU_{ROT} mL⁻¹) können jedoch nur in kurzen Stadien der Trächtigkeit des Tieres gewonnen werden. Durchschnittlich beträgt die Wertigkeit des Serums 200 ME mL⁻¹. Es konnte gezeigt werden, dass die durchgeführte vereinfachte Reinigung von eCG unter Verwendung magnetischer Mikrosorbentien sich ebenfalls für die Reinigung von eCG aus Seren mit geringem Gehalt des Zielproteins eignet.

Tabelle 4.19: Gegenüberstellung der einzelnen Prozessschritte und deren resultierende spezifische Aktivität im konventionellen und vereinfachten Reinigungsverfahren des Proteins eCG

| konventionelle Reinigung [Gospodarowicz & Papkoff, 1967] | | vereinfachte Reinigung | |
|---|---|------------------------------------|---|
| Schritt | spezifische Aktivität [IU _{ROT} /mg] | Schritt | spezifische Aktivität [IU _{ROT} /mg] |
| 1 | Meta-Phosphorsäure Fällung | Meta-Phosphorsäure Fällung | |
| 2 | EtOH-Fällung (50 % v/v) | EtOH-Fällung (50 % v/v) | |
| 3 | EtOH-Fällung (75 % v/v) 530-825 | Ultra-/Diafiltration | 250-280 |
| 4 | Dialyse | IEX-Sorbentien (HGMPF- Prozess) | 600-1300 |
| 5 | Lyophilisierung 600 | | |
| 6 | Gelfiltration 2400-3750 | | |
| 7 | IEX-Chromatographie 200 | | |
| 8 | IEX-Chromatographie 560 | | |
| 9 | IEX-Chromatographie 13800-17700 | | |

Die Fraktion nach der Gelfiltration zeigt im Vergleich zu den weiteren ermittelten spezifischen Aktivitäten mit 2400-3750 IU_{ROT} mg⁻¹ eine sehr hohe spezifische Aktivität. *Gospodarowicz &*

Papkoff [1967] stellten bereits im Anschluss an die Gelfiltration fest, dass die ermittelte Retentionszeit auf ein höheres wie das für das Protein eCG ermittelte Molekulargewicht hinweist und begründeten dies mit der Aggregation des eCG bzw. der Komplexbildung mit anderen vorliegenden Serumproteinen.

Das Lyophilisat im Anschluss an die Dialyse der konventionellen Fällung führt aufgrund der durchgeführten zweiten Ethanol-Fällung zu einem Produkt mit ca. der doppelten spezifischen Aktivität im Vergleich zu dem erhaltenen Ultra-/Diafiltrat der vereinfachten Reinigung (Tabelle 4.19). Im Anschluss an die Reinigung des Proteins eCG im HGMP-Prozess liegt eCG mit einer spezifischen Aktivität von 600-1300 IU_{ROT} mL⁻¹ vor. Eine spezifische Aktivität > 600 IU_{ROT} mL⁻¹ wurde im konventionellen Prozess erst nach drei IEX-Chromatographieschritten (Schritt 9) erreicht. Die Option eines höherwertigen Produktes durch den mehrfachen Einsatz von IEX-Sorbentien im HGMP-Prozess wurde nicht untersucht, da das Eluat des HGMP-Prozesses bereits die gesetzlich geforderte Reinheit erreicht.

Bei der Versuchsdurchführung im Labormaßstab konnten höhere spezifische Aktivitäten (1735 - 2166 IU_{ELISA} mg⁻¹, Kapitel 4.4.3), als im Technikumsmaßstab ermittelt werden (bis zu 1000 IU_{ELISA} mg⁻¹, Kapitel 4.6). Eine mögliche Ursache hierfür ist der Umstand, dass im Labormaßstab die Separation der Partikel mit Hilfe eines Handmagneten erfolgte, was eine nahezu vollständige Abtrennung des Überstandes gewährleistet. Im Technikumsmaßstab erfolgt die Partikelabtrennung dagegen in einem ständig mit Flüssigkeit gefüllten Magnetfilter, wodurch es bei Pufferwechseln zu einer Rückvermischung und geringeren Waschleistungen kommt. Obwohl die im Labormaßstab erhaltenen Eluate nicht im Rattenovartest getestet wurden, lässt sich vermuten, dass durch eine weitere Optimierung des HGMP-Magnetfilters eine Steigerung der spezifischen Aktivität an eCG im Produkt erreicht werden kann.

Eine weitere Erklärung für die abweichenden spezifischen Aktivitäten bietet die unterschiedliche Partikelkonzentration während des Elutionsschrittes (Abbildung 4.32) im Labormaßstab (Kapitel 4.4.3) und den durchgeführten HGMP-Versuchen (Kapitel 4.6). Bei einem Vergleich der im Verlauf der Elution resultierenden Partikelkonzentrationen des Laborversuches sowie des zweiten und dritten HGMP-Prozesses lässt sich eine Korrelation zwischen der Partikelkonzentration während der Elution und der resultierenden spezifischen Aktivität des Lyophilisates in IU_{ELISA} mg⁻¹ feststellen. Eine Ausnahme stellt der vierte HGMP-Prozess dar. Hier konnten bei einer eingesetzten Menge von insgesamt 60 g Partikeln und einer daraus resultierenden Partikelkonzentration von 55,6 g L⁻¹ während des Elutionsschrittes lediglich eine spezifische Aktivität von 598 IU_{ELISA} mg⁻¹ bestimmt werden. Zu den Ursachen der unerwartet niedrigen spezifischen Aktivität des Produktes des vierten HGMP-Prozesses zählt die Hinzunahme von

Partikeln zweiter Wahl zum Erreichen einer Partikelmenge von 60 g. Desweiteren weichen die optimalen Elutionsbedingungen für eine Partikelkonzentration von $55,6 \text{ g L}^{-1}$ möglicherweise von den in Vorversuchen bei einer Partikelkonzentration von 5 g L^{-1} ermittelten Werten ab. Bei einem Einsatz von 100 g hochwertiger M-PVA-DEAP Partikel im Separator und einem Elutionsvolumen von 1800 mL lässt sich jedoch eine hohe Produktkonzentration im Eluat sowie eine spezifische Produktaktivität von mehr als $1000 \text{ IU}_{\text{ELISA}} \text{ mg}^{-1}$ vorhersagen.

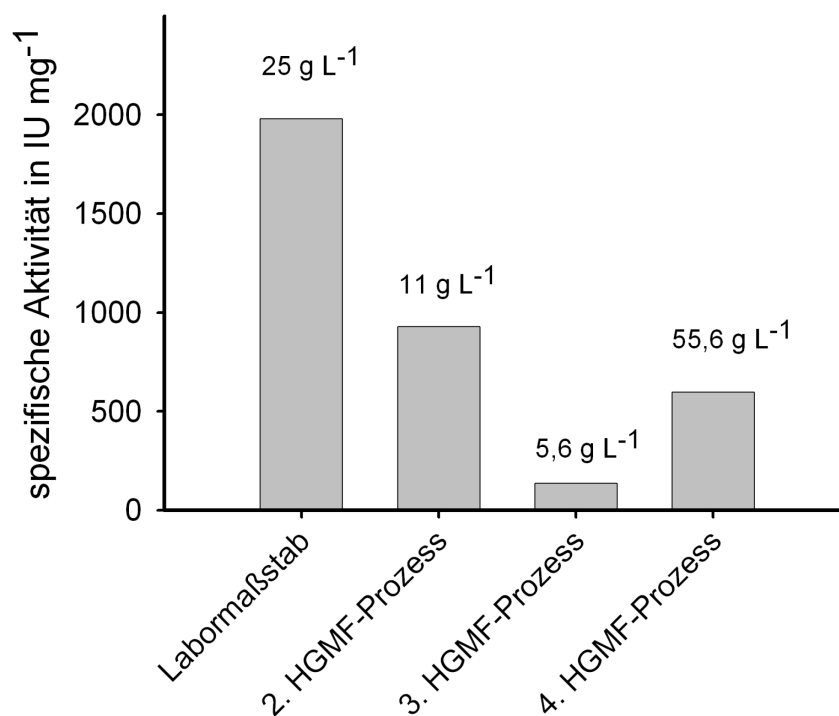


Abbildung 4.32: Zusammenhang zwischen der resultierenden spezifischen Produktaktivität und der während des Elutionsschrittes vorliegenden Partikelkonzentration für Versuche im Laborbormaßstab sowie im zweiten, dritten und vierten HGMF-Prozess

Die bereits unter 2.7.3 vorgestellte Alternative zur Reinigung von eCG nach *González et al.* (1998) liefert im Anschluss an eine Fällung des Plasmas mit Essigsäure (pH 4) und einer Ultra-/Diafiltration mit zwei anschließenden chromatographischen Reinigungsschritten eCG mit einer spezifischen Aktivität von $3700 \text{ IU}_{\text{ROT}} \text{ mg}^{-1}$. Das vorgereinigte eCG nach Fällung des Serums mit Essigsäure und anschließender Ultra-/Diafiltration eignet sich aufgrund des zu hohen Proteingehaltes nach lediglich einer Präzipitation jedoch nicht zur weiteren Reinigung an magnetischen Anionenaustauschersorbentien (Einzeldaten nicht gezeigt).

4.10 Weitere Vorteile der vereinfachten eCG-Vorreinigung

In Kapitel 4.1.1 wurden bereits die Resultate der Chromatographie von konventionell vorgereinigtem eCG vorgestellt. Zur weiteren Verdeutlichung der effizienteren Reinigung des Zielproteins eCG nach vereinfachter Vorreinigung (Kapitel 3.5.1.2) wird im Folgenden die chromatographische Reinigung von eCG nach einer entsprechenden Vorbehandlung dargestellt. In Voruntersuchungen (Kapitel 4.1.1 und 4.3) unter dem Einsatz von eCG nach konventioneller grober Vorreinigung des eCG (Kapitel 3.5.1.1), konnte bereits gezeigt werden, dass der Einsatz der magnetischen Sorbentien (Kapitel 4.3) im Vergleich zur konventionellen Chromatographie an Q FF-Material (Kapitel 4.1.1) zu einer Steigerung der Ausbeute um 17 % sowie zu einer 10-fachen Steigerung des Aufreinigungsfaktors führte.

Zur Untersuchung, inwieweit die vereinfachte Vorreinigung auch im Falle einer „klassischen“ weitergehenden Reinigung mittels Säulenchromatographie Vorteile erbringt, wurde zunächst ein Säulenscreening im 1 mL Maßstab durchgeführt. Tabelle 7.8 im Anhang zeigt die Ergebnisse eines, mit nach Kapitel 3.5.1.2 vorgereinigtem eCG, durchgeführte Säulenscreening. Bei der Testreihe zeigte sich, dass im Fall von vereinfacht vorgereinigtem eCG sich das Säulenmaterial Q FF als am besten erweist. Die erreichte Ausbeute des Chromatographieschrittes lag bei ca. 70 % bei einem auf das Ausgangsserum bezogenen Aufreinigungsfaktor von 840. In der Folge wurde die säulenchromatographische Reinigung mit Q FF Material von 1 mL auf ein Säulenvolumen von 20 mL skaliert.

Aufgrund der vorgenommenen Filtration und dem daraus resultierenden Stufenverlust von 12 %, vor der Injektion der Probe auf die Säule lag die absolute Beladung dieses Versuches bei 8800 IU_{ELISA}. Das Elutionsdiagramm an Q FF (Abbildung 4.33) des Proteins eCG nach vereinfachter Vorreinigung zeigt den Elutionspeak von eCG bei 61,3 min, was einer korrigierten Retentionszeit von 37 min entspricht sowie einen weiteren Elutionspeak bei 74,1 min. Die Höhe des eCG-Elutionspeaks betrug 657 mAU.

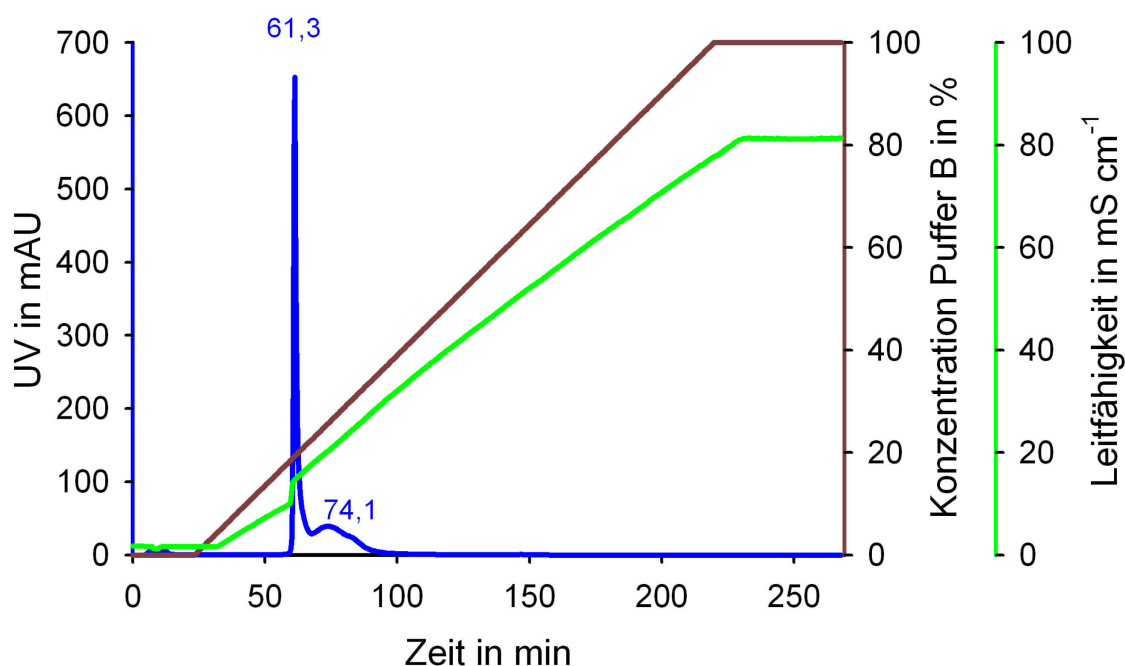


Abbildung 4.33: Elutionsdiagramm an Q FF des Proteins eCG bei einer absoluten Beladung von 8800 IU_{ELISA}. Linearer Gradient: 0-1 M NaCl über 20 Säulenvolumen; Fluss: 2 mL min⁻¹. Äquilibrations- und Probenaufnahmepuffer: 0,02 M Ammoniumacetat, pH 4,5; Elutionspuffer (Puffer B): 0,02 M Ammoniumacetat, 1M NaCl, pH 4,5. UV Detektion bei 280 nm

Tabelle 4.20: Zusammenfassung der Reinigung von eCG an konventionellen Chromatographiematerialien (Q FF) und magnetischen Sorbentien (DEAP) nach vereinfachter Vorreinigung (Kapitel 3.5.1.2)

| Reinigungs-schritt | Protein [mg/mL] | eCG [IU _{ELISA} /mL] | Volumen [mL] | Ausbeute [%] | Aufreinigungs-faktor | Konzentrierungs-faktor |
|----------------------|-----------------|-------------------------------|--------------|--------------|----------------------|------------------------|
| Serum | 64 | 43,8 | 303 | 100 | 1 | 1 |
| HPO ₃ ppt | 7,24 | 31,2 | 363 | 85,4 | 6,29 | 0,71 |
| UF/DF | 0,49 | 186 | 53 | 74,5 | 556 | 4,25 |
| Filtrat | 0,46 | 186 | 46,6 | 65,5 | 592 | 4,25 |
| Eluat (Q FF) | 0,29±0,09 | 247±56,6 | 25±5 | 45,2±1,1 | 1286±198 | 5,64±1,3 |
| Serum | 66±6,1 | 49±8,6 | 378 | 100 | 1 | 1 |
| HPO ₃ ppt | 8,5±2,1 | 41±14 | 441 | 90±9,7 | 6,4 | 0,8±0,2 |
| UF/DF | 0,8±0,5 | 184±14 | 77 | 71±9,6 | 310±200 | 3,7±0,8 |
| Sorptions-überstand | 0,33±0,02 | 8±5,4 | 77 | | | |
| Eluat I (DEAP) | 0,6±0,08 | 774±46 | 15 | 58±9,2 | 1738±138 | 16±0,9 |
| Eluat II (DEAP) | 0,17±0,007 | 120±11 | 15 | 9±0,84 | 924±49 | 2,5±0,23 |

Tabelle 4.20 zeigt eine Gegenüberstellung der Ergebnisse der weiterführenden eCG-Reinigung unter Einsatz magnetischer Mikrosorbentien (Kapitel 4.4.3, Tabelle 4.6) bzw. einer Säulenchromatographie. Bei einem, bezogen auf Volumen und Wertigkeit des Serums, vergleichbaren Versuchsansatz konnte mittels der magnetischen Sorbentien (5 g L^{-1}) im Vergleich zum Q FF-Material eine 22 % höhere Ausbeute erzielt werden. Der Aufreinigungsfaktor konnte, bezogen auf das zweite Eluat, um den Faktor 1,4, der Konzentrierungsfaktor um den Faktor 2,8 erhöht werden. Im Fall des Q FF-Materials betrug die erreichte spezifische Aktivität des eCG $581 \text{ IU}_{\text{ELISA}} \text{ mg}^{-1}$ ($\pm 93,5$). Die ermittelte Standardabweichung bezieht sich im Fall des Q FF-Materials auf eine Dreifachbestimmung. Die Reinigung des Proteins eCG an magnetischen Anionenaustauschersorbentien (Doppelansatz) führte zu einem Produkt mit einer spezifischen Aktivität von $1951 \text{ IU}_{\text{ELISA}} \text{ mg}^{-1}$ (± 305). Die resultierende geringere spezifische Aktivität im Fall des verwendeten Q FF Materials trotz des, im Gegensatz zu den magnetischen Mikrosorbentien, Vorhandenseins mehrerer Trennstufen, beruht möglicherweise auf einem Überangebot freier Bindestellen, welche neben dem Zielprotein eCG zusätzlich von Fremdproteinen besetzt und mit dem eCG eluiert werden.

Neben dieser höheren spezifischen Aktivität des eCG im Anschluss an die Reinigung mit Hilfe magnetischer Mikrosorbentien, ist ein weiterer Vorteil dieses Prozesses die Verkürzung der Prozessdauer. Die gesamte Zeitdauer der Reinigungsschritte eines HGMPF-Prozesses beträgt ohne die anfängliche Suspensionsaufgabe nur ca. 70 min (Tabelle 4.12). Für die Aufgabe der Suspension kommt noch eine Minute pro Liter hinzu, so dass sich für 50 L Ausgangslösung insgesamt eine Prozesszeit von zwei Stunden ergibt. Die Zeit zur Reinigung von 50 L Lösung an einer Chromatographiesäule von z.B. 50 mL Säulenvolumen beträgt dabei ein Vielfaches.

4.11 Analyse des Reinigungsprozesses mittels MALDI-ToF-MS

Zur Identifizierung der Proteine im zweiten Eluat des HGMPF-Prozesses wurde ein tryptischer in-Gel Verdau mit anschließender Massenspektrometrie durchgeführt (Kapitel 3.4.6). Des Weiteren wurden Serumproteine, im Überstand verbleibende Proteine nach der durchgeführten Säurefällung sowie Proteine im Ultra-/Diafiltrat nach grober Vorreinigung des Serums mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert.

Die gewählte Methode für die Identifizierung wird als Peptidmassen-Fingerabdruck (peptide mass fingerprint, PMF) bezeichnet [Pappin et al., 1993] die Vorgehensweise ist Kapitel 3.4.6 zu entnehmen. Für die Identifizierung der Proteine wurde die Suchmaschine Mascot verwendet. Unter Angabe zuvor definierter Bedingungen wie z.B. der Taxonomie, der Massentoleranz und des Spaltenzyms werden die in der Datenbank enthaltenen Proteine *in silico* verdaut. Die

verwendete Suchmaschine errechnet im Anschluss aus der Anzahl der Übereinstimmungen zwischen den gemessenen und errechneten Peptidmassen eine Wahrscheinlichkeit für die statistische Signifikanz des identifizierten Proteins, den sogenannten Score. Bei einem Score > 71 handelt es sich um ein signifikantes Ergebnis. Trotz guter Massengenauigkeit von ca. 50 bzw. 100 ppm durch interne, bzw. externe Kalibrierung [Chamrad, 2004], gibt es aufgrund der Größe der Datenbank und der damit verbundenen großen Menge an generierten Peptiden immer mehrerer Proteine, denen eine bestimmte Peptidmasse zugeordnet werden kann. Posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierung, schränken die Wahrscheinlichkeit einer Identifizierung zusätzlich ein, da durch die Einbeziehung eventueller Modifikationen die Wahrscheinlichkeit an Zufallstreffern zunimmt.

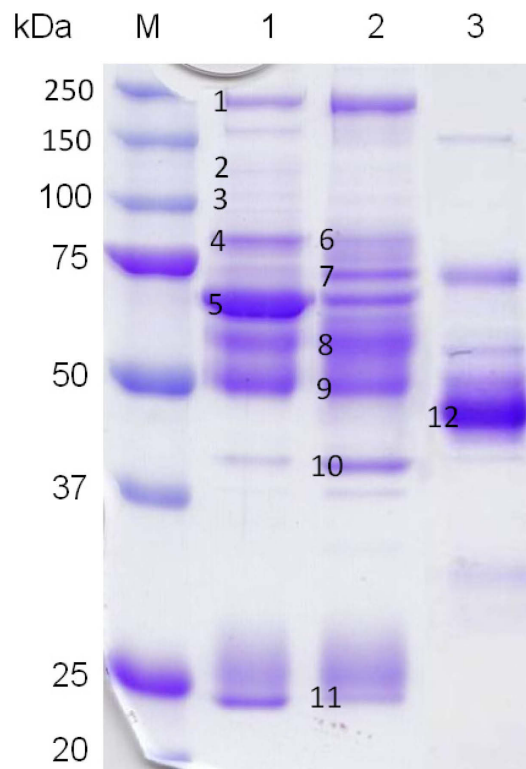


Abbildung 4.34: SDS-Gelelektrophorese zur Identifizierung der Proteine in Serum und den Reinigungsschritten der groben Vorreinigung von eCG. Auftragung von je 10 μg Gesamtprotein. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über ein 12 %-iges SDS-PAGE mit 5 %-igem Sammelgel, mit anschließender Coomassie-Färbung. M: Marker (Firma Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland); 1: Serum; 2: Überstand nach meta-Phosphorsäure Präzipitation; 3: Ultra-/Diafiltrat

Das in Abbildung 4.34 dargestellte Gel zeigt das Proteinmuster verschiedener Abschnitte zur Reinigung von eCG aus Serum (Fraktion 1), im Anschluss an die Fällung mit meta-Phosphorsäure (Fraktion 2), die Ethanol-Fällung und die anschließende Ultra-/Diafiltration (Fraktion 3). Die gekennzeichneten Banden konnten mit Hilfe der verwendeten Datenbank massenspektrometrisch

identifiziert werden. Insgesamt wurden 13 verschiedene Proteine der Spezies *Equus caballus* (Pferd) identifiziert.

Tabelle 4.21 zeigt die korrespondierenden Proteinidentifikationen der Spezies *Equus caballus* unter der jeweiligen Nummer. Ein Vergleich des theoretischen Molekulargewichtes (Tabelle 4.21) und des tatsächlichen Molekulargewichtes (Abbildung 4.34) zeigt in einigen Fällen eine starke Abweichung. Bei den meisten Serumproteinen handelt es sich um Glykoproteine. Bei dem in der Datenbank theoretisch verdauten Protein werden dessen Glykan-Reste nicht berücksichtigt, was die Massendifferenz verursacht. Die Glykoproteine alpha-2-Makroglobulin, Ceruloplasmin und der Komplementfaktor B besitzen beispielsweise ein Molekulargewicht von 725 kDa [Svensson et al., 1995], 115 kDa [Medda et al., 1987], bzw. 100 kDa [Andoh et al., 1997].

Tabelle 4.21: Signifikant identifizierte Proteine aus *Equus caballus* nach grober Reinigung des eCG

| Proteinbande | Identifiziertes Protein | Theoretisches Molekulargewicht* [kDa] | Theoretischer pI-Wert* | Score |
|--------------|--------------------------------------|---------------------------------------|------------------------|-------|
| 1 | Alpha-2-Makroglobulin | 163,9 | 6,24 | 106 |
| 2 | Ceruloplasmin | 122,8 | 5,36 | 83 |
| 3 | Komplementfaktor B | 87,3 | 6,75 | 77 |
| 4 | Transferrin | 80,2 | 5,15 | 206 |
| 5 | Serumalbumin | 70,4 | 5,95 | 111 |
| 6 | Immunoglobulin μ (heavy chain) | 50 | 5,52 | 106 |
| 7 | Histidin-reiches Glykoprotein (HRG) | 43,5 | 7,1 | 102 |
| 8 | Immunoglobulin gamma 5 (heavy chain) | 36,4 | 5,95 | 68 |
| 9 | Immunoglobulin gamma 4 (heavy chain) | 36,2 | 7,71 | 93 |
| 10 | Haptoglobin | 38,9 | 5,59 | 124 |
| 11 | Apolipoprotein A-I | 30,3 | 5,66 | 60 |
| 12 | saures alpha 1-Glykoprotein | 23,4 | 5,07 | 122 |

*: ohne Glykan-Anteil

Abbildung 4.35 zeigt das SDS-Gel nach Auftragen der gewonnenen Eluate des zweiten Zyklus (2) des zweiten HGMPF-Prozesses der vielfachen Partikelrekyclingung (Tabelle 4.14).

Fraktion vier zeigt ein kommerzielles eCG-Präparat der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland). Insgesamt konnten 6 verschiedene Proteine der Spezies *Equus caballus* identifiziert werden.

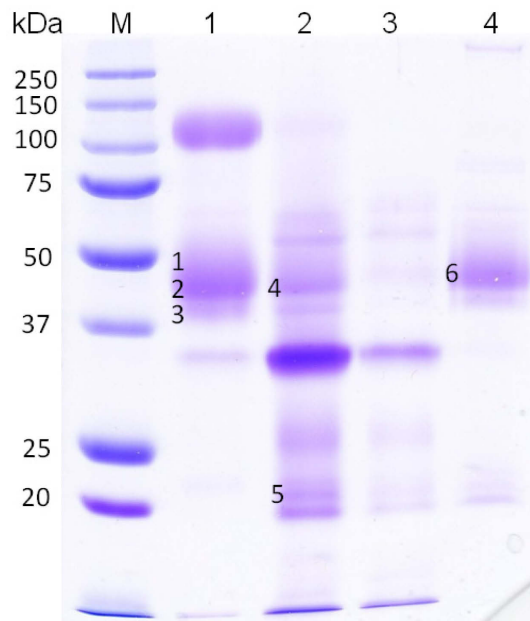


Abbildung 4.35: Gelelektrophorese zur Identifizierung der Proteine in den Eluaten nach Reinigung von eCG an Anionenaustauschern. Es wurde je ein äquivalentes Volumen von 7,5 µl aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über ein 12 %-iges SDS-PAGE mit 5 %-igem Sammelgel, mit anschließender Coomassie-Färbung. Die aufgetragenen Eluate stammen aus dem zweiten HGMPF-Prozesse der vielfachen Partikelrekyclingung, zweiter Zyklus (2) (Tabelle 4.14). M: Marker (Firma Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland); 1: Eluat I; 2: Eluat II; 3: Eluat III; 4: kommerzielles eCG (Merck, Darmstadt, Deutschland) [70 IU]

Tabelle 4.22 zeigt die korrespondierenden Proteinidentifikationen der Spezies *Equus caballus* unter der jeweiligen Nummer.

Bei dem identifizierten Protein saures alpha 1-Glykoprotein (AGP), welches auch unter der Bezeichnung Orosomuroid bekannt ist (Tabelle 4.22), handelt es sich um ein Protein mit einem Glykan-Anteil von 45 % [Fournier et al., 2000] bzw. 31,4 % [Taira et al., 1992] und einem isoelektrischen Punkt (pI) von 2,8-3,8 [Fournier et al., 2000; Taira et al., 1992]. Aufgrund des hohen Glykan-Anteiles, der bei der durch die Datenbank angegebenen Masse nicht berücksichtigt wird, besitzt das Protein ein Molekulargewicht von 41-43 kDa [Fournier et al., 2000]. Eine mögliche Reinigung des AGP ist aufgrund des niedrigen pI-Wertes des Proteins durch das vorgenommene Reinigung von eCG aus Serum (Säurefällung des Proteins bis zu einem pH von 3,0, weitere Reinigung über Anionenaustauscher) möglich. Durch die Identifizierung des AGP

nach der groben Reinigung des Serums durch Säure- und Lösungsmittelfällung im darauf folgenden Ultra-/Diafiltrat (Tabelle 4.21) konnte dies bestätigt werden. Die biologische Funktion des sauren AGP ist noch nicht vollständig geklärt, im Zusammenhang mit bestimmten Erkrankungen kann jedoch ein erhöhter Serumgehalt an AGP nachgewiesen werden [Tamura et al., 1989]. Bei adulten Pferden beträgt die Konzentration an AGP $99,2 \pm 26,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ [Taira et al., 1992], im Vergleich von einer eCG Konzentration im Blut trächtiger Stuten von $5\text{-}10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Bei trächtigen Stuten konnte eine Abnahme der AGP-Konzentration in den letzten 2-3 Monaten der Trächtigkeit nachgewiesen werden. Die Reinigung des AGP aus Serum erfolgt beispielsweise über eine Ammoniumsulfat-Fällung mit anschließender Anionen- und Kationenaustauschchromatographie sowie Gelfiltration [Taira et al., 1992].

Tabelle 4.22: Signifikant identifizierte Proteine aus *Equus caballus* im Eluat im, Anschluss an den HGMF-Prozess

| Proteinbande | Identifiziertes Protein | Theoretisches Molekulargewicht* [kDa] | Theoretischer pI-Wert* | Score |
|--------------|-----------------------------|---------------------------------------|------------------------|-------|
| 1 | saures alpha 1-Glykoprotein | 23,4 | 5,07 | 85 |
| 2 | saures alpha 1-Glykoprotein | 23,4 | 5,07 | 106 |
| 3 | saures alpha 1-Glykoprotein | 23,4 | 5,07 | 84 |
| 4 | Haptoglobin | 38,3 | 5,59 | 114 |
| 5 | Lipokalin 2 (oncogene 24p3) | 33,4 | 5,06 | 116 |
| 6 | saures alpha 1-Glykoprotein | 23,4 | 5,07 | 119 |

*: ohne Glykan-Anteil

Das Zielprotein eCG konnte weder im Eluat nach dem HGMF-Prozess, noch im kommerziellen eCG-Präparat mit Hilfe von MALDI-ToF-MS nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache dafür könnte in der hohen Glykosylierung zu suchen sein. Die angewandte MALDI Fingerprint Methode ist nicht zur Identifizierung von Glykoproteinen geeignet, da die tryptischen Peptide von Glykoproteinen schlecht ionisierbar sind. Die Folge sind Signale mit geringer Intensität oder fehlende Signale [Lochnit & Geyer, 2004]. Zudem verändern die Zuckerreste die Masse der tryptischen Peptide. Diese beiden Effekte erschweren bzw. verhindern eine Zuordnung der bestimmten Massen mit dem *in silico* durchgeführten tryptischen Verdau und der daraus bestimmten Massen [Küster et al., 1998].

Zur Identifikation des Proteins eCG wurde ein Vergleich der Peptidspektren der tryptisch verdauten Proteine in einem Bereich von 20 bzw. 40 kDa, was dem Molekulargewicht der α - bzw. β - Untereinheit des eCG entspricht [Christakos & Bahl, 1979], vorgenommen.

Die Abbildungen 4.37 und 4.38 zeigen das Massenspektrum der in Abbildung 4.36 mit einem Stern gekennzeichneten Proteinbanden auf der Höhe von ca. 20 kDa und 40 kDa.

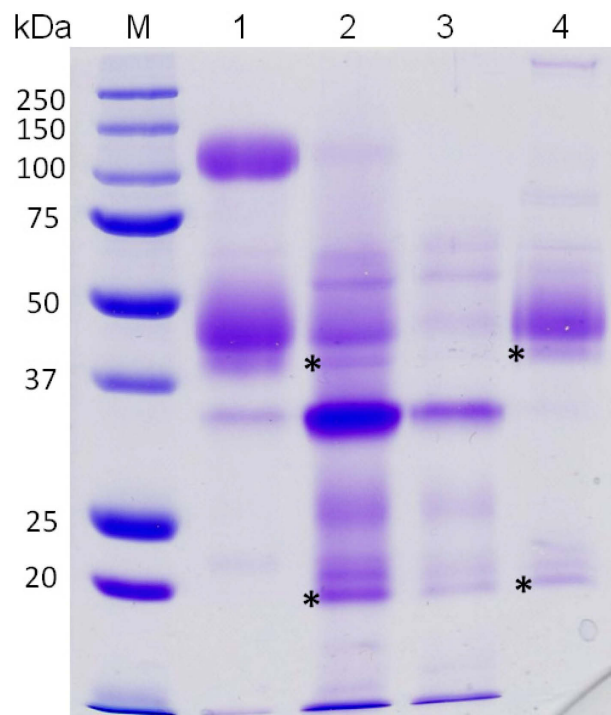


Abbildung 4.36: SDS-Gelelektrophorese zur Identifizierung des Proteins eCG im Eluat nach Reinigung an Anionenaustauschern. Es wurde je ein äquivalentes Volumen von 7,5 μ l aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über ein 12 %-iges SDS-PAGE mit 5 %-igem Sammelgel, mit anschließender Coomassie-Färbung. Die aufgetragenen Eluate stammen aus dem zweiten HGMF-Prozesse der vielfachen Partikelzyklisierung, zweiter Zyklus (2) (Tabelle 4.14). M: Marker (Firma Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland); 1: Eluat I; 2: Eluat II; 3: Eluat III; 4: kommerzielles eCG (Merck, Darmstadt, Deutschland) [70 IU]

Die Proteinbande auf Höhe von etwa 40 kDa des nach dem zweiten HGMF-Prozess gewonnenen Eluat II (2) (Tabelle 4.14) sowie die Proteinbande mit gleichem Molekulargewicht des kommerziellen eCG-Präparates weisen nach dem durchgeführten tryptischen Verdau ein nahezu identisches Peptidspektrum auf (Abbildung 4.37). Dies lässt vermuten, dass es sich hierbei um das gleiche Protein handelt.

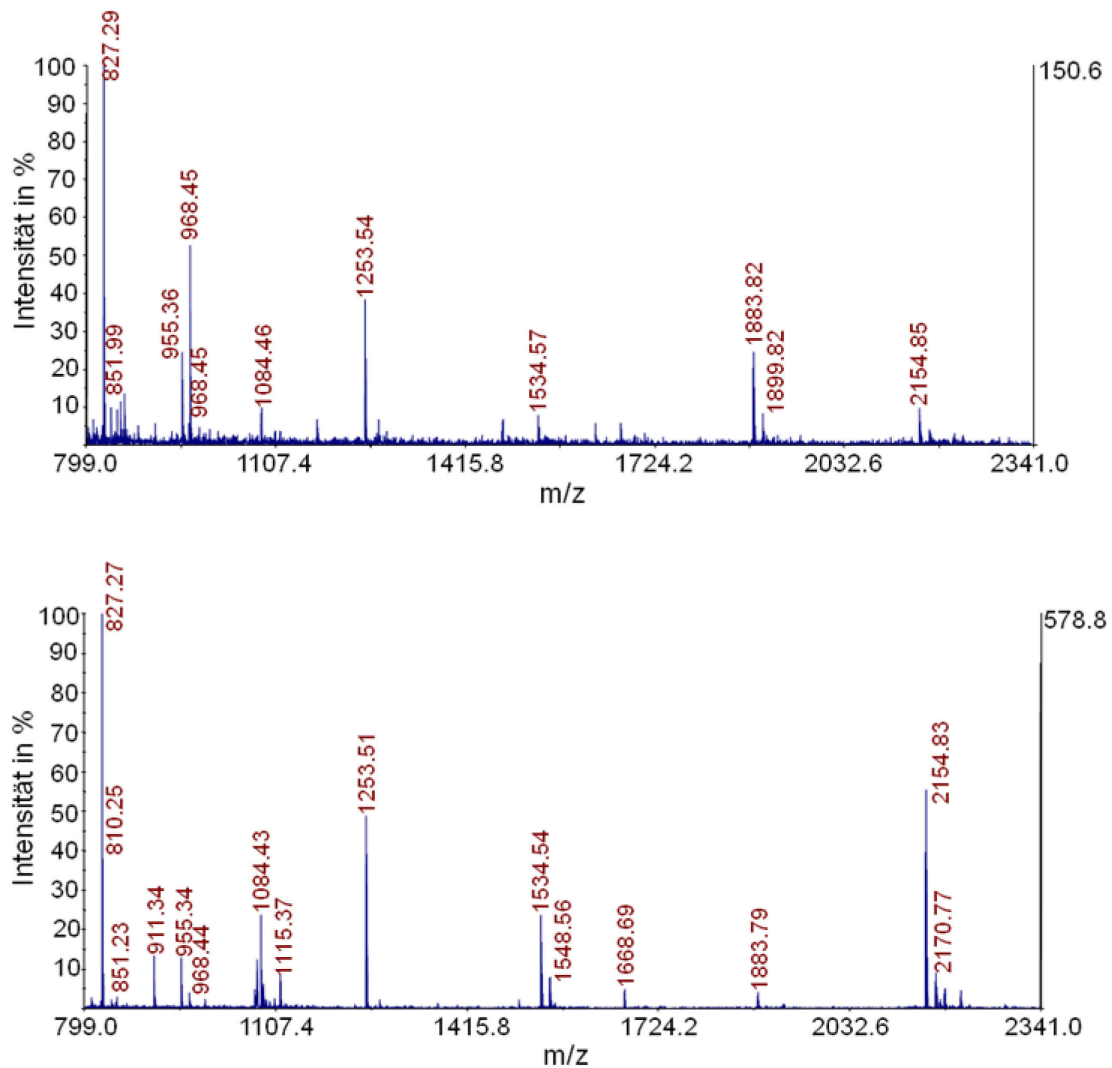


Abbildung 4.37: MALDI-Ergebnis eines tryptischen in-Gel Verdau der ca. 40 kDa Bande im Eluat II (2) (Tabelle 4.14) (oben) und kommerzieller Standard (Merck, Darmstadt, Deutschland) (unten)

Weiterhin zeigten die Proteinbanden nach tryptischen in-Gel Verdau auf Höhe von etwa 20 kDa des nach dem zweiten HGMF-Prozess gewonnenen Eluat II (2) (Tabelle 4.14) sowie die Proteinbande mit gleichem Molekulargewicht des kommerziellen eCG-Präparates ein nahezu identisches Peptidspektrum auf (Abbildung 4.38). Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei den beiden mittels Gelelektrophorese (Abbildung 4.36) aufgetrennten Proteinbanden um die α - bzw. β -Untereinheit (20 bzw. 40 kDa) des Zielproteins eCG handelt.

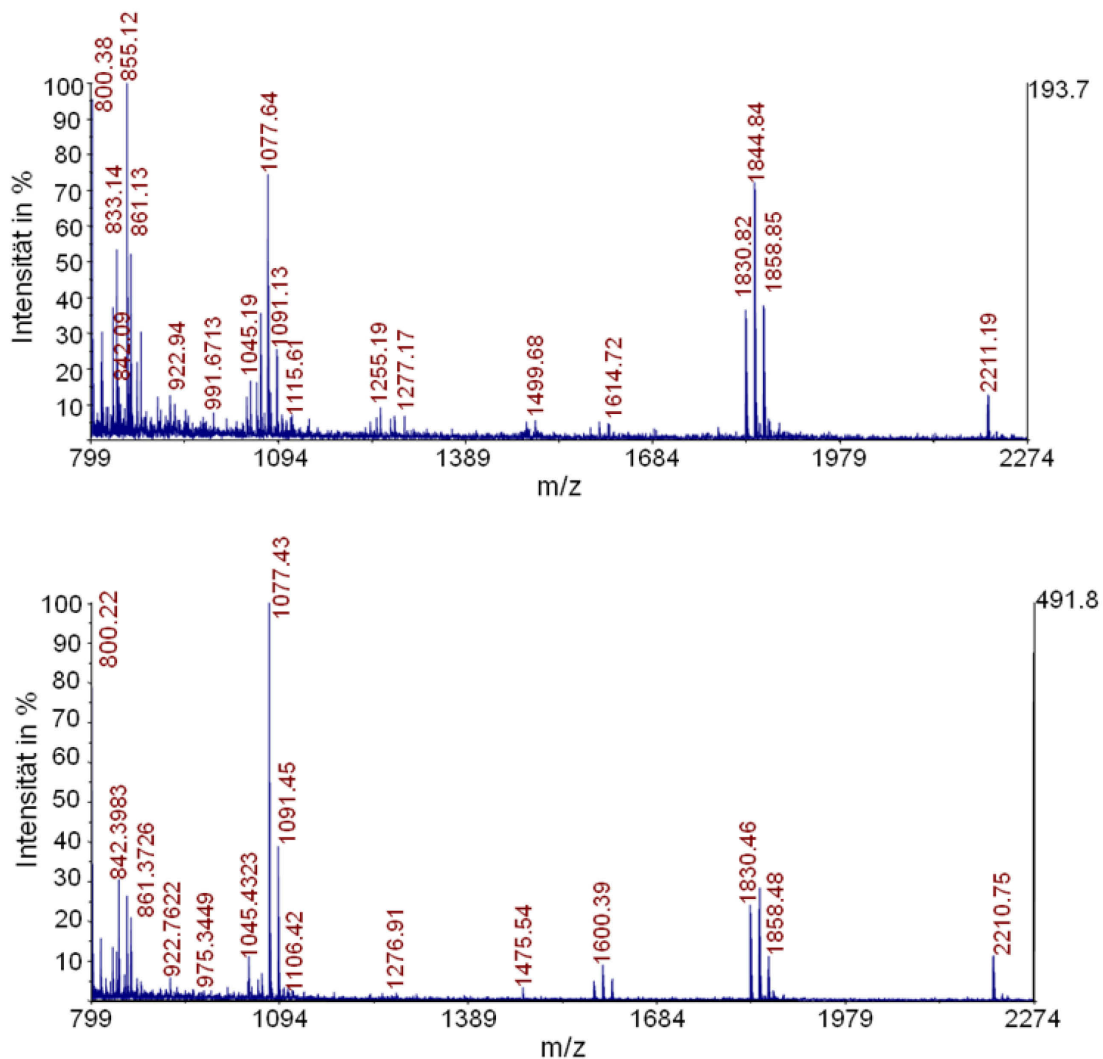


Abbildung 4.38: MALDI-Ergebnis eines tryptischen in-Gel Verdau der ca. 20 kDa Bande im Eluat II (2) (Tabelle 4.14) (oben) und kommerzieller Standard (Merck, Darmstadt, Deutschland) (unten)

Zusätzlich erfolgte mit der MALDI-Massenspektrometrie eine Massenbestimmung der gereinigten Fraktion des Eluates nach Reinigung des eCG an magnetischen Mikrosorbentien sowie des kommerziellen eCG-Präparates der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland). Die verwendeten Matrizen Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure) und 2,5-Dihydroxybenzoesäure sind die in der Literatur beschriebene gebräuchliche Matrizen bei MALDI-Analysen zur Massenbestimmung von Glykoproteinen [Jacoby et al., 2000; Blanchard et al., 2006, Resemann et al., 2007]. Bei dem Einsatz von Sinapinsäure zeigte das Massenspektrum des kommerziellen eCG-Präparates lediglich ein starkes Rauschen der Basislinie (Daten nicht gezeigt). Die eCG-Fraktion nach Reinigung an magnetischen Anionenaustauschern zeigte lediglich einen Peak bei einer Masse von 13,8 kDa (Daten nicht gezeigt). Bei der Verwendung von 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) konnte lediglich ein starkes Rauschen der Basislinie (Daten nicht gezeigt) detektiert werden.

Die Verwendung eines Reflektor Detektors verursacht die überproportionale Beschleunigung der Fragmente aus metastabilen Zuständen, was zu einem Grundrauschen im Massenspektrum beiträgt. Eine Mögliche Ursache für das starke Rauschen der Basislinie im Fall des Massenspektrums des kommerziellen eCG-Präparates könnte der Zerfall der Matrix-Cluster während der Flugzeit sein [Krutchinsky & Chait, 2002].

4.11.1 Deglykolisierung

Wie bereits in Kapitel 4.11 erläutert, verändern die Zuckerreste der Glykoproteine die Masse der tryptischen Peptide, wodurch eine Zuordnung der bestimmten Massen mit dem *in silico* durchgeführten tryptischen Verdau und der daraus bestimmten Massen erschwert wird. Dieser Effekt sollte durch die Deglykolisierung des Zielproteins beseitigt werden. Die Deglykolisierung erfolgte mit Hilfe des enzymatischen Protein Deglykolisierungs Kit E-DEGLY der Firma Sigma-Aldrich Co (St. Louis, USA).

Das Glykoprotein eCG trägt neben N-glykosidisch gebundenen Glykanen auch O-glykosidisch gebundene Glykane [Legardinier et al., 2005a; Damm et al., 1990]. Während die α - Untereinheit lediglich N-glykosidisch gebundenen Glykanstrukturen trägt [Legardinier et al., 2005a], konnten bei der β - Untereinheit sowohl N-glykosidisch als auch O-glykosidisch gebundene Glykane nachgewiesen werden [Damm et al., 1990]. Die Glykanstrukturen des eCG und die Rolle der Glykane in der Signaltransduktion wurden in Kapitel 2.7.2 eingehend beschrieben.

Das im Kit enthaltene Enzym PNGase F (Peptid-N-Glykosidase F) spaltet spezifisch nahezu alle N-glykosidisch gebundene Glykane [Tarentino & Plummer, 1994]. Lediglich N-Acetylglukosamine der Glykoproteine von Pflanzen oder parasitischen Würmern sind resistent gegenüber PNGase F [Taga et al., 1984]. Zur Entfernung intakter O-glykosidisch gebundener Glykanstrukturen existiert kein zu PNGase F vergleichbares Enzym. Die Monoaccharide müssen über eine Reihe von Exoglykosidasen entfernt werden. Das Enzym Neuramidase (Sialidase) spaltet sowohl verzweigte als auch unverzweigte Sialinsäuren von Glykoproteinen [Uchida et al., 1979]. O-Glykosidase (endo- α -N-Acetylgalaktosaminidase) spaltet alle unsubstituierten O-glykosidisch verknüpften Galactosyl- β 1,3-N-Acetyl-D Galaktosamin (Gal β 1,3GalNAc) Disaccharide ab [Iwase & Hotta, 1993]. β (1-4)-Galaktosidase oxidiert primäre Hydroxygruppen von nichtreduzierenden, terminalen β (1-4)-verknüpften Galaktose-Resten [Glasgow et al., 1977]. β -N-Acetylglukosamidase spaltet alle nichtreduzierende terminale β -N-Acetylglukosamin Reste ab [Glasgow et al., 1977]. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Kapitel 3.4.7 beschrieben.

Abbildung 4.39 zeigt das im Anschluss an eine Gelelektrophorese erhaltenen Proteinmuster der eingesetzten Proben vor (Fraktion 1 und 5) und nach (Fraktion 2 und 6) durchgeführter Deglykolisierung (siehe Kapitel 3.4.7). Rinderserumalbumin (BSA) (Fraktion 3 und 7) wurde als Kontrollprotein für den tryptischen Verdau verwendet.

Mit den markierten ausgeschnittenen Gelbanden der Fraktionen 4, 8-10 wurde ein tryptischer in-Gel Verdau durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.7). Die eingesetzten Proben der HPLC-Fraktionen resultieren nach konventioneller grober Vorreinigung des eCG.

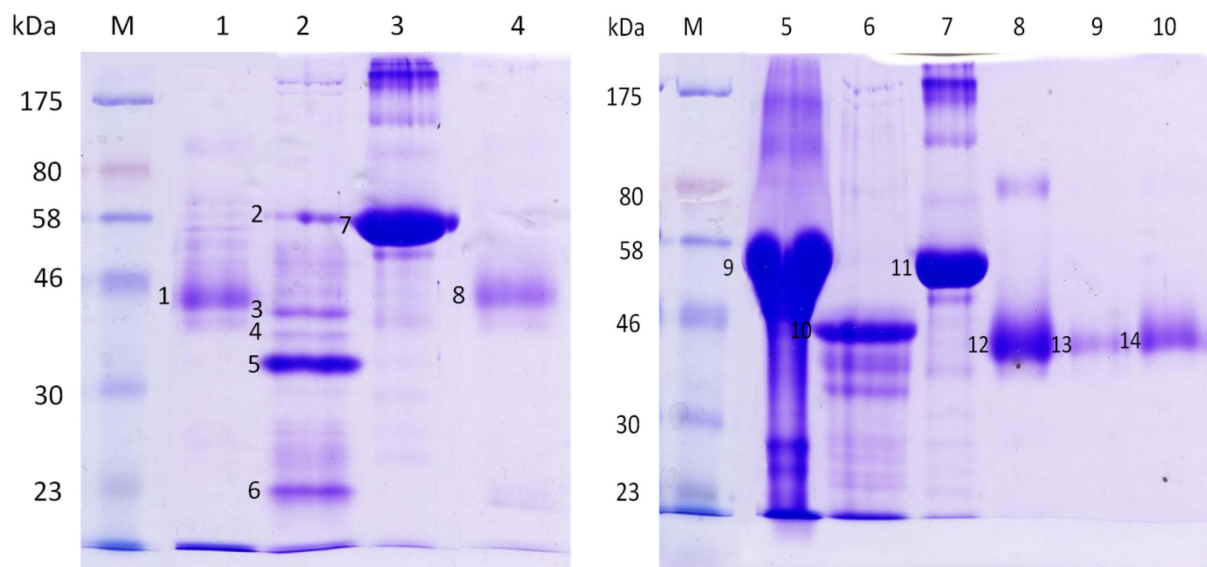


Abbildung 4.39: SDS-Gelelektrophorese zur Kontrolle der enzymatischen Deglykolisierung. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über ein 12 %-iges SDS-PAGE mit 5 %-igem Sammelgel, mit anschließender Coomassie-Färbung. Auftragung von 8 μ g (Fraktion 1), 10 μ g (Fraktion 2) bzw. 12 μ l (Fraktion 8-10). M: Marker (Firma NEB, Ipswich, USA); 1: grob gereinigtes eCG, 2: grob gereinigtes eCG deglykolisiert; 3: BSA Sigma-Aldrich Co, St. Louis [10 μ g]; 4: eCG Merck, Darmstadt [50 IU]; 5: Fetuitin (enzymatic protein deglycosilation Kit, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA); 6: Fetuitin deglykolisiert; 7: BSA Sigma-Aldrich Co, St. Louis [10 μ g]; 8: eCG-Fraktion nach Reinigung an Mono Q; 9: eCG-Fraktion nach Reinigung an Q FF; 10: eCG-Fraktion nach Reinigung an DEAE

Bei den in Fraktion 2 (Abbildung 4.39) zusätzlich auftretenden Proteinbanden handelt es sich um die zur Deglykolisierung der eCG-Probe eingesetzten Enzyme O-Glykosidase (180 kDa), β -N-Acetylglucosamidase (140 kDa), Neuramidase (60 kDa) und PNGase F (36 kDa). Das Enzym Galaktosidase kann aufgrund seines hohen Molekulargewichtes von 350 kDa im 12 %-igen SDS-Page nicht nachgewiesen werden. Die Molekulargewichte der einzelnen Enzyme wurden der Produktinformation des verwendeten Deglykolisierung Kits entnommen.

Durch die vielen negativ geladenen Zuckerreste (z.B. Sialinsäure) der Glykoproteine ergibt sich eine variable Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld, wodurch die mit Coomassie

gefärbten Banden der Glykoproteine im SDS-Page unscharf erscheinen. In Folge der Deglykolisierung konnten in der zweiten Fraktion des SDS-Page (Abbildung 4.39) bis auf eine Bande bei ca. 23 kDa, nur noch scharfe Proteinbanden detektiert werden.

Zur Kontrolle der durchgeführten Deglykolisierung wurde eine weitere Gelelektrophorese mit anschließender Fuchsin-Färbung (Abbildung 4.40) zum spezifischen Nachweis von Glykoproteinen eingesetzt.

Bei dem zur Kontrolle der enzymatischen Deglykolisierung im Kit enthaltene Fetuin-A (alpha-2-HS-Glykoprotein) konnte eine nahezu vollständige Deglykolisierung nachgewiesen werden (Fraktion 3). Die eCG-Probe nach grober Vorreinigung des eCG zeigte lediglich eine Proteinbande auf Höhe von ca. 33 kDa (Fraktion 5). Bei diesem Protein handelt es sich möglicherweise um ein Fragment eines nicht vollständig deglykolisierten Glykoproteins.

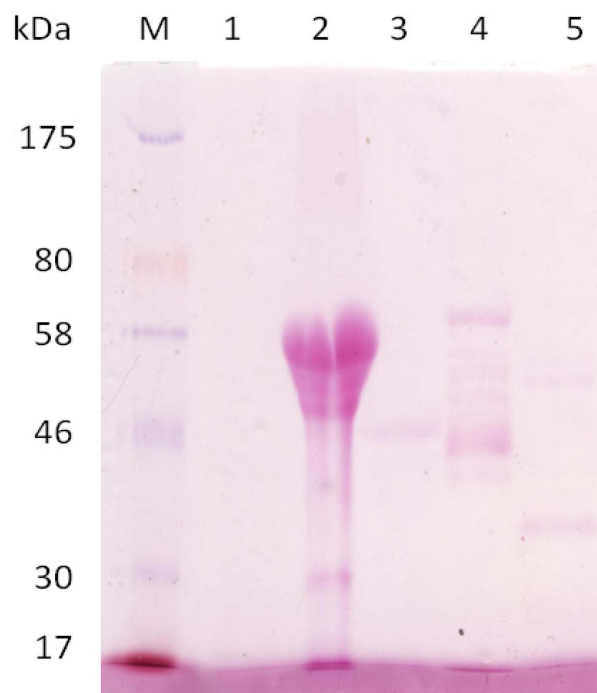


Abbildung 4.40: SDS-Gelelektrophorese zur Kontrolle der enzymatischen Deglykolisierung. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über ein 12 %-iges SDS-PAGE mit 5 %-igem Sammelgel, mit anschließender Fuchsin-Färbung. Auftragung von je 8 µg Gesamtprotein (Fraktion 2-4). M: Marker (Firma NEB, Ipswich, USA); 1: eCG Merck, Darmstadt [50 IU] deglykolisiert; 2: Fetuitin (enzymatic protein deglycosilation Kit, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA); 3: Fetuitin deglykolisiert; 4: grob gereinigtes eCG, 5: grob gereinigtes eCG deglykolisiert

Tabelle 4.23 zeigt die zu Abbildung 4.39 korrespondierenden Proteinidentifikationen nach tryptischem Verdau und anschließender massenspektrometrischer Untersuchung. Von den nach vorgenommener Deglykolisierung ausgeschnittenen Proteinbanden der zweiten Fraktion

(Abbildung 4.39) konnten mittels MALDI-Analyse zwei Proteine der Spezies *Equus caballus* identifiziert werden. Das theoretische Molekulargewicht von 43,5 kDa des Histidin-reichen Glykoproteins (HRG) stimmt mit den im SDS-Page bestimmten molekularen Masse überein, so dass davon ausgegangen werden kann, dass eine Deglykolisierung des Protein stattgefunden hat. Bei HRG handelt es sich um ein Glykoprotein mit einem Kohlehydratanteil von 14 %, mit sechs N-glykosidisch gebundenen Glykanstrukturen [Jones et al., 2005].

Tabelle 4.23: Signifikant identifizierte Proteine nach tryptischem in-Gel Verdau (Abbildung 4.39)

| Protein- bande | Identifiziertes Protein | Theoretisches Molekulargewicht* [kDa] | Theoretischer pI-Wert* | Score | Organismus |
|-------------------|--|---|---------------------------|-------|-----------------------|
| 1 | saures alpha 1-Glykoprotein | 23,4 | 5,07 | 115 | <i>Equus caballus</i> |
| 4 | Histidin-reiches Glykoprotein (HRG) | 43,5 | 7,1 | 102 | <i>Equus caballus</i> |
| 5 | Transthyretin | 15,9 | 5,36 | 143 | <i>Equus caballus</i> |
| 7 | Serumalbumin | 71,2 | 5,82 | 115 | <i>Bos taurus</i> |
| 9 | alpha-2-HS-Glykoprotein (Fetuin-A) | 39,1 | 5,26 | 161 | <i>Bos taurus</i> |
| 11 | Serumalbumin | 71,2 | 5,82 | 115 | <i>Bos taurus</i> |

*: ohne Glykan-Anteil

Die weiterhin durchgeführte in-Gel Deglykolisierung war nicht erfolgreich, da eine vollständige Elimination der eingesetzten Enzyme auch durch mehrfaches Waschen der Gelstücke und Inkubation im Ultraschallbad nicht gelang (Daten nicht gezeigt) (Kapitel 3.4.7).

Auch für die in Lösung durchgeführte Deglykolisierung bleibt festzuhalten, dass das eigentliche Ziel einer Identifikation des Zielproteins eCG über MALDI-ToF-MS nicht erreicht werden konnte. Ursache hierfür ist möglicherweise eine unvollständige Deglykolisierung des Proteins. Die α -Untereinheit des eCG trägt lediglich N-glykosidisch gebundene Glykanstrukturen. Die aufgrund der Deglykolisierung mit PNGase F stattgefundenen Seitenkettenmodifikation der Deaminierung von Asparagin zu Aspartat, was zu einem Anstieg der Masse des Peptides um 1 Da führt, wurde bei der Datenbankrecherche zugelassen.

Im Fall der β -Untereinheit wurde zur Kontrolle ein tryptischer *in silico* Verdau mit der Online Software ExpASY durchgeführt. Die Proteinsequenz der β -Untereinheit wurde Sugino et al.

[1987] entnommen. Der Datenbankabgleich (Mascot) mit den Peptiden ergab jedoch ebenfalls keine Übereinstimmung mit der β -Untereinheit des eCG, sondern lediglich mit einem Score von 114 mit der β -Untereinheit von eLH, was darauf hindeutet, dass die β -Untereinheit des eCG nicht in der Datenbank enthalten ist.

5 Fazit und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Anwendung magnetischer Anionenaustauschersorbentien zur Reinigung von equinem Choriongonadotropin (eCG), mit einer Ausgangskonzentration des gewählten Modellproteins in Serum von lediglich $15\text{-}45 \text{ IU}_{\text{ELISA}} \text{ mL}^{-1}$ ($1 \text{ IU} \approx 100 \text{ ng}$), untersucht. Die hierzu durchgeführte systematische Prozessentwicklung lässt sich in folgende Hauptabschnitte unterteilen: (i) Optimierung vorgelagerter Prozessschritte, (ii) Optimierung der Wasch- und Elutionsbedingungen sowie der Partikelkonzentration, (iii) Aufbau und der Inbetriebnahme der HGMF-Pilotanlage sowie schließlich (iv) Optimierung und Automatisierung des HGMF-Prozesses.

Nach der benötigten Vorreinigung des Serums und der anschließenden Reinigung des eCG an magnetischen Anionenaustauschersorbentien in der HGMF-Pilotanlage wiesen die Produktströme eine über die biologische Aktivität bestimmte Ausbeute an Zielprotein von ca. 60 %, mit einer spezifischen Aktivität von bis zu $1300 \text{ IU}_{\text{ROT}} \text{ mg}^{-1}$ auf, bei einem Verlust an Zielprotein im Rahmen des HGMF-Prozesses von lediglich 5-10 %.

Die parallel durchgeführte Reinigung von eCG über konventionelle Chromatographiemedien erbrachte dagegen nur eine Ausbeute von 45 % bei einer spezifischen Aktivität von $581 \text{ IU}_{\text{ELISA}} \text{ mg}^{-1}$.

Während einer Erhöhung der Ausbeute aufgrund des vereinfachten Ablaufes des HGMF-Verfahrens zumindest erhofft werden konnte, überrascht zunächst die zusätzlich höhere spezifische Aktivität, da Chromatographieverfahren aufgrund ihrer Vielzahl an theoretischen Trennstufen reinere Produktströme erwarten lassen. Eine mögliche Ursache für die Überlegenheit des HGMF-Verfahrens ist zunächst eine höhere eCG-Selektivität der magnetischen Sorbentien im Vergleich zu den verwendeten Chromatographiemedien. Da für das Screening der Chromatographiemedien aber ebenfalls schwach basische Anionenaustauschermaterialien verwendet wurden, erscheint diese Erklärung nicht zwingend. Vielmehr wird vermutet, dass die höhere Effizienz des HGMF-Verfahrens durch eine günstigere Skalierung der Betriebsparameter verursacht wird. Wie aus der Diskussion der verschiedenen HGMF-Versuche ersichtlich, spielt das während der Elution vorliegende Eluat zu Sorbensvolumenverhältnis eine wichtige Rolle für die erreichte spezifische Aktivität des Eluates. Obwohl es sich beim HGMF um ein batchweise durchgeführtes Verfahren handelt, bedingt die gute Abtrennbarkeit der magnetischen Sorbentien, dass das Verhältnis kleinere Werte erreicht, als im Fall der Chromatographieversuche. Eine Reduktion des Säulenvolumens, aber auch damit des Durchsatzes, der Chromatographie wäre

zwar prinzipiell denkbar, aber bereits unter den gewählten Bedingungen benötigt der Chromatographieschritt ca. die dreifache Zeit des HGMF-Schrittes.

Neben der hohen Effizienz ist die Partikelrückgewinnung aus dem magnetischen Filter sowie die Wiederverwendbarkeit der magnetischen Sorbentien ist eine wichtige Voraussetzung für die Wirtschaftlichkeit des HGMF-Verfahrens. Der eingesetzte Filter zeigte eine für einen industriellen Einsatz ausreichende Kapazität sowie einen tolerierbaren Verlust an Partikeln bei maximaler Auslastung der Filterkapazität. Die Wiederverwendbarkeit der magnetischen Sorbentien wurde über 70 Binde- und Elutionsschritte belegt.

Die Durchführung des HGMF-Prozesses und die resultierenden Ausbeuten, Aufreinigungs- und Konzentrierungsfaktoren zeigen, dass sich das Verfahren zur Reinigung des Proteins eCG aus Serum eignet. Mit Hilfe des HGMF-Prozesses konnten mehrere Schritte der herkömmlichen Aufarbeitung des Zielproteins zusammengefasst werden, jedoch konnte aufgrund des verwendeten Ausgangsmaterials und der zur Verfügung stehenden Anionenaustauscher-Liganden keine direkte Produktisolation aus einem ungeklärten Ausgangsmedium realisiert werden. Hierdurch entfällt für den untersuchten Anwendungsfall der wichtige Vorteil der Vermeidung vorausgehender Fest-Flüssig-Trennschritte des HGMF-Verfahrens.

Ein Einsatz zur Realisierung eines direkten HGMF-Verfahrens aus Serum ist die Verwendung hochselektiver Liganden, wie z.B. eCG-spezifische Antikörper. Der Einsatz von Antikörpern schließt eine Konkurrenzadsorption weitgehend aus und vermeidet somit die bei der Verwendung magnetischer Anionenaustauschersorbentien benötigten Fällungsschritte mit meta-Phosphorsäure und Ethanol. Dieser Zeit- und Kostenersparnis durch Vermeidung der Vorreinigung stehen aber die hohen Produktionskosten des Antikörpers sowie dessen Sensitivität gegenüber einer Denaturierung entgegen. Voraussetzung für einen wirtschaftlichen Einsatz von Antikörperliganden wäre dessen Stabilität über mindestens 100 Reinigungszyklen.

Ein zusätzlicher Ansatz zur Optimierung des HGMF-Verfahrens ist eine weitere Verbesserung der Rückspüleffizienz und der Wiedergewinnung der magnetischen Partikel aus dem HGMF-Filter. Eine Reduktion des Partikelverlustes lässt sich möglicherweise durch eine Konstruktionsänderung der Filterelemente der Separatorkammer realisieren. In Diskussion mit den an der Anlagefertigung beteiligten Projektpartnern, wurde ein vereinfachter Aufbau der Filterkammer unter Vermeidung der Abstandsringe der Filterrunden entwickelt. Hierdurch entfällt der nur schwer reinigbare Bereich zwischen den Abstandsringen und der Kammerwand.

Ungeachtet der genannten Optimierungsmöglichkeiten konnte im Rahmen dieser Arbeit die Eignung magnetischer Sorbentien in Kombination mit einer neu entwickelten HGMF-Anlage zur Reinigung eines Proteins von pharmakologischem Interesse gezeigt werden. Das vorgestellte Verfahren stellt auch in wirtschaftlicher Hinsicht, auf Grund der vorgestellten Vorteile gegenüber konventionellen Reinigungsprozessen, wie zum Beispiel der Reduktion der benötigten Prozessschritte, der Steigerung der Produktausbeute, der schnellen Bindungskinetik sowie der vielfachen Wiederverwendbarkeit und vereinfachten Reinigung der Sorbentien eine echte Alternative zu konventionellen Reinigungsverfahren dar.

6 Literaturverzeichnis

Aggarwal, B.B., Farmer, S.W., Papkoff, H., Seidel, G.E. Jr (1980), Biochemical properties of equine chorionic gonadotropin from two different pools of pregnant mare sera, *Biol. Reprod.*, 23(3): 570-576

Allen, W.R. & Stewart, F. (1993), *Equine Reproduction*, Hrsg.: McKinnon A.O. & Voss J.L., Kapitel 9: 81-84, Blackwell Publishing Asia

Amersham Pharmacia Biotech (2000), *Expanded bed adsorption – Principles and methods*, Hrsg.: Amersham Pharmacia Biotech, AB, Uppsala, Schweden

Amersham Biosciences (2002), *Ion exchange chromatography – Principles and methods*, Hrsg.: Amersham Pharmacia Biotech, AB, Uppsala, Schweden

Andoh, A., Fujiyama, Y., Kimura, T., Uchihara, H., Sakumoto, H., Okabe, H., Bamba, T. (1997), Molecular characterization of complement components (C3, C4, and Factor B) in human saliva, *J. Clin. Immunol.*, 17(5): 404-407

Becker, J. (2009), *Einsatz magnetischer Extraktionsphasen zur Bioproduktaufarbeitung*, Dissertation, Institut für funktionelle Grenzflächen, Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

Berensmeier, S. (2006), Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73(3): 495-504

Blanchard, V., Gadkari, R.A., Gerwig, G.J., Leeftang, B.R., Dighe, R.R., Kamerling, J.P. (2006), Characterization of the N-linked oligosaccharides from human chorionic gonadotropin expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Glycoconj. J.*, 24: 33-47

Böhm, D. & Vob, H. (1999), Einsatz von magnetischen Mikropartikeln in der chemischen Technik, *Chem. Ing. Tech.*, 71: 43-51

Bousfield, G.R., Butnev, V.Y. Butnev, V.Y. (2001), Identification of twelve O-glycosylation sites in equine chorionic gonadotropin β and equine luteinizing hormone β by solid-phase edman degradation, *Biol. Reprod.*, 64(1): 136-147

Brown, G. N. (2008), *Advances in magnetic particle based bioprocessing*, Dissertation, School of Chemical Engineering, College of Engineering and Physical Sciences, University of Birmingham

Buchta, M. (2010), *Das Physikum – Kompendium zum 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung*, Hrsg. Sönnichen, A., 2. Auflage, Elsevier GmbH, München

Cartland, G.F. & Nelson, J.W. (1937), The preparation and purification of extracts containing the gonadostimulating hormone of pregnant mare serum, *J. Biol. Chem.*, 119(1): 59-67

- Chamrad, D.** (2004), Bioinformatische Verfahren zur Analyse von Primärstrukturinformation mittels massenspektrometrischer Daten in der Proteomanalyse, Dissertation, Fakultät für Chemie, Ruhr-Universität, Bochum
- Chen, F., Wang, Y., Puett, D.** (1992), The carboxy-terminal region of the glycoprotein hormone alpha-subunit: contributions to receptor binding and signaling in human chorionic gonadotropin, *Mol. Endocrinol.*, 6(6): 914-919
- Christakos, S. & Bahl, O.P.** (1979), Pregnant mare serum gonadotropin. Purification and physicochemical, biological, and immunological characterization, *J. Biol. Chem.*, 254(10): 4253-4261
- Cole, H.H. & Erway, J.** (1941), 48-hour assay test for equine gonadotropin with results expressed in international units, *Endocrinology*, 29(4): 514-519
- Cooke, D.J., Crowe, M.A., Roche, J.F., Headon, D.R.** (1996), Gonadotrophin heterogeneity and its role in farm animal reproduction, *Anim. Reprod. Sci.*, 41(2): 77-99
- Damm, J.B.L., Hard, K. Kamerling, J.P., van Dedem, G.W.K., Vlienthart, J.F.G.** (1990), Structure determination of the major N- and O-linked carbohydrate chains of the β subunit from equine chorionic gonadotropin, *Eur. J. Biochem.*, 189(1): 175-183
- Deng, A., Himmelsbach, M., Zhu, Q.Z., Frey, S., Sengl, M., Buchberger, W., Niessner, R., Knopp, D.** (2003), Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC-MS, *Environ. Sci. Technol.*, 37(15): 3422-3429
- Dingermann, T., Hänsel, R. Zündorf, I.** (2002), Pharmazeutische Biologie: molekulare Grundlagen und klinische Anwendung, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York
- Dunnill, P. & Lilly, M.** (1974), Purification of enzymes using magnetic bio-affinity materials, *Biotechnol. Bioeng.*, 16: 987 - 990
- Ebner, N.** (2006), Einsatz von Magnettechnologie bei der Bioproduktaufarbeitung, Dissertation, Institut für Technische Chemie, Forschungszentrum Karlsruhe, Karlsruhe
- Faber, H. & Haid, H.** (1995), Endokrinologie, 4. Auflage, UTB, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart
- Farmer, S.W. & Papkoff, H.** (1979), Immunochemical studies with pregnant mare serum gonadotropin, *Biol. Reprod.*, 21(2): 425-431
- Fournier, T., Medjoubi, N.N., Porquet, D.** (2000), Alpha-1-acid-glycoprotein, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1482(1-4): 157-171
- Franzreb, M.** (2003), Magnettechnologie in der Verfahrenstechnik wässriger Medien, Habilitation, Institut für Technische Chemie, Forschungszentrum Karlsruhe, Karlsruhe
- Franzreb, M. & Reichert, C.** (2006), High Gradient Magnetic Separator, Patent: US 2006/0016732 A1

- Franzreb, M., Siemann-Herzberg, M., Hobley, T.J., Thomas, O.R.T.** (2006), Protein purification using magnetic adsorbent particles, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70(5): 505-516
- Frey, H.H. & Löscher, W.** (2009), *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*, 3. Auflage, Enke Verlag Stuttgart
- Ginther, O.J., Pineda, M.H., Wentworth, B.C., Nuti, L.** (1974), Rate of disappearance of exogenous LH from the blood in mares, *J. Anim Sci.*, 39(2): 397-403
- Glasgow, L.R., Paulson, J.V., Hill, R.L.** (1977), Systematic purification of five glycosidases from *Streptococcus (Diplococcus) pneumonia*, *J. Biol. Chem.*, 252: 8615-8623
- González G., Castro B., Massaldi, H.** (1998), Extraction of equine chorionic gonadotrophin from pregnant mare plasma by direct adsorption on chromatographic media, *Biotechnol. Bioeng.*, 57(1): 22-25
- Gospodarowicz, D. & Papkoff, H.** (1967), A simple method for the isolation of pregnant mare serum gonadotropin, *Endocrinology*, 80(4): 699-702
- Habeed, A.F.S.A. & Francis, R.D.** (1976), Preparation of Human Immunoglobulin by Ammonium Sulfate Precipitation, *Vox Sang.*, 31(6): 423-434
- Handbook from GE Healthcare** (2007), *Affinity chromatography – Principles and methods*, Hrsg.: GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Schweden
- Handbook from GE Healthcare** (2007), *Ion exchange chromatography & chromatofocusing – Principles and methods*, Hrsg.: GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Schweden
- Heebøll-Nielsen, A., Justesen, S.F.L., Thomas, O.R.T.** (2004), Fractionation of whey proteins with high-capacity superparamagnetic ion-exchangers, *J. Biotechnol.*, 113(1-3):247-262
- Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Smith, P.K.** (1992), *Immobilized affinity ligand techniques*, Academic Pr., San Diego
- Hintemann, T.** (2006), *Entwicklung, Optimierung, Validierung und Automatisierung eines Immunoassays zur sensitiven Detektion des endokrinen Disruptors 17 β -Östradiol im Wasserkreislauf*, Dissertation, Landwirtschaftliche Fakultät, Universität Bonn
- Hoffmann, C.** (2003), *Einsatz magnetischer Separationsverfahren zur biotechnologischen Produktaufarbeitung*, Dissertation, Institut für Technische Chemie, Forschungszentrum Karlsruhe, Karlsruhe
- Hubbich, J.J., Matthiesen, D.B., Hobley, T.J., Thomas, O.R.T.** (2001), High gradient magnetic separation versus expanded bed adsorption: A first principle comparison, *Bioseparation*, 10: 99-112
- Hubbich, J.J. & Thomas, O.R.T.** (2002), High-gradient magnetic affinity separation of trypsin from porcine pancreatin, *Biotechnol. Bioeng.*, 79(3): 301-313

- Iwase, H. & Hotta, K.** (1993), Release of O-linked glycoprotein glycans by endo-alpha-N-acetyl-D-galactosamidase, *Methods Mol. Biol.*, 14: 151-159
- Jacoby, E.R., Kickman, A.T., Laidler, P., Iles, R.K.** (2000), Determination of the glycoforms of human chorionic gonadotropin β -core fragment by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Clin. Chem.*, 46(11): 1796-1803
- Janson, J.C, Rydén, L.** (1998), Protein purification – principles, high resolution methods, and applications, 2. Auflage, John Wiley & Sons Inc., New York
- Jones, A.L., Hulett, M.D., Parish, C.R.** (2005), Histidine-rich glycoprotein: A novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems, *Immunol. Cell Biol.*, 83:106-118
- Kamke, D. & Walcher, W.** (1994), Physik für Mediziner, 2. Auflage, Teubner, Stuttgart
- Keutmann, H.T., McIlroy, P.J., Bergert, E.R., Ryan, R.J.** (1983), Chemically deglycosylated human chorionic gonadotropin subunits: characterization and biological properties, *Biochem.*, 22: 3067-3072
- Kennedy, R. M.** (2001). Expanded-Bed Adsorption Chromatography, Unit Number: 8.8, John Wiley & Sons, New York
- Kolm, H.** (1971), Magnetic device, US Patent Nr. 3567026
- Köttgen, E.**(2003), Lectine und ihre Zuckerliganden, *Med. Klin.*, 98(12):717–38
- Krutchinsky, A.N. & Chait, B.T.** (2002), On the nature of the chemical noise in MALDI mass spectra, *J. Am. Soc. Spectrom.*, 13: 129-134
- Kula, M.R. & Selber, K.** (1999), Protein purification by aqueous liquid extraction, in: *Encyclopedia of Bioprocess Technology*, Hrsg.: Flickinger, M.C. & Drew, S.W., Wiley & Sons Inc., New York, 2179-2191
- Küster, B., Hunter, A.P., Wheeler, S.F., Dwek, R.A., Harvey, D.J.** (1998), Structural determination of N-linked carbohydrates by matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry following enzymatic release within sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide electrophoresis gels: Application to species-specific glycosylation of α_1 -acid glycoprotein, *Electrophoresis*, 19(11): 1950-1959
- Ladisch, M.R.** (2001), *Bioseparations Engineering: Principles, Practice, and Economics*, John Wiley & Sons, New York
- Laemmli U.K.** (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-5
- Lecompte, F., Roy, F., Combarnous, Y.** (1998), International collaborative calibration of a preparation of equine chorionic gonadotrophin (eCG NZY-01) proposed as a new standard, *J. Reprod. Fert.*, 113: 145-150
- Legardinier, S., Cahoreau, C., Klett, D., Combarnous, Y.** (2005a), Involvement of equine chorionic gonadotropin (eCG) carbohydrate side chains in its bioactivity; lessons from recombinant hormone expressed in insect cells, *Reprod. Nutr. Dev.*, 45(3): 255-259

- Legardinier, S., Duonor-Cérutti, M. Devauchell, G., Combarous, Y., Cahoreau, C.** (2005b), Biological activities of recombinant equine luteinizing hormone/chorionic gonadotropin (eLH/CG) expressed in Sf9 and Mimic insect cell lines, *J Mol. Endocrinol.*, 34(1): 47-60
- Levenspiel, O.** (1999), *Chemical Reaction Engineering*, 3. Auflage, John Wiley and Sons, Inc, New York
- Lochnit, G. & Geyer, R.** (2004), An optimized protocol for nano-LC-MALDI-TOF-MS coupling for the analysis of proteolytic digests of glycoproteins, *Biomed. Chromatogr.*, 18(10): 841-848
- Loo, D., Jones, A., Hill, M.M.** (2010), Lectin magnetic bead array for biomarker discovery, *J. Proteome Res.*, 9:5496-5500
- Lunenfeld, B.** (2004), Historical perspectives in gonadotrophin therapy, *Human Reproduction Update*, 10(6): 453-467
- McFarlane, J., Czekala N.M., Papkoff, H.** (1991), Zebra chorionic gonadotropin: partial purification and characterization, *Biol. Reprod.*, 44(5): 827-833
- Medda, R., Cara, N., Floris, G.** (1987), Horse plasma ceruloplasmin molecular weight and subunit analysis, *Prep. Biochem.*, 17(4): 447-454
- Melmer, G.** (2005), *Biopharmaceuticals and the industrial environment, Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems*, Weinheim: Wiley-VCH, 361-383
- Meyer, V.R.** (2003), *Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie*, 9. Auflage, Wiley-VCH
- Meyer, A.** (2004), *Einsatz magnetischer Trennverfahren zur Aufarbeitung von Molkereiprodukten*, Dissertation, Institut für Technische Chemie, Forschungszentrum Karlsruhe, Karlsruhe
- Meyer, A., Berensmeier, S., Franzreb, F.** (2007), Direct capture of lactoferrin from whey using magnetic micro-ion exchangers in combination with high-gradient magnetic separation, *React. Funct. Polym.*, 67: 1577-1588
- Monkos, K.** (2005), A comparison of solution conformation and hydrodynamic properties of equine, porcine and rabbit serum albumin using viscometric measurements, *Biochim. Biophys Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1748(1): 100-109
- Moore, W., Jr & Ward, D.** (1980), Pregnant mare serum gonadotropin. Rapid chromatographic procedures for the purification of intact hormone and isolation of subunits, *J. Biol. Chem.*, 255(14): 6923-6929
- Müller, P.** (2010), *Isolierung von Gonadotropin aus Pferdeserum*, Praxissemesterbericht, Institut für Funktionelle Grenzflächen, Karlsruhe Institut für Technologie, Karlsruhe
- Müller, C., Preußner-Kunze, A., Wagner, K., Franzreb, M.** (2011), Gonadotropin purification from horse serum applying magnetic beads, *Biotechnol. J.*, 6(4): 392-395

- Oberteuffer, J.A.** (1974), Magnetic separation: A review of principles, devices, and applications, *IEEE Trans. Magn.*, 10(2), 223-238
- Olsvik, O., Popovic, T., Skjerve, E., Cudjoe, K.S., Ugelstad, J., Uhlén, M.** (1994), Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology, *Clin. Microbiol. Rev.*, 7(1): 43-54
- Oster, J., Parker, J., Brassard, L.Å.** (2001), Polyvinyl-alcohol-based magnetic beads for rapid and efficient separation of specific or unspecific nucleic acid sequences, *J. Magn. Magn. Mater.*, 225(1-2): 145-150
- Page, M. & Thorpe, R.** (2002), Purification of IgG Using Protein A or Protein G. *The Protein Protocols Handbook*, 2. Auflage, Hrsg.: Walker, J.M., Humana Press Inc., Totowa, New York
- Papkoff H.** (1974), Chemical and Biological Properties of the Subunits of Pregnant Mare Serum Gonadotropin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 58(2): 397-404
- Pappin, D.J., Hojrup, P., Bleasby, A.** (1993), Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting, *Curr. Biol.*, 3: 327-332
- Peterson, E.A. & Sober, H.A.** (1956), Chromatography of Proteins - Cellulose ion exchange adsorbents, *J. Amer. Chem. Soc.*, 78: 751-755
- Pfister, H.** (1979), Magnetische Separation mit hohen Flussdichte-Gradienten, *J. Magn. Magn. Mater.*, 13: 1-10
- Pingoud, A. & Urbanke, C.** (1997), *Arbeitsmethoden der Biochemie*, Walter de Gruyter, Berlin New York
- Resemann, A., Asperger, A., Sparbier, K., Seemann, K., Eichhorn, T., Hunzinger, C., Stein, G., Vorweg, L., Suckau, D.** (2007), P41-M automated LC-MALDI analysis of glycopeptides from glycoprotein digests using DHB as matrix, *J. Biomol. Tech.*, 18(1): 15
- Richter, G.** (2003), *Praktische Biochemie Grundlagen und Techniken*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York
- Roger H.G., Todd P.W., Rudge, S.R., Petrides, D.P.** (2003), *Bioseparations science and engineering*, Oxford University Press, Inc., New York
- Ryan, R.J., Charlesworth, M.C., McCormick, D.J., Milius, R.P., Keutmann, H.T.** (1988), The glycoprotein hormones: recent studies of structure-function relationships, *FASEB J.*, 2: 2661-2669
- Sambrook J. & Russell D.W.** (2001), *Molecular cloning - A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Safarík, I. & Safariková, M.** (2002), Magnetic nanoparticles and bioscience, *Monatsh. Chem.*, 133: 737-759

- Sairam, M.R.** (1989), Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction, *FASAB J.*, 3: 1915-1926
- Scatchard, G.** (1949), The attractions of proteins for small molecules and ions, *Ann. New York Acad. Sci.*, 51: 660-672
- Scopes, R. K.** (2001), *Protein Purification Flow Charts*, John Wiley & Sons, New York
- Sherwood, O.D., Grimek, H.J., McShan, W.H.** (1970), Purification and properties of follicle-stimulating hormone from sheep pituitary glands, *J. Biol. Chem.*, 245(9): 2328-2336
- Strickland, T.W. & Pierce, J.G.** (1983), The α -subunit of pituitary glycoprotein hormones. Formation of three dimensional structure during cell free biosynthesis, *J. Biol. Chem.*, 258: 5927-5932
- Sugino, H., Bousfield, G.R., Moore, W.T., Ward, D.N.** (1987), Structural studies on equine glycoprotein hormones, amino acid sequence of equine chorionic gonadotropin β -subunit, *J. Biol. Chem.*, 262(18): 8603-8609
- Svensson, C., Grönneberg, R., Andersson, M., Alkner, O., Billing, B., Greiff, L., Persson, G.G.** (1995), Allergen challenge-induced entry of alpha 2-macroglobulin and tryptase into human nasal and bronchial airways, *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 96(2): 239-246
- Svoboda, J.** (1987), Magnetic methods for the treatment of minerals, developments in mineral processing, Hrsg.: Fuerstenau D.W., Bnd. 8, Elsevier, Amsterdam, Netherlands
- Taga, E.M., Waheed, A., van Etten, R.L.** (1984), Structural and chemical characterization of a homogeneous peptide N-glycosidase from almond, *Biochem.*, 23: 815-822
- Tamura K., Yatsu, T., Itoh, H., Motoi, Y.** (1989), Isolation, characterization, and quantitative measurement of serum alpha 1-acid glycoprotein in cattle, *Nippon Juigaku Zasshi*, 51: 987-994
- Tarentino, A.L. & Plummer, T.H.** (1994), Enzymatic deglycosylation of asparagines-linked glycans: purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from *Flavobacterium meningospeticum*, *Methods Enzymol.*, 230:44-57
- Taira, T., Fujinaga, T., Tamura, K., Izumi, M., Itoh, H., Tsunoda, N., Yamashita, K., Okumura, M., Mizuno, S.** (1992), Isolation and characterization of alpha 1-acid glycoprotein from horses, and its evaluation as an acute-phase reaction protein in horses, *Am. J. Vet. Res.*, 53: 961-965
- Uchida, Y., Tsukada, Y., Sugimori, T.** (1979), Enzymatic Properties of Neuraminidases from *Arthrobacter ureafaciens*, *J. Biochem.*, 86: 573-585
- Virmani, M., Gupta, A.K., Garg, S.K.** (2003), Extraction, purification and characterization of equine chorionic gonadotropin (eCG) from pregnant mare's serum, *Indian J. Anim. Sci.*, 73(11): 1224-1228

- Wang, L., Sun, X., Gosh, R.** (2008), Purification of equine IgG using membrane based enhanced hybrid bioseparation technique: A potential method for manufacturing hyperimmune antibody, *Biotechno. Bioeng.*, 99(3): 625-633
- Ward, D.N., Moore W.T., Burleigh, B.D.** (1982), Structural studies on equine chorionic gonadotropin, *J. Protein Chem.*, 1(4): 263-280
- Williams, A.** (2001), *Overview of conventional chromatography*, John Wiley & Sons, New York
- Yakovleva, M. E., Safina, G.R., Danielsson, B.** (2010), A study of glycoprotein-lectin interactions using quartz crystal microbalance, *Anal. Chim. Acta*, 668(1): 80-85
- Yao, Y. & Lenhoff, A.M.** (2006), Pore size distributions of ion exchangers and relation to protein binding capacity, *J. Chromatogr. A*, 1126(1-2): 107-119

7 Anhang

7.1 Modifikation der Lösungsmittelfällung

Tabelle 7.1 zeigt das Ergebnis der Isolation von eCG aus Serum nach *Gospodarowicz und Papkoff* [1967] nach Variation der Parameter Temperatur und Ethanol-Konzentration (% v/v) bei der ersten Lösungsmittelfällung. Die Versuchsdurchführung erfolgte mit 500 mL Serum, welches mit 0,5 M meta-Phosphorsäure gefällt wurde. Der resultierende Überstand wurden im Verhältnis 1:1 geteilt. Die folgende Lösungsmittelfällung wurde bei 4 °C und 30 % v/v Ethanol bzw. -15 °C und 30 % v/v Ethanol durchgeführt. Die aufgeführten unterschiedlichen Volumina der Lyophilisate sind auf die divergente Löslichkeit der einzelnen Lyophilisate zurückzuführen.

Tabelle 7.1: Zusammenfassung der Daten für die Reinigung von eCG aus Serum unter Modifikation der Versuchsbedingungen im Rahmen der ersten Lösungsmittel-Fällung.

| Schritt | Protein [mg/mL] | eCG [IU _{ELISA} /mL] | Volumen [mL] | Ausbeute [%] | Aufreinigungs- faktor | Konzentrierungs- faktor |
|------------------------|--------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|----------------------------|
| Serum | 60 | 26 | 500 | 100 | 1 | 1 |
| HPO ₃ ppt | 13 | 19 | 600 | 86 | 3,3 | 0,7 |
| Lyophilisat (4°C) | 1,3 | 149 | 44 | 50 | 265 | 5,7 |
| Lyophilisat (-15°C) | 0,6 | 104 | 35 | 28 | 402 | 3,9 |

Durch eine Reduktion des Volumens an Ethanol von 50 % auf 30 % (v/v) beim ersten Fällungsschritt konnte keine Erhöhung der eCG-Ausbeute im Lyophilisat erreicht werden. Ebenso wurde ein mit dem Standardprotokoll vergleichbarer Aufreinigungs- sowie Konzentrierungsfaktor von 265 bzw. 5,7 erreicht. Bei gleichzeitiger Verringerung der Temperatur verringerte sich die Gesamtausbeute an eCG im Vergleich zum Standardprotokoll um 42 %. Die spezifische Aktivität des eCG betrug 21,6 IU_{ELISA} mg⁻¹ bei einer Reduktion des Lösungsmittels auf 30 % bzw. 26,3 IU_{ELISA} mg⁻¹ bei gleichzeitiger Reduktion der Temperatur auf -15 °C. Zum Vergleich ergibt sich eine spezifische Aktivität von 130 IU_{ELISA} mg⁻¹ bei der Durchführung des Standardprotokolls (Tabelle 4.1), bei einem vergleichbaren Gesamtproteingehalt des resultierenden Lyophilisates. Die höhere Trockengewichtsbestimmung der Fraktion nach Reduktion der Ethanol-Konzentration auf 30 % (v/v) beruht möglicherweise auf dem vermehrten Verbleib von Nukleinsäuren, welche erst ab höheren Konzentrationen an Ethanol präzipitieren [Pingoud & Urbanke, 1997]

7.2 DoE-Arbeitsblätter der Optimierung vorgelagerter Prozessschritte

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|----|--------|----------|-----------|-----------|----|----|----|--------|--------|--------|
| 1 | Exp No | Exp Name | Run Order | Incl/Excl | pH | CF | LF | eCG | GP | eCG/GP |
| 2 | 1 | N1 | 13 | Incl | -1 | -1 | -1 | 31 | 18,18 | 1,71 |
| 3 | 2 | N2 | 8 | Incl | 1 | -1 | -1 | 24,88 | 32,45 | 0,77 |
| 4 | 3 | N3 | 5 | Incl | -1 | 1 | -1 | 114,84 | 56,46 | 2,03 |
| 5 | 4 | N4 | 4 | Incl | 1 | 1 | -1 | 113,06 | 103,03 | 1,1 |
| 6 | 5 | N5 | 3 | Incl | -1 | -1 | 1 | 15,75 | 9,48 | 1,66 |
| 7 | 6 | N6 | 16 | Incl | 1 | -1 | 1 | 25,58 | 35,57 | 0,72 |
| 8 | 7 | N7 | 2 | Incl | -1 | 1 | 1 | 117,41 | 49,43 | 2,38 |
| 9 | 8 | N8 | 6 | Incl | 1 | 1 | 1 | 91,14 | 98,43 | 0,93 |
| 10 | 9 | N9 | 1 | Incl | -1 | 0 | 0 | 26,83 | 15,06 | 1,78 |
| 11 | 10 | N10 | 10 | Incl | 1 | 0 | 0 | 46,35 | 56,64 | 0,82 |
| 12 | 11 | N11 | 15 | Incl | 0 | -1 | 0 | 23,52 | 26,7 | 0,88 |
| 13 | 12 | N12 | 17 | Incl | 0 | 1 | 0 | 82,08 | 87,84 | 0,93 |
| 14 | 13 | N13 | 12 | Incl | 0 | 0 | -1 | 31,34 | 52,14 | 0,6 |
| 15 | 14 | N14 | 9 | Incl | 0 | 0 | 1 | 42,93 | 41,54 | 1,03 |
| 16 | 15 | N15 | 7 | Incl | 0 | 0 | 0 | 59,06 | 52,58 | 1,12 |
| 17 | 16 | N16 | 11 | Excl | 0 | 0 | 0 | 62,01 | 40,59 | 1,53 |
| 18 | 17 | N17 | 14 | Incl | 0 | 0 | 0 | 23,22 | 39,44 | 0,59 |

Abbildung 7.1: Reinheit (Spalte 10) des grob vorgereinigten Serums, welches mit meta-Phosphorsäure auf einen pH von 3 (-1), 3,5 (0) bzw. 4 (1) eingestellt wurde. Nach der Säurefällung wurde der Überstand durch Ultrafiltration (CF) um den Faktor 1 (-1), 2 (0) bzw. 5 (1) eingengt. Die Leitfähigkeit (LF₀/LF) wurde mittels Diafiltration um den Faktor 1 (-1) 5 (0) bzw. 10 (1) reduziert

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|----|--------|----------|-----------|-----------|----|----|----|--------|-------|--------|
| 1 | Exp No | Exp Name | Run Order | Incl/Excl | pH | CF | LF | eCG | GP | eCG/GP |
| 2 | 1 | N1 | 1 | Incl | -1 | -1 | -1 | 539,51 | 1,39 | 388,14 |
| 3 | 2 | N2 | 14 | Incl | 1 | -1 | -1 | 256,62 | 1,2 | 213,85 |
| 4 | 3 | N3 | 17 | Incl | -1 | 1 | -1 | 624,8 | 1,8 | 347,11 |
| 5 | 4 | N4 | 12 | Incl | 1 | 1 | -1 | 386,83 | 1,63 | 237,32 |
| 6 | 5 | N5 | 10 | Incl | -1 | -1 | 1 | 201,48 | 36 | 5,6 |
| 7 | 6 | N6 | 13 | Incl | 1 | -1 | 1 | 234,05 | 29,04 | 8,06 |
| 8 | 7 | N7 | 7 | Incl | -1 | 1 | 1 | 336,06 | 2,24 | 150,03 |
| 9 | 8 | N8 | 15 | Incl | 1 | 1 | 1 | 0,63 | 2,59 | 0,24 |
| 10 | 9 | N9 | 2 | Incl | -1 | 0 | 0 | 322,66 | 4,72 | 68,36 |
| 11 | 10 | N10 | 5 | Incl | 1 | 0 | 0 | 0,19 | 5,93 | 0,03 |
| 12 | 11 | N11 | 16 | Incl | 0 | -1 | 0 | 25,69 | 1,45 | 17,72 |
| 13 | 12 | N12 | 8 | Incl | 0 | 1 | 0 | 1,46 | 25,25 | 0,06 |
| 14 | 13 | N13 | 9 | Incl | 0 | 0 | -1 | 269,72 | 1,62 | 166,49 |
| 15 | 14 | N14 | 3 | Incl | 0 | 0 | 1 | 2,24 | 66,21 | 0,03 |
| 16 | 15 | N15 | 4 | Incl | 0 | 0 | 0 | 156,23 | 1,68 | 92,99 |
| 17 | 16 | N16 | 11 | Excl | 0 | 0 | 0 | 0 | 46 | 0 |
| 18 | 17 | N17 | 6 | Incl | 0 | 0 | 0 | 450,2 | 20,2 | 22,29 |

Abbildung 7.2: Reinheit (Spalte 10) des grob vorgereinigten Serums, welches mit meta-Phosphorsäure auf einen pH von 3 (-1), 3,5 (0) bzw. 4 (1) eingestellt wurde. Nach der Säurefällung wurde der Überstand durch Ultrafiltration (CF) um den Faktor 1 (-1), 2 (0) bzw. 5 (1) eingengt. Die Leitfähigkeit (LF₀/LF) wurde mittels Diafiltration um den Faktor 1 (-1) 5 (0) bzw. 10 (1) reduziert. Anschließend wurde die Proteinlösung mit Ethanol (50% v/v) und Ethanol (75% v/v) präzipitiert.

7.3 Bandenintensität im SDS-Page unter dem Einfluss von Ethanol

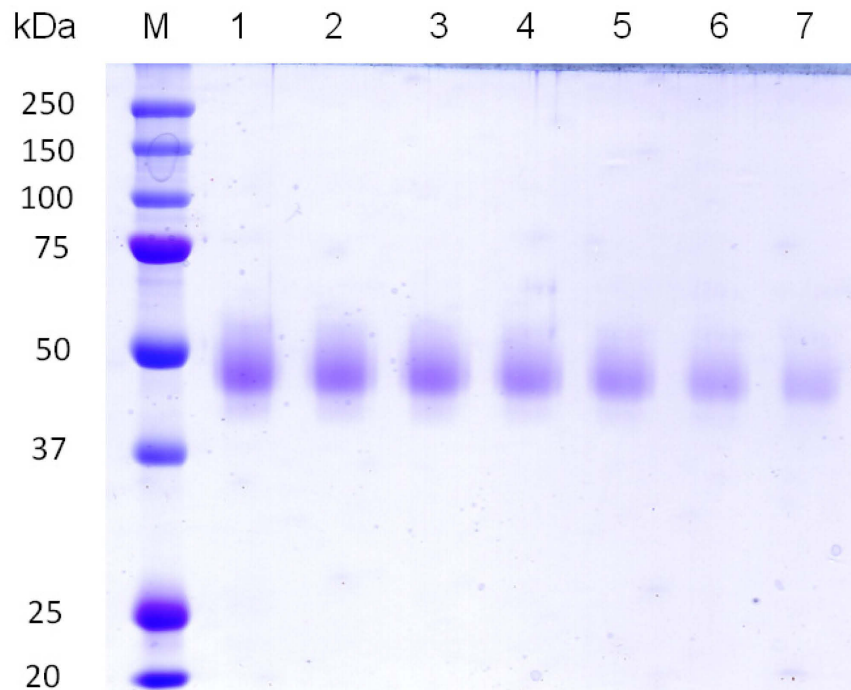


Abbildung 7.3: Einfluss der Ethanol-Konzentration auf die Bandenintensität eines Ultra-/Diafiltrates (UF/DF) im SDS-Page. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über ein 12 %-iges SDS-PAGE mit 5 %-igem Sammelgel, mit anschließender Coomassie-Färbung. Auftragung von je 8 μg Gesamtprotein. M: Marker (Firma Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland); 1: UF/DF (0 % v/v EtOH); 2: UF/DF (10 % v/v EtOH); 3: UF/DF (20 % v/v EtOH); 4: UF/DF (30 % v/v EtOH); 5: UF/DF (40 % v/v EtOH); 6: UF/DF (50 % v/v EtOH)

7.4 Programmstruktur des Reinigungsprozesses an der HGMF-Laboranlage

Tabelle 7.2: HGMF-Laboranlage

| Schritt | Pumpe [%] | Zeit [s] | Magnet [On/Off] | Rührer [On/Off] | gesammelte Fraktion |
|-------------------------|-----------|----------|--------------------|--------------------|------------------------|
| Load Feedstock | 30 | 2000 | ON | | Durchfluss |
| Waschpuffer ein (W1) | 25 | 240 | ON | | Wasch 1 |
| Partikel resuspendieren | 0 | 60 | | ON | |
| Partikel sammeln | 0 | 30 | ON | | |
| Partikel sammeln II | 25 | 120 | ON | | |
| Waschpuffer ein (W2) | 25 | 240 | ON | | Wasch 2 |
| Partikel resuspendieren | 0 | 60 | | ON | |
| Partikel sammeln | 0 | 30 | ON | | |
| Partikel sammeln II | 25 | 120 | ON | | |
| Waschpuffer ein (W3) | 25 | 240 | ON | | Wasch 3 |
| Partikel resuspendieren | 0 | 60 | | ON | |
| Partikel sammeln | 0 | 30 | ON | | |
| Partikel sammeln II | 25 | 120 | ON | | |
| Elutionspuffer ein (E1) | 25 | 60 | ON | | Wasch 4 |
| Partikel resuspendieren | 0 | 300 | | ON | |
| Partikel sammeln | 0 | 30 | ON | | |
| Partikel sammeln II | 25 | 120 | ON | | |
| Elutionspuffer ein (E2) | 25 | 110 | ON | | Elution 1 |
| Partikel resuspendieren | 0 | 300 | | ON | |
| Partikel sammeln | 0 | 30 | ON | | |
| Partikel sammeln II | 25 | 120 | ON | | |
| Elutionspuffer ein (E3) | 25 | 110 | ON | | Elution 2 |
| Partikel resuspendieren | 0 | 300 | | ON | |
| Partikel sammeln | 0 | 30 | ON | | |
| Partikel sammeln II | 25 | 120 | ON | | |
| Waschpuffer ein (W4) | 25 | 160 | ON | | Elution 3 |
| Partikel resuspendieren | 0 | 60 | | ON | |
| Partikel sammeln | 0 | 30 | ON | | |
| Partikel sammeln II | 25 | 120 | ON | | |
| Waschpuffer ein (W5) | 25 | 240 | ON | | Wasch 5 |
| Partikel resuspendieren | 0 | 60 | | ON | |
| Partikel sammeln | 0 | 30 | ON | | |
| Partikel sammeln II | 25 | 120 | ON | | |
| Waschpuffer ein (W6) | 25 | 240 | ON | | Wasch 6 |
| Partikel resuspendieren | 0 | 60 | | ON | |
| Partikel ausspülen | 70 | 900 | | ON | |

7.5 Programmstruktur des Reinigungsprozesses an der HGMF-Pilotanlage

Tabelle 7.3: HGMF-Pilotanlage erster HGMF-Prozess

| | Schritt | Pumpe [%] | Zeit [s] | Magnet [On/Off] | Rührer [%] | gesammelte Fraktion |
|----|-------------------------|-----------|----------|--------------------|------------|------------------------|
| | Load Feedstock | 100 | - | ON | 0 | Durchfluss |
| 1 | Waschpuffer ein (W1) | 75 | 180 | ON | 0 | Wasch 1 |
| 2 | Partikel resuspendieren | 0 | 120 | | 70 | |
| 3 | Pause | 0 | 5 | | 1 | |
| 4 | Partikel sammeln | 0 | 5 | ON | 0 | Wasch 2 |
| 5 | Loop spülen | 50 | 12 | ON | 0 | |
| 6 | Waschpuffer ein (W2) | 75 | 180 | ON | 0 | |
| 7 | Partikel resuspendieren | 0 | 120 | | 70 | |
| 8 | Pause | 0 | 5 | | 1 | |
| 9 | Partikel sammeln | 0 | 50 | ON | 0 | |
| 10 | Loop spülen | 50 | 120 | ON | 0 | Wasch 3 |
| 11 | Waschpuffer ein (W3) | 75 | 180 | ON | 0 | |
| 12 | Partikel resuspendieren | 0 | 300 | | 70 | |
| 13 | Pause | 0 | 5 | | 1 | |
| 14 | Partikel sammeln | 0 | 50 | ON | 0 | Wasch 4 |
| 15 | Loop spülen | 50 | 120 | ON | 0 | |
| 16 | Elutionspuffer ein (E1) | 50 | 120 | ON | 0 | |
| 17 | Partikel resuspendieren | 0 | 300 | | 70 | |
| 18 | Pause | 0 | 5 | | 1 | |
| 19 | Partikel sammeln | 0 | 50 | ON | 0 | |
| 20 | Loop spülen | 50 | 120 | ON | 0 | Elution 1 |
| 21 | Elutionspuffer ein (E2) | 50 | 120 | ON | 0 | |
| 22 | Partikel resuspendieren | 0 | 300 | | 70 | |
| 23 | Pause | 0 | 5 | | 1 | Elution 2 |
| 24 | Partikel sammeln | 0 | 50 | ON | 0 | |
| 25 | Loop spülen | 50 | 120 | ON | 0 | |
| 26 | Elutionspuffer ein (E3) | 50 | 120 | ON | 0 | |
| 27 | Partikel resuspendieren | 0 | 300 | | 70 | |
| 28 | Pause | 0 | 5 | | 1 | |
| 29 | Partikel sammeln | 0 | 50 | ON | 0 | Elution 3 |
| 30 | Loop spülen | 50 | 120 | ON | 0 | |
| 31 | Waschpuffer ein (W4) | 75 | 180 | ON | 0 | |
| 32 | Partikel resuspendieren | 0 | 300 | | 70 | |
| 33 | Pause | 0 | 5 | | 1 | Wasch 5 |
| 34 | Partikel sammeln | 0 | 50 | ON | 0 | |
| 35 | Loop spülen | 50 | 120 | ON | 0 | |
| 36 | Waschpuffer ein (W5) | 75 | 180 | ON | 0 | |
| 37 | Partikel resuspendieren | 0 | 300 | | 70 | |
| 38 | Pause | 0 | 5 | | 1 | |
| 39 | Partikel sammeln | 0 | 50 | ON | 0 | Wasch 5 |
| 40 | Loop spülen | 50 | 120 | ON | 0 | |
| 41 | Pause | 0 | 5 | | 0 | |
| 42 | Partikel resuspendieren | 0 | - | | 70 | |
| | Partikel ausspülen | 75 | - | | 100 | |

Die beiden in Tabelle 7.3 aufgeführten Schritte „Load Feedstock“ und „Partikel ausspülen“ waren eigenständige Programmcodes vor bzw. nach dem automatisierten HGMF-Prozess. Die Zeitdauer dieser Prozesse ist abhängig vom eingesetzten Suspensions- bzw. Spülvolumen.

Die drei weiteren durchgeführten HGMF-Prozesse unterschieden sich lediglich in den eingesetzten Volumina der Wasch- und Elutionspuffer.

Tabelle 7.4: HGMF-Pilotanlage zweiter HGMF-Prozess

| Schritt | Pumpe [%] | Zeit [s] | Magnet [On/Off] | Rührer [%] | gesammelte Fraktion | |
|---------|-------------------------|----------|-----------------|------------|---------------------|-----------|
| 16 | Elutionspuffer ein (E1) | 50 | 180 | ON | 0 | Elution 1 |
| 21 | Elutionspuffer ein (E2) | 50 | 180 | ON | 0 | Elution 2 |
| 26 | Elutionspuffer ein (E3) | 50 | 180 | ON | 0 | Elution 3 |

Tabelle 7.5: HGMF-Pilotanlage dritter und vierter HGMF-Prozess

| Schritt | Pumpe [%] | Zeit [s] | Magnet [On/Off] | Rührer [%] | gesammelte Fraktion | |
|---------|-------------------------|----------|-----------------|------------|---------------------|-----------|
| 1 | Waschpuffer ein (W1) | 65 | 180 | ON | 0 | Wasch 1 |
| 6 | Waschpuffer ein (W2) | 65 | 180 | ON | 0 | Wasch 2 |
| 11 | Waschpuffer ein (W3) | 65 | 180 | ON | 0 | Wasch 3 |
| 16 | Elutionspuffer ein (E1) | 50 | 180 | ON | 0 | Elution 1 |
| 21 | Elutionspuffer ein (E2) | 50 | 180 | ON | 0 | Elution 2 |
| 26 | Elutionspuffer ein (E3) | 50 | 180 | ON | 0 | Elution 3 |
| 31 | Waschpuffer ein (W4) | 65 | 180 | ON | 0 | Wasch 4 |
| 36 | Waschpuffer ein (W5) | 65 | 180 | ON | 0 | Wasch 5 |

7.6 Messung der Fließeigenschaften

Die Viskosität von Serum und grob gereinigtem Serum wurde mit Hilfe eines Rheometers (Anton Paar, Graz, Österreich) bei einer Temperatur von 20 °C bestimmt (Tabelle 7.6).

Tabelle 7.6: Bestimmung der Viskosität der eingesetzten Medien

| Probe | Viskosität [mPa s] |
|-------------------|--------------------|
| Wasser | 1,05 |
| Ultra-/Diafiltrat | 1,2 |
| Serum | 1,75 |

Bei steigender Temperatur (0-35 °C) konnte eine Abnahme der Viskosität des Serums bis auf 1,65 mPa s verzeichnet werden.

7.7 Optimierung der Waschschrirte im automatisierten HGMF-Prozess

Tabelle 7.7: Optimierung der Waschschrirte im HGMF-Prozess mit Leerserum (1) bzw. Leerserum welches mit Waschpuffer auf die Proteinkonzentration von UF/DF ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) eingestellt wurde (2)

| Wasch-schritt | je 3200 mL Waschpuffer | | je 2700 mL Waschpuffer | je 2200 mL Waschpuffer |
|---------------|---|---|---|---|
| | Proteinkonzentration im Ablauf (1) [mg/mL] | Proteinkonzentration im Ablauf (2) [mg/mL] | Proteinkonzentration im Ablauf (2) [mg/mL] | Proteinkonzentration im Ablauf (2) [mg/mL] |
| 1 | 10,5 | 0,21 | 0,25 | 0,35 |
| 2 | 5,8 | 0,04 | 0,03 | 0,07 |
| 3 | 1,45 | 0,02 | 0,04 | 0,02 |
| 4 | 0,16 | 0,01 | 0 | 0 |
| 5 | 0,05 | 0 | 0,04 | 0 |
| 6 | 0,01 | 0 | 0,02 | 0,01 |
| 7 | 0,01 | 0,01 | 0 | 0 |
| 8 | 0,02 | 0,01 | 0 | 0 |
| 9 | 0,01 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0,01 | 0 | 0 | 0 |

Bei dem Ausspülen der Partikel nach Beendigung des 10-ten Waschschrirtes des Versuches mit Leerserum (1) konnte eine Schaumentwicklung beobachtet werden, was auf den Verbleib von Proteinen im Separator auch nach dem 10-ten Waschschrirte hinweist.

7.8 Ligandenscreening

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie unter 3.5.3 beschrieben (experimenteller Teil). Unter der Verwendung des Q FF-Materials konnte die höchste Gesamtausbeute ($31,3 \% (\pm 1,7 \%)$) sowie der höchste Aufreinigungsfaktor (841 ± 38) erreicht werden (Tabelle 7.8). Aufgrund der vorgenommenen Filtration und dem daraus resultierenden Stufenverlust von 17% , vor der Injektion der Probe auf die Säule lag die absolute Beladung bei $833 \text{ IU}_{\text{ELISA}}$. Die ermittelten spezifischen Aktivitäten betragen im Fall des verwendeten Q FF-Materials $430 \text{ IU}_{\text{ELISA}} \text{ mg}^{-1} (\pm 17,1 \text{ IU}_{\text{ELISA}} \text{ mg}^{-1})$, unter dem Einsatz des DEAE-Materials $318 \text{ IU}_{\text{ELISA}} \text{ mg}^{-1} (\pm 42,6 \text{ IU}_{\text{ELISA}} \text{ mg}^{-1})$, bzw. $351 \text{ IU}_{\text{ELISA}} \text{ mg}^{-1} (\pm 39,9 \text{ IU}_{\text{ELISA}} \text{ mg}^{-1})$ im Fall des Q XL-Materials.

Tabelle 7.8: Zusammenfassung der Reinigung von eCG an konventionellen Chromatographiematerialien nach vereinfachter Vorreinigung (Kapitel 3.5.1.2)

| Reinigungs-schritt | Protein [mg/mL] | eCG [IU _{ELISA} /mL] | Volumen [mL] | Ausbeute [%] | Aufreinigungs-faktor | Konzentrierungs-faktor |
|----------------------|-----------------|-------------------------------|--------------|--------------|----------------------|------------------------|
| Serum | 64 | 43,8 | 30,2 | 100 | 1 | 1 |
| HPO ₃ ppt | 7,24 | 31,2 | 36,2 | 85,4 | 6,29 | 0,71 |
| UF/DF | 0,49 | 186 | 5,3 | 74,45 | 556 | 4,25 |
| Filtrat | 0,46 | 185 | 4,5 | 62,94 | 588 | 4,22 |
| Eluat (Q FF) | 0,24±0,01 | 138±7,6 | 3±0 | 31,3±1,7 | 841±38 | 3,2±0,17 |
| Eluat (DEAE) | 0,35±0,02 | 160±10,8 | 2±0 | 24,2±1,6 | 674±16,3 | 3,7±0,25 |
| Eluat (Q XL) | 0,24±0,01 | 131±2,3 | 3±0 | 29,8±0,5 | 800±26,5 | 3±0,05 |

Abbildung 7.4 zeigt exemplarisch das Elutionsdiagramm an Q FF des Proteins eCG.

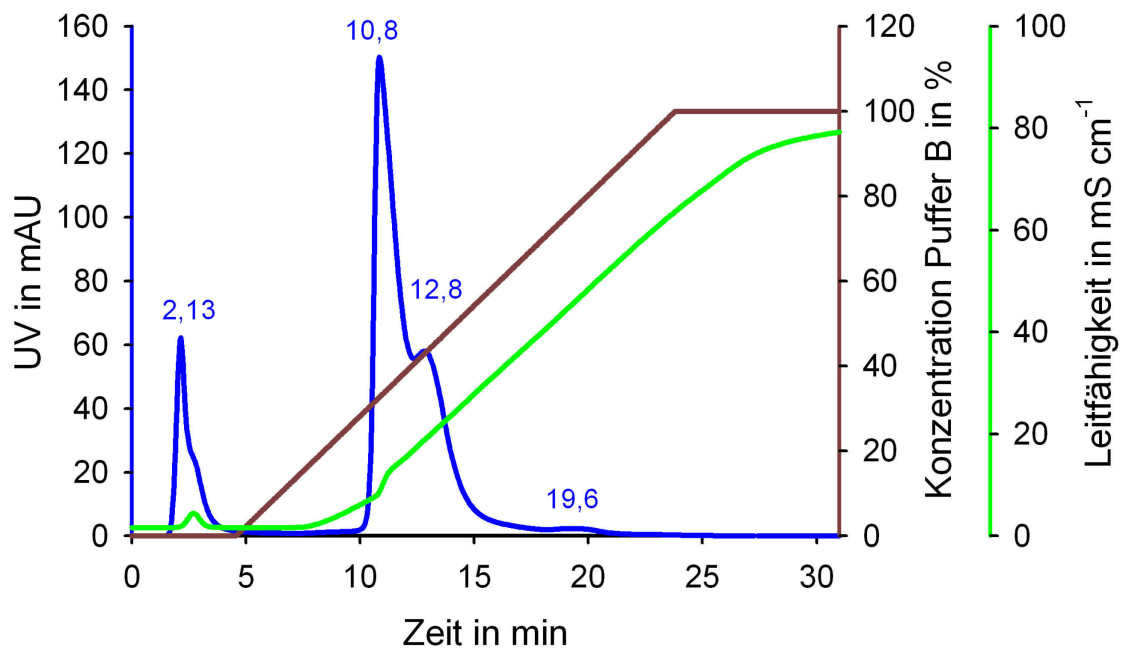


Abbildung 7.4: Elutionsdiagramm an Q FF des Proteins eCG bei einer absoluten Beladung von 833 IU_{ELISA}. Linearer Gradient: 0-1 M NaCl über 20 Säulenvolumen; Fluss: 1 mL min⁻¹. Äquilibrierungs- und Probenaufnahme-puffer: 0,02 M Ammoniumacetat, pH 4,5; Elutionspuffer (Puffer B): 0,02 M Ammoniumacetat, 1 M NaCl, pH 4,5. UV Detektion bei 280 nm

Bei einer Retentionszeit von 2,13 min konnte ein Durchflusspeak von 49,4 mAU detektiert werden. Das Protein eCG wurde nach 10,8 min von der Säule eluiert, was einer korrigierten Retentionszeit von 6,3 min entspricht. Die Höhe des eCG-Elutionspeaks betrug 181 mAU. Im

zweiten Elutionspeak bei einer Retentionszeit von 12,8 min konnte kaum eCG nachgewiesen werden (korrigierten Retentionszeit: 8,2 min).

Im Gegensatz zu dem dargestellten Q FF-Material zeigten die Materialien DEAE und Q XL eine schlechtere Trennleistung mit lediglich einem eCG-Elutionspeak bei einer Retentionszeit von 15,4 min bzw. 15,6 min, was einer korrigierten Retentionszeit von 6,3 min bzw. 6,5 min entspricht (Daten nicht gezeigt).

7.9 Formelzeichen und Symbole

Lateinische Symbole

| | | |
|------------------|---------------------------------------|---|
| A_{Sep} | Separatorquerschnittsfläche | m^2 |
| A | Aufreinigungsfaktor | - |
| B | magnetische Flussdichte | T |
| c | Konzentration | mol L^{-1} |
| D_m | Demagnetisierungsfaktor | - |
| F | Kraft | N |
| F_M | Magnetkraft | N |
| H | magnetische Feldstärke | A m^{-1} |
| I | Stromstärke | A |
| J | magnetische Polarisation | T |
| J_R | Remanenzpolarisation | T |
| J_S | Sättigungspolarisation | T |
| K_d | Gleichgewichtskonstante nach Langmuir | mol L^{-1} |
| L | Länge | m |
| m | Masse | kg |
| \dot{m} | Massenstrom | kg s^{-1} |
| M | Magnetisierung | $\text{A m}^2 \text{ kg}^{-1}$ bzw. A m^{-1} |
| M_P | Partikelmagnetisierung | A m^{-1} |
| M_R | Remanenzmagnetisierung | A m^{-1} |

| | | |
|---------------------|---|-----------------------|
| M_S | Sättigungsmagnetisierung | $A\ m^{-1}$ |
| m_{Prot} | Proteinmasse | kg |
| m_{Zyklus} | Partikelmasse, die vom Filter in einem Zyklus aufgenommen werden kann | kg |
| n | Windungszahl | - |
| P | Produktivität | $kg\ s^{-1}\ m^{-3}$ |
| q_3 | Verteilungsdichte | $l\ \mu\text{m}^{-1}$ |
| Q_3 | Verteilungssumme | % |
| Q_{max} | Maximalbeladung | $kg\ kg^{-1}$ |
| Q_{ZP}^* | Gleichgewichtbeladung an Zielprotein | $kg\ kg^{-1}$ |
| QV | Kapazitätsverhältnis | - |
| t | Zeit | s |
| t_{Zyklus} | Zyklusdauer | s |
| V | Volumen | m^3 |
| \dot{V} | Volumenstrom | $m^3\ s$ |
| V_{Sep} | Filtervolumen | m^3 |
| V_P | Partikelvolumen | m^3 |
| Y | Ausbeute | - |

Griechische Symbole

| | | |
|----------|---|--------------------|
| κ | Volumenssuszeptibilität | - |
| μ_0 | Magnetische Feldkonstante (Vakuumpermeabilität) | $Vs\ A^{-1}m^{-1}$ |
| μ_r | Permeabilitätszahl | - |
| σ | Filterkapazität | $kg\ m^{-3}$ |

7.10 Verwendete Abkürzungen

| | |
|------|-----------------------------------|
| ATPS | Aqueous Two Phase Systems |
| AGM | Alternating Gradient Magnetometer |

| | |
|--------------|---|
| AGP | saures alpha-1-Glykoprotein |
| BCA | Bicinchoninic Acid |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| CF | Konzentrationsfaktor |
| CHO | Chinesische Hamster Ovarzellen |
| DEAE | Diethylaminoethyl |
| DSP | Downstream-Processing |
| eCG | equines Choriongonadotropin |
| EBA | Expanded Bed Adsorption |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| ESEM | Environmental scanning electron microscope |
| FSH | Follikelstimulierendes Hormon |
| GFP | grün fluoreszierende Protein |
| h | Stunde |
| hCG | humanes Choriongonadotropin |
| HGMF | High Gradient Magnetic Fishing |
| HGMS | High Gradient Magnetic Separation |
| IEX | Ionenaustauschchromatographie |
| IU | international Unit (bei eCG 1 IU \approx 100 ng) |
| kDa | Kilodalton |
| L | Liter |
| LF | Leitfähigkeit |
| LH | luteinisierendes Hormon |
| MALDI-ToF-MS | Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation –Time-Of-Flight-Mass-Spectrometry |
| mAU | milli Absorbance Units |
| min | Minute |
| mL | Milliliter |

| | |
|----------|---|
| PMF | peptide mass fingerprint |
| PNGase F | Peptid-N-Glykosidase F |
| ppm | parts per million |
| ppt | Präzipitation |
| PVA | Polyvinylalkohol |
| PVAc | Polyvinylacetat |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration |
| pI | isoelektrischer Punkt |
| ROT | Rattenovartest |
| s | Sekunde |
| SDS-Page | sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| UF/DF | Ultra-/Diafiltrat |
| V | Ventil |