

# **Thermoresponsive chromatographische Bioseparation von Proteinen**

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  
Tobias Karl Hubert Müller, Dipl.-Ing.  
aus Limburg/ Lahn

Referent: Prof. Dr.-Ing. Matthias Franzreb

Korreferent: Prof. Dr.-Ing. Jürgen Hubbuch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2013



„Das Schönste, was wir erleben können, ist das Geheimnisvolle.“

- Albert Einstein -



## Danksagung

Ich möchte mich hiermit ausdrücklich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran möchte ich mich bei meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr.-Ing. Matthias Franzreb für die Möglichkeit der Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe, seine außerordentliche Unterstützung, die vielen konstruktiven Diskussionen und Verbesserungsvorschläge, die eingeräumten Freiräume für eigene Ideen und die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Prof Dr.-Ing. Jürgen Hubbuch danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Owen R.T. Thomas, Ping Cao und Evan Hsu an der Universität Birmingham, für die hervorragende Zusammenarbeit während meines Aufenthaltes in England, sowie die Zeit davor und danach.

Ich bedanke mich recht herzlich bei Dr. Eric von Lieres und Sebastian Schnittert vom Forschungszentrum Jülich, sowie Anna Osberghaus vom KIT-CS für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Entwicklung eines chromatographischen Modells.

Ausdrücklich danke sagen möchte ich Herrn MSc. Jonas Wohlgemuth und Herrn Mike Fübler, ohne die die technische Umsetzung meiner Ideen und der konstruktive Teil dieser Arbeit nicht in diesem Maße möglich gewesen wären.

Ich bedanke mich bei Stephanie Ewert, Sandra Roth, Stewart Mein und Bastian Burgert, die im Rahmen ihrer Diplomarbeit, Praxisarbeit oder Laborantenausbildung zu dieser Arbeit beigetragen haben. Außerdem bedanke ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe ‚Prozesstechnik partikelbasierter Grenzflächen‘ und allen Mitarbeitern des IFG für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ein Dank geht auch an alle Teilnehmer des alldienstäglichen „DOx-Day“.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden. Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, ohne die meine gesamte Ausbildung nicht möglich gewesen wäre. Katharina möchte ich vor allem für die Unterstützung in schwierigen Zeiten Danke sagen.



## Zusammenfassung

Thema der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Affinität diverser kommerziell erhältlicher und neuartiger chromatographischer Sorbentien bezüglich der Adsorption von Proteinen. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand außerdem die Entwicklung eines neuartigen Bioseparationsreaktors zur gezielten Ausnutzung dieser temperatur-induzierbaren Affinitätsänderung für eine innovative und kontinuierlich arbeitende Technik zur flüssigchromatographischen Separation von Bioprodukten. Die Arbeit war dabei Teil eines durch die EU geförderten Projektes (MagPro<sup>2</sup>Life) zur Entwicklung neuartiger magnetischer Sorbentien und integrierter Methoden zur kostengünstigen und großtechnischen Aufreinigung von Zielproteinen aus den Bereichen Futtermittel, Ernährung und Pharmazie.

Der bereits in der Literatur beschriebene Einfluss der Temperatur auf die Stärke der Adsorption von Proteinen auf kommerziell erhältlichen Sorbentien für die Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) wurde in dieser Arbeit näher untersucht. Bei Verwendung vergleichsweise geringer Mengen an kosmotropen Salzen bis maximal 0,5 M Ammoniumsulfat im umgebenden Medium, wurden stationäre Phasen mit unterschiedlichen Funktionalisierungen und Ligandendichten im Temperaturbereich bis 40°C zunächst auf die Stärke des Temperatureinflusses in absatzweisen Experimenten untersucht. Das vielversprechendste Sorbens Butyl Sepharose 4 FF wurde daraufhin in säulenchromatographischen Versuchsreihen weitergehend untersucht. Neben der Möglichkeit einer rein auf Temperaturwechsel basierten Sorbensregeneration, sowie einer möglichen Fraktionierung von Proteinen durch Wechsel der Umgebungstemperatur, wurde auch auf den nachteiligen Effekt des Protein-Unfolding bei erhöhten Temperaturen eingegangen. Die durch Temperaturwechsel erreichten Beladungsdifferenzen waren allerdings recht gering und nicht ausreichend für einen rentablen Einsatz im neu entwickelten Reaktorsystem. Bei Verwendung höherer Salzkonzentrationen bis 1 M Ammoniumsulfat konnten diese allerdings deutlich gesteigert werden.

Durch die spezielle Funktionalisierung konventioneller poröser Chromatographiemedien mit einer Polymermatrix aus thermoresponsiven und geladenen Gruppen wurde durch einen Projektpartner an der Universität Birmingham (UBI) eine neue Klasse von Ionenaustauschermedien (thermoCEX) hergestellt. In Abhängigkeit der Temperatur zeigten diese im Vergleich zu den zuvor beschriebenen HIC-Sorbentien deutlich höhere Kapazitätsunterschiede. Die erreichbaren ionischen Kapazitäten (ca. 25-40  $\mu\text{mol H}^+$  (mL Medium)<sup>-1</sup>) waren zwar im Vergleich zu konventionell erhältlichen Ionenaustauschermedien wie SP Sepharose FF auf

Sepharosebasis bis zu einem Faktor 10 geringer, trotzdem konnten maximale Sättigungsbeladungen von etwa  $30\text{-}80\text{ mg mL}^{-1}$  mit dem Modellprotein Lactoferrin festgestellt werden. Der Temperatureffekt auf die Proteinadsorption konnte außerdem erstmals auch an pharmazeutisch interessanten Antikörperfragmenten nachgewiesen werden.

In chromatographischen Experimenten bei Gesamttemperierung einer mit thermoCEX-Partikeln gepackten Festbettsäule konnte der Trend einer zunehmenden Bindekapazität bei Temperaturerhöhung auch im dynamischen Fall bestätigt werden. Darüber hinaus konnte Protein in signifikanten Mengen rein isokratisch durch Veränderung der Temperatur eluiert werden. Durch die Notwendigkeit einer anschließenden Säulenregeneration, ist dieses bereits in der Literatur beschriebene System allerdings nicht in der Lage größere Zulaufströme kontinuierlich aufzureinigen.

Zur Steigerung der Produktivität und des Durchsatzes wurde daher mit der Entwicklung des Travelling Cooling Zone Reactor (TCZR) der Grundstein zur kontinuierlichen thermoresponsiven Chromatographie in dieser Arbeit gelegt. Eine linear bewegliche und in ihrer Geschwindigkeit genau einstellbare Kühlzone ist um eine mit thermoCEX-Partikeln gepackte, temperierbare Festbettsäule gelagert. Bei einer minimalen Geschwindigkeit von  $0,1\text{ mm s}^{-1}$  ist die Kühlzone in der Lage, einen Temperaturabfall von  $22,6\text{ °C}$  im Säuleninneren auf einer Länge von etwa  $2\text{ cm}$  zu generieren. Durch die Bewegung der Kühlzone entlang der Säule in Flussrichtung der mobilen Phase konnte gezeigt werden, dass Protein in erhöhten Konzentrationen isokratisch eluiert werden kann, während die Säule im Einlaufbereich bereits wieder beladen wird. Entscheidende Prozessparameter konnten im Einstoffsystem mit Lactoferrin als Modellprotein identifiziert werden. Mit den erhaltenen Daten konnte die Trennung eines binären Proteingemisches aus BSA und Lactoferrin ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden. Aufgrund mangelnder Druckstabilität und Massentransportlimitierung während der Elution wurden die porösen Basispartikel als durchsatzlimitierende Faktoren ausgemacht. Als alternatives Basismaterial wurden daher im Rahmen dieser Arbeit auch Monolithe mit thermoresponsiven Liganden funktionalisiert und auf ihren möglichen Einsatz im TCZR System getestet.

Den Abschluss der Arbeit bildete die Erweiterung und Anwendung eines Simulationsprogramms für chromatographische Trennprozesse auf den Fall der Bioseparation mittels des TCZR. Der Einfluss allgemeiner chromatographischer Prozessparameter und spezieller Parameter des TCZR-Systems konnten somit beurteilt und komplexere Trennprozesse *in silico* bereits durchgeführt werden.

## Summary

The presented work focussed on the investigation of the influence of temperature on the protein adsorption affinity of commercially available, as well as recently developed new chromatographic sorbents. The gained results served as basis for the development of a novel chromatographic separation device for continuous bioseparation, taking advantage of the effect of thermoresponsive changes in the adsorption affinity of the new sorbents. The activities were performed as part of a project (MagPro<sup>2</sup>Life) within the 7<sup>th</sup> framework programme of the European Union, whose aim is to develop new magnetically based sorbents and integrated processes for low-cost and large-scale purification of target proteins in the fields of feed, food and pharma.

The already described influence of the temperature onto the adsorption of proteins, regarding commercially available sorbents used for Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) was examined more closely. While using relatively low concentrations of the cosmotropic salt ammonium sulphate with a maximum concentration of 0,5 M and a temperature range of 10-40°C, certain resins differing in ligand types and ligand densities, were investigated in batchwise experiments upon their protein adsorption strengths. The most promising candidate Butyl Sepharose 4 FF was chosen to be investigated by further column chromatographic experiments. The possibilities of purely temperature-dependent resin regeneration as well as of protein fractionation have been proved. However, also the effect of increasing protein unfolding during protein adsorption at elevated temperatures could be observed in certain cases. Despite the proof of concept, the loading differences in the investigated low-salt regime were comparatively low. When working at higher ammonium sulfate concentrations of up to 1 M, the loading differences increased, making the sorbents also an interesting alternative for the use in the novel separation device.

A project partner at the University of Birmingham (UBI) produced a new class of cation exchange sorbents, by functionalizing conventional gelfiltration resins with a copolymer of thermoresponsive and negatively charged groups (thermoCEX). Compared to the previously described HIC sorbents, these resins showed higher loading differences in dependence of temperature. Compared to the conventional Sepharose-based cation exchange resin SP Sepharose FF, the ionic capacities were only about 25-40  $\mu\text{mol H}^+$  (mL media)<sup>-1</sup>, which means a ten times lowered value. Nevertheless, even in this case the maximum saturation capacity with the model protein Lactoferrin was in the range of 30-80 mg mL<sup>-1</sup>. Furthermore, the temperature

influence onto pharmaceutical interesting antibody fragments could be demonstrated for the first time.

ThermoCEX-sorbents were packed into fixed-bed columns and used for conventional thermoresponsive chromatographic experiments by tempering the whole column. Dynamic binding capacities increased with increasing temperatures, revealing the previously described effect. By tempering the whole column, substantial masses of protein could be eluted isocratically by single temperature shifts, but the column had to be regenerated and equilibrated afterwards. This corresponds to a limitation as this technique is only applicable in a non-continuous bioseparation mode.

Hence, to increase productivity and throughput in thermoresponsive chromatography, the Travelling Cooling Zone Reactor (TCZR) was developed to be used in combination with thermoCEX sorbents without the need of any additional regeneration steps. In a TCZR, a linear movable temperature zone, surrounding a fixed-bed column filled with thermoCEX sorbents, can be moved along the separation column at an adjustable speed. When choosing a minimum velocity of  $0.1 \text{ mm s}^{-1}$  the temperature zone is able to generate a temperature drop of  $22.6^\circ\text{C}$  within a narrow section of the fixed-bed column of only 2 cm. By moving the temperature zone along the separation column in the flow direction of the mobile phase, protein could be eluted in high concentrations with every single movement of the temperature zone while protein solution could be loaded simultaneously. Important process parameters were identified when using Lactoferrin as single model protein. By evaluating and analyzing this data, a binary mixture of BSA and Lactoferrin could be successfully separated continuously.

Mass transport limitations while protein elution as well as low pressure stabilities of the used porous particles were identified to limit the throughput of the whole process. Therefore, within this work also monoliths were thermoresponsively functionalized and tested for their possible application within the TCZR system.

Work was completed by the extension and application of a simulation software for liquid chromatography for the special case of continuous bioseparation within the TCZR system. The influence of chromatographic process parameters as well as special TCZR parameters was evaluated and the separation of more complex and sophisticated separation tasks could be demonstrated *in silico*.

# Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	i
Zusammenfassung.....	iii
Summary .....	v
1 Einleitung und Zielsetzung .....	1
2 Grundlagen und Stand der Technik.....	3
2.1 Methoden und Trends der Bioproduktaufarbeitung .....	3
2.2 Theorie der Proteinadsorption.....	9
2.3 Flüssigkeitschromatographie von Bioprodukten .....	13
2.3.1 Prozessparameter der Chromatographie.....	16
2.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie .....	21
2.3.3 Ionenaustauschchromatographie .....	23
2.3.4 Kontinuierliche chromatographische Techniken .....	24
2.3.5 Monolithchromatographie.....	27
2.4 Temperatureffekt der Proteinadsorption auf HIC.....	28
2.5 Thermoresponsive Polymere und Sorbentien .....	29
2.5.1 Intelligente Polymere .....	30
2.5.2 Thermoresponsive Polymere .....	31
2.5.3 Anwendungsmöglichkeiten von thermoresponsiven Polymeren .....	37
2.5.4 Thermoresponsive Chromatographie .....	38
2.6 Chromatographische Modellierung und Simulation.....	44
3 Der Travelling Cooling Zone Reactor .....	48
3.1 Das Prinzip des Travelling Cooling Zone Reactors.....	49
3.2 Besondere Prozessparameter für den Betrieb des TCZR .....	52
4 Konstruktiver Teil .....	55
4.1 Gesamtanlage.....	55
4.2 TCZR-System im Überblick .....	56
4.3 Einzelkomponenten .....	57
4.3.1 Temperaturzone.....	58
4.3.2 Trennsäule.....	61
4.3.3 Temperatursteuerung und Temperaturlaufzeichnung .....	61

---

4.4	Simulation der Wärmeverteilung im Bereich der Kühlzone.....	63
5	Experimenteller Teil .....	69
5.1	Verwendete Chemikalien .....	69
5.2	Verwendete biologische Puffer .....	69
5.3	Modellproteine.....	70
5.4	Verwendete kommerzielle Sorbentien und Säulen .....	72
5.5	Proteinanalytik .....	74
5.5.1	Photometrie .....	74
5.5.2	Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	74
5.5.3	BCA-Assay.....	75
5.5.4	Peakflächenauswertung .....	75
5.6	Herstellung thermoresponsiver Sorbentien.....	76
5.6.1	Partikel als stationäre Phase .....	76
5.6.2	Monolithe als stationäre Phase.....	79
5.7	Sorptionsversuche auf HIC Sorbentien .....	80
5.7.1	Adsorptionsisothermen.....	80
5.7.2	Dynamische Bestimmung der Gleichgewichtsbindingkapazität .....	81
5.7.3	Pulsantwortexperimente.....	81
5.7.4	Temperaturinduzierte Säulenregeneration .....	82
5.7.5	Temperaturinduzierte Proteinfraktionierung .....	82
5.7.6	Untersuchungen zur temperaturabhängigen Proteinadsorption bei erhöhten Salzkonzentrationen.....	83
5.8	Charakterisierung der thermoCEX-Partikel .....	83
5.8.1	Adsorptionsisothermen.....	83
5.8.2	Ionische Kapazität.....	85
5.9	Säulenpacken .....	86
5.9.1	TCZR-Edelstahlsäule .....	87
5.9.2	Borosilikatglassäule .....	88
5.10	Konventionelle thermoresponsive Chromatographie.....	88
5.10.1	Elutionsversuche .....	88
5.10.2	Durchbruchskurven .....	89
5.11	Thermoresponsive Monolithchromatographie.....	89

---

5.12	Temperaturmessungen im Säulenzentrum.....	89
5.13	Absatzweise TCZR-Tests .....	90
5.14	Kontinuierliche TCZR Tests.....	91
5.15	Simulation des TCZR-Prozesses.....	92
6	Ergebnisse und Diskussion .....	95
6.1	Temperatureffekt bei der HIC von Proteinen .....	95
6.1.1	Adsorption von BSA auf HIC-Sorbentien .....	96
6.1.2	Thermodynamische Analyse der Adsorption von BSA auf HIC- Sorbentien .....	103
6.1.3	Entfaltung von BSA auf Butyl Sepharose.....	105
6.1.4	Temperaturinduzierte Säulenregeneration .....	109
6.1.5	Temperaturinduzierte Proteinfractionierung .....	111
6.1.6	Optimierung des Temperatureinflusses der Proteinadsorption auf Butyl Sepharose. .....	113
6.2	Charakterisierung thermoresponsiver Sorbentien .....	116
6.2.1	Ionische Kapazitäten .....	117
6.2.2	Adsorptionsisothermen von Proteinen auf thermoresponsiven IEX-Partikeln.....	119
6.3	Konventionelle thermoresponsive Chromatographie .....	128
6.4	Temperaturprofile innerhalb des verwendeten TCZR-System .....	132
6.5	Absatzweise Untersuchung des TCZR-Systems.....	135
6.5.1	Absatzweise Untersuchung mit SCL6B-ItBA.....	136
6.5.2	Absatzweise Untersuchung mit S6pg-ItBA.....	143
6.5.3	Fazit und Vergleich der eingesetzten thermoCEX-Partikel .....	147
6.6	Kontinuierliche Anwendung des TCZR .....	148
6.6.1	Einfluss der Zulaufkonzentration .....	148
6.6.2	Optimierung der Verfahrensführung .....	153
6.6.3	Kontinuierliche Proteintrennung .....	156
6.7	Anwendung der thermoresponsiven Monolithchromatographie .....	160
6.8	Parameterstudie der Prozesssimulation des TCZR.....	162
6.8.1	Einfluss ausgewählter chromatographischer Parameter .....	163
6.8.2	Kontinuierliche Trennung komplexer Systeme .....	169
7	Fazit und Ausblick.....	175
8	Literaturverzeichnis.....	178

---

9	Anhang .....	189
9.1	Weitere Daten zur chromatographischen Simulation.....	189
9.1.1	Umrechnungen.....	189
9.1.2	Temperaturprofile .....	189
9.2	Salzabhängigkeit der Beladungskapazität der thermoCEX Partikel .....	190
9.3	Adsorptionskinetik von BSA auf Butyl Sepharose 4FF.....	192
9.4	Charakterisierung der thermoCEX-Partikel .....	193
9.4.1	Adsorptionskinetiken von Lactoferrin.....	193
9.4.2	NaOH-Beständigkeit .....	194
9.4.3	Regeneration der Sorbentien .....	196
9.4.4	ESEM-Aufnahmen.....	197
9.5	Adsorptionsisothermen auf weiteren Materialien .....	198
9.6	Weitere getestete Proteine.....	200
9.7	Vorbereitung zur SDS-PAGE .....	201
9.7.1	Pufferherstellung.....	201
9.7.2	SDS-PAGE Gelherstellung .....	202
9.8	Daten zum verwendeten Lactoferrin .....	203
9.9	Daten zum Antikörperfragment a33Fab .....	204
9.9.1	Fermentation und Aufreinigung.....	204
9.9.2	Aminosäuresequenz .....	205
9.10	Weitere TCZR-Ergebnisse .....	206
9.10.1	Absatzweise Versuchsdurchführung .....	206
9.10.2	Abnahme der Zulaufkonzentrationen .....	209
	Symbole und Abkürzungen .....	211

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Die Produktion von biotechnologisch produzierten Makromolekülen wie Proteinen, Enzymen und Antikörpern nimmt stetig zu. Im Vergleich zu chemisch synthetisierten Molekülen stellt die anschließend notwendige Aufarbeitung (das sog. Downstream Processing) der zumeist fermentativ hergestellten Moleküle, die Verfahrenstechnik vor größere Herausforderungen. Biologisch synthetisierte Moleküle liegen zunächst häufig intrazellulär, in geringen Konzentrationen und zusammen mit einer Vielzahl ähnlicher Moleküle vor. Zudem muss zum Erhalt der biologischen Aktivität die sensitive dreidimensionale Struktur der Moleküle konserviert werden.

Eine Reihe spezieller Aufarbeitungsmethoden hat sich für diese speziellen Trenaufgaben im Bereich der Bioverfahrenstechnik etabliert, wobei die Flüssigkeitschromatographie eine der wichtigsten Methoden darstellt. So kann diese Technik sowohl in der qualitativen und quantitativen Analytik, als auch für die präparative Probenaufarbeitung angewendet werden. Auch die Möglichkeit der Anwendung im nicht-linearen Adsorptionsbereich unter Einsatz von Zulaufströmen mit erhöhten Produktkonzentrationen und/oder Volumina ist ein entscheidendes Kriterium für die Wahl dieser Separationsvariante. Zudem kann die Trennleistung durch geschickte Kombination verschiedener chromatographischer Techniken entscheidend erhöht werden, z.B. durch sukzessive Anwendung von Hydrophober Interaktionschromatographie und Ionenaustauschchromatographie. Die zumeist in Festbettsäulen gepackten stationären Phasen unterscheiden sich hierbei nicht nur durch die Beschaffenheit der Grundpartikel, sondern vor allem durch die Wahl der verwendeten Liganden und deren Dichte auf der Partikeloberfläche.

Obgleich schon eine große Anzahl unterschiedlicher Adsorptionstechniken und Liganden beschrieben sind und angewendet werden, geht die Forschung in diese Richtung noch immer weiter. Eine noch relativ neue Klasse von chromatographischen stationären Phasen stellen die mit sogenannten intelligenten Polymeren funktionalisierten thermoresponsiven Sorbentien dar. Durch Verwendung spezieller thermoresponsiver Monomere in Kombination mit ladungstragenden Gruppen wird ein spezielles Polymergerüst auf der Oberfläche von Basispartikeln synthetisiert. Dadurch kann der physikalische Parameter Temperatur gezielt zur Beeinflussung der Proteinadsorption auf diesen Partikeln genutzt werden.

Nachteilig bei den aktuell zumeist verwendeten chromatographischen Verfahren ist ihre Beschränkung auf eine rein absatzweise Durchführung. Nach anfänglicher Beladung der Säule mit

einem Zulaufstrom definierter Konzentration und Auswaschen nur schwach gebundener Komponenten durch reinen Puffer, wird die Zielkomponente zumeist durch Variation der Pufferzusammensetzung mittels Stufen- oder Gradientenelution fraktioniert. Für eine erneute Benutzung der Säule ist eine vorhergehende Reinigung unerlässlich. Zum einen werden hierfür große Mengen an teuren und teils umweltgefährdenden Puffern und Lösungsmitteln benötigt, die anschließend nach nur einmaligem Gebrauch kostenintensiv entsorgt werden müssen. Zum anderen schränkt diese Art und Weise der Verfahrensführung auch den volumetrischen Durchsatz und die Produktivität erheblich ein.

Der Wunsch nach einer intensivierten, ressourcenschonenden, grünen und nachhaltigen chromatographischen Bioseparationsmethode wurde daher speziell in den letzten Jahren laut. Ein Ansatz in die gewünschte Richtung, ist die Entwicklung kontinuierlich arbeitender Techniken. Die bis dato am häufigsten beschriebene und industriell eingesetzte kontinuierliche chromatographische Trennmethode ist die sogenannte Simulated Moving Bed-Technologie. Durch geschickte Ventilschaltung eines aus mehreren Einzelsäulen bestehenden Säulenringsystems kann ein Zulaufstrom kontinuierlich in Extrakt- und Raffinatstrom getrennt werden. Allerdings kann auch bei dieser Technik nicht auf die Verwendung verschiedener Puffer und Lösungsmittel verzichtet werden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, eine neue Methode zur kontinuierlichen und isokratischen Trennung von Proteinen zu entwickeln. Der hierbei verwendete Ansatz ist die Kombination der beschriebenen thermoresponsiven Sorbentien und eines neuartigen Chromatografiesäulenkonzeptes. Nach Planung und Konstruktion eines Prototyps des Systems sollte ein Machbarkeitsnachweis des Gesamtkonzepts durch die kontinuierliche Proteinakkumulation eines einzelnen Proteins am Prototyp durchgeführt werden und wichtige Prozessparameter identifiziert werden. Schließlich sollte gezeigt werden, dass das System auch in der Lage ist kontinuierlich Proteine voneinander zu trennen. Des Weiteren sollten auch kommerziell erhältliche HIC Partikel auf ihre Anwendbarkeit im System untersucht und Möglichkeiten zur Optimierung grundsätzlich erprobt werden. Ein chromatographisches Simulationsprogramm sollte schließlich etabliert werden, um in Zukunft *in silico* planen und optimieren zu können und generell ein tieferes Verständnis des Prozesses zu erhalten.

## 2 Grundlagen und Stand der Technik

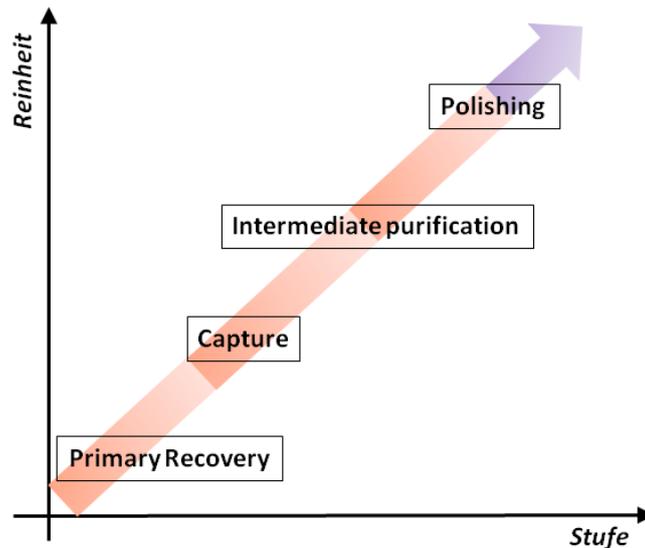
Bioprodukte, oder in hohen Reinheiten für pharmazeutische Anwendungen auch Biopharmazeutika oder Biologics genannt, sind eine Klasse hochmolekularer Verbindungen, die mittels moderner biotechnologischer Methoden produziert werden und die sich unter anderem dadurch auszeichnen, dass sie molekular schwierig zu analysieren sind, da sie zumeist fermentativ oder enzymatisch aus heterogenen Stoffgemischen und von lebenden und gentechnisch veränderten Organismen (Zellen, Tieren und Pflanzen) hergestellt werden [1, 2]. Seit der Vermarktung des ersten biotechnologisch hergestellten Produkts, rekombinantes humanes Insulin im Jahre 1982, hat die Vermarktung von Biopharmazeutika drastisch zugenommen. So waren im Jahre 2000 schon 77 biopharmazeutische Produkte global verfügbar [3]. Den großen Anteil der Bioprodukte und Biopharmazeutika stellen rekombinante Proteine [4] oder therapeutische Proteine mit zahlreichen Substituenten dar [1]. Im Jahre 2006 betrug der Anteil der Antikörper oder Antikörperfragmente am europäischen und US-Biopharmazeutikamarkt 34 %, der Anteil an Erythropoetinen betrug 14 % und der Anteil an Insulinen 14 %. Den Rest stellten Enzyme, Wachstumsfaktoren und Peptide wie Zytokine dar [5, 6]. Obgleich aktuelle Forschungen im Bereich der nicht-proteinhaltigen Biopharmazeutika laufen, geht klar hervor, dass Proteine auch in Zukunft eine dominante Stellung im Bereich der Bioprodukte und Biopharmazeutika einnehmen werden [6]. Im Folgenden wird daher vor allem auf die Aufarbeitung von Proteinen eingegangen.

### 2.1 Methoden und Trends der Bioproduktaufarbeitung

Neben der fermentativen und enzymatischen Produktion von Bioprodukten, vor allem Proteinen, spielt die anschließende Aufarbeitung, das sogenannte Downstream Processing (DSP), eine entscheidende Rolle im gesamten Bioprozess. Entsprechend der jeweiligen Anforderungen und/oder regulatorischen Vorgaben, müssen die hergestellten Proteine abschließend in definierter Reinheit von oftmals mehr als 99 % bei *in vivo* Studien oder therapeutischen Anwendungen vorliegen [7]. Die Anforderungen an die Aufarbeitung biotechnologisch produzierter Moleküle sind im Vergleich zur Aufarbeitung chemisch synthetisierter Moleküle sehr hoch. Gründe dafür gibt es vielfach. Zunächst handelt es sich bei Proteinen um hochmolekulare und dadurch sensitive Moleküle, die, aufgebaut aus Aminosäuren, in verschiedenen hierarchischen Ebenen komplex miteinander verknüpft sind und oftmals nur innerhalb bestimmter Toleranzfenster des umgebenden Mediums, wie Salzgehalt und pH-Wert, ihre volle biologische Aktivität entfalten können. Des Weiteren liegen Proteine nach ihrer mikrobiellen Produktion oftmals zunächst nicht in Lösung vor, sondern werden in den Zellen gelagert

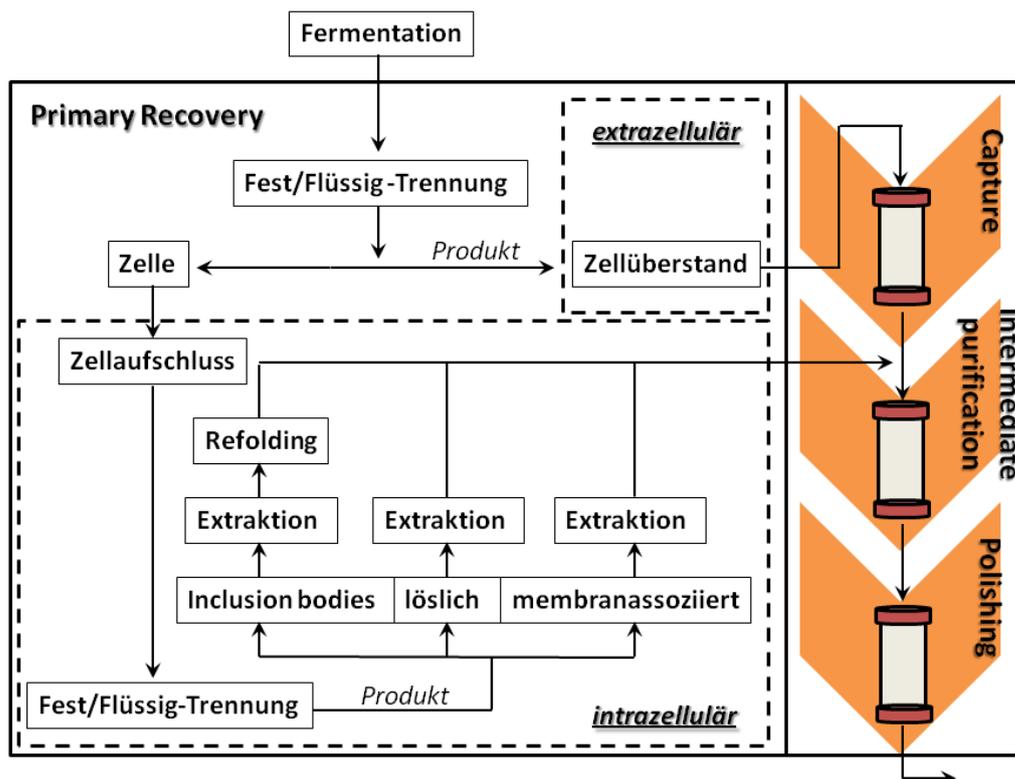
(intrazellulär oder periplasmatisch) und müssen erst durch Zellaufschluss entsprechend freigesetzt werden. Darüber hinaus sind die erreichbaren Konzentrationen und Titer der biologisch produzierten Zielkomponenten oftmals sehr gering, sodass diese anschließend auch nur sehr verdünnt vorliegen. Eine weitere Schwierigkeit der biotechnologischen Verfahrenstechnik ist die oftmals undefinierte und variable Zusammensetzung der aus heterogen zusammengesetzten Bestandteilen bestehenden Fermentationsbrühe. Diese enthält neben den zugeführten Chemikalien unter anderem strukturell ähnliche Proteine oder Oligomere der Zielkomponente sowie potentiell toxische Bestandteile aus Zellmembranen, wie z.B. Endotoxine. Es ist daher wenig erstaunlich, dass die Kosten der Bioproduktaufarbeitung am gesamten Produktionsprozess, gerade bei komplexen Molekülen, einen Großteil der Kosten ausmachen [8]. Laut Guiochon und Beaver [1] können für die Aufreinigung bestimmter Biopharmazeutika etwa 80 % der Gesamtkosten auf das DSP entfallen, was einen weiteren Grund zur Intensivierung der Forschung im Bereich des biotechnologischen DSP bedeutet.

Über die Jahre haben sich diverse Methodiken zur konventionellen Aufarbeitung von biotechnologisch produzierten Produkten ausgebildet, die alle in eine Vielzahl an nacheinander abfolgenden Verfahrensschritten unterteilt sind [9, 10]. Ein generelles Konzept lässt sich aber durch die Gliederung der Verfahrensschritte in verschiedenen Ebenen erreichen, die u.a. als „Primary Recovery“, „Capture“, „Intermediate purification“ und „Polishing“ (RIPP-Konzept) bezeichnet werden [7]. Hierbei erfolgen die genannten Stufen sukzessive, entsprechend der geforderten Produktreinheiten und der jeweiligen Darstellungsform der Zielkomponente. Daneben gibt es weitere Flussdiagramme außer dem bereits erwähnten RIPP-Konzept, in denen u.a. die Formulierung der produzierten Reinstsubstanzen integriert ist und die Bezeichnung der Stufen variiert [11].



**Abbildung 2-1: Schema zur konventionellen Aufarbeitung von Bioprodukten (nach [7]). Die Reinheit des Zielprodukts steigt hierbei in jeder Stufe deutlich an, sodass schließlich die geforderte Zielreinheit erreicht werden kann.**

Abbildung 2-1 erläutert das bereits erwähnte RIPP-Konzept zur Produktaufarbeitung. Nach einer ersten Vorbereitung und Klärung der Fermentationsbrühe (Primary Recovery), zumeist durch Filtration und Zentrifugation, folgt die eigentliche Reinigung der Zielkomponenten in weiteren drei Stufen. Hierbei steht zunächst die Isolation und Stabilisierung des Zielproduktes im Vordergrund, indem vor allem dem Zielprodukt unähnliche Verunreinigungen entfernt werden und die Ausbeute der entscheidende Parameter ist. Im weiteren Verlauf wird das Produkt schließlich in der erforderlichen Reinheit dargestellt und zielproduktähnliche Komponenten entfernt. Bis auf wenige Ausnahmen wird heutzutage in den meisten industriellen Anwendungen die Flüssigchromatographie in den zuletzt erwähnten drei kritischen Stufen angewendet [6]. Weitere anwendbare Verfahrensalternativen in diesen Prozessschritten können z.B. auch Ultrafiltration, Diafiltration, Elektrodialyse oder Kristallisation sein [11, 12]. Abbildung 2-2 zeigt ein entsprechendes Flussdiagramm für einen typischen Aufarbeitungsprozess eines Proteins aus einer Fermentationsbrühe. In diesem beispielhaften Prozess werden nach der Grobreinigung ausschließlich flüssigchromatographische Techniken angewendet.



**Abbildung 2-2: Generelles Fließschema zur Proteinaufreinigung aus ungeklärter Fermentationsbrühe. Die Schritte Capture, Intermediate purification und Polishing werden hier ausschließlich mittels flüssigchromatographischer Techniken durchgeführt. Nach [6, 13].**

Je nach Art des eingesetzten Produktionsorganismus und der Bedingungen der Fermentation liegt das Produkt intra- bzw. extrazellulär vor. Im Falle eines extrazellulär vorliegenden Produktes kann der Zellüberstand nach etwaiger Vorkonzentration und/oder Pufferwechsel direkt aus dem Überstand aufgereinigt werden. Im Falle von intrazellulär (auch periplasmatisch) vorliegenden Zielkomponenten muss durch Kombination mehrerer Verfahrensschritte zunächst die Zelle aufgeschlossen und anschließend das Produkt extrahiert werden, bevor es ebenfalls chromatographisch aufgereinigt werden kann. Zu beachten ist, dass sich eine Reihe von Proteinen nach Zellaufschluss nicht einfach im umgebenden Medium lösen, sondern teilweise Einschlusskörper (sog. Inclusion bodies) bilden oder als Teil der Zellmembranen vorliegen.

Speziell im Aufarbeitungsschritt des Primary Recovery ist daher eine Vielzahl von Verfahrensschritten nötig, um das Produkt für die weiteren Aufarbeitungsebenen vorzubereiten. Da bei jedem einzelnen Verfahrensschritt mit einem geringen Verlust des Wertproduktes zu rechnen ist, summiert sich dieser Wert bei einer großen Anzahl an Verfahrensschritten auf [14]. Beispielsweise führt eine Ausbeute von 90 % in einer einzelnen Aufarbeitungsoperation nach zehn

Prozessschritten zu einer Gesamtausbeute von lediglich noch etwa 35 %. Um die Aufarbeitung vor allem in den Bereichen Produktivität, Wirtschaftlichkeit und Nachhaltigkeit zu optimieren, haben sich mehrere, teils miteinander verwobene Trends entwickelt.

Hierbei ist vor allem die Entwicklung sogenannter integrierter Prozesse zu nennen [15], bei denen in neuartigen Verfahren eine große Anzahl an Prozessschritten eingespart werden kann. Neben der Erhöhung der Produktivität und der Ausbeute kann durch solche innovativen Prozesse auch die Gesamtprozessdauer reduziert werden und im Optimalfall das Zielprodukt innerhalb eines einzelnen Aufarbeitungsschrittes in gewünschter Reinheit und hoher Ausbeute gewonnen werden. Findet die Produktreinigung direkt aus der ungeklärten Fermentationsbrühe ohne weitere Vorbehandlung statt, spricht man in diesem Zusammenhang auch von „Whole-Broth-Verfahren“. Als Beispiele für solche Verfahren sind die im Bereich der Primary Recovery und Capture angesiedelten Verfahren Expanded Bed Adsorption (EBA) und die wässrige Zweiphasenextraktion (ATPS) zu nennen. EBA ist ein auf chromatographischen Prinzipien basierendes Verfahren, das durch Verwendung spezieller Partikel größerer Dichte innerhalb eines durchströmten fluidisierten Bettes in der Lage ist, auch feststoffhaltige Suspensionen als Zulaufströme zu verwenden. Durch die Generierung des fluidisierten Bettes bilden sich innerhalb der EBA-Säule Hohlräume aus, die groß genug sind, um Feststoffe passieren zu lassen, aber klein genug, um die Zielkomponente möglichst vollständig zu adsorbieren [16, 17]. In anschließenden Elutionsschritten kann das gebundene Protein dann im Gegenstrom in großen Reinheiten eluiert werden. Verschieden funktionalisierte Basispartikel können für EBA-Prozesse eingesetzt werden. Unter anderem wurde die Anwendung von EBA für die Aufreinigung der Proteine  $\beta$ -Galactosidase aus Hefelysat mit Anionenaustauscherpartikeln [18] und Hepatitis B Kernantigenen aus *Escherichia coli*-Lysat mittels Basispartikeln mit immobilisierter Metallionenfunktionalisierung [19] bzw. immobilisierten Phagen [20] getestet. In größeren Maßstäben wurde unter anderem das aus *Pseudomonas aeruginosa* stammende Exotoxin A mit Anionenaustauscherpartikeln geklärt und bei gleicher Ausbeute in einem einzelnen Schritt aufkonzentriert [21]. Auch das ATPS-Verfahren ist zur Trennung von Proteinen aus unfiltrierten Rohlösungen geeignet und basiert auf dem Ausbilden zweier unmischbarer wässriger Phasen bei Verwendung zweier Polymere oder eines Polymers und eines geeigneten Salzes in Wasser. Der Trenneffekt beruht auf dem unterschiedlichen Verteilungsverhalten von Zielprotein, sonstigen Proteinen, vorhandener Zelldebris und anderen Inhaltsstoffen sowie anschließender Trennung der Phasen [22]. ATPS fand bisher unter anderem Anwendung bei der Aufreinigung von Chymosin,  $\alpha$ -Antitrypsin und Antikörpern [23].

Eine weitere Möglichkeit zur Einsparung von Prozessschritten wie Zentrifugation, Filtration und Fällung, ist die Anwendung speziell funktionalisierter magnetischer Nano- und Mikropartikel. Durch direkte Inkubation der Partikel mit der Ausgangslösung, können Zielproteine auch direkt in ungeklärten Proteinlösungen spezifisch gebunden werden [24]. Durch anschließende Abtrennung in magnetischen Hochgradientenseparatoren (HGMS) werden die Magnetpartikel dann vom Zellüberstand abgetrennt, die Proteine können eluiert werden und die Partikel liegen anschließend zum erneuten Gebrauch vor [25]. Beispielhaft wurde das Glykoprotein Gonadotropin aus Pferdeserum mit dieser Technik in größerer Ausbeute, geringerer Anzahl an benötigten Verfahrensschritten und verringerter Menge an benötigten Lösungsmitteln aufgereinigt [26].

Neben den genannten „Whole-Broth-Verfahren“ ist die Produktisolation und Produktabtrennung extrazellulärer Proteine schon direkt während der Fermentation ein weiterer Trend in der Bioproduktaufarbeitung. Ziel dieser sogenannten ISPR-Techniken (*In situ* Product Removal) ist es, Zielprodukte während der mikrobiellen Kultivierung direkt aus der Fermentationsbrühe abzuziehen und dadurch ebenfalls Prozessschritte einzusparen. Des Weiteren sind für diese Methodik weitere Vorteile beschrieben, wie z.B. die Verringerung toxischer oder inhibitorischer Eigenschaften des Zielproduktes auf das Biomassewachstum [27]. Die Abtrennung während der Fermentation kann prinzipiell auf verschiedenen Wegen durchgeführt werden, z.B. durch Evaporation, Extraktion, Permeation oder Adsorption, wobei adsorptive Techniken mit speziell funktionalisierten Partikeln den speziellen Charme einer hohen Selektivität besitzen [28]. Neben der Anwendung bei Fermentationsprozessen sind diese Techniken auch für eine Vielzahl biokatalytischer Prozesse mit freien oder immobilisierten Enzymen oder Zellen beschrieben, bei denen neben den bereits genannten Verfahrensvorteilen, thermodynamisch instabile Produkte möglichst schnell in ein geeignetes Medium überführt werden müssen [29]. Eine Weiterentwicklung der beschriebenen ISPR-Techniken stellt die Kombination mit speziellen und bereits im vorigen Absatz besprochenen magnetischen Nanopartikeln in Verbindung mit dem Verfahren der HGMS dar. In einem solchen Prozess konnte bereits die gesteigerte Proteaseproduktion aus *Bacillus licheniformis* nachgewiesen werden [28].

Ein anderer Ansatz, der vor allem auf die Erhöhung der Produktivität und des Durchsatzes abzielt, ist die Weiterentwicklung der zumeist angewandten absatzweisen Betriebsweise in kontinuierliche Techniken. Solche Verfahren sind in der Verfahrenstechnik allerdings oft schwer handhabbar und daher bisher wenig verbreitet. Mit Einschränkungen können die bereits erwähnten ISPR-Techniken in diesem Rahmen erwähnt werden, da sie außer den genannten

positiven Effekten auch die maximal erreichbaren Fermentationszeiten deutlich erhöhen. Im Bereich der Flüssigkeitschromatographie stellen aktuell die sogenannte annulare Chromatographie, die SMB-Chromatographie (Simulated Moving Bed) sowie verschiedene Betriebsweisen von Multisäulen-Chromatographiesystemen die einzigen ernstzunehmenden Varianten dar. Speziell für die großtechnische Trennung von racemischen Gemischen konnten die Stärken der SMB-Technik nachgewiesen werden [30]. Im Abschnitt 2.3.4 wird daher nochmals näher auf diese interessanten Prozessvarianten eingegangen.

Lange Zeit wurden Aufarbeitungsmethoden hauptsächlich durch Erfahrungen, heuristische Methoden und trial-and-error-Experimente ausgelegt [31]. Darunter litt neben der Prozesswirtschaftlichkeit auch das allgemeine Prozessverständnis. Daher wurden im Lauf der Zeit neuere Methoden zur Entwicklung optimaler Prozesse entwickelt. Durch sogenanntes Design-of-Experiments (DoE) kann hierbei durch geschickte Versuchsplanung und anschließende statistische Auswertung der Messdaten aus einer minimalen Anzahl an Versuchen der optimale Betriebspunkt im untersuchten Parameterintervall bestimmt werden [32]. Eine Verbesserung dieser Methodik ist durch die Entwicklung von Robotikplattformen für High-Throughput-Screening (HTS) im kostengünstigen Microscale-Maßstab möglich, da der untersuchte Parameterbereich im gleichen Zeitraum deutlich ausgeweitet werden kann. Eine Alternative der Prozessoptimierung ist die Vorhersage der Resultate einzelner Prozessschritte am Computer, mit den Vorteilen der Minimierung der durchzuführenden Experimente und der Einsparung von Verbrauchsmitteln. Hierbei dienen mathematische Modelle als Grundlage für die anschließende *in silico* Optimierung der jeweiligen Prozesse. Für die Genauigkeit der Prozessvorhersage der Simulationen sind Kenntnisse über gewisse Systemparameter notwendig. Heutzutage können diese Parameter in kurzer Zeit aus Vorversuchen mittels der zuvor erwähnten Techniken HTS und DoE effizient bestimmt werden [33]. Die modellbasierte Datenanalyse und Optimierung speziell im Bereich der Flüssigchromatographie wird in Kapitel 2.6 erläutert.

## ***2.2 Theorie der Proteinadsorption***

Adsorptive Vorgänge spielen eine große Rolle in der Bioverfahrenstechnik. Speziell für die Reinigung von Biomolekülen werden in freier Lösung oder in Festbettsäulen häufig speziell synthetisierte und funktionalisierte Partikel eingesetzt, die in der Lage sind, selektiv einzelne Moleküle oder Molekülklassen reversibel zu binden. Im Allgemeinen wird die Anlagerung von Molekülen an einer Grenzfläche, z.B. Proteine an einer Partikeloberfläche, als Adsorption bezeichnet. Dabei wird die Substanz an der die Adsorption stattfindet „Sorbens“ oder

„Adsorbens“ genannt, wohingegen absorbierende Moleküle als „Sorptive“ oder „Adsorptive“ bezeichnet werden. Bei der Adsorption von Proteinen gibt es mehrere Arten von an- und abstoßenden Kräften, die für die Anlagerung an Grenzflächen verantwortlich sind. Zu nennen sind vor allem ionische, hydrophobe und biospezifische Wechselwirkungen. Grundsätzlich sind hierfür die Proteinbausteine, d.h. die Aminosäuren, und deren komplexe chemische Verknüpfung in verschiedenen hierarchischen Ebenen verantwortlich.

Bringt man eine Sorptivlösung in einem geschlossenen System in Kontakt mit einer definierten Menge an Sorbens, bildet sich nach hinreichend langer Zeit ein Adsorptionsgleichgewicht zwischen der Restkonzentration des Sorptivs in der flüssigen Phase und der zugeordneten Beladung des Adsorbens [34].

Die mathematische Beschreibung der Adsorption im Allgemeinen und der Proteinadsorption nach Erreichen des Adsorptionsgleichgewichtes im Speziellen, lässt sich durch sogenannte Adsorptionsisothermen darstellen, bei der die Beladung eines Sorbens als eine Funktion der Sorptivkonzentration bei konstanten Temperatur und Umgebungsbedingungen, wie Salinität und pH-Wert, beschrieben werden kann. Im Folgenden wird zunächst die Adsorption von Einzelsubstanzen behandelt, d.h. unter Vernachlässigung der Konkurrenz um Bindungsplätze mehrerer Moleküle. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass es sich beim Sorbens um spezielle chromatographische Medien in Gelform handelt und deren Menge immer volumenabhängig in  $V_p$  und in der Einheit mL angegeben wird. Die Beladung entspricht der Masse an adsorbiertem Protein auf diesen Partikeln, die entsprechende Einheit ist daher  $\text{mg mL}^{-1}$ .

Zur Erstellung von Adsorptionsisothermen werden definierte Konzentrationen an Sorptiv mit einer bestimmten Menge an Sorbens in definierten Volumina inkubiert. Die Gesamtmasse an Protein bleibt während des gesamten Prozesses gleich, wobei dies nach Gleichgewichtseinstellung durch Gleichung 2-1 beschrieben werden kann..

$$V(c_0 - c^*) = V_p(q^* - q_0) \quad (2-1)$$

Hierbei steht V für das Gesamtvolumen des Ansatzes,  $c_0$  und  $q_0$  für die Ausgangskonzentration bzw. Ausgangsbeladung.  $c^*$  und  $q^*$  beschreiben die Sorptivkonzentration und Beladung im Gleichgewichtszustand. Da im Allgemeinen mit zunächst unbeladenen Partikeln ( $q_0=0$ ) gearbeitet wird, kann die Gleichgewichtsbeladung durch Umstellen der Formel entsprechend Gleichung 2-2 berechnet werden

$$q^* = -\frac{V}{V_p}(c^* - c_0) \quad (2-2)$$

Um mit den rein experimentell ermittelten Daten Berechnungen durchführen zu können, ist es sinnvoll, die Abhängigkeit der Beladung von der Sorptivkonzentration mit mathematischen Beziehungen zu beschreiben. Hierzu sind verschiedene Gleichungen vorgeschlagen worden, die entweder rein empirisch sind oder auf physikalisch-chemisch bzw. thermodynamisch begründeten Modellvorstellungen beruhen [34].

In der Biotechnologie wird häufig das einfache und auf physikalischen Grundlagen beruhende Langmuir-Modell [35] angewendet. Langmuir geht in seinem Modell davon aus, dass (1) sich eine monomolekulare Adsorptionsschicht und keine Mehrschichtadsorption ausbildet, dass (2) alle Bindungsstellen gleichwertig und gleichförmig sind und (3) dass es keine Wechselwirkungen zwischen Sorptionsplätzen und benachbarten Teilchen gibt. Aufgrund dieser Annahmen kann man die Adsorptionsreaktion in zwei Teilreaktionen unterteilen. Gleichung 2-3 zeigt die Adsorptionsreaktion, wobei die Reaktionsrate  $r_{Ads}$  (d.h. die adsorbierte Stoffmenge pro Zeiteinheit) hier von der Gleichgewichtssorptivkonzentration und der Zahl der noch freien Plätze an der Oberfläche abhängig ist. Die Reaktionsrate der Desorption  $r_{Des}$  hingegen hängt nur von der Beladung der Oberfläche ab (vgl. Gleichung 2-4).

$$r_{Ads} = k_{Ads}(q_{max} - q)c \quad (2-3)$$

$$r_{Des} = k_{Des} q \quad (2-4)$$

Hierbei bezeichnen  $k_{Ads}$  und  $k_{Des}$  die Adsorptions- bzw. Desorptionsgeschwindigkeitskonstante und  $q_{max}$  die maximal erreichbare, sogenannte Sättigungbeladung. Im Adsorptionsgleichgewicht entsprechen sich die Reaktionsraten der Adsorption und der Desorption.

$$k_{Ads}(q_{max} - q)c = k_{Des} q \quad (2-5)$$

Die typische Langmuir-Isothermengleichung (auch Langmuirgleichung) kann dann durch einfaches Umstellen und Zusammenfassen der Geschwindigkeitskonstanten erhalten, wobei die Geschwindigkeitskonstanten sowohl in der Desorptionskonstanten  $K_D$  als auch in der Adsorptionskonstanten  $K_L$  zusammengefasst werden können. Daher haben sich auch zwei mögliche Schreibweisen der Langmuir-Isotherme entwickelt (vgl. Gleichung 2-6 und 2-7).

$$q^* = q_{max} \frac{c^*}{K_D + c^*}, \text{ mit } K_D = \frac{k_{Des}}{k_{Ads}} \quad (2-6)$$

$$q^* = q_{max} \frac{K_L c^*}{1 + K_L c^*}, \text{ mit } K_L = \frac{k_{Ads}}{k_{Des}} \quad (2-7)$$

Beide Schreibweisen finden Anwendung, wobei der Zusammenhang zwischen  $K_D$  und  $K_L$  in dem einfachen Zusammenhang entsprechend Gleichung 2-8 besteht.

$$K_D = \frac{1}{K_L} \quad (2-8)$$

In beiden Gleichungen gibt der Parameter  $q_{max}$  die maximal erreichbare Beladung eines Sorptivs auf einem Sorbens unter definierten Bedingungen an, wobei die Parameter  $K_D$  bzw.  $K_L$  ein Maß für die Affinität eines Sorbens an ein Sorptiv beschreiben. Im Falle der Desorptionskonstante  $K_D$  beschreibt ein kleinerer Wert eine höhere Affinität, wohingegen eine Zunahme des  $K_L$ -Wertes eine stärkere Affinität widerspiegelt.

Die Anpassung der erhaltenen Messdaten an dieses Modell kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. In dieser Arbeit wurde hierzu das Least-Squares-Verfahren genutzt, das eine Anpassung der Isothermenparameter auf Grundlage einer minimalen Summe der Fehlerquadrate der einzelnen Messwerte an die Isothermengleichung durchführt.

Im analytischen Bereich geringer Konzentrationen nähert sich die Langmuirgleichung einem linearen Grenzwert mit maximaler Steigung entsprechend der Henry-Isothermen. In Kombination mit Gleichung 2-6 kann die Isothermengleichung in diesem Bereich durch Gleichung 2-9 bestimmt werden.

$$q^* = \frac{q_{max}}{K_D} c^*, \text{ wobei } \lim_0 c = 0 \quad (2-9)$$

Der Quotient aus maximaler Sättigungsbeladung und Desorptionskonstanten entspricht demnach dem Henry-Koeffizient [6] und gibt die anfängliche maximale Steigung der Isothermen an.

Üblicherweise liegen in realen Lösungen mehrere adsorbierbare Substanzen vor. Die gelösten Stoffe konkurrieren dann zusätzlich miteinander um die Adsorptionsplätze auf der Sorbensoberfläche. Speziell für binäre Systeme entwickelten Butler und Ockrent daher 1930 ein auf der Langmuir-Theorie beruhendes Modell [36]. Hierbei werden die entsprechenden Langmuirparameter  $q_{max,1}$ ,  $q_{max,2}$ ,  $K_{D,1}$  und  $K_{D,2}$  der Einzelstoffadsorptionen verwendet. Die

Gleichgewichtsbeladungen der beiden Komponenten lassen sich dann mittels der Gleichungen 2-10 und 2-11 bestimmen.

$$q_1^* = \frac{q_{max,1} \frac{c_1^*}{K_{D,1}}}{1 + \frac{c_1^*}{K_{D,1}} + \frac{c_2^*}{K_{D,2}}} \quad (2-10)$$

$$q_2^* = \frac{q_{max,2} \frac{c_2^*}{K_{D,2}}}{1 + \frac{c_1^*}{K_{D,1}} + \frac{c_2^*}{K_{D,2}}} \quad (2-11)$$

Für die Verwendung des Modells gilt es allerdings zu beachten, dass es einigen Einschränkungen unterliegt. So wurde beschrieben, dass experimentelle Daten schlecht wiedergegeben werden, wenn (1) sich die Maximalbeladungen der einzelnen Komponenten stark voneinander unterscheiden und (2) ein Teil der Adsorptionsplätze nur einer Komponente zur Verfügung steht [34].

### ***2.3 Flüssigkeitschromatographie von Bioprodukten***

Die Flüssigkeitschromatographie stellt seit Jahrzehnten eine wichtige Methode zur stofflichen Trennung von Gemischen aus den Bereichen der Chemie, Biologie und Biotechnologie dar. Das Trennprinzip dieser Technik beruht auf unterschiedlich starken Wechselwirkungen der einzelnen Substanzen in der sogenannten flüssigen mobilen Phase und der Feststoffphase, der sogenannten stationären Phase. Entsprechend der verwendeten stationären Phasen, der mobilen Phasen und der benötigten Apparaturen gibt es eine ganze Reihe von Aufteilungen der chromatographischen Techniken. Speziell die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) hat sich hierbei für flüssige Proben bewährt. Unter hohen Drücken bis etwa 1000 bar werden Flüssigkeiten und Flüssigkeitsgemische mittels spezieller Pumpen über eine mit stationärer Phase gepackte Festbettsäule gepumpt und nach Probeninjektion einzelne Substanzen voneinander getrennt. Vorteile dieser Techniken sind vor allem ihre breite Anwendbarkeit und ihre Vielseitigkeit. So können unterschiedlichste Moleküle in geringen Spuren nachgewiesen und analysiert werden, sowie große Stoffmengen präparativ voneinander getrennt werden. Des Weiteren spricht die enorme Trennleistung mit einer großen Anzahl an erreichbaren Trennstufen in einem säulenchromatographischen Trennschritt sowie die mögliche und einfache Steigerung der Trennstufenzahl durch Verlängerung der Säule oder Verringerung der Partikelgröße der stationären Phase für diese Technik.

Ein typisches Chromatographieverfahren verläuft absatzweise ab und gliedert sich grundsätzlich in mehrere Einzelschritte. Nach anfänglicher Säulenäquilibrierung mit reinem Probenpuffer wird die Probe in das System injiziert und anschließend ungebundene oder nur schwach gebundene Komponenten mit reinem Probenpuffer ausgewaschen. Gebundene Proteine können durch die folgende stufenweise oder gradielle Erhöhung der Konzentration des Elutionspuffers eluiert werden. Im Anschluss an die vollzogene Aufreinigung werden etwaige stark adsorbierte Komponenten durch Regenerierung der Säule entfernt. Der Verlauf des Vorganges wird als sogenanntes Chromatogramm aufgezeichnet, in dem der Verlauf wichtiger Prozessparameter über der Prozesszeit oder dem Elutionsvolumen aufgetragen wird.

Da es sich bei Biomolekülen und speziell Proteinen um eine besondere Klasse sensibler Moleküle handelt, hat sich für deren spezielle Bedürfnisse im Jahre 1982 unter der Firma Pharmacia (heute GE Healthcare) aus der HPLC-Technik heraus eine besondere Art der Flüssigchromatographie entwickelt, die als FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) bekannt ist. Durch Verwendung geringerer Drücke, Partikeln mit größeren Poren und der Arbeit in wässrigen Medien wird hierbei versucht, dem Erhalt der biologischen Aktivität dieser besonderen Moleküle Rechnung zu tragen [37]. Im Laufe der Zeit haben sich außerdem in diesem Bereich eine ganze Reihe von Trenntechniken etabliert, basierend auf einer noch weitaus größeren Anzahl unterschiedlichster Basispartikeln und Funktionalisierungen.

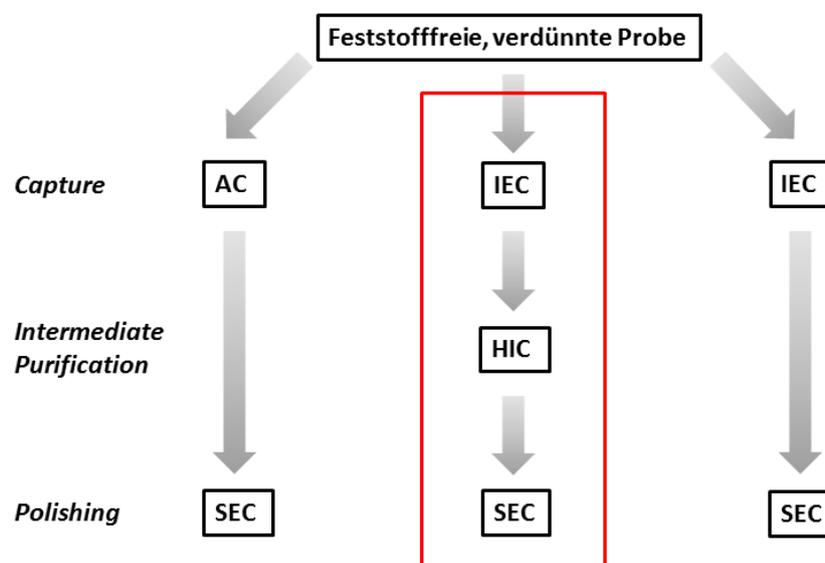
Klassifiziert man die aktuell angewendeten chromatografischen Trenntechniken für Biomoleküle, ergeben sich je nach Art und Weise der Unterteilung acht große Gruppen [38]:

- Mixed-Mode Chromatographie (MMC)
- Normalphasenchromatographie (NPC)
- Umkehrphasenchromatographie (RPC)
- Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)
- Ionenaustauschchromatographie (IEC)
- Größenausschlusschromatographie (SEC)
- Affinitätschromatographie (AC)
- (Metall-) Chelatchromatographie (IMAC)

Da die jeweils verwendete Technik auch die Wahl der mobilen Phase beeinflusst, können NPC und RPC auch gesondert betrachtet werden. In beiden Fällen beruht der Adsorptionsschritt auf der Hydrophobizität der jeweiligen Bioprodukte, es müssen oftmals organische Lösungsmittel

verwendet werden und daher kann nicht in wässrigen Lösungen gearbeitet werden. Außerdem wird die IMAC oftmals zur weitaus größeren Gruppe der AC gezählt. Aufgrund der Vielfältigkeit der Biomoleküleigenschaften haben alle Methoden ihre Berechtigung und unterscheiden sich in den zugrundeliegenden Wechselwirkungen zwischen Molekül und stationärer Phase. Die AC nimmt hierbei nochmals eine Sonderstellung ein, da sie im Vergleich zu allen anderen Techniken dazu in der Lage ist, nicht nur einzelne ähnliche Stoffgruppen zu trennen, sondern molekülspezifisch hohe Affinitäten aufweist. Auch die SEC stellt einen Spezialfall dar, da es sich hierbei im Gegensatz zu den anderen Techniken um eine Verteilungschromatographie und nicht um eine Adsorptionschromatographie handelt. Die eigentliche Trennung während des Elutionsschrittes findet hierbei isokratisch statt, d.h. unter Vermeidung der Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase.

Die Trennleistung der chromatographischen Sektion innerhalb eines Aufreinigungsprozesses kann durch Kombination mehrerer Chromatographiestufen erhöht werden. Abbildung 2-3 zeigt einige typische Beispiele für Chromatographiekombinationen zur Aufreinigung feststofffreier und bei geringen Salzkonzentrationen vorliegender Proteinlösungen. Bei hohen Salzkonzentrationen empfiehlt sich zuvor häufig eine entsprechende Verdünnung oder ein Entsalzungsschritt mittels SEC. Andere Kombinationen können für komplexe Trenaufgaben möglich sein.



**Abbildung 2-3: Typische Chromatographiekombinationen mit Zuteilung zu den einzelnen übergeordneten Aufarbeitungsstufen. Die standardmäßig angewendete Variante IEC → HIC → SEC ist besonders kenntlich gemacht (nach [7]).**

Aufgrund des orthogonalen [39] und komplementären Charakters diverser Chromatographiekombinationen können außerdem, im Sinne eines integrierten Prozesses, weitere Zwischenschritte dadurch vermieden werden, dass der Effluent eines Chromatographieschrittes direkt als Probe in der nächsten Stufe verwendet wird. Prominentestes Chromatographiepaar hierbei ist die Kombination aus IEX und HIC. Bei beiden industriell am häufigsten und standardmäßig angewandten Methoden kann die Bindeaffinität allein durch die Konzentration entsprechender Salze im wässrigen Puffer beeinflusst werden. Sind hohe Salzkonzentrationen beispielsweise vorteilhaft für die Proteinadsorption während der HIC, binden Proteine während der IEC am besten unter salzfreien Bedingungen. Proteine, die nach vorheriger Adsorption durch ansteigende Salzgradienten während der IEC eluiert werden, können anschließend direkt auf HIC-Säulen injiziert werden. Bei geeigneter Einstellung der Prozessparameter bindet das Zielprotein unter diesen Bedingungen und kann abschließend in salzfreiem Puffer hochrein eluiert werden. Den Abschluss vieler Chromatographieroutinen bildet häufig die SEC, bei der Moleküle aufgrund ihrer Größe voneinander getrennt werden. Obgleich die SEC den Nachteil geringer Kapazitäten hat und die Zielfractionen auch entsprechend verdünnt, kann in diesem Schritt neben der Kontaminantenentfernung zugleich auch eine Umpufferung in einen gewünschten Puffer vorgenommen werden. Außerdem ist im Allgemeinen die Produktkonzentration im Schritt des Polishing recht hoch, sodass der Verdünnungseffekt keinen großen Einfluss auf die Prozessökonomie besitzt [6].

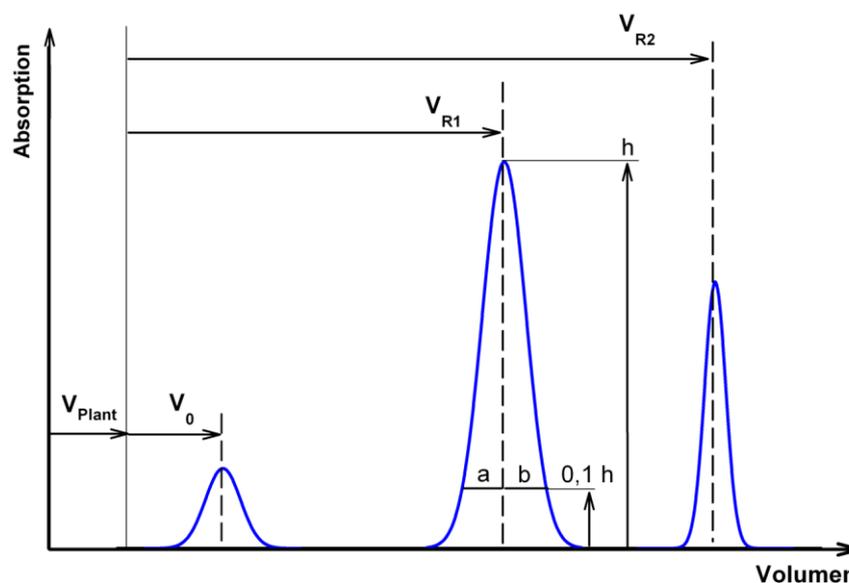
Auf die wichtigen Techniken HIC und IEC wird in den Kapiteln 2.3.2 bzw. 2.3.3 vertieft eingegangen.

### 2.3.1 Prozessparameter der Chromatographie

Zur Analyse eines chromatographischen Schrittes wird zumeist das entstehende Chromatogramm ausgewertet. Da Proteine Licht speziell bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren, wird zumeist der entsprechende  $UV_{280nm}$ -Verlauf beurteilt. Die Zunahme der Lichtabsorption wird in mAU (milli Absorptionseinheiten) angegeben; 1 mAU entspricht dabei der Abnahme des transmittierten Lichtes im Vergleich zum eingestrahlt Licht bei definierter Wellenlänge um 0,2305 %. Über das bekannte Lambert-Beer-Gesetz (vgl. Gleichung 2-12) kann aus dem Absorptionmesswert einer Wellenlänge  $\lambda$  (Extinktion  $E_\lambda$ ) unter Kenntnis des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  und der Pfadlänge des durchstrahlten Körpers  $d$  direkt auf die Produktkonzentration geschlossen werden.

$$E_{\lambda} = \varepsilon c d \quad (2-12)$$

Die Fläche unterhalb eines Chromatogramms kann daher auch zur Bestimmung der jeweiligen Analytenmasse im untersuchten Abschnitt verwendet werden. Auch andere Messgrößen können zur Aufnahme eines Chromatogramms dienen, z.B. wenn eine bestimmte Substanz keine nennenswerte Absorption zeigt. Hier ist vor allem die Leitfähigkeit zu nennen. Abbildung 2-4 zeigt ein beispielhaftes Chromatogramm, bei dem ein Gemisch aus nicht-retardiertem Tracer und zweier Komponenten (Komponente 2 ist hier stärker retardiert) zum Zeitpunkt 0 ins System injiziert wurde, sowie die daraus bestimmbaren Elutionsvolumina. Es muss darauf hingewiesen werden, dass das Totvolumen des verwendeten Systems ( $V_{\text{Plant}}$ ) im System zunächst zu bestimmen ist und anschließend von allen ermittelten Volumina abgezogen werden muss.



**Abbildung 2-4: Beispielhaftes Chromatogramm mit eingezeichnetem Totvolumen des Systems  $V_{\text{Plant}}$ , Retentionsvolumen der mobilen Phase  $V_0$  und zweier Komponenten  $V_{R1}$  und  $V_{R2}$ , sowie den Parametern zur Berechnung der Asymmetrie im Peak der Komponente 1.**

Der Kapazitätsfaktor  $k'$  gibt an, wie stark ein Molekül unter isokratischen Bedingungen in der Säule retardiert wird. Unter der Annahme geringer Konzentrationen kann er im Allgemeinen entsprechend Gleichung 2-13 aus dem Elutionsvolumen eines kleinen, nicht retardierten Tracers  $V_{R,0}$  (entspricht dem Retentionsvolumen der reinen mobilen Phase) und dem Retentionsvolumen der jeweiligen Komponente  $V_{R,i}$  berechnet werden.

$$k' = \frac{V_{R,i} - V_{R,0}}{V_{R,0}} \quad (2-13)$$

Alternativ kann  $k'$  im Bereich geringer Konzentrationen auch mittels der Henry-Konstanten aus Gleichung 2-9 entsprechend Gleichung 2-14 bestimmt werden.

$$k' = \frac{q_{max}}{K_D} \varphi \quad (2-14)$$

Hierbei bezeichnet  $\varphi$  das Phasenverhältnis der stationären zur mobilen Phase in der Säule und wird entsprechend Gleichung 2-15 bestimmt.

$$\varphi = \frac{1 - \varepsilon_B}{\varepsilon_B} \quad (2-15)$$

$\varepsilon_B$  bezeichnet hierbei die Säulenporosität (interstitielles Volumen/ Zwischenpartikelvolumen) und definiert das Leerraumvolumen zwischen den in der Säule gepackten Partikeln.  $\varepsilon_B$  wird aus dem Verhältnis des Elutionsvolumens  $V_{R,int}$  eines nicht retardierten und ausreichend großen Tracer, der nicht in die Poren der Partikeln diffundieren kann und dem Gesamtsäulenvolumen  $CV$  bestimmt.

$$\varepsilon_B = \frac{V_{R,int}}{CV} \quad (2-16)$$

Dementsprechend kann die totale Porosität  $\varepsilon_T$  einer Säule (Leerraumvolumen zwischen den Partikeln und Porenvolumen der Partikeln) aus dem Elutionsvolumen  $V_0$  eines kleinen nicht retardierten Tracers und  $CV$  ermittelt werden.

$$\varepsilon_T = \frac{V_0}{CV} \quad (2-17)$$

Die reine Partikelporosität  $\varepsilon_p$  berechnet sich entsprechend aus Gleichung 2-18.

$$\varepsilon_p = \frac{V_0 - V_{R,int}}{CV - V_{R,int}} \quad (2-18)$$

Aus der Flussrate der mobilen Phase  $\dot{V}_{mob}$  (in  $\text{mL min}^{-1}$ ) kann über Gleichung 2-19 die lineare Geschwindigkeit  $v$  (oder Leerrohrgeschwindigkeit in  $\text{cm h}^{-1}$ ) in einer chromatographischen Säule gemäß folgender Gleichung bestimmt werden, wobei  $S$  die Querschnittsfläche der Säule (in  $\text{cm}^2$ ) bedeutet.

$$v = 60 \frac{\dot{V}_{mob}}{S} \quad (2-19)$$

In den meisten Fällen steht für den Fluss der mobilen Phase nur das Zwischenpartikelvolumen zur Verfügung und die reale Säulengeschwindigkeit ist höher als  $v$  [6]. Die resultierende Zwischenkorngeschwindigkeit (interstitielle Geschwindigkeit)  $v_{int}$  kann aus  $v$  gemäß Gleichung 2-20 berechnet werden

$$v_{int} = \frac{v}{\varepsilon_B} \quad (2-20)$$

Die Wanderungsgeschwindigkeit einer definierten Konzentration in der mobilen Phase  $c$  unter isokratischen Bedingungen ( $v_c$ ) ist wiederum abhängig von den Wechselwirkungen der jeweiligen Komponente mit der stationären Phase in der Säule und kann über folgende Gleichung berechnet werden:

$$v_c = \frac{v_{int}}{1 + \frac{1 - \varepsilon_B}{\varepsilon_B} \frac{dq}{dc}} \quad (2-21)$$

Es wird deutlich, dass  $v_c$  direkt abhängig von der Form der Isothermen ist und jede Konzentration mit einer definierten Geschwindigkeit durch die Säule wandert. Im Falle der kontinuierlichen Beladung einer Säule mit einer Komponente definierter Konzentration und unter Annahme eines Langmuir-Verhaltens kommt es dadurch zu einer Schärfung des Profils, da es physikalisch unmöglich ist, dass die schnellere höhere Konzentration die niedrigere überholt. Entsprechend berechnet sich in diesem Falle  $v_c$  direkt aus den Größen der Konzentration vor und nach der Beladungsfront sowie den mit diesen Konzentrationen im Gleichgewicht stehenden Beladungen.

$$v_c = \frac{v_{int}}{1 + \frac{1 - \varepsilon_B}{\varepsilon_B} \frac{\Delta q}{\Delta c}} \quad (2-22)$$

Unter Kenntnis von  $c$  und der Säulenlänge  $L_c$  ist damit auch die entsprechende Durchbruchzeit  $t_{BT}$  einer Komponente aus Gleichung 2-23 abschätzbar.

$$t_{BT} = \frac{L_c}{v_c} \quad (2-23)$$

Die Abschätzung der Durchbruchzeit bzw. Retentionszeit einer Komponente bei nicht-kontinuierlicher Probenaufgabe ist jedoch nicht ohne weiteres möglich. Im Verlauf der Wanderung über die Säule kommt es aus Dispersionsgründen zu einer Bandenverbreiterung mit

resultierender Konzentrationsverdünnung und dadurch zu einer kontinuierlichen Abnahme von  $v_c$  [40].

Der sogenannte Asymmetriewert  $A_s$  gibt die Güte einer Packung an und wird aus der Form eines Tracerpeaks ermittelt. Dabei wird entsprechend des Beispiels mit Komponente 1 in Abbildung 2-4 in 10% der Peakhöhe, die Strecke vom Lot des Peaks bis zum linken (a) und rechten (b) Rand des Signals gemessen und die Asymmetrie laut Gleichung 2-24 bestimmt.

$$A_s = \frac{b}{a} \quad (2-24)$$

Im Allgemeinen werden Asymmetriewerte zwischen 0,8-1,2 als gut eingestuft, bei größeren Werten spricht man vom sogenannten Tailing, bei niedrigeren Werten vom sogenannten Fronting. In beiden Fällen sollte die Säule neu gepackt werden, z.B. durch Verwendung eines anderen Packfaktors PF. Dieser definiert die Menge an kompressibler stationärer Phase in einer Säule  $V_{gesamt}$  im Verhältnis zu CV.

$$PF = \frac{V_{gesamt}}{CV} \quad (2-25)$$

Im Gegensatz zur Sättigungsbeladung entsprechend Gleichung 2-6 und 2-7, wird im chromatographischen Betrieb auch oft die dynamische Bindekapazität angegeben, die die Menge an adsorbierbarem Protein unter realen Bedingungen und dem Einfluss von dispersiven Faktoren widerspiegelt. Experimentell wird die dynamische Bindekapazität durch Frontalanalyse mit größeren Probevolumina bestimmt. Eine Säule wird mit einer Probe definierter Konzentration  $c_0$  beladen. Nach einiger Zeit kommt es zum Säulendurchbruch und es stellt sich ein maximaler Plateauwert ein. Das Volumen an Probe bis zum Erreichen von 50 % des Durchbruches  $V_{BT,50\%}$  wird dann bestimmt und über das Säulenvolumen zur dynamischen Bindekapazität  $DBC_{50\%}$  normiert.

$$DBC_{50\%} = \frac{c_0 V_{b,50\%}}{V_c} \quad (2-26)$$

Unter der Annahme eines symmetrischen Durchbruches entspricht die  $DBC_{50\%}$  der maximalen Sättigungsbeladung  $q_{max}$ .

Die in dieser Arbeit ebenfalls beschriebene Gleichgewichtsbindekapazität EBC wird in einem ähnlichen Versuchsaufbau ermittelt. Die Säule wird bis zur Ausbildung eines Durchbruches

beladen, anschließend gewaschen und das restliche gebundene Protein eluiert. Die Proteinmasse im Eluat wird bestimmt und über das Säulenvolumen zur EBC normiert.

### 2.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)<sup>1</sup> ist eine im Bereich der Biomolekülaufarbeitung häufig eingesetzte und wichtige flüssigchromatographische Technik. Besonders interessant ist, dass die Proteinaufreinigung mittels HIC auch im präparativen Maßstab bereits vielfach beschrieben wurde [42-45]. Neben der Trennung von Proteinen [46, 47] wurde die HIC u.a. auch als effektive Trenntechnik für die Separation plasmidischer DNS und DNS-Impfstoffe [48, 49], zur Isolierung von bakteriellen Enzymen und zur Virenentfernung aus menschlichem Blutplasma beschrieben [50]. Das Trennprinzip der HIC wurde bereits 1949 von Shepard und Tiselius beschrieben [51], unter Hjertén [52] wurde die Trennmethode allerdings erst unter ihrem heutigen Namen bekannt.

Zur Trennung von Biomolekülen über die HIC nutzt man vor allem deren unterschiedlich stark ausgeprägte hydrophobe Eigenschaften und die entsprechenden Wechselwirkungen mit hydrophob funktionalisierten stationären Phasen. Dies entspricht dem Trennprinzip der RPC, bei der ebenfalls der Einfluss hydrophober Wechselwirkungen genutzt wird. Im Gegensatz zu dieser Technik, kann bei der HIC jedoch auf die Verwendung aggressiver Lösungsmittel verzichtet und in rein wässrigen Puffern gearbeitet werden. Dies stellt vor allem für die Aufreinigung komplexer sensitiver Moleküle [53] einen entscheidenden Vorteil dar.

Heutzutage existieren eine ganze Reihe unterschiedlicher Basispartikeln. Im Falle der Bioproduktaufarbeitung wird gerne auf funktionalisierte Sepharosepartikel zurückgegriffen, die mit verschiedenen HIC-spezifischen Liganden in unterschiedlicher Ligandendichte und Methodik auf die Partikel aufgepfropft werden können. Typischerweise handelt es sich bei diesen Liganden um lineare Alkane (C4 oder C8-Ketten) oder auch aromatische Gruppen, wie Phenyle.

Die Aufreinigung von Proteinen mittels HIC läuft typischerweise über einen Wechsel des Salzgehaltes innerhalb der mobilen Phase ab. Zu Beginn einer jeden Aufreinigung liegt die Probe in Bindepuffer mit hohen Salzkonzentrationen vor. Entsprechend ihrer Hydrophobizitäten kommt es dadurch zu einer mehr oder minder stark ausgeprägten Bindung einzelner Moleküle an die

---

<sup>1</sup> Die Erläuterung der HIC orientiert sich in großen Teilen an der Einleitung zu meiner Veröffentlichung [41].

stationäre Phase. Die Fraktionierung der Moleküle geschieht im Verlauf der Elution durch Änderung der Umgebungsbedingungen in Form einer Abnahme der Salzkonzentration per Stufen- oder Gradientenelution und einer resultierenden Abschwächung der Bindeaffinitäten. Zur Ausnützung des Effektes ist die Wahl geeigneter Salze zu Beginn eines jeden Versuchs unerlässlich. Entsprechend der sogenannten Hofmeister-Reihe aus dem Jahre 1888 - eine empirisch ermittelte Auflistung von Kationen und Anionen und deren Einfluss auf die Proteinlöslichkeit in wässrigen Lösungen - sollten hierfür Salze gewählt werden, die einen kosmotropen Charakter aufweisen und nicht denaturierend (chaotrop) auf Proteine wirken [54]. Vor allem Natriumsulfate und Ammoniumsulfate haben sich etabliert. Ebenso muss die maximale Salzkonzentration mit Bedacht gewählt werden. Zu hohe Konzentrationen führen zu Bedingungen, wie sie auch während der Salzpräzipitation [55] vorliegen, und es kommt zum sogenannten Salting-out-Effekt, das heißt Proteine sind im wässrigen Medium nicht länger löslich und fallen demzufolge aus. Auf einer Festbettsäule würde dies unweigerlich zu einer Verblockung und Zerstörung der Festbettsäulen führen.

Die Retentionsmechanismen von Proteinen auf HIC Medien wurden bereits intensiv studiert und diverse Theorien wurden entwickelt [56]. Es gilt als bewiesen, dass durch die Zugabe kosmotroper Salze strukturierte Wasserschichten über den hydrophoben Liganden und entsprechend hydrophoben Stellen der Proteinoberfläche aufgebrochen werden und es dadurch zu einer Zunahme der thermodynamischen Zustandsgröße Entropie kommt [50, 57]. Diese Theorie kann mathematisch über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung in Gleichung 2-27 beschrieben werden, wobei die Änderung der Gibbsschen freien Energie, die beim Übergang der jeweiligen Komponente aus der mobilen Phase auf die stationäre Phase ( $\Delta G$ ) entsteht, über die Differenz der Enthalpieänderung des freien und adsorbierten Proteins ( $\Delta H$ ) und dem Produkt der Temperatur ( $T$ ) mit der entsprechenden Änderung der Entropie ( $\Delta S$ ) in Beziehung gesetzt wird.

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (2-27)$$

Durch Zunahme der Konzentration an kosmotropen Salzen während eines HIC Prozesses kommt es entsprechend dem zuvor erwähnten Prinzip zu einer Zunahme der Entropie und dadurch auch zu einem Anstieg von  $\Delta S$ . Da die Änderung der Enthalpie im Vergleich zum Wert des zweiten Terms der Gleichung vernachlässigbar klein ist, kommt es durch die resultierende Proteinadsorption zu einer thermodynamisch bevorzugten negativen Änderung der freien Energie ( $\Delta G < 0$ ).

### 2.3.3 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie (IEC) ist derzeit im Bereich der Biomolekülseparation die zumeist angewandte Technik und wird in etwa 75 % aller Aufarbeitungsprotokolle zur Proteinseparation angewendet [58]. Gründe dafür sind ihre vielseitige Anwendbarkeit, die Verfügbarkeit großer Mengen an stationären Phasen und Puffersystemen, die hohen Bindekapazitäten und Trennleistungen, die Fähigkeit die biologische Aktivität von Biomolekülen zu erhalten [6] sowie das unkomplizierte Trennprinzip und die einfache Durchführbarkeit [58]. Nicht verwunderlich ist daher, dass die Ionenaustauschchromatographie für zahlreiche industrielle Produktionsprozesse beschrieben ist und eingesetzt wird [42]. Erwähnenswert ist des Weiteren die Möglichkeit, größere Biomoleküle wie Immunglobuline, plasmidische DNS und Viren mittels dieser Technik zu reinigen [59]. Grundlage für den Wirkmechanismus während der Trennung mittels IEC sind unterschiedlich starke elektrostatische Interaktionen der einzelnen Moleküle mit den speziell funktionalisierten IEC-Sorbentien. Dies begründet auch die vielseitige Anwendbarkeit im Bereich der Bioverfahrenstechnik, da Biomoleküle wie Proteine, Peptide und Nukleinsäuren pH-abhängige und ionisierbare Gruppen innerhalb ihrer Struktur und/oder Oberfläche aufweisen [60] und so in Kontakt mit den ladungstragenden Gruppen der stationären Phasen treten können. Grundsätzlich zu unterscheiden sind zwei Arten von aktiven Gruppen der verwendeten Ionenaustauschliganden. Bei negativ geladenen aktiven Gruppen spricht man von Kationenaustauschern (CEX), bei positiv geladenen aktiven Gruppen von Anionenaustauschern (AEX). Je nachdem ob die Ladung der aktiven Gruppen vom pH-Wert des umgebenden Mediums beeinflusst wird oder eben nicht, unterscheidet man zusätzlich schwache und starke Ionenaustauscher. Bekannte Beispiele für schwache und starke Kationenaustauscher sind Carboxymethyl (CM)- bzw. Sulfopropyl (SP)- und Methylsulfonatgruppen (S). Im Falle von Anionenaustauschmaterialien kann Diethylaminoethyl (DEAE) als Beispiel für einen schwachen und quarternäres Aminoethyl (QAE) oder quarternäres Ammonium (Q) als Beispiel für starke Gruppen benannt werden [6].

Grundsätzlich findet die Bindung während der Ionenaustauschchromatographie in definiertem Puffer und vorgegebenem Medium bei niedrigen Salzkonzentrationen statt. Proteine können entsprechend ihrer jeweiligen Oberflächenladungen entsprechend stark an die stationäre Phase binden. Die Fraktionierung der zuvor gebundenen Proteine geschieht anschließend konventionell durch Stufen- oder Gradientenelution, indem der Salzgehalt innerhalb der mobilen Phase erhöht wird. Die jeweiligen Gegenionen zur verwendeten aktiven Gruppe treten in Konkurrenz zu den

gebundenen Komponenten und lösen so die Bindung zur stationären Phase bei definierten Konzentrationen schließlich vollends.

In der Proteinchromatographie hängt die Wahl der jeweiligen Ionenaustauschart CEX oder AEX vor allem vom pH des umgebenden Mediums und den Ladungseigenschaften des jeweiligen Proteins ab. Saure und basische Aminosäuren, besonders an der Proteinoberfläche, charakterisieren Proteine bezüglich ihrer Ladungseigenschaften. Da es sich bei Proteinen um ampholytische Moleküle handelt, kann über den pH-Wert auch die Gesamtladung oder auch Nettoladung des Moleküls eingestellt werden. Der pH-Wert, an dem die Nettoladung eines Proteins neutral ist, wird als isoelektrischer Punkt (IEP) bezeichnet und gilt als maßgeblicher Parameter zur Auslegung der IEC. Bei Werten oberhalb des IEP ist das Protein negativ geladen und die AEX bietet sich an, bei pH-Werten unterhalb des IEP sind Proteine kationisch geladen und die Adsorption auf CEX-Sorbentien ist bevorzugt. Die Elution der gebundenen Proteine kann daher alternativ zur Erhöhung der Salzkonzentration auch durch Veränderung des pH-Wertes der mobilen Phase stattfinden. Zu beachten ist, dass es für bestimmte Proteine auch zu Abweichungen dieser Theorie kommen kann. Grund dafür sind vor allem heterogene Verteilungen der ladungstragenden Gruppen und daraus resultierende Ladungsasymmetrien [61].

### **2.3.4 Kontinuierliche chromatographische Techniken**

Typischerweise erfolgen flüssigchromatographische Separationsvorgänge im absatzweisen Betrieb, d.h. dass nach der eigentlichen Trennung die Trennsäule mit teilweise teuren Reagenzien und Lösungsmitteln wieder regeneriert werden muss. Speziell für die Handhabung größerer Zulaufströme ist diese einfache Art der Durchführung aber unerwünscht, da sie den Prozess in Bezug auf Wirtschaftlichkeit und Produktivität deutlich einschränkt. Speziell die Produktivität, die als die Menge an prozessierbarem Zulaufstrom pro Zeit und Menge an stationärer Phase definiert ist, gilt hierbei als kritischer Parameter. Bei Anwendungen, bei denen die stationäre Phase nur einen Bruchteil der Prozesskosten ausmacht, kann ein einfaches Scale-up der chromatographischen Trennsäule unter Verwendung größerer Mengen an stationärer Phase durchgeführt werden. Unter Verwendung der gleichen Art an Partikeln, dem gleichen Zulaufstrom bei identischer linearer Flussrate und den gleichen bettvolumenspezifischen Elutionszeiten, können somit größere Mengen an Zulaufstrom bearbeitet werden, ohne Gefahr zu laufen die Säule zu überladen. Zur Erhöhung des Festbettvolumens wird normalerweise der Säulendurchmesser erhöht, sodass das Säulenvolumen proportional zunimmt. Dadurch wird gewährleistet, dass die Verweilzeit der Produkte in der Säule konstant bleibt und es nicht zu

Produktinstabilitäten kommt [62]. Ein Scale-up in dieser Form ist allerdings nicht ohne Einschränkungen durchführbar, da mit zunehmendem Säulendurchmesser unter anderem auch die Einflüsse radialer Strömungen und von Mischeffekten zunehmen und dadurch die Trennleistung der Säulen deutlich abnimmt [63], sowie die mechanische Druckstabilität der Partikeln aufgrund geringerer Säulenwandunterstützung nachlässt [62]. Des Weiteren ist bei Anwendungen, bei denen die verwendeten stationären Phasen einen großen Anteil an den Gesamtprozesskosten tragen, solch eine Maßstabsvergrößerung wirtschaftlich unrentabel und daher kaum realisierbar. In den letzten Jahren haben sich daher spezielle kontinuierlich arbeitende chromatographische Techniken entwickelt, mit dem Ziel den Durchsatz bei gleichbleibender oder sogar geringerer Menge an stationärer Phase zu erhöhen und zusätzlich geringere Mengen an Lösungsmitteln zu verbrauchen.

Eine bekanntere Möglichkeit ist hierbei die bereits in den 1950er Jahren beschriebene LC im Gegenstromverfahren. Im sogenannten True Moving Bed Verfahren (TMB), wird bei konstanter Probenaufgabe die stationäre Phase in Gegenrichtung der Flussrichtung der mobilen Phase geführt. Abbildung 2-5A stellt dieses Verfahren beispielsweise für eine in vier Sektionen unterteilte Festbettsäule vor.

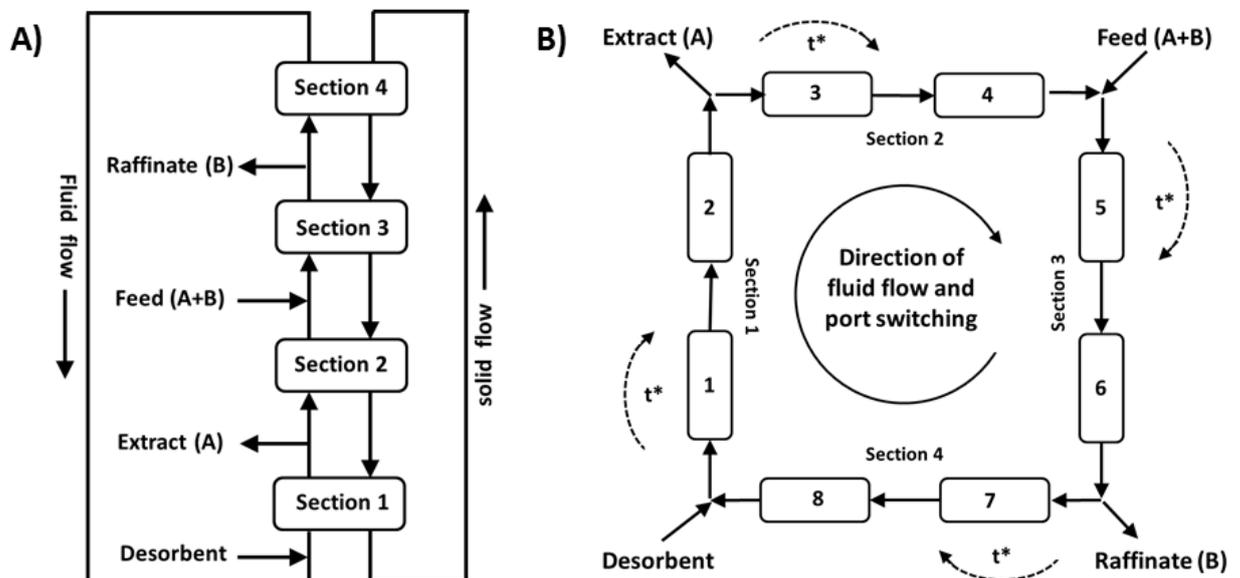
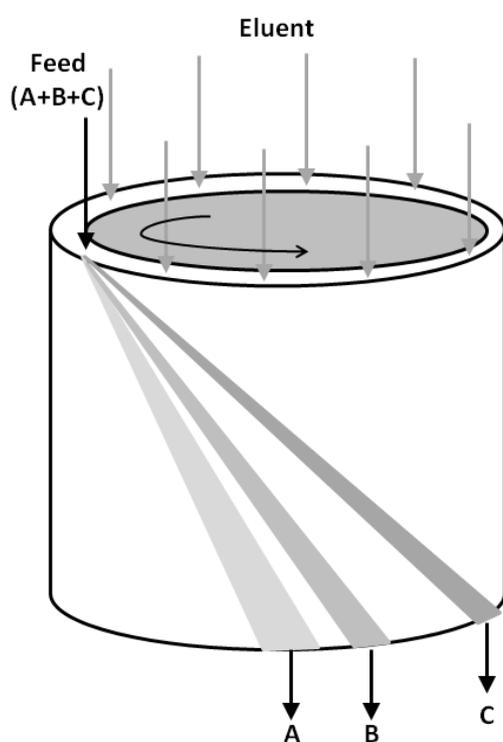


Abbildung 2-5: Chromatographische Gegenstromverfahren. (A) True-Moving-Bed Verfahren; (B) Simulated-Moving-Bed Verfahren. Aus [64].

Im hier gezeigten Beispiel ist die Festbetsäule in vier Sektionen eingeteilt, die allesamt eine wichtige Rolle im Gesamtprozess spielen. Ein Zulaufstrom mit einer Mischung der schwach bindenden Komponente B und der stark bindenden Komponente A wird kontinuierlich zwischen Sektion 2 und 3 zugeföhrt und aufgrund der Zugabe von Elutionsmittel vor Sektion 1 kommt es zur Auftrennung der Komponenten. Komponente B wandert zügig durch Sektion 3 und kann als Raffinat abgezogen werden. Kurz vor Durchbruch der Komponente A kommt es zu einem Verschalten der Säulen in Gegenrichtung der Flussrichtung der mobilen Phase. Durch geschickte Taktung der Schaltzeiten kann schließlich die Ausbildung eines stabilen Zustandes erreicht werden und ebenfalls Komponente A kontinuierlich im Extraktstrom abgeföhrt werden. In der Praxis ist das Verschalten der Festbetsäulen mechanisch nur schwierig durchföhbar [65]. Daher hat sich das Konzept der Simulated Moving Bed Chromatographie (SMB) durchgesetzt, bei der nicht die



**Abbildung 2-6: Annulare Chromatographie.** Der Zulaufstrom der Komponenten A, B und C wird kontinuierlich getrennt. Die Einzelkomponenten können unterhalb der Säule in großer Reinheit abgezogen werden. Komponente C ist die am stärksten bindende Komponente, vor B und A.

Festbetsäulen entgegen der Flussrichtung, sondern vielmehr die Zuordnung der Ein- und Auslassventile in Richtung der mobilen Phase verändert wird (vgl. Abbildung 2-5B). Die Methode stellt daher eine Möglichkeit zur kontinuierlichen Auftrennung eines Stoffgemischs dar und wurde ursprünglich in den 1960er Jahren zur großtechnischen Trennung petrochemischer Komponenten [66] und später dann auch für die kontinuierliche Auftrennung von Zuckern [67], Aminosäuren [68] und Proteinen [69] eingesetzt. Wichtigstes Einsatzgebiet heutzutage ist aber vor allem die enantiomerenreine Produktion aktiver pharmazeutischer Inhaltsstoffe APIs [66]. Der Prozess ist allerdings auf die kontinuierliche Auftrennung in zwei Stoffströme beschränkt. Zwar gibt es Ansätze für neue Prozessstrategien, sodass auch bis zu drei Stoffströme kontinuierlich abgezogen werden können, allerdings sind bis dato keine industriellen Anwendungen beschrieben [70].

Für die kontinuierliche Mehrkomponententrennung wurde daher eine andere Methode konzipiert, die sogenannte annulare Chromatographie, die bereits im

Jahre 1949 von Martin beschrieben wurde [71]. Ein entsprechendes Schaubild ist in Abbildung 2-6 zu sehen. Ein dünner Spalt einer kreisrunden Säule wird mit stationärer Phase gepackt und anschließend kontinuierlich im Kreis bewegt. An festen Positionen oberhalb des Spaltes wird durch Ventile kontinuierlich Probe aufgegeben, sowie an weiteren Ventilen Elutionspuffer. Das Gemisch wandert dadurch wendelförmig durch die Säule. Durch die Elution kommt es anschließend zu einer Auftrennung, sodass sich die einzelnen Komponenten im entstehenden Elutionswinkel unterscheiden. Stärker adsorbierende Komponenten eluieren in einem größeren Winkel. Die in einfachen absatzweisen Versuchen bestimmten Retentionszeiten der einzelnen Komponenten stehen dabei in Beziehung zum Elutionswinkel [72]. Am unteren Ende der Säule können die einzelnen Fraktionen dann an definierten Orten abgezogen werden. Anwendungen zur Reinigung von Proteinen mit dieser Technik wurden unter anderem für die kontinuierliche Entsalzung von BSA [73] und der Aufreinigung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) [72] beschrieben.

Beide vorgestellte Methoden haben den Vorteil der kontinuierlichen Trennung von Stoffgemischen und dadurch auch der Erhöhung der Produktivität. Allerdings muss erwähnt werden, dass in beiden Fällen Elutionsmittel benötigt werden und der Vorgang daher keineswegs isokratisch durchgeführt werden kann; eine Ausnahme bildet die SMB bei Verwendung eines SEC-Sorbents als stationäre Phase. Die wirtschaftliche Rentabilität der Methoden muss daher im Einzelfall betrachtet werden. Zudem muss beachtet werden, dass diese Prozesse auch durch ihre verfahrenstechnische Komplexität hohe Investment- und Instandhaltungskosten bedingen.

### **2.3.5 Monolithchromatographie**

Gegenwärtig werden in der FPLC vor allem poröse Partikel eingesetzt und in Festbettsäulen gepackt, obwohl diese Partikel zahlreiche Nachteile in ihrem Separationsverhalten aufweisen. Neben den Kapazitätsverlusten durch hohe Hohlraumvolumina zwischen den Partikeln, sind hierbei vor allem langsame diffusive Massentransportkinetiken [74] und die mangelnde Druckstabilität zu nennen. Prozesse sind dadurch in ihrem maximalen Durchsatz und ihrer maximalen Trennleistung stark beeinträchtigt. Ein Trend der Chromatographieforschung geht daher in die Richtung, neue und bessere Materialien als Basis für stationäre Phasen zu entwickeln. Eine interessante Möglichkeit bilden hierbei Monolithe, die bereits in den 1990er Jahren entwickelt wurden [75]. Bei monolithischen Trennsäulen handelt es sich um poröse stationäre Phasen, die nicht partikulär, sondern aus einem Stück gefertigt sind, deren Porengrößen genau definiert werden können und deren Porengänge zusammenhängend sind. Durch diese spezielle Struktur ergeben sich einige Vorteile der Monolithtechnologie gegenüber konventionellen

gepackten Betten. Zum einen sind Monolithen druckstabiler als kompressible Partikel und abhängig von der bei der Produktion eingestellten Porengröße entsteht auch bei großen Flussraten aufgrund geringerer Widerstände nur ein geringer Druckverlust über dem Bett. Zum anderen geschieht der Stofftransport innerhalb der Poren bei Monolithen auf dem schnellen konvektiven Wege, sodass die Kapazitäten monolithischer Säulen nicht mehr flussabhängig sind. Aufgrund der großen Durchflusporen sind Monolithe auch speziell für große Moleküle geeignet, da die Bindungsstellen nahezu uneingeschränkt erreichbar sind [76]. Resultat der erwähnten positiven Eigenschaften ist, dass Separationen mit höheren Flussraten bei gleichbleibender Trennleistung sehr viel schneller durchgeführt werden können, was die Produktivität deutlich erhöht. Als nachteilig ist bei aktuellen monolithischen Anwendungen im Vergleich zu gepackten Säulen bis dato allerdings die eingeschränkte volumenspezifische Bindekapazität zu nennen.

Zur Auftrennung von Biomolekülen haben sich vor allem Monolithe auf Polymerbasis wie Polystyrene, Polymethacrylate und Polyacrylamide durchgesetzt [74], die auf verschiedenen Wegen hergestellt werden und anschließend auch funktionalisiert werden können, um z.B. im Bereich der AEX- oder CEX- Chromatographie, HIC oder RPC angewendet zu werden. Detaillierte Informationen zur Geschichte der Monolithentwicklung, den Vorteilen verschiedener monolithischer Basismaterialien, verschiedene Herstellungsmethoden und deren Vor- und Nachteile, verschiedene Funktionalisierungen sowie Anwendungsmöglichkeiten der Monolithchromatographie können der ausführlichen Publikation von Guiochon [77] entnommen werden.

## ***2.4 Temperatureffekt der Proteinadsorption auf HIC***

Neben dem intensiv untersuchten Einfluss diverser Salze auf die Proteinadsorption auf HIC-Materialien gilt auch die Temperatur als entscheidende Einflussgröße. Dies wird schon aus Gleichung 2.20 ersichtlich, da  $\Delta G$  ebenso eine Funktion der Temperatur wie der Entropieänderung ist. Eine Erhöhung der Säulentemperatur verursacht daher ebenfalls eine Zunahme der Proteinadsorption, ebenso wie eine Erhöhung der Konzentration kosmotroper Salze [78]. So wurden bereits Untersuchungen zur Bestimmung von Gleichgewichtsparametern und Adsorptionsisothermen [79] sowie zur Änderung der Retentionszeiten und Elutionsprofile von Modellproteinen unter dynamischen Bedingungen [80, 81] bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Über die van't Hoff-Gleichung [46, 57, 82] kann speziell die Beziehung zwischen Kapazitätsfaktor und Temperatur entsprechend Gleichung 2-28 bestimmt werden.

$$\ln k' = \ln \varphi - \frac{\Delta G}{RT} \quad (2-28)$$

Aus der Gleichung folgt, dass eine Erhöhung der Temperatur zu einer stärkeren Adsorption führt und daher auch der Kapazitätsfaktor ansteigt. Des Weiteren beschreiben Muca et al. [53] erstmalig eine Möglichkeit, Temperaturgradienten gezielt zur Fraktionierung von Proteinsystemen anzuwenden. Zu beachten ist allerdings in allen Fällen die Temperaturstabilität der aufzureinigenden Proteine. Speziell der Effekt des Protein-Unfolding, d.h. Änderungen der Proteinstruktur und dadurch auch der Proteineigenschaften, konnte für bestimmte Proteine ab bestimmten Temperaturen während der Adsorption auf HIC-Medien beschrieben werden [83]. In tiefergehenden Untersuchungen wurde darüber hinaus versucht, diese Erscheinungen durch mathematische Verknüpfungen zu modellieren [84].

Um ein tiefergehendes Verständnis über die Adsorptionsvorgänge von Proteinen und den Einfluss der Systemtemperatur zu erhalten, wurde außerdem versucht, die adsorptiven Vorgänge mit thermodynamischen Zustandsgrößen genauer zu beschreiben [85-87]. Aus der Kombination von Gleichung 2-27 und 2-28 kann folgende Beziehung aufgestellt werden:

$$\ln k' = \ln \varphi - \frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (2-29)$$

wobei  $k'$  aus chromatographischen Versuchen entsprechend Gleichung 2-13 bzw. Adsorptionsexperimenten entsprechend Gleichung 2-14 bestimmt werden kann. Über die graphische Auftragung von  $\ln k'$  über dem Reziprokwert der Temperatur können nun Enthalpie- und Entropieänderung durch eine einfache Linearisierung bestimmt werden. Dies ist auf diesem Wege aber nur möglich, wenn eine lineare Abhängigkeit des Kapazitätsfaktors vorliegt und  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  und  $\varphi$  temperaturunabhängig sind. In Fällen einer nicht-linearen Beziehung sind  $\Delta H$  und  $\Delta S$  selber temperaturabhängig, wobei diese Abhängigkeit in erster Näherung durch die Wärmekapazität des Materials beschrieben werden kann [88].

## ***2.5 Thermoresponsive Polymere und Sorbentien***

Polymere sind Makromoleküle aus mehreren Einheiten, den sogenannten Monomeren, die in Ketten oder verzweigt miteinander eine chemische Verbindung eingehen. Es gibt eine Reihe von Einteilungen für die große Anzahl an existierenden Polymeren. So spricht man von Homopolymeren, wenn das Polymer aus mehreren Einheiten desselben Monomers aufgebaut ist, von Copolymeren hingegen, wenn unterschiedliche Monomere am Aufbau beteiligt sind. Des

Weiteren können Polymere chemisch synthetisiert werden oder sind als natürlich vorkommende Biopolymere essentielle Grundbestandteile des Lebens. Beispiele für Biopolymere sind Proteine (Copolymere aus verschiedenen Aminosäuren), Nucleinsäuren (Copolymere aus Nucleotiden) und Polysaccharide (aufgebaut aus Monosacchariden)[89].

### 2.5.1 Intelligente Polymere

Bei der speziellen Klasse der intelligenten Polymere handelt es sich um synthetische Polymere, die in Abhängigkeit von verschiedenen Reizen aus ihrer Umgebung ihre Form und/oder Eigenschaft verändern können [90, 91]. Andere Namen sind ‚smart polymers‘ oder stimuli-responsive und umweltsensitive Polymere [91]. Dabei liegen die Polymere nicht immer frei in wässriger Lösung vor, sondern können auch auf Oberflächen adsorbiert oder aufgepfropft sein, sowie in entsprechenden Copolymeren quervernetzt in sogenannten Hydrogelen vorliegen [91]. Hydrogele sind chemisch oder physikalisch zu einem dreidimensionalen Netzwerk verknüpfte Polymere, die große Mengen an Wasser aufnehmen können, dadurch anschwellen, aber trotzdem ihre Struktur beibehalten [89]. Nach Auslösung des jeweiligen Reizes kommt es bei freien Polymeren typischerweise zu einer Phasenänderung, die in einer Polymeragglomeration und einer Eintrübung der wässrigen Lösung resultiert. Liegt das Polymer allerdings in anderer physikalischer Form vor, führt diese Phasenänderung im Falle adsorbierter oder aufgepfropfter Polymere zu einer Änderung der Oberflächeneigenschaften der jeweiligen Grenzfläche. Hydrogele schrumpfen oder expandieren, je nach Ausprägung des entsprechenden Stimulus [89, 91]. Dabei ist der jeweilige Prozess anschließend auch wieder komplett umkehrbar [31], wobei die Kinetik der Rückentwicklung nicht zwingend der der ersten Phasenänderung entsprechen muss [91].

Es gibt eine Vielzahl von intelligenten Polymeren, die auf unterschiedlichste Umweltreize reagieren. Zu diesen Umweltreizen zählen physikalische Stimuli wie Temperatur, elektromagnetische Bestrahlung, Ultraschall und mechanischer Stress, sowie chemische Reize wie pH-Wert, spezielle Ionen und Ionenstärke, spezielle Chemikalien und nicht zuletzt biospezifische Änderungen durch das Vorhandensein von Enzymsubstraten, Affinitätsliganden und anderen biologischen Agenzien [90]. Tabelle 2-1 listet einige - teilweise auch modifizierte Polymere - und die zugrundeliegenden Reize auf.

**Tabelle 2-1: Auswahl intelligenter Polymere und ihre auslösenden Reize (nach [90]).**

Polymername	Auslösender Reiz
Poly-(N-Isopropylacrylamid)	Temperatur
Poly(acrylsäure)	pH
Poly-(N-Isopropylacrylamid)-Hydrogel, inklusive ferromagnetischer Partikel	Magnetisches Feld
Polythiopen-Gel	Elektrisches Feld
Kurzes Copolymer aus Poly-(N-Isopropylacrylamid und N-acryloxysuccinimid), inklusive Bioligand und 3-Aminopropoxyazobenzen	UV-Bestrahlung
Polyethylenglykol und Poly(2-Hydroxyethylmethacrylat), mit Dodecylisocyanat modifiziert	Ultraschall
Poly(N-isopropylacrylamid), mit Kupfer-Chlorophyllin-Salz	Licht

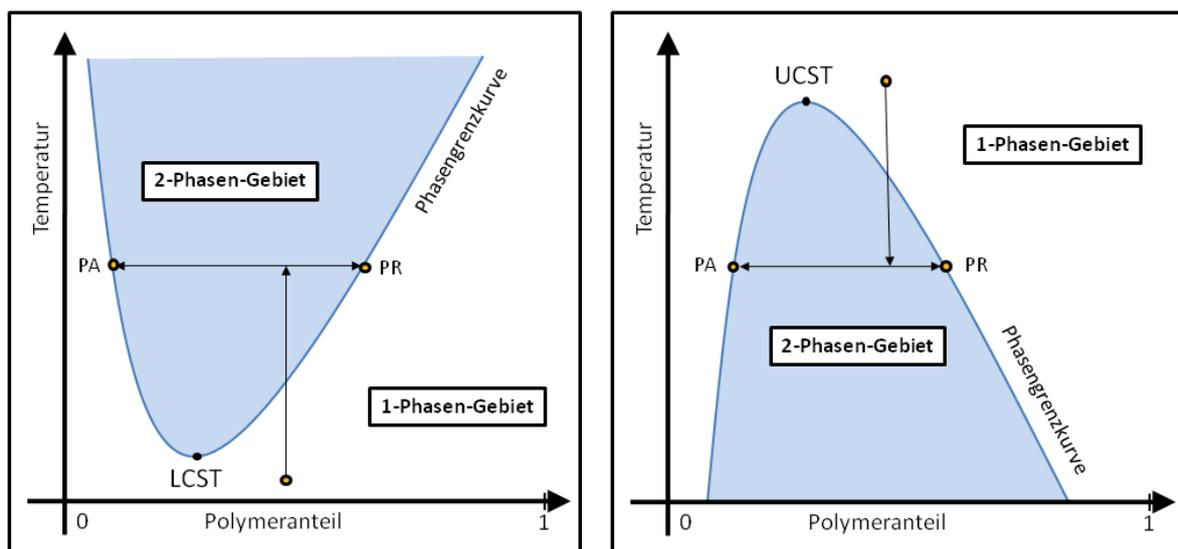
Der zugrundeliegende Mechanismus der Phasenänderung der Polymere ist abhängig vom jeweiligen Impuls. So verursacht beispielsweise eine pH-Änderung eine Neutralisierung geladener Gruppen, bei Temperaturwechseln oder Änderungen der Ionenstärken kommt es zu Wechselwirkungen mit denen das Polymer umgebenden Wasserstoffbrückenbindungen [92]. Darüber hinaus existieren auch Polymersysteme, die aus verschiedenen intelligenten Polymeren aufgebaut sind. Diese ‚multi-responsiven‘ Systeme reagieren auf mehrere Umweltreize [89].

## 2.5.2 Thermoresponsive Polymere

### 2.5.2.1 Allgemeines

Intelligente Polymere, die auf Temperaturwechsel mit einer Änderung ihrer Konformation und Löslichkeit reagieren, werden als thermoresponsive Polymere bezeichnet. Die Besonderheit thermoresponsiver Polymere liegt darin, dass sie in Lösungen einer sogenannten kritischen Lösungstemperatur (CST, **Critical Solution Temperature**) unterliegen und es bei Änderung der Umgebungstemperatur über diese CST hinweg zu einer abrupten Phasentrennung der Polymere und des umgebenden Mediums kommt. Hierbei sind zwei Arten des thermoresponsiven

Verhaltens zu unterscheiden. Ist das Polymer löslich bei niedrigen Temperaturen und unlöslich bei höheren, liegt eine untere kritische Lösungstemperatur (LCST, Lower Critical Solution Temperature) vor. Im umgekehrten Falle, also bei Polymerlöslichkeit bei höheren Temperaturen und Unlöslichkeit bei niedrigeren Temperaturen wird von einer oberen kritischen Lösungstemperatur (UCST, Upper Critical Solution Temperature) [93] gesprochen. Das Vorhandensein der LCST wird auch als negative, das Vorhandensein der UCST als positive Thermosensitivität bezeichnet [94]. Zur Beschreibung dieser Phänomene wird im Allgemeinen die Temperatur des jeweiligen Gesamtsystems über der Zusammensetzung des Gemisches aus Polymer und Lösungsmittel aufgetragen. Die dem jeweiligen System entsprechende Phasengrenzlinie unterteilt das System dann in einen einphasigen Bereich, in dem das Polymer vollständig löslich ist, und einen zweiphasigen Bereich, in dem es zur Trennung des Gemisches in eine polymerreiche und polymerarme Phase kommt. Wie in Abbildung 2-7 dargestellt, entspricht die LCST demnach dem Minimum der Phasengrenzlinie, die UCST umgekehrt dem Maximum.



**Abbildung 2-7: Phasendiagramm einer Polymerlösung mit LCST-Verhalten (links) und UCST-Verhalten (rechts). In beiden Fällen wird beispielhaft gezeigt, wie sich gelöstes Polymer definierter Konzentration im zweiphasigen Gebiet in eine polymerarme Phase (PA) und eine polymerreiche Phase (PR) entmischt.**

Liegt eine Polymermischung bei definierter Systemtemperatur im einphasigen Gebiet vor, muss sie im Falle des Vorhandenseins einer LCST erwärmt werden, im Falle des Vorhandenseins eines UCST abgekühlt werden, um ins zweiphasige Gebiet zu gelangen. Entsprechend den gezeigten Grafiken wandert der Datenpunkt senkrecht nach oben oder unten ins Zweiphasengebiet und teilt sich entlang von Konoden in die zwei Phasen auf. Die Polymerkonzentration der beiden Phasen ergibt sich dann aus dem Schnittpunkt der Konoden mit der Binodalen (Phasengrenzkurve).

LCST, UCST und der Verlauf der Phasengrenzlinie sind immer abhängig vom verwendeten Polymer und dem verwendeten Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch. In Studien konnte zudem gezeigt werden, dass durch Additive wie Salze, oberflächenaktive Substanzen, Lösungsmittel und Lösungsmittelgemische sowie Copolymerisationen die spezifischen kritischen Temperaturen veränderlich und damit auch einstellbar sind [91, 95].

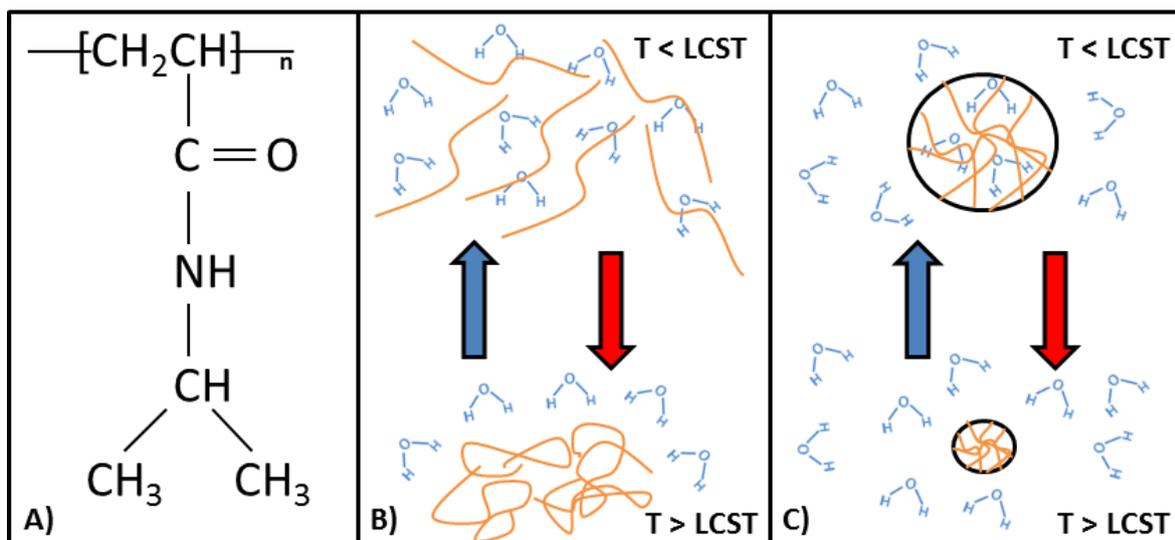
Für biotechnologische Anwendungen sind vor allem wasserlösliche Polymere mit LCST-Verhalten von großem Interesse [89]. Erste Theorien zum abrupten Phasenwechsel dieser Klasse thermoresponsiver Polymere wurden bereits 1969 von Heskins und Guillet entwickelt [96] und von weiteren Autoren [95, 97] bestätigt. Demnach kann eine abgewandelte Form von Gleichung 2-27 angewandt werden, wobei hier speziell die Änderung der freien Gibbs'schen Mischenergie ( $\Delta G_{\text{mix}}$ ) in Abhängigkeit von der Änderung der freien Mischenthalpie ( $\Delta H_{\text{mix}}$ ), der Änderung der freien Mischentropie ( $\Delta S_{\text{mix}}$ ) und der Temperatur (T) gesetzt wird.

$$\Delta G_{\text{mix}} = \Delta H_{\text{mix}} - T \Delta S_{\text{mix}} \quad (2-30)$$

Wenn  $\Delta G_{\text{mix}} < 0$  ist, wird der Mischungszustand thermodynamisch bevorzugt; bei Werten für  $\Delta G_{\text{mix}}$  größer 0 kommt es hingegen zur Phasentrennung. Werden Polymere mit Wasser gemischt, kommt es innerhalb der Polymer-Wasser-Lösung temperaturabhängig zu unterschiedlich stark ausgeprägten Wasserstoffbrückenbindungen mit den Polymeren und einem resultierenden negativen Beitrag der Mischenthalpie. Außerdem nimmt die Ordnung der Wasserstruktur im Umfeld der Polymere zu, da es im Bereich hydrophiler Polymerstrukturen zur Ausbildung der erwähnten Bindungen kommt und es bei hydrophoben Gruppen aufgrund hydrophober Abstoßungen zu einer Ordnung der Wassermoleküle um diese Bereiche kommt, was als „hydrophober Effekt“ bezeichnet wird [97]. Dadurch wird der Wert der Mischentropie ebenfalls negativ und der gesamte Entropieterm bekommt ein positives Vorzeichen. Mischenthalpie und Mischentropie sind sozusagen Gegenspieler in der Beeinflussung des Phasenverhaltens. Bei niedrigen Temperaturen nimmt der Enthalpieterm aufgrund einer hohen Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen einen stark negativen Wert ein und übertrifft den positiven Löslichkeitsterm, sodass  $\Delta G_{\text{mix}}$  einen negativen Wert annimmt und ein einphasiges Gebiet vorliegt. Durch die Erhöhung der Systemtemperatur über die LCST nimmt nun der Wert des positiven Entropieterms zu und dominiert gegenüber dem negativen Enthalpieterm, sodass es zu einer Entmischung der Phasen kommt [98].

### 2.5.2.2 Besonderheiten bekannter thermoresponsiver Polymere

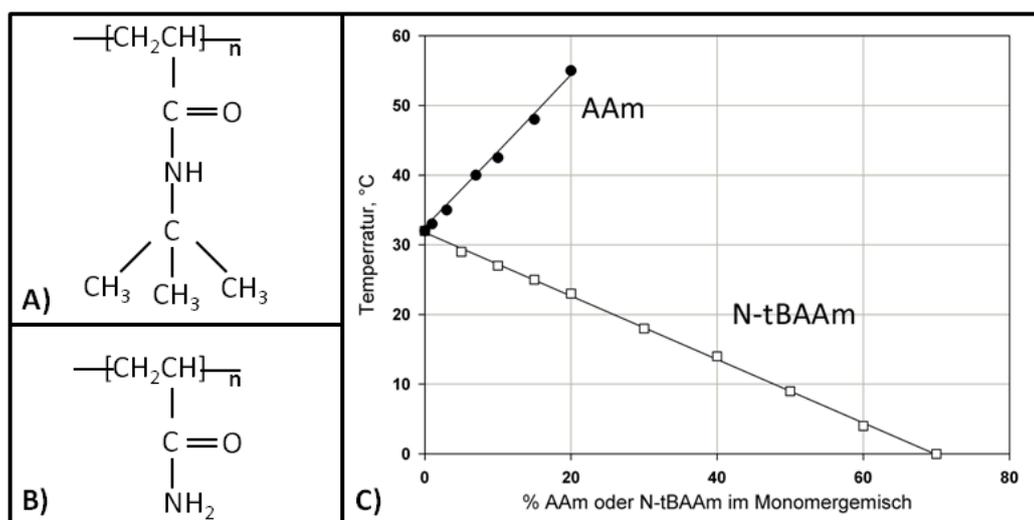
Eine ganze Reihe von thermoresponsiven Polymeren mit negativer Thermosensitivität ist inzwischen bekannt, wobei sich diese hauptsächlich in der Lage ihrer LCST unterscheiden [89, 91]. Beispielhaft sind hier Polymere wie Poly-N-Vinylcaprolactam (LCST bei 35°C), poly-N-Vinylpiperidin mit einer sehr hohen LCST von 64-65°C [99], aber auch poly-N-Acrylpiperidin-Cysteamin mit einer sehr niedrigen LCST von nur 4°C zu nennen [100]. Der bekannteste und am besten untersuchte Vertreter der Klasse der thermoresponsiven Polymere ist Poly-(N-Isopropylacrylamid) (PNIPAAm) [97], der als Homopolymer aus Isopropylacrylamidmonomeren aufgebaut ist. Erste Berichte über das Phasenänderungsverhalten von PNIPAAm stammen schon aus den Jahren 1967 [101] und 1968 [96]. In wässriger Lösung zeigt PNIPAAm ein LCST-Verhalten, mit einer LCST bei etwa 30-35 °C, entsprechend der jeweiligen Mikrostruktur [97]; in anderen Quellen wird eine LCST von genau 32°C genannt [89, 90]. Freies Polymer in wässriger Lösung zeigt beim Überschreiten der LCST ein abruptes Phasenänderungsverhalten. Hydrierte und expandierte Polymerfäden kollabieren und agglomerieren bei Temperaturerhöhung und nehmen eine kugelförmige Konformation [90] an. Thermoresponsive Hydrogele zeigen entsprechend ein ausgeprägtes temperaturabhängiges Hydrierungs-/Dehydrierungsverhalten und schrumpfen bei Erhöhung der Temperatur. Abbildung 2-8 zeigt die Strukturformel von PNIPAAm sowie schematisch die reversible Konformationsänderung freien PNIPAAms und eines PNIPAAm-Hydrogels in Abhängigkeit der Temperatur.



**Abbildung 2-8:** (A) Struktur von Poly-(N-Isopropylacrylamid)(PNIPAAm) in wässriger Lösung; (B) Darstellung der konformationellen Änderung des freien Polymers und (C) eines Hydrogels, oberhalb und unterhalb der unteren kritischen Lösungstemperatur LCST.

Aus der Struktur des Polymers geht hervor, dass sowohl hydrophile Amidgruppen als auch hydrophobe Isopropylgruppen an dessen Aufbau beteiligt sind. Die aufgestellte thermodynamische Theorie zur Temperaturabhängigkeit des Phasenverhaltens thermoresponsiver Polymere kann am Beispiel von PNIPAAm verdeutlicht werden. Bei Temperaturen unterhalb der LCST existieren Wasserstoffbrückenbindungen zu den Amidgruppen des Polymers, sowie eine Ordnung der Wasserstruktur um die hydrophoben Bereiche und eine resultierende Abschirmung der Isopropylgruppen. Durch Temperaturerhöhung kommt es zum Aufbruch der Brückenbindungen, die hydrophoben Gruppen werden nicht mehr abgeschirmt und lagern sich energetisch günstig zusammen, was mit der gezeigten Konformationsänderung einhergeht [90, 102]. Beim Vorliegen von PNIPAAm in der Form thermoresponsiver Hydrogele kommt es oberhalb der LCST aufgrund der Dissoziation des zuvor gebundenen Wassers zur Ausstoßung desselben aus dem Polymernetzwerk und einem resultierenden Schrumpfvorgang des Konstrukts [103].

Der Effekt von Copolymerisationen und der Einfluss von Additiven auf das Phasenverhalten von PNIPAAm wurde eingehend untersucht [91, 97]. So wurde festgestellt, dass Copolymere aus PNIPAAm und hydrophileren bzw. hydrophoberen Monomeren, die LCST in Abhängigkeit ihrer Konzentration verändern können. Abbildung 2-9 zeigt diesen Effekt am Beispiel der Monomere Acrylamid (AAm) und N-*tert*-Butylacrylamid (N-tBAAm).



**Abbildung 2-9:** (A) Struktur des hydrophoben N-*tert*-Butylacrylamid (N-tBAAm); (B) Struktur des hydrophilen Acrylamids (AAm); (C) Änderung der LCST eines Copolymers aus PNIPAAm und AAm bzw. N-tBAAm (nach [91]).

Die Monomere tBAAm und AAm ähneln in ihrem Aufbau sehr stark NIPAAm. Während bei tBAAm ein Wasserstoffmolekül durch eine Methyl-Gruppe substituiert ist, ist die Isopropylgruppe des NIPAAm bei AAm komplett durch Wasserstoff ersetzt. Im Vergleich zu NIPAAm hat tBAAm daher einen hydrophoberen Charakter und senkt mit zunehmender Konzentration im Copolymer die LCST, während das hydrophilere AAm zu einer deutlichen Zunahme der LCST führt und es ab einer bestimmten Konzentration schließlich sogar zu einem Verschwinden der Phasengrenze kommt [91].

Ein ähnlicher Effekt konnte mit im Wasser gelösten Salzen festgestellt werden. Da die Phasentrennung maßgeblich durch die Wasserbindungen mit dem Polymer zustande kommt [102], kann durch Zugabe bestimmter Salze die LCST entweder gesenkt oder auch erhöht werden. Hierbei konnte eine Korrelation der Temperaturverschiebung entsprechend der Hofmeister-Reihe und dem Aussalzverhalten der jeweiligen Salze festgestellt werden [54]. Wasserstrukturbrechende, d.h. aussalzende kosmotrope Salze erhöhen die Hydrophobizität des Gesamtsystems und die LCST wird gesenkt, während chaotrope Salze zu einem Anstieg der LCST führen.

Durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln zu wässrigen Lösungen von PNIPAAm kann die LCST ebenfalls entscheidend variiert werden. Hierbei sind allerdings komplexere Vorgänge zu beobachten, da z.B. die Zugabe von Methanol zu Wasser zunächst zu einer Senkung der LCST führt und erst bei größeren Konzentrationen eine Erhöhung des LCST beobachtet werden kann. Dieser Effekt, dass Polymere in gewissen binären Gemischen schlechter oder gar nicht mehr löslich sind (entspricht einem Absenken der LCST), wird in der Literatur als „Cononsolvency“-Effekt bezeichnet und beruht darauf, dass bis zu gewissen Konzentrationen die Bindungen zwischen den beiden Lösungen stärker sind als die Wasserstoffbrückenbindungen zum Polymer. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass durch Zugabe eines Lösungsmittels (z.B. Ethanol) in einem System sowohl eine LCST als auch eine UCST vorliegen kann [95].

PNIPAAm in wässriger Lösung zeigt außerdem Unterschiede in seinem Phasenänderungsverhalten während des Aufheiz- bzw. Abkühlvorganges des Gesamtsystems. Lutz et al. [104] konnten durch entsprechende Trübungsmessungen zeigen, dass beim Aufheizen eines PNIPAAm-Homopolymers ein deutlicher Phasenübergang zu erkennen ist, wobei beim Abkühlen dieser Übergang erst bei geringerer Temperatur und nicht so abrupt vonstattengeht. Diese Hysterese wird durch teilweise irreversible Konformationsänderungen erklärt.

### 2.5.3 Anwendungsmöglichkeiten von thermoresponsiven Polymeren

Thermoresponsive Polymere sind die am besten untersuchten intelligenten Polymere überhaupt [90]. Dies liegt vor allem daran, dass der Stimulus Temperatur in entsprechenden Systemen *in vivo* sowie *in vitro* gut handhabbar und steuerbar ist [89]. Neben reiner Grundlagenforschung über die zugrunde liegenden Mechanismen, haben sich im Lauf der Zeit vor allem in der Biologie und Biotechnologie zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten für diese Polymere entwickelt [90]. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über einige interessante Techniken gegeben.

Eine große Vielzahl unterschiedlicher Anwendungen bieten thermoresponsive Polymere vor allem im Bereich der Bioseparation. Eine Möglichkeit der Verwendung thermoresponsiver Polymere ist hierbei die Konjugation von speziellen Affinitätsliganden oder Enzymen an die Polymere und die anschließende temperaturinduzierte Präzipitation der Konjugate [91, 105]. Im Falle, dass Enzyme an das Polymer konjugiert sind, kann nach Umwandlung des jeweiligen Substrats, das immobilisierte Enzym durch Temperaturerhöhung einfach präzipitiert und zur Wiederverwendung vom Produkt abgetrennt werden. Im Falle von Affinitätsliganden kann das entsprechende Zielmolekül innerhalb einer Mischung mit diversen Kontaminanten an den konjugierten Liganden binden. Durch Temperaturerhöhung kann das dann präzipitierte Polymer-Ligand-Zielmolekül-Konstrukt danach abgetrennt und durch Elution kann anschließend das Zielmolekül in Reinform dargestellt werden. Auf diese Weise konnten beispielsweise IgG aus einer Lösung mit Protein A konjugierten PNIPAAm [91] und Antikörperfragmente mittels konjugierten Metallchelatabbildnern abgetrennt werden [105].

Eine weitere Verwendung thermoresponsiver Biokonjugate zur temperaturinduzierten Präzipitation stellt die Verwendung für spezielle Phasenseparations-Immunoassays, im Sinne eines ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) dar. Hierbei werden Antikörper an thermoresponsive Polymere geheftet. Nach der Bindung der Antigene kann ein zweiter Antikörper zum späteren quantitativen Nachweis adsorbiert und das gesamte Konstrukt danach durch Temperaturwechsel separiert werden. Vorteile gegenüber konventionellen Immunoassays, bei denen die primären Antikörper zunächst an die Oberflächen von Reaktionsgefäßen gebunden werden müssen, ist die direkte Durchführbarkeit des Assays in Lösung. Des Weiteren ist denkbar, dass Polymere mit unterschiedlicher Thermosensitivität und Affinitätsliganden verwendet werden, um unterschiedliche Analyten zu binden, temperaturspezifisch zu separieren und simultan quantitativ zu bestimmen [91]. Ein solches Verfahren wurde bereits für den Nachweis von Antikörpern angewendet [106].

Ebenfalls im Bereich der Bioseparation angesiedelt und eine aktuell stark untersuchte Anwendung thermoresponsiver Polymere, ist die Verwendung als oberflächenaktive Funktionalisierung auf chromatographischen Adsorbentien. Hierbei kann durch Temperaturänderung die Retention von Molekülen beeinflusst werden. Dieses Thema wird im Abschnitt 2.5.4 ausführlicher behandelt.

Die Behandlung von Oberflächen mit thermoresponsiven Polymeren kann aber auch in der Zellkulturtechnik eine Rolle spielen. Durch Beschichtung von Zellkulturplatten kann deren Oberflächenstruktur durch den Temperaturstimulus beeinflusst werden und adhärente Zellen somit schonend gelöst werden. Diese Methode kann demnach als eine Alternative zur standardmäßig angewandten Trypsinbehandlung zur Zellablösung verstanden werden [107].

Darüber hinaus können thermoresponsive Polymere auch als Aktoren und Ventile in Mikrofiltrationssystemen eingesetzt werden. Entsprechende Membranen werden mit dem Polymer funktionalisiert und der Durchfluss von Flüssigkeiten durch die Membranen kann in Abhängigkeit der Temperatur gesteuert werden [31].

Eine weitere Möglichkeit der Verwendung thermoresponsiver Hydrogele ist der *in vivo* Einsatz in sogenannten „drug delivery“ Systemen. Pharmazeutisch interessante Wirkstoffe werden hierfür zunächst innerhalb der Polymerstruktur eingeschlossen. Durch Änderung der Temperatur ändert sich die Polymer- und Porenstruktur der Hydrogele und die zuvor eingeschlossenen Moleküle können kontrolliert an definierten Wirkungsorten freigesetzt werden [108]. Außerdem wurden bereits Untersuchungen angestellt, um Enzyme in solchen Gelsystemen zu immobilisieren und dadurch Umwandlungsraten zu erhöhen. Durch die Erhöhung und Absenkung der Systemtemperatur wird das Quellverhalten der Hydrogele so ausgenutzt, dass diese als hydraulische Pumpen wirken. Bei Abkühlung des Systems kommt es dadurch zu einer Porenerweiterung und Substrat wird in das System hineingesaugt; durch Erwärmung wird anschließend das umgewandelte Produkt wieder aus dem Gel ins umgebende Medium herausgepresst [109].

#### **2.5.4 Thermoresponsive Chromatographie**

Thermoresponsive Polymere finden ihre Anwendung vor allem im Bereich der Flüssigkeitschromatographie. Hierzu werden die jeweiligen Polymere auf entsprechenden Basispartikeln funktionalisiert und ändern damit die Oberflächeneigenschaften dieser Partikel und dadurch auch die Wechselwirkungen der Partikel mit unterschiedlichen Stoffen. Als Basispartikel wurden in der Literatur vor allem Partikel auf Siliziumdioxidbasis ( $\text{SiO}_2$ ) beschrieben, als

thermoresponsives Polymer wurden vor allem PNIPAAm und diverse Copolymerisationen mit PNIPAAm genutzt. Eine ganze Reihe verschiedener Funktionalisierungen und Funktionalisierungsmethoden sind in der Literatur beschrieben.

Die Oberflächenfunktionalisierung mit thermoresponsiven Polymeren kann hauptsächlich auf zwei Wegen erfolgen. In sogenannten „grafting-to“-Ansätzen werden Polymere zunächst in freier Lösung synthetisiert. Endständige funktionelle Gruppen der so produzierten Polymere, wie Thiole, Silane und Säuren, können dann mit reaktiven Gruppen auf der Partikeloberfläche reagieren. Einen weiteren Ansatz stellen die sogenannten „grafting-from“-Ansätze dar. Hierbei wird zunächst ein Polymerisationsinitiator auf der Partikeloberfläche immobilisiert. Die eigentliche Funktionalisierung durch Polymerisierung zugegebener Monomere findet dann direkt auf der Partikeloberfläche statt. Vorteile der „grafting-from“-Ansätze sind vor allem die hohe erreichbare Polymerdichte, geringe Polydispersität und die gute Steuerbarkeit von Polymerligandendichte und -länge [31]. Im Falle von Siliziumdioxid-Partikeln wird als „grafting-to“ Ansatz häufig die Funktionalisierung von Aminopropyl-Silicapartikeln mit NIPAAm (Co-)Polymeren über aktivierte Esteraminbindungen beschrieben, für „grafting-from“-Ansätze wird häufig die radikalische Polymerisation von Polymeren auf initiatormodifizierten Partikeln genutzt [90].

Hauptvorteil der Verwendung thermoresponsiver stationärer Phasen in der Chromatographie ist die Möglichkeit, teilweise oder sogar komplett auf chemische Elutionsmittel zu verzichten. Die Affinität der Moleküle zu den schaltbaren Oberflächen kann somit im Idealfall allein durch Änderung des physikalischen Stimulus „Temperatur“ gesteuert werden und Moleküle können ohne Änderung der chemischen Zusammensetzung der mobilen Phase in Stufen oder Gradienten eluiert werden. Speziell bei der in der HPLC häufig angewandten RPC wurden organische Lösungsmittel häufig als Laufmittel eingesetzt. Für sensitive Biomoleküle wie z.B. Proteine, die ihre biologische Aktivität in diesen Lösungsmitteln nicht erhalten könnten und denaturieren würden, stellt die Arbeit in wässrigen Medien unter Verwendung dieser neuen Klasse von stationären Phasen einen deutlichen Vorteil dar. Des Weiteren können die bei Kauf und Entsorgung der Lösungsmittel entstehenden Kosten gesenkt und die Nachhaltigkeit des gesamten Verfahrens durch Vermeidung umweltgefährdender Abfälle deutlich gesteigert werden. Im Laufe der letzten 20 Jahre haben sich eine ganze Reihe unterschiedlicher chromatographischer Techniken auf Basis thermoresponsiv-polymermodifizierter stationärer Phasen entwickelt.

#### 2.5.4.1 Thermoresponsive Größenausschlusschromatographie

Eine Möglichkeit der Verwendung dieser Partikel für die Chromatographie stellt die SEC dar. Siliziumdioxidpartikel wurden dazu mit Diethylaminoethyl-Dextranen modifiziert und anschließend mit thermoresponsivem PNIPAAm funktionalisiert. Bei Temperaturen unterhalb der LCST konnte für Proteine eine höhere Auflösung festgestellt werden, die wohl mit den hydrophilen Eigenschaften des PNIPAAm bei diesen Temperaturen und einer resultierenden Porosität der Partikel einhergeht. Bei Temperaturen oberhalb der LCST wurde der reine Trenneffekt durch Größenausschluss durch die nun stärker hydrophoben Wechselwirkungen des PNIPAAm mit den Proteinen beeinflusst. Die Elutionszeiten einiger Komponenten nahmen zu, die Auflösung des Systems wurde reduziert [110]. Ebenfalls beschrieben ist die PNIPAAm-Funktionalisierung poröser Polystyrenpartikel. Durch Wahl von Cyclohexanol als Porogen innerhalb des beschriebenen Polymerisierungsprotokolls wurde die innere und äußere Partikeloberfläche gleichmäßig funktionalisiert. Bei Erhöhung der Temperatur konnte für höhermolekulare Dextrane eine erhöhte Retentionszeit nachgewiesen werden, die wohl durch den Kollaps der Polymerketten innerhalb der Poren begründet ist und damit zu einer Porenvergrößerung der Partikel führt [111]. Eine Abwandlung innerhalb der thermoresponsiven SEC stellt die Verwendung stationärer Phasen dar, die aus thermoresponsiven Polymeren aufgebaut sind und nicht noch extra funktionalisiert werden müssen. Adrados et al. [112] beschreiben solch ein Verfahren, bei dem Partikel aus thermoresponsiver Hydroxypropylzellulose ein temperaturabhängiges Schwellverhalten und eine resultierende Variation der Partikelporosität zeigen. Bei Raumtemperatur sind die Partikel in geschwollenem Zustand, die Poren sind vergleichsweise groß und die so hergestellten Partikel zeigen einen Größenausschluss für Proteine <20 kDa. Bei Temperaturen oberhalb der LCST schrumpfen Partikel und auch Poren, sodass sogar Lysozym mit einer molekularen Größe von etwa 14 kDa nicht in die Poren eindringen kann.

#### 2.5.4.2 Thermoresponsive Hydrophobe Interaktionschromatographie

Eine weitere Möglichkeit stellt die Anwendung thermoresponsiver stationärer Phasen in der Hydrophoben Interaktionschromatographie dar. Schon 1996 konnten Kanazawa et al. [113] zeigen, dass eine Änderung der Temperatur zur Änderung der Oberflächeneigenschaften thermoresponsiver Silicaoberflächen führt; bei niedrigen Temperaturen zeigen diese Partikel hydrophiles, bei Temperaturen oberhalb der LCST hydrophobes Verhalten. So konnte erstmals aufgezeigt werden, dass eine Mischung aus fünf unterschiedlich hydrophoben Steroiden in wässriger mobiler Phase allein durch Erhöhung der Temperatur in zunehmender Auflösung

voneinander getrennt werden kann. In weiteren Veröffentlichungen wurde mit ähnlichen und optimierten funktionalisierten Partikeln außerdem die temperaturinduzierte Trennung von Peptiden und Proteinen beschrieben [114-118]. In weiterführenden Untersuchungen wurde zudem nachgewiesen, dass die Trennleistung durch stufenweise oder gradielle Änderung der Temperatur innerhalb des Systems bei isokratischer Verwendung wässriger mobiler Phase sogar noch gesteigert werden kann [119]. Teal et al. [120] beschrieben außerdem die mögliche Anwendbarkeit dieser Technik für die Trennung von Aminosäuren, Enzymen und Nukleotiden mit PNIPAAm basierten Hydrogelen, wobei PNIPAAm hierbei alleine oder als Komposit mit kommerziell erhältlichen quervernetzten Dextranpartikeln eingesetzt wurde.

### **2.5.4.3 Thermoresponsive Affinitätschromatographie**

Auch die proteinspezifische temperaturabhängige Chromatographie stellt eine Anwendungsmöglichkeit der thermoresponsiven Chromatographie dar. Hierbei können spezielle Affinitätsliganden in Kombination mit thermoresponsiven Polymeren auf der Oberfläche spezieller Partikel gebunden werden und spezifische Zielmoleküle – und nicht ganze Molekülklassen – in einem Schritt selektiv gebunden und ebenfalls rein isokratisch durch Temperaturänderung eluiert werden. Kikuchi et al. [121] haben ein entsprechendes Modell vorgeschlagen, bei dem auf aminfunktionalisierten Polymethacrylatpartikeln sowohl PNIPAAm als auch der Farbstoff und Affinitätsligand Cibacron Blue gebunden wurde und spezifisch humanes Serumalbumin von anderen Proteinen aus menschlichem Blutserum getrennt werden konnte. Hierbei wurde PNIPAAm zuvor in definierter Länge hergestellt und über eine endständige Carboxygruppe auf die aminierten Partikel aufgepfropft („grafting-to“-Ansatz). Der Affinitätsligand wurde über sogenannte Spacermoleküle (Abstandshalter des Liganden zur Oberfläche) unabhängig vom thermoresponsiven Polymer gebunden. Dabei wurde beachtet, dass die Länge des Spacers geringer ist als diejenige der Polymere. Bei Temperaturen oberhalb der LCST, d.h. bei kollabiert vorliegenden Polymeren, kommt es auf diese Weise zur spezifischen Adsorption von Serumalbuminen. Bei Temperaturerniedrigung und resultierender Expansion der Polymerketten werden die zuvor gebundenen Proteine nahezu vollständig von ihren Bindungsstellen heruntergedrückt.

### **2.5.4.4 Thermoresponsive Ionenaustauschchromatographie**

Durch die Möglichkeit der Copolymerisation thermoresponsiver Monomere mit Monomeren mit geladenen Gruppen ist auch die Anwendung im Bereich der Ionenaustauschchromatographie bereits beschrieben worden. Die Herstellung eines thermoresponsiven Anionenaustauschers

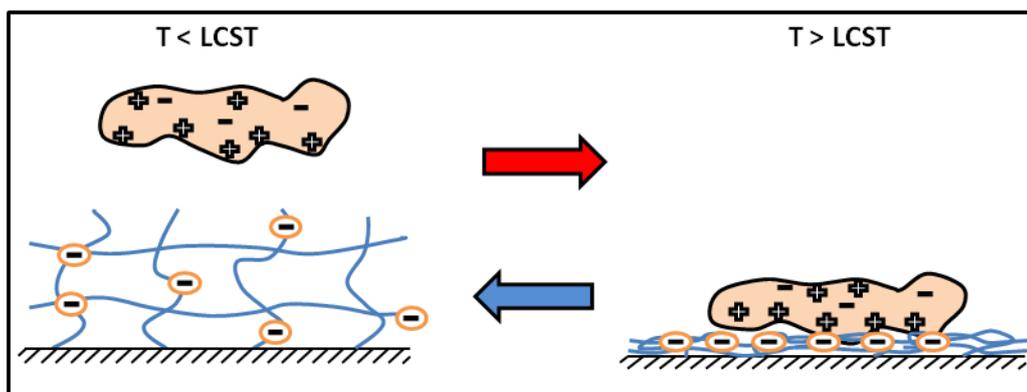
wurde von Ayano et al. [122] beschrieben. Hierbei wurden Silicapartikel mit einem Gemisch zweier thermoresponsiver Materialien (PNIPAAm und Butylmethacrylat) und der kationisch geladenen Gruppe *N,N*-Dimethylaminopropylacrylamid hergestellt und die Trennleistung am Beispiel pharmazeutischer Inhaltsstoffe getestet. Lagen die Analyten aufgrund des eingestellten pH-Werts in neutraler oder positiv geladener Form vor, dominierten vor allem hydrophobe Wechselwirkungen. Im Falle von negativ geladenen Analyten konnte eine Trennung aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen erfolgen. Bei Kombination dieser Partikel und Analyten konnte die Retentionszeit durch Absenkung der Systemtemperatur gesteigert werden. Erklärt wird dieses Verhalten durch die Abschirmung ladungstragender Gruppen bei Temperaturerhöhung durch aggregierende Polymere und der Ladungseigenschaft des geladenen Monomers, da mit zunehmender Temperatur ein Vorzeichenwechsel des Zetapotentials der Partikel von positiv nach negativ beobachtet werden konnte [123]. Die Separation von Proteinen mit ähnlich produzierten Anionenaustauscherpartikeln wurde von Nagase et al. [124] beschrieben. In diesem Fall erhöht sich jedoch die Retentionszeit negativ geladener Proteine bei Erhöhung der Systemtemperatur deutlich. Zudem konnte gezeigt werden, dass die elektrostatischen Wechselwirkungen mit zunehmender Salzkonzentration abgeschwächt werden. Kobayashi et al. [125, 126] haben die Funktionalisierung von Silicapartikeln mit einem Copolymer aus PNIPAAm, tBAAM und der anionisch geladenen AAc (poly-(NIPAAm-co-AAc-co-tBAAM)) zur Produktion thermoresponsiver Kationenaustauscherpartikel erstmals beschrieben. Die chromatographische Aufreinigung unterschiedlich stark positiv geladener Catecholaminderivate und Peptide konnte mit diesem Medium gezeigt werden, wobei es in diesem Falle zu deutlich stärkerer Retention bei Temperaturen bis etwa 35°C kommt. Oberhalb dieser Temperaturen nahmen die Wechselwirkungen wieder ab. Dies wird durch Änderungen der Ladungsdichten auf der Partikeloberfläche erklärt, die durch Polymeragglomerationen im Umfeld der ladungstragenden Gruppen zustande kommen und mit zunehmender Temperatur abnehmen.

#### **2.5.4.5 Biokompatible thermoresponsive Protein-Ionenaustauschchromatographie**

Die Aufreinigung von Proteinen mit thermoresponsiven Kationenaustauschpartikeln wurde erstmals von Maharjan [127] beschrieben. Als Basismaterial wird hierbei allerdings kein Silica, sondern quervernetzte Agarose – sogenannte Sepharose – verwendet. Grund für die Wahl dieses porösen Materials ist, dass es Vorteile bei biotechnologischen Anwendungen gegenüber Silicapartikeln aufweist. Neben den höheren Kosten der Silicapartikel ist die Unbeständigkeit von Silica-basierten Partikeln gegenüber stark basischen Agenzien wie Natronlauge, die zur

Regeneration der verwendeten stationären Phasen aber benötigt werden, ein entscheidendes Kriterium gegen dieselben.

Die zuvor bereits erwähnte poly(NIPAAm-co-AAc-co-tBAAm) Copolymerisierung wurde per „grafting-from“ Ansatz auf die Partikel gepfropft. Zusätzlich wurde der Polymermischung noch der Quervernetzer N,N-Metylenbisacrylamid (MBAAm) mit einer geringen Konzentration (etwa 1 % der gesamten Monomerkonzentration) zugesetzt. Das spezielle und quervernetzte Polymerkonstrukt aus poly(NIPAAm-co-AAc-co-tBAAm-co-MBAAm) wird als ItBA bezeichnet. Als Modellprotein wird das basische Protein Lactoferrin gewählt, welches mit zunehmender Temperatur eine höhere Affinität zu den verwendeten Partikeln aufzeigt. In säulenchromatographischen Versuchen mit Temperierung der Gesamtsäule, konnte eine Trennung des Lactoferrin von zwei negativ geladenen Proteinen gezeigt werden. Hierfür wurde die Säule zunächst bei 50°C betrieben, sodass nur Lactoferrin binden konnte, anschließend wurde das Protein durch eine Temperaturerniedrigung auf 20°C eluiert. Als mobile Phase wurde ein wässriger Phosphatpuffer mit minimaler Ionenstärke eingesetzt. Das Prinzip der temperaturinduzierbaren Ionenaustauschchromatographie dieser Partikel mit basischen Proteinen wird in Abbildung 2-10 dargestellt.



**Abbildung 2-10: Schematische Illustration der Wechselwirkung von basischen Proteinen und der Oberfläche von biokompatiblen thermoresponsiven Kationenaustauschpartikeln (ItBA-Funktionalisierung) in wässriger Lösung bei neutralem pH, unterhalb der LCST (links) und (B) oberhalb der LCST (rechts).**

Durch die Copolymerisation wird die poröse Oberfläche in Form eines Hydrogels modifiziert. Bei geringen Temperaturen unterhalb der LCST liegt das Polymerkonstrukt in expandierter, hydratisierter Form vor. Elektrostatische Wechselwirkungen dominieren zwar gegenüber hydrophoben, doch sie sind aufgrund der geringen Ladungsdichte über das gesamte Hydrogelvolumen nur schwach ausgeprägt, was zu einer geringen Bindungsaffinität für basische

Proteine führt. Bei Erhöhung der Temperatur kommt es zum Kollaps der Polymerketten und einer Agglomeration an der Partikeloberfläche. Hydrophobe Wechselwirkungen des thermoresponsiven Polymers nehmen dabei genauso zu, wie die Ladungsdichte der ladungstragenden Acrylsäure auf der Partikeloberfläche. Daraus resultieren eine größere Affinität des Zielproteins und schließlich auch seine Adsorption. Durch erneute Abkühlung expandieren die Polymerfäden wieder und die zuvor gebundenen Proteine desorbieren.

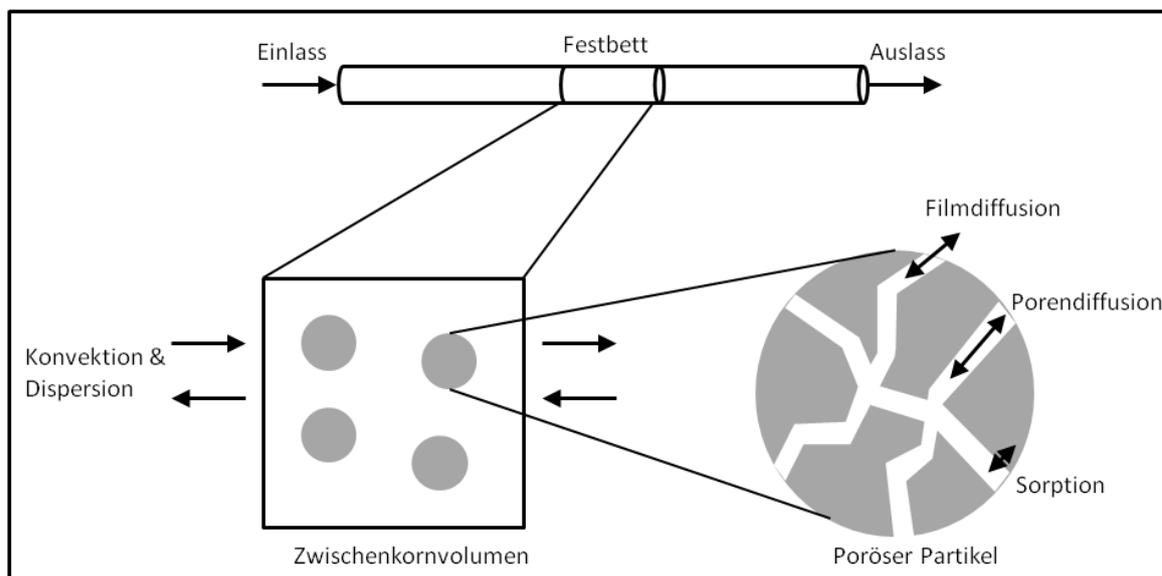
## ***2.6 Chromatographische Modellierung und Simulation***

In Abschnitt 2.1 wurde bereits die Anwendbarkeit von *in silico* Modellen zur Bioprozessoptimierung angesprochen. Im Folgenden wird nun nochmals speziell auf die modellgestützte Chromatographiesimulation eingegangen.

Unter Modellierung wird hierbei die vereinfachte mathematische Darstellung eines chromatographischen Systems verstanden, wobei die Genauigkeit des jeweiligen Modells abhängig von der Wahl der Parameterquantität und -qualität ist. Die eigentliche Simulation entspricht anschließend der mathematischen Berechnung der jeweiligen Stoffkonzentration und der entsprechenden Partikelbeladung einer Komponente zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter Verwendung des jeweiligen Modells. Dazu ist die möglichst genaue Kenntnis der im Modell verwendeten Parameterwerte notwendig. Mittels der Simulationsdaten können dann Vorhersagen zu chromatographischen Systemen getroffen werden, mit dem Ziel der Optimierung, Planung und zur Akquise eines tieferen Prozessverständnisses.

Bei der Modellerstellung für chromatographische Trennprozesse spielen neben den eigentlichen Stoffeigenschaften der zu trennenden Moleküle auch Systemeigenschaften der verwendeten Festbetten und Adsorptionsvorgänge eine entscheidende Rolle. Die resultierenden Simulationen werden daher häufig durch zu hohe Rechenzeiten und unbekannte Prozessparameterwerte eingeschränkt. Oftmals werden daher vereinfachte Modelle erstellt, indem mehrere Parameter zusammengefasst und/oder verschiedene theoretische oder empirisch basierte Korrelationen zur Parameterberechnung angewandt werden. Einen Überblick über unterschiedlich detailliert beschriebene chromatographische Modelle liefert hierfür beispielsweise das Buch von Gu [128]. Der Simulationsprozess kann durch diese Techniken vereinfacht werden, kann aber teilweise die hohen Ansprüche an ein genaues Prozessverständnis nicht mehr ausreichend befriedigen. Einen guten Kompromiss bildet dabei das sogenannte „general rate model“, das sowohl eine

Beschreibung des extrapartikulären als auch des intrapartikulären Stofftransports beinhaltet. Abbildung 2-11 illustriert alle in diesem Modell einzeln betrachteten Prozessparameter.



**Abbildung 2-11: Schematische Illustration der Einflussparameter innerhalb des „general rate model“ für chromatographische Simulationen (nach [129]).**

Die Moleküle werden in der mobilen Phase konvektiv durch das Zwischenkornvolumen des gepackten Bettes gepumpt. Durch Verwirbelungen, ungleiche Packungen und Flussinhomogenitäten kommt es dabei zu Dispersionseffekten. Der Stofftransport der Moleküle aus der mobilen Phase an die Partikeloberfläche aufgrund von Konzentrationsunterschieden wird durch die stagnierende flüssige Phasengrenzschicht limitiert und als Filmdiffusion bezeichnet. Der Stofftransport innerhalb poröser Partikel ist als Porendiffusion definiert. An der Partikeloberfläche und der inneren Oberfläche kommt es dann zur Einstellung des Sorptionsgleichgewichts, wobei auch dieser Vorgang Stofftransportlimitierungen unterliegen kann.

In den letzten Jahren haben sich unterschiedliche Verfahren entwickelt, um die erstellten Modelle mathematisch in entsprechende aussagekräftige Ergebnisse umzuwandeln. Im Folgenden wird zusammenfassend aber auf den Lösungsansatz aus der Publikation von von Lieres und Andersson [129] eingegangen. Die eigentliche mathematische Berechnung zur Simulation bestimmter Trennaufgaben mittels des „general rate model“ wird durch die numerische Lösung einer Reihe von Differentialgleichungen durchgeführt. In Abhängigkeit der gewünschten Genauigkeit der Ergebnisse wird die Säule hierzu in eine mehr oder minder große Anzahl einzelner Abschnitte räumlich und zeitlich diskretisiert, um Gleichgewichtsbedingungen in möglichst kleinen

Volumenelementen darstellen zu können. Darüber hinaus können die porösen Partikel in einzelne Schalen unterteilt werden, um somit Beladungsprofile auch in dieser radialen Ebene mathematisch darstellen zu können. Das eigentliche Modell, das nach der entsprechenden Aufteilung für alle entstehenden Abschnitte des Systems gelöst werden muss, besteht aber prinzipiell nur aus zwei Arten nichtlinearer partieller Differentialgleichungen, die den Massenbilanzen jeder einzelnen Komponente in der mobilen Phase und in den Partikeln entsprechen. Zusammen mit geeigneten Randwertbedingungen sind numerische Algorithmen inzwischen dazu befähigt, aus der resultierenden großen Anzahl partieller Differentialgleichungen die Konzentrations- und Beladungsverläufe innerhalb der Festbettsäule bestimmen zu können. Die Darstellung der jeweiligen Ergebnisse kann dann unter anderem in Form von Chromatogrammen oder auch zu definierten Zeitpunkten innerhalb der Säule als Konzentrationsprofile wiedergegeben werden.

Zur Beschreibung der Massenbilanz einer Komponente  $i$  innerhalb der interstitiellen mobilen Phase wird Gleichung 2-31 verwendet. Diese Gleichung beinhaltet Konvektion, Dispersion und Filmdiffusion, wobei  $c_i$  die Konzentration der Komponente  $i$  in der mobilen Phase,  $t$  die Zeit,  $z$  den Ort,  $v_{int}$  die Zwischenkorngeschwindigkeit,  $D_{ax}$  den axialen Dispersionskoeffizienten,  $r_p$  den Partikelradius,  $\beta_c$  das Verhältnis von Gesamtvolumen der mobilen Phase zu Gesamtpartikelvolumen und  $j_{f,i}$  den konzentrationsabhängigen Stoffstrom durch den Grenzflächenfilm bezeichnet.

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = -v_{int} \frac{\partial c_i}{\partial z} + D_{ax} \frac{\partial^2 c_i}{\partial z^2} - \frac{1}{\beta_c} \frac{3}{r_p} j_{f,i} \quad (2-31)$$

Die entsprechende Massenbilanz im Partikel wird in Gleichung 2-32 beschrieben und beinhaltet Terme für die Porendiffusion und Sorptionsprozesse, wobei  $c_{p,i}$  die Konzentration der Komponente  $i$  im Partikel,  $D_{p,i}$  der Porendiffusionskoeffizient,  $r$  die radiale Koordinate,  $\beta_p$  das Verhältnis von Zwischenkornvolumen zum Volumen der stationären Phase und  $q_i$  die Beladung einer Komponente  $i$  auf der stationären Phase bezeichnet.

$$\frac{\partial c_{p,i}}{\partial t} = D_{p,i} \left( \frac{\partial^2 c_{p,i}}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_{p,i}}{\partial r} \right) - \frac{1}{\beta_p} \frac{\partial q_i}{\partial t} \quad (2-32)$$

Der negative Beladungsterm kann wie folgend umgestellt werden.

$$-\frac{1}{\beta_p} \frac{\partial q_i}{\partial t} = -\frac{1}{\beta_p} \frac{\partial q_i}{\partial c_{p,i}} \frac{\partial c_{p,i}}{\partial t} \quad (2-33)$$

Die Kombination von Gleichung 2-32 und 2-33 führt zu einer partiellen Differentialgleichung, in der die Beladung der Partikel mit einer Komponente  $i$  in Abhängigkeit der entsprechenden Konzentration in den Partikeln gesetzt wird.

$$\left(1 + \frac{1}{\beta_p} \frac{\partial q_i}{\partial c_{p,i}}\right) \frac{\partial c_{p,i}}{\partial t} = D_{p,i} \left( \frac{\partial^2 c_{p,i}}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_{p,i}}{\partial r} \right) \quad (2.34)$$

Die Abhängigkeit der Beladung von der Konzentration in Gleichung 2.34 kann über bekannte Modelle wie das Langmuir-Modell im Einkomponentenfall, oder das Butler-Ockrent-Modell in binären und Multikomponentensystemen beschrieben werden. Bei Kenntnis weiterer Abhängigkeiten können entsprechende Modelle erstellt und eingepflegt werden.

### 3 Der Travelling Cooling Zone Reactor

Technische Anwendungen adsorptiver Prozesse müssen dazu geeignet sein, die zu trennenden Komponenten reversibel adsorbieren und desorbieren zu können. Generell wird in der adsorptiven Flüssigkeitschromatographie hierbei die chemische Zusammensetzung der mobilen Phase variiert und damit die Bindungsaffinitäten der Substanzen mit der stationären Phase beeinflusst. Wenn diese chemisch induzierbare Elution aus Gründen der Nachhaltigkeit vermieden werden soll, stellt die Änderung physikalischer Parameter – vor allem Temperatur und Druck – die einzige Variante dar. Speziell für die Reinigung von Gasgemischen und Abreicherung von flüchtigen Kontaminanten haben sich in der Vergangenheit Techniken wie die „Temperature-Swing-Adsorption (TSA)“ und „Pressure-Swing-Adsorption (PSA)“ entwickelt. Im Falle der TSA kommt es bei niedriger Temperatur zur Adsorption der entsprechenden Kontaminanten innerhalb eines Festbetts einer porösen stationären Phase; durch periodische Erwärmung kann das Festbett anschließend wieder regeneriert werden [130, 131]. Die PSA funktioniert ähnlich, hierbei wird allerdings der Druck periodisch geschaltet [132]. Entsprechende technische Lösungen sind in der Literatur beschrieben. Bei flüssigchromatographischen Adsorptionsprozessen spielen Druckabhängigkeiten eine vernachlässigbare Rolle, wohingegen Temperaturabhängigkeiten mehr oder minder stark ausgeprägt sind. Speziell durch die Verwendung thermoresponsiver Materialien (vgl. Abschnitt 2.5.4) ist hier aber das Potential für eine entsprechende Technologieentwicklung gegeben. Die technische Anwendung thermoresponsiver Polymere in chromatographischen Festbettsäulen zur Trennung von Biomolekülen wurde in der Literatur bisher immer durch Temperierung der gesamten Säule beschrieben. Dabei handelt es sich zumeist um doppelwandige Säulen, sodass das Gesamtsystem mittels Wassertemperierung geregelt werden kann [119]. Eine interessante Variante stellt auch die Temperierung thermoresponsiv funktionalisierter Magnetpartikel durch ein von extern aufgeprägtes alternierendes Magnetfeld dar [133]. Neben den bereits erwähnten ökonomischen und ökologischen Vorteilen der temperaturwechselbasierten Separation weist diese auf absatzweisen Betrieb beschränkte verfahrenstechnische Auslegung allerdings auch einige Nachteile auf:

- (1) Der Unterschied der Gleichgewichtsparameter durch Temperaturwechsel im maximal anwendbaren Temperaturbereich<sup>2</sup> ist nicht so stark ausgeprägt wie beispielsweise bei

---

<sup>2</sup> Bei niedrigen Temperaturen steigt die Viskosität und damit auch der unerwünschte Druckverlust über dem gepackten Bett, bei hohen Temperaturen besteht die Gefahr der Produktzerstörung durch Denaturierung.

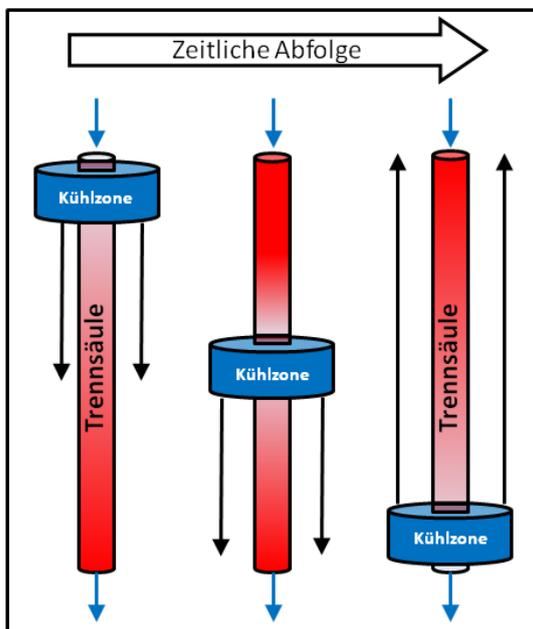
chemischen Elutionsverfahren. Durch Dispersionseffekte innerhalb der Säule und eine resultierende Verdünnung desorbierten Komponenten sind Peakschärfe und resultierende Aufkonzentrierung oftmals ungenügend.

- (2) Die Raum-Zeit-Ausbeute absatzweiser thermoresponsiver Verfahren ist oftmals unzureichend, da durch die periodische Temperaturvariation immer zusätzliche Zeit aufgewendet werden muss um die gesamte Säule aufzuheizen bzw. abzukühlen.
- (3) Temperatur-basierte Verfahren benötigen zur Erwärmung ganzer Säulen große Mengen an Energie.

Um die angesprochenen Vorteile zu nutzen und die Nachteile zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit eine Anlage zur effizienten Flüssigchromatographie von Molekülen auf Basis thermoresponsiv funktionalisierter stationären Phasen entwickelt.

### 3.1 Das Prinzip des Travelling Cooling Zone Reactors

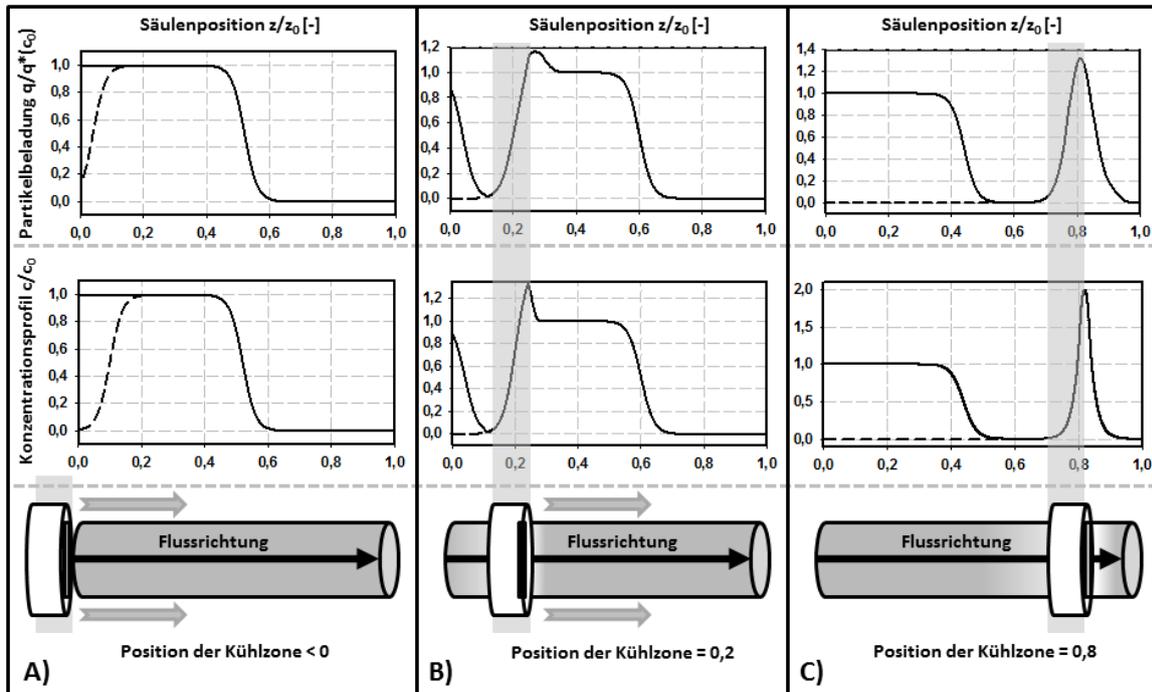
Der sogenannte Travelling Cooling Zone Reactor (TCZR) ist ein spezielles Separationsreaktorarrangement, das für die quasi-kontinuierliche, flüssigchromatographische



**Abbildung 3-1: Illustration einer Verfahrensweise der Kühlzone (schwarze Pfeile) in gleicher Richtung der Flussrichtung der mobilen Phase (blaue Pfeile) und zurück in die Startposition.**

und thermoresponsive Separation von Proteinen in einem Festbett entwickelt wurde. Prinzipiell besteht das System aus einem temperierbaren Reaktorraum, innerhalb dessen eine mit thermoresponsiven Sorbentien gepackte Chromatographiesäule befestigt ist. Eine kühlbare Temperaturzone (Kühlzone), die einen Bruchteil der Länge der Säule ausmacht, umgibt diese und kann mit definierter Geschwindigkeit entlang der Säule bewegt werden. Abbildung 3-1 illustriert eine Verfahrensweise der Kühlzone entlang der mit thermoresponsiven Sorbens gefüllten Chromatographiesäule. Dabei ist die Säule zunächst auf eine höhere Umgebungstemperatur temperiert.

Im Folgenden wird das Konzept des Systems erläutert, wobei die chromatographische Säule mit denen in Abschnitt 2.5.4.5 beschriebenen thermoresponsiven Sorbentien gepackt ist und die Ausgangslösung nur aus einem gelösten Protein besteht. Das Protein bindet in diesem Falle bei erhöhter und eluiert bei niedrigerer Temperatur.



**Abbildung 3-2:** Schematische Illustration einer Kühlzonenverfahung entlang einer mit thermoresponsiven Sorbentien gepackten Säule. Die durchgezogenen Linien markieren den Fall eines kontinuierlichen Zulaufs einer Einstofflösung, die gestrichelte Linie stellt den absatzweisen Fall mit Pulsaufgabe dar. Die einmalige Verfahung der Kühlzone wird sukzessive von links nach rechts gezeigt, wobei drei charakteristische Zeitpunkte gewählt sind: Die Kühlzone befindet sich (A) außerhalb der Säule, (B) bei 20% der Säulenlänge, (C) bei 80% der Säulenlänge.

Abbildung 3-2 illustriert das Konzept und erläutert die zu erwartenden Konzentrations- und Beladungsprofile in der Säule zu drei unterschiedlichen Zeiten bzw. Positionen der Temperaturzone. Die dargestellten Positionen der Säule folgen in einer Verfahung zeitlich aufeinander von links nach rechts; die erste Position entspricht dem Beginn einer jeden Verfahung, die Kühlzone befindet sich außerhalb der Säule; anschließend werden Positionen der Kühlzone beschrieben, nachdem sie 20 % bzw. 80 % der Säulenlänge erreicht hat. Neben der Darstellung eines kontinuierlichen Zulaufstroms (durchgezogene Linie) wird zusätzlich auch der Fall einer definierten Pulsaufgabe (gestrichelte Linie) dargestellt. Dabei werden die folgenden Annahmen getroffen:

- (1) Der Temperaturunterschied durch die Kühlzone reicht aus, um alles zuvor gebundene Protein zu desorbieren.
- (2) Die Geschwindigkeit der wandernden Kühlzone ist kleiner als die interstitielle Flussgeschwindigkeit der mobilen Phase und schneller als die Wanderungsgeschwindigkeit der Konzentrationsfront.
- (3) Diffusive Massentransportlimitierungen spielen eine untergeordnete Rolle.

Zu Beginn des Prozesses (vgl. Abbildung 3-2A) liegt die Säule in unbeladener Form vor, die Kühlzone befindet sich außerhalb der gepackten Säule. Der Reaktorraum wird auf eine definierte Adsorptionstemperatur erwärmt und die Säule mit einem definierten Puls oder kontinuierlich mit einer proteinhaltigen Zulauflösung beladen. Infolgedessen kommt es zur Ausbildung einer dem chromatographischen Sorbens, der Packung und der bindenden Komponente entsprechenden Konzentrationsfront des freien Proteins in der mobilen Phase innerhalb der Säule. Außerdem bildet sich ein zugehöriges Beladungsprofil adsorbierten Proteins auf der stationären Phase aus. Die Beladung ergibt sich dabei aus der zugrundeliegenden Isothermen bei definierter Temperatur und Gleichgewichtskonzentration  $c^*$  sowie der jeweiligen Adsorptionskinetik und kann daher in der Illustration nur qualitativ dargestellt werden. Im Falle kontinuierlicher Beladung stellt sich für Konzentration und Beladung ein Plateauwert ein, im Falle der absatzweisen Beladung nimmt zunächst die Konzentration und zugehörige Beladung wieder ab, da gebundenes Protein von reinem Puffer ausgewaschen wird. Nach einer definierten Zeit wird nun die Verfahrung der Kühlzone in definierter Geschwindigkeit gestartet.

Nach 20%iger Verfahrung der Kühlzone entlang der Chromatographiesäule (vgl. Abbildung 3-2B) hat die Kühlzone die bis zu dieser Stelle zuvor gebundene Menge an Protein desorbiert. Dadurch entsteht hinter der Kühlzone ein Bereich auf der Trennsäule der unbeladen ist. Zugleich nimmt die Konzentration im Bereich der Kühlzone zu. Das desorbierte Protein wandert mit der mobilen Phase und der entsprechenden Flussgeschwindigkeit in Bereiche vor der Kühlzone und adsorbiert dort erneut. Sobald die Kühlzone diesen Bereich der Säule erreicht, eluiert das gebundene Protein wieder. Durch diesen andauernden „Catch-and-Release“-Effekt akkumuliert sich Protein vor der wandernden Kühlzone. Durch diese Konzentrationserhöhung kommt es auch zur Ausbildung einer Beladungserhöhung im Vergleich zur maximal erreichbaren Beladung bei Zulaufkonzentration der bindenden Komponente. Die Form der Erhöhung, der sog. Beladungspeak, ist wiederum abhängig von der Adsorptionskinetik. Außerdem geht die Beladung beim angenommenen Adsorptionsverhalten nach Langmuir mit steigender Zielkomponentenkonzentration in den Bereich der Sättigung, sodass eine weniger starke Zunahme im Vergleich zum Konzentrationspeak

zu erwarten ist. Zusätzlich entwickelt sich bei kontinuierlicher Beladung im Bereich links der Kühlzone auch ein Tal der Proteinkonzentration und Proteinbeladung, da die Wanderungsgeschwindigkeit der Konzentrationsfront geringer ist als die der Kühlzone. Im Falle der absatzweisen Beladung bleiben Konzentration und Beladung auf dem Nullwert.

Nach 80%iger Verfahrungszeit (vgl. Abbildung 3-2C) hat sich im direkten Bereich rechts der Kühlzone weiteres zuvor desorbiertes Protein akkumuliert. Aufgrund der bereits erwähnten Effekte hat sich auch der Beladungspeak stärker ausgebildet, ist aber im Vergleich zum zugehörigen Konzentrationspeak weniger stark ausgeprägt und scharf. Der Bereich unbeladener Material links der Kühlzone bis zum Wiederanstieg der Beladung (bei kontinuierlicher Beladung) hat sich aufgrund der geringeren Wanderungsgeschwindigkeit der Konzentrationsfront ausgeweitet. Das Profil der Konzentrationsfront hat nahezu den Ausgangszustand (vgl. Abbildung 3-2A) erreicht. Bei Pulsaufgabe ändert sich links der Kühlzone nichts mehr.

Nach endgültigem Erreichen der Kühlzone am rechten Rand der Säule wird das desorbierte Protein in hoher Konzentration eluiert. Bei korrekter zeitlicher Auslegung des Systems entsprechen Konzentrations- und Beladungsprofil bei kontinuierlicher Beladung den anfänglichen Profilen in Abbildung 3-2A und die Temperaturzone kann erneut entlang des Systems verfahren werden.

Das System bietet folgende speziellen Vorteile gegenüber bisher angewendeten Verfahren zur thermoresponsiven Chromatographie:

- (1) Kontinuierliche Anwendbarkeit, da im Verlauf der Temperaturzonenverfahrenszeit simultan im unteren Bereich der Säule desorbiert wird, während der obere Teil der Säule kontinuierlich beladen wird und die Temperaturzone beliebig oft verfahren werden kann.
- (2) Proteinakkumulation und Aufkonzentrierung bindender Komponenten und damit Einsparung weiterer Aufkonzentrierungsschritte im Rahmen einer integrierten Prozessentwicklung.

### ***3.2 Besondere Prozessparameter für den Betrieb des TCZR***

Anders als bei konventionellen chromatographischen Systemen, spielen bei der Arbeit mit dem TCZR-System weitere Einflussfaktoren eine entscheidende Rolle. Vor allem die Säulenumgebungstemperatur  $\Phi_u$  und die Temperatur in der Säule nach Abkühlung durch die Temperaturzone  $\Phi_{\text{Säule}}$  sind hierbei zu nennen. Außerdem spielt auch die Verfahrgeschwindigkeit

$v_{TCZR}$  der wandernden Kühlzone eine entscheidende Rolle bei der Auslegung eines chromatographischen Trennschrittes mittels des TCZR.

Die Adsorptionsaffinität der verwendeten thermoresponsiven Ionenaustauschsorbentien und bestimmter Zielproteine kann entsprechend den Ausführungen in Abschnitt 2.2 mit Adsorptionsisothermen beschrieben werden. Im Vergleich zu konventionellen chromatographischen stationären Phasen für die Ionenaustauschchromatographie wird die Adsorption nicht nur durch die chemische Zusammensetzung des umgebenden Mediums (Ionenstärke, pH-Wert) gesteuert, sondern maßgeblich durch die Temperatur beeinflusst. Da im TCZR isokratisch gearbeitet wird, können allerdings alle Parameter mit Ausnahme der Systemtemperatur als konstant angenommen werden. In diesem speziellen Falle sind  $q_{max}$  und  $K_D$  (entsprechend Gleichung 2-6) lediglich Funktionen der Temperatur und die Langmuir-Gleichung kann in die sogenannte „thermoresponsive Langmuirgleichung“ umformuliert werden:

$$q^* = q_{max}(\Phi) \frac{c^*}{K_D(\Phi) + c^*} \quad (3-1)$$

Die temperaturabhängigen Funktionen für  $q_{max}$  und  $K_D$  werden dabei aus entsprechenden und zuvor experimentell ermittelten Gleichgewichtsparametern bestimmt; dazu werden die  $q_{max}$ - und  $K_D$ -Werte über der Temperatur aufgetragen und durch eine Kurvenanpassung approximiert. In dieser Arbeit ergaben sich im untersuchten Temperaturbereich und den verwendeten thermoCEX-Sorbentien ausnahmslos lineare Zusammenhänge.

Bei kontinuierlicher Beladung einer Trennsäule mit einer Komponente der Zulaufkonzentration  $c_F$  kann mittels der Isothermendaten aus Gleichung 3-1 die Gleichgewichtsbeladung bei definierter Temperatur  $\Phi$  und unter der Annahme  $c_F = c^*$  berechnet werden. Dementsprechend kann bei Kenntnis der Umgebungstemperatur  $\Phi_u = \Phi_{Ads}$  und der minimalen Säuleninnentemperatur  $\Phi_{Säule} = \Phi_{Des}$  auch die eluierbare Proteinmenge  $\Delta m$  bei Verföhrung der Temperaturzone nach Gleichung 3-2 bestimmt werden, wobei  $c_{TCZR}$  die Konzentration im Bereich der Kühlzone ist und  $\alpha_{TCZR}$  die relative Position der Kühlzone im Verhältnis zur gesamten Säulenlänge bei Überföhrung durch die Kühlzone angibt.

$$\Delta m = (q^*(c_F, \Phi_{Ads}) - q^*(c_{TCZR}, \Phi_{Des})) (\alpha_{TCZR} * CV * PF) \quad (3-2)$$

Die maximale Menge an Protein ist demnach eluierbar, wenn die Beladung bei Kühlzonentemperatur den Wert 0 annimmt und  $\alpha_{TCZR} = 1$  ist.

Bei Kenntnis des Volumens der durch die Temperaturzonenverfahren erhaltenen Elutionsfraktion  $V_{Peak}$ , ist zudem die Bestimmung der maximal erreichbaren Proteinkonzentration  $c_{Peak}$  in den Elutionspeaks aus den Isothermendaten vorab mittels Gleichung 3-3 berechenbar.

$$c_{Peak} = \frac{\Delta m}{V_{Peak}} \quad (3-3)$$

Daraus ist anschließend der Aufkonzentrierungsfaktor CF bestimmbar (vgl. Gleichung 3-4). Dieser Wert stellt das Verhältnis der Proteinkonzentration in den Proteinpeaks zur Zulaufkonzentration dar.

$$CF = \frac{c_{Peak}}{c_F} \quad (3-4)$$

Zur Simulation der Bioseparation mittels TCZR wurde das adaptierte Isothermenmodell nach Gleichung 3-1 in die vom Forschungszentrum Jülich unter Dr. von Lieres (IBG-1, Biotechnology; Modeling and Simulation Group) entwickelte Software CADET 1.0.0 eingepflegt. Zur Implementierung der temperaturabhängigen Elution kann ein entsprechendes Temperaturprofil eingelesen werden, dass anschließend mit der Geschwindigkeit  $v_{TCZR}$  über die Trennsäule bewegt wird. In allen Bereichen der Säule, an denen die Temperatur nicht extern durch das Profil aufgeprägt wird, wird die Proteinadsorption durch  $\Phi_0$  bestimmt. Zusätzlich ist auch die zeitliche Verzögerung des Starts des Temperaturprofils durch die Integration eines Offset-Wertes möglich. Detaillierte Informationen zum modifizierten Simulationsmodell sind Abschnitt 5.15 zu entnehmen.

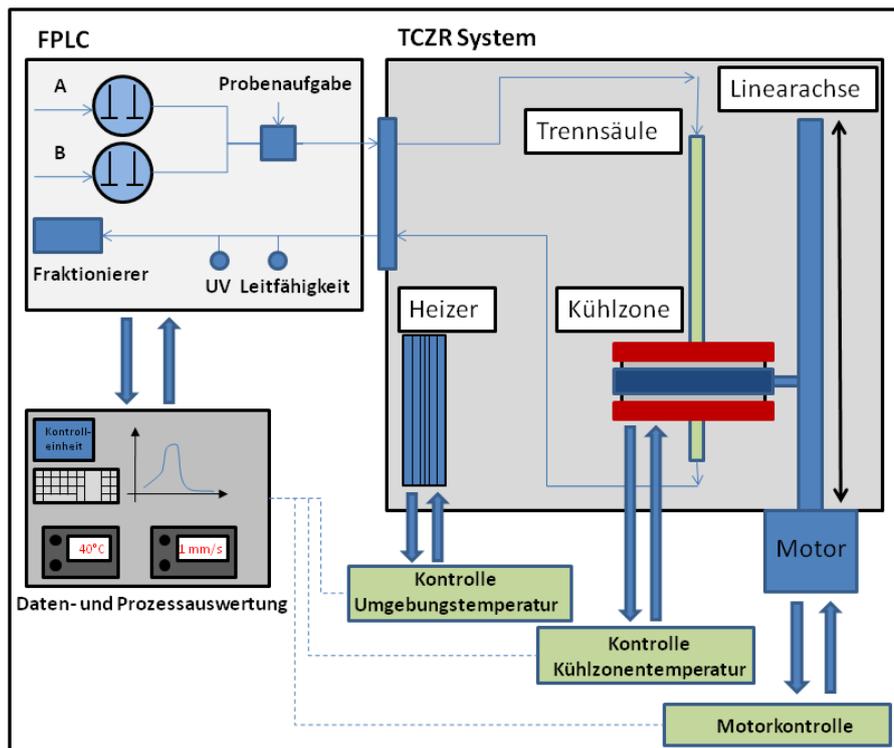
## 4 Konstruktiver Teil

In diesem Abschnitt wird zunächst auf die Einbettung des eigentlichen TCZR als Herzstück innerhalb der gesamten Anlage zur Bioseparation eingegangen. Anschließend wird das für diese Arbeit neu entwickelte TCZR-System vorgestellt. Des Weiteren werden die Hauptkomponenten des Systems erläutert und speziell auf die eigens am Institut entwickelte Kühlzone, die Trennsäule und das Tool zur Einstellung und Kontrolle der Systemtemperierung eingegangen. Abschließend werden Simulationen zum Wärmeübergang zwischen Kühlzone und Trennsäule dargestellt, die mittels der Software Quickfield 5.6 (Tera Analysis Ltd.) ermittelt wurden. Detailabbildungen der Kühlzone, der Trennsäule, der jeweiligen Halterungen und Dichtungen, der Kapillardurchführungen, Halterungen der Thermoelemente und Schleppkette sind der Arbeit von Wohlgemuth [134] zu entnehmen.

### 4.1 Gesamtanlage

Das TCZR-System stellt die für das eigentliche Trennverfahren notwendige Säulenperipherie zur Verfügung, sodass die Säule definiert auf eine Systemtemperatur temperiert und die temperaturinduzierte isokratische Elution anschließend mittels der verfahrenbaren Kühlzone durchgeführt werden kann. Abbildung 4-1 zeigt das TCZR-System schematisch im Verbund mit allen weiteren benötigten Komponenten.

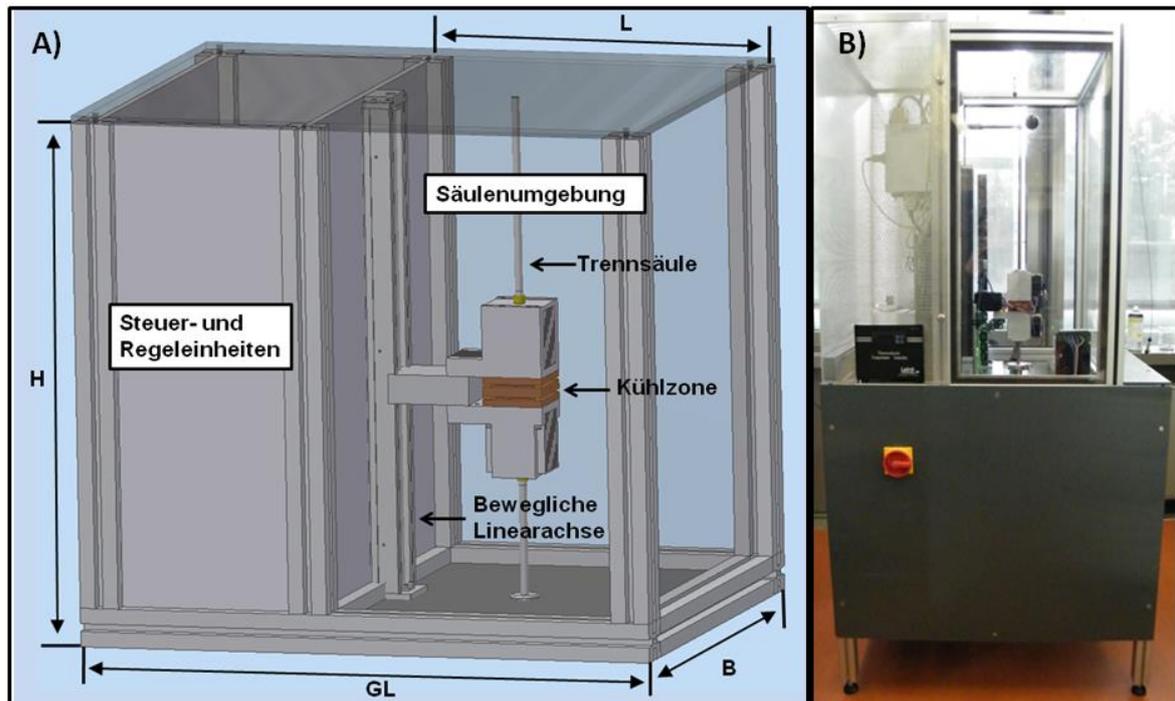
Das TCZR-System ist über Kapillaren an ein kommerziell erhältliches FPLC System gekoppelt. In dieser Arbeit wurde hierzu eine ÄKTA Purifier UPC 10 (GE Healthcare) mit integrierter Probenaufgabepumpe P-960 genutzt, die in der Lage ist, Puffer oder Probe bei gewünschter Flussrate bis maximal  $10 \text{ mL min}^{-1}$  und einem Maximaldruck von 250 bar über die Säule zu leiten. Die Kapillaren sind so angeschlossen, dass die Säule von oben nach unten durchlaufen wird, anschließend wird das Eluat wieder zurück an die FPLC-Anlage geleitet. Diese verfügt über online UV- und Leitfähigkeitsdetektoren und kann somit den Proteingehalt über UV-Absorptionsmessungen bei 280 nm detektieren. Der zusätzlich angeschlossene Fraktionierer FRAC-950 ist anschließend in der Lage, den Effluenten nach entsprechenden Vorgaben zu fraktionieren. Das entstehende Chromatogramm kann über die entsprechende Software UNICORN 5.20 aufgenommen werden. Die Regelung und Kontrolle der Systemtemperatur, Kühlzonentemperatur und Verfahrnung der Kühlzone wird über spezielle Einheiten vorgenommen. Die Regelung der Kühlzonentemperatur wird in Kapitel 4.3.1, die der Systemtemperatur in Kapitel 4.3.3 erläutert.



**Abbildung 4-1:** Darstellung der Integration des TCZR-Systems der im Rahmen der Arbeit genutzten Gesamtanlage. Diese besteht neben dem TCZR-System aus einer FPLC-Anlage und Einheiten zur Prozesssteuerung, Prozessauswertung und -kontrolle.

## 4.2 TCZR-System im Überblick

Das eigentliche TCZR-System ist als CAD-Zeichnung in Abbildung 4-2A dargestellt, Abbildung 4-2B zeigt eine Aufnahme des Prototyps. Im Gegensatz zur abgebildeten CAD-Zeichnung wurde bei der Konstruktion aus Gewichtsgründen die Abdeckung der Steuer- und Regeleinheiten weniger massiv aus Lochblech gefertigt, sodass auch auf die beiden gezeichneten Profile links im Modell verzichtet werden konnte. Des Weiteren ist in Abbildung 4-2A aus Gründen der Übersichtlichkeit auf den Unterbau der Anlage verzichtet worden, in dem aber ein Großteil der verwendeten Elektronik integriert wurde.



**Abbildung 4-2:** (A) CAD Zeichnung inklusive massiver Abdeckung der Steuer- und Regeleinheiten. Die wichtigsten Komponenten sind benannt. (B) Prototyp des TCZR-Systems inklusive des Unterbaus. Die Abdeckung auf der linken Seite ist weniger massiv gefertigt.

Das gesamte Grundgerüst - Unterbau und die darüber liegende Säulenumgebungsbox - an dem alle weiteren Komponenten befestigt sind, besteht aus quadratischen Aluminiumprofilen der Kantenlänge 4 cm (Festo AG &Co.KG). Die Höhe des Unterbaus beträgt (ohne Standfüße) 80 cm, ebenso wie die Gesamtlänge des Unterbaus. Entsprechend Abbildung 4-2A sind Breite (B) und Höhe (H) des Aufbaus 60 cm bzw. 80 cm. Die Gesamtlänge (GL) des Aufbaus beträgt 68,5 cm und teilt sich in 25,5 cm für den Bereich der Steuer- und Regeleinheiten und 43 cm (L) für den Bereich der Säulenumgebung auf. Die Säulenumgebung ist nach außen hin abgeschlossen, die Unterseite und linke Seitenwand (zu den Steuer- und Regeleinheiten) sind aus grauem Polyvinylchlorid (PVC) gefertigt; Oberseite, rechte Seitenwand, Vorder- und Rückseite sind aus transparentem Polymethylmethacrylat (PMMA) gefertigt, wobei die Vorderseite zu Servicezwecken leicht entnommen werden kann (Servicetür). Das Volumen des Raumes der Säulenumgebung beträgt daher etwa 206 L.

### 4.3 Einzelkomponenten

Der eigentlich funktionelle Teil des TCZR-Systems besteht aus einer Kombination kommerziell erhältlicher und am Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG) speziell konstruierter

Komponenten. Zu den kommerziell erhältlichen Kernkomponenten des Systems zählt vor allem die Linearachse. Hierbei wurde eine hochpräzise elektrische Schlittenachse der Bauart EGSK-400-33-6P (Festo AG & Co.KG) verwendet. Ein beweglicher Schlitten kann hierbei innerhalb einer Führung per Kugelgewindetrieb linear innerhalb dieser Führung bewegt werden. Angetrieben wird das System von einem Servomotor Typ EMMS-AS-40-M-TS. Die Kupplung zwischen Servomotor und Spindelachse wurde so gewählt, dass eine minimale Verfahrgeschwindigkeit von 0,1 mm/s problemlos möglich ist. Die Verfahrgenauigkeit des Systems beträgt 0,01 mm. Der maximale Hub beträgt 400 mm, wurde aber aus Sicherheitsgründen über induktive Endschalter auf etwa 390 mm eingeschränkt. Die Steuerung der Achse wird über die Kommunikation mit dem angeschlossenen Motorcontroller CMMS-AS-C4-3A erreicht, eine Programmierung der Verfahrunge ist über die Software Festo Configuration Tool (FCT) möglich. Auf dem Schlitten der Linearachse ist die Kühlzone befestigt.

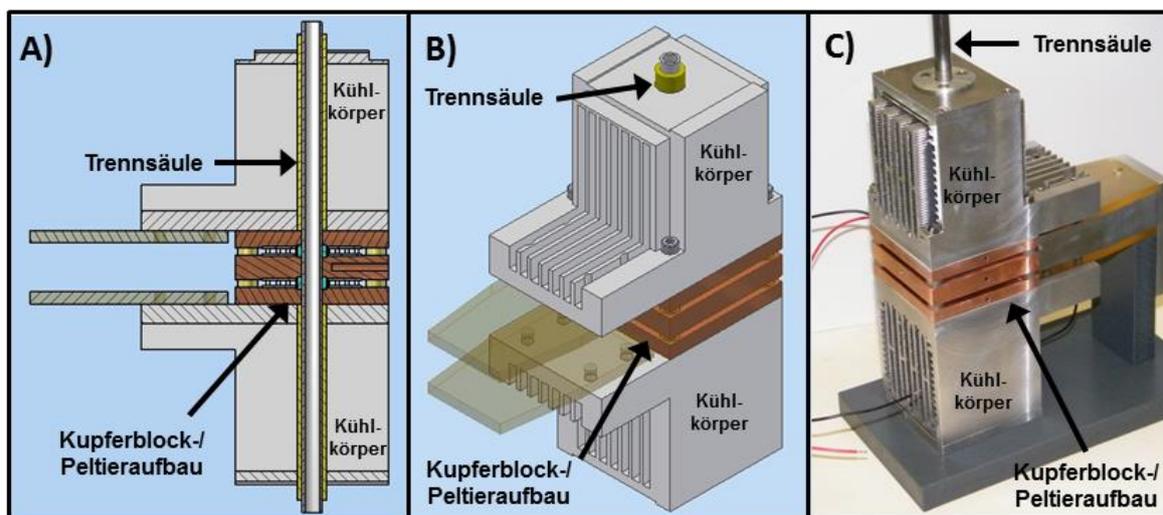
Für die Temperatursteuerung der Kühlzone wurde ein thermoelektrischer Temperaturcontroller MTTC-1410 (Laird Technologies) verwendet. Dieser bidirektionale Controller ist in der Lage die Temperatur von thermoelektrischen Elementen im Bereich von -100 °C bis 200°C auf 0,1°C genau einzustellen. Der verwendete Messsensor ist ein PT-1000 Thermoelement und zentrisch in einer Bohrung im mittleren Kupferblock der Temperaturzone versenkt. Die eingestellte Temperatur am Controller regelt somit die Temperatur im mittleren Kupferblock.

Für die Temperierung der Säulumgebung wird ein Heizlüfter mit 800 W Heizleistung des Typs Cirrus 80 (DBK) verwendet.

### **4.3.1 Temperaturzone**

Die am Schlitten der beweglichen Linearachse befestigte Temperaturzone ist eine spezielle Entwicklung zur Kühlung der Trennsäule durch direkte Wärmeübertragung. Die Methode der Wahl zur Konstruktion der Temperaturzone ist die Verbindung dreier gut wärmeleitender Kupferblöcke und zweier thermoelektrischer Module, sogenannter Peltierelemente, des Typs TB-109-1,4-1,5CH (Kryotherm). Die verwendeten Elemente sind quadratisch mit einer Kantenlänge von 40 mm, mit einer bauartbedingten Höhe von 4 mm und einer zentralen Bohrung mit einem Durchmesser von 13 mm. Bei Peltierelementen handelt es sich allgemein um elektrothermische Wandler und aktive Kühlelemente, die bei Stromfluss durch miteinander verbundene Halbleitermaterialien eine Temperaturdifferenz zwischen zwei Keramikplatten erzeugen können, wobei eine Warm- und eine Kaltseite innerhalb dieser Elemente entstehen. Die

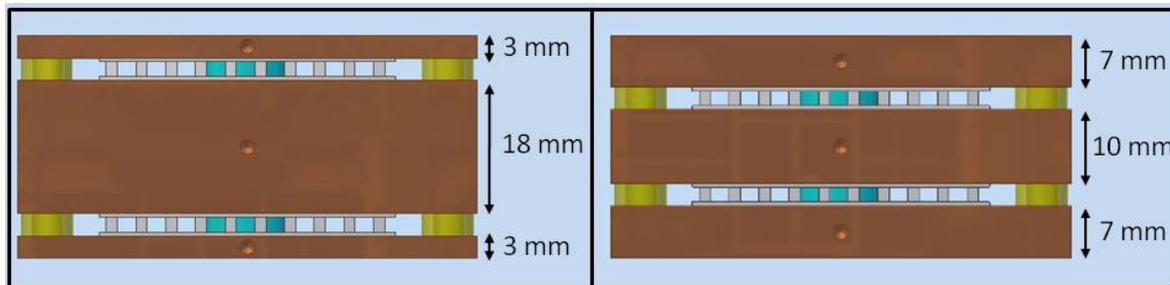
einzelnen verwendeten Elemente können im Optimalfall laut Herstellerangaben eine Temperaturdifferenz von maximal 70°C zwischen Kühlseite und Warmseite generieren. Dies ist aber nur möglich, wenn unter anderem der so generierte Wärmeüberschuss auf der Warmseite abgeführt wird, da die Wärmeleitung der halbleitenden Metalle ansonsten zu einem Wärmeausgleich führt. Die entworfene Kühlzone ist mehrfach in Abbildung 4-3 dargestellt.



**Abbildung 4-3: Abbildungen der Kühlzone inklusive Trennsäule. (A) CAD-Querschnitt; (B) CAD-Draufsicht; (C) technische Umsetzung eines ersten Prototypen.**

Die beiden Peltierelemente und drei quadratische Kupferblöcke mit einer Kantenlänge von 60 mm und definierten Höhen sind in einer Art „Sandwichaufbau“ zusammengefügt. Dabei sind die Peltierelemente zentrisch und planar auf den Kupferblöcken gelagert, die Kühlseiten beider Peltierelemente weisen in Richtung des zentralen Kupferblockes; die Warmseiten zeigen in Richtung der äußeren Kupferblöcke. Durch 0,5 mm tiefe Fräsungen in den Kupferblöcken sind die Peltierelemente gegen Verrutschen gesichert, Schrauben an den vier Ecken fixieren das Konstrukt. Zwischen den Peltierelementen und den Kupferblöcken sorgt eine dünne Schicht Wärmeleitpaste für einen optimierten Wärmeübergang. Abstandsringe aus PMMA um die Schrauben und zwischen den Kupferblöcken verhindern ungewollte Wärmetransporte zwischen den Kupferblöcken und vermeiden zu großen Anpressdruck auf die sensiblen Peltierelemente. Die auf den Warmseiten der Peltierelemente entstehende Wärme wird über Hochleistungskühlkörper mit aufgesetzten Lüftern (in den Abbildungen nicht gezeigt) abgeführt. Die verwendeten Kühlkörper des Typs LA-6-100-12 (Fischer Elektronik) mit einer Höhe von 78 mm und einer Länge von 100 mm wurden für den Aufbau gefräst und ebenfalls zentriert mit einer Durchgangsbohrung versehen, oben und unten auf den Sandwichaufbau aufgesetzt und fest verschraubt. In den Kupferblöcken

ist zentriert ebenfalls eine Bohrung mit einem Durchmesser von 8,04 mm eingelassen, sodass die Trennsäule durch den kompletten Aufbau geführt werden kann. Zur guten Wärmeübertragung wird Öl in den Spalt mit einer Breite von 0,02 mm zwischen Trennsäule und Kühlzone eingefüllt. Teflonringe zwischen den Kupferblöcken entlang des Umfangs der Bohrung dichten die Peltierelemente gegenüber der Säule komplett ab. Auf der Oberseite des oberen Kühlkörpers und der Unterseite des unteren Kühlkörpers sind Ringdichtungen um die Säule gelagert. Der Gesamtaufbau hat eine Höhe von 178 mm, der eigentliche Sandwichaufbau hat eine Höhe von 30 mm. Im Rahmen der Arbeit wurden zwei unterschiedliche Sandwichaufbauten verwendet, bei denen die Höhe der Kupferblöcke variiert wurde. Die verwendeten Sandwichaufbauten sind in Abbildung 4-4 zu sehen.

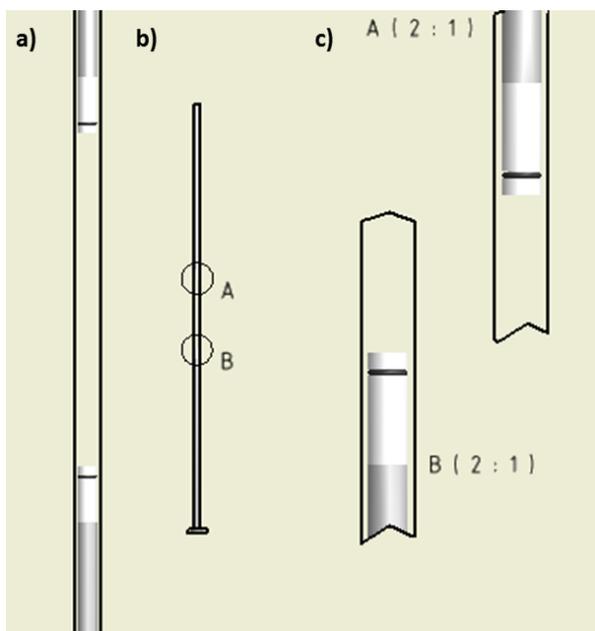


**Abbildung 4-4: CAD-Seitenansicht der verwendeten Sandwichaufbauten der Kühlzone. Die Höhen der Kupferblöcke sind in den Zeichnungen angegeben, in allen Kupferblöcken sind Bohrungen zum Einführen der Thermoelemente angedeutet.**

In beiden Aufbauten haben die äußeren Kupferblöcke die gleiche Höhe. Im ersten Fall beträgt die Höhe der äußeren Kupferblöcke 7 mm, der innere Kupferblock hat dann eine Höhe von 10 mm (7-10-7). Im zweiten Fall ändert sich das Verhältnis zugunsten des zentralen Kupferblockes und die entsprechenden Kupferblockhöhen betragen 3 mm bzw. 18 mm (3-18-3).

Wie bereits erwähnt, wird die Temperatur der Kühlzone über den Controller MTTC-1410 und den angeschlossenen Messfühler gesteuert. Dieser Messfühler wird über eine entsprechende Bohrung im mittleren Kupferblock versenkt. Die Steuerung der Peltierelemente richtet sich daher nur nach dem mittleren Kupferblock; die Erwärmung der außenliegenden Kupferblöcke ergibt sich aus der entstehenden Wärmemenge auf den Warmseiten und der durch die Kühlkörper abgeführten Wärmemenge. Zur Aufnahme des Temperaturverlaufes sind in allen Kupferblöcken Bohrungen zum Einführen von PT-100 Thermoelementen (Typ K) vorgesehen. Die Aufzeichnung der Temperaturdaten wird in Abschnitt 4.3.3 behandelt.

### 4.3.2 Trennsäule



**Abbildung 4-5: CAD-Zeichnung der verwendeten Trennsäule. (a) Mit Sorbens füllbarer Bereich der Säule, Höhe 10 cm. (b) Edstahlsäule mit angeschweißtem Flansch, Höhe 65 cm. (c) Vergrößerte Ausschnitte (2:1) des unteren und oberen Stempels mit angefügtem PTFE-Endstück. Der dargestellte Dichtungsring schließt bis zur Säuleninnenwand (nach [92]).**

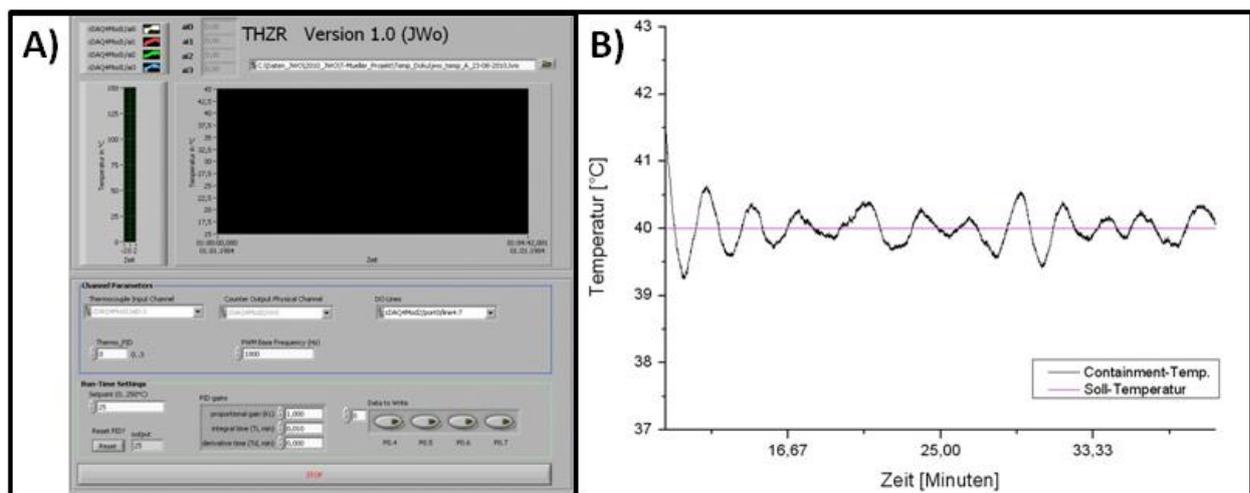
entsprechend angefertigte Stempelkonstruktionen aus hohlem Aluminiumrohr (6x1 mm) mit aufgeschraubten Aufsätzen aus Polytetrafluorethylen (PTFE, Teflon) mit Gesamtlängen von 27 cm (unten) und 28 cm (oben) an definierter Stelle gehalten. Die Teflonaufsätze fixieren zusätzlich die Anschlusskapillaren von und zum FPLC-System. Die Fertigung von Teflonaufsätzen ist notwendig, da Aluminium instabil gegenüber wässrigen alkalischen Lösungen ist. Die beiden Stempelkonstruktionen mit Endstücken und Dichtungsringen, die Edstahlsäule, sowie ein Querschnitt der Säule mit eingeführten Stempeln ist in Abbildung 4-5 dargestellt.

Bei der verwendeten Trennsäule handelt es sich um eine Edstahlsäule mit einem inneren Durchmesser von 6 mm, einer Wandstärke von nur 1 mm und einer Gesamtlänge von 65 cm. Da das Öl zwischen den Kupferblöcken und der Säule bei der Verfahrnung der Kühlzone mitgeführt werden muss, darf die Säule keine Versätze oder Vorsprünge aufweisen. Am unteren Ende der Säule ist ein Adapterflanschstück angeschweiß, damit die Säule am Boden der Säulumgebung des TCZR fixiert und über eine spezielle Klemm-Schraubverbindung befestigt werden kann. Im oberen Bereich der Säule wird diese außerdem durch eine weitere Halterung gegen etwaiges Verbiegen und etwaige Verformungen gesichert. Der eigentliche gefüllte Bereich der Trennsäule befindet sich in 27 cm Entfernung vom Boden der Säule und hat eine Höhe von 10 cm. Das eingefüllte Sorbens wird durch zwei

### 4.3.3 Temperatursteuerung und Temperaturoaufzeichnung

Die Temperaturoaufzeichnung innerhalb der abgeschlossenen Reaktorumgebung und die Messung der Temperatur innerhalb der Kupferblöcke werden durch speziell gefertigte Thermolemente (Typ K) mit einer Messfühlerlänge von 70 mm und einem Durchmesser von 2 mm erreicht. Diese sind über das Thermolement-Eingangsmoel NI 9211 und das entsprechende Chassis NicDAQ-

9178 (National Instruments) mit einem Computer verbunden. Über die Software LabView (National Instruments) wurde von J. Wohlgemuth im Rahmen einer Masterarbeit ein entsprechendes Datenerfassungsprogramm entwickelt [134], das die Temperaturdaten der Messensoren in Echtzeit aufnimmt und zusätzlich die Aufgabe der Regelung der Temperatur in der Säulumgebung übernimmt. Die graphische Darstellung des resultierenden Temperaturverlaufs sowie die Parametrisierung des Temperaturreglers werden in einer eigens entwickelten Benutzeroberfläche dargestellt und eingegeben. Abbildung 4-6A zeigt ein Bild der verwendeten Benutzeroberfläche.



**Abbildung 4-6:** (A) Benutzeroberfläche des zur Temperaturregelung und -kontrolle verwendeten LabView-Programmes. Im oberen Bereich findet die graphische Darstellung der Umgebungstemperatur und der Temperaturen innerhalb der drei Kupferblöcke statt. Im mittleren und unteren Segment sind fortgeschrittene Parametereinstellungen zur Regelung der Temperatur der Säulumgebung möglich; (B) graphische Darstellung einer 50-minütigen Temperaturaufzeichnung innerhalb der Säulumgebung bei Einstellung der Temperatur auf 40°C. Die Aufzeichnung beginnt nach etwa 5 Minuten. Ein stabiler Zustand wird nach 15 Minuten erreicht. Nach 20 Minuten wird die Kühlzone zugeschaltet, nach 29 Minuten wieder ausgeschaltet. Grafiken aus [134].

Die größte Herausforderung innerhalb dieses Programmes stellte die adäquate Regelung der Temperatur innerhalb der Säulumgebung dar. Hierzu kann über die Benutzeroberfläche eine Eingabe der drei Parameter Proportional (P)-, Integral (I)- und Differentialglied (D) vorgenommen werden. Über einen softwareintegrierten PID-Regler wird dann ein magnetisches Relais angesteuert, das wiederum den Heizer innerhalb der Säulumgebung an oder aus schaltet. Die innerhalb des Regelkreises benötigte Rückkopplung erfolgt durch Temperaturmessung der aktuellen Ist-Temperatur des Systems. Im hier verwendeten System wurden dazu die Daten der

Temperaturmessung eines in zentraler Position der Säulenumgebung angebrachten Messensors genutzt. Innerhalb dieser Arbeit wurde mit einer Verstärkung von 7,38 für das P-Glied und den Werten 0,79 Minuten für das I-Glied und 0,19 Minuten für das D-Glied gearbeitet. Die eingestellten Werte liegen in etwa in dem von Wohlgemuth [134] für das System vorgeschlagenen Parameterbereich, der über die heuristische Methode von Ziegler und Nichols [135] berechnet wurde. Abweichungen resultieren vor allem daraus, dass innerhalb dieser Arbeit auf die Verwendung eines zusätzlichen Lüfters in der Säulenumgebung vollkommen verzichtet wurde. Trotz diverser Störgrößen, wie z.B. variierende Außentemperatur, variable Position der Kühlzone, unabhängig geregelter Wärmeeintrag des Kühlkörperaufbaus sowie Öffnen und Schließen der Servicetür konnte ein stabiles Temperatursignal im Bereich 35-40°C nach etwa 15 Minuten Betriebszeit erreicht werden. Die Schwankungen der Temperatur betragen hierbei  $\pm 1^\circ\text{C}$  um die eingestellte Solltemperatur. Abbildung 4-6B zeigt die Schwankung der Ist-Temperatur um eine gewünschte Temperatur von 40°C im zuvor beschriebenen System über einen Zeitraum von 50 Minuten. Nach etwa 20 Minuten wurde die Kühlzonentemperierung als Störgröße eingeschaltet, nach 29 Minuten wieder ausgeschaltet; aus der Auftragung sind keine größeren Abweichungen erkennbar.

#### ***4.4 Simulation der Wärmeverteilung im Bereich der Kühlzone***

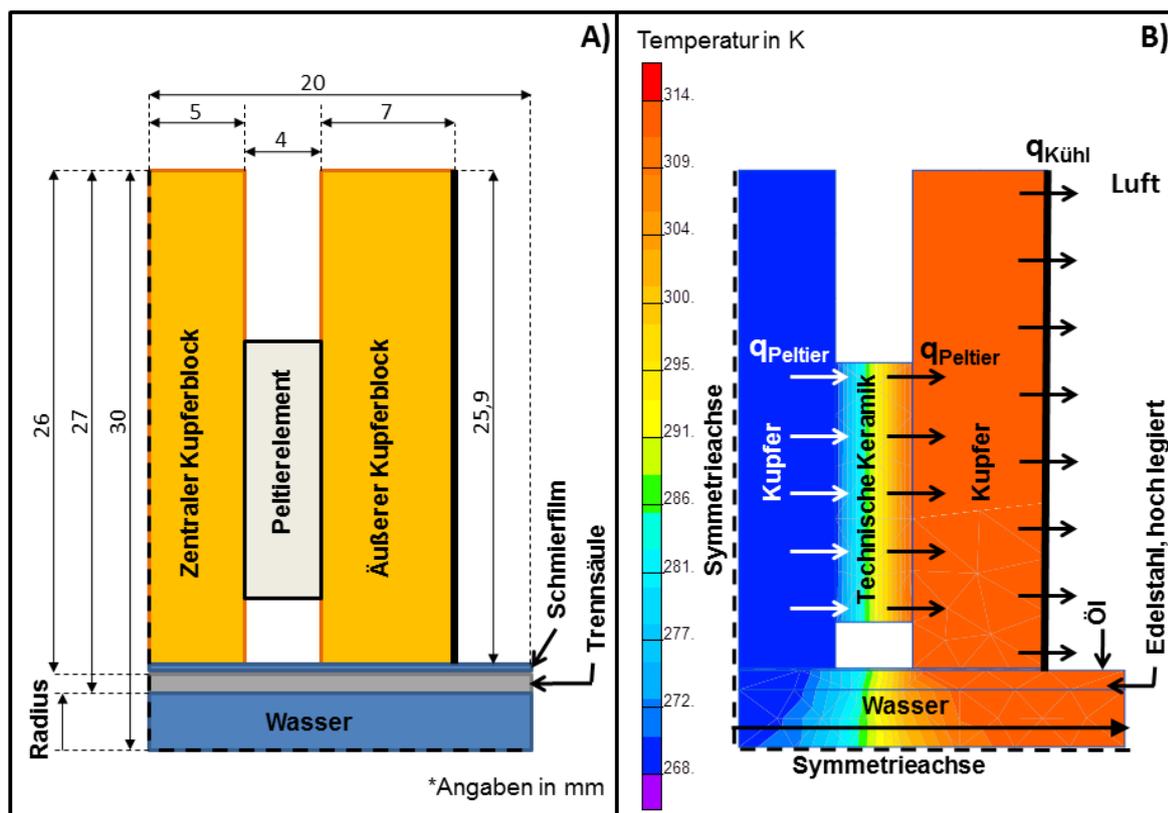
Von besonderer Bedeutung während der Planung des TCZR-Systems war die Auslegung der Kühlzone und im Speziellen die Wahl der Kühlmethode. Nachdem die Wahl entsprechend Abschnitt 4.3.1 auf eine durch Peltier-Elemente erzeugte und von außen auf die Trennsäule aufgeprägte Temperaturübertragung gefallen war, wurden vor Konstruktion der Kühlzone Wärmeübergangssimulationen mittels des Softwareprogramms QuickField™ 5.6 (Tera Analysis Ltd.) durchgeführt. Bei diesem Programm handelt es sich um ein Softwarepaket, das mittels Finite-Elemente-Methode (FEM) dazu geeignet ist, 2-D Feldberechnungen für elektromagnetische, thermische und mechanische Problemstellungen durchzuführen, zu simulieren und graphisch darzustellen.

Im Speziellen sollten über eine entsprechende Modellerstellung und die anschließende Simulation Kenntnisse über die folgenden Fragestellungen erzielt werden:

- (1) Treten im verwendeten System in radialer Richtung größere Temperaturgradienten auf?
- (2) Welchen Einfluss hat die Größe des Spalts zwischen Kühlzone und Trennsäule auf die Wärmeübertragung?

- (3) Ist die Verwendung eines Schmiermittels mit guten Wärmeleiteigenschaften (z.B. Öl) im Spalt zwischen Kühlzone und Trennsäule für eine gute Wärmeübertragung notwendig?

Dazu wurde innerhalb des Softwarepaketes ein achsensymmetrisches Modell eines Säulenabschnitts (Länge 20 mm) mit der umgebenden Kühlzone 7-10-7 gestaltet. Die entsprechende Bemaßung des Modells mit einem Spaltmaß von 0,1 mm ist in Abbildung 4-7A dargestellt. Zur Übersichtlichkeit sind außerdem die einzelnen Bereiche des Modells benannt.



**Abbildung 4-7: (A) Für die FEM-Simulationen verwendetes achsensymmetrisches Modell eines Trennsäulenabschnittes und der Kühlzone, inklusive Bemaßung und Bezeichnung der einzelnen Bereiche; (B) Mittels QuickField™ erstellte Wärmeübergangssimulation inklusive Markierung der Peltierwärmeströme  $q_{\text{Peltier}}$  und der durch Konvektion erzwungenen Kühlung  $q_{\text{Kühl}}$ .**

QuickField™ bietet standardmäßig keine Möglichkeit, das einer Wärmepumpe ähnliche Verhalten eines Peltierelementes darzustellen. Im vorliegenden Fall wurde daher das Peltierelement dadurch charakterisiert, dass es an seiner Grenzfläche zum angrenzenden Kupferblock kontinuierlich eine Wärmemenge  $q_{\text{Peltier}}$  von  $38289,7 \text{ W m}^{-2}$  aufnimmt (Kaltseite) und auf der gegenüberliegenden Grenzfläche die entsprechende Wärmemenge abgibt (Warmseite). Die Kühlung der Warmseite über die entsprechenden Hochleistungskühlkörper wird in der Simulation

über Konvektionskühlung der umgebenden Luft mit einer konstanten Lufttemperatur von  $T_{Luft} = 313 \text{ K}$  und einem Wärmeübergangskoeffizienten  $\alpha$  von  $500 \text{ W K}^{-1} \text{ m}^{-2}$  realisiert. Die zwischen Kupferblock und Umgebungsluft transportierte flächenspezifische Wärmemenge  $q_{Kühl}$  ist dabei abhängig von der Temperatur  $T$  des Kupferblocks und berechnet sich entsprechend Formel 4-1.

$$q_{Kühl} = \alpha (T - T_{Luft}) \quad (4-1)$$

Des Weiteren ist es für die Berechnung notwendig, einzelne Bereiche des Modells speziellen Materialien zuzuordnen, was entsprechend der Bezeichnungen in Abbildung 4-7B vorgenommen wurde. Für die hier durchgeführten Wärmeübergangssimulationen unter Annahme isotroper Wärmeleiteigenschaften der verwendeten Materialien ist es notwendig die Dichte  $\rho$ , die Wärmekapazität  $c_p$  und die thermische Leitfähigkeit  $\lambda$  der einzelnen Materialien vorzugeben. Hierbei wurde vereinfachend angenommen, dass das Peltierelement komplett aus technischer Keramik gefertigt wurde und sich das Sorbens wie reines Wasser verhält. In Tabelle 4-1 sind die verwendeten Werte aufgeführt.

**Tabelle 4-1: Isotrope Parameterwerte der zur Simulation benötigten Materialien.**

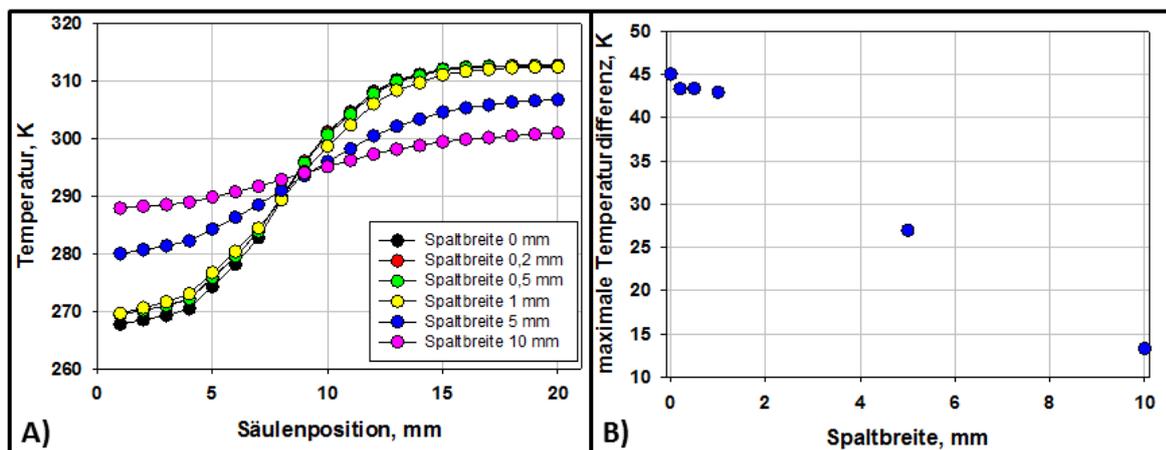
Material	Dichte $\rho$ , $\text{g L}^{-1}$	Wärmekapazität $c_p$ , $\text{J kg}^{-1} \text{K}^{-1}$	Thermische Leitfähigkeit $\lambda$ , $\text{W m}^{-1} \text{K}^{-1}$
Kupfer	8920	381	230
Edelstahl	7850	470	15
Technische Keramik	2000	500	3
Schmiermittel	900	4187	10
Luft	1,293	1000	0,026
Wasser	1000	4187	0,55

Abbildung 4-7B stellt in graphischer Form die Temperaturentwicklung unter Verwendung der zuvor erwähnten Parameter dar. Bezüglich der Temperaturverteilung innerhalb der Säule fällt auf, dass sich in axialer Richtung auf weniger als 20 mm ein Temperaturunterschied von etwa 44 K ausbildet, was aufgrund der Kontaktstellen mit dem zentralen und dem äußeren Kupferblock auch zu erwarten war. In radialer Richtung ist der Temperaturunterschied deutlich geringer und liegt bei maximal etwa 3,6 K, wobei dies in Abhängigkeit der Säulenposition variiert und im Bereich des zentralen Kupferblockes am stärksten ausgeprägt ist. So können an Säulenposition 0 mm am Säuleninnenrand 269,2 K und im Säulenzentrum 269,8 K gemessen werden. An Position 4 mm

sind dies 276,6 K und 273 K, an Position 8 mm 299,1 K und 296,1 K, an Position 12 mm 313,1 K und 313,5 K, an Position 16 mm 312,7 K und 312,6 K und an Position 20 mm bleibt die Temperatur konstant bei 312,7 K.

Aufgrund der gezeigten Ergebnisse und radialen Heterogenitäten im Bereich der Kühlzone spielen Temperaturunterschiede in radialer Richtung auch schon bei Verwendung dünner Säulen mit einem Durchmesser von 6 mm eine wichtige Rolle. Mit zunehmendem Durchmesser der Säulen nehmen diese Heterogenitäten allerdings deutlich zu, sodass davon auszugehen ist, dass weitgehend homogene radiale Wärmeverteilungen nur bei Säulen im analytischen Maßstab und bis zu einem maximalen Innendurchmesser von 10 mm zu erwarten sind.

Da es sich bei der Kühlzone um ein konzentrisch um die Trennsäule angebrachtes, bewegliches Bauteil handelt, ist ein auftretender Spalt zwischen der Außenwand der Säule und der Innenwand der Kühlzone unvermeidbar. Zur Abschätzung des Einflusses der Spaltgröße auf die Wärmeübertragung zwischen Kühlzone und Trennsäule, wurde die Breite des Schmierfilms (vgl. Abbildung 4-7A) im Bereich von 0 – 10 mm variiert und der Temperaturverlauf anhand des in der Abbildung gezeigten Pfeiles im Säulenzentrum aufgenommen. Abbildung 4-8A stellt die Temperaturverläufe im Säulenzentrum dar, Abbildung 4-9B zeigt die maximal erzielbaren Temperaturdifferenzen.

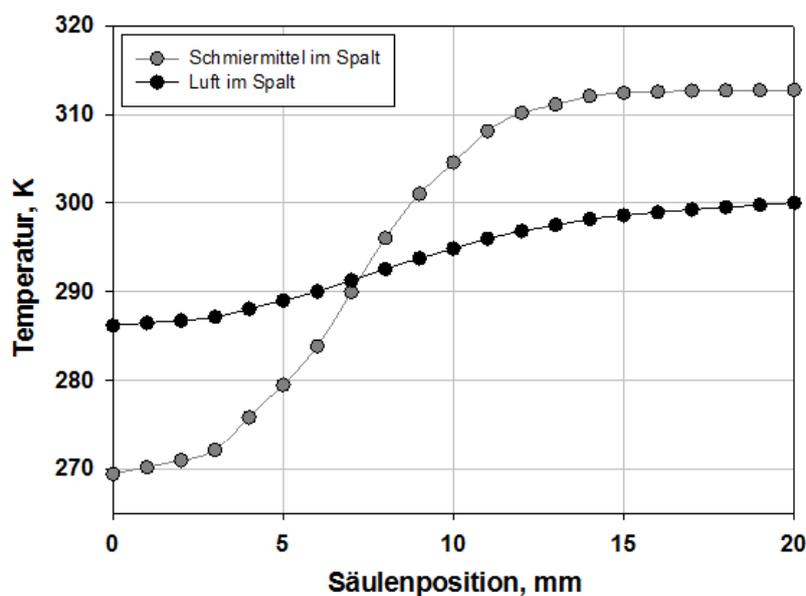


**Abbildung 4-8: (A) Temperaturverlauf im Säulenzentrum in Abhängigkeit der Spaltbreite im Bereich von 0 bis 10 mm; (B) Auftragung der maximal erreichbaren Temperaturdifferenz innerhalb der Säule in Abhängigkeit der Spaltbreite.**

Wie zu erwarten war, ergeben sich die höchsten Temperaturgradienten bei Minimierung der Spaltbreite. Dies liegt daran, dass der Bereich des Schmierfilms mit seiner im Vergleich zu

Metallen geringen thermischen Leitfähigkeit klein gehalten bzw. komplett vermieden wird. Bis zu einer Spaltbreite von etwa 1 mm ist unter den getroffenen Annahmen keine signifikante Änderung des Temperaturprofils und eine Abnahme der maximal erzielbaren Temperaturdifferenz von nur ca. 2 K feststellbar. Bei größeren Spaltmaßen von 5 und 10 mm können dann aber deutliche Abnahmen der zu erwartenden Temperaturdifferenzen auf 27 K bzw. 13 K beobachtet werden. Das in dieser Arbeit verwendete System mit einer Spaltbreite von 0,02 mm zeigt daher ein nahezu optimales Wärmeübertragungsverhalten.

Die notwendige Abdichtung des zwischen Säule und Kühlzone befindlichen Schmiermittelfilms kann mechanisch einen Schwachpunkt der Anlage darstellen. Speziell aus der andauernden Reibung der Dichtungen mit der Säule im Verfahrensbetrieb kann ein deutlicher Abrieb der Dichtungen resultieren. Dies führt unweigerlich zu Undichtigkeiten und zum Austritt des Schmiermittels aus dem Spalt. Für einen Betrieb mit konstanter Wärmeübertragung ist daher die Kenntnis des Einflusses des Schmiermittelfilms von großer Bedeutung. Hierzu wurde der Temperaturverlauf innerhalb der Säule (vgl. mit schwarzem Pfeil in Abbildung 4-7A) aufgenommen und mit dem Extremfall verglichen, das keinerlei Schmiermittel im Spalt vorhanden ist. In diesem Falle wurden die Simulationsparameter von Luft anstelle der Schmiermitteldaten verwendet. Die Spaltbreite der vorgestellten Simulation betrug 0,2 mm. Die beiden entsprechenden Temperaturverläufe sind in Abbildung 4-9 dargestellt.



**Abbildung 4-9: Temperaturverläufe im Säulenzentrum bei Verwendung von Schmiermittel (graue Kreise) und Luft (schwarze Kreise) im Spalt mit einer Spaltbreite von 0,2 mm.**

Wie zu erkennen, erfolgt ohne Verwendung eines gut wärmeleitenden Schmiermittels nahezu keine Wärmeübertragung und es bildet sich ein nur schwach ausgeprägter Temperaturgradient. Für die im weiteren Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Experimente bedeutet dies, dass vor jedem Lauf zerstörte Dichtungen überprüft und eventuell ausgetauscht wurden und das Schmiermittelreservoir vor jedem Lauf neu aufgefüllt wurde.

Einschränkend ist festzuhalten, dass bei der Modellbildung und den durchgeführten Simulationen eine Vielzahl vereinfachender Annahmen getroffen wurden und zudem der dynamische Durchfluss der mobilen Phase innerhalb der Trennsäule komplett vernachlässigt wurde. Die Simulationsergebnisse sind aus diesem Grunde auch eher qualitativ zu interpretieren, trotzdem aber dazu geeignet die prinzipielle Anwendbarkeit des Systems zu rechtfertigen und Schlüsselbedingungen für eine effiziente Betriebsweise zu identifizieren.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 *Verwendete Chemikalien*

Folgende Chemikalien stammten von der Firma Sigma-Aldrich: Acrylsäure (AAc, 99 %), Ammoniumperoxidsulfat (APS), Blue Dextran, Dithiothreitol (DTT), Epichlorhydrin (ECH, 99 %), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA,  $\geq 99$  %), N-Isopropylacrylamid (NIPAAm, 97 %), N-tert-Butylacrylamid (tBAAm, 97 %), N,N'-Methylenbisacrylamid (MBAAm, 99 %), N,N'-Dimethylformamid (DMF,  $\geq 99,9$  %), TRIZMA base ( $\geq 99,5$  %), 2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinolin (EEDQ,  $\geq 99$  %), 4,4'-azobis(4-cynovaleriansäure) (ACV,  $\geq 98$  %). Von der Firma Fisher Scientific wurden Glycerin, Ammoniaklösung (35 %) und Ethanol (zur Analyse) verwendet und von der Firma Merck Ammoniumsulfat (für biochemische Zwecke), Bromphenolblau Natriumsalz, Coomassie Brilliant Blue R-250, Ethanol (zur Analyse), Kaliumchlorid (zur Analyse), Natriumdodecylsulfat (SDS), Polyethylenglycol (PEG, MW 35000 g mol<sup>-1</sup>) und Tetramethylethylenediamin (TEMED). Von der Firma Carl Roth stammen: Acrylamid (AAm, 30 %), Essigsäure (reinst), Glycin (für die Biochemie,  $\geq 99$  %), di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $\geq 99,5$  %), di-Natriumhydrogenphosphat (wasserfrei,  $\geq 98$  %), Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat ( $\geq 99,5$  %), di-Natriumhydrogenphosphat Dodecahydrat ( $\geq 99,5$  %), Natriumchlorid (zur Analyse,  $\geq 99,5$  %), ortho-Phosphorsäure (reinst, 85 %), Salzsäure (reinst, 37 %), Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS,  $\geq 99,9$  %), Natriumhydroxyd (NaOH,  $\geq 99$  %).

Als Proteinmarker innerhalb der durchgeführten SDS-PAGE wurde der Marker PageRuler Plus Prestained Protein Ladder der Firma Fermentas eingesetzt.

Das verwendete Wasser wurde vor der Benutzung mit einer MilliQplus Anlage (Fa. Merck-Millipore) behandelt.

### 5.2 *Verwendete biologische Puffer*

In allen Versuchen, in denen die Proteinadsorption auf HIC-Sorbentien untersucht wurde, wurde 50 mM Natriumphosphatpuffer mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ammoniumsulfat und einem pH von 7,0 verwendet. Hierfür wurde wasserfreies di-Natriumhydrogenphosphat und entsprechende Mengen an Ammoniumsulfat eingewogen, der pH-Wert über Zugabe von ortho-Phosphorsäure eingestellt und der Puffer anschließend über einen Glasfaserfilter (GF 6, Fa. Schleicher & Schüll) gefiltert.

Sofern nicht anders angegeben, wurde in allen Versuchen, in denen die Proteinadsorption auf thermoresponsiven IEX-Sorbentien untersucht wurde, 10 mM Natriumphosphatpuffer mit einem pH von 6,5 genutzt. Hierfür wurde di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat eingewogen, der pH-Wert über Zugabe von ortho-Phosphorsäure eingestellt und der Puffer anschließend über einen Glasfaserfilter (GF 6, Fa. Schleicher & Schüll) gefiltert.

### ***5.3 Modellproteine***

In dieser Arbeit wurden diverse Proteine als Modellproteine verwendet und bezüglich ihrer Adsorption auf thermoresponsiven Sorbentien untersucht. Für die Untersuchung der Adsorption auf HIC Sorbentien wurde mit Bovinem Serumalbumin, Lysozym und  $\alpha$ -Chymotrypsinogen gearbeitet; bei der Untersuchung der Adsorption auf thermoresponsiven IEX Sorbentien wurden Lactoferrin, BSA und  $\alpha$ 33Fab eingesetzt. Alle Proteine lagen in lyophilisierter Form vor und wurden vor Benutzung in entsprechenden Puffern (vgl. Abschnitt 5.2) gelöst und anschließend durch regenerierte Cellulosefilter (Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$ , Fa. Whatman) gefiltert. Eine Ausnahme bildete  $\alpha$ 33Fab, das beim Projektpartner University of Birmingham (UBI) als periplasmatisches Protein einer E.coli Fermentation gewonnen wurde, direkt im Lysispuffer vorlag und anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt, umgepuffert und aufkonzentriert wurde.

#### *Bovines Serum Albumin*

Bovines Serumalbumin (BSA) wurde von der Firma Sigma-Aldrich geliefert und hat eine Reinheit von  $\geq 98\%$  (laut SDS-PAGE). Bei BSA handelt es sich um ein Protein der Gruppe der Albumine, der größten im Blutplasma vorkommenden Klasse an Proteinen. Diese Gruppe der Proteine ist vor allem an der Regulation des osmotischen Drucks im Gewebe, sowie des Transports von Hormonen und Fettsäuren beteiligt. BSA wird in der Bioanalytik häufig als Konzentrationsstandard verwendet. Auch in biochemischen Anwendungen, z.B. immunologischen Nachweisverfahren, wird BSA häufig eingesetzt. BSA hat eine Größe von 66,43 kDa [136] und einen isoelektrischen Punkt bei 4,7 [137].

#### *Lysozym*

Lysozym aus Hühnereiweiß (EC 3.2.1.17) wurde über die Firma Sigma-Aldrich in kristalliner Form bezogen ( $\sim 70000 \text{ Units mg}^{-1}$ ). Lysozym besitzt eine antibakterielle Wirkung, indem es die Peptidoglykanschicht der bakteriellen Zellwand hydrolysiert und damit die Bakterien zerstört.

Lysozym ist ein stark basisches Protein mit einem pI von 11,35 [138] und einer geringen Größe von nur 14,3 kDa [139].

#### *α-Chymotrypsinogen*

α-Chymotrypsinogen aus der Schweinebauchspeicheldrüse wurde von Sigma-Aldrich bereitgestellt. Es stellt eine vom Pankreas produzierte inaktive Vorstufe, ein Zymogen, der Serinprotease Chymotrypsin (EC 3.4.4.5) dar. Die Produktion von Zymogenen ist essentiell, da nur dadurch der Verdau und Abbau von Proteinen und Zellen im synthetisierenden Gewebe verhindert wird und die Enzyme erst nach Transport an ihren Zielort aktiviert werden. Die biochemische Umwandlung der enzymatisch wenig aktiven Vorstufe α-Chymotrypsinogen in Chymotrypsin geschieht mittels eines komplexen Spaltungsprozesses und wird durch das Enzym Trypsin katalysiert [140, 141]. α-Chymotrypsinogen hat eine Größe von 25 kDa [142] und einen pI von 8,97 [143].

#### *Bovines Lactoferrin*

Bovines Lactoferrin wurde von einem molkeverarbeitendem Betrieb zur Verfügung gestellt und als Produkt aus Kuhmilch gewonnen. Die Vorbehandlung des Lactoferrin erfolgte über Ionenaustauschschritte und anschließende Lyophilisierung, sodass es anschließend als rötliches Lyophilisat Anwendung fand. Die Reinheit des verwendeten Lactoferrin beträgt etwa 96 % und es ist bis etwa 50°C temperaturstabil. Genauere Untersuchungen zur Temperaturstabilität und zur Reinheit des verwendeten Lactoferrin sind im Anhang angeführt (vgl. Abschnitt 9.8). Bovines Lactoferrin kommt in Kuhmilch in Konzentrationen von 20-200 mg L<sup>-1</sup> vor [10]. Es ist ein eisenbindendes Protein, das in der Lage ist reversibel Fe<sup>3+</sup> zu binden und nimmt somit eine Schlüsselrolle in der zellulären Eisenversorgung ein. Des Weiteren besitzt Lactoferrin eine antimikrobielle Wirkung, indem es Mikroorganismen zum einen das zum Wachstum benötigte Eisen entzieht und zum anderen direkt mit molekularen und zellulären Komponenten der potentiellen Pathogene interagiert [144]. Bovines Lactoferrin hat eine Größe von etwa 80 kDa [144, 145] und ist ein basisches Protein mit einem pI von 8-8,5 [144].

#### *a33Fab*

Das pharmazeutisch interessante Antikörperfragment a33Fab kam bei Versuchen am Standort des Projektpartners UBI zum Einsatz. Bei Fab handelt es sich um das antigenbindende Fragment eines

Antikörpers. Es besteht aus zwei Aminosäureketten, die als leichte und schwere Kette bezeichnet werden und über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind. Die leichte und schwere Kette unterteilen sich jeweils nochmals in eine variable und eine konstante Domäne. Da Fab Fragmenten die konstante Region zur Auslösung der Immunantwort fehlt, wird es therapeutisch und zur akuten Behandlung als Antidot eingesetzt, indem es bestimmte toxische Antigene blockiert [146]. Das hier eingesetzte a33Fab hat entsprechend seiner Aminosäuresequenz eine berechnete Größe von etwa 51 kDa und einen berechneten pI-Wert von 8,73. (vgl. Anhang Abschnitt 9.9.2).

#### 5.4 Verwendete kommerzielle Sorbentien und Säulen

In dieser Arbeit wurden verschiedene kommerziell erhältliche chromatographische Sorbentien verwendet. Alle verwendeten Sorbentien und Säulen wurden von GE Healthcare bezogen. Für die Untersuchung des Temperatureffektes auf die Adsorption von Proteinen bei der HIC wurden die stationären Phasen Butyl Sepharose 4 FF, Octyl Sepharose 4 FF, Phenyl Sepharose 6 FF (low sub) und Phenyl Sepharose 6 FF (high sub) verwendet. Hierbei handelte es sich um poröse Partikel auf Basis des Polysaccharids Agarose mit einem Anteil von 4 bzw. 6% quervernetzter Agarose (sog. Sepharose). Der mittlere Partikeldurchmesser aller Partikeltypen beträgt 90  $\mu\text{m}$ . Die Partikel unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Ligandenfunktionalisierung und ihrer Ligandendichte, wie in Tabelle 5-1 dargestellt.

**Tabelle 5-1: Daten zu den verwendeten Sorbentien für die HIC.**

	<b>Butyl Sepharose 4 FF</b>	<b>Octyl Sepharose 4 FF</b>	<b>Phenyl Sepharose 6 FF (low sub)</b>	<b>Phenyl Sepharose 6FF (high sub)</b>
<b>Ligand</b>	Butyl	Octyl	Phenyl	Phenyl
<b>Quervernetzung, %</b>	4	4	6	6
<b>Ligandendichte, <math>\mu\text{mol (mL Medium)}^{-1}</math></b>	40	5	25	40

Zur weiteren Untersuchung unter dynamischen Bedingungen wurde die chromatographische Säule HiScreen Butyl FF (GE Healthcare) mit einem Säulenvolumen (CV) von 4,7 mL verwendet.

Als Basismaterialien zur Herstellung von thermoresponsiven stationären Phasen mit Kationenaustauschfunktionalität (thermoCEX-Partikel; vgl. 5.6.1) wurden poröse Partikel benutzt, die normalerweise Anwendung bei der Größenausschlusschromatographie finden. Eine Übersicht über wichtige Parameter der verwendeten Sorbentien Sepharose CL-6B, Sephacryl S-400 HR und Superose 6 prep grade zeigt Tabelle 5-2.

**Tabelle 5-2: Daten zu den verwendeten Grundpartikeln.**

	Sepharose CL-6B	Sephacryl S-400 HR	Superose 6 prep grade
<b>Matrix</b>	Quervernetzte Agarosepartikel, 6% Agaroseanteil	Allyldextran und N,N'- methylenbisacrylamid	Komposit quervernetzter Agarose
<b>Partikeldurchmesser, <math>\mu\text{m}</math></b>	90	50	30
<b>Größenverteilung, <math>\mu\text{m}</math></b>	45-165	25-75	20-40

Als Alternative zu den thermoCEX-Partikeln wurden auch Monolithe entsprechend funktionalisiert (thermoCEX-Monolith). Als Basis der Monolithfunktionalisierung (vgl. Abschnitt 5.6.2) diente eine CIM® Epoxy-1 Tube Monolithic column (BIA Separations GmbH). Die Matrix des Monolithen besteht aus Poly(glycidylmethacrylat-co-ethylendimethacrylat) und ist bereits mit Epoxygruppen aktiviert. Der durchschnittliche Porenradius des Materials liegt bei 600-750 nm. Der Fluss der mobilen Phase innerhalb der tubulären Monolithsäule mit einem Säulenvolumen von 1 mL geschieht radial von außen nach innen, d.h. die mobile Phase trifft zunächst auf die Außenseite des Monolithen, tritt dann durch die Monolithmatrix und gelang schließlich über die innere Oberfläche des Monolithen in den Ablauf. Bei einer Länge des Monolithen von  $L = 4,2$  mm beträgt der äußere Monolithdurchmesser  $D_o = 18,6$  mm, der innere Durchmesser  $D_i = 6,7$  mm. Durch die spezielle Geometrie des Gehäuses entstehen bei konstanter Flussrate der mobilen Phase  $v_{\text{mob}}$  unterschiedliche lineare Geschwindigkeiten auf der Außenseite und der Innenseite des Monolithen. Um eine durchschnittliche lineare Geschwindigkeit  $v_{\text{av}}$  zu berechnen, wird Gleichung 5-1 verwendet.

$$v_{\text{av}} = \frac{v_{\text{mob}} \ln\left(\frac{D_o}{D_i}\right)}{\pi L(D_o - D_i)} \quad (5-1)$$

## 5.5 Proteinanalytik

### 5.5.1 Photometrie

Für die Messung der Proteinkonzentrationen wurde ein UV-Vis-Spektrometer (Nanodrop® ND 1000, Fa. Thermo Fisher Scientific) verwendet, das es erlaubt, Absorptionsmessungen von Flüssigkeiten mit sehr kleinen Volumina und ohne die Notwendigkeit von Messküvetten durchzuführen. Die Intensität der Absorption kann unter Beachtung des Lambert-Beer-Gesetzes zur Proteinkonzentrationsbestimmung (vgl. Gleichung 2-12) herangezogen werden, wobei die Pfadlänge des emittierten Lichtes 10 mm beträgt. Die Konzentrationen von  $\alpha$ -Chymotrypsinogen, BSA, Lactoferrin und Lysozym wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt, indem jeweils 3  $\mu$ l der Probe auf die Messzelle gegeben wurden. Vor jeder Messreihe wurde als Blankwert der jeweilige Puffer ohne Proteinzusatz gewählt. Obwohl maximale Proteinkonzentrationen von maximal 100 mg mL<sup>-1</sup> Protein mit dem Photometer ohne Verdünnung beschrieben sind, wurde der Arbeitsbereich auf maximal 10 mg mL<sup>-1</sup> eingeschränkt. Proben höherer Konzentration wurden entsprechend verdünnt.

Für jedes Protein wurde zunächst eine Kalibriergerade erstellt mit Proteinproben bekannter Konzentration (z.B. 0,9; 1,8; 2,7; 3,6; 4,5; 5,4; 6,3; 7,2; 8,1; 9 mg mL<sup>-1</sup>). Aus der Steigung der Kalibriergeraden (UV-Absorption bei 280 nm über der Proteinkonzentration) lässt sich dann der Extinktionskoeffizient bestimmen. Für eine 10 mg mL<sup>-1</sup> Probe in Phosphatpuffer (10 mM bzw. 50 mM; vgl. Abschnitt 5.2) beträgt der Extinktionskoeffizient für  $\alpha$ -Chymotrypsinogen 15,66 L g<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, für BSA 6,7 L g<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, für Lactoferrin 10,56 L g<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> und für Lysozym 26,44 L g<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### 5.5.2 Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur qualitativen Beurteilung der eluierten Proteinfractionen wurde die Methode der denaturierenden Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) gewählt. Entsprechend der Angaben in Abschnitt 9.7 wurde hierbei zunächst ein SDS-Gel hergestellt, bestehend aus einem Trenngel (15 % Acrylamid/Bisacrylamidmischung) im unteren Bereich und einem darüber liegenden Sammelgel (4 % Acrylamid/Bisacrylamidmischung) zur Erhöhung der Auflösung im Trenngel. Das Gel wurde anschließend in das Elektrophoresesystem (Mini-PROTEAN® Tetra 4-gel, Bio-Rad) eingesetzt, die Probentaschenkämme entfernt und das gesamte System mit 1x Laufpuffer befüllt. Die Proteinproben wurden parallel vorbereitet. Sofern nicht anders angegeben wurden 12  $\mu$ l der jeweiligen Probe mit 12  $\mu$ l des 2x Lämmli-puffers gemischt und anschließend 5 Minuten bei 90°C inkubiert. Die Proteine wurden dadurch denaturiert und Eigenladungen der Proteine durch das

beinhaltete und negativ geladene Reagenz SDS maskiert. Nach Abkühlen der Proben wurden 20 µl der Probe in eine Tasche des Gels pipettiert. Eine Tasche jeden Gels war zudem reserviert für den Proteingrößenstandard. 2 µl des Standards wurden ohne weitere Vorbehandlung in diese Tasche pipettiert. Anschließend wurde die Gelelektrophorese bei einer Spannung von 120 V für 30 Minuten durchgeführt. Danach wurde das Gel entnommen und mit Coomassie-Färbelösung bei Raumtemperatur 30 Minuten gefärbt. Die Färbelösung wurde daraufhin abgelassen, das Gel zweimal mit Wasser gewaschen und anschließend für etwa 12 Stunden mit Entfärbelösung entfärbt. Nach zwei weiteren Waschungen mit Wasser wurde das Gel in durchsichtigen Folien eingeschweißt und mittels Scanner wurden Aufnahmen der entstandenen Proteinbanden angefertigt.

### 5.5.3 BCA-Assay

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration des nach rProtein-G-Säule chromatographisch aufgereinigten Antikörperfragmentes a33Fab wurde der sogenannte Bicinchoninsäure Protein Assay (BCA-Assay) gewählt. Die kolorimetrische Proteinkonzentrationsmethode wurde mittels der Mikroplattenprozedur des Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) durchgeführt. Als Proteinstandard diente der mitgelieferte BSA-Standard. Die Messung der Absorption wurde in 96-well-Platten in einem Glomax multi detection system (Promega) vorgenommen.

Die Methode beruht auf der bekannten Biuret-Reaktion, bei der  $\text{Cu}^{2+}$  im alkalischen Milieu durch Proteine oder Peptide zu  $\text{Cu}^+$  reduziert wird [147]. Das entstehende  $\text{Cu}^+$  komplexiert anschließend mit dem Reagenz Bicinchoninsäure (BCA) zu einem wasserlöslichen purpurnen Komplex und wird dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm vermessen. Innerhalb eines Messbereiches bis etwa  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  nimmt die Absorption linear mit der Proteinkonzentration zu. Mittels Kalibrationsgeraden aus Proteinproben definierter Konzentration kann die Konzentration unbekannter Proben ermittelt werden.

### 5.5.4 Peakflächenauswertung

In säulenchromatographischen Experimenten zur Untersuchung der Proteinadsorption von Ein-Protein-Systemen auf der Säule HiScreen Butyl FF am FPLC System Äkta Purifier UPC 10 (GE Healthcare) wurde die eluierte bzw. durchlaufende und nicht retardierte Menge an Protein über die Peakflächen im resultierenden Chromatogramm (UV-Absorptionssignal bei 280 nm) bestimmt. Hierzu wurde mittels der Software Unicorn (GE Healthcare) die Peakfläche unter den jeweiligen Proteinpeaks bestimmt. Unter der Annahme einer absoluten Proteinelution und einer

hundertprozentigen Wiederfindung des Proteins am Ende jeden Experimentes, konnte somit der prozentuale Anteil der einzelnen Proteinpeaks zur gesamten Proteinmenge bestimmt werden. Da auch die aufgegebene Proteinmenge durch das definierte Probenvolumen mit definierter Konzentration bekannt war, konnte anschließend die eluierte und gebundene Proteinmenge bestimmt werden.

## **5.6 Herstellung thermoresponsiver Sorbentien**

Im Folgenden wird die Funktionalisierung thermoresponsiver Partikel und Monolithe mit Kationenaustauschfunktionalität beschrieben.

### **5.6.1 Partikel als stationäre Phase**

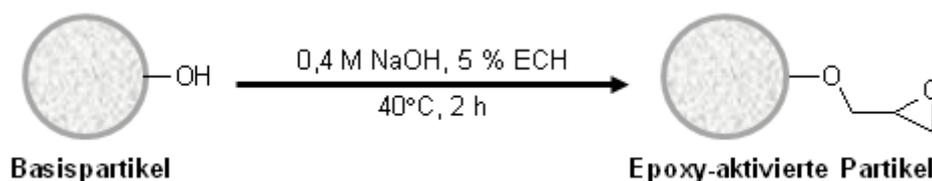
Als Grundlage für die Herstellung von thermoCEX-Partikeln dienten drei kommerziell erhältliche, sphärische und poröse Partikel unterschiedlicher Größe und Größenverteilung, die normalerweise Anwendung in der Größenausschlusschromatographie finden. Die Funktionalisierung dieser Partikel erfolgte analog für alle verwendeten Partikel.

Die hier beschriebene Herstellung von thermoCEX-Partikeln wurde vom Projektpartner UBI durchgeführt. Die Syntheseroute wird in dieser Arbeit trotzdem erwähnt, da diese Partikel in dieser Arbeit angewendet wurden. Die Beschreibung der einzelnen Funktionalisierungsschritte entstammt der gemeinsamen eingereichten Veröffentlichung [148].

Die Funktionalisierung unterteilt sich in vier Blöcke: die Epoxy-Aktivierung, die Amino-Funktionalisierung, die Immobilisierung des Polymerisationsinitiators und die Oberflächenpolymerisierung mit thermoresponsiven Monomeren, einem Quervernetzer und der im neutralen pH-Bereich negativ geladenen Acrylsäuregruppe. Die standardmäßig in 20 % Ethanol gelagerten Partikel werden vor Benutzung und auch während der einzelnen Arbeitsschritte mit einer Filternutsche trocken gesaugt und anschließend mit Wasser gewaschen. Bei der experimentellen Durchführung gab es Partikelverluste nach jedem Modifikationsschritt. Im Folgenden sind die Massen einer SCL6B-ItBA-Funktionalisierung angegeben (50 g, 71 mL). Die entsprechenden Chemikalienmengen mussten im Falle anderer Partikelmengen dementsprechend angepasst werden.

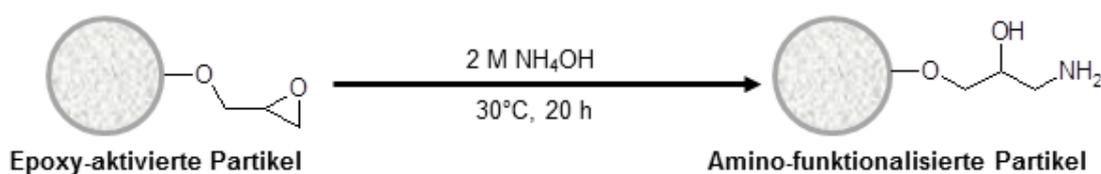
### Epoxy-Aktivierung

Die trockengesaugten Partikel wurden mit 85 mL Wasser und 40 mL 2 M NaOH in einem konischen 250 mL Messkolben gelöst und anschließend bei 40°C im Wasserbad für 30 Minuten geschüttelt. Anschließend wurden 10 mL Epichlorhydrin zugegeben um eine finale Konzentration von etwa 5 % (v/v) zu erreichen. Die Mischung wurde bei 40°C für weitere 2 Stunden inkubiert und die Partikel anschließend mit Wasser gewaschen und trocken gesaugt.



### Amino-Funktionalisierung

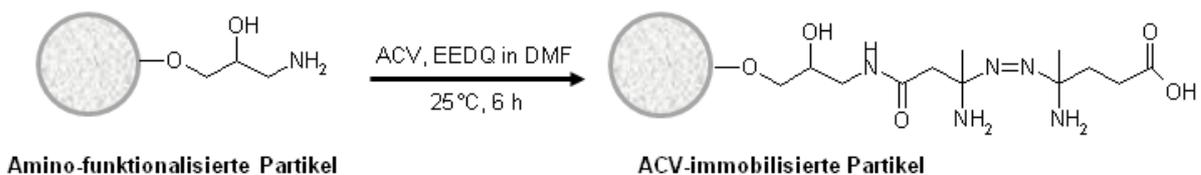
Die Amino-Funktionalisierung der Partikel wurde durch die Modifikation der oberflächengebundenen Oxirangruppen mit Ammoniumionen vorgenommen. Die Methode wurde erstmals von Hermansson et al. [149] beschrieben. Dazu wurden die Partikel (47,5 g, 65 mL) in 50 mL 2 M NaOH gelöst, sodass eine 57 %ige Suspension entstand. Diese wurde für etwa 20 Stunden bei 30 °C schüttelnd inkubiert und anschließend ausgiebig mit Wasser unter Vakuum in einem gesinterten Glasfilter gewaschen.



### Immobilisierung des Polymerisationsinitiators

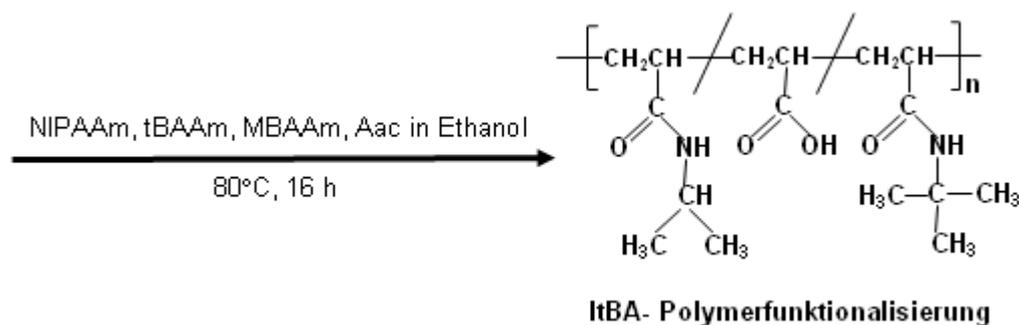
Stufenweise (50 %, 75 %) wurden die Partikel anschließend in 100 % Ethanol (jeweils fünfmaliges Waschen) überführt. In jedem Schritt wurden die Partikel mit etwa 40 mL der jeweiligen Ethanolösung für 30 Minuten inkubiert, anschließend zur Sedimentation zentrifugiert und wieder trockengesaugt. Die Methode der Immobilisierung des Polymerisationsinitiators 4,4'-Azobiscyanovaleriansäure (ACV) auf amino-funktionalisierten Partikeln wurde von Yakushiji et al. [150] übernommen und angepasst. Die Partikel (45 g, 56 mL) wurden in einer abgeschlossenen

und stickstoffgesättigten Atmosphäre in einer Schüttelflasche mit einer Lösung aus 75 mM ACV und 150 mM des Kondensationsreagenzes 2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinolin (EEDQ) in 145 mL Dimethylformamid gemischt. Gelöster Sauerstoff wurde anschließend durch Ausgasen mit Stickstoff ausgetrieben. Die Kupplungsreaktion lief unter konstantem Rühren bei 25°C für sechs Stunden im Wasserbad in luftdicht abgeschlossenen Reaktionsgefäßen ab. Die so behandelten Partikel wurden anschließend noch fünfmal mit DMF und fünfmal mit 100 % Ethanol gewaschen.



### Oberflächenpolymerisation

Die ACV-immobilisierten Partikel wurden anschließend mit dem leicht quervernetzten Copolymer poly(NIPAAm-*co*-tBAAm-*co*-AAc-*co*-MBAAm) modifiziert, wobei die benötigten Monommengen schon in der Arbeit von Maharjan et al. [127] beschrieben und lediglich die Wasch- und Reaktionsbedingungen hier leicht abgewandelt wurden. Die Partikel wurden durch Vakuumfiltration trockengesaugt. Die Sorbentien (25 g, 35 mL) wurden dann in einer Lösung aus NIPAAm (900 mM), t-BAAm (50 mM), AAc (50 mM) und MBAAm (10 mM) in 125 mL Ethanol gelöst. Anschließend wurde für 30 Minuten Stickstoff in die Suspension eingeleitet und die gasfreien Reaktionsgefäße anschließend luftdicht verschlossen. Die eigentliche Polymerisation erfolgte dann bei konstantem Schütteln im Wasserbad bei 80°C für 16 Stunden. Nach Abkühlung der Lösung auf Raumtemperatur wurden die Partikel dann sequentiell (100 %, 75 %, 50 %) wieder in 20 % Ethanol überführt und bei 4°C darin gelagert.



Die entstandene Polymerstruktur auf der Partikeloberfläche wird entsprechend der Publikation von Maharjan et al. [127] im Folgenden als ItBA bezeichnet. Die entstandenen Partikel werden als S6pg-ItBA (Superose 6 pg als Basismaterial), S400HR-ItBA (Sephacryl 400 HR als Basismaterial) und SCL6B-ItBA (Sephacryl CL6B als Basismaterial) bezeichnet.

## 5.6.2 Monolithe als stationäre Phase

Die bereits epoxy-aktivierten Monolithe (vgl. 5.4) wurden vergleichbar zu den Partikeln funktionalisiert, obgleich der erste Schritt der Epoxy-Aktivierung nicht notwendig war. Die chemischen Reaktionen der Aminofunktionalisierung, Immobilisierung des Polymerisationsinitiators und Oberflächenpolymerisierung sind jedoch ähnlich. Unterschiedlich war die Art und Weise der Funktionalisierung, da der Monolith fest in sein Gehäuse eingegossen war. Daher wurde der Monolith in-situ funktionalisiert, indem die Reagenzlösungen über eine Peristaltikpumpe in den Monolithen gepumpt wurden und dieser dann verschlossen und bei definierten Temperaturen in einem Wasserbad gelagert wurde, bzw. kontinuierlich die Reagenzien über den Monolithen gepumpt wurden. Im Folgenden wird auf die einzelnen in-situ Funktionalisierungsschritte nochmals kurz eingegangen. Ein Wasch- bzw. Spülschritt entspricht dabei einem kontinuierlichen Fluss der jeweiligen Flüssigkeit oder Lösung über den Monolithen bei einer Geschwindigkeit von  $u_{av} = 39 \text{ cm h}^{-1}$  für eine Dauer von 10 Minuten.

### Amino-Funktionalisierung

Zunächst wurde der Monolith mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde er für 10 Minuten bei einer mittleren Geschwindigkeit  $v_{av}$  von  $19,5 \text{ cm h}^{-1}$  mit 2 M Ammoniaklösung befüllt, verschlossen und für 21 Stunden im Wasserbad bei  $28^\circ\text{C}$  gelagert. Anschließend wurde der Monolith nacheinander mit Wasser, 50% Ethanol, 75 % Ethanol und schließlich 100 % Ethanol gewaschen.

### Immobilisierung des Polymerisationsinitiators

Zur Immobilisierung des Polymerisationsinitiators ACV wurden 0,526 g ACV und 0,927 g EEDQ zunächst in 25 ml DMF gelöst. Diese Lösung wurde im Ultraschallbad für fünf Minuten behandelt und anschließend für 15 Minuten mit einer mittleren Geschwindigkeit  $v_{av} = 19,5 \text{ cm h}^{-1}$  in den Monolithen gepumpt. Die chemische Reaktion geschah dann im Wasserbad bei  $25^\circ\text{C}$  über einen Zeitraum von sechs Stunden. Anschließend wurde der Monolith je 30 Minuten mit reinem DMF und anschließend reinem Ethanol gewaschen.

### Oberflächenpolymerisation

2,55 g N-Isopropylacrylamid, 158,975 mg *tert*-Butylacrylamid, 38,54 mg Methylenbisacrylamid und 85,704  $\mu\text{L}$  Acrylsäure wurden in 25 mL Ethanol gelöst. Die Lösung wurde im Ultraschallbad für fünf Minuten ausgegast. Anschließend wurde die Lösung im Kreislauf mit einer mittleren Geschwindigkeit von  $v_{av} = 19,5 \text{ cm h}^{-1}$  kontinuierlich über die Säule geleitet. Dabei wurde der Monolith im Wasserbad gelagert. Die Temperatur des Wasserbades betrug  $60^\circ\text{C}$  in den ersten 3,5 Stunden, anschließend  $65^\circ\text{C}$  und schließlich  $70^\circ\text{C}$  für jeweils 2,5 Stunden. Schließlich wurde der Monolith noch für je 15 Minuten nacheinander mit 100 %, 75 %, 50 % und 20 % Ethanol gespült und dann in 20 % Ethanol bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.

## **5.7 Sorptionsversuche auf HIC Sorbentien**

In allen Versuchen mit HIC Sorbentien wurde Phosphatpuffer entsprechend der Beschreibung aus Abschnitt 5.2 verwendet. Zur Äquilibrierung und Waschung der gelartigen Partikel wurden diese zunächst in 50 mL Falcontubes pipettiert, bis zur vollständigen Sedimentation zentrifugiert, der Überstand entnommen und dann mit dem jeweiligen Puffer aufgefüllt und gemischt. In den Abschnitten 5.7.1 - 5.7.4 wurde ausschließlich mit BSA gearbeitet. In 5.7.5 wurde zusätzlich Lysozym eingesetzt. In Abschnitt 5.7.6 wurde  $\alpha$ -Chymotrypsinogen als Modellprotein verwendet.

### **5.7.1 Adsorptionsisothermen**

Die Sorbentien wurden zunächst in 50 mM Phosphatpuffer pH 7 mit den dem Experiment entsprechenden Konzentrationen an Ammoniumsulfat (0,1 M, 0,3 M oder 0,5 M) gewaschen. Hierzu wurden etwa 5-15 mL der gelartigen Partikel (gelagert in 20 % Ethanol) in 50 mL Falcontubes überführt, bis zur vollständigen Sedimentation zentrifugiert, der Überstand entnommen und verworfen und dann die Partikel mit dem jeweiligen Puffer aufgefüllt und gemischt. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Anschließend wurde das Volumen der Partikel bestimmt und eine Suspension (Slurry) mit einem Partikelanteil von 40 % hergestellt. 500  $\mu\text{L}$  dieser Suspension wurde anschließend mit 500  $\mu\text{L}$  Proteinlösung (im gleichen Puffer) definierter Konzentration (1, 3, 6, 10, 14, 20  $\text{mg mL}^{-1}$ ) in einem Mikrozentrifugenröhrchen gemischt, sodass sich eine Proteinausgangskonzentration von 0,5, 1,5, 3, 5, 7 bzw. 10  $\text{mg mL}^{-1}$  BSA ergab. Bei definierten Temperaturen ( $10^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$  bzw.  $40^\circ\text{C}$ ) wurden diese Proben dann in einem Thermomixer comfort (Eppendorf) für 60 Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Anschließend sedimentierten die Partikel für 30 Minuten bei gleicher Temperatur und ohne Schütteln, bevor der Überstand entfernt wurde. Die Proteinkonzentrationen  $c^*$  im Überstand

wurden anschließend photometrisch bestimmt. Die genauen Ausgangskonzentrationen  $c_0$  wurden ebenfalls photometrisch bestimmt, indem die Proteinlösungen mit reinem Puffer ohne Partikel vermischt wurden. Zur mathematischen Anpassung der Messdaten und Ermittlung der Isothermenparameter  $q_{\max}$  und  $K_D$  wurde anschließend das Langmuir-Modell verwendet. Die Anpassung der Daten an das Modell erfolgte mithilfe der Least-Squares-Methode der Software SigmaPlot®11 (Systat Software Inc.).

### 5.7.2 Dynamische Bestimmung der Gleichgewichtsbindekapazität

Die dynamische Gleichgewichtsbindekapazität EBC („equilibrium binding capacity“) wurde für BSA auf der chromatographischen Säule HiScreen Butyl FF bestimmt. BSA in einer Konzentration von  $7,5 \text{ mg mL}^{-1}$  wurde in Phosphatpuffer mit definierten Ammoniumsulfatkonzentrationen  $c_{AS}$  (0,1 M, 0,3 M bzw. 0,5 M) gelöst und mit einer linearen Geschwindigkeit der mobilen Phase von  $v = 150 \text{ cm h}^{-1}$  über die Säule gepumpt. Die Säule wurde durch ein Wasserbad temperiert und hatte je nach Versuchsdurchführung eine konstante Temperatur von  $10^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$  oder  $40^\circ\text{C}$ . Das System wurde bis zum Proteindurchbruch mit BSA beladen, was einer Zunahme des UV-Absorptionswertes bis auf einen Plateauwert von 1800 milli-Absorptionseinheiten (mAU) und einer vollständigen Beladung der Säule entspricht. Anschließend wurde die Säule mit reinem Puffer ohne BSA gewaschen, sodass nur schwach gebundenes Protein eluierte und die Absorption bis auf einen Wert von 10 mAU abfiel. Schließlich wurde die Säule auf  $10^\circ\text{C}$  abgekühlt und das verbleibende gebundene Protein durch Waschen mit Phosphatpuffer ohne Ammoniumsulfat vollständig eluiert. Die Proteinkonzentration im Eluat und damit auch die eluierte Proteinmasse wurden bestimmt. Bezogen auf die eingesetzte Sorbensmenge entspricht dieser Wert dann der EBC bei definierter Temperatur und  $c_{AS}$ .

### 5.7.3 Pulsantwortexperimente

Die Säule HiScreen Butyl FF wurde anfangs mit 2,5 CV des Phosphatpuffers mit entsprechenden Konzentrationen an Ammoniumsulfat (0,1 M, 0,3 M bzw. 0,5 M) äquilibriert, wobei die Säule in einem Wasserbad auf konstanter Temperatur ( $10^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$ ) gehalten wurde. Entsprechend den EBC-Messungen bei den unterschiedlichen Betriebsparametern, wurden 30 %, 70 % oder 100 % der EBC-Menge an BSA mit einer Konzentration von  $7,5 \text{ mg mL}^{-1}$  in den entsprechenden Puffern und bei einer linearen Flussgeschwindigkeit von  $150 \text{ cm h}^{-1}$  über die Säule gepumpt. Anschließend wurde die Säule bei gleicher Temperatur und Flussgeschwindigkeit mit 3 CV des Puffers ohne Protein gewaschen. Schließlich wurde die Säule noch mit 20 % Ethanollösung

gewaschen. Die eluierten Proteinmengen in den einzelnen Stufen wurden über die Peakflächen bestimmt.

#### **5.7.4 Temperaturinduzierte Säulenregeneration**

Die zyklischen Adsorptions-/Desorptionsexperimente wurden ebenfalls mit der Chromatographiesäule HiScreen Butyl FF durchgeführt. Ein Experiment bestand aus fünf Zyklen, wobei jeder Zyklus wiederum aus einem Proteinadsorptionsschritt bei einer Säulentemperatur von 40°C und einem Desorptionsschritt bei einer Säulentemperatur von 10°C bestand. Je nach Experiment wurde Phosphatpuffer mit unterschiedlichen Ammoniumsulfatkonzentrationen (0,3 M bzw. 0,5 M) mit einer linearen Flussrate von 150 cm h<sup>-1</sup> über die Säule gepumpt. Jeder Zyklus startete mit der Injektion von 2 mL BSA in einer Konzentration von 7,5 mg mL<sup>-1</sup>, gelöst im jeweiligen Puffer. Unter Adsorptionsbedingungen wurde nicht gebundenes BSA anschließend über einen Zeitraum von 4 CV wieder aus der Säule gewaschen; anschließend wurde gebundenes Protein durch Umschalten auf die Elutionstemperatur isokratisch über einen Zeitraum von 4 CV von der Säule eluiert. Die eluierte Proteinmenge in jedem Schritt wurde über Peakflächenauswertung bestimmt.

#### **5.7.5 Temperaturinduzierte Proteinfractionierung**

Die Proteinfractionierung von BSA und Lysozym durch einen Temperaturwechsel wurde an einer HiScreen Butyl FF Säule durchgeführt. Die lineare Flussgeschwindigkeit der mobilen Phase betrug 150 cm h<sup>-1</sup>. Bindepuffer war 50 mM Phosphatpuffer mit einer c<sub>AS</sub> von 0,5 M bei pH 7. Die Säule wurde zunächst für 2 CV mit Bindepuffer bei 40°C äquilibriert. Anschließend wurden 100 µL der in Bindepuffer gelösten Proteine BSA (c= 1 mg mL<sup>-1</sup>) und Lysozym (c= 0,5 mg mL<sup>-1</sup>) in das System injiziert. Ungebundene Proteine wurden über einen Zeitraum von 3 CV von der Säule gewaschen, bevor die Säulentemperatur auf 10°C gesenkt wurde und für weitere 3 CV Protein von der Säule eluiert wurde. In einem letzten Schritt wurde die Säule dann über einen Zeitraum von 3 CV mit 20 % Ethanolösung regeneriert. Alle Proteinfractionen wurden anschließend per SDS-PAGE analysiert.

## 5.7.6 Untersuchungen zur temperaturabhängigen Proteinadsorption bei erhöhten Salzkonzentrationen

### Batchversuch

$\alpha$ -Chymotrypsinogen wurde in Phosphatpuffer mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ammoniumsulfat gelöst (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1 M). Entsprechend den Isothermenversuchen aus Abschnitt 5.7.1 wurde die Beladung bei einer Proteinausgangskonzentration von  $c_0=2 \text{ mg mL}^{-1}$  anschließend ermittelt. Die Versuche wurden jeweils bei 10°C und 40°C durchgeführt und die Säulenbeladung über der Ammoniumsulfatkonzentration aufgetragen.

### Säulenversuch

$\alpha$ -Chymotrypsinogen wurde in Phosphatpuffer mit Ammoniumsulfatkonzentrationen von 0 M, 0,4 M bzw. 0,9 M in einer Konzentration zu  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  gelöst. Die Säule HiScreen Butyl FF wurde anschließend für 3 CV mit dem jeweiligen Puffer bei 40°C und einer linearen Flussgeschwindigkeit von  $125 \text{ cm h}^{-1}$  äquibriert. Anschließend wurden 40 mL der Proteinlösung ins System injiziert und daraufhin bei gleicher Temperatur die Säule mit Puffer ohne Protein über einen Zeitraum von 6 CV gewaschen. Nach Abkühlen der Säule auf 10°C wurde die Säule anschließend für weitere 6 CV eluiert, bevor schlussendlich das verbliebene gebundene Protein durch eine Beaufschlagung mit reinem Phosphatpuffer über einen Zeitraum von 5 CV eluiert wurde. Die eluierten Proteinmassen nach Abkühlung und der finalen Elution wurden über Peakflächenauswertung bestimmt.

## 5.8 Charakterisierung der thermoCEX-Partikel

In allen Versuchen zur Untersuchung der Proteinadsorption von Lysozym oder Lactoferrin auf thermoCEX-Sorbentien wurde entsprechend Abschnitt 5.2 mit 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 gearbeitet. Die Versuche zur Regeneration mit Natronlauge und zur Stabilität der funktionalisierten Partikel nach Natronlaugebehandlung (vgl. Abschnitt 9.4.3 und 9.4.2), wurden stellvertretend mit thermoresponsiv funktionalisierten Sephacryl S400 HR Partikeln durchgeführt.

### 5.8.1 Adsorptionsisothermen

Die jeweiligen Sorbentien wurden zunächst in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 gewaschen. Hierzu wurden etwa 5-15 mL der gelartigen Partikel (gelagert in 20 % Ethanol) in ein 50 mL Falcontubes

überführt, bis zur vollständigen Sedimentation zentrifugiert, der Überstand entnommen und verworfen und dann die Partikel mit dem jeweiligen Puffer aufgefüllt und gemischt. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Anschließend wurde das Volumen der Partikel bestimmt und ein Slurry mit einem Partikelanteil von 20 % hergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden anschließend drei unterschiedliche Protokolle für die Erstellung von Adsorptionsisothermen bei definierten Temperaturen durchgeführt, die im Folgenden dargestellt werden. Das größte Unterscheidungsmerkmal der drei Methoden liegt in der Wahl der Ausgangskonzentrationen  $c_0$ . Methode A deckt einen weiten Proteinkonzentrationsbereich bis  $40 \text{ mg mL}^{-1}$  ab, die Methode B ist besser für die Untersuchung geringerer Ausgangskonzentrationen bis maximal  $15 \text{ mg mL}^{-1}$  geeignet, während bei Methode C eine maximale  $c_0$  von  $9 \text{ mg mL}^{-1}$  verwendet wird. Die Methoden unterscheiden sich zusätzlich auch in den verwendeten Gesamtvolumina.

#### Methode A:

500  $\mu\text{L}$  des 20 % Slurry wurden mit 500  $\mu\text{L}$  Proteinlösung (im gleichen Puffer) definierter Konzentration (2, 4, 10, 20, 40, 80  $\text{mg mL}^{-1}$ ) in einem Mikrozentrifugenröhrchen gemischt, sodass sich eine Proteinausgangskonzentration von 1, 2, 5, 10, 20 bzw. 40  $\text{mg mL}^{-1}$  BSA ergibt. Bei definierten Temperaturen (20°C, 35°C bzw. 50°C) wurden diese Proben dann in einem Thermomixer comfort (Eppendorf) für 60 Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Anschließend sedimentierten die Partikel für 30 Minuten bei gleicher Temperatur und ohne Schütteln, bevor der Überstand entfernt wurde. Die Proteinkonzentrationen  $c^*$  im Überstand wurden anschließend photometrisch bestimmt. Die genauen Ausgangskonzentrationen  $c_0$  wurden ebenfalls photometrisch bestimmt, indem die Proteinlösungen mit reinem Puffer ohne Partikel vermischt wurden. Zur Evaluation, mathematischen Anpassung der Messdaten und Ermittlung der isothermenparameter  $q_{\text{max}}$  und  $K_D$  wurde anschließend das Langmuir-Modell verwendet. Die Anpassung der Daten an das Modell erfolgte mithilfe der Least-Squares-Methode der Software SigmaPlot®11 (Systat Software Inc.).

#### Methode B:

500  $\mu\text{L}$  dieses 20 % Slurry wurden mit 250  $\mu\text{L}$  Proteinlösung (im gleichen Puffer) definierter Konzentration (3, 6, 12, 18, 30, 45  $\text{mg mL}^{-1}$ ) in einem Mikrozentrifugenröhrchen gemischt, sodass sich eine Proteinausgangskonzentration von 1, 2, 5, 10, 20 bzw. 40  $\text{mg mL}^{-1}$  BSA ergibt. Bei definierten Temperaturen (10°C, 20°C, 35°C bzw. 50°C) wurden diese Proben dann in einem Thermomixer comfort (Eppendorf) für 60 Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute inkubiert.

Anschließend sedimentierten die Partikel für 30 Minuten bei gleicher Temperatur und ohne Schütteln, bevor der Überstand entfernt wurde. Die Proteinkonzentrationen  $c^*$  im Überstand wurden anschließend photometrisch bestimmt. Die genauen Ausgangskonzentrationen  $c_0$  wurden ebenfalls photometrisch bestimmt, indem die Proteinlösungen mit reinem Puffer ohne Partikel vermischt wurden. Zur Evaluation, mathematischen Anpassung der Messdaten und Ermittlung der Isothermenparameter  $q_{\max}$  und  $K_D$  wurde anschließend das Langmuir-Modell verwendet. Die Anpassung der Daten an das Modell erfolgte mithilfe der Least-Squares-Methode der Software SigmaPlot®11 (Systat Software Inc.).

#### Methode C:

Die Erstellung der Adsorptionsisothermen von a33Fab auf S6pg-IgBA wurde nach einem modifizierten Protokoll der Methode B durchgeführt. Je 200  $\mu\text{L}$  des 20 % Slurry wurden mit 100  $\mu\text{L}$  Antikörperfragmentlösung definierter Konzentrationen (0,3, 1,5, 3, 4,5, 6, 7,5, 9  $\text{mg mL}^{-1}$ ) gemischt, sodass sich eine a33Fab-Ausgangskonzentration  $c_0$  von 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 bzw. 3  $\text{mg mL}^{-1}$  ergab. Bei definierten Temperaturen (10°C, 20°C, 35°C bzw. 50°C) wurden diese Proben dann in einem Thermomixer comfort (Eppendorf) für 60 Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Anschließend sedimentierten die Partikel für 30 Minuten bei gleicher Temperatur und ohne Schütteln, bevor der Überstand entfernt wurde. Die Proben wurden zunächst alle 1:2 verdünnt und die Proteinkonzentration dann über den BCA-Assay bestimmt. Die genauen Ausgangskonzentrationen  $c_0$  wurden ebenfalls per BCA-Assay bestimmt, indem die Proteinlösungen mit reinem Puffer ohne Partikel vermischt wurden. Zur Evaluation, mathematischen Anpassung der Messdaten und Ermittlung der Isothermenparameter  $q_{\max}$  und  $K_D$  wurde anschließend das Langmuir-Modell verwendet. Die Anpassung der Daten an das Modell erfolgte mithilfe der Least-Squares-Methode der Software SigmaPlot®11 (Systat Software Inc.).

### **5.8.2 Ionische Kapazität**

Die Bestimmung der ionischen Kapazität der thermoCEX-Partikel wurde in Anlehnung an die Testmethode („Determination of the Total Capacity of CM Sepharose) der Fa. Pharmacia (heute: GE Healthcare) durchgeführt.

Zunächst wurde ein 25 % Slurry der jeweiligen thermoCEX-Partikel in 20 % Ethanollösung hergestellt. 6,4 ml dieses Slurry wurden in einen sauberen, zuvor ausgeheizten und leer gewogenen Glastiegel (GF4) pipettiert. Über eine Vakuumpumpe wurde die Flüssigkeit entzogen und über eine Differenzwägung konnte anschließend die Dichte der Partikel  $\rho$  bestimmt werden.

1 g der trockenen Partikel wurden anschließend in ein 15 mL Falcontube gegeben. 5 mL einer 5 % (w/w) NaCl in 0,1 M NaOH-Lösung wurden zugegeben, anschließend fünf Minuten geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde fünfmal wiederholt. Danach wurden 5 mL 0,001 M NaOH zugegeben, drei Minuten geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde ebenfalls fünfmal wiederholt. Danach wurden 2,5 mL 0,1 M HCl Maßlösung zugegeben, fünf Minuten geschüttelt und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde insgesamt zweimal durchgeführt und dann noch zweimal mit Wasser wiederholt. Die Überstände wurden gesammelt und vereinigt, anschließend wurde mittels einer Titrino SM 702 Station (Metrohm AG) und 0,1 M NaOH als Titriermittel der Äquivalenzpunkt bestimmt und das benötigte Volumen an Titriermittel  $V_S$  bestimmt. In einer Vergleichsmessung mit dem unfunctionalisierten Sorbens wurde entsprechend das Volumen  $V_B$  bestimmt. Über Gleichung 5-2 konnte anschließend die ionische Kapazität  $IC_M$  in  $\mu\text{mol H}^+ \text{g}^{-1}$  bestimmt werden.

$$IC_M = (V_B - V_S) * 0,1 * f \quad (5-2)$$

$f$  stellt einen Korrekturfaktor zur genauen Konzentration der 0,1 M NaOH-Lösung laut Gleichung 5-3 dar, wobei die genaue NaOH Konzentration zuvor durch Titration von 5 ml 0,1 M HCl-Lösung bestimmt wurde.

$$f = \frac{c(\text{NaOH})}{0,1} \quad (5-3)$$

Die ionische Kapazität pro Partikelvolumen  $IC_V$  in  $\mu\text{mol H}^+ \text{mL}^{-1}$  konnte durch die zuvor bestimmte Dichte der Partikel bestimmt werden, entsprechend Gleichung 5-4.

$$IC_V = IC_M * \rho \quad (5-4)$$

## 5.9 Säulenpacken

Die chromatographischen Säulen in dieser Arbeit wurden mit thermoCEX-Partikeln gepackt. Im Falle der für die TCZR-Anwendung entwickelten Stahlsäule ( $CV=2,83$  ml; vgl. Abschnitt 4.3.2) wurden die Packungen mit SCL6B-ItBA und S6pg-ItBA durchgeführt. Die verwendete Ominfit® Labware Säule (Diba Industries, Inc.) wurde mit S6pg-ItBA gefüllt. Die verwendete kommerziell erhältliche Säule besteht aus Borosilikatglas mit einem Innendurchmesser von 6,6 mm und einer Länge von 100 mm. Durch die Verwendung eines festen und eines variabel einstellbaren Adapters können unterschiedliche Füllhöhen realisiert werden. Bezüglich der Packungsqualität wurde der Asymmetriewert eines aufgegebenen Salztracers beurteilt. Hierzu wurden 50  $\mu\text{L}$  einer 2 M NaCl

Lösung in Wasser (bzw. 10 mM Phosphatpuffer pH 6.5 im Falle der Borosilikatsäule) in die Säule injiziert und das entstehende Signal der sich ändernden Leitfähigkeit im Chromatogramm analysiert. Aus der Retentionszeit des Salzes wurde in diesen Versuchen außerdem die Gesamtporosität  $\epsilon_T$  bestimmt. Die Bettporosität  $\epsilon_B$  wurde aus Tracerversuchen mit Blue Dextran bestimmt. Hierzu wurden 50  $\mu\text{L}$  einer Lösung aus 1 mg  $\text{mL}^{-1}$  Blue Dextran in 50mM Tris-HCl und 100 mM KCl bei einem pH von 7,5 über die Säule geleitet und die Retentionszeit des Tracers zur Berechnung der Bettporosität verwendet. Die Werte wurden entsprechend der Formeln 2-16 und 2-17 und unter Beachtung des Systemtotvolumens bestimmt.

### 5.9.1 TCZR-Edelstahlsäule

Zunächst wurde ein Polypropylenfilter (GE Healthcare) auf den unteren, zuvor eingefetteten Stempel gelegt, zusammen mit diesem in die Stahlsäule eingeschoben, mit der Stellschraube fixiert und die Säule senkrecht ausgerichtet. Die untere Ablaufkapillare wurde mit Phosphatpuffer gefüllt. Das entsprechende Sorbens wurde in Phosphatpuffer in einem 50 % Slurry angesetzt und über eine Spritze kontinuierlich über den Säulenrand in die Säule gelassen. Da die Adapter des Systems nicht variabel waren und die Packungsqualität dadurch allein durch die Menge des verwendeten Sorbens variiert werden konnte, war es von größter Bedeutung, die richtige Menge an Sorbens einzufüllen bzw. den richtigen Packfaktor zu wählen. Für die absatzweisen TCZR-Versuche (vgl. Abschnitt 6.4) wurde die Säule mit 3,4 ml SCL6B-ItBA (Packfaktor 1,2) bzw. 3,1 ml S6pg-ItBA (Packfaktor 1,1) gefüllt, im Falle der kontinuierlichen Tests wurden 4,3 ml Sorbens (Packfaktor 1,52) in die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule komplett mit Phosphatpuffer gefüllt, ein Filter aufgelegt und der zweite gefettete Adapter in die Säule geschoben. Die Säule wird anschließend an das FPLC-System angeschlossen und mit einer Flussrate von  $1 \text{ mL min}^{-1}$  für 80 Minuten durchspült. Der Fluss wurde anschließend gestoppt und der Adapter bis etwa 1,6 cm oberhalb der finalen Position nach unten gedrückt. Anschließend wurde die Flussrate absatzweise um  $0,1 \text{ mL min}^{-1}$  alle fünf Minuten erhöht, bis eine maximale Flussgeschwindigkeit von  $1 \text{ mL min}^{-1}$  (bei Säulenfüllung S6pg-ItBA) bzw.  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$  (bei SCL6B-ItBA) erreicht werden konnte. Der Fluss wurde anschließend erneut gestoppt, der Adapter auf seine finale Position nach unten geschoben, mit der Stellschraube fixiert und die Säule in das TCZR-System eingebaut. Der Druckverlust über der Säule durfte im finalen Betrieb mit  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  bzw.  $1 \text{ mL min}^{-1}$  nicht größer als 0,4 MPa sein, sollte aber deutlich darunter liegen. Im Falle der SCL6B-ItBA Packung wurde  $\epsilon_B$  mit 0,31 und  $\epsilon_T$  mit 0,87 bestimmt. Für die Packung mit S6pg-ItBA in den absatzweisen Experimenten konnten Werte von  $\epsilon_B = 0,46$  und  $\epsilon_T = 0,82$  bestimmt werden. Aufgrund der Adsorption des Tracers an den Partikeln konnte für die Packung der

kontinuierlichen Tests die Bettporosität nur zu  $\epsilon_B = 0,4$  abgeschätzt werden,  $\epsilon_T$  wurde mit 0,89 bestimmt. Die Asymmetriewerte  $A_s$  variierten im Laufe der Arbeit mit den Säulen, waren aber zumeist im Bereich von 1,3-1,6 und damit etwas erhöht.

### 5.9.2 Borosilikatglassäule

Die Säule wurde zunächst gereinigt, senkrecht aufgebaut und die Kapillare im unteren Teil der Säule mit 20 % Ethanol gefüllt. Der untere Teil der Säule wurde anschließend mit Phosphatpuffer gefüllt, daraufhin wurden 1,3 mL des Sorbens in einem 50 % Slurry (in Phosphatpuffer) kontinuierlich und ohne Absetzen in die Säule pipettiert. Das Sorbens sedimentierte 20 Minuten, anschließend wurde die Säule vollständig mit 20 % Ethanol gefüllt und der obere Stempel in einem 45 ° Winkel und unter Vermeidung von Luftblaseneinschlüssen in die Säule eingeführt. Die Säule wurde dann an das FPLC-System angeschlossen und eine Stunde mit 0,5 mL min<sup>-1</sup> gespült. Nach einer Stunde wurde die Ethanollösung durch Puffer ersetzt und das System für 60 Minuten mit 1,5 mL min<sup>-1</sup> gespült. Der obere Adapter wurde danach nach unten gedreht, sodass das Sorbens leicht komprimiert wurde. Bei einer Flussrate von 1 mL min<sup>-1</sup> wurden dann die Tracertests mit Salz durchgeführt und die Säule entsprechend der Asymmetriewerte noch leicht nach unten gedreht. Schlussendlich konnte unter Berücksichtigung des maximal anwendbaren Druckverlustes über dem Säulenbett ( $\Delta p = 0,4$  MPa) ein Asymmetriefaktor von 1,8 erreicht werden. Die Bettporosität konnte aufgrund der Adsorption des Tracers nicht bestimmt werden, wurde aber auf  $\epsilon_B = 0,4$  festgelegt.

## 5.10 Konventionelle thermoresponsive Chromatographie

Zur Durchführung dieser Experimente wurde die bereits erwähnte und gepackte Borosilikatsäule an das FPLC-System angeschlossen und in einem temperierbaren Wasserbad Lauda RC6-RCS (Lauda) mit einer Temperaturgenauigkeit von  $\pm 0,5^\circ\text{C}$  gelagert.

### 5.10.1 Elutionsversuche

Die Säule wurde bei verschiedenen Temperaturen (20°C, 35°C, 40°C), einer linearen Geschwindigkeit von 87,7 cm h<sup>-1</sup> und mit 40 mL einer konstanten Proteinkonzentration von 1 mg mL<sup>-1</sup> beladen. Danach wurde die Säule mit reinem Puffer gewaschen, bis das Absorptionssignal nur noch etwa 50 mAU betrug. Abschließend wurde die Temperatur auf 10°C reduziert und die Säule weiter mit reinem Puffer für 25-45 mL gewaschen.

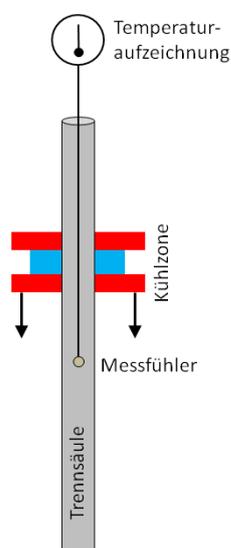
## 5.10.2 Durchbruchskurven

Bei verschiedenen Temperaturen des Wasserbades (10°C, 12,4°C, 15°C, 20°C, 25°C, 35°C, 40°C) wurde die Säule konstant bei einer linearen Geschwindigkeit von 87,7 cm h<sup>-1</sup> mit Lactoferrin konstanter Konzentrierung von 1 mg mL<sup>-1</sup> in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 beladen. Die Durchbruchskurven wurden aufgezeichnet und dynamische Bindekapazitäten (DBC<sub>50%</sub>) bestimmt. Dazu wurde die aufgegebene Proteinmenge aus dem Aufgabevolumen berechnet, nachdem die Durchbruchskurve 50 % des sich später bei komplettem Durchbruch des Proteins ergebenden Plateauwertes erreicht hätte. Das Totvolumen des verwendeten Systems wurde vom Aufgabevolumen bei DBC<sub>50%</sub> abgezogen und die Beladungen unter Kenntnis der aufgegebenen Proteinmengen und der gepackten Säulenmenge von 1,3 mL berechnet.

## 5.11 Thermoresponsive Monolithchromatographie

Der thermoCEX-Monolith wurde in einem temperierbaren Wasserbad gelagert (Temperaturschwankung um Solltemperatur ± 1°C) und mit dem FPLC-System verbunden. Bei einer Fließgeschwindigkeiten von 10 mL min<sup>-1</sup> wurde Lactoferrin einer Konzentration von 1 mg mL<sup>-1</sup> in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 zunächst bei einer Temperatur von 40°C über den Monolithen geleitet, bis sich nach dem Durchbruch ein UV-Absorptionsplateauwert bei etwa 550 mAU einstellte. Der Monolith wurde anschließend kurz mit reinem Puffer ebenfalls bei 40°C gewaschen, bis das UV-Absorptionssignal einen Wert von etwa 30 mAU aufwies. Anschließend wurde die Temperatur auf 10°C reduziert und der Monolith weiterhin mit etwa 20 mL reinem Puffer durchspült.

## 5.12 Temperaturmessungen im Säulenzentrum



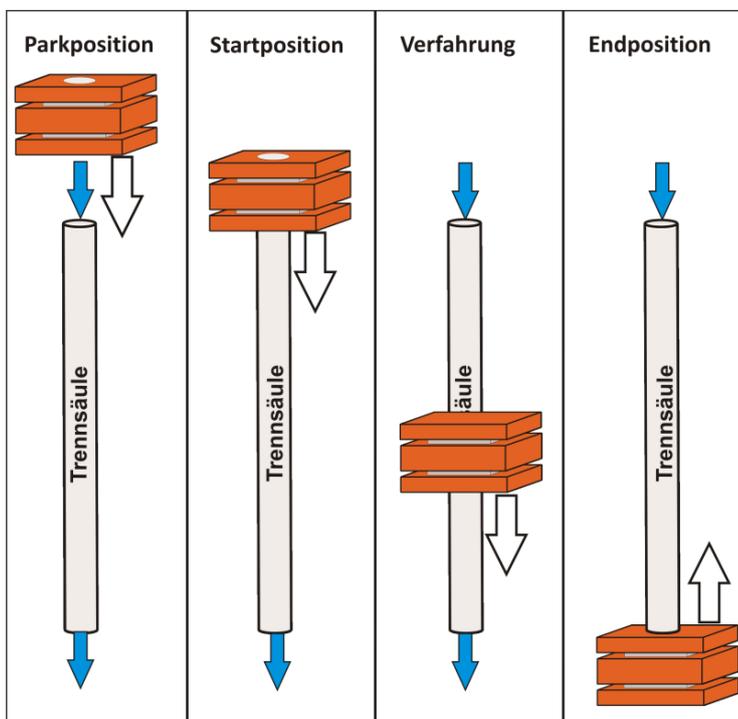
**Abbildung 5-1:**  
**Schemazeichnung des Versuchsaufbaus zur Temperaturmessung innerhalb der Säule.**

Um die Temperatur unter realen Betriebsbedingungen zu messen, wurde ein langes, dünnes, drahtähnliches Thermoelement (Typ J) an einer Angelschnur festgeklebt. Die Schnur wurde darauf an speziellen Verschlüssen befestigt und in der später verwendeten Trennsäule gespannt, sodass der Messfühler an der Spitze des Thermoelementes in zentraler Position der Säule und ohne Kontakt zur inneren Säulenwand fixiert war. Das Thermoelement war zur Temperaturaufzeichnung an ein digitales Temperaturmessgerät TastoTherm® MP2001 (Impac) gekoppelt. Die Säule

wurde daraufhin mit einer viskosen Lösung 40 % (w/w) Polyethylenglykol 35000 in Wasser gefüllt. Der entsprechende Versuchsaufbau ist in Abbildung 5-1 schematisch illustriert. Bei zuvor definierter Umgebungstemperatur sowie Temperatureinstellung und Verfahrensgeschwindigkeit der Kühlzone wurde diese nun von oben nach unten über die Säule bewegt. Die gemessenen Temperaturen wurden über der Verfahrenposition aufgetragen und werden im Folgenden als Temperaturprofil bezeichnet. Zur Bestimmung der Kinetik des Wärmeüberganges wurde die Temperaturzone mit hoher Geschwindigkeit außerdem auch direkt auf die Position des Messfühlers verfahren und die Temperaturentwicklung über der Zeit aufgenommen.

### 5.13 Absatzweise TCZR-Tests

Aufgrund der diversen unterschiedlichen Prozessführungen der einzelnen Experimente werden die genauen Prozessparameter (Umgebungstemperatur  $\Phi_u$ , Säuleinnentemperatur  $\Phi_{\text{Säule}}$ , Kühlzonenverfahrensgeschwindigkeit  $v_{\text{TCZR}}$ , Zwischenkorngeschwindigkeit der mobilen Phase  $v_{\text{int}}$ , Anzahl der Verfahrenen, verwendetes Protein, Probenvolumen, Probenkonzentration  $c_F$ , verwendetes Sorbens) im Ergebnisteil wiedergegeben. Die grundsätzliche Versuchsdurchführung wird im Folgenden beschrieben.



**Abbildung 5-2:** Positionen der Kühlzone während einer Verfahren. Die Kühlzone ist zunächst außerhalb der Säule geparkt und wird dann mit hoher Geschwindigkeit auf die Startposition bewegt. Nach der eigentlichen Verfahren mit vorgegebener Geschwindigkeit stoppt die Kühlzone in ihrer Endposition und wird dann mit hoher Geschwindigkeit wieder in ihre Parkstellung bewegt. Die Bewegungsrichtung (weiße Pfeile) und die Flussrichtung der mobilen Phase (blaue Pfeile) sind dargestellt.

Die Säule wurde in das FPLC-System eingebaut und mit Laufpuffer (10 mM Phosphatpuffer pH 6,5) äquilibriert. Mittels der Temperatursteuerung- und -überwachung wurde der Innenraum des TCZR auf eine konstante Temperatur  $\Phi_u$  temperiert. Die Säule wurde anschließend mit einer definierten Menge an Protein in definierter konstanter Konzentration und gleichbleibender Flussgeschwindigkeit beladen und anschließend für einen gewissen Zeitraum mit reinem Puffer gewaschen. Die Kühlzone befindet sich dabei zunächst komplett außerhalb des gefüllten Säulenbereiches in ihrer Parkzone am oberen Anschlag der Linearachse. Eine Verfahrungssequenz mit der Kühlzone gliederte sich dann in drei Abschnitte, wie in Abbildung 5-2 dargestellt. (1) Mit einer Geschwindigkeit von  $20 \text{ mm s}^{-1}$  wurde die Kühlzone zunächst in ihre Startposition gebracht, sodass sich das Zentrum der Kühlzone etwa 2 cm oberhalb des Säuleneingangs befand. (2) Mit einer definierten Geschwindigkeit wurde die Kühlzone anschließend entlang der Chromatographiesäule für 140 mm nach unten bewegt, sodass sie schließlich mit dem Mittelpunkt der Kühlzone etwa 2 cm unterhalb des Säulenausgangs stoppte. (3) Direkt im Anschluss wurde die Kühlzone mit einer Geschwindigkeit von  $20 \text{ mm s}^{-1}$  wieder in die Parksituation oberhalb des Säuleneingangs gefahren. Nach Beendigung aller Verfahrungen wurde die Säule schließlich noch mit Elutionspuffer (Bindepuffer inklusive 1 M NaCl) gewaschen. Die Proteinkonzentrationen der während der Elution aufgefangenen Peaks wurden UV/Vis-Messung bestimmt.

### ***5.14 Kontinuierliche TCZR Tests***

Zur kontinuierlichen Anwendung des TCZR-Systems wurde die Säule zunächst mit Bindepuffer äquilibriert und der Innenraum des TCZR auf  $35^\circ\text{C}$  temperiert. Sofern nicht anders angegeben, wurde die Säule anschließend konstant mit einer Proteinlösung (Protein gelöst in Bindepuffer) definierter Konzentration und gleichbleibender Flussgeschwindigkeit beladen. Zu definierten Zeitpunkten nach 200, 280, 360, 440, 520, 600 und 680 Minuten Beladungszeit wurde anschließend die Kühlzone aus ihrer Parkposition entsprechend Abbildung 5-2 mit einer definierten Geschwindigkeit von  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$  über die Säule gefahren. Nach Beendigung aller Verfahrungen wurde die Säule schließlich noch mit Elutionspuffer (Bindepuffer inklusive 1 M NaCl) gewaschen. Die Proteinkonzentrationen der während der Elution aufgefangenen Peaks (Peakfraktionierung ab einem  $\text{UV}_{280\text{nm}}$ -Absorptionssignal von 100 mAU) wurden per Photometrie bestimmt.

### **5.15 Simulation des TCZR-Prozesses**

Zur Simulation des chromatographischen Prozesses wurde die am Forschungszentrum Jülich entwickelte Software CADET 1.0.0 genutzt. Mittels dieses modellbasierten Simulationstools können Konzentrations- und Beladungsprofile basierend auf der in Kapitel 2.6 vorgestellten Theorie im Effluenten und innerhalb der Säule zu definierten Zeitpunkten berechnet werden. Die Implementierung der Temperaturabhängigkeit während der Bioseparation mit dem TCZR-System wurde entsprechend der Ausführungen in Kapitel 3.2 vorgenommen. Der eigentliche Quellcode der Software, der alle mathematischen Verknüpfungen und die numerische Lösung der Differentialgleichungen enthält, wurde in der Programmiersprache C++ geschrieben. Zur Gleichgewichtsberechnung diente die in Gleichung 3-1 beschriebene thermoresponsive Langmuirgleichung. Weitere variable Parameter können entsprechend der gewünschten Simulation über eine Eingabedatei im hdf5-Format eingelesen werden. Nach Berechnung der eigentlichen Simulation, wurden Konzentrations- und Beladungsdaten als Ausgabedatei im selben hdf5-File gespeichert. Die graphische Darstellung wurde anschließend über die Software MatlabR2012b (MathWorks) vorgenommen.

KD ist im Simulationsprogramm entsprechend Gleichung 2-6 definiert. Durch Festlegung von  $k_{ads}$  auf einen Wert von 1, entspricht  $k_{des}$  demnach KD. Des Weiteren wurden ausschließlich lineare Abhängigkeiten von  $q_{max}$  und KD von der Temperatur beobachtet; diese können demnach durch je ein Parameterpaar beschrieben werden. Die Beschreibung von quadratischen oder kubischen Abhängigkeiten kann innerhalb der Software aber ebenfalls vorgenommen werden. Die jeweiligen Parameter wurden in dieser Arbeit allerdings auf den Wert 0 gesetzt.

**Tabelle 5-3** gibt eine Übersicht der zur Simulation benötigten Parameter, die in dieser Arbeit variiert wurden. Die Darstellung der Parameter erfolgt aus Gründen der Übersichtlichkeit in verschiedenen Klassen; entsprechende Ordnerstrukturen sind auch innerhalb der verwendeten hdf-Eingabedatei zu finden. Die Parametereingabe erfolgt innerhalb der Software immer in SI-Einheiten, die verwendeten Einheiten sind ebenfalls angegeben. Parameter, die in dieser Arbeit nicht variiert wurden, die aber auch über die Eingabedatei geändert werden können, sind in der Tabelle nicht erfasst. Dabei handelt es sich vor allem um mathematische Parameter zur örtlichen und zeitlichen Diskretisierung der Säule, zur Einteilung der Partikel in Schalen und zum verwendeten Lösungsalgorithmus.

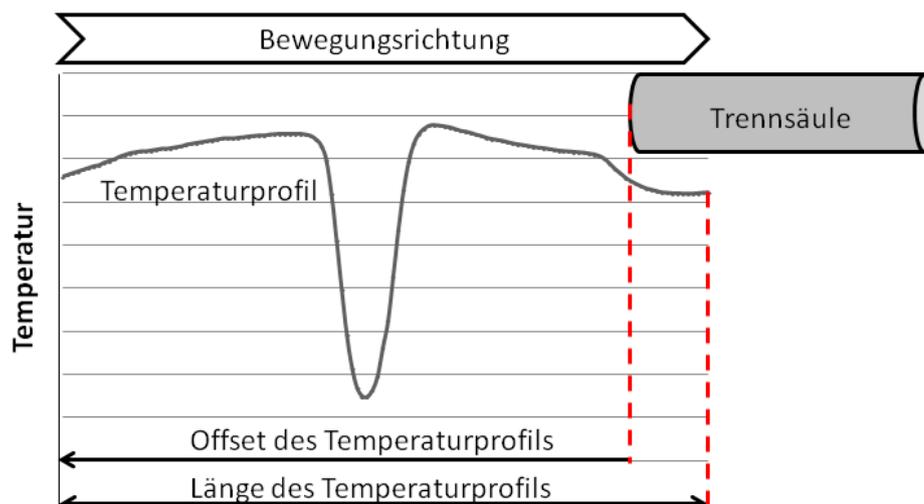
$K_D$  ist im Simulationsprogramm entsprechend Gleichung 2-6 definiert. Durch Festlegung von  $k_{ads}$  auf einen Wert von 1, entspricht  $k_{des}$  demnach  $K_D$ . Des Weiteren wurden ausschließlich lineare Abhängigkeiten von  $q_{max}$  und  $K_D$  von der Temperatur beobachtet; diese können demnach durch je ein Parameterpaar beschrieben werden. Die Beschreibung von quadratischen oder kubischen Abhängigkeiten kann innerhalb der Software aber ebenfalls vorgenommen werden. Die jeweiligen Parameter wurden in dieser Arbeit allerdings auf den Wert 0 gesetzt.

**Tabelle 5-3: Variierte Parameter des chromatographischen Simulationsmodells inklusive Bezeichnung innerhalb der Software CADET 1.0.0 und entsprechende Einheiten.**

Beschreibung	Software-Bezeichnung	Einheit
<b>Basiswerte</b>		
Anzahl der Komponenten im Zulauf	NCOMP	-
<b>Modellparameter Adsorption</b>		
Umgebungstemperatur	TEMP_ENVIRON	K
Offset des Temperaturprofils	TEMP_OFFSET	m
Temperaturprofil	TEMP_PROFILE	K
Länge des Temperaturprofils	TEMP_PROF_LENGTH	m
Geschwindigkeit des Temperaturprofils	TEMP_VELOCITY	$m s^{-1}$
Konstante $k_{Ads}$	THM_KA	$mol m^{-3}$
Erster Term der temperaturabhängigen $k_{des}$	THM_KD	$mol m^{-3}$
Zweiter Term der temperaturabhängigen $k_{des}$	THM_KD_T	$mol m^{-3} K^{-1}$
Erster Term der temperaturabhängigen $q_{max}$	THM_QMAX	$mol m^{-3}$
Zweiter Term der temperaturabhängigen $q_{max}$	THM_QMAX_T	$mol m^{-3} K^{-1}$
<b>Modellparameter Chromatographie</b>		
Axiale Dispersion, $D_{ax}$	COL_DISPERSION	$m^2 s^{-1}$
Säulenlänge, L	COL_LENGTH	m
Bettporosität, $\epsilon_B$	COL_POROSITY	-
Filmdiffusionskoeffizient* (in $j_f$ )	FILM_DIFFUSION	$m^2 s^{-1}$
Porendiffusionskoeffizient, $D_p$	PAR_DIFFUSION	$m^2 s^{-1}$
Partikelporosität	PAR_POROSITY	-
Partikelradius	PAR_RADIUS	m
Interstitielle Geschwindigkeit, $v_{int}$	VELOCITY	$m s^{-1}$

Modellparameter Säuleneingang		
Konstante Zulaufkonzentration, $c_0$	CONST_COEFF	$\text{mol m}^{-3}$
Zeitliche Dauer der Simulationsberechnung	SECTION_TIMES	s

Die Möglichkeit einer Temperaturelution wird in dieser Version der Software durch die Eingabeparameter „Temperaturprofil“, „Länge des Temperaturprofils“ und „Offset des Temperaturprofils“ realisiert. Dazu wird eine Liste von Temperaturwerten in eine Textdatei geschrieben und automatisch als „Temperaturprofil“ eingelesen. Über den Parameter „Länge des Temperaturprofils“ kann die wirkliche Länge des Profils festgelegt werden. Der Parameter „Offset des Temperaturprofils“ entspricht dem Startpunkt der Verfahrung über die Säule. Dadurch können gewünschte zeitliche Versätze zwischen Beginn der Simulation und dem eigentlichen Überfahren der Temperaturzone über die Säule realisiert werden. Der Zeitpunkt des Starts der Überfahrung kann über die Verfahrgeschwindigkeit und den Offset leicht bestimmt werden. Nach Start der Simulation wird das Temperaturprofil unter dem ebenfalls definierten Parameter „Geschwindigkeit des Temperaturprofils“ über die Säule geschoben. Abbildung 5-3 stellt das Prinzip zur Überfahrung eines Temperaturprofils mit den Parametern „Länge des Temperaturprofils“ und „Offset des Temperaturprofils“ nochmals anschaulich dar. Im dargestellten Fall ist der Offset-Wert geringer als die Gesamtlänge des Profils; in diesem Fall überlappt das Temperaturprofil mit der Säule schon zu Beginn der Simulation.



**Abbildung 5-3: Darstellung der Modellparameter „Temperaturprofil“, „Länge des Temperaturprofils“ und „Offset des Temperaturprofils“. Bei Start der Simulation läuft das Profil in der angezeigten Richtung mit definierter Geschwindigkeit über die Trennsäule.**

Um numerische Instabilitäten der Software zu vermeiden, müssen abrupte Temperaturwechsel des Profils vermieden werden. Der Parameter „Umgebungstemperatur“ sollte zudem den Temperaturen in den Randbereichen des Temperaturprofils entsprechen. Die Möglichkeit einer wiederholten Temperaturelution ist in dieser Version der Software nur über die Eingabe eines entsprechenden mehrzyklischen Temperaturprofils möglich.

## **6 Ergebnisse und Diskussion**

Grundlage für die Anwendung einer temperaturkontrollierten Chromatographie unter isokratischen Bedingungen ist zunächst die Auswahl eines geeigneten Sorbens. Kapitel 6.1 beschreibt daher die Charakterisierung unterschiedlicher HIC-Materialien im Hinblick auf ihre Temperatursensitivität. Kapitel 6.2 befasst sich mit der Charakterisierung spezieller thermoresponsiver Materialien, die vom Projektpartner UBI zur Verfügung gestellt wurden. Die temperaturabhängige Anwendbarkeit einiger dieser Materialien innerhalb einer chromatographischen Trennsäule bei kompletter Temperierung derselben wird in Abschnitt 6.3 beschrieben. Ergebnisse zur kontinuierlichen und temperaturkontrollierten Chromatographie mittels TCZR werden speziell in den Kapiteln 6.4, 6.5 und 6.6 behandelt. Kapitel 6.4 befasst sich hierbei zunächst mit der Untersuchung des Wärmeübergangs innerhalb der Trennsäule und der resultierenden Temperaturprofile. Kapitel 6.5 beschreibt wichtige empirisch ermittelte Einflussfaktoren der Trennung mittels des TCZR-Systems. In Kapitel 6.6 wird die eigentliche kontinuierliche Proteinakkumulation bei Verwendung eines Einstoffsystems und auch die kontinuierliche Trennung eines binären Systems dargestellt. Experimentelle Daten zur Anwendbarkeit von Monolithen als alternative Basismaterialien für die thermoresponsive Chromatographie werden in Kapitel 6.7 gezeigt und diskutiert. Kapitel 6.8 beschreibt Ergebnisse chromatographischer Simulationen weiterer Trenaufgaben mit dem TCZR.

### ***6.1 Temperatureffekt bei der HIC von Proteinen***

Der Temperatureffekt auf die Adsorption von Proteinen während der HIC wurde bereits in Kapitel 2.4 erörtert. Dieser Abschnitt behandelt experimentelle Ergebnisse, die einerseits den Temperatureffekt auf diversen Sorbentien beschreiben, andererseits auch weitere Anwendungsmöglichkeiten einer primär durch Temperaturwechsel gesteuerten Chromatographie aufzeigen. Um den Einfluss der Temperatur zum dominierenden Faktor zu machen, wurde hauptsächlich mit Puffern geringer Salzkonzentrationen gearbeitet. Neben der reinen

experimentellen Analyse wurde auch die quantitative Beschreibung der Adsorptionsvorgänge mit thermodynamischen Parametern vorgenommen. Auch auf den unerwünschten Effekt des Protein-Unfolding bei Arbeit mit erhöhten Temperaturen wird eingegangen. Abschließend werden Ergebnisse zur Beeinflussung des Temperatureffektes durch eine Erhöhung der zuvor bewusst niedrig gewählten kosmotropen Salzkonzentration vorgestellt.

Die in den Kapiteln 6.1.1 bis 6.1.5 gezeigten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht [41]. Die zugrunde liegenden experimentellen Durchführungen der Versuche sind in Kapitel 5.7 beschrieben.

### 6.1.1 Adsorption von BSA auf HIC-Sorbentien

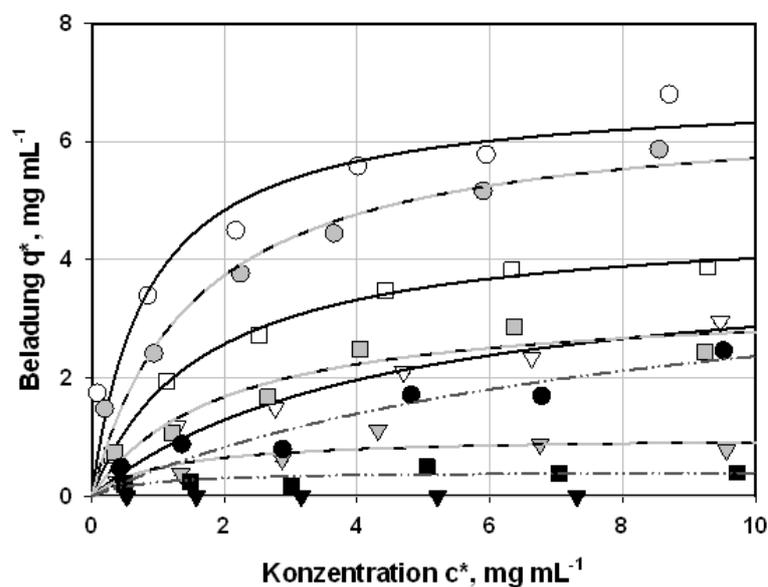
Zur grundsätzlichen Beschreibung des Temperatureffektes der Proteinadsorption wurden Adsorptionsisothermen des Modellproteins BSA auf vier verschiedenen HIC-Sorbentien (vgl. Kapitel 5.7.1) aufgenommen. Im Zuge entsprechender Vorversuche (vgl. Anhang, Kapitel 9.3) erwies sich dabei eine Inkubationszeit von 60 Minuten als ausreichend, um ein Gleichgewicht zwischen Sorbenskonzentration und Beladung zu erreichen. Zur Hervorhebung des Temperatureinflusses wurde die Konzentration an kosmotropem Ammoniumsulfat im verwendeten Phosphatpuffer mit maximal 0,5 M relativ gering gehalten. Die Vermeidung großer Salzkonzentrationen hat darüber hinaus vor allem bei technischen Anwendungen größeren Maßstabs ökonomische und ökologische Vorteile, da neben der Reduktion der benötigten Mengen auch die Entsorgung der teilweise umweltgefährdenden Substanzen vereinfacht wird. Für die Adsorption des Modellproteins BSA auf den vier untersuchten Sorbentien Butyl Sepharose 4 FF (vgl. Abbildung 6-1), Octyl Sepharose 4 FF (vgl. Abbildung 6-2), Phenyl Sepharose 6 FF (low sub) (vgl. Abbildung 6-3) und Phenyl Sepharose 6 FF (high sub) (vgl. Abbildung 6-4) sind daher die Gleichgewichtsparameter für die drei Ammoniumsulfatkonzentrationen ( $c_{AS}$ ) 0,1 M, 0,3 M und 0,5 M und die Temperaturen ( $\Phi$ ) 10°C, 25°C und 40°C dargestellt. Die Parameter der Anpassung nach Langmuir  $q_{max}$  und  $K_D$  sind in Tabelle 6-1, Tabelle 6-2, Tabelle 6-3 und Tabelle 6-4 gelistet. Generell ist festzustellen, dass eine komplette Sättigung der Sorbentien im verwendeten Konzentrationsbereich der Isothermen kaum erreicht werden konnte.

Wie zu erwarten, nimmt die Menge an adsorbiertem Protein mit zunehmender Salzkonzentration in nahezu allen untersuchten Kombinationen zu. Die einzige Ausnahme bildete hierbei die Adsorption von BSA auf Phenyl Sepharose 6 FF (low sub), wobei dieses Sorbens allerdings generell die geringste Proteinadsorption zeigt, wodurch kleine Messungenauigkeiten einen großen Einfluss

auf die ermittelten Adsorptionswerte haben. Im Gegensatz zum klaren Trend der Proteinadsorption in Abhängigkeit der Salzkonzentration, ergaben sich große Unterschiede bei Betrachtung des Temperatureffektes auf die Proteinadsorption der vier Sorbentien.

**Tabelle 6-1: Adsorptionsparameter  $q_{max}$  und  $K_D$  der Adsorption von BSA auf Butyl Sepharose 4 FF im untersuchten Bereich von  $\Phi= 10-40^\circ\text{C}$  und  $c_{AS}= 0,1-0,5\text{ M}$ .**

$\Phi, ^\circ\text{C}$	$q_{max}, \text{mg mL}^{-1}$			$K_D, \text{mg mL}^{-1}$		
	$c_{AS}, \text{M}$			$c_{AS}, \text{M}$		
	0,1	0,3	0,5	0,1	0,3	0,5
10	0	1,0	4,1	0	1,9	4,4
25	0,4	3,3	4,7	0,8	2,0	1,6
40	4,4	6,6	6,8	8,6	1,5	0,8



**Abbildung 6-1: Isothermen der Adsorption von BSA auf Butyl Sepharose 4 FF bei verschiedenen Temperaturen (Kreise:  $40^\circ\text{C}$ ; Quadrate:  $25^\circ\text{C}$ ; Dreiecke:  $10^\circ\text{C}$ ) und Konzentrationen an Ammoniumsulfat (weiß:  $0,5\text{ M}$ ; grau:  $0,3\text{ M}$ ; schwarz:  $0,1\text{ M}$ ). Die Linien entsprechen der Anpassungsfunktionen nach Langmuir (schwarz:  $0,5\text{ M}$ ; grau-schwarz:  $0,3\text{ M}$ ; grau gestrichelt:  $0,1\text{ M}$ ).**

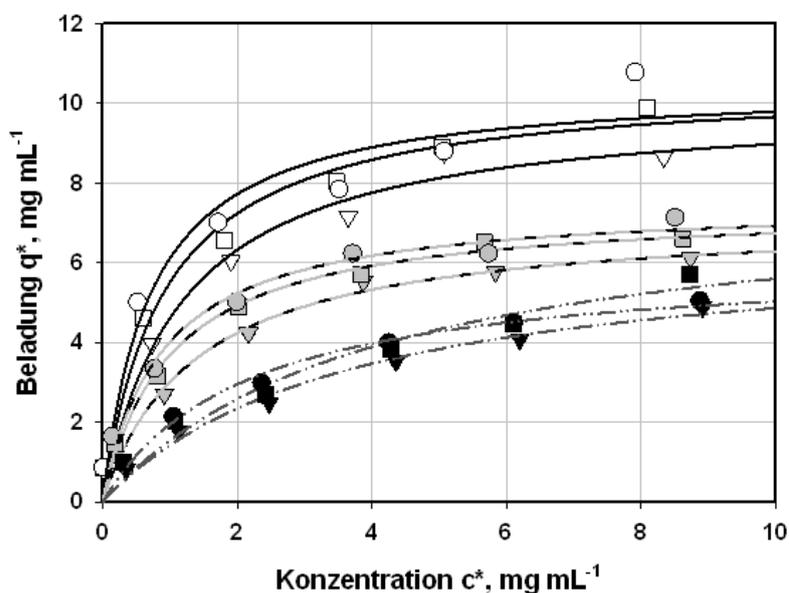
Bei 10°C und einer  $c_{AS}$  von 0,1 M konnte keine Adsorption von BSA auf Butyl Sepharose 4 FF festgestellt werden, wogegen eine maximale Sättigungsbeladung  $q_{max}$  von 6,8 mg mL<sup>-1</sup> (für 40°C und  $c_{AS}$ = 0,5 M) am oberen Ende des betrachteten Temperatur- und Salzkonzentrationsbereiches resultierte. Mit steigender Temperatur bei konstanter  $c_{AS}$  von 0,5 M nahm die Proteinbindungsaffinität deutlich zu, was durch die Abnahme des  $K_D$ -Wertes von 4,4 bis 0,8 mg mL<sup>-1</sup> gut dokumentiert wird. Bei gleichbleibenden Ammoniumsulfatkonzentrationen von 0,3 M konnten keine bedeutenden Änderungen des  $K_D$ -Wertes festgestellt werden und aufgrund der generell sehr geringen Proteinadsorption bei Verwendung einer konstanten  $c_{AS}$  von nur 0,1 M war der Vergleich der  $K_D$ -Werte in diesem Fall nur von geringer Signifikanz. Die Differenz an adsorbiertem BSA ( $\Delta q_\Phi$ ) bei sich ändernden Systemtemperaturen aber gleichbleibender  $c_{AS}$  ist für Butyl Sepharose 4 FF, verglichen mit allen weiteren untersuchten Sorbentien, am stärksten ausgeprägt. Der maximale Wert für  $\Delta q_\Phi$  ergab sich bei einer  $c_{AS}$  von 0,3 M mit 5,6 mg mL<sup>-1</sup> BSA. Im Falle einer konstanten  $c_{AS}$  von 0,5 M betrug dieser Wert 2,7 mg mL<sup>-1</sup>, im Falle von  $c_{AS}$ = 0,1 M 4,4 mg mL<sup>-1</sup>.

**Tabelle 6-2: Adsorptionsparameter  $q_{max}$  und  $K_D$  der Adsorption von BSA auf Octyl Sepharose 4 FF im untersuchten Bereich von  $\Phi$ = 10-40°C und  $c_{AS}$ = 0,1-0,5 M.**

$\Phi, ^\circ\text{C}$	$q_{max}, \text{mg mL}^{-1}$			$K_D, \text{mg mL}^{-1}$		
	$c_{AS}, \text{M}$			$c_{AS}, \text{M}$		
	0,1	0,3	0,5	0,1	0,3	0,5
10	6,7	7,2	10,0	3,7	1,4	1,1
25	7,9	7,4	10,6	4,1	1,0	0,9
40	6,1	7,5	10,5	2,1	0,9	0,7

Die Adsorption von BSA auf der mit C8-Ketten modifizierten, hydrophoben Oberfläche der verwendeten Octyl Sepharose 4 FF war vergleichsweise hoch. Die temperaturabhängige Änderung der Sättigungsbeladung bei konstanter Ammoniumsulfatkonzentration war allerdings gering. So konnte bei einer  $c_{AS}$  von 0,1 M eine maximale Sättigungsbeladung von 7,9 mg mL<sup>-1</sup> festgestellt werden,  $\Delta q_\Phi$  betrug allerdings nur 1,8 mg mL<sup>-1</sup>. Im Falle einer konstanten  $c_{AS}$  von 0,3 M verhielt sich dies ähnlich. Einer maximalen Sättigungsbeladung von 7,5 mg mL<sup>-1</sup> steht ein sehr geringes  $\Delta q_\Phi$  von lediglich 0,3 mg mL<sup>-1</sup> gegenüber. Bei konstanter Ammoniumsulfatkonzentration von 0,5 M konnte ein maximaler Wert für  $q_{max}$  von 10,6 mg mL<sup>-1</sup> beobachtet werden.  $\Delta q_\Phi$  betrug in

diesem Falle  $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ , wobei die Differenz zwischen  $25^\circ\text{C}$  und  $40^\circ\text{C}$  lediglich  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  BSA betrug.

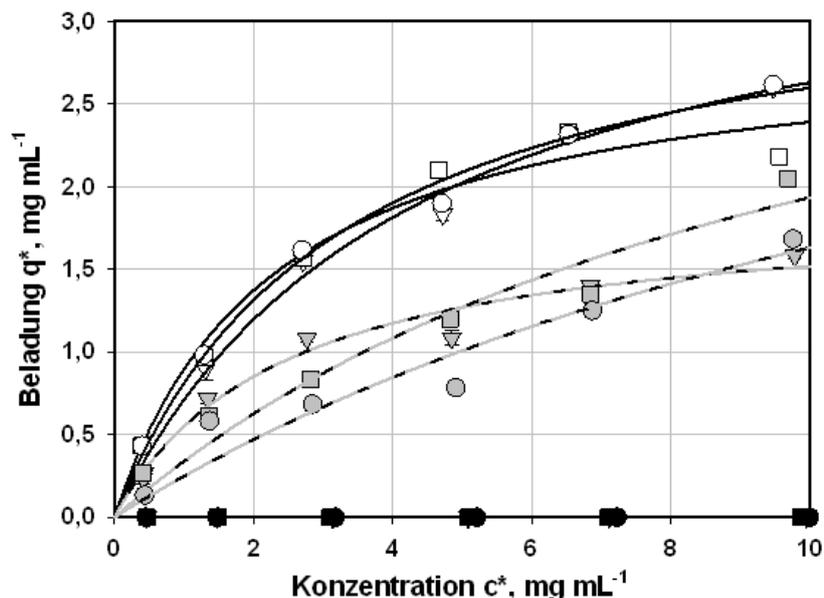


**Abbildung 6-2:** Isothermen der Adsorption von BSA auf Octyl Sepharose 4 FF bei verschiedenen Temperaturen (Kreise:  $40^\circ\text{C}$ ; Quadrate:  $25^\circ\text{C}$ ; Dreiecke:  $10^\circ\text{C}$ ) und Konzentrationen an Ammoniumsulfat (weiß:  $0,5 \text{ M}$ ; grau:  $0,3 \text{ M}$ ; schwarz:  $0,1 \text{ M}$ ). Die Linien entsprechen der Anpassungsfunktionen nach Langmuir (schwarz:  $0,5 \text{ M}$ ; grau-schwarz:  $0,3 \text{ M}$ ; grau gestrichelt:  $0,1 \text{ M}$ ).

Im Gegensatz zu Octyl Sepharose 4 FF konnte auf den mit dem aromatischen Phenyl-Ring oberflächenmodifizierten Partikeln Phenyl Sepharose 6 FF (low sub) nur eine geringe Proteinbindung nachgewiesen werden. Im Falle einer geringen  $c_{\text{AS}}$  von  $0,1 \text{ M}$  erfolgte im verwendeten Temperaturbereich überhaupt keine Bindung. Phenyl Sepharose 6 FF (low sub) zeigte insgesamt die geringsten Beladungen mit BSA unter den vier untersuchten HIC-Sorbentien.

**Tabelle 6-3:** Adsorptionsparameter  $q_{\text{max}}$  und  $K_D$  der Adsorption von BSA auf Phenyl Sepharose 6 FF (low sub) im untersuchten Bereich von  $\Phi= 10\text{-}40^\circ\text{C}$  und  $c_{\text{AS}}= 0,1\text{-}0,5 \text{ M}$ .

$\Phi, ^\circ\text{C}$	$q_{\text{max}}, \text{mg mL}^{-1}$			$K_D, \text{mg mL}^{-1}$		
	$c_{\text{AS}}, \text{M}$			$c_{\text{AS}}, \text{M}$		
	0,1	0,3	0,5	0,1	0,3	0,5
10	0	1,9	3,8	0	2,4	4,3
25	0	4,1	2,9	0	1,1	2,3
40	0	4,3	3,4	0	1,6	3,2

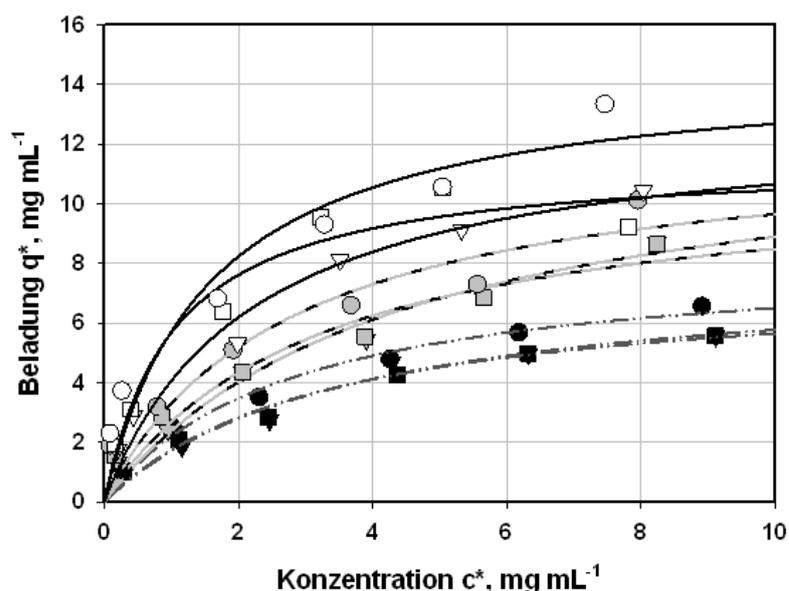


**Abbildung 6-3: Isothermen der Adsorption von BSA auf Phenyl Sepharose 6 FF (low sub) bei verschiedenen Temperaturen (Kreise: 40°C; Quadrate: 25°C; Dreiecke: 10°C) und Konzentrationen an Ammoniumsulfat (weiß: 0,5 M; grau: 0,3 M; schwarz: 0,1 M). Die Linien entsprechen der Anpassungsfunktionen nach Langmuir (schwarz: 0,5 M; grau-schwarz: 0,3 M; grau gestrichelt: 0,1 M).**

Dies steht in leichtem Kontrast zur Publikation von Chen et al. [151], in welcher eine maximale Sättigungsbeladung von etwa  $9 \text{ mg mL}^{-1}$  bei einer  $c_{AS}$  von 0,5 M und einer Systemtemperatur von  $20^\circ\text{C}$  berichtet wird. Dabei wurde allerdings humanes Serumalbumin anstelle von BSA verwendet. Im hier beschriebenen Fall konnte bei leicht erhöhter  $c_{AS}$  von 0,3 M eine maximale Sättigungsbeladung von  $4,3 \text{ mg mL}^{-1}$  festgestellt werden. Zudem war keine klare Abhängigkeit der Temperatur feststellbar. Da im Falle einer  $c_{AS}$  von 0,3 M im untersuchten Bereich eine lineare Zunahme der Gleichgewichtsbeladung bis zu einer Gleichgewichtskonzentration von  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  beobachtet wurde, resultierte dies in vergleichsweise hohen theoretischen  $q_{\text{max}}$ -Werten. Dessen ungeachtet konnten für die BSA-Adsorption auf Phenyl Sepharose 6 FF (low sub) generell nur geringe Werte für  $\Delta q_\phi$  bestimmt werden. Mit den hier ermittelten Daten betragen diese bei einer  $c_{AS}$  von 0,3 M  $2,4 \text{ mg mL}^{-1}$  und bei 0,5 M AS nur  $0,9 \text{ mg mL}^{-1}$ .

**Tabelle 6-4: Adsorptionsparameter  $q_{\max}$  und  $K_D$  der Adsorption von BSA auf Phenyl Sepharose 6 FF (high sub) im untersuchten Bereich von  $\Phi= 10-40^\circ\text{C}$  und  $c_{\text{AS}}= 0,1-0,5 \text{ M}$ .**

$\Phi, ^\circ\text{C}$	$q_{\max}, \text{mg mL}^{-1}$			$K_D, \text{mg mL}^{-1}$		
	$c_{\text{AS}}, \text{M}$			$c_{\text{AS}}, \text{M}$		
	0,1	0,3	0,5	0,1	0,3	0,5
10	7,9	12,8	13,0	3,6	4,4	2,2
25	7,5	11,2	12,2	3,3	3,2	1,4
40	8,3	12,3	14,7	2,8	2,7	1,6



**Abbildung 6-4: Isothermen der Adsorption von BSA auf Phenyl Sepharose 6 FF (high sub) bei verschiedenen Temperaturen (Kreise:  $40^\circ\text{C}$ ; Quadrate:  $25^\circ\text{C}$ ; Dreiecke:  $10^\circ\text{C}$ ) und Konzentrationen an Ammoniumsulfat (weiß:  $0,5 \text{ M}$ ; grau:  $0,3 \text{ M}$ ; schwarz:  $0,1 \text{ M}$ ). Die Linien entsprechen der Anpassungsfunktionen nach Langmuir (schwarz:  $0,5 \text{ M}$ ; grau-schwarz:  $0,3 \text{ M}$ ; grau gestrichelt:  $0,1 \text{ M}$ ).**

Chen et al. [87] berichten, dass eine Zunahme der Ligandendichte bei Verwendung der gleichen chromatographischen Basispartikel in einer stärkeren Proteinadsorption während der HIC resultiert. Das untersuchte Sorbens Phenyl Sepharose 6 FF (high sub) zeigte dementsprechend auch deutlich höhere Beladungswerte als das zuvor beschriebene und mit geringerer Ligandendichte ausgestattete Sorbens Phenyl Sepharose 6 FF (low sub). Darüber hinaus zeigte

Phenyl Sepharose 6 FF (high sub) generell die höchsten Adsorptionswerte von BSA unter den untersuchten Sorbenskandidaten. Die maximale Sättigungsbeladung ergab sich für eine Temperatur von 40°C und  $c_{AS}$  von 0,5 M zu 14,7 mg mL<sup>-1</sup>. Eine Sättigungsbeladung von 7,9 mg mL<sup>-1</sup> wurde bei 0,1 M Ammoniumsulfat in der mobilen Phase und nur 10°C Systemtemperatur gemessen. Selbst diese minimale Sättigungsbeladung war höher als die maximal ermittelten Beladungen für Butyl Sepharose 4 FF und Phenyl Sepharose 6 FF (low sub). Vergleicht man die Sättigungsbeladungen bei konstanter Salzkonzentration und zunehmender Temperatur miteinander, so ist kein klarer Trend feststellbar. Die Adsorption bei 25°C ist geringer als im Falle der Adsorption bei 10°C und steigt dann wieder an bei 40°C. Obwohl hohe Adsorptionswerte erreicht werden konnten, waren die Werte für  $\Delta q_{\phi}$  relativ gering. Maximal 1,7 mg mL<sup>-1</sup> betrug der temperaturabhängige Beladungsunterschied bei einer  $c_{AS}$  von 0,5 M, was dieses Material unattraktiv für temperaturkontrollierte Adsorptionsstudien macht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Ligandentyp und Ligandendichte verantwortlich für große Unterschiede bei der Proteinadsorption während der HIC sind. Bei Verwendung gleicher Basispartikel wird generell eine stärkere Proteinadsorption für aromatische Liganden als für Alkyliliganden erwartet [87]. Dies konnte für die in dieser Arbeit verwendeten Sorbentien im untersuchten Messbereich bestätigt werden. Die höchsten Adsorptionsparameter konnten für die stark substituierten Phenylliganden festgestellt werden, anschließend folgten die Alkyliliganden in der Reihenfolge abnehmender Hydrophobizität, erst Oktyl, dann Butyl. Die schwächste Adsorption zeigten schwach substituierte Phenylliganden. Zur quantitativen Bewertung der Temperaturabhängigkeit der Proteinadsorption eines Sorbens spielt aber vor allem der Parameter  $\Delta q_{\phi}$  die entscheidende Rolle. Dieser Wert entspricht der Menge an Protein, die bei ansonsten konstanten Rahmenbedingungen allein aufgrund von Temperaturvariationen eluierbar ist. Hohe Werte dieses Parameters sind daher für vertiefende Untersuchungen der temperaturgesteuerten Proteinadsorption auf HIC-Materialien erwünscht. Die höchsten Werte für  $\Delta q_{\phi}$  wurden in dieser Arbeit für Butyl Sepharose 4 FF nachgewiesen. Dieses Sorbens wurde daher für alle weiteren Untersuchungen zum Temperatureffekt während der Proteinadsorption ausgewählt. Interessanterweise ist der verwendete C4-Ligand auch der am schwächsten hydrophobe Ligand unter den untersuchten. Offensichtlich liegt daher ein Zusammenhang zwischen zunehmender Stärke des Temperatureffekts und abnehmender Hydrophobizität vor.

## 6.1.2 Thermodynamische Analyse der Adsorption von BSA auf HIC-Sorbentien

Die festgestellten Adsorptionsunterschiede bei Verwendung unterschiedlicher Versuchstemperaturen wurden durch Berechnung der thermodynamischen Parameter  $\Delta H$  und  $\Delta S$  analysiert. Da für Ammoniumsulfatkonzentrationen von 0,1 M keine oder nur geringe Adsorptionswerte bestimmt wurden, sind in Tabelle 6-5 nur die nach Gleichung 2-29 berechneten Werte bei einer  $c_{AS}$  von 0,3 M und 0,5 M aufgeführt. Die benötigten Kapazitätsfaktoren wurden entsprechend Gleichung 2-14 aus den zuvor aufgenommenen Adsorptionsisothermen (vgl. Abschnitt 6.1.1) bestimmt.

**Tabelle 6-5: Änderung der thermodynamischen Parameter  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  und  $\Delta G$  bei der Adsorption von BSA auf verschiedenen HIC-Sorbentien bei unterschiedlichen Temperaturen und Konzentrationen von Ammoniumsulfat.**

HIC Sorbens	$c_{AS}$ , mol L <sup>-1</sup>	$\Delta H$ , kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta S$ , J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>	$\Delta G$ (10°C), kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta G$ (40°C), kJ mol <sup>-1</sup>
Butyl Sepharose 4 FF	0,3	52,2	179,1	1,49	-3,88
	0,5	54,31	191,19	0,18	-5,56
Octyl Sepharose 4 FF	0,3	11,95	56,11	-3,94	-5,62
	0,5	12,29	61,74	-5,19	-7,04
Phenyl Sepharose 6 FF (low sub)	0,3	30,78	109,15	-0,13	-3,4
	0,5	18,94	65,72	0,33	1,64
Phenyl Sepharose 6 FF (high sub)	0,3	10,98	47,52	-2,48	-3,9
	0,5	10,97	53,94	-4,3	-5,92

Die Berechnung der Parameter  $\Delta H$  und  $\Delta S$  wurde in allen Fällen entsprechend der Ausführungen in Kapitel 2.4 vorgenommen. Mit der Ausnahme Phenyl Sepharose 6 FF (low sub) konnte in allen Fällen eine weitestgehend lineare Abhängigkeit innerhalb der Auftragung festgestellt werden. Phenyl Sepharose 6 FF (low sub) ist aufgrund seiner geringen Adsorption ohnehin gesondert zu betrachten, wurde zur Auswertung jedoch identisch zu den anderen drei Sorbentien behandelt. Die Bestimmtheitsmaße der Linearisierung wurden im Falle von Butyl Sepharose 4 FF > 0,99, im Falle von Octyl Sepharose 4 FF > 0,94 und im Falle von Phenyl Sepharose 6 FF (high sub) > 0,86 bestimmt. In dieser Arbeit wurden diese Daten als vernachlässigbare Abweichungen zum

Idealfall 1 interpretiert und entsprechend der Erläuterung in Kapitel 2.4 konnte daraufhin in allen drei Fällen das Modell zur Bestimmung temperaturunabhängiger Parameter  $\Delta H$  und  $\Delta S$  angewendet werden. Dies steht konträr zu den Aussagen innerhalb der Publikationen von Haidacher et al. [82], Xia et al. [88] und Überbacher et al. [86], die eine Temperaturabhängigkeit der Parameter beschrieben. Eine Erklärung dafür ist, dass in den beschriebenen Arbeiten jeweils Systeme betrachtet wurden, bei denen deutlich höhere Konzentrationen an kosmotropen Salzen in der mobilen Phase verwendet wurden und bei diesen Umgebungsbedingungen tatsächlich eine starke Temperaturabhängigkeit vorliegt.

Erneut mit der Ausnahme von Phenyl Sepharose 6 FF (low sub), konnten in allen weiteren Fällen nahezu konstante Werte für  $\Delta H$  und nur eine leichte Zunahme von  $\Delta S$  mit zunehmender  $c_{AS}$  bestimmt werden. Die höchsten Werte für  $\Delta S$  und daher auch die maximalen Unterschiede bei Variation der Temperatur wurden für Butyl Sepharose 4 FF festgestellt. Aus den so ermittelten Werten konnte mittels Gleichung 2-27 die Differenz der freien Energie  $\Delta G$  bei unterschiedlichen Temperaturen 10°C und 40°C bestimmt werden. Für Octyl Sepharose 4 FF und Phenyl Sepharose 6 FF (high sub) resultierten hierbei die am stärksten negativen Werte, was gleichzeitig auch mit den höchsten Bindekapazitäten dieser Sorbentien korrespondiert. Die Differenz der Werte für  $\Delta G$  bei den untersuchten Temperaturen war allerdings in beiden Fällen relativ gering, maximal 1,68 kJ mol<sup>-1</sup> für Octyl Sepharose 4 FF bei 0,3 M Ammoniumsulfat und 1,62 kJ mol<sup>-1</sup> für Phenyl Sepharose 6 FF (high sub) bei einer  $c_{AS}$  von 0,5 M. Aufgrund der maximalen Unterschiede von  $\Delta S$ , konnten auch maximale Differenzen für die entsprechenden  $\Delta G$ -Werte während der Proteinadsorption auf Butyl Sepharose 4 FF festgestellt werden. Im untersuchten Temperaturbereich konnte zudem ein Vorzeichenwechsel von positiv nach negativ mit zunehmender Temperatur bestimmt werden. Dies entspricht den Ergebnissen der zuvor vorgestellten Adsorptionsisothermen, bei denen nahezu keine Proteinbindung bei 10°C vorlag, wohingegen BSA bei 40°C deutlich stärker gebunden wurde. Es bleibt festzuhalten, dass die hier vorgestellte van't-Hoff-Analyse für sich alleine oder in Kombination mit der Erstellung von Adsorptionsisothermen gut geeignet ist, um nach HIC-Sorbentien mit stark temperaturabhängigem Proteinadsorptionsverhalten zu screenen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass hierbei der Unterschied der Entropie  $\Delta S$  von ausschlaggebender Bedeutung ist, da er die Werte von  $\Delta G$  maßgeblich beeinflusst und im Gegensatz zu  $q_{max}$ -Werten direkte Rückschlüsse auf die Temperaturabhängigkeit erlaubt. Zusätzlich konnte anhand des Sorbens Butyl Sepharose 4 FF gezeigt werden, dass der Temperaturbereich einer temperaturkontrollierten HIC so eingestellt werden sollte, dass es zu einem Vorzeichenwechsel von  $\Delta G$  kommt, wenn zwischen erhöhter und niedriger Temperatur

gewechselt wird. Dabei ist allerdings darauf zu achten, dass das verwendete Protein bei der erhöhten Temperatur noch stabil ist und nicht ausfällt.

### 6.1.3 Entfaltung von BSA auf Butyl Sepharose

Im vorigen Abschnitt wurde erläutert, dass über geschickte Wahl des Sorbens und der chromatographischen Betriebsbedingungen, wie Salzgehalt und Systemtemperatur, eine temperaturkontrollierte HIC optimiert werden kann. Um die Anwendbarkeit der aus Isothermendaten ermittelten Parameter auch für ihren praktischen Einsatz innerhalb der Säulenchromatographie zu verifizieren, wurden Versuche mit einer mit Butyl Sepharose 4 FF gefüllten HiScreen Butyl FF Säule durchgeführt. Dabei wird im Folgenden vor allem auf den Einfluss der Entfaltung und teilweisen Denaturierung von Proteinen während der Adsorption auf HIC-Sorbentien und in Abhängigkeit der  $c_{AS}$  und der Temperatur eingegangen.

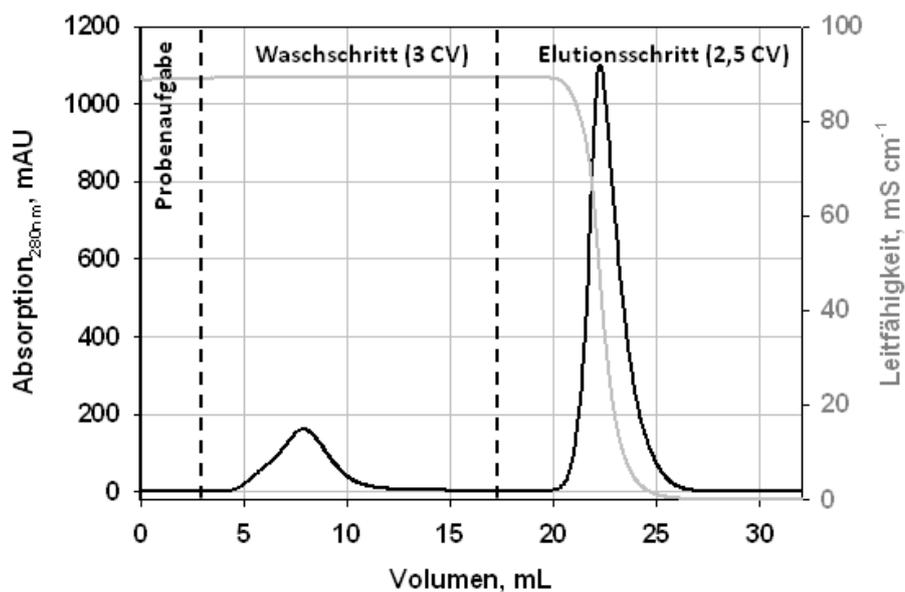
**Tabelle 6-6: Werte der experimentell ermittelten und aus Isothermendaten berechneten EBC im Temperaturbereich von 10°C bis 40°C und in Phosphatpuffer mit Konzentrationen an Ammoniumsulfat von 0,1 M, 0,3 M und 0,5 M.**

		$c_{AS}, M$		
		0,1	0,3	0,5
EBC, mg mL <sup>-1</sup> (experimentell)	10°C	0	0,47	1,27
	25°C	0,49	1,32	3,61
	40°C	1,59	3,41	6,00
EBC, mg mL <sup>-1</sup> (berechnet)	10°C	0	0,8	2,58
	25°C	0,36	2,61	3,87
	40°C	2,05	5,5	6,14

Zunächst wurde hierbei entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 5.7.2 die EBC experimentell ermittelt. Wie erwartet konnte mit zunehmender Temperatur und Konzentration an Ammoniumsulfat hierbei auch eine deutliche Zunahme festgestellt werden. Entsprechend Tabelle 6-1 konnten jedoch die aus den Isothermenparametern  $q_{max}$  und  $K_D$  berechneten Gleichgewichtswerte bei einer BSA-Konzentration von 7,5 mg mL<sup>-1</sup> und den entsprechenden Systembedingungen nie erreicht werden. Teilweise konnte nur die Hälfte der theoretisch erzielbaren Beladung erreicht werden. Dieser Unterschied kann in gewissen Grenzen durch den

dynamischen Charakter der experimentellen Bestimmung der EBC erläutert werden, wodurch nur schwer vollständige Gleichgewichtsbedingungen erreicht werden können. Allerdings erklärt dies nicht, dass vor allem unter schwachen Bindebedingungen (niedrige Temperatur und niedrige Salzkonzentration) große Unterschiede auftraten, wohingegen bei starken Bindebedingungen ( $c_{AS}=0,5M$ ,  $\Phi=25^{\circ}C$  oder  $40^{\circ}C$ ) nahezu übereinstimmende Werte zwischen Experiment und Berechnung festgestellt werden konnten. Unter der Annahme, dass sich sowohl während der Isothermenversuche als auch während der experimentellen Bestimmung der EBC ein Gleichgewichtszustand einstellte, konnte der in den Experimenten durchgeführte Waschschrift nach Erreichen eines stabilen Plateauwertes als einziger Unterschied identifiziert werden. Ursache ist eine zu geringe Proteinbindungsaffinität unter schwachen Bindebedingungen, wodurch ein substantieller Anteil an zuvor schwach gebundenem Protein von der Säule gespült wird.

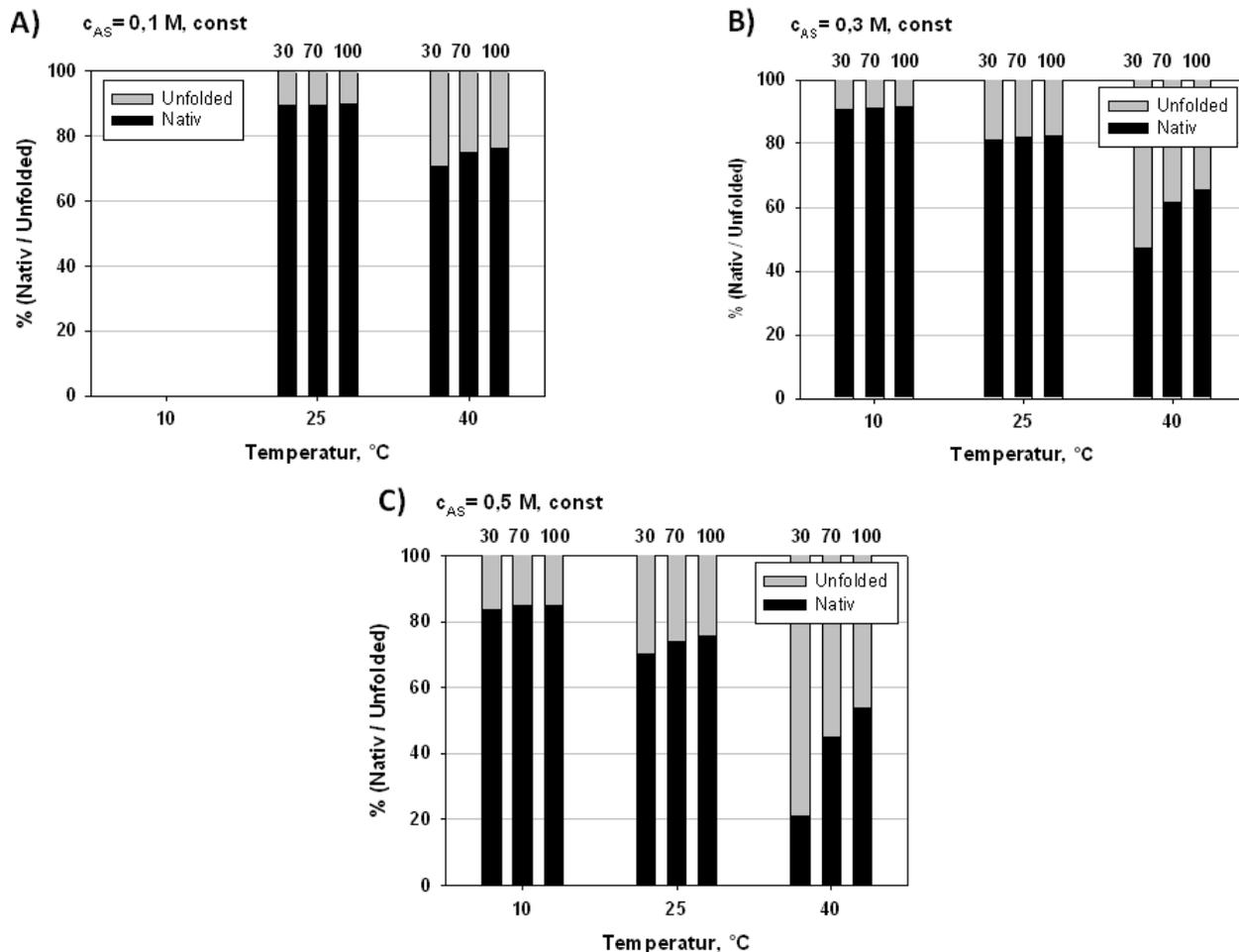
Um ein tieferes Verständnis dieses Zusammenhangs zu erhalten, wurden Pulsantwortexperimente (vgl. Abschnitt 5.7.3) durchgeführt, bei denen  $c_{AS}$  und  $\Phi$  variiert wurden, die Säule aber nur mit definierten Volumina an Proteinlösung gleicher Konzentration, also nicht bis zur vollständigen Sättigung, beladen wurde. Die Menge an aufgebener BSA-Lösung entsprach dabei jeweils definierten Prozentsätzen (30 %, 70 % und 100 %) der zuvor experimentell ermittelten EBC. In Abbildung 6-5 ist exemplarisch ein resultierendes Chromatogramm dargestellt, bei dem  $c_{AS} = 0,5$  M und  $\Phi = 40^{\circ}C$  betrug und 30% des zuvor ermittelten EBC injiziert wurden (hier: 8,46 mg in 1,15 mL Probenvolumen).



**Abbildung 6-5: Chromatogramm der Bindung und Elution von BSA auf einer HiScreen Butyl FF Säule. Der verwendete 50 mM Phosphatpuffer hatte eine  $c_{AS}$  von 0,5 M, die Systemtemperatur betrug  $\Phi=40^\circ\text{C}$ . Dargestellt sind die drei Abschnitte des Versuchs sowie der Verlauf des UV-Signals (schwarze Linie) und der Verlauf der Leitfähigkeit (graue Linie).**

Wie im Chromatogramm ersichtlich, entstehen im Experiment zwei Proteinpeaks mit unterschiedlich großen Peakflächen. Während der isokratischen Betriebsweise der Säule läuft demnach ein Teil des BSA bereits nach weniger als 3 CV nach Probenaufgabe weitestgehend unretardiert durch die Säule. Das restliche BSA kann anschließend erst durch Reduktion der Konzentration an Ammoniumsulfat desorbiert und eluiert werden. Das Resultat legt den Verdacht nahe, dass BSA auf zwei unterschiedlichen Wegen an Butyl Sepharose bindet und ein Anteil des aufgegebenen BSA entsprechend der Umgebungsbedingungen zu einem Unfolding neigt. Dieser Effekt von BSA während der Adsorption auf HIC-Sorbentien wurde bereits in anderen Publikationen beschrieben [45, 84]. Während natives Protein kaum retardiert wird, bindet das entfaltete Protein auf der hydrophoben Oberfläche und kann erst unter Elutionsbedingungen eluiert werden. Im Gegensatz zu den hier dargestellten Pulsantwortexperimenten, konnte dieser Effekt weder bei der Ermittlung von Adsorptionsisothermen, noch bei der Ermittlung der EBC-Daten bei vollständiger Sättigung der Säule festgestellt werden.

Abbildung 6-6 stellt die Menge an nativem und entfaltetem Protein bei konstanter  $c_{AS}$  von 0,1 M, 0,3 M und 0,5 M und Variationen der Temperaturen (unterhalb des jeweiligen Diagramms) und der Menge des Injektionspulses ausgedrückt (als Anteil der EBC, oberhalb des Diagramms) dar. Die Prozentangaben an nativem und entfaltetem Protein entsprechen dabei jeweils prozentual der Peakfläche während des ersten bzw. zweiten Elutionspeaks in den Versuchen. Da entsprechend der in Tabelle 6-6 dargestellten Ergebnisse im Falle einer  $c_{AS}$  von 0,1 M und  $\Phi=10^\circ\text{C}$  keinerlei BSA-Adsorption festgestellt werden konnte, wurde dieser Fall nicht weiter untersucht und ist im Diagramm nicht angegeben. In diesem Fall ist allerdings unabhängig von der Injektionsmenge mit 100 % nativem Protein zu rechnen. In allen anderen Fällen konnte festgestellt werden, dass ein gewisser Prozentsatz an Protein zum Unfolding während oder kurz nach seiner Adsorption neigt. Der Anteil an entfaltetem Protein stieg sowohl bei Zunahme der Konzentration an Ammoniumsulfat als auch bei Erhöhung der Temperatur. Bei  $\Phi=25^\circ\text{C}$  variierte der Anteil an entfaltetem Protein zwischen etwa 10 % bei einer  $c_{AS}$  von 0,1 M bis maximal etwa 25-30 % bei 0,5 M. Diese Werte entsprechen in etwa den Werten der Adsorption von BSA auf Butyl-S-Sepharose. Hierbei konnten 5 % entfaltetes Protein bei einer  $c_{AS}$  von 0,1 M und 30-35 % bei einer  $c_{AS}$  von 0,5 M festgestellt werden [45].



**Abbildung 6-6:** Darstellung der Fraktionen an nativem und entfaltetem BSA nach Pulsantwortexperimenten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ammoniumsulfat in der mobilen Phase und unterschiedlichen Systemtemperaturen. Die Zahlen oberhalb der Balken repräsentieren das Volumen des aufgegebenen Injektionspulses, prozentual dargestellt als Anteil der zuvor experimentell ermittelten Menge der EBC bei den entsprechenden Bedingungen. Im Falle von  $c_{AS}=0,1 \text{ M}$  und  $\Phi=10^\circ\text{C}$  wurde keinerlei Adsorption festgestellt. (A) Konstante  $c_{AS}$  von  $0,1 \text{ M}$ ; (B) Konstante  $c_{AS}$  von  $0,3 \text{ M}$ ; (C) Konstante  $c_{AS}$  von  $0,5 \text{ M}$ .

In allen Fällen der Verwendung einer Temperatur von  $10^\circ\text{C}$  oder  $25^\circ\text{C}$  war kein signifikanter Unterschied der Menge an entfaltetem Protein durch Variation der Injektionsmenge zu erkennen. Im Falle einer Temperatur von  $40^\circ\text{C}$  änderte sich dies und kleinere Mengen an aufgegebenem Injektionsvolumen führten zu mehr entfaltetem Protein. Dies liegt aller Wahrscheinlichkeit nach daran, dass bei den vergleichsweise hohen Beladungsmengen bei einer Systemtemperatur von  $40^\circ\text{C}$  kinetische Massentransportlimitierungen ins Spiel kommen. Speziell im Falle großer Aufgabemengen von 70% oder 100% des EBC kommt daher ein Teil des BSA überhaupt nicht in

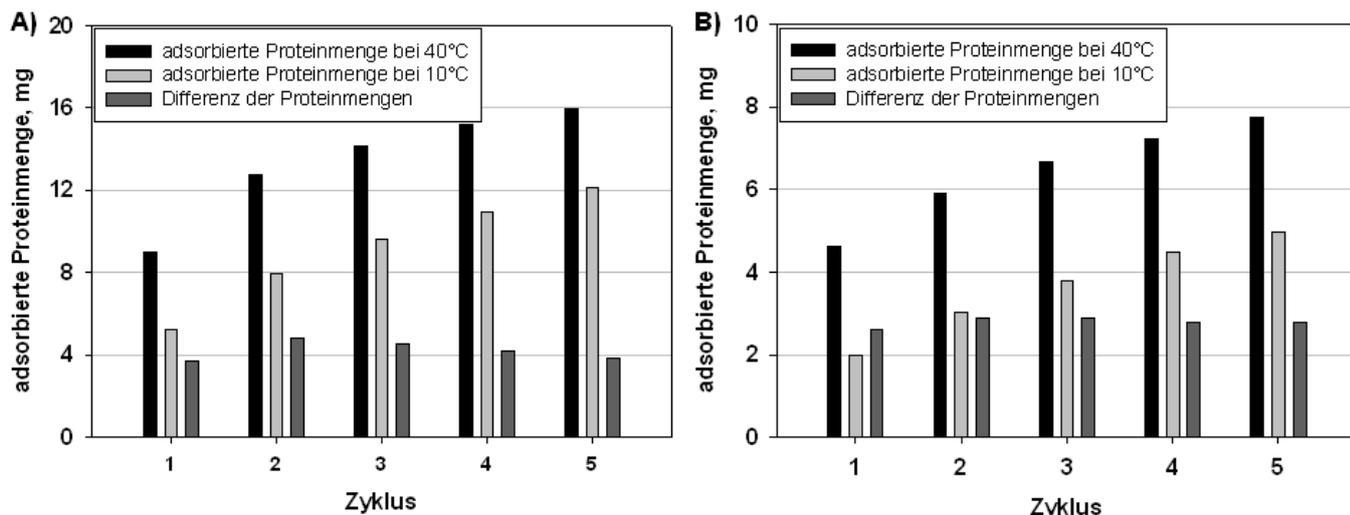
Kontakt mit dem Sorbens, läuft ungehindert durch die Säule und erhöht somit die Fraktion an nativem BSA.

Die dargestellten Ergebnisse machen deutlich, dass die Temperaturabhängigkeit des Proteinunfolding auch ausschlaggebend für die Temperaturabhängigkeit der Adsorption von BSA auf HIC-Sorbentien ist und dass die Adsorption durch eine Temperaturerhöhung deutlich gesteigert werden kann. Ähnliche Tendenzen wie in dieser Arbeit konnten in weiteren isokratischen Chromatographiestudien der Adsorption von BSA auf Butyl-FF-Sepharose bei Temperaturen im Bereich von 5°C bis 25°C nachgewiesen werden [84]. Die genauen Mechanismen der Elution von zuvor entfaltetem BSA auf HIC-Sorbentien durch Absenkung der Temperatur sind nicht vollständig geklärt. Sollte BSA in seiner entfalteten Form eluiert werden und aufgrund des Verlustes seiner biologischen Aktivität anschließend nicht mehr geeignet für eine spätere Anwendung sein, wäre die Entwicklung temperaturkontrollierter HIC-Prozesse durch Limitierungen des erlaubten Temperaturfensters deutlich eingeschränkt. Vermutlich kommt es aber zu einer Rückfaltung der stark gebundenen Proteinfraktion und einer resultierenden Desorption dann wieder nativen Proteins; Modelle für beide Theorien wurden erstellt, wobei nur im zweiten Fall der BSA-Rückfaltung eine Übereinstimmung mit experimentell ermittelten Chromatogrammen gezeigt werden konnte [84]. Die Umgebungsbedingungen einer temperaturkontrollierten Chromatographie müssen in diesem Falle so gewählt werden, dass allein durch Wechsel der Temperatur ein möglichst großer  $\Delta q_0$  realisiert werden kann. Einschränkend muss erwähnt werden, dass in diesem Abschnitt ausschließlich die Temperaturabhängigkeit von BSA als Modellprotein untersucht wurde. In der Literatur findet sich ein allgemeiner Zusammenhang zwischen dem Parameter der adiabatischen Proteinkompressibilität und einer zunehmenden Tendenz zum Entfalten auf HIC-Sorbentien [152]. Ob aber ein genereller Zusammenhang zwischen der Tendenz eines Proteins zum Unfolding und seiner Temperaturabhängigkeit während der HIC existiert, liegt außerhalb des Rahmens dieser Studie.

#### **6.1.4 Temperaturinduzierte Säulenregeneration**

Das folgende Kapitel befasst sich mit der Regeneration von zuvor beladenen Sorbens auf rein physikalischem Wege. Anstelle der konventionellen Regenerierung von Trennsäulen mit chemischen Elutionsmitteln wie Ethanol oder Natronlauge, wird in den folgenden Fällen erneut die Temperatur als maßgeblicher Faktor tiefergehend untersucht.

Aus den vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass nach vorheriger BSA-Adsorption bei 40°C keine vollständige Proteinelution bei einer Elutionstemperatur von  $\Phi=10^\circ\text{C}$  möglich ist. Neben der grundsätzlichen Möglichkeit der temperaturinduzierten Regeneration wurde daher auch untersucht, ob es im Rahmen der in Abschnitt 5.7.4 vorgestellten Versuchsdurchführung zu etwaigen Proteinakkumulationen durch fünffache Wiederholung der Adsorptions-/Desorptionszyklen kommt.



**Abbildung 6-7: Fünf Zyklen eines auf Temperaturunterschieden basierenden BSA Adsorptions-/Desorptionsprozesses. In beiden Diagrammen repräsentieren die schwarzen Balken die adsorbierte Proteinmenge im Adsorptionsschritt bei 40°C, während die hellgrauen Balken die adsorbierte Menge nach Desorption bei 10°C bezeichnet. Der eigentliche Arbeitsbereich ist als Differenz der Beladungsmengen für jeden Schritt als dunkelgraue Balken dargestellt. Die verwendete mobile Phase hatte eine konstante Konzentration an Ammoniumsulfat von (A)  $c_{AS}=0,5\text{ M}$ ; (B)  $c_{AS}=0,3\text{ M}$ .**

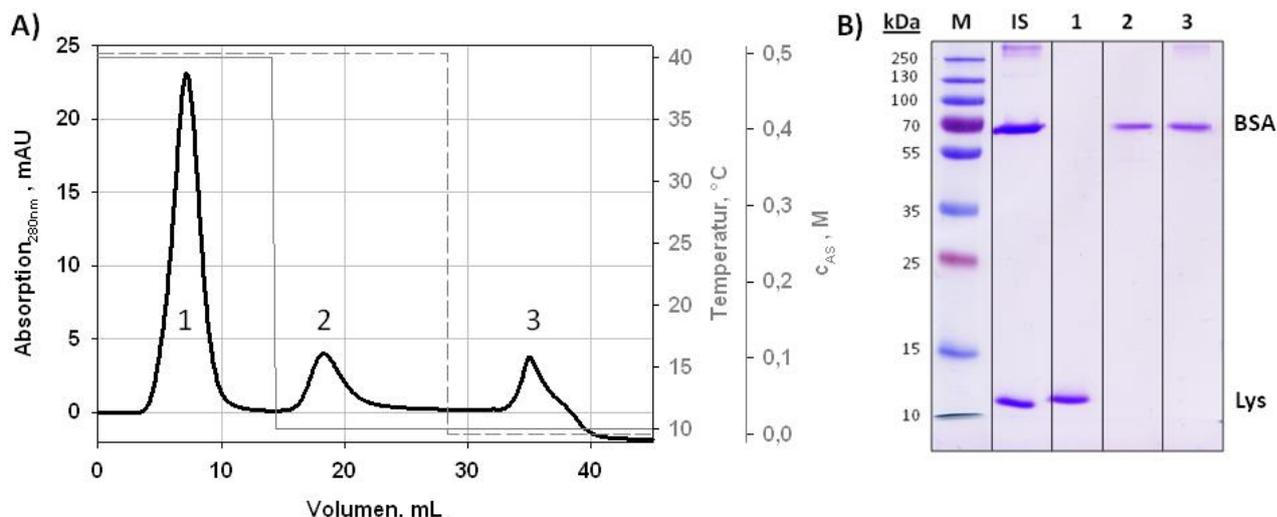
Die Menge an auf die Säule aufgegebenem BSA beträgt pro Zyklus 15 mg. Bezogen auf das Säulenvolumen der verwendeten Säule entspricht dies  $3,2\text{ mg mL}^{-1}$ . Im Falle der  $c_{AS}$  von 0,3 M korrespondiert dies mit nahezu 100 % des EBC, im Falle von 0,5 M etwa 50 % des EBC (vgl. Tabelle 6-6). Verglichen mit den in Abbildung 6-6 dargestellten Ergebnissen sollten sich demnach 35 % ( $c_{AS}=0,3\text{ M}$ ) bzw. 70 % ( $c_{AS}=0,5\text{ M}$ ) des aufgegebenen BSA auf der Oberfläche entfalten und unter isokratischen Bedingungen permanent adsorbieren, während der Anteil an nativem Protein während des Waschschrtes eluiert wird. Für den ersten Adsorptionsschritt sind somit etwa 5 mg ( $c_{AS}=0,3\text{ M}$ ) bzw. 10 mg ( $c_{AS}=0,5\text{ M}$ ) adsorbiertes BSA zu erwarten. Dies konnte mit den Ergebnissen des Experimentes und adsorbierten Mengen an BSA nach dem ersten Adsorptionsschritt von 4,6 mg und 9 mg (für  $c_{AS}=0,3\text{ M}$  bzw. 0,5 M) entsprechend der Darstellung in Abbildung 6-7 bestätigt werden. Betrachtet man den anschließenden Schritt der

Temperaturerniedrigung auf 10°C, so ist bei dieser Temperatur entsprechend der Daten aus Abbildung 6-6 mit etwa 10 % entfaltetem Protein bzw. 1,5 mg BSA bei einer  $c_{AS}$  von 0,3 M und 18 % bzw. 2,7 mg bei einer  $c_{AS}=0,5$  M zu rechnen. Diese Erwartungswerte sind geringer als die experimentell ermittelten Werte mit 2 mg bzw. 5,3 mg. Eine detaillierte Analyse dieses Phänomens wurde nicht durchgeführt. Es wird allerdings vermutet, dass die Rückfaltung durch einen einfachen Temperaturwechsel generell nicht im erwarteten Maße möglich ist. Entsprechend Abbildung 6-7 verhielt sich die verbleibende adsorbierte BSA-Fraktion in den folgenden vier Zyklen additiv. So waren 13 mg bei Verwendung einer mobilen Phase mit einer  $c_{AS}$  von 0,5 M nach dem zweiten Adsorptionsschritt gebunden, verglichen mit 9 mg nach dem ersten Schritt. Von den neu gebundenen 8,5 mg wurden daraufhin wieder etwa 4,5 mg desorbiert. Die Menge an BSA, die in allen Zyklen desorbiert werden konnte, blieb sowohl bei Verwendung von 0,3 M und 0,5 M Ammoniumsulfat weitgehend konstant (2,6-2,9 mg bzw. 3,7-4,8 mg).

Die Tatsache, dass nach jedem Zyklus eine konstante Zunahme der adsorbierten Menge an BSA ermittelt werden konnte zeigt, dass die Säule noch keinen stabilen und stationären Gleichgewichtszustand erreicht hat. Trotzdem ist mittels dieser Technik z.B. eine Aufreinigung einer nicht adsorbierenden und von der Temperatur unbeeinflussten Komponente denkbar, die während des Adsorptionsschrittes in gleichbleibender Konzentration im Effluenten erscheint, während die bindende und temperaturabhängige Komponente abgereichert und erst anschließend durch Temperaturerniedrigung eluiert wird. Zu bedenken ist allerdings, dass die erreichbare Beladungsdifferenz der bindenden Komponente mit etwa 0,58 (bei  $c_{AS}=0,3$  M) bzw. 1 mg pro mL CV (bei  $c_{AS}=0,5$  M) im betrachteten Fall doch sehr gering ist.

### 6.1.5 Temperaturinduzierte Proteinfractionierung

Unabhängig von der im vorigen Kapitel angesprochenen geringen Arbeitskapazität bieten temperaturabhängige chromatographische Trennmethode den Vorteil einer isokratischen Aufreinigung. Als Beispiel wird im Folgenden die Trennung eines binären Proteingemisches mittels temperaturgesteuerter HIC beschrieben



**Abbildung 6-8: (A) Chromatogramm (schwarze Linie) der temperaturinduzierten Proteinfractionierung. Die graue Linie markiert den Temperatursprung von 40°C auf 10°C, die graue gestrichelte Linie markiert die Elution der Säule mit 20% Ethanol. Die fraktionierten Proteinpeaks sind nummeriert; (B) SDS-PAGE (15%) der fraktionierten Proteinpeaks. M: Marker; IS: Ausgangslösung; 1: Eluiertes Protein während des Spülens der Säule mit reinem Bindepuffer; 2: Eluiertes Protein durch den Temperatursprung; 3: Eluiertes Protein nach Säulenregeneration mit 20% Ethanol.**

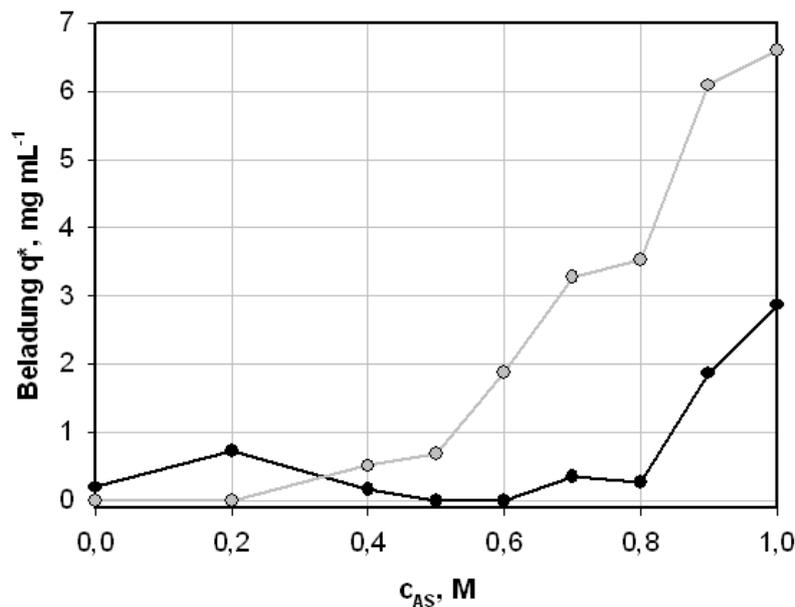
Entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 5.7.5 wurde die Trennung von BSA und Lysozym durchgeführt. Das kleine, rigide Protein Lysozym zeigt im Gegensatz zu BSA keinerlei Tendenzen zum Unfolding und läuft unter isokratischen Bedingungen ungebunden durch die Säule [152]. Aus Vorversuchen konnte im untersuchten Beobachtungsfenster auch keine Temperaturabhängigkeit der Adsorption von Lysozym auf Butyl Sepharose festgestellt werden. Abbildung 6-8A zeigt das entstehende Chromatogramm des Separationsexperimentes. Im Laufe des Versuchs waren drei Proteinpeaks zu beobachten. Der erste Proteinpeak erschien direkt nach Probenaufgabe während des Spülens der Säule mit reinem Bindepuffer bei einer Systemtemperatur von 40°C. Nach Absenken der Temperatur auf 10°C entstand Proteinpeak 2 und nach Wechsel der mobilen Phase auf die Elutionslösung 20% Ethanol entstand ein dritter Peak. Aufgrund verschiedener UV-Absorptionsverhalten des Phosphatpuffers und der Ethanollösung kam es sogar zu einem Abfall des UV-Signals unter einen Wert von 0 mAU. Zur Identifikation der eluierten Proteine wurden die drei Peaks fraktioniert und in einer SDS-PAGE entsprechend Abbildung 6-8B aufgetragen. Offensichtlich konnte unter den gegebenen Versuchsbedingungen mit geringeren Injektionsmengen als zuvor alles BSA bei  $\Phi=40^{\circ}\text{C}$  und  $c_{AS}=0,5$  M gebunden werden, ohne dass verfrühte Durchbrüche oder Auswascheffekte des BSA festgestellt werden konnten. Dies bestätigt die Daten aus Abbildung 6-6C, die zeigen, dass bei den eingestellten Umgebungsbedingungen eine

Reduktion des Injektionsvolumens zu einem höheren Anteil an entfaltetem BSA führt. Lysozym hingegen eluierte wie erwartet komplett während der isokratischen Spülung mit Bindepuffer (vgl. Bande 1). Durch Absenkung der Temperatur eluierte anschließend ein Teil des BSA (vgl. Bande 2). Zudem zeigte der entsprechende Elutionspeak leichtes Tailingverhalten, was für nicht ausreichende Elutionsbedingungen spricht. Unter chemischen Elutionsbedingungen konnte anschließend das restliche BSA eluiert werden (vgl. Bande 3). Vergleicht man die Bandenstärke der BSA-Fraktionen (Bande 2 und Bande 3) und die Flächen unter den entstehenden Chromatogrammen, ist festzustellen, dass etwa dieselbe Masse an BSA durch Temperaturerniedrigung bzw. chemische Elution eluierte. Dies entspricht den Beobachtungen aus Kapitel 6.1.4; hier konnte durch Temperaturerniedrigung bei einer  $c_{AS}$  von 0,5 M auch nur etwa 50 % des BSA eluiert werden.

Unterscheiden sich die zu trennenden Proteine in ihrem Temperaturverhalten wie im gezeigten Beispiel deutlich voneinander und reduziert man die Injektionsmengen, sodass möglichst keine bindende Proteinfraction eluiert, ist eine Trennung der Komponenten allein durch Temperaturunterschiede möglich. Eine komplette Elution der gebundenen Komponenten verlangt allerdings stärkere Elutionsbedingungen und konnte im vorliegenden Fall nur durch eine Änderung der mobilen Phase erreicht werden.

### **6.1.6 Optimierung des Temperatureinflusses der Proteinadsorption auf Butyl Sepharose**

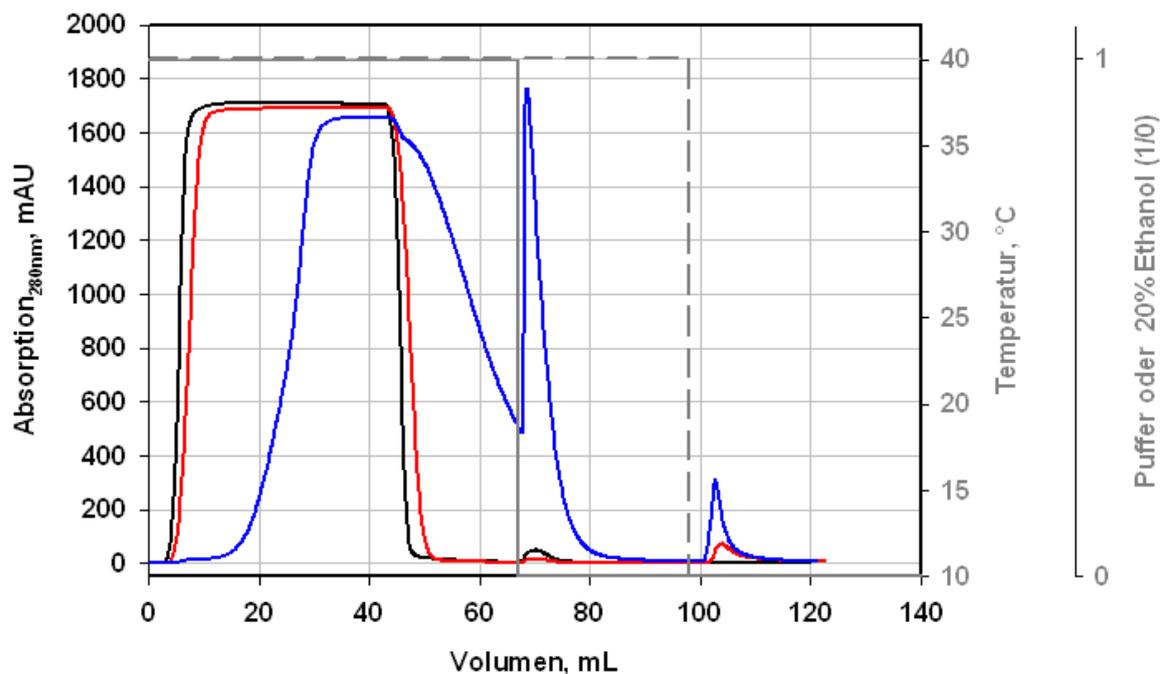
Die allein durch Temperaturwechsel erreichten Beladungsdifferenzen bei der Proteinadsorption auf HIC-Sorbentien sind aufgrund doch relativ schwacher temperaturinduzierter Elutionsbedingungen im untersuchten Bereich geringer Konzentrationen kosmotroper Salze nicht stark ausgeprägt. Zur effizienteren Nutzung und Erhöhung der Beladungsdifferenz bei hoher Adsorptionstemperatur und niedriger Elutionstemperatur wird im folgenden Abschnitt auf den zuvor bewusst weitgehend vernachlässigten synergistischen Effekt einer Erhöhung der Konzentration an kosmotropen Salzen eingegangen. Zunächst wurde in absatzweisen Versuchen entsprechend der Erläuterung aus Abschnitt 5.7.6 die Adsorption des Modellproteins  $\alpha$ -Chymotrypsinogen auf Butyl Sepharose bei Temperaturen von 10°C und 40°C und Konzentrationen von Ammoniumsulfat bis 1 M untersucht.



**Abbildung 6-9: Beladung von Butyl Sepharose 4 FF nach Adsorption einer Lösung von  $\alpha$ -Chymotrypsinogen ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) bei  $10^\circ\text{C}$  (schwarz) oder  $40^\circ\text{C}$  (grau) Systemtemperatur und unter Variation der Konzentration an Ammoniumsulfat ( $c_{AS}$ ) im verwendeten 50 mM Phosphatpuffer.**

Abbildung 6-9 zeigt das Ergebnis dieser Studie. Bei  $\Phi=10^\circ\text{C}$  kam es nahezu zu keiner Adsorption des Proteins bis zu einer  $c_{AS}$  von 0,8 M. Durch Erhöhung der Konzentration an Ammoniumsulfat auf 1 M war aber ein Anstieg auf etwa  $3 \text{ mg mL}^{-1}$  festzustellen. Bei einer Temperatur von  $\Phi=40^\circ\text{C}$  war bereits ab einer  $c_{AS}=0,4 \text{ M}$  eine deutliche Zunahme der Beladung zu erkennen, was auch den publizierten Ergebnissen aus einer Arbeit von Muca et al. [153] entspricht. Aus isokratischen Säulenexperimenten konnte in dieser Veröffentlichung eine deutliche Zunahme des Kapazitätsfaktors bei einer geringeren Systemtemperatur von  $25^\circ\text{C}$  ab einer  $c_{AS}$  von etwa 0,5 M festgestellt werden. Der Maximalwert wurde auch im vorliegenden Fall bei  $c_{AS}=1 \text{ M}$  mit  $6,6 \text{ mg mL}^{-1}$  gemessen. Der steilste Beladungsanstieg erfolgte im Bereich zwischen  $c_{AS}=0,8 \text{ M}$  und  $c_{AS}=0,9 \text{ M}$ . Durch die beiden unterschiedlichen Beladungsverläufe konnte nun festgestellt werden, dass sich die temperaturabhängige Arbeitskapazität, d.h. die Beladungsdifferenz zwischen Versuchen bei Adsorptions- und Elutionstemperatur durch Erhöhung der Ammoniumsulfatkonzentration im Falle des verwendeten Modellproteins tatsächlich erhöhen lässt. Ist bei 0 M Ammoniumsulfat keinerlei Unterschied feststellbar, so wuchs dieser Wert bei einer  $c_{AS}$  von 0,4 M bereits auf  $0,34 \text{ mg mL}^{-1}$  an und stieg bei einer maximalen Konzentration von Ammoniumsulfat von 1 M auf  $3,73 \text{ mg mL}^{-1}$ . Der maximale Unterschied konnte bei einer  $c_{AS}$  von 0,9 M mit  $4,2 \text{ mg mL}^{-1}$  festgestellt werden. Um zu überprüfen, ob diese Resultate auch auf Chromatographieversuche übertragen werden können, wurden unter Verwendung von Puffern

mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ammoniumsulfat ( $c_{AS}=0$ ; 0,4; 0,9 M) Chromatographieläufe entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 5.7.6 durchgeführt. Die resultierenden Chromatogramme sind in Abbildung 6-10 dargestellt.



**Abbildung 6-10: Chromatogramme der temperaturabhängigen HIC des Proteins  $\alpha$ -Chymotrypsinogen bei einer  $c_{AS}$  von 0 M (schwarz), 0,4 M (rot) oder 0,9 M (blau). Nach 40 mL Probenaufnahme wird die Säule für 28,2 mL mit reinem Puffer gewaschen. Die durchgezogene graue Linie stellt die Temperatursenkung auf 10°C dar, die gestrichelte graue Linie den abschließenden Wechsel auf Elutionspuffer (20 % Ethanol).**

Schon aus den Beladungsprofilen der Chromatogramme konnte geschlossen werden, dass das zugesetzte Salz einen deutlichen Einfluss auf die Temperaturabhängigkeit der Proteinadsorption hat. Ähnelten sich die Durchbruchkurven von  $c_{AS}=0$  M und  $c_{AS}=0,4$  M noch sehr, kam es aufgrund der erwarteten stärkeren Adsorption bei Verwendung einer  $c_{AS}$  von 0,9 M zu einem wesentlich späteren Durchbruch. Das Plateau wurde in allen Fällen erreicht, wobei aufgrund unterschiedlicher UV-Absorptionen der verwendeten Puffer nicht exakt die gleichen Absorptionswerte erreicht werden konnten. Im Falle der beiden Niedrigsalzversuche konnte im anschließenden Schritt schwach gebundenes Protein komplett ausgewaschen werden und das UV-Signal erreicht die Basislinie. Aufgrund starker Adsorption kam es bei 0,9 M Ammoniumsulfat zu einem typischen Tailingverhalten, da das adsorbierte Protein während des Waschschrtes eine langsame Elution zeigte. Nach dem Waschschrte mit einer Länge von 6 CV konnte in diesem Falle kein Rückgang des UV-Signals bis zur Basislinie beobachtet werden. Für die nachfolgend

angegebenen Mengenangaben des durch Temperaturerniedrigung eluierten Proteinanteils ist daher zu berücksichtigen, dass zumindest im Falle einer  $c_{AS}$  von 0,9 M auch schwächer gebundene Proteinanteile einbezogen werden. Dennoch konnte in allen Fällen durch Temperaturerniedrigung  $\alpha$ -Chymotrypsinogen eluiert werden. Mit ansteigender  $c_{AS}$  von 0 M, 0,4 M und 0,9 M betrug die eluierte Proteinmasse 0,3 mg, 0,13 mg bzw. 9,2 mg. Entsprechend der Beobachtungen aus den absatzweisen Versuchen konnte auch hier die deutlichste Zunahme der Arbeitskapazität bei Verwendung einer  $c_{AS}$  von 0,9 M beobachtet werden. Im Falle einer  $c_{AS}$  von 0 M entsprach die in diesem Schritt eluierte Menge der gesamten gebundenen Proteinmenge; im folgenden Regenerationsschritt wurde kein weiteres Protein eluiert. Im Falle des Versuches bei einer  $c_{AS}$  von 0,4 M wurden im Regenerationsschritt 0,54 mg Protein eluiert (also 80 % des gesamten gebundenen Proteins), im Falle von 0,9 M noch 1,29 mg (12,3 % des gesamten gebundenen Proteins). Erwartungsgemäß war der Unterschied der Versuche bei den geringen Salzkonzentrationen auch gering.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass erfolgreich bewiesen wurde, dass bei geschickter Wahl der Salzkonzentration tatsächlich die Arbeitskapazität einer temperaturinduzierten Regeneration erhöht werden konnte. Im dargestellten Modellfall konnte eine optimale Konzentration des kosmotropen Salzes Ammoniumsulfat von 0,9 M ermittelt werden. Für ökonomisch und ökologisch sinnvolle Anwendungen der temperaturkontrollierten Adsorption auf HIC-Oberflächen muss aber ein Kompromiss geschlossen werden. Geringe Salzgehalte im Puffer sind im Sinne integrierter Prozessführung erwünscht, wobei höhere Salzgehalte zur deutlichen Steigerung des temperaturabhängigen Arbeitskapazität führen. Einschränkend ist aber festzuhalten, dass im Falle höherer Salzkonzentrationen nicht nur auf die Temperaturstabilität der zu trennenden Proteine zu achten ist, sondern auch auf den Aussalzpunkt. In unseren Versuchen konnte bei einer Temperatur von 40°C und einer Ammoniumsulfatkonzentration größer 1 M Proteinpräzipitation festgestellt werden. Da der Übergang zwischen verstärkter Adsorption und irreversibler Präzipitation oftmals fließend ist, könnte die Abnahme des Anstiegs der temperaturabhängigen Arbeitskapazität bei einer  $c_{AS}$  von 1 M im gezeigten Modell schon durch anfangende Proteindenaturierungen bedingt sein.

## ***6.2 Charakterisierung thermoresponsiver Sorbentien***

Der folgende Abschnitt befasst sich mit der Charakterisierung der drei in dieser Arbeit verwendeten thermoCEX Sorbentien S6pg-ItBA, S400HR-ItBA und SCL6B-ItBA, die entsprechend der in Abschnitt 5.6.1 vorgestellten Funktionalisierungsmethodik basierend auf

chromatographischen Basispartikeln (vgl. Abschnitt 5.6.1) hergestellt wurden. Die Ergebnisse von SCL6B-ItBA werden zusätzlich mit den zur Verfügung stehenden Daten der Arbeit von Maharjan et al. [127] verglichen. Da die Materialien S6pg-ItBA und S400HR-ItBA innerhalb dieser Arbeit erstmalig hergestellt wurden, können keinerlei Vergleiche angestellt werden. Der Fokus dieses Kapitels liegt auf der Darstellung der Eignung der Partikeln zur temperaturkontrollierten Adsorption/Desorption von Modellproteinen. Zur Vergleichbarkeit der hergestellten Kationenaustauschmaterialien mit kommerziell erhältlichen Sorbentien wurde außerdem die ionische Kapazität bestimmt.

Der Einfluss des Salzgehaltes und der verwendeten Puffer wird im Anhang erläutert (vgl. Abschnitt 9.2). Selbst bei gleichbleibender Phosphatkonzentration konnten große Unterschiede der temperaturkontrollierten Adsorption bei vergleichsweise kleinen Unterschieden in der Pufferzubereitung festgestellt werden. Da keine Kenntnis über die Stabilität der Polymerfunktionalisierung in alkalischen Lösungen zur notwendigen Reinigung existierte, wurde in dieser Arbeit zudem die Beständigkeit aller funktionalisierten Partikel überprüft. Entsprechend der im Anhang gezeigten Ergebnisse in Abschnitt 9.4.2 konnte die Beständigkeit bis zu einer Konzentration alkalischer NaOH-Lösung von 1 M nachgewiesen werden. Zudem konnte erfolgreich aufgezeigt werden, dass einfache Elutionen mit erhöhten Salzkonzentrationen nicht ausreichend sind, um alles zuvor adsorbierte Protein zu eluieren. Die Ergebnisse aus Abschnitt 9.4.3 zeigen, dass eine vollständige Regeneration jedoch schon durch Behandlung der Sorbentien mit NaOH-Konzentrationen von 0,1 M erreicht werden konnte. Die optische Begutachtung der funktionalisierten Partikeln mittels Elektronenmikroskop wurde ebenfalls durchgeführt. Die Polymerisierung auf der Partikeloberfläche führte allerdings nicht zu sichtbaren Unterschieden (vgl. Anhang Abschnitt 9.4.4).

### **6.2.1 Ionische Kapazitäten**

Proteinbindekapazitäten sind abhängig von einer Vielzahl von Faktoren. Speziell bei der Verwendung von Ionenaustauschermatrizes bestimmen Ionenstärke, pH-Wert und Temperatur des umgebenden Mediums, sowie das verwendete Protein die Adsorptionsstärke. Zur Vergleichbarkeit verschiedener Ionenaustauscher untereinander wird häufig die ionische Kapazität angegeben, wobei auch die Qualität der Funktionalisierung und Dichte an ladungstragenden Gruppen auf Partikeloberflächen mittels dieses Wertes quantitativ abgeschätzt werden kann. Die ionische Kapazität ist ein von Umgebungsbedingungen weitestgehend unabhängiger Kennwert und gibt im Falle von negativ geladenen Kationenaustauschern die

maximal adsorbierbare Menge an  $H^+$ -Ionen an und wird daher auch als  $H^+$ -Austauschkapazität bezeichnet. Unter der Annahme, dass je ein  $H^+$ -Ion an eine ladungstragende Gruppe bindet (z.B. bei Carboxylgruppen  $COO^-$  oder Sulfogruppen  $SO_3^-$ ), kann somit die Gesamtmenge an ladungstragenden Gruppen auf den Partikeln bestimmt werden. Die Bestimmung der ionischen Kapazität wurde entsprechend Abschnitt 5.8.2 durchgeführt. Die Ergebnisse für die drei Partikelarten sind in Tabelle 6-7 angegeben. Im Falle von S400HR-ItBA und SCL6B-ItBA wurde die ionische Kapazität zweier separat erstellter Partikelchargen (Charge #1 und #2) bestimmt und die Verteilung um den entstehenden Mittelwert angegeben, für S6pg-ItBA ist der Wert für Charge #1 angegeben.

**Tabelle 6-7: Ionische Kapazitäten der drei thermoCEX-Sorbentien bezogen auf die Sorbensmasse als auch auf das Volumen sedimentierten Sorbens.**

Matrix	Ionische Kapazität, $\mu\text{mol } H^+ \text{ g}^{-1*}$	Ionische Kapazität, $\mu\text{mol } H^+ \text{ mL}^{-1}$
S6pg-ItBA	31,5	25,4
S400HR-ItBA	$51,55 \pm 4,25$	$45 \pm 2,8$
SCL6B-ItBA	$47,95 \pm 1,05$	$38,35 \pm 1,35$

\* bezogen auf trocken gesaugtes Sorbens (nicht getrocknet)

Ogleich in allen drei Fällen kommerziell erhältliche Basispartikel nach derselben Methode funktionalisiert wurden, konnten unterschiedliche ionische Kapazitäten erreicht werden. Während S400HR-ItBA die höchste ionische Kapazität zeigte, war diese bei den kleinsten verwendeten Partikeln S6pg-ItBA am geringsten ausgeprägt. Selbst die beiden aus ähnlicher Matrix hergestellten Partikel S6pg-ItBA und SCL6B-ItBA unterschieden sich stark in den ermittelten ionischen Kapazitäten. Die zugrundeliegenden Zusammenhänge der Stärke der ionischen Kapazität und der verwendeten Basispartikel wurden in dieser Arbeit nicht behandelt. Es wird allerdings ein komplexes Zusammenspiel aus einer Vielzahl von Parametern, wie Partikelgröße, Porosität, Mikrostruktur und Matrixzusammensetzung vermutet.

Der Unterschied zu kommerziell erhältlichen Sorbentien auf Sepharosebasis ohne thermoresponsive Funktionalität ist allerdings in allen drei Fällen deutlich. Der schwache Kationenaustauscher CM Sepharose FF mit Carboxymethylgruppen als funktionellen Liganden und der starke Kationenaustauscher SP Sepharose FF mit Sulfopropylgruppen weisen Werte von  $90\text{-}130 \mu\text{mol } H^+ \text{ mL}^{-1}$  bzw.  $180\text{-}250 \mu\text{mol } H^+ \text{ mL}^{-1}$  auf (Herstellerangaben von GE Healthcare) und

sind damit um die Faktoren 2-10 stärker geladen als die thermoresponsiv funktionalisierten Partikel. Die Gründe für diese deutlichen Unterschiede sind vermutlich in der komplexen Polymerstruktur der funktionalisierten Partikel zu finden. Entweder können mit der angewendeten Funktionalisierungstechnik nicht entsprechend viele ladungstragende Monomere innerhalb des Polymerkonstrukts eingebaut werden, oder es kommt zur Abschirmung der ladungstragenden Gruppen durch das umgebende Polymer.

## **6.2.2 Adsorptionsisothermen von Proteinen auf thermoresponsiven IEX-Partikeln**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe von Proteinen auf ihre Fähigkeit zur temperaturabhängigen Adsorption innerhalb eines TCZR untersucht. Im folgenden Kapitel wird speziell auf die thermoresponsive Adsorption der Proteine Lactoferrin und a33 Fab eingegangen. Generell sollten geeignete Modellproteine eine Reihe von Eigenschaften erfüllen. Zu diesen Eigenschaften gehören vor allem die Löslichkeit in wässrigen Puffern, basische Ladungseigenschaften (hoher  $pI$ ), ausgeprägte Temperaturstabilität und temperaturabhängige Adsorption. Neben den bereits genannten Proteinen wurde eine Reihe weiterer Proteine gescreent (vgl. Anhang Abschnitt 9.6). Hierbei konnte  $\alpha$ -Chymotrypsinogen als weiteres Protein mit temperaturabhängigen Bindeeigenschaften identifiziert werden, wogegen Cytochrom C und Lysozym zwar Adsorption aber nahezu keine Temperaturabhängigkeit zeigten. So konnte im Temperaturbereich von 20°C bis 50°C für die Adsorption von Lysozym auf SCL6B-ItBA beispielsweise ein fast konstantes  $q_{max}$  von 25,3-26,5 mg mL<sup>-1</sup> und ein  $K_D$ -Wert im Bereich von 0,06-0,01 mg mL<sup>-1</sup> identifiziert werden. Theoretische Zusammenhänge zwischen der Struktur eines Proteins und seiner temperaturabhängigen Adsorptionsaffinität auf thermoresponsiven Materialien sind noch weitgehend unbekannt, sodass die Ermittlung der Thermoresponsivität aktuell rein empirisch erfolgt.

### **6.2.2.1 Adsorption des Modellproteins Lactoferrin**

Der folgende Abschnitt befasst sich mit den Bindungseigenschaften des Modellproteins Lactoferrin auf den drei synthetisierten thermoCEX Partikelsorten, wobei im Speziellen die Temperaturabhängigkeit betrachtet wurde. Zur Beschreibung der Parameter wurden Adsorptionsisothermen bei verschiedenen Umgebungstemperaturen aufgenommen (vgl. Abschnitt 5.8.1) und über das Langmuirmodell angepasst. Entsprechend der ermittelten Parameter  $q_{max}$  und  $K_D$  bei unterschiedlichen Temperaturen konnte für jedes Sorbens die zugehörige thermoresponsive Langmuirgleichung nach Gleichung 3-1 ermittelt werden. Die im

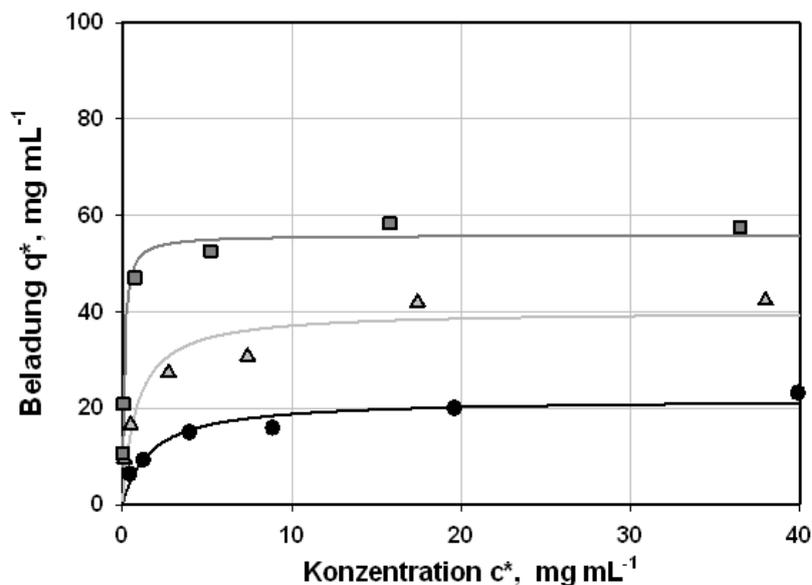
Anhang gezeigten Adsorptionskinetiken von Lactoferrin auf den drei thermoCEX Sorbentien offenbaren, dass bei der gewählten Inkubationszeit von 60 Minuten in allen Fällen ein Gleichgewichtszustand zwischen der Proteinkonzentration in der Lösung und der Beladung vorlag (vgl. Abschnitt 9.4.1). In den Abbildungen 6.11 bis 6.13 wurden die Adsorptionsisothermen mit Lactoferrin entsprechend Methode A bei den drei Temperaturen 20°C, 35°C und 50°C und bis zu maximalen Startkonzentrationen  $c_0$  von 40 mg mL<sup>-1</sup> betrachtet. Die zugehörigen Parameter der Anpassung nach Langmuir sind in den Tabellen 6-8, 6-10 und 6-11 angegeben. Zusätzlich ist die anfängliche Steigung der Adsorptionsisothermen als Quotient der beiden aus dem Langmuir-Modell berechneten Parameter angegeben ( $q_{\max} K_D^{-1}$ ), die häufig als Vergleichsmaß zur Beurteilung der Adsorptionsaffinität benutzt wird. Ein kleiner Wert entspricht hierbei einer geringen Adsorptionsaffinität, während eine Zunahme des Wertes einer stärkeren Tendenz zur Proteinadsorption entspricht.

Im Falle der Lactoferrinadsorption mit SCL6B-ItBA konnte mit zunehmender Temperatur eine deutliche Zunahme der Adsorptionsaffinität beobachtet werden. Bei 20°C Umgebungstemperatur war die Bindung bei einem  $K_D$ -Wert von 1,66 mg mL<sup>-1</sup> und die maximale Sättigungbeladung von 21,9 mg mL<sup>-1</sup> noch sehr gering, wohingegen bei 50°C eine deutliche Abnahme des  $K_D$ -Wertes um den Faktor 18,4 und eine Zunahme des  $q_{\max}$  auf 55,9 mg mL<sup>-1</sup> die Stärkung der Lactoferrinadsorption dokumentieren.

**Tabelle 6-8: Langmuirparameter und anfängliche Isothermensteigung der Adsorption von Lactoferrin auf SCL6B-ItBA bei 20°C, 35°C und 50°C (nach Methode A).**

Temperatur	$q_{\max}$ , mg mL <sup>-1</sup>	$K_D$ , mg mL <sup>-1</sup>	$q_{\max} K_D^{-1}$
20°C	21,9	1,66	13,2
35°C	40,2	0,83	48,5
50°C	55,9	0,09	609,9

Die Adsorptionsaffinität steigt für dieses Sorbens unter den gewählten Bedingungen jedoch nicht linear. So konnte beim Temperatursprung von 20°C auf 35°C lediglich eine Zunahme der anfänglichen Isothermensteigung um einen Faktor von etwa 3,7 festgestellt werden. Bei gleicher Temperaturdifferenz von 15°C konnte jedoch bei Vergleich der Adsorptionsaffinitäten bei 35°C und 50°C eine Zunahme um den Faktor 12,6 beobachtet werden, was einer vergleichsweise 3,4-fach stärkeren Zunahme dieses Kennwertes entspricht.



**Abbildung 6-11:** Gleichgewichtsparameter der Adsorption von Lactoferrin auf SCL6B-ItBA bei 20°C (Kreis), 35°C (Dreieck) und 50°C (Quadrat). Die Linien entsprechen den Isothermen der Anpassungsfunktionen nach Langmuir (20°C: schwarz; 35°C: grau; 50°C: dunkelgrau).

Mit den so ermittelten Daten konnte anschließend unter Verwendung von Gleichung 3-1 die thermoresponsive Langmuirgleichung für die Lactoferrinadsorption auf SCL6B-ItBA entsprechend Gleichung 6-1 aufgestellt werden.

$$q^* = \frac{(1,1347 \Phi - 0,3767)c^*}{2,6917 - 0,0523 \Phi + c^*} \quad (6-1)$$

Hierbei wurden Linearisierungen der  $q_{\max}$  und  $K_D$ -Verläufe über der Temperatur mit Bestimmtheitsmaßen von 1 in beiden Fällen festgestellt. Zur Berechnung der Gleichgewichtsbeladung  $q^*$  in der Einheit  $\text{mg mL}^{-1}$  müssen dafür die Zahlenwerte der Temperatur in der Einheit °C (an Stelle von  $\Phi$ ) und der Gleichgewichtskonzentration in der Einheit  $\text{mg mL}^{-1}$  (an Stelle von  $c^*$ ) eingesetzt werden. Diese Vorgehensweise muss auch bei den Gleichungen 6-2, 6-3 und 6-4 beachtet werden.

In der Arbeit von Maharjan et al. [127] wurde die ItBA-Funktionalisierung bereits mit einer ähnlichen Funktionalisierungsmethodik auf Basispartikeln des Typs Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) vorgenommen und das Adsorptions-/Desorptionsverhalten von Lactoferrin untersucht. Diese Partikel entsprechen den verwendeten SCL6B Basispartikeln dieser Arbeit u.a. in der verwendeten Matrix und der Partikelgrößenverteilung und unterscheiden sich lediglich

geringfügig in der Chemie ihrer Quervernetzung, sodass die Ergebnisse der Langmuiranpassung der publizierten Isothermenparameter (vgl. Tabelle 6-9) mit den Isothermenparametern von SCL6B-ItBA verglichen (vgl. Tabelle 6-8) wurden.

**Tabelle 6-9: Langmuirparameter und anfängliche Isothermensteigung ItBA funktionalisierter Sepharose 6 Fast Flow Partikel. Die Daten stammen aus der Veröffentlichung von Maharjan et al. [127]. Die Partikel wurden nach der dort vorgestellten Methode funktionalisiert.**

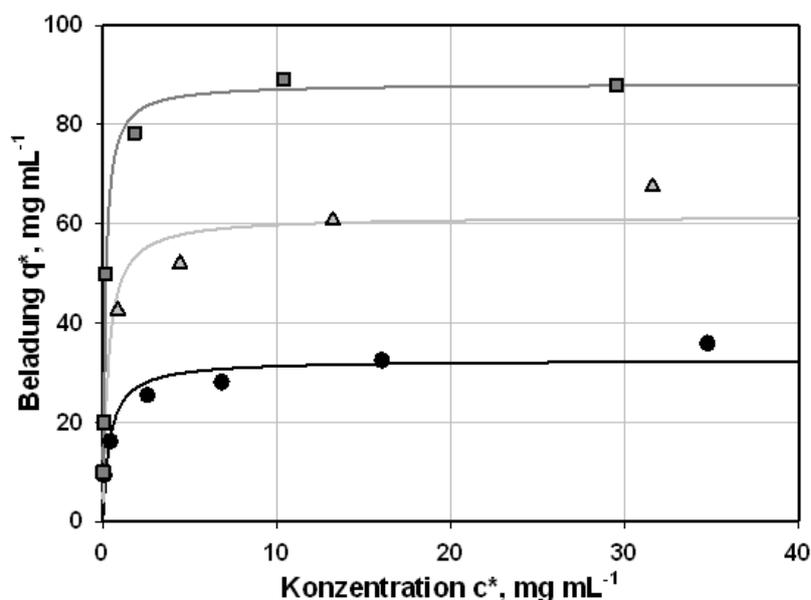
Temperatur	$q_{\max}$ , mg mL <sup>-1</sup>	$K_D$ , mg mL <sup>-1</sup>	$q_{\max} K_D^{-1}$
20°C	24 ± 2	1,86	12,9
50°C	68 ± 2	0,56	121,43

Wie aus den Daten hervorgeht, konnte in beiden Fällen ein ähnliches Verhalten beobachtet werden, da auch im Falle der Publikation die Adsorptionsaffinität von Lactoferrin mit zunehmender Temperatur deutlich zunahm. Während die Adsorptionsaffinitäten jedoch bei 20°C nahezu identisch sind (13,2 und 12,9) zeigt sich bei 50°C ein deutlicher Unterschied festgestellt werden. Obgleich  $q_{\max}$  im Falle der Vergleichspartikel um etwa 12 mg mL<sup>-1</sup> höher lag, konnte bei den in dieser Arbeit hergestellten Partikeln eine um den Faktor 5 höhere Adsorptionsaffinität festgestellt werden. Dieses verbesserte thermoresponsive Verhalten liegt vermutlich vor allem an den durch den Kooperationspartner in Birmingham vorgenommenen Optimierungen der Partikelfunktionalisierung. Speziell der kritische Schritt der Epoxyaktivierung wurde optimiert, sodass bei den in dieser Arbeit hergestellten Partikeln eine Steigerung der oberflächengebundenen Oxirangruppen um etwa das Doppelte auf 650-750 µmol pro Gramm getrockneter SCL6B nachgewiesen wurde. Das in dieser Arbeit verwendete SCL6B-ItBA wies damit anschließend u.a. einen höheren Copolymeranteil, eine gestiegene Hydrophobizität und eine dreifach höhere Ladungsdichte [148] auf.

**Tabelle 6-10: Langmuirparameter und anfängliche Isothermensteigung der Adsorption von Lactoferrin auf S400HR-ItBA bei 20°C, 35°C und 50°C (nach Methode A).**

Temperatur	$q_{\max}$ , mg mL <sup>-1</sup>	$K_D$ , mg mL <sup>-1</sup>	$q_{\max} K_D^{-1}$
20°C	32,6	0,40	81,0
35°C	61,5	0,29	214,8
50°C	88,2	0,14	651,6

Auch im Falle der S400HR-ItBA Partikel konnte mit zunehmender Temperatur eine Zunahme der Lactoferrinadsorption festgestellt werden. Auffällig sind die im Vergleich zu SCL6B-ItBA höheren  $q_{\max}$ -Werte bei allen Temperaturen (etwa Faktor 1,5). Die  $K_D$ -Werte sind im Vergleich zu SCL6B-ItBA bei 20°C und 35°C geringer, bei 50°C aber höher.



**Abbildung 6-12:** Gleichgewichtsparameter der Adsorption von Lactoferrin auf S400HR-ItBA bei 20°C (Kreis), 35°C (Dreieck) und 50°C (Quadrat). Die Linien entsprechen den Isothermen der Anpassungsfunktionen nach Langmuir (20°C: schwarz; 35°C: grau; 50°C: dunkelgrau).

Die Adsorptionsaffinitäten sind dadurch vergleichsweise hoch, wobei die Unterschiede der Anfangssteigungen bei den Temperatursprüngen von 20°C auf 35°C und von 35°C auf 50°C nicht mehr stark variierten (Faktor 2,7 bzw. Faktor 3,03). Auch hier konnte die thermoresponsive Langmuirgleichung aufgestellt werden.

$$q^* = \frac{(1,8563 \Phi - 4,2183)c^*}{0,5856 - 0,0087 \Phi + c^*} \quad (6-2)$$

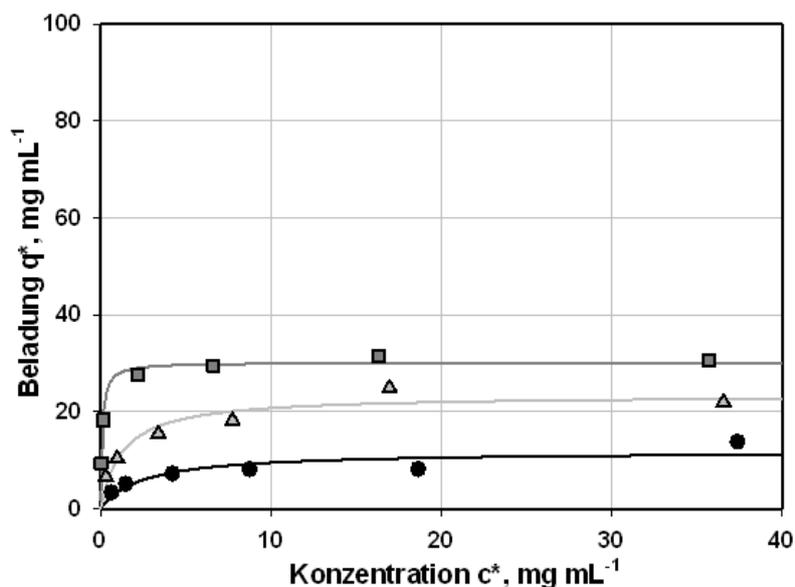
Die Linearisierung der Auftragung von  $q_{\max}$  und  $K_D$  über der Zeit ergab Bestimmtheitsmaße von  $R^2=1$  bzw.  $R^2=0,99$ .

Zuletzt folgt die Betrachtung der thermoresponsiven Partikel S6pg-ItBA, die auf Basis der Ausgangspartikel mit dem geringsten mittleren Durchmesser in dieser Arbeit hergestellt wurden. Für die Durchführung der absatzweisen TCZR-Experimente in Kapitel 6.5 wurde hierbei ausschließlich die nachfolgend beschriebene Partikelcharge #1 verwendet.

**Tabelle 6-11: Langmuirparameter und anfängliche Isothermensteigung der Adsorption von Lactoferrin auf S6pg-ItBA (Charge #1) bei 20°C, 35°C und 50°C (nach Methode A).**

Temperatur	$q_{\max}$ , mg mL <sup>-1</sup>	$K_D$ , mg mL <sup>-1</sup>	$q_{\max} K_D^{-1}$
20°C	11,8	2,47	4,79
35°C	23,4	1,28	18,3
50°C	30,2	0,09	344,3

Auch S6pg-ItBA zeigte eine Zunahme der Adsorption mit zunehmender Temperatur. Unter allen getesteten Partikeln konnten allerdings die geringsten Werte für  $q_{\max}$  und zumindest bei einer Temperatur von 20°C auch der höchste  $K_D$ -Wert festgestellt werden. Dadurch resultieren vergleichsweise geringe maximale Isothermensteigungen. Allerdings kann ebenso festgestellt werden, dass die Unterschiede in der Adsorptionsaffinität zwischen den einzelnen Temperaturen am deutlichsten ausgeprägt sind. So konnte eine Zunahme von 20°C auf 35°C um den Faktor 3,8 bestimmt werden, der Unterschied zwischen 35°C und 50°C war erneut höher und erreichte hierbei einen Maximalwert mit einem Faktor von 18,9, was etwa einem fünffach höheren Faktor entspricht.



**Abbildung 6-13: Gleichgewichtsparameter der Adsorption von Lactoferrin auf S6pg-ItBA bei 20°C (Kreis), 35°C (Dreieck) und 50°C (Quadrat). Die Linien entsprechen den Isothermen der Anpassungsfunktionen nach Langmuir (20°C: schwarz; 35°C: grau; 50°C: dunkelgrau).**

Die thermoresponsive Langmuirgleichung für die Lactoferrinadsorption auf S6pg-ItBA kann danach wie folgt aufgestellt werden, wobei die Linearisierung von  $q_{\max}$  und  $K_D$  mit Bestimmtheitsmaßen von 0,98 bzw. 1 vorgenommen werden konnte.

$$q^* = \frac{(0,6117 \Phi + 0,385)c^*}{4,0567 - 0,0793 \Phi + c^*} \quad (6-3)$$

Für die Experimente zur konventionellen thermoresponsiven Chromatographie (vgl. Abschnitt 6.3), der kontinuierlichen Anwendung des TCZR (vgl. Abschnitt 6.6) und zur Parameterstudie des TCZR-Prozesses in Abschnitt 6.8 wurde ausschließlich S6pg-ItBA Charge #2 verwendet. Die Isothermen dieser Partikelcharge wurden mittels Methode B ermittelt (vgl. Abschnitt 5.8.1). Die grafische Darstellung der Gleichgewichtsparameter und der Isothermen der Anpassungsfunktionen sind im Anhang (vgl. Kapitel 9.5, Abbildung 9-6) ersichtlich.

**Tabelle 6-12: Langmuirparameter und anfängliche Isothermensteigung der Adsorption von Lactoferrin auf S6pg-ItBA (Charge #2) bei 10°C, 20°C, 35°C und 50°C (nach Methode B).**

Temperatur	$q_{\max}$ , mg mL <sup>-1</sup>	$K_D$ , mg mL <sup>-1</sup>	$q_{\max} K_D^{-1}$
10°C	12,4	4,79	2,58
20°C	16,9	2,93	5,78
35°C	19,9	1,09	18,3
50°C	28,5	0,15	189,9

Im Vergleich zu Charge #1 konnten ähnliche  $q_{\max}$ -Werte im gesamten Temperaturbereich festgestellt werden. Auch die  $K_D$ -Werte und damit auch die Adsorptionsaffinitäten entsprechen sich bis zu einer Temperatur von 35°C. Bei einer Temperatur von 50°C hatte die Erhöhung des  $K_D$ -Wertes um gerade einmal 0,06 mg mL<sup>-1</sup> einen erheblichen Einfluss auf die Abnahme der Adsorptionsaffinität um einen Faktor von 1,8. Da die Berechnung des  $K_D$ -Wertes gerade in diesen geringen Konzentrationsbereichen oftmals schwierig zu bestimmen ist und die Abweichung der Messwerte innerhalb der Analyseungenauigkeiten liegt, kann davon ausgegangen werden, dass sich beide Materialien nahezu identisch verhalten. Für diese Charge konnte ebenfalls eine thermoresponsive Langmuirgleichung aufgestellt werden, mit Bestimmtheitsmaßen der Linearisierung von 0,96 für  $q_{\max}$  und  $K_D$ .

$$q^* = \frac{(0,3809 \Phi + 8,4713)c^*}{5,3795 - 0,1118 \Phi + c^*} \quad (6-4)$$

Generell kann in allen Fällen das in Abschnitt 2.5.4.5 beschriebene temperaturabhängige Verhalten der ItBA-Funktionalisierung und die publizierte Hypothese [127] bestätigt werden. Diese besagt, dass bei niedriger Temperatur das Copolymer hydriert und in seinem expandierten Status ist. Dadurch ist der Abstand zwischen den geladenen Carboxylgruppen im Konstrukt hoch, was zu geringer Adsorptionsaffinität bei Temperaturen von 10°C und 20°C führt. Bei Temperaturerhöhung auf 35°C bzw. 50°C kommt es zunehmend zu einem Kollaps des quervernetzten Copolymers, einer Erhöhung der Ladungsdichte pro Flächeneinheit und einer zunehmenden Adsorptionsaffinität. Die in dieser Arbeit hergestellten SCL6B-ItBA zeigten aufgrund eines höheren Copolymeranteils auf der Partikeloberfläche eine stärker ausgeprägte Lactoferrinadsorptionsaffinität vor allem bei höheren Temperaturen [148]. Dies führt im entsprechenden Temperaturbereich auch zu höheren und gewünschten Gleichgewichtsbeladungsunterschieden. Die verwendete Oberflächenmodifikation in dieser Arbeit kann demnach als Optimierung bezeichnet werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die gemessenen ionischen Kapazitäten bezüglich des  $q_{\max}$ -Wertes der Adsorption von Lactoferrin entsprechen und zwar in der Reihenfolge S400HR-ItBA > SCL6B-ItBA > S6pg-ItBA. Die ionische Kapazität lässt hingegen keine Rückschlüsse auf die erzielbaren Affinitätsunterschiede bei verschiedenen Temperaturen zu. Diese können jedoch mittels der anfänglichen Isothermensteigung gut charakterisiert werden. Die größten Unterschiede konnten demnach bei S6pg-ItBA vor SCL6B-ItBA und S400HR-ItBA festgestellt werden. Generell konnten bei Verwendung der speziell hergestellten thermoresponsiven Materialien deutlich höhere Beladungen (und Beladungsunterschiede) als im Falle der hydrophoben Interaktionssorbentien erzielt werden (vgl. Abschnitte 6.1.1 und 6.1.6). Für die nachhaltige und kontinuierliche chromatographische Anwendung im TCZR weisen die thermoCEX-Partikel in ihrer Gesamtperformance gegenüber HIC-Partikeln somit deutliche Vorteile auf.

### 6.2.2.2 Adsorption des Antikörperfragmentes a33 Fab

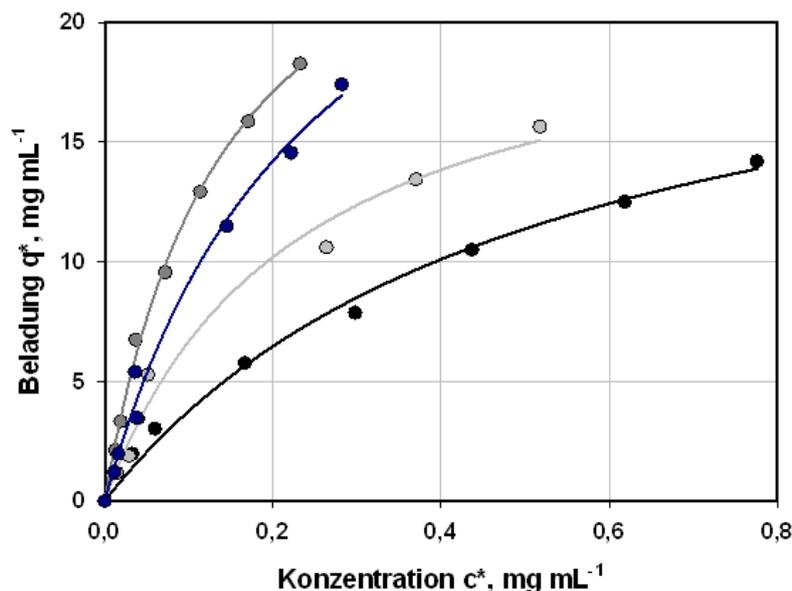
Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit der Untersuchung der temperaturabhängigen Adsorption des Antikörperfragmentes a33Fab. Die Adsorptionsversuche wurden mit zuvor durch Fermentation produziertem und durch Affinitätschromatographie vorgereinigtem a33 Fab (vgl. Anhang Abschnitt 9.9.1) nach der beschriebenen Isothermenmethode C (vgl. Abschnitt 5.8.1) durchgeführt. Die Adsorptionsexperimente wurden auf S6pg-ItBA-Partikeln (Charge #2) durchgeführt, als Puffer wurde ein 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 nach Sørensen verwendet

[154]. Hierzu wurden zwei Lösungen aus Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat und Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat entsprechend gemischt, um den gewünschten pH-Wert zu erreichen. Aufgrund geringerer Leitfähigkeit und eines Analogieschlusses zu den im Anhang gezeigten Isothermenparameter aus Versuchen mit Lactoferrin (vgl. Abschnitt 9.2) muss allerdings mit vergleichsweise höheren Adsorptionen und auch Beladungsdifferenzen als bei Verwendung des konventionellen Phosphatpuffers gerechnet werden.

**Tabelle 6-13: Langmuirparameter und anfängliche Isothermensteigung der Adsorption von a33Fab auf S6pg-ItBA (Charge #2) bei 10°C, 20°C, 35°C und 50°C (nach Methode C, mit Sörensen-Phosphatpuffer).**

Temperatur	$q_{\max}$ , mg mL <sup>-1</sup>	$K_D$ , mg mL <sup>-1</sup>	$q_{\max} K_D^{-1}$
10°C	23,1	0,51	44,9
20°C	21,6	0,22	96,7
35°C	31,9	0,25	128,1
50°C	29,1	0,14	207,2

Für den Verlauf der  $q_{\max}$ -Werte als auch der  $K_D$ -Werte konnte keine kontinuierliche Zunahme bzw. Abnahme mit zunehmender Temperatur festgestellt werden. Lediglich die Tendenz der Werte war erkennbar und spiegelt sich auch an der stetig steigenden Isothermenanfangssteigung wider. Die Zunahme der Adsorptionsaffinität im gesamten Temperaturbereich ist mit einem Faktor von 4,63 nicht besonders stark ausgeprägt. Erwähnenswert ist außerdem, dass die Zunahme der Adsorptionsaffinität zwischen 20°C und 35°C, also im Bereich der LCST von reinem PNIPAAm, wider Erwarten nur 19,4 % der gesamten Affinitätszunahme im untersuchten Temperaturbereich ausmacht. Speziell die schwankenden Langmuirparameter können dadurch erklärt werden, dass entsprechend Abbildung 6-14 unter den experimentellen Bedingungen keine vollständige Sättigung des Materials möglich war. Die ermittelten Parameter beruhen damit fast ausschließlich auf Messungen im Bereich der größten Isothermensteigung, und geringe analytische Ungenauigkeiten können die Ergebnisse deutlich verändern.



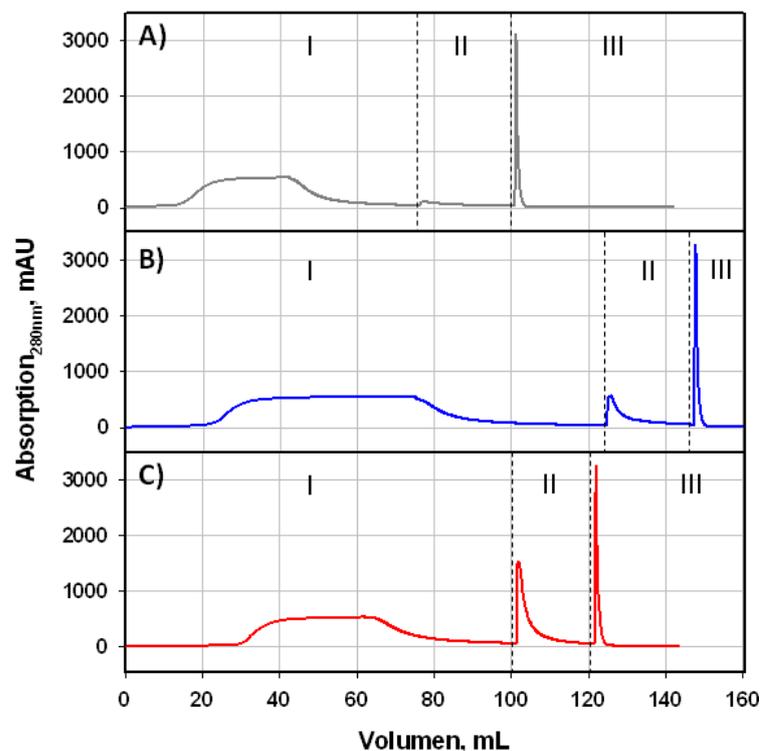
**Abbildung 6-14:** Gleichgewichtsparameter der Adsorption von a33 Fab auf S6pg-ItBA bei 10°C (schwarz), 20°C (grau), 35°C (blau) und 50°C (dunkelgrau). Die Linien entsprechen den Isothermen der Anpassungsfunktionen nach Langmuir.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der Temperatureffekt von a33Fab nicht so stark ausgeprägt ist wie der des Modellproteins Lactoferrin. Mit dem Wissen, dass für die gezeigten Messdaten Phosphatpuffer mit geringerer Leitfähigkeit verwendet wurde, kann vermutet werden, dass der Temperatureffekt mit konventionellem Phosphatpuffer noch weiter abgeschwächt wird. Trotzdem konnte erstmals die generelle Temperaturabhängigkeit pharmazeutisch interessanter Proteine beschrieben werden. Diese Studie bildet daher die Grundlage für die mögliche Aufreinigung dieser Biopharmazeutika mittels konventioneller thermoresponsiver Chromatographie oder im TCZR-System.

### 6.3 Konventionelle thermoresponsive Chromatographie

Das übliche Vorgehen im Rahmen einer Chromatographie von Bioprodukten mit thermoresponsiv funktionalisierten Partikeln wurde entsprechend der Ausführungen in Kapitel 2.5.4 schon mehrfach in der Literatur beschrieben. Die Berichte umfassen dabei unter anderem auch die Anwendbarkeit thermoresponsiver Ionenaustauschmaterialien, ähnlich den in dieser Arbeit beschriebenen (vgl. Abschnitt 2.5.4.4). Die Aufreinigung wurde an kleineren organischen Molekülen wie Steroiden und Catecholaminderivaten, sowie auch an Peptiden vorgenommen. Erste Ergebnisse zur thermoresponsiv-chromatographischen Trennung von Proteinen (drei Milchproteine) auf ItBA-modifizierten Sepharosepartikeln wurden in der schon häufiger

angesprochenen Arbeit von Maharjan et al. [127] gezeigt. In allen Fällen wurde die Trennung der Analyten durch eine Temperierung der gesamten Säule erreicht, die dafür komplett in einem temperierbaren Wasserbad gelagert wurde. Diese Vorgehensweise wird hier als konventionelle thermoresponsive Chromatographie bezeichnet.

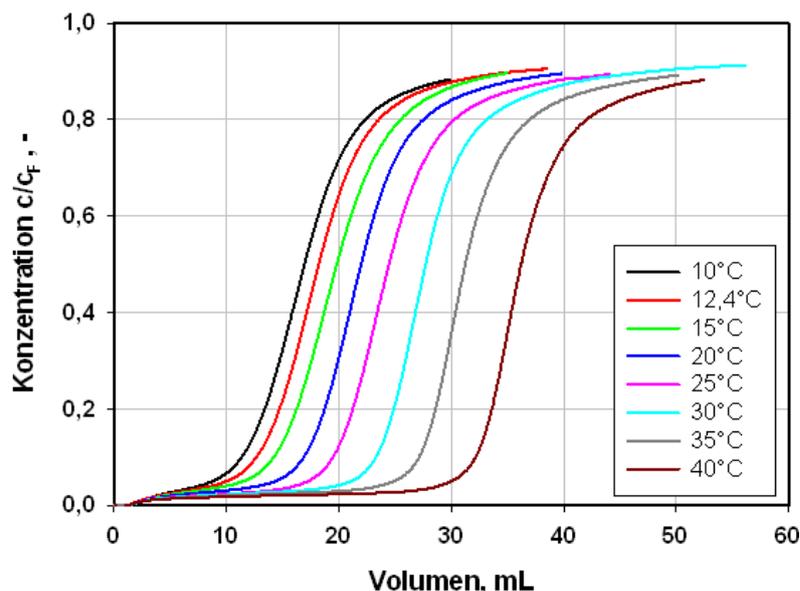


**Abbildung 6-15: Chromatogramme der konventionellen thermoresponsiven Chromatographie auf S6pg-ItBA #2 mit Lactoferrin ( $c_f = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) bei einer Temperatur während der Adsorption von (A) 20°C, (B) 35°C und (C) 40°C. (I) bezeichnet die Beladung und das anschließende Waschen bei Adsorptionstemperatur, (II) die Phase nach Abkühlung der Temperatur auf 10°C und (III) die Elution mittels 0,1 M NaOH.**

Im folgenden Kapitel wird in vergleichbarer Weise zunächst die isokratische thermoresponsive Proteinelution von Lactoferrin auf S6pg-ItBA (Charge #2) entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 5.10.1 durchgeführt, um einen Eindruck über die Performance der von uns verwendeten Systemkomponenten (Material, Protein) zu erhalten. In diesen Experimenten wurde anstelle von Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat aber wasserfreies Phosphatsalz zur Pufferherstellung genutzt. Aufgrund der dabei bestimmten höheren Ionenstärke und der daraus resultierenden geringeren Adsorptionsaffinität kann kein direkter Vergleich der gebundenen und eluierten Proteinmengen mit den theoretisch bei ansonsten gleichen Umgebungsbedingungen bestimmbaren Werten aus den Isothermendaten entsprechend Tabelle 6-12 durchgeführt

werden. Abbildung 6-15 zeigt die Chromatogramme der drei durchgeführten konventionellen thermoresponsiven Chromatographieläufe, bei denen die Säule bei unterschiedlichen Temperaturen und ansonsten gleichen Bedingungen vollständig bis zum Erreichen des Plateaus beladen und anschließend schwach gebundenes Protein ausgewaschen wurde. Danach wurde Lactoferrin durch Absenkung der Temperatur auf 10°C eluiert und abschließend die Restbeladung durch Regeneration mit 0,1 M NaOH desorbiert. Erwartungsgemäß erfolgte ein späterer Durchbruch bei Erhöhung der Temperatur von 20°C über 35°C bis 40°C durch Erhöhung der entsprechenden Gleichgewichtsbeladung. Der eigentliche Temperatureffekt erfolgte dann durch Abkühlung der Säule auf 10°C. In allen Fällen konnte Protein eluiert werden, jedoch waren die eluierten Mengen stark unterschiedlich. Im Falle der höchsten Adsorptionstemperatur von 40°C und der demzufolge auch höchsten Temperaturdifferenz konnten etwa 10,5 mg Lactoferrin eluiert werden, im Falle der Versuche mit einer Adsorptionstemperatur von 35°C nur 6,1 mg und bei 20°C lediglich 2,3 mg. In allen Fällen hätte durch Verlängerung des Waschschrattes noch weiteres Protein eluiert werden können, da die Basislinie noch nicht erreicht wurde. Wie bereits angesprochen, konnte durch einfache Temperaturabsenkung nicht die Gesamtmenge an zuvor adsorbiertem Protein eluiert werden. Durch Regeneration mit 0,1 M NaOH war dies anschließend jedoch möglich. Somit konnte im dynamischen chromatographischen Experiment erfolgreich bestätigt werden, dass in Abhängigkeit der gewählten Adsorptions- und Elutionstemperatur grundsätzlich Protein eluiert werden kann und die eluierte Proteinmenge mit zunehmender Temperaturdifferenz auch zunimmt. Allerdings konnte ebenso festgestellt werden, dass während der temperaturinduzierten Elution in allen Fällen ein starkes Tailingverhalten auftrat, was aufgrund der Bindebedingungen typisch für isokratische Elutionen ist. Aufgrund zunehmender Eluatverdünnung ist dieses Verhalten allerdings unerwünscht. Die sukzessive Abfolge der drei Abschnitte während der konventionellen thermoresponsiven Chromatographie lässt außerdem eine kontinuierliche Anwendung dieser Technik nicht zu.

Zusätzlich zu den beschriebenen Chromatographieexperimenten wurden im selben chromatographischen System Durchbruchskurven zur Ermittlung der Bindekapazität unter dynamischen Bedingungen im Temperaturbereich von 10°C bis 40°C gemäß Abschnitt 5.10.2 aufgenommen. In Abbildung 6-16 sind die Durchbruchskurven bei konstanter Säulentemperatur von 10°C, 12,4°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C bzw. 40°C gezeigt. Mit zunehmender Temperatur ist auch hier ein späterer Durchbruch zu erkennen, wobei schon die Betrachtung der Kurven offenbart, dass es vor allem im höheren Temperaturbereich zu größeren Beladungsdifferenzen kommt.



**Abbildung 6-16:** Durchbruchkurven einer Lösung aus Lactoferrin in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 ( $c_f = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) bei unterschiedlichen Temperaturen im Bereich von 10°C bis 40°C. Die Konzentration des Eluats ist dimensionslos bezogen auf  $c_f$  angegeben.

In allen Fällen konnte ein nahezu symmetrischer Durchbruch festgestellt werden. In diesem Falle stellt der aus den Kurven berechenbare  $DBC_{50\%}$  die unter dynamischen Bedingungen im System erreichbare Gleichgewichtsbeladung dar. In Tabelle 6-14 werden die für die beschriebenen Temperaturen bestimmten Werte zusätzlich mit den über die Gleichung 6-4 berechneten Werte aus den Adsorptionsexperimenten verglichen. In allen Fällen konnte im dynamischen Fall eine höhere Kapazität bestimmt werden, was im Umkehrschluss bedeutet, dass mittels der Daten der Adsorptionsisothermen zu frühe Durchbrüche vorhergesagt würden. Der Unterschied der Kapazitäten liegt zwischen  $10,7 \text{ mg mL}^{-1}$  und  $15,1 \text{ mg mL}^{-1}$ , wobei bei niedrigeren Temperaturen die prozentuale Differenz mit beispielsweise 82,09 % bei 10°C deutlich ausgeprägter ist als bei 40°C mit 44,66 %.

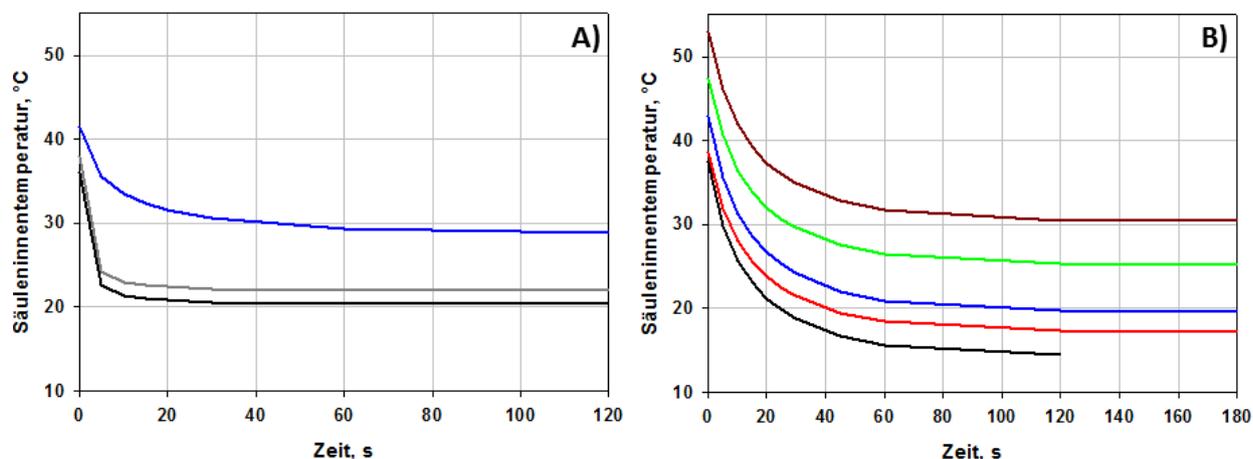
**Tabelle 6-14:** Gegenüberstellung der  $DBC_{50\%}$  aus Durchbruchkurven von Lactoferrin und der aus Gleichung 6-4 berechneten Gleichgewichtsbeladung  $q^*$  in  $\text{mg mL}^{-1}$  im Temperaturbereich von 10°C bis 40° bei gleicher Lactoferrinkonzentration ( $c_f = c^* = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) auf S6pg-ItBA Charge #2.

$\text{mg mL}^{-1}$	10°C	12,4°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
$DBC_{50\%}$	13,0	14,0	15,2	16,9	18,8	21,3	24,0	27,8
$q^*$	2,33	2,64	3,02	3,88	5,02	6,58	8,84	12,4

Die großen Unterschiede zwischen berechneten und experimentell ermittelten Sättigungsbeladungen können nicht alleine mit der Verwendung unterschiedlicher Phosphatsalze erklärt werden. Ein weiterer Unterschied liegt vor allem in der Datenbestimmung unter statischen bzw. dynamischen Betriebsbedingungen. Aus diesem Grunde sollten in Zukunft Parameter für Beladungsgleichgewichte direkt an den gepackten Trennsäulen aufgenommen werden. Geeignete Methoden unter dynamischen Bedingungen wurden von Nicoud und Seidel-Morgenstern [155] beschrieben.

#### 6.4 Temperaturprofile innerhalb des verwendeten TCZR-System

Entscheidend für den effizienten Betrieb des TCZR ist die gute Wärmeübertragung zwischen der beweglichen Kühlzone und dem Säuleninneren. FEM-Simulationen zum Wärmeübergang (vgl. Abschnitt 4.4) waren geeignet um kritische Einflussfaktoren innerhalb des Aufbaus zu identifizieren, die reale Wärmentwicklung und entstehende Wärmeprofile bei Wanderung der Kühlzone über die Säule wurden aber experimentell entsprechend der Beschreibung in Kapitel 5.12 aufgenommen und werden in diesem Abschnitt dargestellt. Die analysierten Messungen wurden bei maximaler Leistungsfähigkeit der Temperaturzone durchgeführt.



**Abbildung 6-17:** Kinetiken des Temperaturverlaufs innerhalb der chromatographischen Trennsäule bei Verwendung von (A) Temperaturzone 7-10-7 oder (B) Temperaturzone 3-18-3. Die Verläufe bei unterschiedlichen Umgebungstemperaturen von 35°C (schwarz), 36°C (grau), 37°C (rot), 40°C (blau), 45°C (grün) oder 50°C (dunkelrot) sind gezeigt.

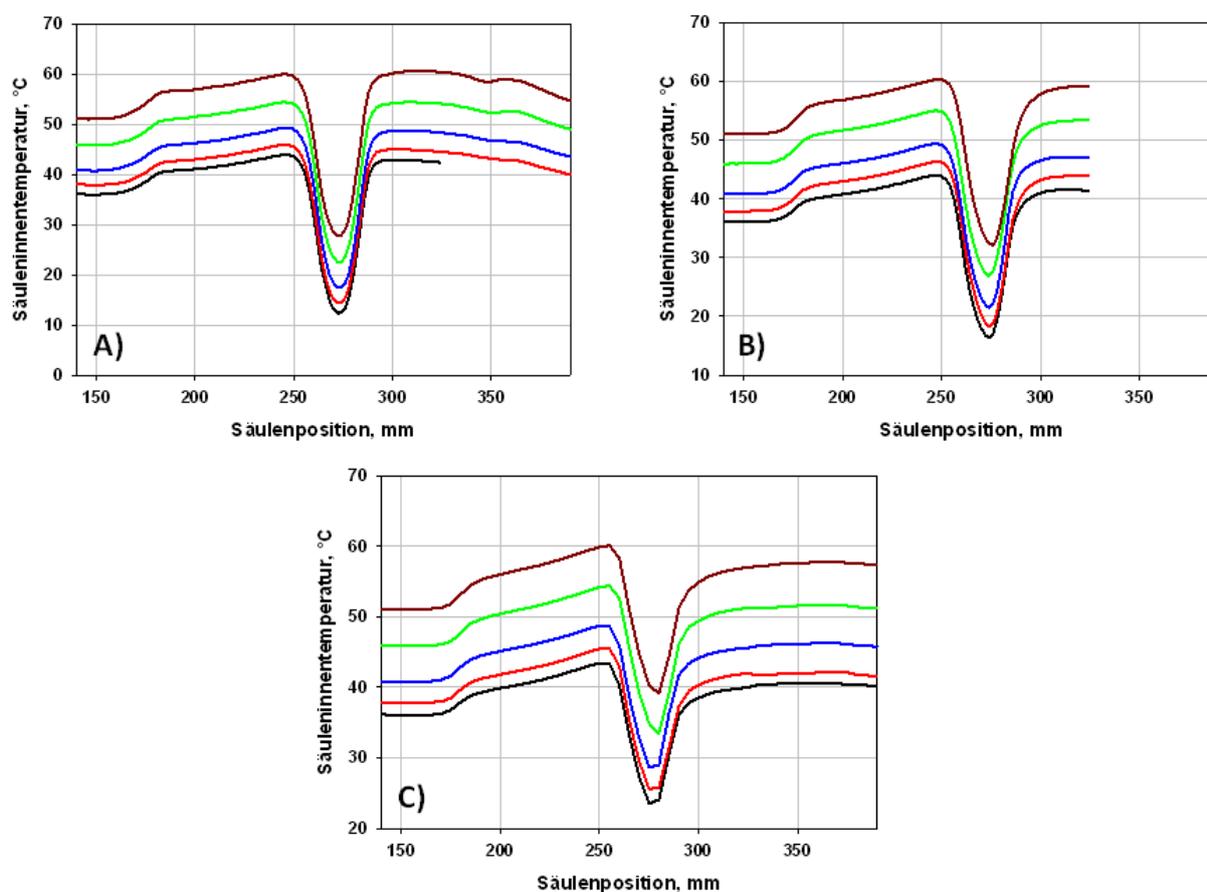
Zum grundsätzlichen Vergleich der beiden in dieser Arbeit hergestellten Kühlzonen 7-10-7 und 3-18-3 (vgl. Kapitel 4.3.1) werden in Abbildung 6-17 die Temperaturkinetiken vergleichend nebeneinander gestellt, d.h. die zeitabhängigen Ergebnisse der Messungen der

Temperaturentwicklung im Inneren der Säule auf Höhe des Mittelpunkts des zentralen Kupferblocks. Im Falle des Aufbaus 7-10-7 wurde die maximale Temperaturdifferenz bei  $\Phi_u = 35^\circ\text{C}$ ,  $36^\circ\text{C}$  und  $40^\circ\text{C}$  und einer maximalen Dauer von 120 Sekunden aufgenommen, im Falle des Aufbaus 3-18-3 wurde die Temperaturentwicklung bei Umgebungstemperaturen von  $35^\circ$ ,  $37^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$ ,  $45^\circ\text{C}$  und  $50^\circ\text{C}$  für 180 Sekunden aufgezeichnet (für  $\Phi_u = 35^\circ\text{C}$  nur bis 120 Sekunden).

Im Falle der Temperaturzone 7-10-7 stellte sich ungeachtet der Umgebungstemperatur nach etwa 60 Sekunden eine stabile minimale Temperatur innerhalb der Säule ein, wobei bei Umgebungstemperaturen von  $35^\circ\text{C}$  und  $36^\circ\text{C}$  schon nach etwa 40 Sekunden dieser Wert erreicht wurde. Dies bedeutet, dass 60 Sekunden Kontaktzeit des zentralen und kühlenden Kupferblockes mit einem Abschnitt der Säule ausreichen, um diesen auf die erreichbare Minimaltemperatur abzukühlen. Für den Betrieb des TCZR resultiert hieraus die Empfehlung, dass das Maximum der Verfahrgeschwindigkeit der Temperaturzone  $v_{\text{TCZR}}$  nicht über  $0,17 \text{ mm s}^{-1}$  liegen sollte. Eine Verringerung von  $v_{\text{TCZR}}$  unter diesen Wert führt aber zu keiner weiteren Temperaturerniedrigung, wogegen höhere Werte für  $v_{\text{TCZR}}$  zwangsläufig zu geringeren Temperaturdifferenzen führen. Diese Verfahrgeschwindigkeit wird im weiteren Verlauf als kritische Verfahrgeschwindigkeit  $v_{\text{TCZR,krit}}$  bezeichnet. Die maximal erreichbare Temperaturdifferenz zwischen minimaler Säuleninnentemperatur  $\Phi_{\text{Säule,min}}$  und der gewählten Umgebungstemperatur  $\Phi_u$  ist hierbei abhängig von der gewählten Umgebungstemperatur. So konnten für  $\Phi_u$  von  $35^\circ\text{C}$ ,  $36^\circ\text{C}$  und  $40^\circ\text{C}$  verschiedenen Differenzen mit  $\Delta\Phi$  von  $14,5^\circ\text{C}$ ,  $13,9^\circ\text{C}$  bzw.  $11,2^\circ\text{C}$  festgestellt werden. Die Abnahme der Temperaturdifferenz mit zunehmender Umgebungstemperatur kommt durch unzureichende Kühlung der äußeren Kupferblöcke durch die Kühlkörper zustande und führt damit zu eingeschränkter Leistungsfähigkeit der Peltierelemente.

Für die Temperaturzone 3-18-3 konnten höhere Temperaturunterschiede festgestellt werden, die zudem nahezu unabhängig von der gewählten Umgebungstemperatur sind und im Bereich zwischen  $19,9^\circ\text{C}$  und  $20,6^\circ\text{C}$  liegen. Dies spricht für eine bessere Wärmeabführung und wird vor allem durch die geringere Höhe der äußeren Kupferblöcke bedingt. In allen Fällen konnte eine maximale Temperaturdifferenz nach etwa 120 Sekunden beschrieben werden, wobei bereits wiederum nach 60 Sekunden die maximale Temperaturdifferenz zu 90 % erreicht wurde. Ausgehend von einer benötigten Wärmeübergangszeit von 60 Sekunden ergibt sich ein  $v_{\text{TCZR,krit}}$  von  $0,3 \text{ mm s}^{-1}$ , d.h. nahezu das doppelte im Vergleich zu  $v_{\text{TCZR,krit}}$  der Temperaturzone 7-10-7. Aufgrund der höheren und konstanten Temperaturdifferenz im betrachteten Bereich der Umgebungstemperatur und der höheren  $v_{\text{TCZR,krit}}$  ist die Temperaturzone 3-18-3 für den Einsatz im

TCZR besser geeignet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher ausschließlich Tests am TCZR-System mit dieser Temperaturzone durchgeführt.



**Abbildung 6-18: Temperaturprofile im Säulenzentrum bei Verfahrung der Temperaturzone über die Trennsäule mit einer  $v_{TCZR}$  von (A)  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$ , (B)  $0,4 \text{ mm s}^{-1}$ , (C)  $1 \text{ mm s}^{-1}$ . und  $\Phi_u$  von  $35^\circ\text{C}$  (schwarz),  $37^\circ\text{C}$  (rot),  $40^\circ\text{C}$  (blau),  $45^\circ\text{C}$  (grün) und  $50^\circ\text{C}$  (dunkelrot).**

Im Folgenden werden nur Temperaturprofile, d.h. reale gemessene Temperaturverläufe innerhalb der Trennsäule, bei Verwendung der Temperaturzone 3-18-3 betrachtet. Abbildung 6-18 zeigt die nach den Erläuterungen in Abschnitt 5.12 durchgeführten Messergebnisse für Temperaturprofile bei Umgebungstemperaturen von  $35^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$ ,  $45^\circ\text{C}$  und  $50^\circ\text{C}$ . Diese fünf Profile wurden bei drei unterschiedlichen  $v_{TCZR}$  aufgenommen, wobei die Verfahrungs- und Umgebungstemperaturen von  $1 \text{ mm s}^{-1}$  und  $0,4 \text{ mm s}^{-1}$  größer sind als  $v_{TCZR,krit}$  und  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$  kleiner ist als dieser Wert. In allen Fällen war der Temperatursensor fest innerhalb der Trennsäule auf Höhe der Position 273 mm der linearen Achse angebracht. Die Verfahrung der Temperaturzone begann oberhalb dieser Position bei Säulenposition 140 mm. Wie bei der späteren Anwendung wurde die Temperaturzone dann von oben nach unten bis maximal Säulenposition 390 mm verfahren. Ausnahmen bildeten die

Messungen bei  $v_{\text{TCZR}} = 0,4 \text{ mm s}^{-1}$  und  $\Phi_u = 35^\circ\text{C}$  bei  $v_{\text{TCZR}} = 0,1 \text{ mm s}^{-1}$ . Zu beachten ist, dass bei Top-Down-Verfahung und der gewählten horizontalen Darstellungsweise der Profile, das Profil nach links über eine waagrecht liegende Trennsäule fahren würde.

Die Temperaturprofile verdeutlichen nochmals, dass mit abnehmender Verfahrgeschwindigkeit der Temperaturzone eine Erhöhung der maximalen Temperaturdifferenz zu erreichen ist, die zugleich unabhängig von der jeweiligen Umgebungstemperatur ist. Im Detail wurden hierbei maximale Temperaturdifferenzen zur Umgebungstemperatur von  $11,6\text{-}12,7^\circ\text{C}$  bei einer  $v_{\text{TCZR}}$  von  $1 \text{ mm s}^{-1}$  festgestellt, bei  $0,4 \text{ mm s}^{-1}$  ein Unterschied von  $17,9\text{-}18,7^\circ\text{C}$  und bei  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$  sogar  $22,2\text{-}22,6^\circ\text{C}$ . So konnte beispielsweise bei  $\Phi_u = 35^\circ\text{C}$  eine minimale Säulentemperatur von  $12,4^\circ\text{C}$  gemessen werden. Was aus den Kinetiktests hervorging, aber bei Betrachtung der Temperaturprofile offenbar wird, sind die starken Überschwingen vor und nach dem starken Absinken der Temperatur. Dies ist auf die spezielle Sandwich-Bauweise der Temperaturzone und ihre äußeren Kupferblöcke zurückzuführen, die bei Abkühlung des zentralen Blockes aufgrund der Wärmepumpenwirkung der Peltierelemente aufgewärmt werden und die Trennsäule in den Randbereichen der Kühlzone über die Umgebungstemperatur aufheizen. Dieses Überschwingen beträgt durchschnittlich etwa  $10^\circ\text{C}$ , sodass beim Betrieb der Anlage bei  $35^\circ\text{C}$  durchaus  $45^\circ\text{C}$  Säuleninnentemperatur während der Temperaturzonenverfahung entstehen können. Durch eine Isolationsschicht zwischen Trennsäule und den Kupferblöcken wäre dieser Effekt vermeidbar, doch ist er bei der Proteinseparation im TCZR sogar erwünscht. So führt eine Temperaturerhöhung vor und nach der eigentlichen Kühlzone zu einer stärkeren Bindung der Modellproteine in diesen Bereichen und die Elutionspeaks im Chromatogramm werden automatisch geschärft. Im Vorlauf zum eigentlichen Proteinpeak wird ein verfrühter Durchbruch somit verhindert, während im Anschluss an die Kühlzone die Tendenz zum Tailingverhalten deutlich eingeschränkt werden kann.

## ***6.5 Absatzweise Untersuchung des TCZR-Systems***

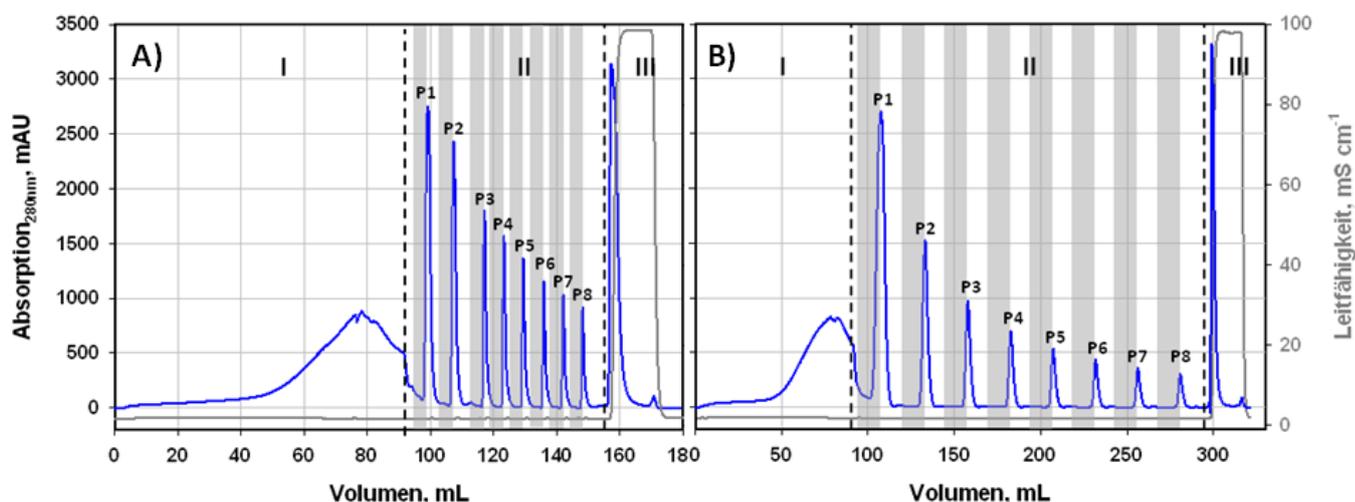
Im folgenden Kapitel werden Ergebnisse in Form von Chromatogrammen und Massenbilanzen der Anwendung des TCZR-Systems im absatzweisen Betrieb gezeigt. Die nicht-kontinuierliche Anwendung des Gesamtsystems eignete sich in besonderer Weise um wichtige Schlüsselparameter zu identifizieren und einen optimierten Betriebspunkt für kontinuierliche Anwendungen (vgl. Abschnitt 6.6) auszulegen. Als stationäre Phasen wurden die Materialien SCL6B-ItBA und S6pg-ItBA ausgewählt und getestet. Die Umgebungstemperatur wurde in allen Experimenten auf  $\phi_u = 35^\circ\text{C}$  eingestellt, damit trotz Überschwingen der Temperatur im Bereich der

äußeren Kupferblöcke (vgl. Abschnitt 6.4) die Temperaturstabilität des verwendeten Modellproteins Lactoferrin (vgl. Anhang Abschnitt 9.8) gegeben ist. In nahezu allen Versuchen wurde die Kühlzonen­temperatur entsprechend der Ausführungen im vorigen Kapitel eingestellt; eine Ausnahme bildete das in Abbildung 6-21 gezeigte Experiment, bei dem nicht die maximale Peltierleistung eingestellt wurde und die Temperaturunterschiede daher weniger stark ausgeprägt waren. Die Anzahl der Verfahrungen der Temperaturzone  $n$  sowie die Geschwindigkeit der Temperaturzone  $v_{\text{TCZR}}$  variierten innerhalb der einzelnen Experimente, wobei eine konstante Zulaufkonzentration  $c_F$  von  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  gewählt wurde. Nach Abschluss der Verfahrungen wurde noch gebundenes Protein durch Erhöhung der Salinität in der mobilen Phase eluiert. Aufgrund der unterschiedlichen Partikel- und Packungseigenschaften wurden bei den beiden verwendeten thermoCEX-Partikel­typen unterschiedliche  $v_{\text{int}}$  und Beladungsmengen gewählt. In allen Fällen wurde die Säule entsprechend der Isothermendaten bei  $35^\circ\text{C}$  komplett beladen, sodass im Falle von SCL6B-ItBA immer  $153 \text{ mg}$  Lactoferrin aufgegeben wurden (entspricht  $3,4 \text{ mL}$  gepackten Sorbens und einem  $q_{\text{max}}$  von etwa  $45 \text{ mg mL}^{-1}$ ) und im Falle von S6pg-ItBA  $74,4 \text{ mg}$  Lactoferrin (entspricht  $3,1 \text{ mL}$  gepackten Sorbens und einem  $q_{\text{max}}$  von etwa  $24 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Eine vollständige Beladung des Sorbens bei Adsorptionstemperatur erlaubt die Ermittlung des maximalen, allein durch Temperaturwechsel auf Elutionstemperatur eluierbaren Anteils an gebundenem Protein. Bei nicht vollständiger Beladung verringert sich die eluierbare Menge drastisch, wie im Anhang in Abschnitt 9.10 und Abbildung 9-10 bei Beladung der mit SCL6B-ItBA gepackten Säule mit nur  $20 \%$  der maximalen Beladungsmenge gezeigt wurde. Außerdem wird ausschließlich auf die Arbeit mit Lactoferrin als Modellprotein eingegangen. Die aus Isothermenexperimenten bestimmte und nur schwach ausgeprägte Temperaturabhängigkeit der Adsorption anderer basischer Proteine (vgl. Abschnitt 6.2.2) konnte am Beispiel von Lysozym auch innerhalb des TCZR-Systems entsprechend Abbildung 9-611 im Anhang bestätigt werden. In diesem Fall konnte nur eine geringe Menge an Protein durch Temperaturerniedrigung von SCL6B-ItBA eluiert werden.

### 6.5.1 Absatzweise Untersuchung mit SCL6B-ItBA

In diesem Kapitel wurden zunächst absatzweise Versuche der mit SCL6B-ItBA (Charge #1) gepackten Säule durchgeführt. In diesem Falle konnte mit einer maximalen interstitiellen Geschwindigkeit der mobilen Phase  $v_{\text{int}} = 680 \text{ cm h}^{-1} = 1,89 \text{ mm s}^{-1}$  ( $\dot{V}_{\text{mob}} = 1 \text{ ml min}^{-1}$ ) gearbeitet werden. Höhere Flussraten wurden aufgrund der eingeschränkten Druckstabilität der Partikel nicht angewendet. In den beiden ersten dargestellten Versuchen wurde die Säule mit Lactoferrin beladen, für  $5 \text{ CV}$  mit reinem Puffer gewaschen (Abschnitt I) und anschließend durch insgesamt  $n=8$  Verfahrungen der Kühlzone Protein eluiert (Abschnitt II). Die Geschwindigkeit der Kühlzone

wurde hierbei auf  $v_{TCZR} = 0,4 \text{ mm s}^{-1}$  (entspricht etwa 21 % von  $v_{int}$ ) oder  $v_{TCZR} = 0,1 \text{ mm s}^{-1}$  (entspricht etwa 5,3 % von  $v_{int}$ ) eingestellt. Die resultierenden Chromatogramme sind in Abbildung 6-19A bzw. Abbildung 6-19B dargestellt. Da die zur Aufzeichnung von acht Verfahrenen benötigte Elutionszeit in Abschnitt II mit abnehmender  $v_{TCZR}$  zunimmt, wurde im Falle der Verfahren mit  $v_{TCZR} = 0,1 \text{ mm s}^{-1}$  entsprechend deutlich länger eluiert (Volumen an mobiler Phase liegt bei 180 mL bzw. 320 mL). Der Zeitraum einer Verfahren der Kühlzone in Richtung der Flußrichtung der mobilen Phase wird, wie auch in allen folgenden Chromatogrammen, durch die grauen Hintergründe im Chromatogramm dargestellt.



**Abbildung 6-19: Chromatogramme einer achtfachen Verfahren der Kühlzone über die mit SCL6B-ItBA gefüllte Trennsäule. Dabei wurde mit je 76,5 mL Lactoferrinlösung ( $c_f = 2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) beladen, die eluierten Proteinpeaks wurden als P1 - P8 bezeichnet. (A)  $v_{TCZR} = 0,4 \text{ mm s}^{-1}$ ; (B)  $v_{TCZR} = 0,1 \text{ mm s}^{-1}$ . Die grauen Hintergründe markieren den Zeitraum einer Verfahren der Kühlzone. Abschnitte: (I) Beladung und Waschen; (II) TCZR-Elution; (III) Elution mit 1 M NaCl.**

Den Chromatogrammen kann entnommen werden, dass nach der Beladung mit Lactoferrin ein Plateauwert nicht ganz erreicht wurde und der anschließende Waschschritt nicht zu einer Basislinienrückkehr ausreichte, da das Protein offensichtlich zu starke Bindungsaffinität zeigte (vgl. beide Abschnitte I). Im Falle der Verfahren mit  $v_{TCZR} = 0,4 \text{ mm s}^{-1}$  waren nach Abschluss von Abschnitt I noch 102,7 mg Lactoferrin auf der Säule gebunden, im Falle von  $v_{TCZR} = 0,1 \text{ mm s}^{-1}$  noch 101,8 mg. Anschließend konnte in beiden Experimenten Lactoferrin in scharfen Peaks von der Säule eluiert und nach jeder Elution zudem eine Rückkehr zur Basislinie beobachtet werden. Dadurch konnte das erdachte Konzept des Sandwich-Aufbaus der Temperaturzone und der zur Peakschärfung dienenden wärmeren äußeren Kupferblöcke (vgl. Abschnitt 6.4) bestätigt werden. Das Profil der Elutionspeaks hängt somit entsprechend von Form und Ausführung der

Temperaturzone und weniger von der Qualität der Sorbenspackung ab. Eine Abnahme der Fläche der Proteinpeaks von P1 - P8 ist in beiden Fällen ersichtlich, wobei die Menge an eluiertem Protein in jedem Elutionspeak gemessen wurde und in Tabelle 6-15 dargestellt ist. Durch Abkühlung des Sorbens konnte erwartungsgemäß nicht das komplette Protein eluiert werden. Die Menge an eluiertem Protein durch Erhöhung der Salzkonzentration der mobilen Phase auf 1 M NaCl (Abschnitt III) ist ebenfalls in der Tabelle angegeben. Zusätzlich zu den eluierten Proteinmassen sind die eluierten Mengen auch auf die Gesamtmenge an Protein bezogen, die nach Abschluss von Abschnitt I noch fest auf der Säule gebunden waren.

**Tabelle 6-15: Eluierte Mengen an Lactoferrin (LF) während der absatzweisen Anwendung des TCZR-Systems und acht Verfahrungen der Kühlzone über die mit SCL6B-ItBA gefüllte Trennsäule bei unterschiedlichen  $v_{TCZR}$  von  $0,4 \text{ mm s}^{-1}$  und  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$ .**

TCZR-Test: $n=8$ ; $v_{TCZR}= 0,4 \text{ mm s}^{-1}= 0,21 v_{int}$											
Abschnitt	II								III		
Peak#	P1	P2	P3+P4	P5	P6+P7	P8	Summe	Salz	Massenbilanz		
LF, mg	13,6	8,6	7,5	4,3	2,7	1,8	38,6	54,3	-		
LF, %*	13,3	8,3	7,3	4,2	2,7	1,8	37,6	53,2	90,8		

TCZR-Test: $n=8$ ; $v_{TCZR}= 0,1 \text{ mm s}^{-1}= 0,05 v_{int}$											
Abschnitt	II								III		
Peak#	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Summe	Salz	Massenbilanz
LF, mg	32,6	10	5,6	3,8	2,8	2	1,6	1,5	59,9	32,8	-
LF, %*	32	9,8	5,5	3,7	2,8	2	1,6	1,5	58,9	32,3	91,1

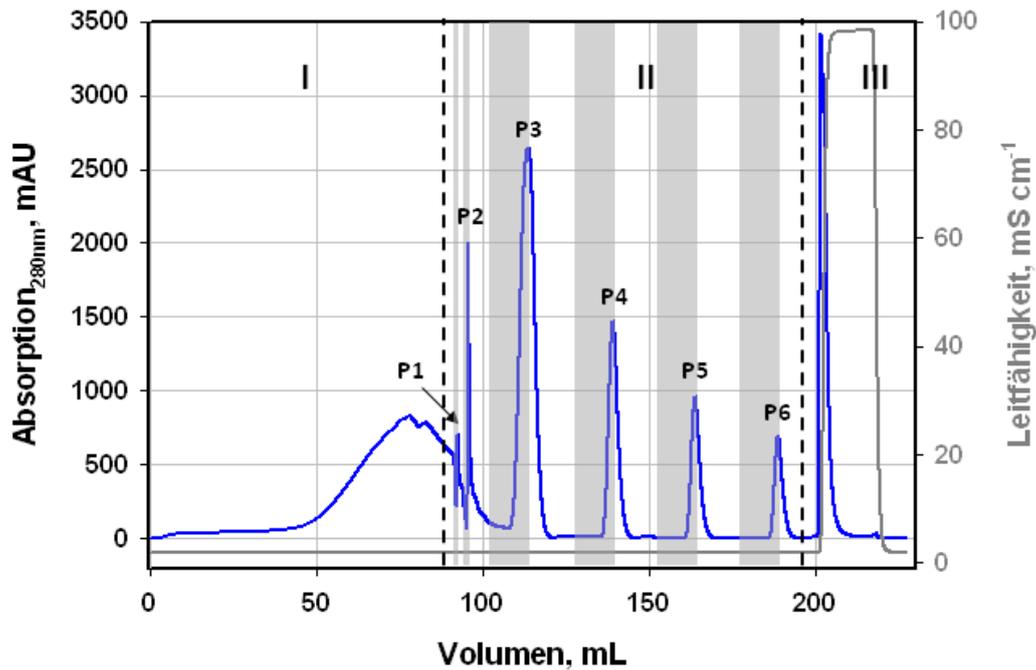
\* Bezogen auf die Menge an fest gebundenem Protein nach Abschnitt I (102,7 mg bzw. 101,8 mg).

Obleich in beiden Fällen nach Beladung und Waschschrift nahezu identische Mengen an Protein noch auf der Säule verblieben waren, konnten drastische Unterschiede zwischen den beiden Experimenten festgestellt werden. Im Falle von  $v_{TCZR}= 0,4 \text{ mm s}^{-1}$  konnten insgesamt lediglich 37,6 % des gebundenen Proteins durch acht Verfahrungen der Temperaturzone eluiert werden, wobei alleine die erste Verfarung 13,3 % erreicht. Im Falle der geringeren Verfahrgeschwindigkeit der Temperaturzone von  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$  konnten hingegen insgesamt 58,9 % an Lactoferrin eluiert werden. Die erste TCZR-Verfarung erreichte hierbei den Hauptanteil von 32 %, die Abnahme der eluierten Lactoferrinmengen in den nacheinander folgenden Elutionspeaks erfolgte zudem deutlicher. Nach acht Verfahrungen der Temperaturzone war somit im Falle der höheren  $v_{TCZR}$  noch mehr Protein auf der Säule verblieben. Die Höhe des jeweils ersten Peaks war

noch nahezu gleich. Die weiteren Peaks sind aufgrund der unterschiedlichen Restbeladung nicht vergleichbar. Die Massenbilanz konnte in beiden Fällen nicht ganz geschlossen werden (90,8 % bzw. 91,1 %) was die Notwendigkeit einer anschließenden Regeneration der Säule nochmals verdeutlicht.

Auffällig ist, dass bei den gewählten Bedingungen nicht die gesamte eluierbare Menge an Protein in einem einzigen Elutionsschritt eluiert werden konnte. Wie im Anhang ersichtlich, konnte auch nach  $n=16$  Verfahrungen der Temperaturzone noch immer Protein eluiert werden (vgl. Abbildung 9-72). Eine Erklärung kann in der porösen Struktur der chromatographischen Basispartikel gefunden werden. Unter der Annahme, dass die Flüssigkeit innerhalb der Partikelporen unbewegt ist [156], müssen desorbierte Proteine zunächst aus den Poren diffundieren um in das Zwischenkornvolumen zu gelangen und konvektiv aus der Säule transportiert zu werden. Dieses im Allgemeinen als Ursache für dispersive Effekte in der Chromatographie verantwortliche Phänomen [156] scheint auch die Effizienz des TCZR-Systems zu mindern. Ist die benötigte Zeit zur Diffusion der desorbierten Proteine aus den Partikeln größer als die eigentliche Kontaktzeit der Kühlzone mit diesem Partikel, kommt es zu einem Temperaturanstieg und einer folgenden erneuten Adsorption der Proteine innerhalb der Partikel, bevor sie in die umgebende mobile Phase eluieren konnten. Erhöht man nun die Verfahrensgeschwindigkeit der Kühlzone  $v_{TCZR}$ , wird die Kontaktzeit zu den Partikeln gesenkt und es kann weniger Protein eluieren. Offensichtlich war in den gezeigten Experimenten die Kontaktzeit zu den Partikeln selbst bei  $v_{TCZR} = 0,1 \text{ mm s}^{-1}$  (entspricht etwa 180 Sekunden) noch nicht ausreichend, um innerhalb einer einzigen Verfahrung die maximale Menge an Protein zu eluieren.

Um den Effekt des Einflusses von  $v_{TCZR}$  in einem weiteren Bereich von  $v_{TCZR}$  quantitativ zu untersuchen, wurde im Anschluss ein Experiment durchgeführt, bei dem innerhalb mehrerer Verfahrungen unterschiedliche  $v_{TCZR}$  eingesetzt wurden. Abbildung 6-20 zeigt das entsprechende Chromatogramm, bei dem nach Beladungs- und Waschschrift die Temperaturzone in Abschnitt II insgesamt sechsmal über die Säule bewegt wurde. Während der ersten Verfahrung wurde hierbei eine Verfahrensgeschwindigkeit der Kühlzone von  $1,9 \text{ mm s}^{-1}$  (entspricht 100 % der Geschwindigkeit  $v_{int}$ ) gewählt, während der zweiten Verfahrung  $1 \text{ mm s}^{-1}$  (entspricht etwa 53 % von  $v_{int}$ ) und während der Verfahrungen 3-6 betrug  $v_{TCZR} = 0,1 \text{ mm s}^{-1}$  (entspricht 5,3 % von  $v_{int}$ ). Da sich die Proteinpeaks P4 - P6 wieder ähnlich verhalten wie in den beiden vorherigen Experimenten, werden zum Vergleich der unterschiedlichen Kühlzonengeschwindigkeiten vor allem P1 - P3 näher betrachtet.



**Abbildung 6-20: Chromatogramm einer sechsfachen Verfahrungs der Kühlzone über die mit SCL6B-ItBA gefüllte Trennsäule. Dabei wurde mit 76,5 mL Lactoferrinlösung ( $c_f=2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) beladen, die eluierten Proteinpeaks wurden als P1 - P6 bezeichnet.  $v_{\text{TCZR}}$  betrug  $1,9 \text{ mm s}^{-1}$  im Falle von P1,  $1 \text{ mm s}^{-1}$  für P2 und  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$  für P3-P6. Die grauen Hintergründe markieren eine Verfahrungs der Kühlzone. Abschnitte: (I) Beladung und Waschen; (II) TCZR-Elution; (III) Elution mit 1 M NaCl.**

Die Säule wurde in Abschnitt I beladen und gewaschen, wobei in diesem Falle nach dem Waschschrift noch 108,8 mg Lactoferrin in der Säule verbleiben. Entsprechend der schnelleren Verfahrungs der Kühlzone, nimmt auch die Kontaktzeit zur Säule ab und die grauen Balken im Diagramm verdünnen sich. Während im Falle von P1 nur eine schwache Zunahme des UV-Absorptionssignals und keine Rückkehr zur Basislinie feststellbar waren, nahmen diese Effekte in P2 zu und waren am stärksten ausgeprägt in P3, obgleich die Kühlzone schon zweifach über die Trennsäule verfahren und Protein bereits eluiert wurde. Tabelle 6-16 stellt die eluierten Proteinmengen innerhalb dieses Versuches dar.

Während kaum Protein während der Verfahrungs der Kühlzone mit  $v_{\text{TCZR}}= 1,9 \text{ mm s}^{-1}$  festgestellt werden konnte, stieg dieser Wert von etwa 3 % des gebundenen Proteins bei  $1 \text{ mm s}^{-1}$  auf bis zu 27 % des gebundenen Proteins in P3 bei Verfahrungs mit  $v_{\text{TCZR}}= 0,1 \text{ mm s}^{-1}$ . In den Peaks 4 bis 6 konnte anschließend wieder eine sukzessive Abnahme der eluierten Proteinmengen beobachtet werden.

**Tabelle 6-16: Eluierte Mengen an Lactoferrin (LF) während der absatzweisen Anwendung des TCZR-Systems und sechs Verfahrenen der Kühlzone über die mit SCL6B-ItBA gefüllte Trennsäule bei unterschiedlichen  $v_{TCZR}$  von  $1,9 \text{ mm s}^{-1}$  (P1),  $1 \text{ mm s}^{-1}$  (P2) und  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$  (P3-P6).**

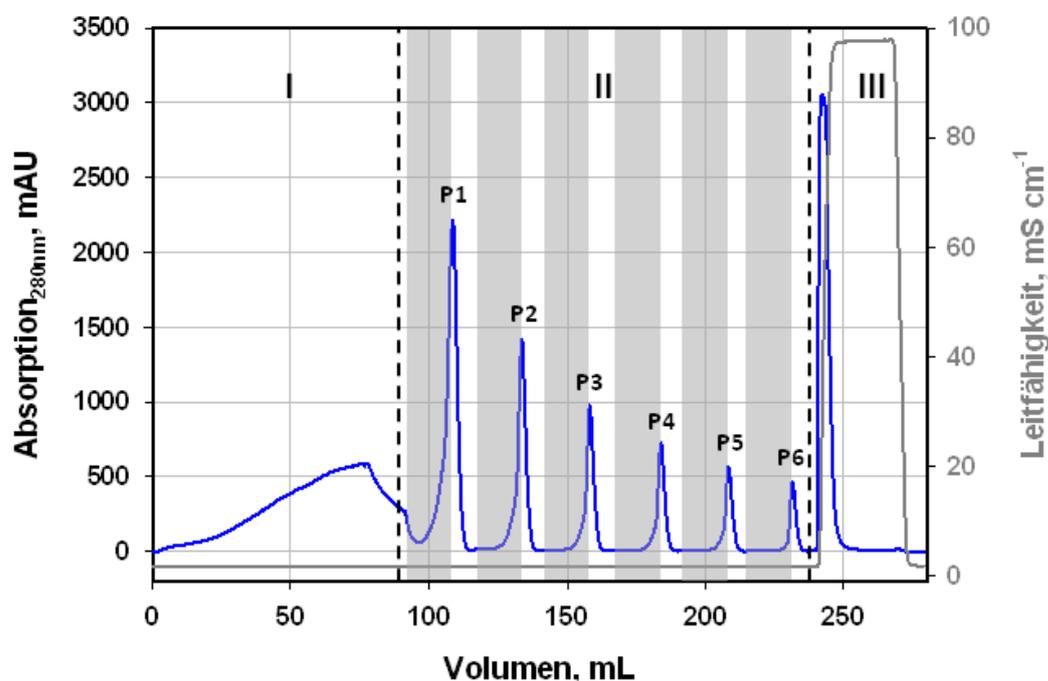
Abschnitt	II							III	Massenbilanz	
	Peak#	P1	P2	P3	P4	P5	P6	Summe		Salz
LF, mg	<0,01	3,3	29,3	9,6	5,4	3,7		51,3	41,3	-
LF, %*	<0,01	3	27	8,8	5	3,4		47,2	38	85,2

\* Bezogen auf die Menge an fest gebundenem Protein nach Abschnitt I (108,8 mg).

Die Tatsache, dass bei Angleichung der beiden Geschwindigkeiten  $v_{TCZR}$  und  $v_{int}$  kaum Protein eluiert werden konnte (Peak P1), zeigt, dass in diesem Fall die Gefahr besteht, dass desorbiertes Protein aufgrund der hohen  $v_{TCZR}$  in Bereiche hinter der Kühlzone zurückfällt und wieder adsorbiert. Dies liegt zum einen an der unzureichenden Kontaktzeit und dem bereits diskutierten Einfluss der Porendiffusion, zum anderen aber auch daran, dass entsprechend der ermittelten Isothermendaten auch bei Elutionstemperatur noch Bindungsaffinität der Proteine zum Sorbens vorliegt. Dadurch ist die Geschwindigkeit der Konzentrationsfront noch geringer, bereits eluiertes Protein fällt bei steigenden Werten für  $v_{int}$  vermehrt in Bereiche hinter der Kühlzone zurück und adsorbiert erneut. Betrachtet man sich die großen Unterschiede in der Masse an eluiertem Protein während der verschiedenen Temperaturzonenverfahren sind diese Unterschiede aber nicht allein durch die genannten Einflussfaktoren zu erklären. Ein weiterer, bis dato vernachlässigter Aspekt, ist die Kinetik der Wärmeübertragung der Kühlzone, die bereits in Kapitel 6.4 besprochen wurde. So kann im Falle einer  $v_{TCZR} = 1,9 \text{ mm s}^{-1}$  eine Kühlzonen temperatur in der Säule von nur  $26^\circ\text{C}$ , im Falle von  $v_{TCZR} = 1 \text{ mm s}^{-1}$   $22,5^\circ\text{C}$  und nur bei  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$  eine minimale Kühlzonen temperatur von  $12,4^\circ\text{C}$  erreicht werden (nur  $v_{TCZR} = 0,1 \text{ mm s}^{-1}$  ist kleiner als  $v_{TCZR,krit}$ ). Die verringerten Temperaturdifferenzen zur Umgebungstemperatur mit zunehmender  $v_{TCZR}$  verringern auch die Unterschiede der temperaturabhängigen Gleichgewichtseinstellungen, sodass weniger Protein eluiert werden kann.

Um den Einfluss der Wärmeübergangskinetik auf die Trennung innerhalb des TCZR-Systems quantitativ abschätzen zu können, wurde daher ein weiteres Experiment entsprechend Abbildung 6-21 durchgeführt und mit dem Versuch aus Abbildung 6-19A verglichen. Hierbei wurde bei einer Verfahrensgeschwindigkeit der Kühlzone von  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$  die Leistung der Kühlzone so eingestellt, dass eine minimale Kühlzonen temperatur von  $16,4^\circ\text{C}$  erreicht wurde. Dies entspricht der minimalen

Kühlzonentemperatur bei einer  $v_{TCZR}$  von  $0,4 \text{ mm s}^{-1}$ . Dadurch wurde bei gleichbleibender Massentransportkinetik lediglich die Änderung der Temperatur betrachtet.



**Abbildung 6-21:** Chromatogramm einer sechsfachen Verfahrungs der Kühlzone über die mit SCL6B-ItBA gefüllte Trennsäule. Dabei wurde mit 76,5 mL Lactoferrinlösung ( $c_f=2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) beladen, die eluierten Proteinpeaks wurden als P1-P6 bezeichnet.  $v_{TCZR}$  betrug  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$ . Die grauen Hintergründe markieren eine Verfahrungs der Kühlzone. Abschnitte: (I) Beladung und Waschen; (II) TCZR-Elution; (III) Elution mit 1 M NaCl.

Erneut konnte nach allen sechs Verfahrungs Protein eluiert werden, wobei die Peakprofile sich vom Vergleichsversuch deutlich unterscheiden. Dies erklärt sich durch die nicht maximal eingestellten Leistungen der Peltierelemente. Innerhalb der Säule entstanden neben einer geringeren minimalen Temperatur auch weniger stark ausgeprägte Temperaturerhöhungen durch die äußeren Kupferblöcke. Dies resultierte in weniger scharfen Peaks mit leichter Tendenz zum Fronting. Vergleicht man die eluierten Proteinmengen von P1 - P6 aus Abbildung 6-21A mit den Mengen dieses Versuches kann festgestellt werden, dass bei maximaler Peltierleistung 56,8 mg Protein eluiert werden konnte, während in diesem Versuch lediglich 50,3 mg eluiert wurden. Es wird deutlich, dass die Abnahme von  $\phi_{\text{Säule,min}}$  um lediglich  $4^\circ\text{C}$  zu einem Unterschied an 6,5 mg Protein führt und damit in diesem Fall etwa 9 % der gesamten eluierten Proteinmenge ausmacht. Größere Unterschiede der erreichbaren Temperaturdifferenzen haben daher erheblichen Einfluss auf die TCZR-Effizienz, wobei dieser Anteil vor allem durch die Thermoresponsivität der

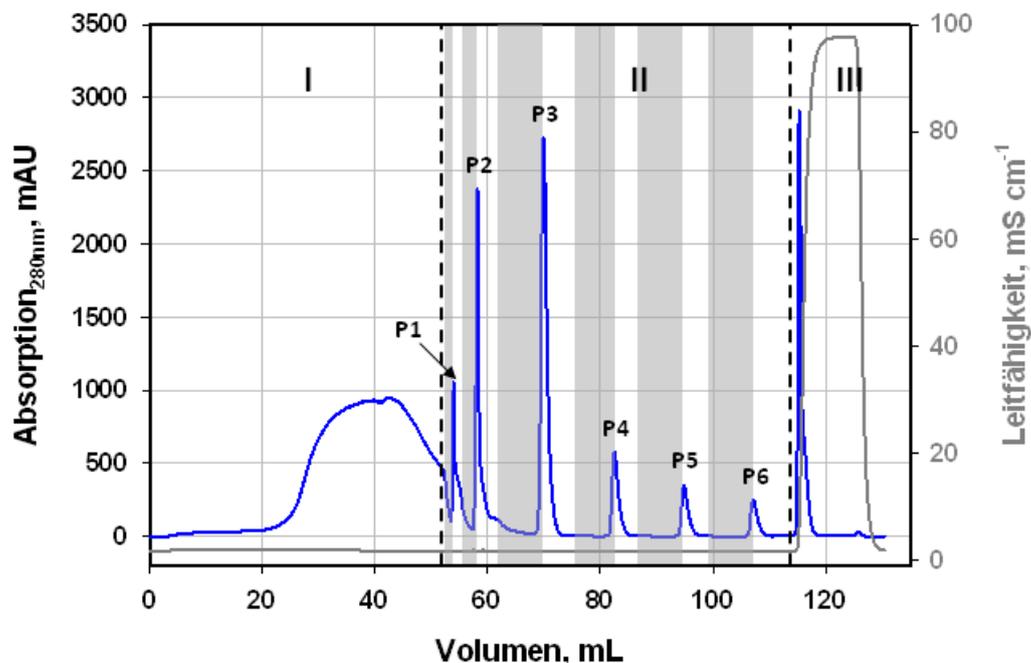
verwendeten Sorbentien definiert wird. Um den Einfluss des Wärmeüberganges daher im Einzelfall zu bestimmen, müsste diese Art an Experimenten mit einer höheren Anzahl unterschiedlicher Kühlleistungen durchgeführt werden. Im vorliegenden Fall kann allerdings davon ausgegangen werden, dass die eingeschränkte Porendiffusion während der Elution das System insgesamt stärker beeinflusst, als der Temperaturunterschied von 4°C. Dies wird vor allem dadurch offenbar, dass erneut ein Großteil der eluierbaren Proteinnmenge nicht in einem einzigen Verfahrensschritt eluiert werden konnte.

### 6.5.2 Absatzweise Untersuchung mit S6pg-ItBA

Im folgenden Abschnitt werden Ergebnisse der absatzweisen Beladung einer mit S6pg-ItBA (Charge #1) gepackten Trennsäule innerhalb des Systems betrachtet. Ausschlaggebend für die Wahl der auf Basis von S6pg hergestellten thermoCEX-Partikel waren zwei Faktoren. Zum einen die durch Isothermenexperimente bestimmten maximalen Affinitätsunterschiede unter den drei produzierten thermoCEX-Partikeln. Zum anderen auch die Tatsache, dass S6pg-Partikel die kleinsten verwendeten Basispartikel darstellten. Da diese Partikel damit auch die geringsten Porenpfadlängen aufweisen, sollte die zur Diffusion benötigte Zeit zuvor desorbierter Proteine verringert und die im vorigen Abschnitt als limitierender Faktor vorgestellte Massentransportlimitierung durch eingeschränkte Porendiffusion dadurch minimiert werden. In allen Versuchen mit S6pg-ItBA konnte aufgrund der eingeschränkten Druckstabilität der Basispartikel nur mit einer  $v_{\text{int}} = 230 \text{ cm h}^{-1} = 0,64 \text{ mm s}^{-1}$  ( $\dot{V}_{\text{mob}} = 0,5 \text{ mL min}^{-1}$ ) gearbeitet werden.

Analog zum in Abbildung 6-20 erläuterten Chromatogramm wurde ein ähnlicher Versuch durchgeführt, bei dem nach vollständiger Beladung des Adsorbens und anschließendem Auswaschen nur schwach gebundener Komponenten (Abschnitt I), Protein in Abschnitt II durch sechsfache Verfahrung der Kühlzone mit unterschiedlichen  $v_{\text{TCZR}}$  und verbliebenes Protein durch Beaufschlagung mit 1 M NaCl in Abschnitt III von der Säule eluiert wurde. Von den 74,4 mg aufgegebenem Lactoferrin waren nach Abschnitt I noch 34,65 mg auf der Säule verblieben. Während bei der ersten Verfahrung eine Geschwindigkeit von  $0,6 \text{ mm s}^{-1}$  (entspricht etwa 94 % von  $v_{\text{int}}$ ) gewählt wurde, betrug dieser Wert bei der zweiten Verfahrung nur noch  $0,3 \text{ mm s}^{-1}$  (entspricht etwa 46,9 % von  $v_{\text{int}}$ ) und  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$  (entspricht etwa 16 % von  $v_{\text{int}}$ ) bei den restlichen vier Verfahrungen. Ähnlich wie bei den Experimenten einer mit SCL6B-ItBA gefüllten Trennsäule nahm die Menge an eluiertem Protein mit abnehmender  $v_{\text{TCZR}}$  deutlich zu. Auch hierbei führte die Verringerung der Kühlzonengeschwindigkeit zu einer positiven Beeinflussung der Proteinelution mittels des TCZR-Systems. Im betrachteten Chromatogramm konnte allerdings schon im ersten

Elutionspeak (P1) selbst bei fast identischer Geschwindigkeit zu  $v_{\text{int}}$  eine deutliche Menge an Protein eluiert werden kann. Eine Auflistung der in den einzelnen Proteinpeaks eluierten Lactoferrinmengen ist in Tabelle 6-17 zu finden.



**Abbildung 6-22:** Chromatogramm einer sechsfachen Verfahrung der Kühlzone über die mit S6pg-ItBA gefüllte Trennsäule. Dabei wurde mit 37,2 mL Lactoferrinlösung ( $c_f=2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) beladen, die eluierten Proteinpeaks wurden als P1 - P6 bezeichnet.  $v_{\text{TCZR}}$  betrug  $0,6 \text{ mm s}^{-1}$  im Falle von P1,  $0,3 \text{ mm s}^{-1}$  für P2 und  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$  für P3 - P6. Die grauen Hintergründe markieren eine Verfahrung der Kühlzone. Abschnitte: (I) Beladung und Waschen; (II) TCZR-Elution; (III) Elution mit 1 M NaCl.

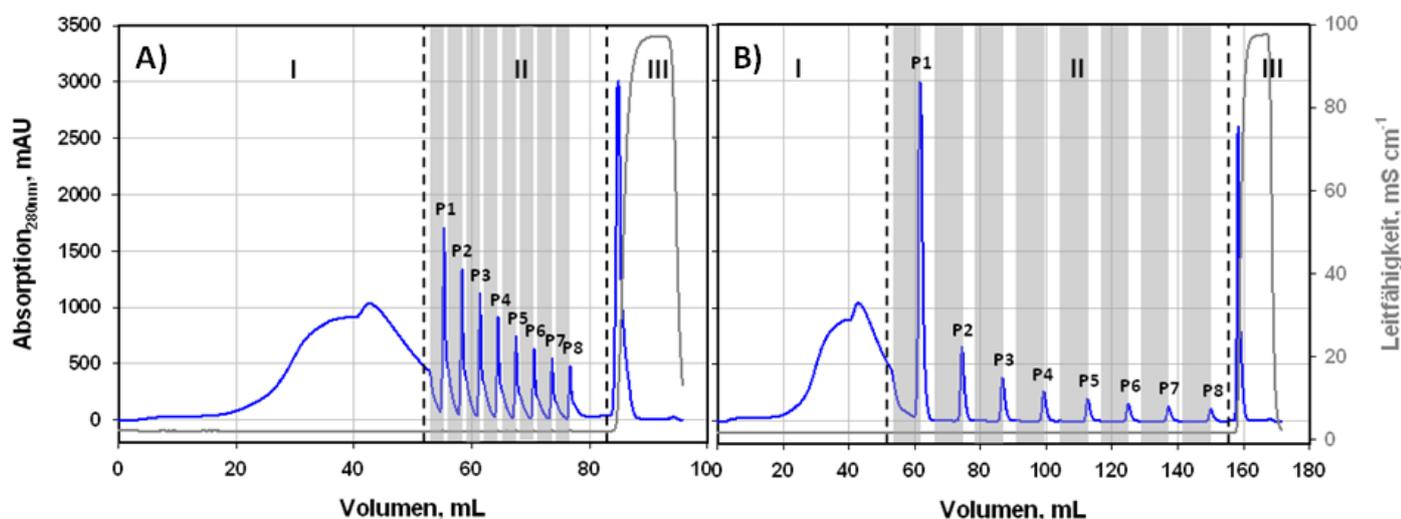
Ein Anstieg der auf das ursprünglich gebundene Protein bezogenen, relativen Elutionsmengen in den Peaks von 8 % in P1 auf maximal 28,8 % in P3 ist zu erkennen, wobei selbst in P2 19,2 % eluiert werden konnten. Insgesamt konnten 65,5 % des zuvor gebundenen Proteins alleine durch die sechs Temperaturzonenverfahren eluiert werden.

**Tabelle 6-17: Eluierte Mengen an Lactoferrin (LF) während der absatzweisen Anwendung des TCZR-Systems und sechs Verfahrenen der Kühlzone über die mit 56pg-ItBA gefüllte Trennsäule bei unterschiedlichen  $v_{TCZR}$  von  $1,9 \text{ mm s}^{-1}$  (P1),  $1 \text{ mm s}^{-1}$  (P2) und  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$  (P3-P6).**

Abschnitt	II						III		
Peak#	P1	P2	P3	P4	P5	P6	Summe	Salz	Massenbilanz
LF, mg	2,8	6,6	10	1,8	0,9	0,7	22,7	10,2	-
LF, %*	8	19,2	28,8	5,1	2,6	1,9	65,5	29,3	94,8

\* Bezogen auf die Menge an fest gebundenem Protein nach Abschnitt I (34,65 mg).

Ebenfalls wurden zwei weitere Experimente analog zu den in Abbildung 6-19 gezeigten Chromatogrammen durchgeführt, bei der die Temperaturzone achtfach bei konstanten Verfahrensgeschwindigkeiten über die Säule bewegt wurde. Abbildung 6-23A zeigt hierbei das Ergebnis bei einer  $v_{TCZR}$  von  $0,4 \text{ mm s}^{-1}$  (entspricht 62,5 % von  $v_{int}$ ), Abbildung 6-23B bei einer  $v_{TCZR}$  von  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$  (entspricht 15,6 % von  $v_{int}$ ).



**Abbildung 6-23: Chromatogramme einer achtfachen Verfahren der Kühlzone über die mit 56pg-ItBA gefüllte Trennsäule . Dabei wurde mit je 37,2 mL Lactoferrinlösung ( $c_f = 2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) beladen, die eluierten Proteinpeaks wurden als P1 - P8 bezeichnet. (A)  $v_{TCZR} = 0,4 \text{ mm s}^{-1}$ . (B)  $v_{TCZR} = 0,1 \text{ mm s}^{-1}$ . Die grauen Hintergründe markieren den Zeitraum einer Verfahren der Kühlzone. Abschnitte: (I) Beladung und Waschen; (II) TCZR-Elution; (III) Elution mit 1 M NaCl.**

Die Menge an fest gebundenem Protein nach Abschnitt I war in beiden Fällen relativ identisch und betrug 33,6 mg Lactoferrin ( $v_{TCZR} = 0,1 \text{ mm s}^{-1}$ ) bzw. 33,5 mg ( $v_{TCZR} = 0,4 \text{ mm s}^{-1}$ ). In beiden Fällen konnte Protein nach jeder Bewegung des TCZR desorbiert und in scharfen Elutionspeaks eluiert

werden. Während jedoch im Falle einer höheren  $v_{TCZR}$  von  $0,4 \text{ mm s}^{-1}$  kein vollständiger Rückgang des UV-Absorptionssignals auf die Basislinie feststellbar war, konnte dies bei der geringeren Verfahrensgeschwindigkeit erreicht werden. Zudem wurde bereits in P1 deutlich mehr Protein eluiert und die maximale Peakhöhe (bis etwa 3000 mAU) spricht für eine deutlichere Aufkonzentrierung. Die deutliche Abnahme der Peakfläche von P1 zu allen weiteren Proteinpeaks P2 - P8 beschreibt außerdem die optimierten Betriebsbedingungen des Systems. In Tabelle 6-18 werden die in allen Elutionspeaks eluierten Proteinmassen der beiden Versuche aufgelistet und erneut in Verbindung zur Menge an fest gebundenem Lactoferrin gesetzt.

**Tabelle 6-18: Eluierte Mengen an Lactoferrin (LF) während der absatzweisen Anwendung des TCZR-Systems und acht Verfahrungen der Kühlzone über die mit S6pg-IbBA gefüllte Trennsäule bei unterschiedlichen  $v_{TCZR}$  von  $0,4 \text{ mm s}^{-1}$  und  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$ .**

TCZR-Test: $n=8$ ; $v_{TCZR} = 0,4 \text{ mm s}^{-1} = 0,625 v_{int}$											
Abschnitt	II									III	
Peak#	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Summe	Salz	Massenbilanz
LF, mg	3,2	2,7	2,1	1,7	1,3	1,1	0,9	0,8	13,9	17,2	-
LF, %*	9,6	8,2	6,3	5	4	3,2	2,8	2,5	41,5	51,4	93
TCZR-Test: $n=8$ ; $v_{TCZR} = 0,1 \text{ mm s}^{-1} = 0,16 v_{int}$											
Abschnitt	II									III	
Peak#	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Summe	Salz	Massenbilanz
LF, mg	16,2	1,9	0,8	0,7	0,5	0,4	0,4	0,3	20,9	10,3	-
LF, %*	48,2	5,6	2,4	2	1,4	1,2	1,1	0,8	62,7	30,5	93,2

\* Bezogen auf die Menge an fest gebundenem Protein nach Abschnitt I (33,5 mg bzw. 33,6 mg).

Die gemessenen Proteinmengen bestätigen die bereits geschilderten Resultate der beiden Experimente. In beiden Fällen konnte Protein eluiert werden, die Proteinmenge nahm jedoch sukzessive mit jeder weiteren Verfahrung der Temperaturzone ab. Während bei einer Geschwindigkeit von  $v_{TCZR} = 0,4 \text{ mm s}^{-1}$  maximal 3,2 mg Lactoferrin im ersten Proteinpeak eluiert werden konnte, betrug dieser Wert 16,2 mg im Falle der geringeren Verfahrensgeschwindigkeit. Dieser Wert entspricht 48,2 % der gesamten gebundenen Proteinmenge und damit deutlich mehr als in allen bisherigen Versuchen. Insgesamt konnten 62,7 % des gebundenen Proteins alleine durch die acht Verfahrungen in diesem Falle desorbiert werden, das heißt, dass alleine die erste Verfahrung den Hauptanteil mit 77,5 % daran ausmacht. Dies macht deutlich, dass wie erhofft durch Wahl einer geringen  $v_{TCZR}$  zur Maximierung der Kontaktzeit der Kühlzone mit den gepackten

Partikeln, in Kombination mit kleinen porösen Adsorbentien, die Porendiffusionslimitierung während der TCZR-Elution minimiert werden konnte und das Ziel einer maximalen Proteinelution in nur einem einzigen Verfahrensschritt nahezu erreicht werden konnte.

### 6.5.3 Fazit und Vergleich der eingesetzten thermoCEX-Partikel

Generell ist zunächst festzustellen, dass die absatzweisen Experimente mit SCL6B-ItBA und S6pg-ItBA grundsätzliche Vorteile der Verwendung eines TCZR für die thermoresponsive Chromatographie offenbaren. Als Hauptvorteile gegenüber der konventionellen thermoresponsiven Chromatographie (vgl. Abschnitt 6.3) sind die scharfen und hochkonzentrierten Proteinpeaks unter Vermeidung von Tailingverhalten zu nennen. Zur Auslegung eines optimierten Prozesses mit dem TCZR-System hat sich herausgestellt, dass vor allem der Wärmeübergang der Temperaturzone auf das Adsorbens und die langsame Porendiffusion während der Elution mit der Temperaturzone von größter Bedeutung sind. Eine Verringerung der Geschwindigkeit der Kühlzone bei konstanter interstitieller Geschwindigkeit der mobilen Phase, bzw. allgemeiner ausgedrückt, ein hohes Verhältnis von  $v_{\text{int}}$  zu  $v_{\text{TCZR}}$ , haben sich als vorteilhaft erwiesen, da größere Temperaturunterschiede erreicht werden und die Kontaktzeit der Kühlzone mit den Partikeln erhöht wird.

Neben diesen Gemeinsamkeiten bei Anwendung der Sorbentien im TCZR-System konnten durch die Daten aber auch deutliche Unterschiede der verwendeten Materialien gezeigt werden. Da aufgrund unterschiedlichen Proteinadsorptionsverhaltens auch unterschiedliche Proteinmengen auf den Materialien adsorbierten, kann der Vergleich der Partikel am besten durch die prozentual eluierten Proteinmengen bezogen auf das ursprünglich gebundene Lactoferrin ausgedrückt werden. Besonders auffällig war hierbei, dass bei Verwendung der kleineren S6pg-ItBA Partikel ein deutlich höherer Anteil per Temperaturzonenverfahren bei gleicher  $v_{\text{TCZR}}$  eluiert werden konnte. Beispielhaft sind hier 48,2 % eluierten Proteins in P1 bei einer Geschwindigkeit von  $v_{\text{TCZR}}=0,1 \text{ mm s}^{-1}$  für S6pg-ItBA im Vergleich zu lediglich 32 % für SCL6B-ItBA zu nennen. Wie bereits an entsprechender Stelle erwähnt, ist dies ein weiteres Indiz für die vorhandene Massentransportlimitierung während der Proteinelution und deren Verringerung durch kleinere Basispartikel. Bedenkt man zusätzlich, dass im Falle von S6pg-ItBA aufgrund von Druckinstabilitäten die Geschwindigkeit der mobilen Phase deutlich reduziert werden musste und dadurch das Verhältnis von  $v_{\text{int}}$  zu  $v_{\text{TCZR}}$  reduziert wurde, treten die Vorteile der kleineren S6pg-ItBA-Partikel noch deutlicher in den Vordergrund, da bei gleichen  $v_{\text{TCZR}}/v_{\text{int}}$ -Verhältnissen mit noch stärkeren Vorteilen der S6pg-ItBA-Partikel zu rechnen wäre. Das Ziel einer maximalen

Proteinelution mit einer einzigen Verfahrnung der Temperaturzone ist daher im verwendeten System und den gegebenen Rahmenbedingungen vor allem mit den kleineren Basispartikeln und einer möglichst geringen  $v_{TCZR}$  erreichbar.

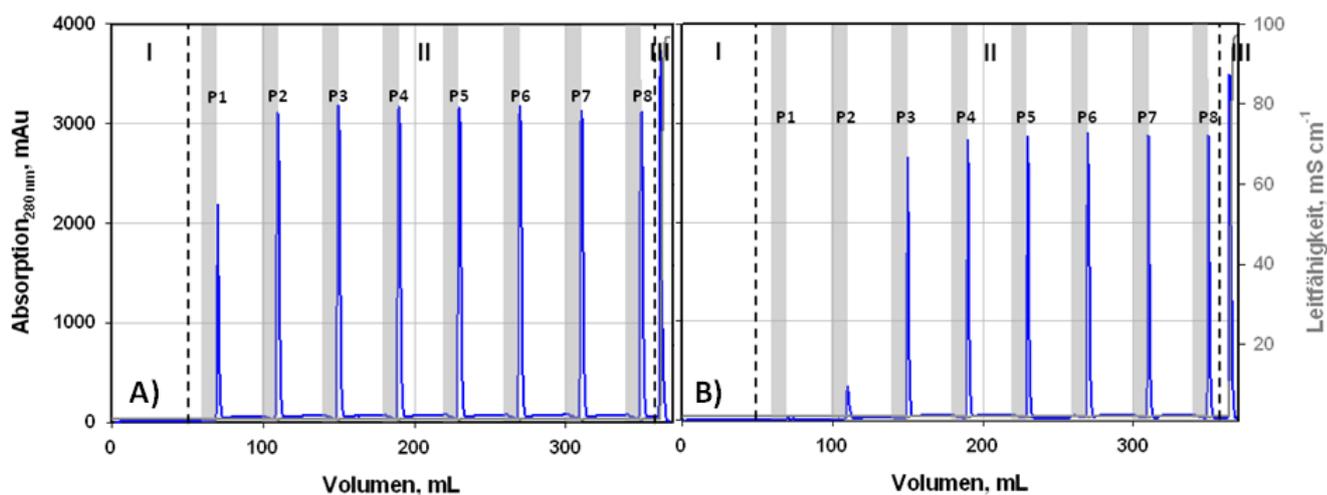
## **6.6 Kontinuierliche Anwendung des TCZR**

Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der Diskussion erster experimenteller Ergebnisse der kontinuierlichen Anwendung des TCZR-Systems. Zur grundsätzlichen Charakterisierung wurde hierbei zunächst in den Abschnitten 6.6.1 und 6.6.2 mit Lactoferrin als einziger Komponente gearbeitet. Abschnitt 6.6.3 beschäftigt sich dann mit experimentellen Ergebnissen zur kontinuierlichen Aufreinigung eines binären Proteingemisches. Entsprechend der Beschreibung aus Abschnitt 5.14 wurden die Umgebungsbedingungen gewählt und die Versuchsdurchführung gestaltet. So wurde bei einer Umgebungstemperatur von  $\Phi_u = 35^\circ\text{C}$  und einer konstanten Zulaufkonzentration  $c_f$  die Temperaturzone zu definierten Zeitpunkten nach 60, 100, 140, 180, 220, 260, 300 und 340 mL aufgegebener mobiler Phase gestartet und komplett über die Säule verfahren. Eine Ausnahme bildete hier das in Abschnitt 6.6.2 dargestellte Experiment, das an entsprechender Stelle erläutert wird. Aufgrund der im vorigen Abschnitt erhaltenen Daten aus absatzweisen Versuchen wurde in allen Versuchen mit optimierten Bedingungen gearbeitet, sodass eine geringe  $v_{TCZR}$  von  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$  eingesetzt und die Edelstahltrennsäule mit ItBA-modifizierten kleinen S6pg-Partikeln gepackt wurde. In diesem Abschnitt wurden S6pg-ItBA-Partikel der Charge #2 eingesetzt. Erneut wurde ein Volumenstrom von  $\dot{V}_{mob} = 0,5 \text{ mL min}^{-1}$  angewendet. Bei der verwendeten Säulenpackung entsprach dies einer interstitiellen Geschwindigkeit von  $v_{int} = 265 \text{ cm h}^{-1} = 0,74 \text{ mm s}^{-1}$ . Damit war das Verhältnis  $v_{int}$  zu  $v_{TCZR}$  leicht größer als in den absatzweisen Versuchen. Aufgrund der im Anhang beschriebenen Rückführung bereits eluierten Proteins, kam es im Verlauf der experimentellen Durchführung zu leicht veränderlichen Zulaufkonzentrationen, die jedoch vor jeder Verfahrnung der Temperaturzone bestimmt wurde und im Folgenden auch zur Berechnung der Aufkonzentrierungsfaktoren herangezogen wurden (vgl. Kapitel 9.10.2).

### **6.6.1 Einfluss der Zulaufkonzentration**

Zunächst wurde der Einfluss der Zulaufkonzentration  $c_f$  auf das Verhalten der kontinuierlichen TCZR-Anwendung untersucht. Dazu wurde Lactoferrinlösung definierter Konzentrationen von  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  bzw.  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  konstant über die Säule gepumpt und die Temperaturzone zu den definierten Zeitpunkten insgesamt achtmal über die Säule verfahren. Am Ende des Experiments wurde schließlich das auf der Säule verbliebene Protein durch Erhöhung der Salzkonzentration in

der mobilen Phase eluiert. Die resultierenden Chromatogramme der Versuche sind in Abbildung 6-24A für  $c_F = 1 \text{ mg mL}^{-1}$  und Abbildung 6-24B für  $c_F = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  gezeigt. Während der Versuche wurde die Proteinlösung eines Proteinpeaks und des anschließend folgenden Durchflusses gepoolt und wieder zur Ausgangslösung gegeben. Da jedoch zu jedem Zeitpunkt ein Teil des aufgegebenen Lactoferrins an der Säule gebunden vorliegt, ist auch im Idealfall die Konzentration dieses Pools geringer als die Zulaufkonzentration. Durch die Rückführung des gepoolten Volumens nahm daher im Laufe der Zeit die gemessene Zulaufkonzentration etwas ab und betrug zum Ende der Versuche noch  $0,84 \text{ mg mL}^{-1}$  (im Falle von  $c_F = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) und  $0,38 \text{ mg mL}^{-1}$  (im Falle von  $c_F = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ).



**Abbildung 6-24: Chromatogramme einer achtfachen Verfahrungszyklen der Kühlzone über die mit S6pg-ItBA gefüllte Trennsäule. Dabei wurde kontinuierlich mit Lactoferrinlösung einer anfänglichen Konzentration von (A)  $c_F = 1 \text{ mg mL}^{-1}$  und (B)  $c_F = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  beladen, die eluierten Proteinpeaks wurden als P1 - P8 bezeichnet.  $v_{TCZR}$  betrug  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$ . Die grauen Hintergründe markieren den Zeitraum einer Verfahrungszyklen der Kühlzone. Abschnitte: (I) Beladung; (II) TCZR-Elution; (III) Elution mit  $1 \text{ M NaCl}$ .**

Aus den Chromatogrammen wird deutlich, dass die erste Verfahrungszyklen der Kühlzone in beiden Fällen so abgestimmt wurde, dass zuvor keinerlei Proteindurchbruch feststellbar war. Dies war beabsichtigt, da im späteren industriellen Einsatz einer solchen Anlage der Anteil an nicht-retardierter Zielkomponente unweigerlich als Verlust einkalkuliert werden müsste. Anschließend ist feststellbar, dass nach jeder Verfahrungszyklen der Temperaturzone immer Lactoferrin in sehr scharfen Elutionspeaks eluiert werden konnte. Eine Ausnahme bildete P1 bei einer  $c_F$  von  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Die entstehenden Proteinpeaks der beiden Chromatogramme unterscheiden sich stark voneinander. So ist im Falle einer  $c_F = 1 \text{ mg mL}^{-1}$  schon ab P1 ein UV-Absorptionssignal mit einer maximalen Höhe von etwa  $2200 \text{ mAU}$  feststellbar, liegt bei P2 schon bei  $3100 \text{ mAU}$  und nimmt ab

P3 einen gleichbleibenden Wert von etwa 3150 mAu ein. Im Falle einer konstanten Zulaufkonzentration von  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  kann erst ab P2 überhaupt ein kleiner Proteinpeak mit einer maximalen Peakhöhe von etwa 200 mAU festgestellt werden. In P3 betrug die Peakhöhe schon ca. 2800 mAU bevor ab P4 relativ konstante Peakhöhen von ca. 2950 mAU erreicht werden. Außerdem konnte festgestellt werden, dass zwischen den einzelnen Proteinpeaks keine vollständige Rückkehr zur Basislinie feststellbar war. Dies spricht dafür, dass nach den Verfahrungen der Temperaturzone ein Teil des zuvor gebundenen Lactoferrins nach seiner Desorption nicht wieder binden kann und daher in geringer Konzentration eluiert.

Die Fraktionierung des Eluats in die Proteinpeaks (P1-P8) und die dazwischen liegenden Abschnitte erlaubte die quantitative Analyse der Experimente. Die in den einzelnen Proteinpeaks eluierten Lactoferrinmengen werden in Tabelle 6-19 dargestellt.

**Tabelle 6-19: Eluierte Masse an Lactoferrin in den acht Elutionspeaks (P1-P8) bei einer anfänglichen Zulaufkonzentration der Lactoferrinlösung von  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  bzw.  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ .**

$c_F, \text{ mg mL}^{-1}$	P1, mg	P2, mg	P3, mg	P4, mg	P5, mg	P6, mg	P7, mg	P8, mg
0,5	-	1,46	10,45	12,31	13,41	14,46	14,76	13,16
1	7,54	28,89	31,31	31,20	31,40	30,62	31,65	28,14

Die gemessenen Proteinmassen in den Elutionspeaks entsprechen den Beobachtungen aus den Chromatogrammen. Für  $c_F = 1 \text{ mg mL}^{-1}$  stellte sich eine konstante eluierbare Lactoferrinmenge von durchschnittlich 30,72 mg bereits ab P3 ein. Im Falle der halben Zulaufkonzentration stellte sich erst mit Beginn von P4 ein konstanter Elutionswert von durchschnittlich 13,62 mg Protein ein. Die Erklärung für die spätere Einstellung eines Gleichgewichtszustandes, d.h. einer konstanten Menge an eluierbarem Protein bei Verfahrung der Temperaturzone in identischen Zeitabständen, hängt vor allem mit der später erreichten maximalen Beladung der Säule zusammen. Entsprechend der Isothermendaten aus Tabelle 6-12 und einem  $K_D$ -Wert der Lactoferrinadsorption bei  $\Phi_u = 35^\circ\text{C}$  von  $1,09 \text{ mg mL}^{-1}$ , kann davon ausgegangen werden, dass sich zumindest die verwendete Zulaufkonzentrationen von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  nicht mehr im linearen Bereich der Isotherme befindet und die Form der Isotherme dann entsprechend Gleichung 2-22 maßgeblich an der Ausbildung der Geschwindigkeit der Konzentrationsfront beteiligt ist. So wandert im vorliegenden Fall bei höherer Zulaufkonzentration die Konzentrationsfront schneller durch die Säule, sodass diese früher ihren Gleichgewichtszustand erreicht hat. Da sich ein konstanter und maximaler Wert der

eluierten Proteinmassen erst bei einer durchgehenden Gleichgewichtsbeladung der Säule ausbilden kann, geschieht dies in den besprochenen Experimenten für  $c_F = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  etwas später. Alternativ hätte man die Säule anfangs bis zum Durchbruch und der Ausbildung einer konstanten Ablaufkonzentration fahren und erst in diesem Status die Verfahrung der Temperaturzone starten können. Unter Inkaufnahme größerer anfänglicher Proteinverluste hätte sich hierbei schon nach der ersten Verfahrung ein stabiler Zustand eingestellt. Die Mengen an Lactoferrin die zwischen den Proteinpeaks eluierten konnten mit durchschnittlich 2,63 mg bei einer Zulaufkonzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  bzw. 1,54 mg für  $c_F = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  bestimmt werden. Dies entspricht 8,5 % bzw. 11,3 % der in den Proteinpeaks durchschnittlich eluierbaren Proteinmenge. Es konnte somit bewiesen werden, dass sich in Abhängigkeit der Zulaufkonzentration nach ausreichend langer Zeit ein stabiler Zustand einstellt. Dieser Zustand ist im Falle eines Einkomponentensystems durch die Möglichkeit einer kontinuierlichen Akkumulation des zulaufenden Proteins in scharfe, konzentrierte Elutionspeaks charakterisiert, wobei die Verluste an Zielkomponente zwischen den Peaks nur einen Bruchteil der akkumulierbaren Proteinmasse ausmachen.

Bis dato wurde lediglich auf die eluierbaren Proteinmassen eingegangen, wobei diese bei reduzierter Zulaufkonzentration und dadurch auch reduzierter Gleichgewichtsbeladung auf der Säule natürlich geringer ausfallen. Ein weiterer und bereits in Kapitel 3.1 erwähnter Vorteil des Systems liegt jedoch auch in der starken Aufkonzentrierung der bindenden Komponenten. Um den Einfluss der Zulaufkonzentration auf diesen Effekt zu beschreiben, sind in Tabelle 6-20 die erzielten Aufkonzentrierungsfaktoren in den Proteinpeaks dargestellt. Die Elutionsvolumina betragen bei  $c_F = 1 \text{ mg mL}^{-1}$  durchschnittlich etwa 4,5 mL und etwa 4 mL bei  $c_F = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ .

**Tabelle 6-20: Aufkonzentrierungsfaktoren an Lactoferrin in den acht Proteinpeaks (P1 - P8) bei anfänglicher Zulaufkonzentration der Lactoferrinlösung von  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  bzw.  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ .**

$c_F, \text{ mg mL}^{-1}$	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
0,5	-	1,01	5,55	9,55	8,72	9,08	9,75	8,63
1	2,18	6,92	7,62	7,73	7,67	8,10	8,62	7,53

Entsprechend der gesamten eluierten Proteinmassen stellten sich konstante Peakkonzentrationen erneut ab P3 bzw. P4 ein. Im Falle einer  $c_F$  von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  konnte eine durchschnittliche Konzentration von  $6,97 \text{ mg mL}^{-1}$  ab P3 und im Falle von  $c_F = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  von  $3,44 \text{ mg mL}^{-1}$  ab P4

festgestellt werden. In Abhängigkeit der im Laufe des Versuches leicht abnehmenden Zulaufkonzentrationen ergeben sich daher experimentell ermittelte Aufkonzentrierungsfaktoren CF im Gleichgewichtszustand ab P3 bzw. P4 von 7,88 ( $c_F = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) und 9,15 ( $c_F = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Somit wird offenbar, dass bei geringerer Zulaufkonzentration im betrachteten System mit höheren Aufkonzentrierungen zu rechnen ist. Generell ist dies im Zuge integrierter Prozessentwicklungen zwar erwünscht, zu beachten ist allerdings, dass zu hohe Konzentrationen schlecht löslicher Proteine zu ungewünschten Ausfällungen auf der Säule führen können.

Die erhaltenen Durchschnittswerte der eluierten Proteinmenge und Aufkonzentrierungsfaktoren konnten auch über eine Massenbilanz der zwischen zwei Kühlzonenverfahren der Säule zugeführten Proteinmenge sehr gut bestimmt werden. Hierbei muss zunächst allerdings die bereits angesprochene Abnahme der Zulaufkonzentration aufgrund von Adsorptionsvorgängen ( $0,84 \text{ mg mL}^{-1}$  bei  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  und  $0,38 \text{ mg mL}^{-1}$  bei  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) in Betracht gezogen werden. So wurden im Falle einer kontinuierlichen Aufgabe einer theoretischen Konzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  und einem Aufgabevolumen von 40 mL zwischen zwei Peaks 33,6 mg Lactoferrin aufgegeben. Abzüglich des Durchlaufes von etwa 2,6 mg ergibt sich damit ein  $\Delta m$  von 31 mg und bei einem Peakvolumen von 4,5 mL ein CF von 8,2. Im Falle einer theoretischen Zulaufkonzentration von  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  wurden demnach 15,2 mg Lactoferrin aufgegeben. Bei einem gemittelten Durchlauf von 1,54 mg entspricht dies somit einem Wert für  $\Delta m$  von 13,66. Bei einem Peakvolumen von 4 mL kann aus dieser Bilanz somit ein CF von 8,98 berechnet werden.

Zusätzlich wurden die aufgestellten Gleichungen 3-2 bis 3-4 überprüft, ob darüber eine realistische Abschätzung der eluierbaren Proteinmengen und Konzentrierungsfaktoren schon vorab möglich ist. Zur Berechnung der Aufkonzentrierungsfaktoren wurden  $V_{\text{Peak}} = 4,5 \text{ mL}$  und  $V_{\text{Peak}} = 4 \text{ mL}$  für  $c_F = 1 \text{ mg mL}^{-1}$  bzw.  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  angenommen. Als  $\Phi_{\text{Ads}}$  und  $\Phi_{\text{Des}}$  wurden  $35^\circ\text{C}$  und  $12,4^\circ\text{C}$  genutzt. Mittels dieser Daten ergaben sich für eine Zulaufkonzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  ein  $\Delta m$  von 32,64 mg und ein CF von 8,16 (im Vergleich zu den experimentell ermittelten Gleichgewichtswerten ab Peak 3 mit durchschnittlichen Werten von  $\Delta m = 30,72 \text{ mg}$  und ein  $\text{CF} = 7,88$ ). Für eine Zulaufkonzentration von  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  ergeben sich berechnete Werte zu  $\Delta m = 21,5 \text{ mg}$  und  $\text{CF} = 9,56$ . Die experimentell ermittelten und Durchschnittswerte ab P4 wurden zu  $\Delta m = 13,62 \text{ mg}$  und  $\text{CF} = 9,15$  bestimmt. Unter Berücksichtigung der bei der experimentellen Durchführung entstandenen Verdünnung der Zulaufkonzentration fallen die berechneten Werte für CF sogar noch etwas höher aus. Die Abweichungen sind wohl vor allem darauf zurückzuführen, dass in den vorliegenden Berechnungen eine jeweils vollständige Beladung der Säule angenommen wurde (d.h.  $\alpha_{\text{TZR}} = 1$ ), was offensichtlich hier nicht erreicht werden konnte.

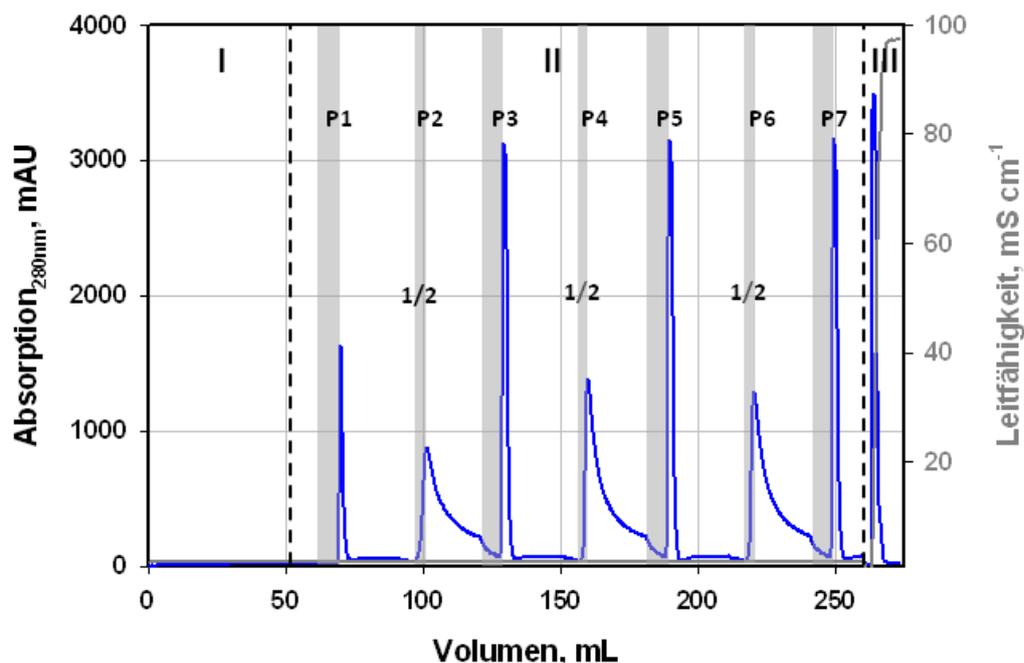
Nichtsdestotrotz konnte bestätigt werden, dass die experimentellen Daten für beide Zulaufkonzentrationen unter Berücksichtigung einer Toleranz auch mathematisch aus den vorgestellten Gleichungen vorhergesagt werden können.

### 6.6.2 Optimierung der Verfahrensführung

In einem weiteren Versuch zur kontinuierlichen Anwendung des TCZR-Systems, wurde versucht die im Gleichgewichtszustand erreichbaren Werte von  $\Delta m$  und CF zu steigern. Die zugrunde liegende Idee wird im Folgenden kurz erläutert:

Nach vollständiger Beladung der Säule mit einer definierten Zulaufkonzentration wird die Temperaturzone über die Säule verfahren. Die Verfahrung erfolgt wiederum in Flussrichtung der mobilen Phase und mit der gleichen Bewegungsgeschwindigkeit, allerdings stoppt die Verfahrung an einem definierten Punkt innerhalb der Säule, wonach die Kühlzone mit hoher Geschwindigkeit zurück in die Startposition verfahren wird. Durch diese absatzweise Anwendung des Systems wird Protein in konzentrierter Form innerhalb der Säule akkumuliert, jedoch im Idealfall nicht eluiert. In dem mit der Kühlzone überfahrenen Bereich der Säule ist wieder Bindekapazität frei und weiteres zulaufendes Protein kann gebunden werden. Durch eine anschließende Verfahrung der Temperaturzone über die komplette Säule sollte dann mehr Proteinmasse im gleichen Elutionsvolumen eluierbar sein und folglich die beiden Werte  $\Delta m$  und CF erhöht werden.

Im vorliegenden Versuch wurde die Säule bei  $\Phi_u = 35^\circ\text{C}$  konstant mit einer Lactoferrinlösung einer Konzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  beladen, wobei im Laufe des Versuches eine leichte Abnahme der Zulaufkonzentration aufgrund der Rückführung bereits eluierten Proteins zu verzeichnen war. Nach 60 mL Elutionsvolumen wurde die Temperaturzone zum ersten Mal komplett über die Säule verfahren. Anschließend folgte dreimal eine Kombination aus einer Verfahrungen bis zur Hälfte der Trennsäule und eine volle Verfahrung je im Abstand von 30 mL. Abschließend wurde gebundenes Protein durch Erhöhung der Salinität in der mobilen Phase eluiert. Abbildung 6-25 zeigt das Chromatogramm des Experiments. Die halben Verfahrungen in Abschnitt II sind durch die Markierung „½“ besonders kenntlich gemacht.



**Abbildung 6-25:** Chromatogramm einer siebenfachen Verfahrung der Kühlzone über die mit *S6pg-ItBA* gefüllte Trennsäule. Die Anfangskonzentration des Zulaufs betrug  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Die Proteinpeaks wurden als P1 - P7 bezeichnet, wobei bei jeder zweiten Verfahrung (P2, P4, P6) die Kühlzone nur bis zur Hälfte der Trennsäule verfahren wurde.  $v_{\text{TCZR}}$  betrug  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$ . Die grauen Hintergründe markieren eine bzw. eine halbe Verfahrung der Kühlzone. Abschnitte: (I) Beladung; (II) TCZR-Elution; (III) Elution mit  $1 \text{ M NaCl}$ .

Nach der ersten vollständigen Verfahrung ist ein scharfer Elutionspeak mit einer maximalen Peakhöhe von etwa 1700 mAU feststellbar. Nach der anschließenden ersten halbmaximalen Verfahrung der Temperaturzone ist ein Peak mit stark ausgeprägtem Tailingverhalten und einer maximalen Peakhöhe von 900 mAU sichtbar. Die folgenden drei kompletten Verfahrungen zeigen wieder drei scharfe Elutionspeaks mit ähnlichem Aussehen und einer maximalen Peakhöhe von etwa 3100 mAU. Die beiden Proteinpeaks P4 und P6 nach halbmaximaler Verfahrung zeigen ähnlich wie auch P2 starkes Tailingverhalten, wobei allerdings eine höhere und in beiden Fällen identische Peakhöhe von etwa 1300 mAU erreicht wird. Zur quantitativen Analyse werden in **Tabelle 6-21** die eluierten Proteinmassen der einzelnen Proteinpeaks bei vollständiger Verfahrung (sog. Hauptpeaks; P1, P3, P5, P7) angegeben. Die Elutionspeaks bei halber Verfahrung der Temperaturzone (P2, P4, P6) werden zusammenfassend mit der gesamten Proteinmenge angegeben, die zwischen zwei Hauptpeaks eluierte. Für die Hauptpeaks sind zusätzlich die erreichten Aufkonzentrierungsfaktoren unter Berücksichtigung der nachlassenden Zulaufkonzentration bis  $0,93 \text{ mg mL}^{-1}$  angegeben.

**Tabelle 6-21: Eluierte Masse an Protein in den Hauptpeaks (P1, P3, P5, P7) und der Durchläufe dazwischen (P2, P4, P6), sowie Aufkonzentrierungsfaktoren innerhalb der Hauptpeaks P3, P5 und P7 bei anfänglicher Zulaufkonzentration  $c_F = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ .**

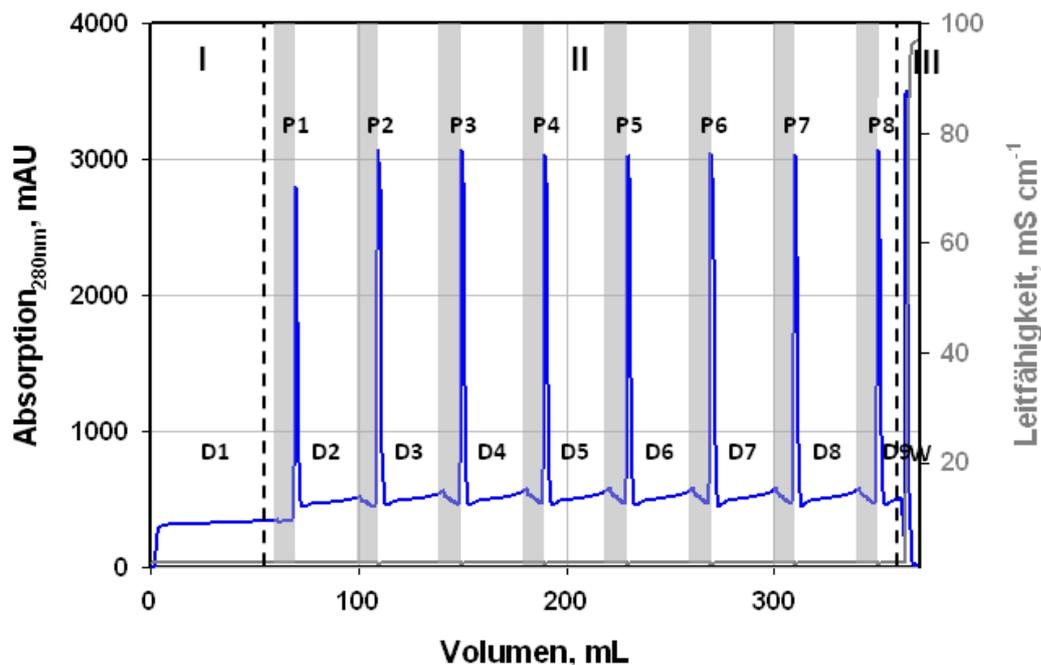
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
<b><math>\Delta m</math>, mg</b>	7,04	20,25	30,60	26,40	29,70	24,85	28,99
<b>CF</b>	-	-	6,67	-	7,42	-	7,04

Die Messdaten bestätigen die Beobachtungen aus dem Chromatogramm, bei denen sich ein stabiles Niveau der Hauptpeaks P3, P5 und P7 bezüglich der Werte  $\Delta m$  und CF ergab und das System offensichtlich ab P3 den Gleichgewichtszustand erreicht hatte. In diesen Peaks konnten durchschnittlich 29,76 mg Protein eluiert werden, während ein durchschnittlicher Aufkonzentrierungsfaktor von 7,04 erzielt wurde. Während der ersten vollständigen Verfahrungs der Temperaturzone in P1 war die Säule noch nicht vollständig beladen, sodass nur etwa 7 mg Lactoferrin eluiert werden konnten. Im Vergleich zum im vorigen Abschnitt analysierten Experiment bei achtfacher vollständiger Verfahrungs der Temperaturzone und einer konstanten Zulaufkonzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $\Delta m = 30,72 \text{ mg}$ ;  $CF = 7,88$ ) waren die eluierten Proteinnengen in den Hauptpeaks in diesem Versuch sogar etwas geringer, obgleich die aufgegebenen Proteinnenge zwischen zwei vollständigen Verfahrungs in diesem Experiment 60 mL betrug und nicht nur 40 mL. Der Grund für diesen Effekt liegt an den entstandenen Proteinpeaks P2, P4 und P6. Anders als erwartet, führte die halbmaximale Bewegung der Temperaturzone zu einer verfrühten Elution großer Mengen an Protein. Offensichtlich konnten die im Bereich der lokalen Konzentrationserhöhung akkumulierten Proteine auch bei erhöhter Temperatur der Umgebung ( $\phi_u = 35^\circ\text{C}$ ) nicht wieder stark genug auf der Säule adsorbieren und wurden folglich wieder eluiert. Das für isokratische Elutionen typische und stark ausgeprägte Tailingverhalten spricht zusätzlich für zu schwache Wechselwirkungen mit dem Sorbens. Nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes wurden somit in P4 und P6 durchschnittlich 25,63 mg Lactoferrin eluiert. Dies entspricht nahezu der gesamten Menge an Protein (30 mg) das zwischen dem Ende einer vollständigen Verfahrungs und dem Beginn der halbmaximalen Verfahrungs aufgegeben wurde. Eine Verwendung des beschriebenen Ansatzes einer absatzweisen Verfahrungs erscheint daher nur für höhere Bindungsaffinitäten und längere Säulen aussichtsreich.

### 6.6.3 Kontinuierliche Proteintrennung

Dieses Kapitel beschreibt Versuche zur kontinuierlichen Trennung eines binären Proteingemisches aus Lactoferrin und BSA. Aufgrund der Oberflächenladungseigenschaften bei einem pH der eingesetzten mobilen Phase von 6,5 lag das saure BSA in negativ geladener Form vor. Entsprechend der Beschreibungen aus Kapitel 3.2.1 wird hierbei demnach der Fall einer bindenden Komponente Lactoferrin und einer nicht-bindenden Komponente BSA behandelt. Im Folgenden wird Lactoferrin daher auch als „Zielkomponente“, BSA als „Kontaminante“ bezeichnet. Die Durchführung des Versuches folgte der in Kapitel 5.14 beschriebenen Methodik, als Proteinlösung wurde ein Gemisch aus Lactoferrin ( $c_f = 0,9 \text{ mg mL}^{-1}$ ) und BSA ( $c_f = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) angewendet und die Temperaturzone nach anfänglicher Beladung (Abschnitt I) insgesamt achtfach über die Trennsäule verfahren (Abschnitt II) bevor das restliche gebundene Protein in Abschnitt III durch Erhöhung der Salzkonzentration auf 1 M NaCl in der mobilen Phase eluiert wurde. Die Proteinpeaks (P1–P8) wurden ab einer Peakhöhe von 100 mAU fraktioniert, ebenso die Durchläufe vor, zwischen und nach den Peaks (D1–D9) und der Elutionspeak nach Erhöhung der Salzkonzentration (W). Das entstandene Chromatogramm wird in Abbildung 6-26 gezeigt.

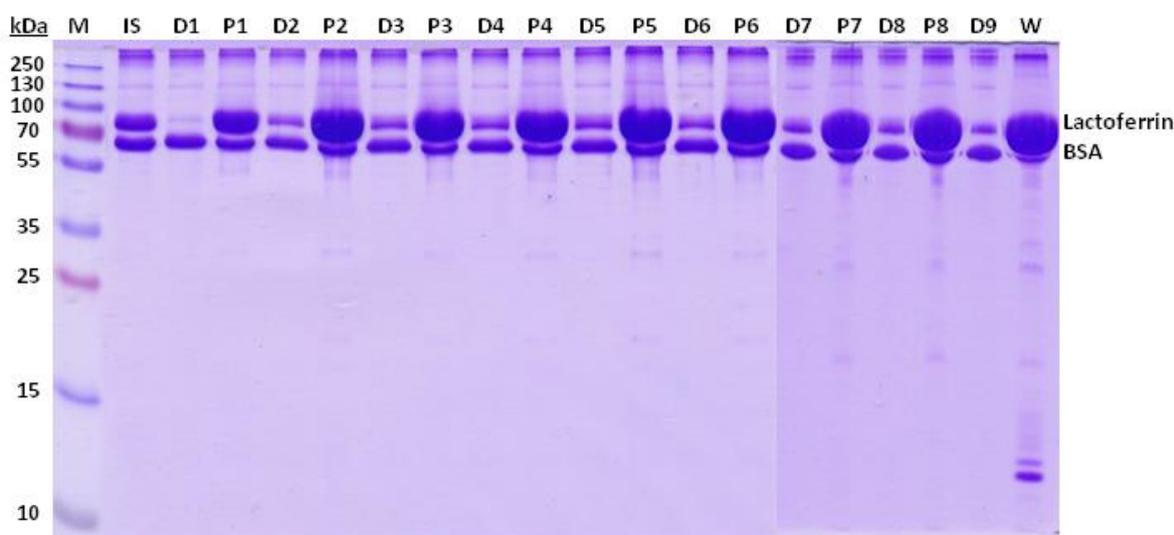
Bei Betrachtung des Chromatogramms fällt der frühe Anstieg des UV-Absorptionssignal auf, der für einen Proteindurchbruch schon kurz nach Probenaufgabe in Abschnitt I spricht und eine Höhe von etwa 350 mAU erreicht. Nach den Verfahrungen der Temperaturzone sind scharfe Proteinelutionspeak zu sehen. Während P1 eine maximalen Peakhöhe von ca. 2800 mAU aufweist, konnte eine stabile Peakhöhe erst ab P2 mit etwa 3070 mAU festgestellt werden. Auffällig ist jedoch der Anstieg des UV-Signales der Durchläufe nach den Verfahrungen der Temperaturzone auf etwa 500 mAU, wobei im Laufe des Versuches mit jeder Verfahrung eine leichte Zunahme um etwa 20 mAU festgestellt werden konnte. Zudem ist ein beginnender Anstieg des UV-Signals kurz vor dem Start der folgenden Temperaturzonenverfahrung erkennbar. Da sowohl BSA und Lactoferrin Licht bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbierten und aus dem entstandenen Chromatogramm nicht abgeleitet werden konnte in welchen Mengen und Konzentrationen die beiden Proteine eluierten, wurde zusätzlich noch eine SDS-PAGE der gesammelten Fraktionen erstellt



**Abbildung 6-26:** Chromatogramm einer achtfachen Verfahrung der Kühlzone über die mit *S6pg-ItBA* gefüllte Trennsäule. Dabei wurde die Säule kontinuierlich mit einem Proteingemisch aus *Lactoferrin* (Anfangskonzentration  $c_F=0,9 \text{ mg mL}^{-1}$ ) und *BSA* ( $c_F=1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) beladen. Die eluierten Proteinpeaks wurden als P1 - P8, die Fraktionen vor und zwischen den Peaks als D1 - D9 und die Elutionsfraktion mit W bezeichnet.  $v_{TCZR}$  betrug  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$ . Die grauen Hintergründe markieren den Zeitraum einer Verfahrung der Kühlzone. Abschnitte: (I) Beladung und Waschen; (II) TCZR-Elution; (III) Elution mit  $1 \text{ M NaCl}$ .

Das Ergebnis der SDS-PAGE ist in Abbildung 6-27 dargestellt und lässt eine qualitative Beurteilung der Vorgänge während der experimentellen Durchführung zu. „IS“ bezeichnet hierbei eine Probe der Ausgangslösung, die obere Bande markiert *Lactoferrin*, die untere Bande *BSA*. Im gezeigten Chromatogramm wurde für alle Banden das gleiche Probevolumen von  $1,5 \text{ }\mu\text{L}$  aufgetragen. Es wird deutlich, dass eine *BSA*-Bande bereits in Fraktion D1 erkennbar ist und die Bandenintensität der Intensität der *BSA*-Bande in der Ausgangslösung entspricht. Im weiteren Verlauf des Prozesses konnte ein entsprechendes Bandensignal in allen Fraktionen gefunden werden. Dies spricht für das erwartete Verhalten eines ungehinderten und kontinuierlichen Durchlaufs bei Applikation einer negativ geladenen Kontaminante auf einem CEX-Sorbens und erklärt damit den frühen Anstieg des UV-Signals und das konstant hohe UV-Niveau. *Lactoferrin* hingegen zeigt in D1 nur eine sehr schwache Bande, was eine starke Adsorption der Zielkomponente ohne nennenswerten Durchbruch bedeutet. In den Banden der Proteinpeaks P1–P8 kommt es zu einer deutlichen Verstärkung der Intensität der *Lactoferrin*-bande, wobei die stärkste und dann gleichbleibende Intensität erst ab P2 beobachtet werden kann. Diese Ergebnisse sprechen für die

Proteinakkumulation der Zielkomponenten durch die Verfahrung der Temperaturzone und die Einstellung eines Gleichgewichtszustandes ab P2. Die Zunahme des Absorptionssignals speziell zwischen dem Bereich D1 vor der ersten Verfahrung und D2 zwischen den Proteinpeaks, aber auch allen weiteren Fraktionen D3–D9, korreliert mit der Zunahme der Bandenintensität der Zielkomponenten in diesen Fraktionen. Dieses Verhalten konnte in den Einstoffversuchen mit Lactoferrin bisher nicht beobachtet werden und liegt daher vermutlich an dem speziellen temperaturabhängigen Verhalten von BSA.



**Abbildung 6-27: SDS-PAGE (15% Gel) einzelner Fraktionen des TCZR-Versuches zur kontinuierlichen Trennung von BSA und Lactoferrin. Das Auftragevolumen beträgt 1,5  $\mu$ L pro Probe. M: Marker; IS: Ausgangslösung; D1 - D9: Fraktionen vor und zwischen den Peaks; P1 - P8: Fraktionen der Proteinpeaks; W: Elutionspeak.**

Offensichtlich kommt es nach Verfahrung der Temperaturzone zu ungewünschten Wechselwirkungen des BSA mit dem thermoCEX-Sorbens, sodass einige Bindungsplätze auf der Partikeloberfläche irreversibel belegt werden, weniger Lactoferrin binden kann und daher der Durchlauf erhöht wird. Da dieser Effekt erst nach der ersten Verfahrung der Temperaturzone deutlich wird und ein solches Verhalten durch die eigentliche Abkühlung des Systems nicht erklärbar ist, wird vermutet, dass die Temperaturerhöhung in den Randbereichen der Temperaturzone bis auf 45°C zu strukturellen Änderungen von BSA führt. Da PNIPAA-modifizierte Oberflächen entsprechend der Polymerchemie reinen PNIPAAms (vgl. Kapitel 2.5.2.2) speziell bei erhöhten Temperaturen hydrophobe Eigenschaften aufweisen, könnte BSA in ähnlicher Weise wie bei dem in Kapitel 6.1.3 beschriebenen Verhaltens des „Protein-Unfolding“ in denaturierter Form stark auf der Oberfläche binden und unspezifische hydrophobe

Bindungsplätze des ItBA-Polymers blockieren. Da in diesem Versuch kontinuierlich große Mengen an BSA auf das Sorbens gegeben wurden, ist die Zunahme bei weiteren Verfahrungen nicht mehr stark ausgeprägt, da bereits in Fraktion D2 nahezu alle hydrophoben Bindungsplätze durch BSA blockiert sind.

**Tabelle 6-22: Eluierte Masse  $\Delta m$  und Aufkonzentrierungsfaktoren CF der Zielkomponente Lactoferrin innerhalb der acht Elutionspeaks (P1-P8) des kontinuierlichen Trennversuches mit dem TCZR-System und einer anfänglichen Zulaufkonzentration von  $c_f = 0,9 \text{ mg mL}^{-1}$ .**

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
<b><math>\Delta m</math>, mg</b>	10,76	20,9	21,9	21,5	21,0	22,3	20,8	20,9
<b>CF</b>	2,94	5,91	6,15	6,03	6,19	7,03	6,21	6,19

Trotz des speziellen Verhaltens der Kontaminante BSA konnte das beschriebene Prinzip zur Trennung der kontinuierlichen Trennung einer bindenden und einer nicht-bindenden Komponente mittels des TCZR-Systems experimentell bewiesen werden. Zur quantitativen Auswertung des Versuches wurden nun die erhaltenen Proteinmassen und Aufkonzentrierungsfaktoren in den Proteinpeaks von Lactoferrin unter der Annahme bestimmt, dass BSA kontinuierlich mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  nicht-retardiert durch das System läuft. Diese Ergebnisse werden in Tabelle 6-22 gezeigt. Zusätzlich sind die eluierten Mengen an Lactoferrin und die Konzentrationen in den Fraktionen D1 – D9 in Tabelle 6-23 angegeben.

**Tabelle 6-23: Eluierte Masse  $m$  und Konzentration  $c$  der Zielkomponenten Lactoferrin innerhalb der Fraktionen D1 – D9 des kontinuierlichen Trennversuches mit dem TCZR-System und einer anfänglichen Zulaufkonzentration von  $c_f = 0,9 \text{ mg mL}^{-1}$ .**

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
<b><math>m</math>, mg</b>	5,69	9,61	11,7	12,4	11,9	12,0	12,8	12,5	1,69
<b><math>c</math>, <math>\text{mg mL}^{-1}</math></b>	0,09	0,27	0,33	0,35	0,33	0,33	0,36	0,35	0,27

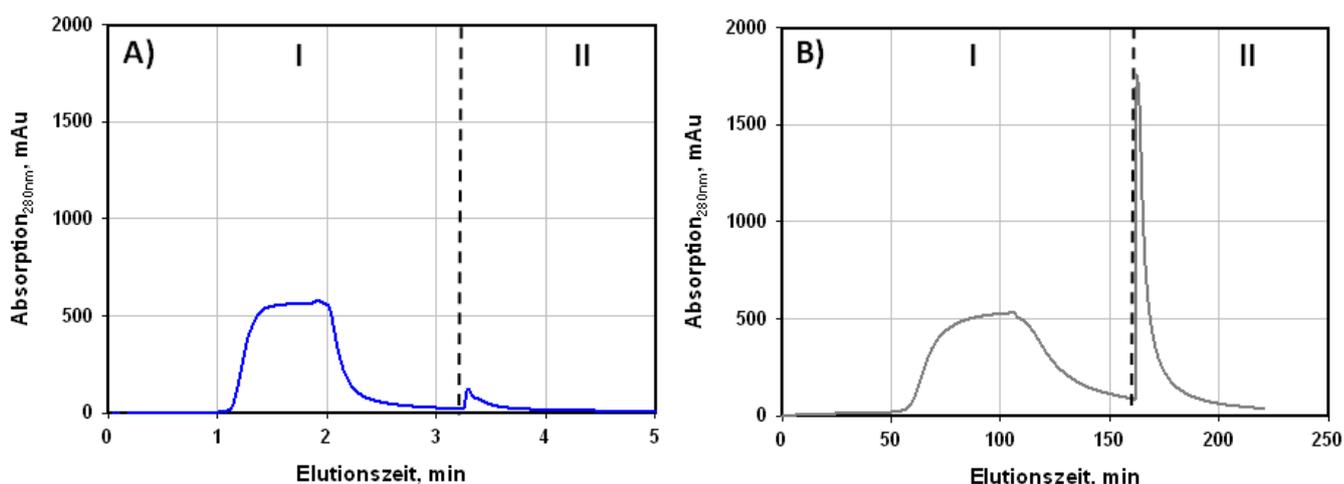
Die Ergebnisse bestätigen die bereits beschriebenen Beobachtungen nochmals. Es kann festgestellt werden, dass in den Versuchen ab P2 ein Gleichgewichtszustand erreicht wurde, sodass eine kontinuierliche Lactoferrinmenge von  $21,3 \text{ mg}$  mit einem Aufkonzentrierungsfaktor

von 6,2 erreicht wurde, wobei im Laufe des Versuches eine minimale Zulaufkonzentration von 0,82 mg mL<sup>-1</sup> festgestellt werden konnte. Die Menge an durchlaufendem Lactoferrin erreichte allerdings erst mit Fraktion D3 einen konstanten Wert von durchschnittlich 12,2 mg bei einer Konzentration von 0,34 mg mL<sup>-1</sup>, wobei D9 aufgrund der gekürzten Elutionszeit von nur 6,3 mL hierbei nicht in Betracht gezogen wurde. Speziell die experimentell ermittelten Daten des in Abschnitt 6.6.1 vorgestellten Versuches zur Proteinakkumulation reinen Lactoferrins mit einer leicht höheren anfänglichen Zulaufkonzentration von 1 mg mL<sup>-1</sup> eignen sich zum Vergleich und zur Abschätzung des negativen Einflusses der Kontaminante BSA auf die Effizienz des TCZR-Systems. So konnte festgestellt werden, dass sich ein Gleichgewichtszustand bereits früher ausgebildet hat (nach P2 anstatt nach P3), die Menge an eluierendem Lactoferrin zwischen den Proteinpeaks im Gleichgewichtszustand deutlich zugenommen hat (12,22 mg im Vergleich zu 2,63 mg) und dadurch auch weniger Protein per Temperaturzonenverfahren (21,3 mg im Vergleich zu 30,72 mg) mit einem geringeren Aufkonzentrierungsfaktor (6,2 im Vergleich zu 7,9) eluiert werden konnte.

## ***6.7 Anwendung der thermoresponsiven Monolithchromatographie***

Im Folgenden wird erstmals die Anwendbarkeit eines thermoCEX-Monolithen zur temperaturgesteuerten Proteinakkumulation mit Lactoferrin als Modellprotein beschrieben und mit thermoCEX-Partikeln S6pg-ItBA verglichen. Die Funktionalisierung erfolgte nach der in Abschnitt 5.6.2 beschriebenen Methode zur thermoresponsiven Oberflächenmodifizierung von Monolithen. Als Basismonolith wurde der in Abschnitt 5.4 beschriebene, kommerziell erhältliche Monolith auf Polymerbasis benutzt. Generell wurde bisher in der Literatur nur einmal die Monolithfunktionalisierung mit thermoresponsiven Polymeren beschrieben [157], wobei in diesem publizierten Fall ein „grafting-to“ Ansatz gewählt wurde sowie keine ladungstragenden Gruppen copolymerisiert wurden und in den weiterführenden Studien auch nicht Proteine als Modellmoleküle verwendet wurden. Zur generellen Beschreibung der Anwendbarkeit des in dieser Arbeit verwendeten thermoCEX-Monolithen mit ItBA-Oberflächenmodifizierung (hergestellt nach „grafting-from“-Ansatz; vgl. Abschnitt 2.5.4) wurde ein konventionelles thermoresponsives Chromatographieexperiment entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 5.11 durchgeführt, wobei die Temperatur der Säule während der Proteinadsorption zunächst 40°C betrug und anschließend zur Elution auf 10°C abgekühlt wurde. Die Flussgeschwindigkeit der mobilen Phase betrug  $\dot{V}_{\text{mob}} = 10 \text{ mL min}^{-1}$ , entsprechend einer  $v_{\text{av}}$  von 390 cm h<sup>-1</sup>. Das Chromatogramm des Versuches ist in Abbildung 6-28A dargestellt. Vergleichend wurde der Versuch auch mit der S6pg-ItBA-gepackten Borosilikatglassäule durchgeführt. Aufgrund der

Druckinstabilität der Partikel konnte in diesem Fall eine maximale Flussgeschwindigkeit von nur  $\dot{V}_{\text{mob}} = 0,5 \text{ mL min}^{-1}$  ( $v_{\text{int}} = 87,7 \text{ cm h}^{-1}$ ) angewendet werden. Das entstandene Chromatogramm wird in Abbildung 6-28B gezeigt. Die nach Temperaturerniedrigung eluierten Proteinmengen wurden im Falle der S6pg-ItBA-Partikel photometrisch bestimmt, im Falle des thermoCEX-Monolith wurde die Peakfläche ausgewertet.



**Abbildung 6-28: Chromatogramme der konventionellen thermoresponsiven Chromatographie auf (A) thermoCEX-Monolith, (B) S6pg-ItBA. Abschnitte: (I) Beladung und Waschung bei 40°C; (II) Elution bei 10°C.**

In Abschnitt I ist in beiden Chromatogrammen der Durchbruch des Lactoferrins erkennbar. Nach einem Waschschriff mit reinem Puffer über einen Zeitraum von 10 CV konnte im Falle des thermoCEX-Monolithen ein Rückgang des UV-Signals auf 30 mAU festgestellt werden. Im Falle der Partikel dauerte dieser Schritt mit 50 CV deutlich länger, wobei selbst nach dieser Zeit das UV-Signal noch immer einen Wert von 50 mAU aufwies. Nach anschließender Temperaturabsenkung auf 10°C konnte in beiden Fällen Protein eluiert werden, wobei im Falle der Partikel eine maximale Peakhöhe von etwa 1750 mAU erreicht wurde und im Falle des Monolithen nur ein geringer Anstieg auf etwa 100 mAU sichtbar war. In beiden Fällen konnte wieder das typische Tailingverhalten beobachtet werden und nach insgesamt vier Minuten im Falle des Monolithen bzw. 220 Minuten im Falle der Partikel konnte eine Rückkehr zur Basislinie festgestellt werden. Die bestimmte Proteinmenge im Eluat konnte entsprechend mit 0,66 mg Lactoferrin für den Monolithen und 9,73 mg für die Partikel bestimmt werden. Bezogen auf die eingesetzte Monolith- bzw. Partikelmenge entspricht dies Werten von 0,66 mg Lactoferrin pro mL Monolith bzw. 7,49 mg Lactoferrin pro mL S6pg-ItBA-Packung.

Zusammenfassend lässt sich damit feststellen, dass das beschriebene Experiment im Falle der Anwendung des Monolithen verglichen mit dem Fall der Anwendung der Partikelschüttung 55-fach schneller durchgeführt werden konnte, wobei pro Zyklus 11,2-fach weniger Protein durch die Temperaturerniedrigung eluiert werden kann. Bei mehrfacher Wiederholung des Versuches in der gleichen Zeitspanne ist daher mit einer Produktionssteigerung des Verfahrens mit thermoCEX-Monolithen zu einem Faktor von fünf zu rechnen, d.h. in der gleichen Zeit kann fünffach mehr Lactoferrin durch Temperaturerniedrigung eluiert werden.

Diese Ergebnisse der Anwendung der thermoCEX-Monolithen korrelieren mit den in Abschnitt 2.3.5 beschriebenen Eigenschaften bei der generellen Anwendung von Monolithen in der Chromatographie. Aufgrund geringerer Widerstände in den Trennsäulen und größerer Druckstabilitäten können deutlich höhere Flussraten eingesetzt werden, wodurch Aufreinigungen deutlich schneller ablaufen. Andererseits konnte mit dem hergestellten thermoCEX-Monolithen auch klar belegt werden, dass die Kapazitäten im Vergleich zu Partikeln deutlich geringer sind und daher weniger Protein pro Trennschritt eluiert werden kann. Die Optimierung der Funktionalisierung der Monolithen war außerhalb des Fokus dieser Arbeit, doch könnte bei Steigerung der Bindekapazitäten während des Adsorptionsschrittes die Effizienz der Monolithen sicherlich weiter gesteigert werden. Außerdem sind bei Verwendung von Monolithen diffusive Vorgänge während des Massentransports zwischen mobiler und stationärer Phase vernachlässigbar gering und Gleichgewichtseinstellungen daher ausschließlich von Adsorptionskinetiken der Zielmoleküle und der Monolithoberfläche abhängig. Dies konnte auch für den eingesetzten thermoCEX-Monolithen durch nahezu identische Durchbruchskurven bei Verwendung unterschiedlicher Flussgeschwindigkeiten im Bereich zwischen  $1 \text{ mL min}^{-1}$  und  $10 \text{ mL min}^{-1}$  nachgewiesen werden. Aus den genannten Gründen stellen Monolithe eine interessante Alternative für die Verwendung innerhalb des TCZR-Systems dar, da durch Erhöhung der Flussrate der mobilen Phase der Durchsatz deutlich erhöht werden könnte und die Massentransportlimitierung während der temperaturgesteuerten Proteinelution vernachlässigbar wäre, was entsprechend der Schlussfolgerungen aus den Abschnitten 6.5.1 und 6.5.2 eine Optimierung der Verwendung des gesamten TCZR-Prinzips bedeutet.

## **6.8 Parameterstudie der Prozesssimulation des TCZR**

Der folgende Abschnitt befasst sich mit der Anwendung des speziell für die Anwendung des TCZR-Systems angepassten chromatographischen Simulationsmodells CADET 1.0.0 entsprechend der Beschreibung aus Abschnitt 5.15. Dabei wurden in dieser Arbeit zwei Ziele verfolgt, die in den

Abschnitten 6.8.1 und 6.8.2 dargestellt werden. Zum einen wird der Einfluss kritischer Parameter nochmals näher untersucht und entsprechend der erhaltenen Daten bewertet. Zum anderen werden kontinuierliche Trennvorgänge weiterer binärer Proteingemische gezeigt, die in der Praxis noch nicht umgesetzt wurden. Die in den Abschnitten verwendeten Temperaturprofile sind im Anhang ersichtlich (vgl. Abschnitt 9.1.2). In allen Fällen wurde mit einer molekularen Größe der Modellproteine von 80 kDa gerechnet. Die davon abhängige Umrechnung der Zulaufkonzentrationen und Beladungen sowie die resultierende thermoresponsive Langmuirgleichung werden ebenfalls im Anhang erläutert (vgl. Abschnitt 9.1.1).

### 6.8.1 Einfluss ausgewählter chromatographischer Parameter

Speziell aus den absatzweisen TCZR-Experimenten (vgl. Kapitel 6.5) konnte durch systematische Versuchsdurchführung der starke Einfluss des Geschwindigkeitsverhältnisses zwischen  $v_{\text{int}}$  und  $v_{\text{TCZR}}$  sowie der Porendiffusion auf die Trennleistung und Gesamtperformance des TCZR-Systems festgestellt werden. Im Folgenden werden mittels des Simulationstools erstellte Chromatogramme diskutiert, bei denen speziell auf den Einfluss dieser kritischen Parameter eingegangen wird. Dazu wurde die Trennsäule mit einem Einstoffsystem bis zur vollständigen Sättigung und der resultierenden Ausbildung eines Plateauwertes nach Proteindurchbruch beladen und anschließend die Temperaturzone einfach über die Säule verfahren.

Tabelle 6-24 zeigt die für die in diesem Abschnitt beschriebenen Simulationen standardmäßig eingestellten Parameterwerte. Die Isothermendaten wurden entsprechend der im Anhang dargestellten Berechnungen ermittelt (vgl. Abschnitt 9.1.1) und entsprechen den aus absatzweisen Versuchen bestimmten Parameterwerten der Adsorption des Modellproteins Lactoferrin auf S6pg-ItBA Charge #2. Auch weitere Parameter orientieren sich an den durchgeführten Experimenten. So wurde die Umgebungstemperatur auf 35°C (entspricht 308,15 K) festgelegt und mit einer konstanten Zulaufkonzentration von 0,5 mg mL<sup>-1</sup> (entspricht 6,25x10<sup>-3</sup> mol m<sup>-3</sup>), einem Partikelradius von 1,5x10<sup>-5</sup> m (entspricht dem mittleren Durchmesser von S6pg-Basispartikeln) und einer gleichbleibenden Geschwindigkeit der Temperaturzone  $v_{\text{TCZR}}$  von 0,1 mm s<sup>-1</sup> (entspricht 1x10<sup>-4</sup> m s<sup>-1</sup>) gearbeitet. Die Säulenlänge wurde entsprechend des verwendeten Aufbaus mit 0,1 m festgelegt und die Porositätswerte  $\epsilon_B$  und  $\epsilon_P$  wurden mit 0,4 bzw. 0,5 bestimmt. Der Filmdiffusionskoeffizient wurde mit 1 m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> bewusst sehr hoch gewählt, da dieser Schritt nach Auswertung der experimentellen Messergebnisse nicht als massentransportlimitierender Parameter identifiziert wurde und etwaige störende Effekte während der Simulation dadurch ausgeschlossen werden konnten.

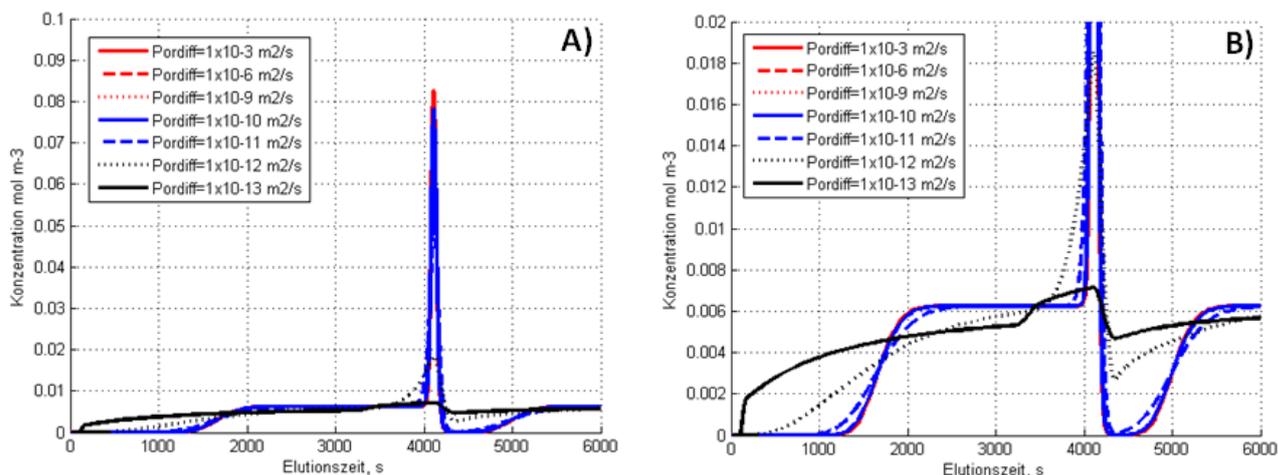
**Tabelle 6-24: Standardwerte der chromatographischen Parameter für die Simulationsexperimente bei einmaliger Verfahrung der Temperaturzone.**

Beschreibung	Parameterwert	Einheit
<b>Konstante Parameter</b>		
Anzahl der Komponenten im Zulauf	1	-
Umgebungstemperatur	308,15	K
Geschwindigkeit des Temperaturprofils, $v_{TCZR}$	$1 \times 10^{-4}$	$\text{m s}^{-1}$
Konstante $k_{Ads}$	1	$\text{mol m}^{-3}$
Erster Term der temperaturabhängigen $k_{des}^*$	4,0822	$\text{mol m}^{-3}$
Zweiter Term der temperaturabhängigen $k_{des}^*$	-0,0127	$\text{mol m}^{-3} \text{K}^{-1}$
Erster Term der temperaturabhängigen $q_{max}^*$	-10,861	$\text{mol m}^{-3}$
Zweiter Term der temperaturabhängigen $q_{max}^*$	0,0433	$\text{mol m}^{-3} \text{K}^{-1}$
Säulenlänge, L	0,1	m
Bettporosität, $\epsilon_B$	0,4	-
Filmdiffusionskoeffizient	1	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
Partikelporosität, $\epsilon_p$	0,5	-
Partikelradius	$1,5 \times 10^{-5}$	m
Konstante Zulaufkonzentration	$6,25 \times 10^{-3}$	$\text{mol m}^{-3}$
<b>Variable Parameter</b>		
Axiale Dispersion, $D_{ax}$	variabel	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
Porendiffusionskoeffizient, $D_p$	variabel	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
Interstitielle Geschwindigkeit, $v_{int}$	variabel	$\text{m s}^{-1}$
Temperaturoffset	variabel	m

\* vgl. Gleichung 9-3

Zunächst wurden in einer Testreihe verschiedene Simulationen durchgeführt, bei denen der Wert des Porendiffusionskoeffizient  $D_p$  im Bereich zwischen  $1 \times 10^{-3} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  und  $1 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  variiert wurde. Große Werte dieses Diffusionskoeffizienten bedeuten eine schnelle Diffusion innerhalb der porösen Partikel und einen geringen Einfluss auf den gesamten Massentransfer, wohingegen kleine Werte von  $D_p$  die Porendiffusion als geschwindigkeitslimitierenden Schritt während der Gleichgewichtseinstellung der Proteinadsorption erscheinen lassen. In diesen Experimenten wurde  $v_{int}$  mit  $7,36 \times 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$  (entspricht  $265 \text{ cm h}^{-1}$ ), die axiale Dispersion mit  $6 \times 10^{-7} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  und der Temperaturoffset mit 0,44 m festgelegt. In Abbildung 6-29A sind die Ergebnisse der

Simulationen bis zu einer gesamten Simulationsdauer von 6000 Sekunden dargestellt. Zur besseren Veranschaulichung wird zusätzlich in Abbildung 6-29B ein Ausschnitt der Chromatogramme gezeigt, wobei ein maximaler y-Achsenwert der Proteinkonzentration im Effluenten von  $0,02 \text{ mol m}^{-3}$  gewählt wurde.

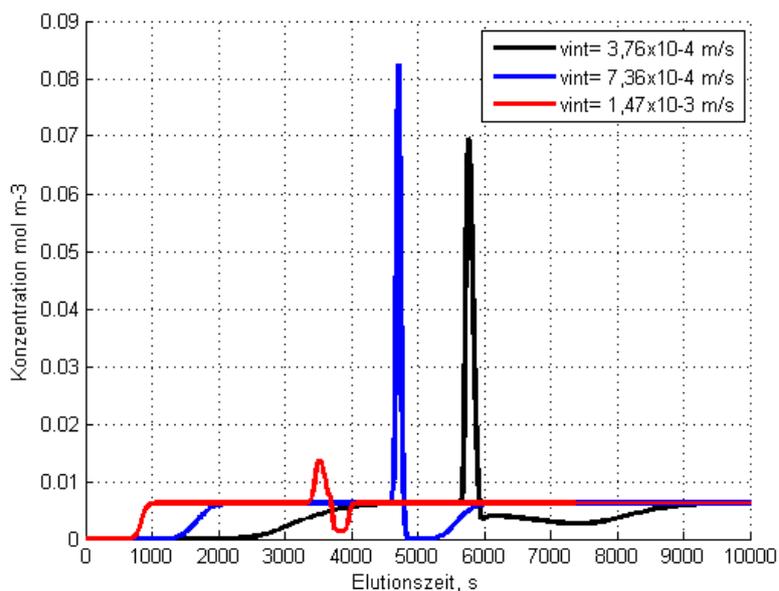


**Abbildung 6-29: Simulierte Chromatogramme bei einmaliger Verfahrungszone über die voll beladene Säule bei unterschiedlichen Werten für den Porendiffusionskoeffizienten von  $1 \times 10^{-3} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  bis  $1 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ . (A) Gesamte Darstellung des Chromatogramms; (B) Ausschnitt des Chromatogramms bis zu einer maximalen Proteinkonzentration im Effluenten von  $0,02 \text{ mol m}^{-3}$ .**

Effekte der unterschiedlichen Porendiffusion sind am Anfang der Simulation während des Beladungsschrittes und im Speziellen während der temperaturgesteuerten Elution durch die verfahrbare Temperaturzone zu sehen. Es ist offensichtlich, dass mit abnehmender Geschwindigkeit der Porendiffusion ein früher Durchbruch zu sehen ist. Im Falle von  $D_p = 1 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  und  $D_p = 1 \times 10^{-13} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  konnte in der angegebenen Zeit sogar nicht einmal der maximale Plateauwert erreicht werden. Zusätzlich sinkt mit abnehmendem Porendiffusionskoeffizienten die Effizienz der Elutionspeaks. Die maximale Peakhöhe nimmt ab und die Peaks verbreitern sich. Im Säulenablauf nach Abschluss der Verfahrungszone ist in diesen Fällen zudem keine Rückkehr der Proteinkonzentration im Effluenten auf die Basislinie beobachtbar, da eine Restbeladung auf den Partikeln verbleibt und daher anschließend schnell wieder eine vollständige Sättigung erreicht wird. Abnehmende Porendiffusionskoeffizienten beeinflussen das System daher in mehrfacher Weise negativ, da geringere Aufkonzentrierungsfaktoren innerhalb der Proteinpeakfraktionen zu erwarten wären und aufgrund der nicht gegebenen Rückkehr zur Basislinie auch zwischen zwei Temperaturzonenverfahrungen Zielkomponente eluieren würde. Im vorgestellten Modell konnten

diese negativen Effekte vor allem ab einem  $D_p$  von  $1 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  beobachtet werden. In realen Systemen werden Diffusionskoeffizienten zwischen  $1 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  und  $1 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  gemessen [6]. Dies bedeutet, dass experimentelle Diffusionswerte für Proteine gerade an der Grenze liegen und die genannten Effekte bei größeren Partikeln deutlich bemerkbar werden. Da aber generell ein Einfluss auf die Elutionscharakteristik beschrieben werden konnte, bestätigen sich die nach den experimentellen Versuchen gemachten Hypothesen, dass Protein nach seiner Desorption innerhalb der Partikelporen unter den vorliegenden Versuchsbedingungen nicht vollständig während einer Temperaturzonenverfahung aus dem Partikel diffundiert und es folglich aufgrund zu geringerer Kontaktzeiten der Partikel mit der Kühlzone zu erneuten Adsorptionsvorgängen in den Poren kommt.

In einer weiteren Testreihe wurde bei konstanter  $v_{\text{TCZR}}$  die interstitielle Geschwindigkeit im Bereich zwischen  $3,76 \times 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$  und  $1,47 \times 10^{-3} \text{ m s}^{-1}$  variiert, was einer Halbierung bzw. Verdopplung der standardmäßig verwendeten Geschwindigkeit von  $7,36 \times 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$  entspricht. Dadurch konnte entsprechend das Verhältnis zwischen  $v_{\text{int}}$  und  $v_{\text{TCZR}}$  halbiert bzw. verdoppelt werden. Der axiale Dispersionskoeffizient wurde innerhalb dieser Simulationsreihe auf  $6 \times 10^{-7} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , der Porendiffusionskoeffizient auf  $1 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  eingestellt. Durch die unrealistisch hohen Werte für den Stoffübergangskoeffizienten im Film und den Porendiffusionskoeffizienten werden die Einflüsse des Stofftransports an und in den Partikel vernachlässigbar klein und somit treten in den Simulationsergebnissen klar die Einflüsse des Geschwindigkeitsverhältnisses  $v_{\text{int}}$  zu  $v_{\text{TCZR}}$  und der axiale Dispersion hervor. Da aufgrund der unterschiedlichen Geschwindigkeiten auch die Zeitpunkte des Proteindurchbruchs variierten (früher bei höherer  $v_{\text{int}}$ ), wurden die Temperaturoffset-Werte entsprechend zu 0,4 m, 0,5 m bzw. 0,6 m festgelegt, damit die Temperaturzone immer erst nach vollständigem Durchbruch der Zulauflösung über die Säule fährt. Dadurch sind die Elutionspeaks auch zu verschiedenen Elutionszeiten klar unterscheidbar. Die drei simulierten Chromatogramme sind in Abbildung 6-30 dargestellt.

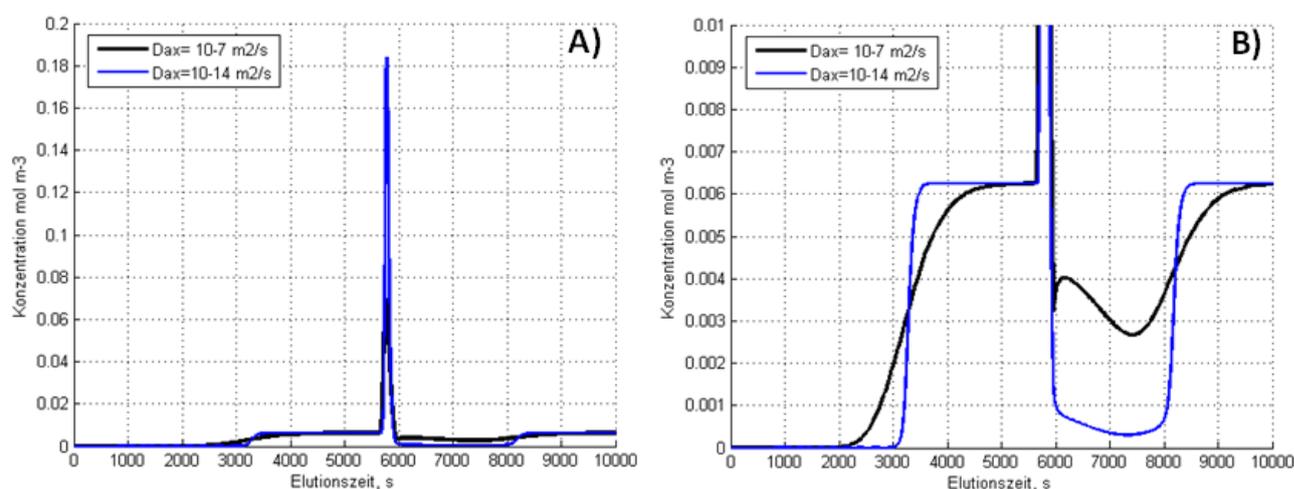


**Abbildung 6-30: Simulierte Chromatogramme einer einfachen Verfahrungs der Kühlzone nach vollständiger Beladung der Säule und unterschiedlichen interstitiellen Geschwindigkeiten der mobilen Phase von  $3,76 \times 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$  (schwarz),  $7,36 \times 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$  (blau) und  $1,47 \times 10^{-3} \text{ m s}^{-1}$  (rot).**

Generell ist feststellbar, dass aufgrund der unterschiedlichen Geschwindigkeit der mobilen Phase neben den unterschiedlichen Elutionszeiten auch stark unterschiedliche Elutionsprofile entstehen. Bei der geringsten interstitiellen Fließgeschwindigkeit  $v_{\text{int}}$  von  $3,76 \times 10^{-4} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  und dem daraus resultierenden geringsten Geschwindigkeitsverhältnis ergibt sich ein Elutionspeak mit einer maximalen Peakkonzentration von  $0,07 \text{ mol m}^{-3}$ . Anschließend zeigt sich im Säulenablauf jedoch nicht der gewünschte vollständige Rückgang der Proteinkonzentration im Effluenten. Als Ursache wurde vermutet, dass bei dieser geringen Strömungsgeschwindigkeit  $v_{\text{int}}$  ein Teil des durch die Kühlzone eluierten Proteins aufgrund der hohen axialen Dispersion in Bereiche hinter der Kühlzone gelangt und wieder adsorbiert. Durch die verbleibende Restbeladung wird zum einen die Bindung des weiterhin mit dem Zulauf einströmenden Proteins verschlechtert und zum anderen führen Restbeladungen im Bereich des Säulenendes aufgrund der Gleichgewichtseinstellung mit der mobilen Phase zum bekannten Tailing einer isokratischen Elution. Durch Erhöhung von  $v_{\text{int}}$  auf  $7,36 \times 10^{-4} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  wird dieser negative Effekt einer Dispersion entgegen der Strömungsrichtung zurückgedrängt, das Elutionsprofil geschärft und eine höhere maximale Peakkonzentration von  $0,082 \text{ mol m}^{-3}$  erreicht. Bei weiterer Erhöhung des Geschwindigkeitsverhältnisses und der Geschwindigkeit  $v_{\text{int}}$  auf  $1,47 \times 10^{-3} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  kann jedoch keine weitere Schärfung des Elutionsprofils und Erhöhung der Konzentration des Elutionspeaks erreicht werden. Vielmehr wird nur ein kleiner Elutionspeak mit einer maximalen Peakkonzentration von

0,013 mol m<sup>-3</sup> sichtbar, mit einer anschließenden nur geringen Konzentrationsabnahme in einem kleinen Bereich ohne vollständige Rückkehr zur Basislinie. Ursache hierfür ist, dass es im Falle von sehr hohen  $v_{int}/v_{TCZR}$ -Werten nicht zu der gewünschten, sich mit der Verschiebung der Temperaturzone immer weiter aufstauenden Konzentrationsüberhöhung unmittelbar vor der Temperaturzone kommt. Für hohe  $v_{int}/v_{TCZR}$ -Werte wird in die großen, die Kühlzone durchlaufenden Lösungsvolumina nur eine im Verhältnis geringe Proteinmenge eluiert, wodurch es zu keiner starken Aufkonzentrierung kommen kann. Zudem führt die große Menge an nachströmendem Protein dazu, dass die durch die Verfahrung der Kühlzone freigewordene Bindekapazität sich sehr rasch wieder erschöpft, wodurch kein zwischenzeitlicher Rückgang der Ablaufkonzentration auf die Basislinie erreicht wird.

Um den beschriebenen Einfluss der axialen Dispersion näher zu untersuchen wird im Folgenden anhand des Vergleichs des bereits beschriebenen Simulationsergebnisses bei einer  $v_{int} = 3,76 \times 10^{-4} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  mit dem Simulationsergebnis eines ähnlichen Versuchs bei Erniedrigung des Einflusses der axialen Dispersion ( $D_{ax} = 1 \times 10^{-14} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) und ansonsten identischen Parameterwerten verdeutlicht. Die entsprechenden Chromatogramme sind in Abbildung 6-31A gezeigt. Zur besseren Veranschaulichung wird zusätzlich in Abbildung 6-31B ein Ausschnitt der Chromatogramme gezeigt, wobei ein maximaler y-Achsenwert der Proteinkonzentration im Effluenten von 0,01 mol m<sup>-3</sup> gewählt wurde.



**Abbildung 6-31: Simulierte Chromatogramme einer einfachen Verfahrung der Kühlzone nach vollständiger Beladung der Säule bei einer  $v_{int} = 3,76 \times 10^{-4} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  und unterschiedlichen axialen Dispersionskoeffizienten von  $1 \times 10^{-7} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  (schwarz) und  $1 \times 10^{-14} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  (blau). (A) Darstellung des gesamten Chromatogramms; (B) Ausschnitt des Chromatogramms bis zu einer maximalen Proteinkonzentration im Effluenten von  $0,01 \text{ mol m}^{-3}$ .**

Aus den Chromatogrammen wird deutlich, dass durch geringere Werte des axialen Dispersionskoeffizienten deutlich höhere maximale Proteinkonzentrationen im Elutionspeak feststellbar sind (bis  $0,182 \text{ mol m}^{-3}$ ) und auch die anschließende gewünschte Konzentrationsabnahme im Effluenten deutlich verstärkt auftritt.

Es ist somit festzustellen, dass der starke Einfluss des Geschwindigkeitsverhältnisses auch in den Simulationen nachgewiesen werden konnte und eine Erniedrigung des Verhältnisses  $v_{\text{int}}/v_{\text{TCZR}}$  bis in den Bereich von 3 zu einer deutlichen Erhöhung der erreichten maximalen Peakkonzentration führte. So resultierten ein Verhältnis von ca. 15 zu einem maximalen Konzentrationsfaktor  $CF_{\text{max}}$  von lediglich 2, ein Verhältnis von 7,4 zu einem  $CF_{\text{max}}$  von ca. 13 und ein Verhältnis von 3,8 zu einem  $CF_{\text{max}}$  von über 11,2, falls keine Stofftransporteffekte die Ausbildung eines entsprechend scharfen Peaks verhindern. Allerdings konnte durch die Simulationen erstmals auch der negative Effekt der axialen Dispersion bei zu geringen Strömungsgeschwindigkeiten  $v_{\text{int}}$  belegt werden. Unter Vernachlässigung der axialen Dispersion können daher schärfere Peaks mit höheren  $CF_{\text{max}}$  erreicht werden. Für das  $v_{\text{int}}/v_{\text{TCZR}}$ -Verhältnis von 3,8 konnte in diesem Fall der Wert für  $CF_{\text{max}}$  um den Faktor 2,6 gesteigert werden.

## 6.8.2 Kontinuierliche Trennung komplexer Systeme

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit der Simulation kontinuierlicher Trennvorgänge binärer System mittels des TCZR-Systems. Für die Simulationen wurde das im Anhang beschriebene Temperaturprofil mit einer fünffachen Verfahrung der Kühlzone gewählt. Die weiteren verwendeten Parameter dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 6-25 gelistet. Dabei wurden für alle kinetischen Parameter konstante Werte festgelegt. Die Isothermendaten der Zielkomponente sind identisch mit den Daten der Simulationen des vorigen Abschnittes und entsprechen den gemessenen Werten der Adsorption von Lactoferrin auf S6pg-ItBA. Auch die Werte zur Säulenlänge und Packungsqualität sowie der verwendete Partikelradius wurden beibehalten. Entsprechend der im vorigen Abschnitt beschriebenen Ergebnisse beim gewählten  $D_{\text{ax}} = 6 \times 10^{-7} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , wurden  $v_{\text{int}} = 7,36 \times 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$  und  $v_{\text{TCZR}} = 1 \times 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$  als Geschwindigkeiten der mobilen Phase und der Verfahrzone festgelegt. Die Adsorptionsparameter der thermoresponsiven Langmuirgleichung für eine zweite Komponente wurden variiert und werden in der Beschreibung der einzelnen Simulationsergebnisse angegeben. Auch die Werte des Temperaturoffsets variierten, was vor allem mit veränderlichen Durchbruchzeiten bei Veränderung der Isothermenparameter in Verbindung steht. Die Zulaufkonzentration der zweiten Komponente war in allen Fällen identisch mit der Zulaufkonzentration der Zielkomponente.

**Tabelle 6-25: Standardwerte der chromatographischen Parameter für die Simulationsexperimente bei fünffacher Verfahrung der Temperaturzone.**

	Beschreibung	Parameterwert	Einheit
<b>Konstante Parameter</b>			
	Anzahl der Komponenten im Zulauf	2	-
	Umgebungstemperatur	308,15	K
	Geschwindigkeit des Temperaturprofils, $v_{TCZR}$	$1 \times 10^{-4}$	$\text{m s}^{-1}$
	Konstante $k_{Ads}$	1	$\text{mol m}^{-3}$
Zielkomponente	Temperaturabhängige $k_{des}$ , Term #1 *	4,0822	$\text{mol m}^{-3}$
	Temperaturabhängige $k_{des}$ , Term #2 *	-0,0127	$\text{mol m}^{-3} \text{K}^{-1}$
	Temperaturabhängige $q_{max}$ , Term #1 *	-10,861	$\text{mol m}^{-3}$
	Temperaturabhängige $q_{max}$ , Term #2 *	0,0433	$\text{mol m}^{-3} \text{K}^{-1}$
	Säulenlänge, L	0,1	m
	Bettporosität, $\epsilon_B$	0,4	-
	Filmdiffusionskoeffizient	1	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
	Partikelporosität, $\epsilon_p$	0,5	-
	Partikelradius	$1,5 \times 10^{-5}$	m
	Konstante Zulaufkonzentrationen	$6,25 \times 10^{-3}$	$\text{mol m}^{-3}$
	Axiale Dispersion, $D_{ax}$	$6 \times 10^{-7}$	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
	Porendiffusionskoeffizient, $D_p$	$1 \times 10^{-6}$	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
	Interstitielle Geschwindigkeit, $v_{int}$	$7,36 \times 10^{-4}$	$\text{m s}^{-1}$
<b>Variable Parameter</b>			
	Temperaturoffset	variabel	m
Komponente #2	Temperaturabhängige $k_{des}$ , Term #1 *	variabel	$\text{mol m}^{-3}$
	Temperaturabhängige $k_{des}$ , Term #2 *	variabel	$\text{mol m}^{-3} \text{K}^{-1}$
	Temperaturabhängige $q_{max}$ , Term #1 *	variabel	$\text{mol m}^{-3}$
	Temperaturabhängige $q_{max}$ , Term #2 *	variabel	$\text{mol m}^{-3} \text{K}^{-1}$

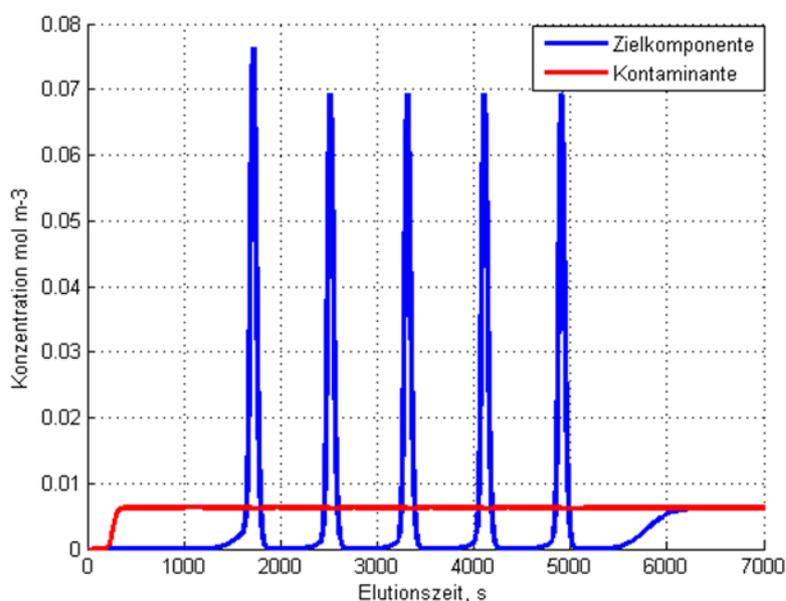
\* vgl. Gleichung 9-3

In einer ersten Simulation eines binären TCZR-Systems wurde der Fall untersucht, dass neben der bindenden Komponente eine zweite Komponente kontinuierlich auf die Säule aufgegeben wird, die allerdings nur sehr schwach bindet und deren Langmuirkonstante unabhängig von der Umgebungstemperatur ist. Während beide Terme von  $q_{max}$  unverändert gelassen wurden und

damit den Werten der Zielkomponenten entsprechen, wurde der erste Term von  $K_d$  verdoppelt und der zweite Term auf 0 gesetzt, sodass sich die thermoresponsive Isothermengleichung 6-5 ergab. Die in diesem Kapitel angegebenen thermoresponsiven Isothermengleichungen sind entsprechend der Ausführungen aus Kapitel 9.1.1 in SI-Einheiten angegeben, was durch die in Großbuchstaben ausgedrückte Gleichgewichtsbeladung  $Q^*$  und Gleichgewichtskonzentration  $C^*$  (beide in  $\text{mol m}^{-3}$ ) sowie der Temperatur  $T$  (in K) ausgedrückt wird.

$$Q^* = \frac{(0,0433 T - 10,861) C^*}{8,1644 + C^*} \quad (6-5)$$

Das entsprechende Chromatogramm wird in Abbildung 6-32 gezeigt, wobei der Offsetwert des Temperaturprofils auf 0,52 m festgelegt wurde.



**Abbildung 6-32: Simuliertes Chromatogramm einer fünffachen Verfahrzone über die Trennsäule und Trennung einer bindenden Zielkomponente und einer Kontaminanten.**

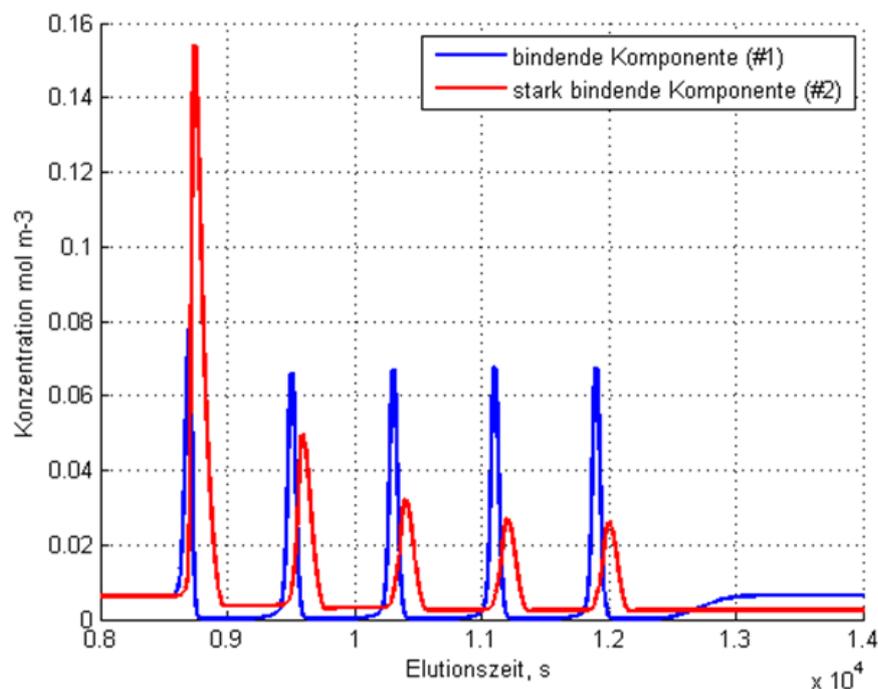
Das Chromatogramm zeigt die fünffache kontinuierliche Akkumulation der Zielkomponente, wobei die Elutionszeiten mit der Verfahrzone genauso gesteuert wurden, dass Protein während des Durchbruchs der Zielkomponente eluierte. Die leichte Erhöhung der maximalen Peakkonzentration des ersten Elutionspeaks ist darauf zurückzuführen, dass die Dauer bis zur Verfahrzone der Temperaturzone länger war als in den folgenden Verfahrungen und dass daher die Beladung der Säule zu diesem Zeitpunkt etwas höher war. Die zweite Komponente – hier als „Kontaminante“ bezeichnet – zeigt aufgrund des hohen  $K_D$ -Wertes eine sehr geringe

Bindungsaffinität und es kommt zu einem frühen Durchbruch. Das simulierte Chromatogramm ähnelt sehr deutlich dem der Trennung von BSA und Lactoferrin (vgl. Abbildung 6-26). Auch hier konnte die Zielkomponente Lactoferrin in scharfen Elutionspeaks eluiert werden, während BSA kontinuierlich nicht-retardiert durch die Säule lief. So konnte gezeigt werden, dass obgleich unterschiedliche Aufkonzentrierungsfaktoren in Simulation und Experiment erreicht wurden, die Simulation in der Lage ist kontinuierliche Trennaufgaben mittels des TCZR-Systems nachzubilden und dann in Zukunft auch vor auszuplanen. Eine Einschränkung liefert allerdings das besondere Verhalten bestimmter Proteine wie z.B. BSA, die bei höheren Temperaturen zu teilweiser Denaturierung und unspezifischer Adsorption neigen. Ein solch spezielles Verhalten kann in der aktuellen Version des Simulationsmodells noch nicht erfasst werden.

In einer weiteren Simulation wurde die Trennung zweier nur geringfügig unterschiedlich bindender Komponenten mit temperaturabhängigem Adsorptionsverhalten für beide Komponenten betrachtet. In der Simulation wurden die Isothermenparameter der zweiten Komponente so gewählt, dass bei gleichen Werten für  $q_{\max}$  eine höhere Adsorptionsaffinität dadurch erreicht wird, dass beide  $k_{\text{des}}$ -Terme um den Faktor 5 reduziert wurden. Die entsprechende thermoresponsive Isothermengleichung dieser stärker bindenden Komponente lautet somit:

$$Q^* = \frac{(0,0433 T - 10,861) C^*}{0,81644 - 0,00254 T + C^*} \quad (6-6)$$

Das entsprechende Chromatogramm wird in Abbildung 6-33 gezeigt, wobei aufgrund des späten Durchbruchs der stark bindenden zweiten Komponente nur der interessante Ausschnitt der Simulation im Bereich zwischen 8000 und 14000 Sekunden gezeigt wird. Der Offsetwert des Temperaturprofils wurde auf 1,22 m gesetzt.



**Abbildung 6-33:** Ausschnitt eines simulierten Chromatogramms einer fünffachen Verfahung der Temperaturzone über eine zuvor voll beladene Trennsäule und der resultierenden Trennung zweier bindender Komponenten. Das Chromatogramm beschreibt den Bereich zwischen 8000 und 14000 s Simulationszeit.

Wie aus dem Chromatogramm ersichtlich wird, kann ein gleichbleibendes Elutionsprofil für die Komponente #1 mit einer maximalen Peakhöhe von etwa  $0,062 \text{ mol m}^{-3}$  erreicht werden. Außerdem erfolgt ein starker Rückgang der am Säulenende ablaufenden Konzentration von Komponente #1 zwischen den Elutionspeaks. Im Falle der stärker bindenden Komponente #2 konnte eine deutlich höhere maximale Peakkonzentration im ersten Elutionspeak mit etwa  $0,155 \text{ mol m}^{-3}$  festgestellt werden, dieser Wert nahm im Laufe der weiteren Verfahung der Kühlzone aber deutlich ab, sodass bereits ab Peak 2 geringere maximale Konzentrationen als die von Komponente #1 erreicht wurden und sich konstante Elutionsprofile erst ab Peak 4 mit einer maximalen Peakkonzentration von  $0,023 \text{ mol m}^{-3}$  ergaben. Der Grund dafür ist, dass aufgrund der starken Bindungsaffinität von Komponente #2 die Geschwindigkeit der Konzentrationsfront innerhalb der Säule sehr langsam ist und es lange dauert bis die Säule voll beladen ist. So entspricht der erste Elutionspeak dem Fall, dass die gesamte Säulenbeladung mit der Zulaufkonzentration von Komponente #2 im Gleichgewicht steht. Da dieser Versuch mit dem Ziel einer Minimierung der Verluste der Zielkomponente #1 ausgelegt wurde und die Elutionszeiten mit der Temperaturzone exakt für diese Komponente geplant wurden, kann die Säule in den weiteren Verfahrungen nicht den Gleichgewichtszustand mit der stärker bindenden Komponente

#2 erreichen und weniger Protein eluiert. Da zusätzlich die hohe Bindungsaffinität eine vollständige Elution von Komponente #2 durch die Kühlzone verhindert, verbleibt in der Säule dementsprechend eine Restbeladung dieser Komponente nach den Verfahrenen und es stellt sich erst nach mehreren Verfahrenen (hier nach vier Verfahrenen) ein Gleichgewichtszustand ein. Die auch hinter der Kühlzone verbleibende Restbeladung führt zusätzlich zu dem bereits beschriebenen Effekt eines isokratischen Tailings, d.h. einer langsamen Elution zwischen den Verfahrenen. Dies führt zu dem zunächst verblüffenden Umstand, dass die stärker bindende Komponente kontinuierlich im Ablauf erscheint, wogegen die schwächer bindende Komponente zwischen ihren scharfen Elutionspeaks praktisch auf null abfällt. Durch eine geeignete Fraktionierung des Ablaufs ist daher auch für dieses System mit zwei bindenden Komponenten eine weitgehende und kontinuierliche Trennung möglich. Unabhängig von diesen Beobachtungen konnte die Verdrängungstheorie bestätigt werden, da die schwächer bindende Komponente in allen Elutionspeaks vor der stärker bindenden Komponente eluierte. Der Verdrängungseffekt sorgte außerdem noch für eine weitere Schärfung der ohnehin scharfen Elutionspeaks der schwächer bindenden Komponente.

## 7 Fazit und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war die effektive Nutzung thermoresponsiver Sorbensmaterialien zur flüssigchromatographischen Bioseparation von Proteingemischen. In diesem Zusammenhang wurden wichtige Meilensteine innerhalb dieser Arbeit erreicht. Zu diesen zählen u.a. (i) Beschreibung thermodynamischer Parameter zur Identifikation besonders geeigneter, kommerzieller Sorbentien für die temperaturgesteuerte Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC); (ii) Anwendungsbeispiele der temperaturgesteuerten Chromatographie auf HIC-Medien; (iii) Entwicklung eines neuartigen Bioseparationsreaktors (TCZR) zur isokratischen, kontinuierlichen flüssigkeitschromatographischen Proteinseparation; (iv) Applikation des TCZR in Kombination mit speziell funktionalisierten thermoresponsiven Ionenaustauschsorbentien (thermoCEX-Partikel); (v) Implementierung der Temperaturabhängigkeit der Isothermenparameter sowie des steuerbaren Temperaturverlaufes innerhalb eines TCZR in ein chromatographisches Simulationsmodell und theoretische Beschreibung der Trennung binärer Stoffgemische.

Der Temperatureffekt auf die Adsorption von Proteinen wurde an zwei Klassen von Chromatographiesorbentien untersucht. Dabei handelte es sich einerseits um kommerziell erhältliche HIC-Sorbentien und andererseits um oberflächenpolymermodifizierte, thermoresponsive Ionenaustauschmedien. Zum Erreichen der genannten Meilensteine wurden die Sorbentien zunächst in absatzweisen Experimenten auf ihre temperaturabhängigen Adsorptionscharakteristiken untersucht. Als Modellproteine dienten hierbei vor allem BSA für die HIC-Anwendungen und Lactoferrin im Falle der thermoCEX-Partikel. Während von den ausgewählten HIC-Sorbentien nur Butyl-Sepharose eine nennenswerte Temperaturabhängigkeit der Adsorption aufweist, zeigte sich dieser Effekt bei allen drei hergestellten thermoCEX-Partikeln. Die thermoCEX-Partikel zeigen jedoch allesamt deutlich höhere Kapazitätsunterschiede.

Im Zuge der Entwicklung des TCZR-Systems mit thermoCEX-Partikeln konnten in ersten absatzweisen Experimenten kritische Betriebsparameter identifiziert werden. So konnte die Effizienz der Proteinelution vor allem durch eine Reduktion der Verfahrensgeschwindigkeit der Temperaturzone auf ca. 10-20 % der interstitiellen Geschwindigkeit der mobilen Phase gesteigert werden. Auch die Verwendung kleinerer poröser Partikel mit geringeren Radii und Porenpfadlängen führte zu deutlich verbesserten Elutionseffizienzen. Speziell der Stofftransportschritt der Porendiffusion während der Proteinelution wurde hierbei als geschwindigkeitsbestimmend identifiziert. Durch optimierte Einstellung entsprechender

Parameter konnte die Menge an eluierbarem Protein in einer Temperaturzonenverfahren um etwa 40 % gesteigert werden.

Bei der abschließenden Demonstration der kontinuierlichen Applikation konnte zudem der Einfluss der Zulaufkonzentration beschrieben werden. So stellte sich bei geringerer Proteinkonzentration zwar erst nach längerer Zeit ein Gleichgewichtszustand ein, jedoch konnte der Aufkonzentrierungsfaktor bei Halbierung der Zulaufkonzentration auf  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  um den Faktor 1,16 gesteigert werden. Die kontinuierliche Trennung eines binären Systems führte zur gewünschten Akkumulation der Zielkomponente Lactoferrin in kleinen Volumina mit hohen Konzentrationen, wobei es bei Verwendung der ausgewählten zweiten Komponente BSA zu ungewünschten und unspezifischen Adsorptionsvorgängen auf der Säule kam. Aus diesem Grund kam es zu einem vermehrten Verlust des Lactoferrins und einer Reduktion des mittleren Aufkonzentrierungsfaktors.

Als interessante Alternative zu thermoCEX-Partikeln wurde erstmalig ein thermoCEX-Monolith zur thermoresponsiven Chromatographie von Proteinen hergestellt und eingesetzt. Die positiven Effekte einer minimierten Massentransportlimitierung und stark erhöhter, anwendbarer Flussraten überwiegen hierbei deutlich die reduzierten maximalen Kapazitäten, die aber durch optimierte Funktionalisierungsprotokolle sicherlich noch gesteigert werden können. Die Zukunft der thermoresponsiven Medien für den Einsatz im TCZR-System würde dann sicherlich thermoCEX-Monolithen gehören.

Die Vorgänge in der Trennsäule des TCZR während der Verfahren der Temperaturzone konnten bis dato nur schwer beschrieben werden und die Planung der ersten Experimente beruhte daher hauptsächlich auf Heuristiken und Hypothesen. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Eric von Lieres vom Forschungszentrum Jülich wurde daher das Chromatographie-simulationsprogramm CADET um den Fall thermoresponsiver Sorbentien und verfahrbarer Temperaturprofile erweitert. Die ersten Simulationsergebnisse sind vielversprechend und bestätigen, dass das Modell in der Lage ist, zumindest qualitativ die real durchgeführten Experimente nachzuvollziehen. Quantitative Abweichungen von realen Ergebnissen sind nach derzeitigem Stand vor allem darauf zurückzuführen, dass die aus absatzweisen Versuchen ermittelten Isothermenparameter der Adsorption von Proteinen auf polymermodifizierten Partikeln nicht den Werten unter dynamischen Bedingungen entsprechen. Für zukünftige Anwendungen ist das Simulationsprogramm aber ein wichtiges Hilfsmittel zur Planung, Vorhersage und *in silico* Optimierung von Trennvorgängen komplexerer Stoffgemische. Für die

Trennung von realen Stoffgemischen ist dabei aber auch die genaue und präzise Kenntnis der Adsorptionsparameter vonnöten, sodass die Verfahren zur Ermittlung dieser Werte noch verbessert werden sollten. Hierbei sollten die überwiegend genutzten statischen Batchverfahren durch dynamische Verfahren, wie z.B. die Perturbationsmethode, ersetzt werden. Zusätzlich müssen die Stoffgemische und im Speziellen die jeweiligen Einzelkomponenten auf ihre maximale Löslichkeit und ihre Temperaturstabilität untersucht werden.

Abschließend sollen noch einige Möglichkeiten und Trends zur Optimierung der TCZR-Anwendung erwähnt werden. Neben der Partikel- und Prozessoptimierung kann der TCZR-Prozess in Zukunft auch apparatetechnisch dahingehend verbessert werden, dass die erreichbare Temperaturdifferenz der Umgebungstemperatur zur Kühlzonentemperatur gesteigert wird. Diese Optimierung könnte beispielsweise durch einen Sandwichaufbau mit mehreren übereinander gelagerten Peltierelementen oder durch Wasserkühlung stattfinden. Um Temperaturinstabilitäten sensibler Proteine vorzubeugen, könnte mit anderen thermoresponsiven Polymeren gearbeitet werden, sodass maximale Kapazitätsunterschiede bei niedrigeren Temperaturen erreicht werden. Um den TCZR-Prozess nicht nur auf Kationenaustauschvorgänge zu beschränken sollten zudem thermoresponsive Versionen weiterer Funktionalitäten, wie z.B. Anionenaustauscher oder Metallchelator-Bildner, entwickelt werden.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] Guiochon, G., Beaver, L. A., Separation science is the key to successful biopharmaceuticals. *Journal of Chromatography A* 2011, *1218*, 8836-8858.
- [2] Walsh, G., Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: an issue of nomenclature. *Eur J Pharm Sci* 2002, *15*, 135-138.
- [3] Ashton, G., Growing pains for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology* 2001, *19*, 307-311.
- [4] Wurm, F. M., Manufacturing of biopharmaceuticals and implications for biosimilars. *Kidney Blood Press Res* 2007, *30 Suppl 1*, 6-8.
- [5] Aggarwal, S., What's fueling the biotech engine-2007. *Nature Biotechnology* 2008, *26*, 1227-1233.
- [6] Carta, G., Jungbauer, A., *Protein Chromatography - Process development and Scale-up*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 2010.
- [7] Amersham Biosciences, *Protein Purification - Handbook*, Code no. 18-1132-29.
- [8] Hubbuch, J., Kula, M. R., Isolation and purification of biotechnological products. *Journal of Non-Equilibrium Thermodynamics* 2007, *32*, 99-127.
- [9] Becker, J., Einsatz magnetischer Extraktionsphasen zur Bioproduktaufarbeitung, *Doktorarbeit, Institut für Funktionelle Grenzflächen, Universität Karlsruhe TH*, Karlsruhe 2009.
- [10] Meyer, A., Einsatz magnetischer Trennverfahren zur Aufbereitung von Molkereiprodukten, *Doktorarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Karlsruhe (TH)*, Karlsruhe 2004.
- [11] Nfor, B. K., Ahamed, T., van Dedem, G. W. K., van der Wielen, L. A. M., *et al.*, Design strategies for integrated protein purification processes: challenges, progress and outlook. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2008, *83*, 124-132.
- [12] Ebner, N., Einsatz von Magnettrenntechnologie bei der Bioproduktaufarbeitung, *Doktorarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Karlsruhe (TH)*, Karlsruhe 2005.
- [13] Lienqueo, M. E., Asenjo, J. A., Use of expert systems for the synthesis of downstream protein processes. *Computers & Chemical Engineering* 2000, *24*, 2339-2350.
- [14] Fish, N. M., Lilly, M. D., The Interactions between Fermentation and Protein Recovery. *Bio-Technology* 1984, *2*, 623-627.
- [15] Schugerl, K., Hubbuch, J., Integrated bioprocesses. *Current Opinion in Microbiology* 2005, *8*, 294-300.
- [16] McCormick, D. K., Expanded Bed Adsorption. *Bio-Technology* 1993, *11*, 1059-1059.
- [17] Li, J., Chase, H. A., Use of expanded bed adsorption to purify flavonoids from Ginkgo biloba L. *Journal of Chromatography A* 2009, *1216*, 8759-8770.
- [18] Boeris, V., Balce, I., Vennapusa, R. R., Rodriguez, M. A., *et al.*, Production, recovery and purification of a recombinant beta-galactosidase by expanded bed anion exchange adsorption.

*Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2012, 900, 32-37.

[19] Yap, W. B., Tey, B. T., Alitheen, N. B. M., Tan, W. S., Purification of His-tagged hepatitis B core antigen from unclarified bacterial homogenate using immobilized metal affinity-expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography A* 2010, 1217, 3473-3480.

[20] Ng, M. Y. T., Tan, W. S., Tey, B. T., Purification of recombinant hepatitis B core antigen from unclarified *Escherichia coli* feedstock using phage-immobilized expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2012, 903, 60-67.

[21] Johansson, H. J., Jagersten, C., Shiloach, J., Large scale recovery and purification of periplasmic recombinant protein from E-coli using expanded bed adsorption chromatography followed by new ion exchange media. *Journal of Biotechnology* 1996, 48, 9-14.

[22] Rito-Palomares, M., Lyddiatt, A., Process integration using aqueous two-phase partition for the recovery of intracellular proteins. *Chemical Engineering Journal* 2002, 87, 313-319.

[23] Asenjo, J. A., Andrews, B. A., Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications. *Journal of Chromatography A* 2012, 1238, 1-10.

[24] Franzreb, M., Siemann-Herzberg, M., Hobley, T. J., Thomas, O. R. T., Protein purification using magnetic adsorbent particles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006, 70, 505-516.

[25] Hoffmann, C., Franzreb, M., Holl, W. H., A novel high-gradient magnetic separator (HGMS) design for biotech applications. *Ieee Transactions on Applied Superconductivity* 2002, 12, 963-966.

[26] Müller, C., Wagner, K., Frankenfeld, K., Franzreb, M., Simplified purification of equine chorionic gonadotropin (eCG)--an example of the use of magnetic microsorbents for the isolation of glycoproteins from serum. *Biotechnology Letters* 2011, 33, 929-936.

[27] Stark, D., Von Stockar, U., In Situ Product Removal (ISPR) in Whole Cell Biotechnology During the Last Twenty Years, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin 2002, pp. 150-175.

[28] Käppler, T., Cerff, M., Ottow, K., Hobley, T., Posten, C., In Situ Magnetic Separation for Extracellular Protein Production. *Biotechnology and Bioengineering* 2009, 102, 535-545.

[29] Lye, G. J., Woodley, J. M., Application of in situ product-removal techniques to biocatalytic processes. *Trends in Biotechnology* 1999, 17, 395-402.

[30] Schulte, M., Strube, J., Preparative enantioseparation by simulated moving bed chromatography. *Journal of Chromatography A* 2001, 906, 399-416.

[31] Liu, H., Application of new materials and tools in bioseparation, *Ph.D. thesis, College of Engineering and Physical Sciences, University of Birmingham*, Birmingham 2009.

[32] Mandenius, C. F., Brundin, A., Bioprocess Optimization Using Design-of-Experiments Methodology. *Biotechnology Progress* 2008, 24, 1191-1203.

[33] Susanto, A., Knieps-Grunhagen, E., von Lieres, E., Hubbuch, J., High Throughput Screening for the Design and Optimization of Chromatographic Processes: Assessment of Model Parameter

- Determination from High Throughput Compatible Data. *Chemical Engineering & Technology* 2008, 31, 1846-1855.
- [34] Sontheimer, H., Frick, B. R., Fettig, J., Hörner, G., *et al.*, *Adsorptionsverfahren zur Wasserreinigung*, DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe (TH), Karlsruhe 1985.
- [35] Langmuir, I., The Adsorption of Gases on Plane Surfaces of Glass, Mica and Platinum. *J.Am.Chem. Soc* 1918, 40, 1361-1403.
- [36] Butler, J. A. V., Ockrent, C., Studies in Electrocapillarity. III. *The Journal of Physical Chemistry* 1929, 34, 2841-2859.
- [37] Madadlou, A., O'Sullivan, S., Sheehan, D., Fast Protein Liquid Chromatography, in: Walls, D., Loughran, S. T. (Eds.), *Protein Chromatography, Methods and Protocols*, Springer, New York Dordrecht Heidelberg London 2011.
- [38] Jungbauer, A., Chromatographic media for bioseparation. *Journal of Chromatography A* 2005, 1065, 3-12.
- [39] Gottschalk, U., *Process Scale Purification of Antibodies*, Wiley 2009.
- [40] Guiochon, G., Preparative liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2002, 965, 129-161.
- [41] Müller, T. K. H., Franzreb, M., Suitability of commercial hydrophobic interaction sorbents for temperature-controlled protein liquid chromatography under low salt conditions. *Journal of Chromatography A* 2012, 1260, 88-96.
- [42] Sofer, G., Hagel, L., *Handbook of Process Chromatography: a Guide to optimization, Scale-up and Validation*, Academic Press, London, San Diego 1999.
- [43] Wu, S. L., Karger, B. L., Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *High Resolution Separation and Analysis of Biological Macromolecules, Pt A* 1996, 270, 27-47.
- [44] Graumann, K., Ebenbichler, A. A., Development and scale up of preparative HIC for the purification of a recombinant therapeutic protein. *Chemical Engineering & Technology* 2005, 28, 1398-1407.
- [45] Jungbauer, A., Machold, C., Hahn, R., Hydrophobic interaction chromatography of proteins: III. Unfolding of proteins upon adsorption. *Journal of Chromatography A* 2005, 1079, 221-228.
- [46] Queiroz, J. A., Tomaz, C. T., Cabral, J. M. S., Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Biotechnology* 2001, 87, 143-159.
- [47] O'Connor, K. C., Ghatak, S., Stollar, B. D., Use of hydrophobic interaction chromatography to separate recombinant antibody fragments from associated bacterial chaperone protein GroEL. *Analytical Biochemistry* 2000, 278, 239-241.
- [48] Diogo, M. M., Ribeiro, S., Queiroz, J. A., Monteiro, G. A., *et al.*, Scale-up of hydrophobic interaction chromatography for the purification of a DNA vaccine against rabies. *Biotechnology Letters* 2000, 22, 1397-1400.

- [49] Diogo, M. M., Queiroz, J. A., Monteiro, G. A., Martins, S. A. M., *et al.*, Purification of a cystic fibrosis plasmid vector for gene therapy using hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnology and Bioengineering* 2000, *68*, 576-583.
- [50] Esquibel-King, M. A., Dias-Cabral, A. C., Queiroz, J. A., Pinto, N. G., Study of hydrophobic interaction adsorption of bovine serum albumin under overloaded conditions using flow microcalorimetry. *Journal of Chromatography A* 1999, *865*, 111-122.
- [51] Shepard, C.C., Tiselius, A., Discussions of the Faraday society. *Hazel, Watson and Wilney, London* 1949, *7*, 275.
- [52] Hjertén, S., Some general aspects of hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* 1973, *87*, 325-331.
- [53] Muca, R., Piatkowski, W., Antos, D., Altering efficiency of hydrophobic interaction chromatography by combined salt and temperature effects. *Journal of Chromatography A* 2009, *1216*, 8712-8721.
- [54] Zhang, Y. J., Cremer, P. S., Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology* 2006, *10*, 658-663.
- [55] Baldwin, R. L., How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophysical Journal* 1996, *71*, 2056-2063.
- [56] Geng, X., Guo, L. A., Chang, J., Study of the retention mechanism of proteins in hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* 1990, *507*, 1-23.
- [57] El Rassi, Z., Recent progress in reversed-phase and hydrophobic interaction chromatography of carbohydrate species. *Journal of Chromatography A* 1996, *720*, 93-118.
- [58] Karlsson, E., Rydén, L., Brewer, J., Ion Exchange Chromatography, in: Janson, J.-C., Rydén, L. (Eds.), *Protein Purification*, Wiley-VCH, New York 1998.
- [59] Yamamoto, S., Miyagawa, E., Retention behavior of very large biomolecules in ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A* 1999, *852*, 25-30.
- [60] Levison, P. R., Large-scale ion-exchange column chromatography of proteins - Comparison of different formats. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2003, *790*, 17-33.
- [61] Kopaciewicz, W., Rounds, M. A., Fausnaugh, J., Regnier, F. E., Retention Model for High-Performance Ion-Exchange Chromatography. *Journal of Chromatography* 1983, *266*, 3-21.
- [62] Rathore, A. S., Velayudhan, A., *Scale-Up and Optimization in Preparative Chromatography, Principles and Biopharmaceutical Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York 2003.
- [63] Scott, C. D., Spence, R. D., Sisson, W. G., Pressurized, Annular Chromatograph for Continuous Separations. *Journal of Chromatography* 1976, *126*, 381-400.
- [64] Rajendran, A., Peper, S., Johannsen, M., Mazzotti, M., *et al.*, Enantioseparation of 1-phenyl-1-propanol by supercritical fluid-simulated moving bed chromatography. *Journal of Chromatography A* 2005, *1092*, 55-64.

- [65] Mazzotti, M., Storti, G., Morbidelli, M., Optimal operation of simulated moving bed units for nonlinear chromatographic separations. *Journal of Chromatography A* 1997, 769, 3-24.
- [66] Rajendran, A., Paredes, G., Mazzotti, M., Simulated moving bed chromatography for the separation of enantiomers. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216, 709-738.
- [67] Bubnik, Z., Pour, V., Gruberova, A., Starhova, H., *et al.*, Application of continuous chromatographic separation in sugar processing. *Journal of Food Engineering* 2004, 61, 509-513.
- [68] Jo, S. H., Han, Q., Suh, Y. W., Ryu, J. B., *et al.*, Particle-Size Optimization for a Polymer Coated Silica Gel in SMB Chromatography for Amino Acid Separation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2009, 32, 2822-2838.
- [69] Andersson, J., Mattiasson, B., Simulated moving bed technology with a simplified approach for protein purification - Separation of lactoperoxidase and lactoferrin from whey protein concentrate. *Journal of Chromatography A* 2006, 1107, 88-95.
- [70] Agrawal, G., Kawajiri, Y., Comparison of various ternary simulated moving bed separation schemes by multi-objective optimization. *Journal of Chromatography A* 2012, 1238, 105-113.
- [71] Martin, A. V. P., *Discussions of the Faraday Society* 1949, 7.
- [72] Uretschlager, A., Einhauer, A., Jungbauer, A., Continuous separation of green fluorescent protein by annular chromatography. *Journal of Chromatography A* 2001, 908, 243-250.
- [73] Reissner, K., Prior, A., Wolfgang, J., Bart, H. J., Byers, C. H., Preparative desalting of bovine serum albumin by continuous annular chromatography. *Journal of Chromatography A* 1997, 763, 49-56.
- [74] Zou, H. F., Huang, X. D., Ye, M. L., Luo, Q. Z., Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* 2002, 954, 5-32.
- [75] Hjerten, S., Liao, J. L., Zhang, R., High-Performance Liquid-Chromatography on Continuous Polymer Beds. *Journal of Chromatography* 1989, 473, 273-275.
- [76] Podgornik, A., Jancar, J., Mihelic, I., Barut, M., Strancar, A., Large Volume Monolithic Stationary Phases: Preparation, Properties, and Applications. *Acta Chimica Slovenica* 2010, 57, 1-8.
- [77] Guiochon, G., Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2007, 1168, 101-168.
- [78] Muca, R., Piatkowski, W., Antos, D., Effects of thermal heterogeneity in hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216, 6716-6727.
- [79] Tongta, A., Liapis, A. I., Siehr, D. J., Equilibrium and kinetic parameters of the adsorption of  $\alpha$ -chymotrypsinogen A onto hydrophobic porous adsorbent particles. *Journal of Chromatography A* 1994, 686, 9.
- [80] Goheen, S. C., Engelhorn, S. C., Hydrophobic interaction high-performance liquid chromatography of proteins. *Journal of Chromatography A* 1984, 317, 55-65.

- [81] Goheen, S. C., Gibbins, B. M., Protein losses in ion-exchange and hydrophobic interaction high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2000, *890*, 73-80.
- [82] Haidacher, D., Temperature effects in hydrophobic interaction chromatography. *PNAS* 1996, *93*, 6.
- [83] Wei, Y., Yan, Y., Zhao, J., Geng, X., Liu, R., Temperature Effects in Hydrophobic Interaction Chromatography of Proteins. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2006, *29*, 439 - 449.
- [84] Muca, R., Marek, W., Piatkowski, W., Antos, D., Influence of the sample-solvent on protein retention, mass transfer and unfolding kinetics in hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* 2010, *1217*, 2812-2820.
- [85] Bonomo, R. C. F., Minim, L. A., Coimbra, J. S. R., Fontan, R. C. I., *et al.*, Hydrophobic interaction adsorption of whey proteins: Effect of temperature and salt concentration and thermodynamic analysis. *Journal of Chromatography B* 2006, *844*, 6-14.
- [86] Ueberbacher, R., Rodler, A., Hahn, R., Jungbauer, A., Hydrophobic interaction chromatography of proteins: thermodynamic analysis of conformational changes. *J Chromatogr A* 2010, *1217*, 184-190.
- [87] Chen, W.-Y., Huang, H.-M., Lin, C.-C., Lin, F.-Y., Chan, Y.-C., Effect of Temperature on Hydrophobic Interaction between Proteins and Hydrophobic Adsorbents: Studies by Isothermal Titration Calorimetry and the van't Hoff Equation. *Langmuir* 2003, *19*, 9395-9403.
- [88] Xia, F., Nagrath, D., Cramer, S. M., Effect of pH changes on water release values in hydrophobic interaction chromatographic systems. *Journal of Chromatography A* 2005, *1079*, 229-235.
- [89] Gil, E. S., Hudson, S. M., Stimuli-reponsive polymers and their bioconjugates. *Progress in Polymer Science* 2004, *29*, 1173-1222.
- [90] Maharjan, P., Woonton, B. W., Bennett, L. E., Smithers, G. W., *et al.*, Novel chromatographic separation -- The potential of smart polymers. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2008, *9*, 232-242.
- [91] Hoffman, A., Patrick, S. S., Volga, B., Guohua, C., *et al.*, Really smart bioconjugates of smart polymers and receptor proteins. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000, *52*, 577-586.
- [92] Ewert, S., Inbetriebnahme und Charakterisierung eines neuartigen Bioseparationsreaktors (TCZR) für die thermoresponsive Flüssigkeitschromatographie, *Diplomarbeit, Institut für Funktionelle Grenzflächen, Karlsruher Institut für Technologie, Eggenstein-Leopoldshafen* 2011.
- [93] Zourna, K., Smart magnetic affinity adsorbents, *College of Engineering and Physical Sciences Ph.D. thesis, University of Birmingham, Birmingham* 2009.
- [94] Echeverria, C., Lopez, D., Mijangos, C., UCST Responsive Microgels of Poly(acrylamide-acrylic acid) Copolymers: Structure and Viscoelastic Properties. *Macromolecules* 2009, *42*, 9118-9123.
- [95] Costa, R. O. R., Freitas, R. F. S., Phase behavior of poly(N-isopropylacrylamide) in binary aqueous solutions. *Polymer* 2002, *43*, 5879-5885.

- [96] Heskins, M., Guillet, J. E., Solution Properties of Poly(N-isopropylacrylamide). *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry* 1968, 2, 1441-1455.
- [97] Schild, H. G., Poly (N-Isopropylacrylamide) - Experiment, Theory and Application. *Progress in Polymer Science* 1992, 17, 163-249.
- [98] Netopilik, M., Bohdanecky, M., Chytrý, V., Ulbrich, K., Cloud point of poly(N-isopropylmethacrylamide) solutions in water: Is it really a point? *Macromolecular Rapid Communications* 1997, 18, 107-111.
- [99] Solomon, O. F., Corciove, M., Ciuta, I., Boghina, C., Properties of Solutions of Poly-N-Vinylcaprolactam. *Journal of Applied Polymer Science* 1968, 12, 1835-&.
- [100] Hoshino, K., Taniguchi, M., Kitao, T., Morohashi, S., Sasakura, T., Preparation of a new thermo-responsive adsorbent with maltose as a ligand and its application to affinity precipitation. *Biotechnology and Bioengineering* 1998, 60, 568-579.
- [101] Scarpa, J. S., Mueller, D. D., Klotz, I. M., Slow Hydrogen-Deuterium Exchange in a Non-Alpha-Helical Polyamide. *Journal of the American Chemical Society* 1967, 89, 6024-&.
- [102] Yamauchi, H., Maeda, Y., LCST and UCST Behavior of Poly(N-isopropylacrylamide) in DMSO[Water mixed solvents studied by IR and micro-Raman Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B* 2007, 111, 12964-12968.
- [103] Chuang, W. J., Chiu, W. Y., Tai, H. J., Thermally crosslinkable poly(N-isopropylacrylamide) copolymers: Synthesis and characterization of temperature-responsive hydrogel. *Materials Chemistry and Physics* 2012, 134, 1208-1213.
- [104] Lutz, J. F., Akdemir, O., Hoth, A., Point by point comparison of two thermosensitive polymers exhibiting a similar LCST: Is the age of poly(NIPAM) over? *Journal of the American Chemical Society* 2006, 128, 13046-13047.
- [105] Kumar, A., Wahlund, P. O., Kepka, C., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., Purification of histidine-tagged single-chain Fv-antibody fragments by metal chelate affinity precipitation using thermoresponsive copolymers. *Biotechnology and Bioengineering* 2003, 84, 494-503.
- [106] Monji, N., Hoffman, A. S., A Novel Immunoassay System and Bioseparation Process Based on Thermal Phase Separating Polymers. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1987, 14, 107-120.
- [107] Da Silva, R. M. P., Mano, J. F., Reis, R. L., Smart thermoresponsive coatings and surfaces for tissue engineering: switching cell-material boundaries. *Trends in Biotechnology* 2007, 25, 577-583.
- [108] Eeckman, F., Amighi, K., Moës, A. J., Effect of some physiological and non-physiological compounds on the phase transition temperature of thermoresponsive polymers intended for oral controlled-drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 2001, 222, 259-270.
- [109] Park, T. G., Hoffman, A. S., Thermal Cycling Effects on the Bioreactor Performances of Immobilized Beta-Galactosidase in Temperature-Sensitive Hydrogel Beads. *Enzyme and Microbial Technology* 1993, 15, 476-482.
- [110] Lakhari, H., Okano, T., Nurdin, N., Luthi, C., *et al.*, Temperature-responsive size-exclusion chromatography using poly(N-isopropylacrylamide) grafted silica. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1998, 1379, 303-313.

- [111] Hosoya, K., Sawada, E., Kimata, K., Araki, T., *et al.*, In-Situ Surface-Selective Modification of Uniform Size Macroporous Polymer Particles with Temperature-Responsive Poly-N-Isopropylacrylamide. *Macromolecules* 1994, 27, 3973-3976.
- [112] Adrados, B. P., Galaev, I. Y., Nilsson, K., Mattiasson, B., Size exclusion behavior of hydroxypropylcellulose beads with temperature-dependent porosity. *Journal of Chromatography A* 2001, 930, 73-78.
- [113] Kanazawa, H., Yamamoto, K., Matsushima, Y., Takai, N., *et al.*, Temperature-Responsive Chromatography Using Poly(N-isopropylacrylamide)-Modified Silica. *Analytical Chemistry* 1996, 68, 100-105.
- [114] Kanazawa, H., Yamamoto, K., Kashiwase, Y., Matsushima, Y., *et al.*, Analysis of peptides and proteins by temperature-responsive chromatographic system using N-isopropylacrylamide polymer-modified columns. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1997, 15, 1545-1550.
- [115] Kanazawa, H., Kashiwase, Y., Yamamoto, K., Matsushima, Y., *et al.*, Temperature-Responsive Liquid Chromatography. 2. Effects of Hydrophobic Groups in N-Isopropylacrylamide Copolymer-Modified Silica. *Analytical Chemistry* 1997, 69, 823-830.
- [116] Kanazawa, H., Matsushima, Y., Okano, T., Temperature-responsive chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 1998, 17, 435-440.
- [117] Yamamoto, K., Kanazawa, H., Matsushima, Y., Nobuhara, T., *et al.*, Preparation of packing materials for temperature-responsive chromatography. Modification of silica surface with Poly (N-isopropylacrylamide). *Chromatography* 2000, 21, 7.
- [118] Kanazawa, H., Ayano, E., Kenichi, C., Kikuchi, A., Okano, T., Temperature-responsive chromatography - Effects of Temperature gradient-. *Analytical Sciences* 2001, 17 supplement, 2.
- [119] Ayano, E., Okada, Y., Sakamoto, C., Kanazawa, H., *et al.*, Study of temperature-responsibility on the surfaces of a thermo-responsive polymer modified stationary phase. *Journal of Chromatography A* 2006, 1119, 51-57.
- [120] Teal, H. E., Hu, Z., Root, D. D., Native Purification of Biomolecules with Temperature-Mediated Hydrophobic Modulation Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry* 2000, 283, 159-165.
- [121] Kikuchi, A., Okano, T., Intelligent thermoresponsive polymeric stationary phases for aqueous chromatography of biological compounds. *Progress in Polymer Science* 2002, 27, 1165-1193.
- [122] Ayano, E., Nambu, K., Sakamoto, C., Kanazawa, H., *et al.*, Aqueous chromatography system using pH- and temperature-responsive stationary phase with ion-exchange groups. *Journal of Chromatography A* 2006, 1119, 58-65.
- [123] Kikuchi, A., Kobayashi, J., Okano, T., Iwasa, T., Sakai, K., Temperature-modulated interaction changes with adenosine nucleotides on intelligent cationic, thermoresponsive surfaces. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 2007, 22, 575-588.
- [124] Nagase, K., Kobayashi, J., Kikuchi, A., Akiyama, Y., *et al.*, Thermally-modulated on/off-adsorption materials for pharmaceutical protein purification. *Biomaterials* 2011, 32, 619-627.

- [125] Kobayashi, J., Kikuchi, A., Sakai, K., Okano, T., Aqueous chromatography utilizing hydrophobicity-modified anionic temperature-responsive hydrogel for stationary phases. *Journal of Chromatography A* 2002, 958, 109-119.
- [126] Kobayashi, J., Kikuchi, A., Sakai, K., Okano, T., Cross-linked thermoresponsive anionic polymer-grafted surfaces to separate bioactive basic peptides. *Analytical Chemistry* 2003, 75, 3244-3249.
- [127] Maharjan, P., Hearn, M. T., Jackson, W. R., De Silva, K., Woonton, B. W., Development of a temperature-responsive agarose-based ion-exchange chromatographic resin. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216, 8722-8729.
- [128] Gu, T., *Mathematical Modelling and Scale-up of Liquid Chromatography*, 1995.
- [129] von Lieres, E., Andersson, J., A fast and accurate solver for the general rate model of column liquid chromatography. *Computers & Chemical Engineering* 2010, 34, 1180-1191.
- [130] Bonjour, J., Chalfen, J. B., Meunier, F., Temperature swing adsorption process with indirect cooling and heating. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2002, 41, 5802-5811.
- [131] Bonnissel, M. P., Luo, L. G., Tondeur, D., Rapid thermal swing adsorption. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2001, 40, 2322-2334.
- [132] Sircar, S., Golden, T. C., Purification of hydrogen by pressure swing adsorption. *Separation Science and Technology* 2000, 35, 667-687.
- [133] Yagi, H., Yamamoto, K., Aoyagi, T., New liquid chromatography method combining thermo-responsive material and inductive heating via alternating magnetic field. *Journal of Chromatography B* 2008, 876, 97-102.
- [134] Wohlgemuth, J., Planung und Realisierung automatisierter Mess-und Synthesysteme zur Generierung von Funktionellen Grenzflächen, *Masterthesis, Fakultät für Elektro- und Informationstechnik, Hochschule Karlsruhe, Karlsruhe* 2011.
- [135] Ziegler, J. G., Nichols, N. B., Optimum Settings for Automatic Controllers. *Journal of Dynamic Systems, Measurement and Control* 1993, 115, 3.
- [136] Hirayama, K., Akashi, S., Furuya, M., Fukuhara, K., Rapid Confirmation and Revision of the Primary Structure of Bovine Serum-Albumin by Esims and Frit-Fab Lc Ms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1990, 173, 639-646.
- [137] Ge, S. R., Kojio, K., Takahara, A., Kajiyama, T., Bovine serum albumin adsorption onto immobilized organotrichlorosilane surface: Influence of the phase separation on protein adsorption patterns. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* 1998, 9, 131-150.
- [138] Wetter, L. R., Deutsch, H. F., Immunological Studies on Egg White Proteins .4. Immunochemical and Physical Studies of Lysozyme. *Journal of Biological Chemistry* 1951, 192, 237-242.
- [139] Canfield, R. E., Peptides Derived from Tryptic Digestion of Egg White Lysozyme. *Journal of Biological Chemistry* 1963, 238, 2691-2697.

- [140] Sakota, N., On the Mechanism of the Activation of Alpha-Chymotrypsinogen to Alpha-Chymotrypsin .1. Electrophoretic Studies of the Activation of Alpha-Chymotrypsinogen to Alpha-Chymotrypsin. *Journal of Biochemistry* 1954, 41, 797-801.
- [141] Sakota, N., On the Mechanism of the Activation of Alpha-Chymotrypsinogen to Alpha-Chymotrypsin .2. The Changes in Amino-Terminal Amino Acids of Alpha-Chymotrypsinogen during the Activation by Trypsin. *Journal of Biochemistry* 1955, 42, 69-75.
- [142] Wilcox, P. E., Gertrude E. Perlmann, L. L., Chymotrypsinogens-chymotrypsins, *Methods in Enzymology*, Academic Press 1970, pp. 64-108.
- [143] Beeley, J. A., Stevenso.Sm, Beeley, J. G., Polyacrylamide-Gel Isoelectric Focusing of Proteins - Determination of Isoelectric Points Using an Antimony Electrode. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1972, 285, 293-300.
- [144] González-Chávez, S. A., Arévalo-Gallegos, S., Rascón-Cruz, Q., Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009, 33, 301.e301-301.e308.
- [145] Castellino, F. J., Fish, W. W., Mann, K. G., Structural studies on bovine lactoferrin. *The Journal of Biological Chemistry* 1970, 245, 6.
- [146] Flanagan, R. J., Jones, A. L., Fab antibody fragments - Some applications in clinical toxicology. *Drug Safety* 2004, 27, 1115-1133.
- [147] Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., *et al.*, Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry* 1985, 150, 76-85.
- [148] Müller, T. K. H., Cao, P., Ewert, S., Wohlgemuth, J., *et al.*, Integrated system for temperature-controlled FPLC comprising improved copolymer modified beaded agarose adsorbents and a travelling cooling zone reactor (TCZR) arrangement. *Journal of Chromatography A* 2013, 1285, 97-108.
- [149] Hermansson, G. T., Mallia, A. K., Smith, P. K., *Immobilized affinity ligand techniques*, Academic Press, London 1992.
- [150] Yakushiji, T., Sakai, K., Kikuchi, A., Aoyagi, T., *et al.*, Effects of cross-linked structure on temperature-responsive hydrophobic interaction of poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel-modified surfaces with steroids. *Analytical Chemistry* 1999, 71, 1125-1130.
- [151] Chen, J., Cramer, S. A., Protein adsorption isotherm behavior in hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* 2007, 1165, 67-77.
- [152] Ueberbacher, R., Haimer, E., Hahn, R., Jungbauer, A., Hydrophobic interaction chromatography of proteins V. Quantitative assessment of conformational changes. *Journal of Chromatography A* 2008, 1198-1199, 154-163.
- [153] Muca, R., Piatkowski, W., Antos, D., Altering efficiency of hydrophobic interaction chromatography by combined salt and temperature effects. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216, 8712-8721.
- [154] Gomori, G., Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies. *Methods in Enzymology* 1955, 1, 138-146.

[155] Nicoud, R. M., Seidel-Morgenstern, A., Adsorption isotherms: experimental determination and application to preparative chromatography, *Isolation & Purification* 1996,2, 165-200.

[156] Tallarek, U., Vergeldt, F. J., Van As, H., Stagnant mobile phase mass transfer in chromatographic media: Intraparticle diffusion and exchange kinetics. *Journal of Physical Chemistry B* 1999, 103, 7654-7664.

[157] Roohi, F., Antonietti, M., Titirici, M. M., Thermo-responsive monolithic materials. *Journal of Chromatography A* 2008, 1203, 160-167.

## 9 Anhang

### 9.1 Weitere Daten zur chromatographischen Simulation

#### 9.1.1 Umrechnungen

Die zur Simulation benötigte Umrechnung der Konzentration  $c$  (in  $\text{mg mL}^{-1}$ ) nach  $C$  (in  $\text{mol m}^{-3}$ ) kann unter Kenntnis des molekularen Gewichts (MW) des jeweiligen Proteins (in  $\text{g mol}^{-1}$ ) berechnet werden. Unter Verwendung von Gleichung 9-1 ergibt sich somit für ein 80 kDa großes Protein mit einer Zulaufkonzentration  $c_F = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  eine Zulaufkonzentration  $C_F = 0,00625 \text{ mol m}^{-3}$ .

$$C = \frac{1000 c}{MW} \quad (9-1)$$

Die Umrechnung der Konzentration  $q$  (in  $\text{mg mL}^{-1}$ ) nach  $Q$  (in  $\text{mol m}^{-3}$ ) kann ebenfalls nur unter Kenntnis des molekularen Gewichts (MW) des jeweiligen Proteins (in  $\text{g mol}^{-1}$ ) berechnet werden. Die Beladung wird in diesem Fall auf das Partikelskelett bezogen und mittels Gleichung 9-2 berechnet.

$$Q = \frac{q}{MW} \frac{1000}{\varepsilon_T} \quad (9-2)$$

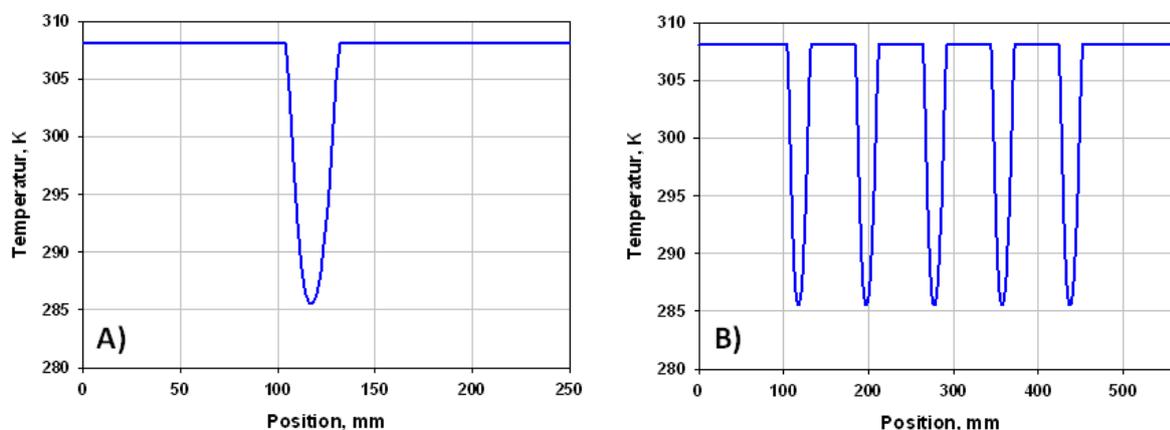
Für die Simulationen wurde standardmäßig eine Zielkomponente benutzt, deren Adsorptionseigenschaften durch die thermoresponsive Langmuirgleichung von Lactoferrin auf S6pg-ItBA Charge #2 beschrieben werden konnte (vgl. Gleichung 6-4). Nach Umrechnung der temperaturabhängigen Gleichungen von  $q_{\text{max}}$  und  $K_D$  sowie der Angabe der Temperatur in K, kann die Gleichung dann in SI-Einheiten angegeben werden (vgl. Gleichung 9-3).

$$Q^* = \frac{(0,0433 T - 10,861) C^*}{4,0822 - 0,0127 T + C^*} \quad (9-3)$$

#### 9.1.2 Temperaturprofile

Für die in Abschnitt 6.8.1 besprochenen Simulationsergebnisse wurde das in Abbildung 9-1A gezeigte Temperaturprofil benutzt. Für die Ergebnisse aus Abschnitt 6.8.2 wurde sofern nicht anders erwähnt das Temperaturprofil entsprechend Abbildung 9-1B benutzt. Das einfache Temperaturprofil entspricht dem gemessenen Temperaturprofil in der Säule, jedoch wurden die Temperaturerhöhungen entfernt, d.h. die Temperatur wurde konstant auf die

Umgebungstemperatur von 308,15 K gesetzt und die Profile somit geglättet. Die Längen der Temperaturprofile betragen 250 mm bzw. 570 mm.

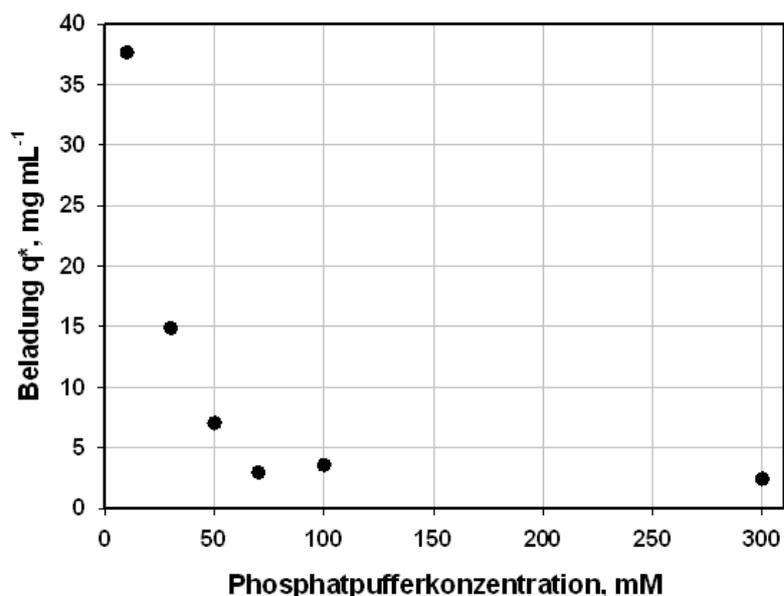


**Abbildung 9-1: Verwendete Temperaturprofile für die Simulation mittels der Software CADET 1.0.0. Temperaturprofil für eine einfache Verfahrnung (A) und eine fünffache Verfahrnung (B).**

## ***9.2 Salzabhängigkeit der Beladungskapazität der thermoCEX Partikel***

Die Elution von an Ionenaustauschersorbentien gebundenen Proteinen wird konventionell durch Erhöhung der Salzkonzentration des umgebenden Puffers (Elutionspuffer) erreicht. Hierbei kommt es zu einer konkurrierenden Adsorption der gebundenen Makromoleküle mit den entsprechenden Gegenionen des gelösten Salzes. Als Elutionssalz wird hauptsächlich NaCl eingesetzt, wobei neben dem Salztyp insbesondere die Salzkonzentration des Puffers einen Einfluss auf die Elutionseffizienz ausübt. Außer bei der Elution spielt die vorliegende Salzkonzentration auch bereits während des Bindevorgangs eine wichtige Rolle.

Um die Salzabhängigkeit der Bindekapazität der thermoCEXPartikel zu untersuchen, wurde entsprechend Methode B Lactoferrin mit einer Startkonzentration von  $c_0 = 10 \text{ mg mL}^{-1}$  mit S6pg-ItBA (Charge #2) als Referenzpartikel in Phosphatpuffer mit Konzentrationen von 10 mM, 30 mM, 50 mM, 70 mM, 100 mM und 300 mM bei 50°C inkubiert. Die Überstände wurden photometrisch vermessen, die Beladungen berechnet und entsprechend Abbildung 9-2 über der Phosphatkonzentration aufgetragen. Die aufgetragenen Messwerte entsprechen dem Mittelwert der Ergebnisse aus Dreifachbestimmungen. Der hier eingesetzte Phosphatpuffer wurde durch das Lösen von Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat in Wasser und das anschließendes Einstellen des pH-Wertes mit o-Phosphorsäure hergestellt.



**Abbildung 9-2: Abhängigkeit der Bindekapazität von der Phosphatkonzentration im umgebenden Puffer bei einer Temperatur von 50°C.**

Wie aus der Abbildung ersichtlich, ist die höchste Beladung von  $37,7 \text{ mg mL}^{-1}$  bei der geringsten Salzkonzentration zu erwarten. Allerdings hat vor allem der Anstieg der Phosphatkonzentration im Bereich geringer Proteinkonzentrationen einen sehr starken Effekt, der in dieser ausgeprägten Form bei kommerziellen Ionenaustauschmaterialien in der Regel nicht beobachtet wird. Schon eine Erhöhung der Salzkonzentration auf 50 mM Phosphatpuffer reduziert die Beladung hier um einen Faktor von 12,7. Ab einer Konzentration des Phosphatpuffers von etwa 70 mM stellt sich eine konstante, aber geringe Beladung um etwa  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  ein. Das Ergebnis zeigt deutlich, dass eine für kommerzielle Ionenaustauschermedien empfohlene Phosphatpufferkonzentrationen von 50 mM (lt. GE Healthcare) in diesem Fall nicht geeignet ist, weshalb in dieser Arbeit trotz der resultierenden geringen Pufferkapazität mit Salzkonzentrationen von 10 mM gearbeitet wurde.

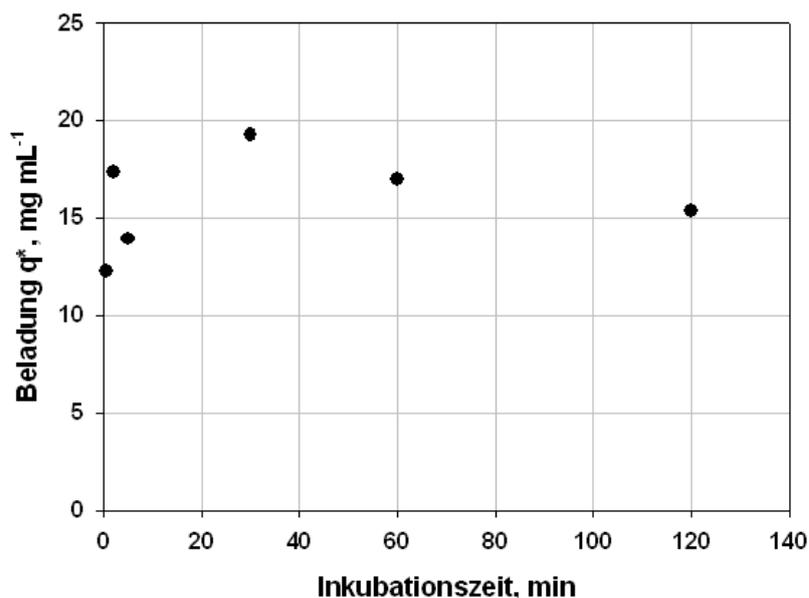
**Tabelle 9-1: Langmuirparameter der Adsorption von Lactoferrin auf S6pg-IgBA (Charge #2) nach Methode B und Phosphatpuffer nach Sørensen mit einer Konzentration von 10 mM.**

Temperatur	$q_{\max}$ , mg mL <sup>-1</sup>	$K_D$ , mg mL <sup>-1</sup>	$q_{\max} K_D^{-1}$
10°C	27,11	0,35	77,46
20°C	37,75	0,46	82,06
35°C	44,31	0,5	89,49
50°C	58,3	0,39	148,35

In dieser Arbeit wurde neben den besprochenen Phosphatpuffern aber auch Phosphatpuffer nach Sørensen eingesetzt, der bei gleicher Phosphatkonzentration eine geringere Leitfähigkeit ( $1\text{--}1,1\text{ mS cm}^{-1}$  gegenüber  $1,7\text{--}1,8\text{ mS cm}^{-1}$ ) aufweist. Tabelle 9-1 zeigt die ermittelten Parameter nach Langmuir-Anpassung der Gleichgewichtsdaten (Methode B, vgl. Kapitel 5.8.1). Obgleich in diesem Fall keine kontinuierliche Abnahme des  $K_D$ -Wertes mit zunehmender Temperatur zu sehen ist, nimmt die anfängliche Isothermensteigung andauernd zu. Verglichen mit den Ergebnisse des zumeist verwendeten Phosphatpuffers in dieser Arbeit (vgl. Tabelle 6-12) ist hier bei geringeren Temperaturen eine höhere Affinität, bei  $50^\circ\text{C}$  jedoch eine geringere Affinität erkennbar, wenn man nur die anfänglichen Steigungen miteinander vergleicht. In allen Fällen konnten hier erwartungsgemäß aufgrund geringerer Leitfähigkeit auch höhere Beladungen festgestellt werden. Die Differenzen der Beladungen sind dadurch ebenfalls ausgeprägter. Obgleich dieser Effekt vorteilhaft für die Anwendung innerhalb des TCZR-Systems sein könnte, wurde in dieser Arbeit mit Ausnahme der Ausführungen in Abschnitt 6.2.2.2 nicht mit Sørensen-Phosphatpuffer gearbeitet.

### ***9.3 Adsorptionskinetik von BSA auf Butyl Sepharose 4FF***

Entsprechend der Probenvorbereitung zur Erstellung einer Isotherme (vgl. 5.7.1) wurde BSA mit einer Ausgangskonzentration von  $c_0 = 40\text{ mg mL}^{-1}$  in insgesamt sechs identischen Ansätzen in Puffer mit  $200\text{ }\mu\text{L}$  des Sorbens vorgelegt. Der verwendete Puffer war  $50\text{ mM}$  Phosphatpuffer mit einer  $c_{AS}$  von  $0,5\text{ M}$ . Die Inkubation im Thermomixer fand bei  $40^\circ\text{C}$  statt. Nach  $0,5, 2, 5, 30, 60$  bzw.  $120$  Minuten wurde immer ein Ansatz entnommen, in einer temperierbaren Zentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert, der Überstand entnommen, photometrisch vermessen und die Beladung bestimmt. Die Kinetik ist in Abbildung 9-3 gezeigt.



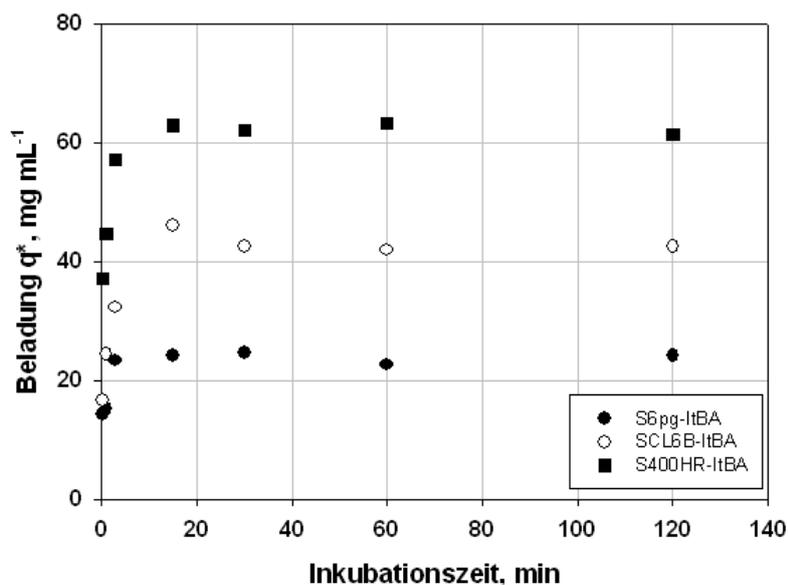
**Abbildung 9-3: Adsorptionskinetik von BSA auf Butyl Sepharose 4 FF.**

Die Adsorption von BSA auf Butyl Sepharose 4 FF wurde auch stellvertretend für die weiteren verwendete HIC-Sorbentien Octyl Sepharose 4FF, Phenyl Sepharose 6FF (low sub) und Phenyl Sepharose 6 FF (high sub) durchgeführt. Nach etwa 20 Minuten hat sich hierbei ein stabiles Gleichgewicht zwischen Sorbenskonzentration und Beladung eingestellt. Eine Inkubationszeit von 60 Minuten repräsentiert daher einen sicheren Wert zur Erzielung der gewünschten Gleichgewichtsbeladung unter den gegebenen Randbedingungen.

## **9.4 Charakterisierung der thermoCEX-Partikel**

### **9.4.1 Adsorptionskinetiken von Lactoferrin**

Entsprechend der Probenvorbereitung zur Erstellung einer Isotherme nach Methode A (vgl. 5.8.1) wurde Lactoferrin mit einer Ausgangskonzentration von  $c_0 = 10 \text{ mg mL}^{-1}$  in insgesamt sieben identischen Ansätzen in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 mit 100  $\mu\text{L}$  des jeweiligen Sorbens vorgelegt. Die Inkubation im Thermomixer fand bei 40°C statt. Nach 0,25, 1, 3, 15, 30, 60 und 120 Minuten wurde immer ein Ansatz entnommen. Die Ansätze nach 0,25, 1 und 3 Minuten wurden durch einen Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von 0,45  $\mu\text{m}$  gefiltert, bei allen anderen Ansätzen wurden die Proben in einer temperierbaren Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand anschließend entnommen. Die Beladung wurde bestimmt und die Kinetik für die thermoCEX-Partikel auf Basis von Superose 6 prep grade, Sephacryl S400 HR und Sepharose CL6B bestimmt. Die Kinetiken werden in Abbildung 9-4 gezeigt.



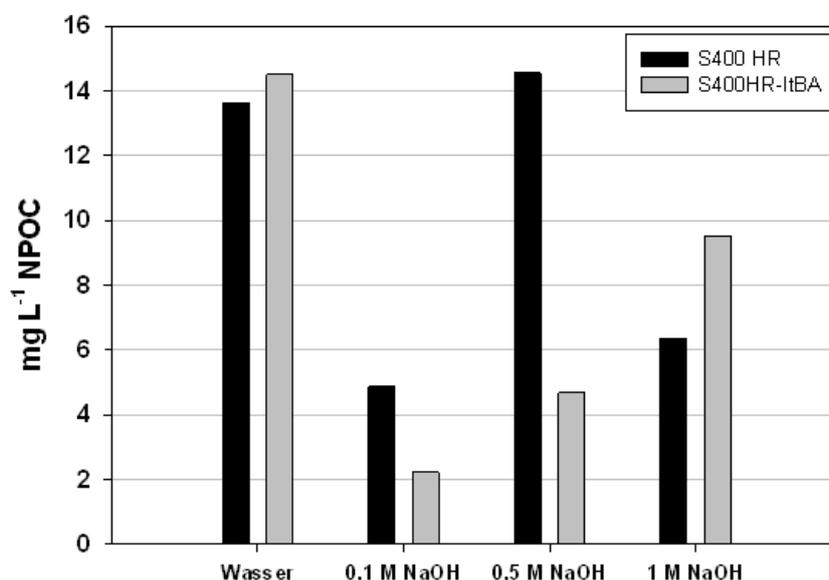
**Abbildung 9-4: Adsorptionskinetik von Lactoferrin auf thermoCEX Partikeln Superose 6 pg (gefüllte Kreise), Sepharose CL6B (offene Kreise) und Sephacryl 400 HR (gefüllte Quadrate).**

Bei der Adsorption von Lactoferrin auf den drei verwendeten unterschiedlichen thermoCEX-Partikeln Superose 6 pg, Sephacryl S400 HR und Sepharose CL6B stellte sich bei einer Systemtemperatur von 40°C nach 15 Minuten bei allen drei Partikeltypen ein Gleichgewicht zwischen Sorbenskonzentration und Beladung ein. Eine Inkubationszeit von 60 Minuten repräsentiert daher einen sicheren Wert zur Erzielung der gewünschten Gleichgewichtsbeladung unter den gegebenen Randbedingungen. Bei Inkubationszeiten unter 10 Minuten zeigt sich das ihrer Größe entsprechende, wesentlich schnellere Sorptionsverhalten der S6pg-ItBA-Partikel. Für diese Partikel war bereits nach 3 Minuten der Gleichgewichtszustand erreicht. Diese Dauer entspricht der Kontaktzeit mit der Kühlzone 3-18-3 im Falle der geringsten eingesetzten Verfahrensgeschwindigkeit von 0,1 mm s<sup>-1</sup>.

#### 9.4.2 NaOH-Beständigkeit

Die Beständigkeit der thermo-CEX-Partikel gegenüber Natronlauge wurde durch die Bestimmung des NPOC-Wertes (non-purgeable organic carbon) mit einem Multi N/C 2000 (Fa. Analytik Jena AG) bestimmt. Hierzu wurden zunächst 100 µL der in Wasser gelösten Partikel mit 5 ml NaOH-Lösung der Konzentrationen 0 M, 0,1 M, 0,5 M bzw. 1 M gemischt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Sedimentation der Partikel wurden anschließend die Proben mit 5 mL HCl in identischer Konzentration bzw. Wasser neutralisiert. Das entstehende CO<sub>2</sub> wurde außerhalb des Analysengerätes mit Stickstoff ausgeblasen. Anschließend wurde die Probe in die

Anlage injiziert. Durch thermokatalytische Hochtemperaturoxidation in Anwesenheit von speziellen Katalysatoren werden etwaige Kohlenstoffverbindungen quantitativ aufgeschlossen und entstehendes CO<sub>2</sub> über einen NDIR Detektor detektiert. Über eine vorangegangene Kalibration kann aus der Peakfläche des entsprechenden Signalverlaufs der Kohlenstoffgehalt der Probe bestimmt werden. Zum Vergleich der Beständigkeit der thermoCEX-Partikel wurde die Testreihe auch mit unfunktionalisierten Basispartikeln durchgeführt. Der NPOC-Gehalt der reinen NaOH-Lösungen und des verwendeten Wassers wurden als Blank-Werte von den jeweiligen Probewerten abgezogen.



**Abbildung 9-5: NPOC-Anteil im Überstand nach Behandlung von 100 µL Sephacryl S400 HR (schwarz) bzw. Sephacryl HR 400 HR-ItBA (grau) mit 5 mL Wasser, 0,1 M NaOH, 0,5 M NaOH bzw. 1 M NaOH.**

Stellvertretend für alle verwendeten thermoCEX-Partikel wurde die Beständigkeit gegenüber NaOH an S400HR-ItBA-Partikeln entsprechend Abbildung 9-5 überprüft und der Anteil an NPOC im Überstand zusätzlich mit unbehandelter S400HR verglichen. Zwar konnten Unterschiede für die beiden Materialien festgestellt werden, es zeigte sich allerdings kein klarer Zusammenhang zur eingesetzten NaOH-Konzentration festgestellt werden. Zudem war der NPOC-Anteil im Überstand der unfunktionalisierten Probe bei 0,1 M NaOH sogar höher als der Wert der ItBA-funktionalisierten Partikel. Interessanterweise konnte der höchste Anteil an NPOC im Überstand für zuvor mit reinem Wasser behandelte thermoresponsiv funktionalisierte Partikel gefunden werden. Aus diesen Gründen wurde eine Beständigkeit des Polymers gegenüber der Regeneration mit NaOH bis zu einer Konzentration von 1 M angenommen.

### 9.4.3 Regeneration der Sorbentien

Zur Untersuchung der Regenerationsfähigkeit der thermoCEX-Partikel nach vorheriger Beladung mit Lactoferrin wurde das im Folgenden erarbeitete Protokoll angewendet. Als Referenzpartikel wurde hier S400HR-ItBA verwendet.

500  $\mu\text{L}$  eines 20 % Slurry der thermo-CEX-Partikel wurden mit 250  $\mu\text{L}$  einer Lactoferrinlösung mit einer Konzentration von  $60 \text{ mg mL}^{-1}$  beladen um eine Ausgangskonzentration von  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  zu erhalten. Als Bindepuffer wurde 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 eingesetzt. Bei  $50^\circ\text{C}$  wurden die Proben im Thermomixer inkubiert, die Partikel sedimentierten für 30 Minuten, der Überstand wurde photometrisch vermessen und die Menge an gebundenem Protein bestimmt. Danach wurde 1 ml Elutionspuffer (Bindepuffer inklusive 1 M NaCl) zu den Proben gegeben, 20 Minuten im Thermomixer bei  $20^\circ\text{C}$  inkubiert, 15 Minuten sedimentiert, der Überstand vermessen und die desorbierte Proteinmasse bestimmt. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal wiederholt. Abschließend wurden diese drei Wiederholungen nochmals durchgeführt, allerdings wurde anstelle des Elutionspuffers 0,1 M, 0,5 M bzw. 1 M NaOH eingesetzt.

**Tabelle 9-2: Massenbilanz zur Elution bzw. Regeneration von vorher beladenen Partikeln S400HR-ItBA (Charge #2) mit Elutionspuffer bzw. Natronlauge unterschiedlicher Konzentration.**

Konzentration NaOH	Gebundenes Protein, mg	$\Sigma$ (3x Elution), mg	$\Sigma$ (3x NaOH-Regeneration), mg	Gesamtelution, %
<b>Versuch #1</b>				
3x Elution	9,7	8,2	1,5	100
3x 0,1 M NaOH				
<b>Versuch #2</b>				
3x Elution	9,7	8,2	1,5	100
3x 0,5 M NaOH				
<b>Versuch #3</b>				
3x Elution	9,8	8,2	1,5	98,9
3x 1 M NaOH				

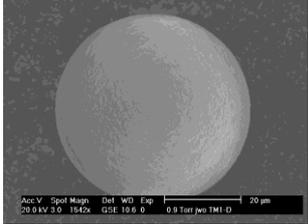
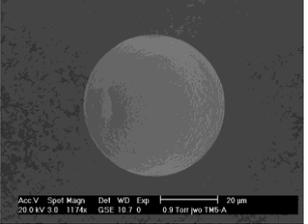
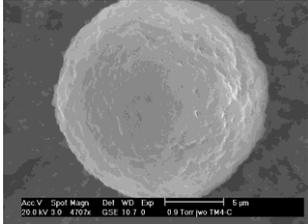
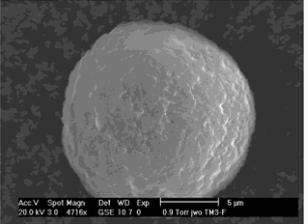
In Tabelle 9-2 sind die Ergebnisse der Elution mit Elutionspuffer und anschließender Regeneration mit NaOH unterschiedlicher Konzentrationen nach vorheriger Beladung von Lactoferrin auf S400 HR-ItBA dargestellt. Die Masse an Protein, die hierbei zunächst auf den Partikeln gebunden scheint, entspricht nicht exakt der Beladung. Hier ist zusätzlich die Proteinmenge mit einberechnet, die sich im Puffer in den Poren der Partikeln befindet und nicht adsorbiert bzw. nur lose gebunden ist. In allen drei Ansätzen waren vergleichbare Mengen an Protein nach dreifacher Elution mit Elutionspuffer noch gebunden. Nach anschließender Regeneration mit NaOH verschiedener Konzentrationen konnte in allen Fällen das Sorbens komplett regeneriert werden.

Das Ergebnis offenbart, dass eine Konzentration von 0,1 M NaOH demnach ausreichend ist, die Partikel vollständig zu reinigen. In dieser Arbeit wurde daher in allen Regenerationschritten 0,1 M NaOH verwendet.

#### **9.4.4 ESEM-Aufnahmen**

Im folgenden Abschnitt werden elektronenmikroskopische Aufnahmen funktionalisierter SCL6B-ItBA und S6pg-ItBA Partikel und der entsprechenden Basispartikel gezeigt und miteinander verglichen. Die Aufnahmen wurden mittels eines ESEM Typ XL 30 FEG (Philips, Niederlande) aufgenommen und entstammen der Arbeit von Ewert [92]. Im Vergleich zu konventionellen Rasterelektronenmikroskopen eignet sich das eingesetzte Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) speziell zur Untersuchung biologischer und nicht-leitender Proben, da unter Gasatmosphäre und nicht unter Vakuumbedingungen gearbeitet werden kann.

**Tabelle 9-3: ESEM-Aufnahmen kommerzieller und ItBA-funktionalisierter Partikel Sepharose CL-6B und Superose 6 prep grade (aus [92]).**

Matrix	unfunktionalisierte Partikel	ItBA-funktionalisierte Partikel
Sepharose CL-6B		
Superose 6 prep grade		

Wie aus den Bildern in Tabelle 9-3 zu erkennen ist, wurde die Vergrößerung des ESEM so gewählt, dass jeweils ein Partikel zu sehen ist. Anhand der angefügten Größenskalisierung ist deutlich zu erkennen, dass Sepharose CL6B und Superose 6 pg entsprechend der Herstellerangaben unterschiedlich groß sind. Die rauere Struktur der Superose 6 pg Partikeln ist vor allem durch die veränderte Vergrößerungsstufe bedingt. Auf jeden Fall ist in beiden Fällen kein Unterschied zwischen unfunktionalisierter und funktionalisierter Oberfläche erkennbar.

## 9.5 Adsorptionsisothermen auf weiteren Materialien

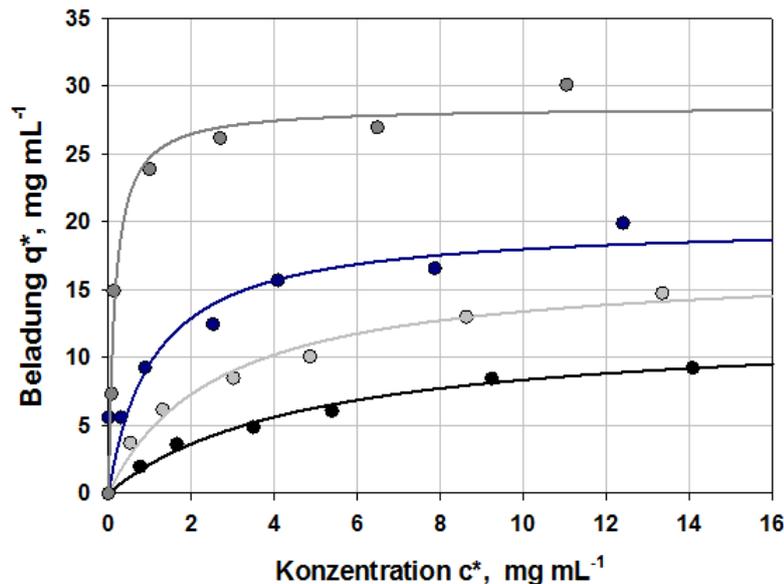
Im Verlauf dieser Arbeit wurden teilweise mehrere Chargen der thermoCEX Materialien hergestellt und angewandt. Außer den beiden besprochenen Chargen wurde noch eine dritte Charge S6pg-ItBA, eine zweite Charge S400HR-ItBA und eine zweite Charge SCL6B-ItBA hergestellt. Zur Vergleichbarkeit wurden in allen Fällen Isothermen mit Lactoferrin bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen. Im Falle der dritten Charge von S6pg-ItBA wurde Methode B zur Bestimmung der Parameter herangezogen, in den beiden anderen Fällen Methode A. Tabelle 9-4 zeigt die ermittelten Parameter für die drei Partikelchargen.

**Tabelle 9-4: Isothermenparameter (Anpassung nach Langmuir) weiterer verwendeter Chargen der thermoCEX-Partikel.**

Temperatur	$q_{\max}$ , mg mL <sup>-1</sup>	$K_D$ , mg mL <sup>-1</sup>	$q_{\max} K_D^{-1}$
<b>SCL6B-ItBA Charge #2 (nach Methode A)</b>			
20°C	20,8	1,17	17,8
35°C	35,2	0,36	97,8
50°C	63,2	0,12	526,4
<b>S400HR-ItBA Charge #2 (nach Methode A)</b>			
20°C	31,8	0,05	635,0
35°C	58,5	0,22	265,8
50°C	79,6	0,14	568,5
<b>S6pg-ItBA Charge #3 (nach Methode B)</b>			
10°C	12,0	1,1	10,9
20°C	17,3	0,77	22,4
35°C	36,9	2,65	13,9
50°C	44,14	0,22	200,5

Im Falle der zweiten Charge von S400HR-ItBA fällt auf, dass bei 20°C ein sehr geringer  $K_D$ -Wert dafür verantwortlich ist, dass schon bei geringer Temperatur eine sehr hohe Anfangssteigung der Isothermen festgestellt wird. Dies widerspricht den Erwartungen einer zunehmenden Affinität mit zunehmender Temperatur. Ein ähnliches Verhalten kann bei Charge 3 von S6pg-ItBA für eine Temperatur von 35°C festgestellt werden; hier ist der gemessene  $K_D$ -Wert aber höher als erwartet, die Steigung daher geringer. Da angesichts der Daten aller anderen thermoCEX-Partikel nirgends solch ein Verhalten aufgetreten ist und selbst bei der artgleichen Charge dieses nicht zu beobachten war, kann eine fehlerbehaftete Messung nicht ausgeschlossen werden. Die Werte von  $q_{\max}$ ,  $K_D$  liegen ansonsten innerhalb des zu erwartenden Bereichs an Mess- und Analyseungenauigkeiten, sodass festgestellt werden kann, dass die Partikelherstellung in mehreren Chargen miteinander vergleichbar und wiederholbar ist.

In Abbildung 9-6 werden die Isothermen zu den in Kapitel 6.2.2.1 (Tabelle 6-12) gezeigten Isothermenparametern der S6pg-ItBA Charge #2 gezeigt.



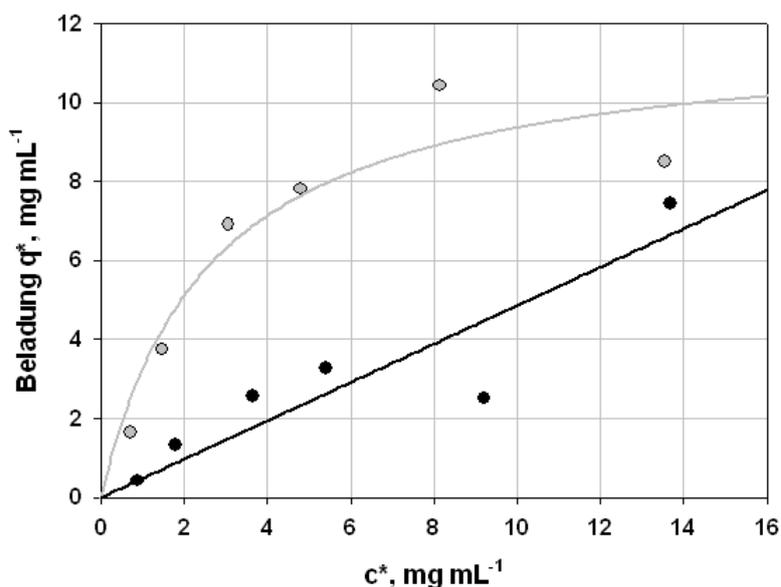
**Abbildung 9-6:** Gleichgewichtsparameter der Adsorption von Lactoferrin auf S6pg-ItBA (Charge #2) bei 10°C (schwarz), 20°C (grau), 35°C (blau) und 50°C (dunkelgrau). Die Linien entsprechen den Isothermen der Anpassungsfunktionen nach Langmuir.

## 9.6 Weitere getestete Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Proteine auf ihre Fähigkeit hin untersucht, als mögliche Modellproteine bei der temperaturabhängigen Adsorption auf thermoresponsiv funktionalisierten Sorbentien und im TCZR zu dienen. Hierbei wurden diverse Proteine mit unterschiedlichen biologischen Bedeutungen ausgewählt, die sich u.a. auch stark in Größe und pI-Wert unterscheiden. Wichtiges Auswahlkriterium war neben den geringen Kosten der lyophilisierten Proteinkandidaten vor allem die Löslichkeit im eingesetzten 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 in höheren Konzentrationen bis mindestens 45 mg mL<sup>-1</sup>. Folgende Proteine erfüllten diese Eigenschaften nicht: Catalase aus Rinderleber (EC 1.11.1.6, pI= 5,4; MW= 250 kDa), Alkohol Dehydrogenase aus Bäckerhefe (EC 1.1.1.1, pI= 5,4-5,8; MW= 141 kDa), Lipase aus *Candida rugosa* (EC 3.1.1.3, pI= 5; MW= 58 kDa), Myoglobin aus Pferdeskelettmuskel (pI= 7,36; MW= 17 kDa),  $\alpha$ -Amylase aus Schweinebauchspeicheldrüse (EC 3.2.2.1, pI= 6,4; MW= 55,4 kDa) und Casein aus Milch (pI= 4,6, MW= ca. 90 kDa, bestehend aus mehreren Untereinheiten).

Die untersuchten Proteine Cytochrom C aus Pferdeherz (pI= 9,59, MW= 11,83 kDa),  $\alpha$ -Chymotrypsinogen (pI= 9; MW= 25 kDa) und Lysozym (pI=11,35; MW=14,2 kDa) waren löslich. Ein weiteres entscheidendes Kriterium für die Auswahl eines Modellproteins war die Änderung der Adsorptionsaffinität auf thermoresponsiv funktionalisiertem Kationenaustauschsorbentien in

Abhängigkeit von der Temperatur. Im Temperaturbereich von 20°C bis 50°C konnte hierbei für Cytochrom C und Lysozym keinerlei Adsorptionsunterschied, für  $\alpha$ -Chymotrypsinogen dagegen ein leichter Unterschied festgestellt werden.  $\alpha$ -Chymotrypsinogen präzipitierte allerdings bereits bei 50°C, dies muss bei späteren Anwendungen unbedingt berücksichtigt werden.



**Abbildung 9-7:** Isothermen von  $\alpha$ -Chymotrypsinogen auf S6pg-ItBA (Charge #2) bei 10°C (schwarz) und 35°C (grau) (nach Methode B).

Abbildung 9-7 zeigt die leicht unterschiedlichen Adsorptionsisothermen bei 10°C und 35°C während der Adsorption auf S6pg-ItBA (Charge #2), die entsprechend der Methode B aufgenommen wurden. Aufgrund des steilen Anstiegs der Datenpunkte bei 10°C ergeben sich für die Parameter aus der Anpassung nach Langmuir nur physikalisch unsinnige Werte. Zur Veranschaulichung sind daher die Adsorptionsisothermen anstelle der Parameterwerte angegeben.

## 9.7 Vorbereitung zur SDS-PAGE

### 9.7.1 Pufferherstellung

- **1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8:** 45,42 g TRIS in Wasser lösen und mit Wasser auf 250 mL auffüllen, pH mit HCl einstellen
- **0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8:** 15,14 g TRIS in Wasser lösen und mit Wasser auf 250 mL auffüllen, pH mit HCl einstellen

- **2x Lämmli-Puffer:** 2,5 mL 0,5 M TRIS-HCl pH 6,8 mit 4 mL 10 % SDS, 2 mL Glycerin, 0,5 mL 0,1 % Bromphenolblau, 100  $\mu$ L 2 M DTT und 1 mL Wasser mischen
- **10x Lauffpuffer:** 30,3 g TRIS, 150 g Glycin und 10 g SDS lösen, pH mit HCl/NaOH auf 8,3 einstellen
- **1x Lauffpuffer:** 100 mL 10x Lauffpuffer mit 900 mL Wasser mischen
- **Coomassie-Färbelösung:** 1 mL Coomassie Brilliant Blue R-250 mit 400 mL Ethanol und 100 mL Essigsäure mischen und mit Wasser auf 1 L auffüllen
- **Entfärbelösung:** 100 mL Ethanol und 75 mL Essigsäure mischen und mit Wasser auf 1 L auffüllen

### 9.7.2 SDS-PAGE Gelherstellung

Im Folgenden wird die Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele in tabellarischer Form (vgl. Tabelle 9-5) wiedergegeben. Die angegebenen Mengen sind ausreichend für zwei Gele mit einer Geldicke von je 1 mm. Die Einzelkomponenten des Trenngels wurden gemischt, in den Gelgießstand pipettiert und anschließend 30 Minuten polymerisieren gelassen. 20  $\mu$ L Isopropanol wurden zunächst auf das Trenngel gegeben, um Luftblasen zu entfernen. Anschließend wurden die Komponenten des Sammelgels gemischt und auf das Trenngel pipettiert. Ein Probenaschenkamm wurde eingesteckt und das Gel erneut 30 Minuten polymerisiert. Das verwendete System zum Gelgießen und zur anschließenden Auftrennung ist ein Mini-Protean Tetra Cell System (Fa. Bio-Rad).

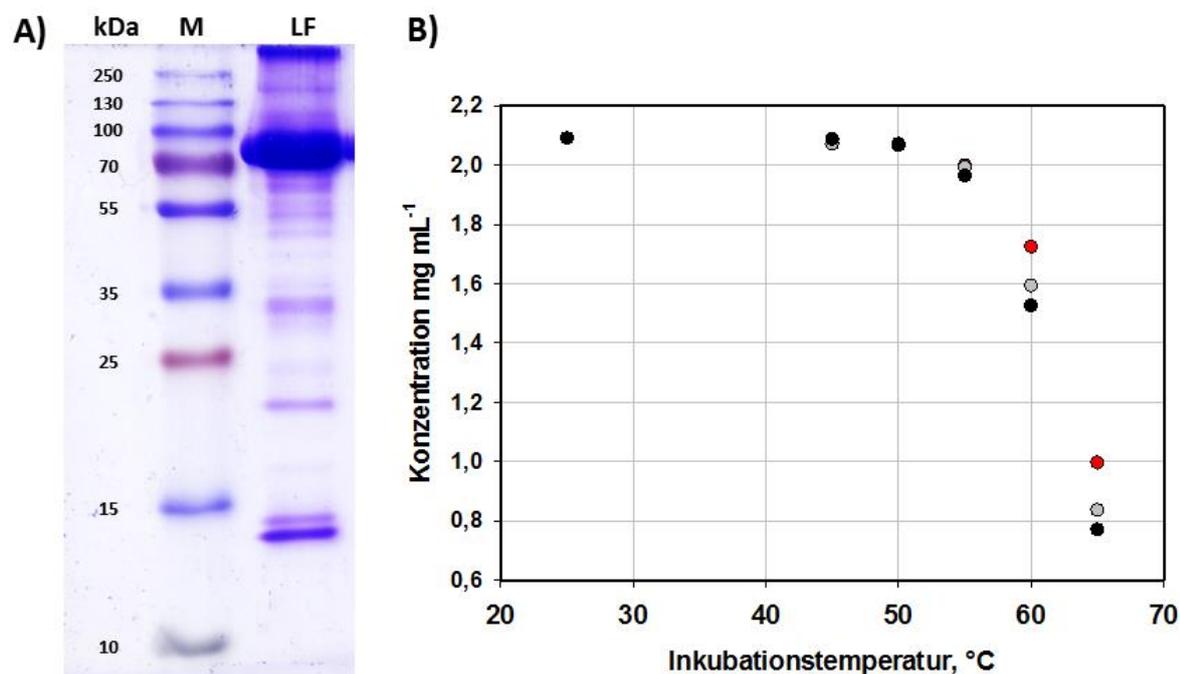
**Tabelle 9-5: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE.**

15 % Trenngel (10,5 mL)		5 % Sammelgel (4 mL)	
30 % Acrylamid	5,25 mL	30 % Acrylamid	0,67 mL
1,5 M TRIS pH 8,8	2,625 mL	0,5 M TRIS pH 6,8	1 mL
10 % SDS	0,105 mL	10 % SDS	0,04 mL
Wasser	2,52 mL	Wasser	2,3 mL
10 % APS	0,105 mL	10 % APS	0,04 mL
TEMED	0,0042 mL	TEMED	0,004 mL

## **9.8 Daten zum verwendeten Lactoferrin**

Die Reinheit des verwendeten Lactoferrin wurde über eine SDS-PAGE bestimmt. Hierzu wurde das lyophilisierte Protein in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 mit einer Konzentration von 2 mg mL<sup>-1</sup> gelöst und auf ein Gel aufgetragen. Das entsprechende Gel ist in Abbildung 9-8A dargestellt. Es zeigt sich, dass Lactoferrin eine deutliche Bande bei etwa 78 kDa aufweist. Weitere Proteinbanden sind ersichtlich, diese stammen aller Wahrscheinlichkeit nach von anderen zuvor nicht vollständig abgereicherten Milchproteinen wie etwa  $\alpha$ -Lactalbumin mit einer Größe von 14 kDa. Die Reinheit des Lactoferrin wurde entsprechend der Intensität der Banden mit etwa 96 % bestimmt.

Zur Bestimmung der Temperaturstabilität des verwendeten Lactoferrin wurden 500  $\mu$ L einer 2 mg mL<sup>-1</sup> Lactoferrinlösung in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5 bei 25°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C und 65°C über verschieden lange Zeiträume von 15, 30 und 60 Minuten im Thermomixer inkubiert. Nach anschließender fünfminütiger Zentrifugation wurde die verbleibende Konzentration im Überstand photometrisch vermessen. Die Abnahme der Konzentration ist gleichbedeutend mit der Denaturierung sowie Präzipitation des Proteins und somit seiner Instabilität und Untauglichkeit für chromatographische Anwendungen bei dieser Temperatur. Strukturelle Umwandlungen der Sekundär- und Tertiärstruktur ohne gleichzeitige Präzipitation, die eventuell schon bei geringeren Temperaturen und Inkubationszeiten stattfanden und die biologische Bedeutung des Proteins änderten, konnten auf diese Weise allerdings nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 9-8:** (A) SDS-PAGE (15 % Gel) einer Lactoferrinlösung ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) in Phosphatpuffer, M: Marker; LF: Lactoferrinlösung; (B) Temperaturstabilität von Lactoferrin in Lösung bei verschiedenen Temperaturen ( $25^\circ\text{C} - 65^\circ\text{C}$ ) und Inkubationszeiten von 15 Minuten (rot), 30 Minuten (grau) und 60 Minuten (schwarz).

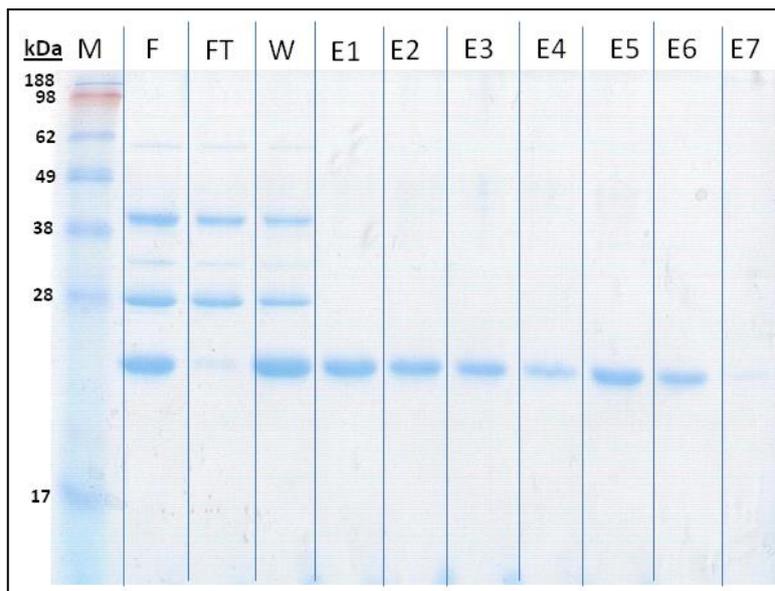
Abbildung 9-8B zeigt graphisch aufbereitet die Proteinkonzentration im Überstand aufgetragen, über der Temperatur. Es zeigt sich, dass bis zu einer Temperatur von  $50^\circ\text{C}$  keinerlei Abnahme der Proteinkonzentration feststellbar ist. Bei Temperaturen  $> 50^\circ\text{C}$  nimmt die Konzentration auch mit steigender Inkubationszeit stetig ab. Eine kritische Temperatur von  $50^\circ\text{C}$  konnte somit für die Arbeit mit Lactoferrin ermittelt werden.

## 9.9 Daten zum Antikörperfragment a33Fab

### 9.9.1 Fermentation und Aufreinigung

a33Fab wurde in einem fed-batch Verfahren in E.coli vom Partner UBI fermentiert, reicherte sich im Periplasma der Mikroorganismen an und konnte anschließend durch eine Hitzeschockbehandlung (16 h bei  $60^\circ\text{C}$ ) in das umgebende Medium überführt werden. Nach Abtrennung der Feststoffe durch Zentrifugation und Neutralisation mit 2,5 M Tris lag a33Fab dann in Konzentrationen von etwa  $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$  im Lysispuffer (100 mM Tris-Base/ 10 mM EDTA) vor. Das hier vorliegende a33 Fab zeigte Affinität zu rekombinantem Protein G und konnte über einen Chromatographieschritt auf einer HiTrap rProtein G Säule (CV= 1mL) aufgereinigt werden. Hierzu

wurde die Säule zunächst für 3 CV bei einer Flussrate von  $1 \text{ mL min}^{-1}$  äquilibriert. Nach anschließender Probenaufgabe von 10 CV wurde die Säule mit reinem PBS-Puffer für 5 CV gewaschen. Die Elution wurde durch Spülen mit  $0,1 \text{ M}$  Glycin pH 2,7 für 10 CV vorgenommen und dann in 1 mL Fraktionen aufgefangen. Durch Zugabe von  $10 \text{ }\mu\text{L}$   $2,5 \text{ M}$  Tris-Base wurde jede Elutionsfraktion anschließend neutralisiert. Abbildung 9-9 zeigt ein SDS-PAGE der einzelnen Fraktionen einer Aufreinigung.



**Abbildung 9-9:** SDS-PAGE (14 %) von Proben (5  $\mu\text{L}$  Auftragevolumen) einer chromatographischen a33 Fab Aufreinigung mittels einer HiTrap rProteinG Säule. M: Marker (Invitrogen SeeBlue™ Plus 2 Prestained Standard); F: Ausgangslösung; W: Waschfraktion; E1-E7: 1 mL Elutionsfraktionen.

Entsprechend der reduzierenden SDS-PAGE zeigte a33Fab eine doppelte Proteinbande bei etwa 25 kDa. Die weiteren Banden bei 60, 40, 30 und 28 kDa stammen vermutlich von weiteren membran-assoziierten Proteinen. Die Elutionsfraktionen E1-E7 wurden gepoolt, und nach anschließender Umpufferung in Phosphatpuffer und Aufkonzentrierung in Ultrazentrifugenröhrchen Amicon Ultracell 10 k (Millipore) mit einem molekularen Größenausschluss von 10 kDa, konnte a33Fab auf eine Konzentration von  $9 \text{ mg ml}^{-1}$  (Nachweis durch BCA-Assay) aufkonzentriert werden.

### 9.9.2 Aminosäuresequenz

Im Folgenden sind die Aminosäuresequenzen der leichten (light chain) und schweren (heavy chain) Kette des in dieser Arbeit verwendeten Antikörperfragmentes a33 zu sehen.

**LIGHT CHAIN**

MKKTAIAIAVALAGFATVAQADIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASQNVRTVVAWYQQKPGKAPKTLIYLASNHRHTGVPSRFSGSGSGT  
 DFTLTISLQPEDFATYFCLQHWSYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE  
 SVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

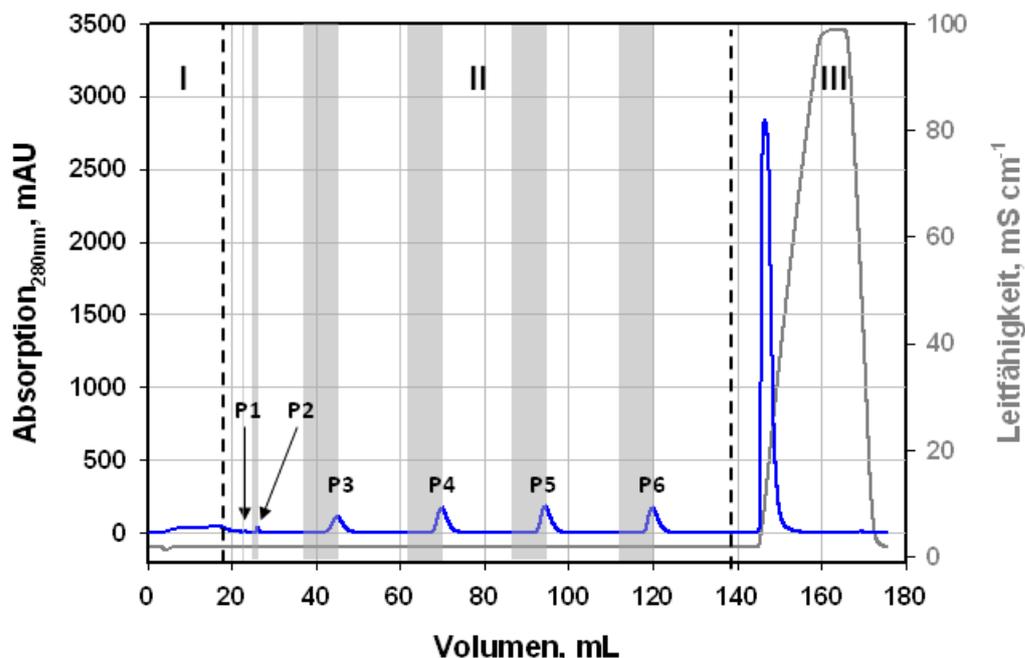
**HEAVY CHAIN**

MKKTAIAIAVALAGFATVAQAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSTYDMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSYTYLDSVKGGRFT  
 ISRDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCAPTTVVPFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCAA

Die light chain setzt sich aus 235 Aminosäuren zusammen und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 25,48 kDa und einen pI von 8,72. Die heavy chain setzt sich aus 249 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 25,99 kDa und einem pI von 8,75. Die Gesamtgröße des Moleküls entspricht daher etwa 51,47 kDa. Die Molekulargewichte entsprechen der Beobachtung der zuvor gezeigten SDS-PAGE, wobei unter denaturierenden Bedingungen die Disulfidbrücken der beiden Ketten aufgelöst werden. Die genannten Werte wurden mittels <http://isoelectric.ovh.org> aus den Sequenzen berechnet.

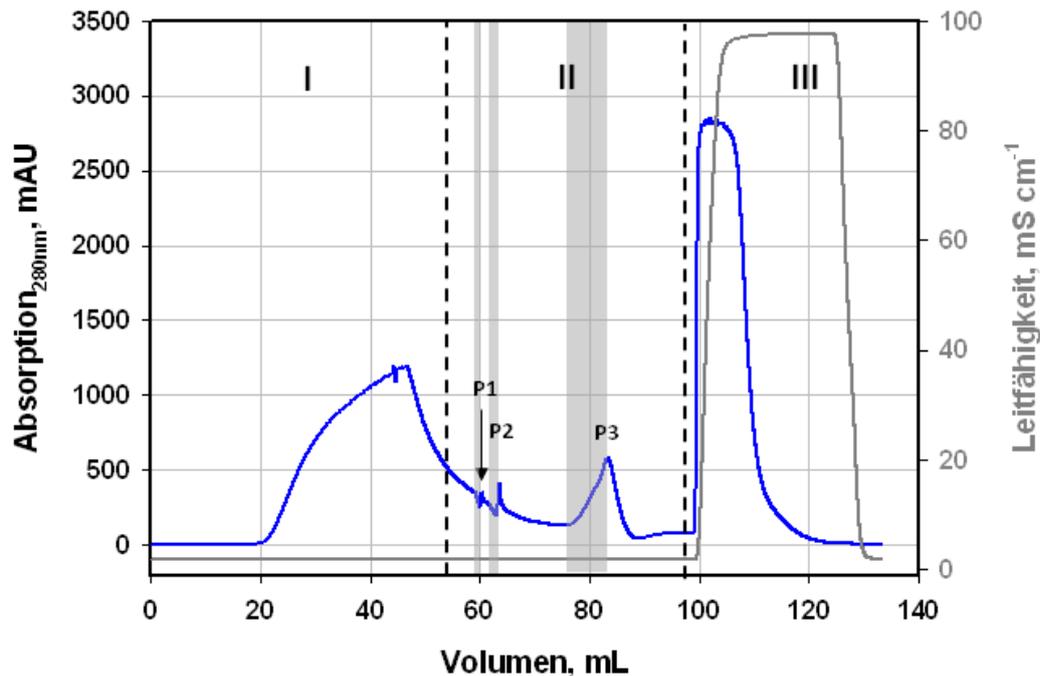
**9.10 Weitere TCZR-Ergebnisse****9.10.1 Absatzweise Versuchsdurchführung**

In Abbildung 9-10 ist das Chromatogramm einer absatzweisen Beladung und Elution der mit SCL6B-ItBA gefüllten Trennsäule gezeigt, wobei die Geschwindigkeit der Temperaturzone variiert wurde. Die Umgebungstemperatur  $\phi_u$  betrug 35°C, die Leistung der Kühlzone wurde maximal eingestellt. Nach Beladung und anschließendem Waschschrift (5 CV) wurde die Kühlzone mit einer Geschwindigkeit  $v_{TCZR}=1,9 \text{ mm s}^{-1}$  über die Säule bewegt (P1), für P2 wurde  $v_{TCZR}$  auf  $1 \text{ mm s}^{-1}$  reduziert und die Elution der Proteinpeaks P3-P6 resultierte aus Verfahrenen mit einer  $v_{TCZR}=0,1 \text{ mm s}^{-1}$ . Abschließend wurde gebundenes Protein durch Salzelution mit 1 M NaCl eluiert. Die Säule wurde in diesem Falle jedoch nur mit etwa 20 % der maximalen und berechneten Menge an Lactoferrin ( $c_f=2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) beladen. Dies entspricht einer Menge von 30 mg Lactoferrin. Aufgrund der geringen Beladung konnte nur wenig Protein nach den einzelnen Verfahrensschritten eluiert werden.



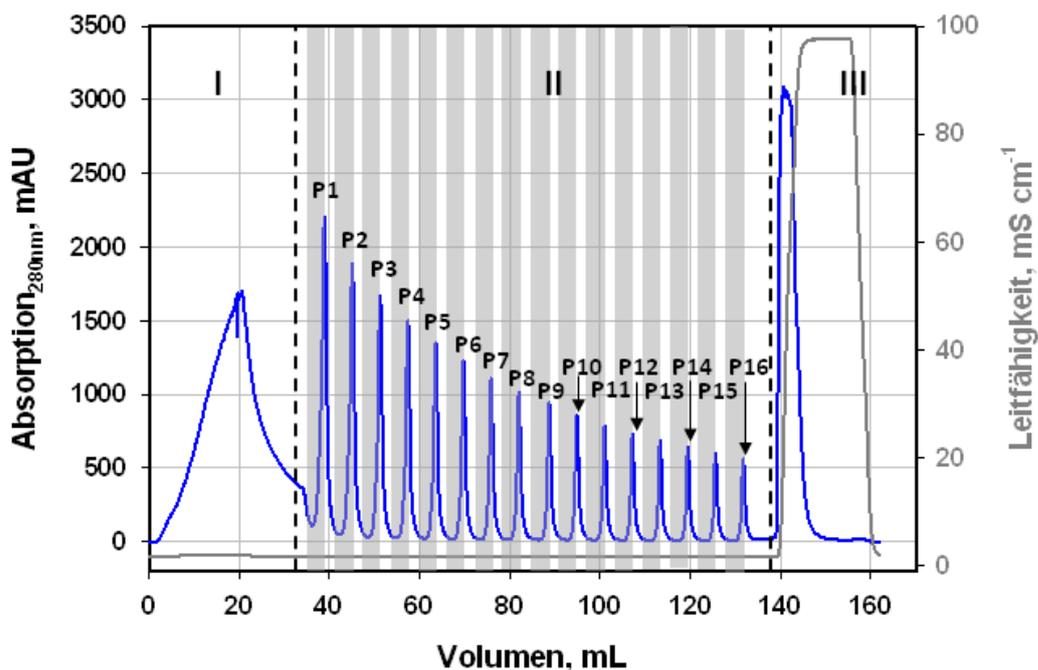
**Abbildung 9-10: Chromatogramm einer sechsfachen Verfahrungs der Kühlzone über die mit SCL6B-ItBA gefüllte Trennsäule. Dabei wurde mit 15 mL Lactoferrin ( $c_f=2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) beladen, die eluierten Proteinpeaks wurden als P1-P6 bezeichnet. Die Verfahrungsbedingungen der Temperaturzone betragen  $1,9 \text{ mm s}^{-1}$  im Falle von P1,  $1 \text{ mm s}^{-1}$  für P2 und  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$  für P3 - P6. Die grauen Hintergründe markieren eine Verfahrungs der Kühlzone. Abschnitte: (I) Beladung und Waschen; (II) TCZR-Elution; (III) Elution mit  $1 \text{ M NaCl}$ .**

Abbildung 9-61 zeigt das Chromatogramm der absatzweisen Beladung mit 88,4 mg Lysozym der mit SCL6B-ItBA beladenen Trennsäule. Die Umgebungstemperatur  $\phi_u$  betrug  $35^\circ\text{C}$ , die Leistung der Kühlzone wurde maximal eingestellt. Die Kühlzone wurde nach anfänglichem Beladen und Waschen insgesamt dreimal mit verschiedenen Geschwindigkeiten über die Säule gefahren. Die Geschwindigkeiten betragen  $1,9 \text{ mm s}^{-1}$ ,  $1 \text{ mm s}^{-1}$  bzw.  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$ . In Abschnitt III wurde noch gebundenes Protein durch Erhöhung der Salzkonzentration auf  $1 \text{ M NaCl}$  eluiert. Der Einfluss der temperaturgesteuerten Proteindesorption ist nur schwach ausgeprägt, wobei bei langsamerer Geschwindigkeit mehr Lysozym eluiert werden konnte.



**Abbildung 9-61: Chromatogramm einer dreifachen Verfahrungs der Kühlzone über die mit SCL6B-ItBA gefüllte Trennsäule. Dabei wurde mit 44,2 mL Lysozym ( $c_F=2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) beladen, die eluierten Proteinpeaks wurden als P1-P3 bezeichnet. Die Verfahrensgeschwindigkeiten der Temperaturzone betragen  $1,9 \text{ mm s}^{-1}$  im Falle von P1,  $1 \text{ mm s}^{-1}$  für P2 und  $0,1 \text{ mm s}^{-1}$  für P3. Die grauen Hintergründe markieren den Zeitraum einer Verfahrungs der Kühlzone. Abschnitte: (I) Beladung und Waschen; (II) TCZR-Elution; (III) Elution mit 1 M NaCl.**

Abbildung 9-72 zeigt das Chromatogramm einer absatzweisen Beladung mit 153 mg Lactoferrin ( $c_F=8 \text{ mg mL}^{-1}$ ), anschließendem Auswaschen ungebundener und schwach gebundener Komponenten und einer in Abschnitt II folgenden sechzehnfachen Verfahrungs der Kühlzone über die Trennsäule mit einer  $v_{TCZR}=0,4 \text{ mm s}^{-1}$ . Die Umgebungstemperatur  $\phi_u$  betrug  $35^\circ\text{C}$ , die Leistung der Kühlzone wurde maximal eingestellt. In allen Verfahrungs konnte Protein eluiert werden, wobei die Menge an eluiertem Protein immer kleiner wurde. Selbst nach dieser Anzahl an Verfahrungs konnte durch Temperaturwechsel noch immer Lactoferrin desorbiert werden.



**Abbildung 9-72:** Chromatogramm einer sechzehnfachen Verfahrungs der Kühlzone über die mit SCL6B-ItBA gefüllte Trennsäule. Dabei wurde mit 19,1 mL Lactoferrin ( $c_f=8 \text{ mg mL}^{-1}$ ) beladen, die eluierten Proteinpeaks wurden als P1-P16 bezeichnet. Die Verfahrungs geschwindigkeit der Temperaturzone betrug  $0,4 \text{ mm s}^{-1}$ . Die grauen Hintergründe markieren jeweils eine Verfahrungs der Kühlzone. Abschnitte: (I) Beladung und Waschen; (II) TCZR-Elution; (III) Elution mit 1 M NaCl.

### 9.10.2 Abnahme der Zulaufkonzentrationen

In den kontinuierlichen Experimenten zur Proteinakkumulation von Lactoferrin und zur Trennung des binären Proteingemisches in Kapitel 6.6 wurde im Verlauf der Probenaufgabe nicht kontinuierlich frische Proteinlösung aufgegeben. Vielmehr wurden die gesammelten Fraktionen eines Proteinpeaks und des dahinter eluierenden Bereichs geringerer Konzentration gesammelt und wieder mit der aufzugebenden Proteinprobe vereinigt. Durch diese Vorgehensweise konnte die Menge an benötigtem Protein für die Experimente eingeschränkt werden, aufgrund von unvermeidbaren Verlusten nahm auf diese Weise aber die Zulaufkonzentration an Lactoferrin während der einzelnen Experimente ab. Die in der Arbeit berechneten Aufkonzentrierungsfaktoren beziehen sich daher nicht auf die anfänglich eingestellte Zulaufkonzentration, sondern vielmehr auf die tatsächlichen Zulaufkonzentrationen vor jeder Verfahrungs der Temperaturzone. Die tatsächlichen Zulaufkonzentrationen vor den Proteinpeaks P1 – P8 der Einzelstoffexperimente mit einer anfänglichen Zulaufkonzentration  $c_f$  von  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  und  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , des

Optimierungsversuches bei absatzweiser Verfahrung der Temperaturzone mit einer Zulaufkonzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  sowie der Versuch der kontinuierlichen Proteintrennung mit einer anfänglichen Zulaufkonzentration des Lactoferrins von  $0,9 \text{ mg mL}^{-1}$  sind in Tabelle 9-6 gezeigt

**Tabelle 9-6: Tatsächliche Zulaufkonzentrationen der Zielkomponente Lactoferrin vor den Verfahrungen der Temperaturzone (P1 – P8) während der vier durchgeführten kontinuierlichen TCZR-Experimente.**

Versuch	in $\text{mg mL}^{-1}$							
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
<b>Einstoff,</b> $c_f = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ (vgl. Abbildung 6-24)	0,98	0,98	0,94	0,91	0,93	0,88	0,84	0,84
<b>Einstoff,</b> $c_f = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ (vgl. Abbildung 6-24)	0,48	0,48	0,48	0,36	0,38	0,39	0,38	0,38
<b>Absatzweise,</b> $c_f = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ (vgl. Abbildung 6-25)	1,05	1,05	0,93	0,93	0,96	0,96	-	-
<b>Separation,</b> $c_f = 0,9 \text{ mg mL}^{-1}$ (vgl. Abbildung 6-26)	0,9	0,9	0,88	0,87	0,83	0,82	0,83	0,83

## Symbole und Abkürzungen

*Lateinische Symbole (inkl. ausgewählter Indizes)*

AS	Asymmetriefaktor	-
C	Konzentration	mg mL <sup>-1</sup>
C	Konzentration	mol m <sup>-3</sup>
c <sub>p</sub>	spezifische Wärmekapazität	J kg <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>
CV	Säulenvolumen	mL
CF	Aufkonzentrierungsfaktor	-
D <sub>ax</sub>	axialer Diffusionskoeffizient	m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>
DBC <sub>50%</sub>	dynamische Bindekapazität (bei 50% des maximalen Durchbruch)	mg mL <sup>-1</sup>
D <sub>p</sub>	Porendiffusionskoeffizient	m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>
E	Extinktion	-
EBC	Equilibrium Binding Capacity	mg mL <sup>-1</sup>
G	freie Gibbs'sche Energie	kJ mol <sup>-1</sup>
H	Enthalpie	kJ mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>
j <sub>F</sub>	Stoffstrom durch die Grenzfläche	kg m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>
k'	Kapazitätsfaktor	-
k <sub>Ads</sub>	Geschwindigkeitskonstante der Adsorption	mL mg <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
k <sub>Des</sub>	Geschwindigkeitskonstante der Desorption	s <sup>-1</sup>
K <sub>D</sub>	Langmuir-Parameter	mg mL <sup>-1</sup>
K <sub>L</sub>	Langmuir-Parameter	mL mg <sup>-1</sup>
L <sub>c</sub>	Säulenlänge	mm
LCST	Lower Critical Solution Temperature	°C
M	Proteinmasse	mg
PF	Packfaktor; Quotient aus gepacktem Sorbensvolumen und CV	-
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration	-
pI	neutrale Oberflächennettoladung von Proteinen	-
Q	Beladung/ transportierte Wärmemenge	mg mL <sup>-1</sup> / W m <sup>-2</sup>
Q	Beladung	mol m <sup>-3</sup>

$r_p$	Partikelradius	$\mu\text{m}$
$r_{\text{Ads}}$	Reaktionsrate der Adsorption	$\text{mg mL}^{-1} \text{s}^{-1}$
$r_{\text{Des}}$	Reaktionsrate der Desorption	$\text{mg mL}^{-1} \text{s}^{-1}$
$S$	Entropie	$\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$
$T$	Temperatur	K
$t$	Zeit	s
UCST	Upper Critical Solution Temperature	$^{\circ}\text{C}$
$V$	Volumen	mL
$V_p$	Partikelvolumen	mL
$v$	lineare Fließgeschwindigkeit	$\text{cm h}^{-1}$
$v_{\text{av}}$	durchschnittliche Fließgeschwindigkeit	$\text{mL min}^{-1}$
$v_c$	Wanderungsgeschwindigkeit der Konzentrationsfront	$\text{mm s}^{-1}$
$v_{\text{int}}$	interstitielle Fließgeschwindigkeit	$\text{cm h}^{-1}$
$\dot{V}_{\text{mob}}$	Flussrate der mobile Phase	$\text{mL min}^{-1}$
$v_{\text{TZR}}$	Verfahrgeschwindigkeit der Kühlzone	$\text{mm s}^{-1}$
$z$	Ort/ Säulenposition	m

### Griechische Symbole

$\alpha$	Wärmeübergangskoeffizient/ relative Position	$\text{W K}^{-1} \text{m}^{-2} / -$
$\beta$	Verhältnis von Zwischenkornvolumen zu stationärer Phase	-
$\Delta$	Differenz	-
$\lambda$	thermische Leitfähigkeit/ Wellenlänge	$\text{W m}^{-1} \text{K}^{-1} / \text{nm}$
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient	$\text{L g}^{-1} \text{cm}^{-1}$
$\epsilon_B$	Bettporosität	-
$\epsilon_p$	Partikelporosität	-
$\epsilon_T$	Gesamtporosität	-
$\rho$	Dichte	$\text{g L}^{-1}$
$\Phi$	Temperatur	$^{\circ}\text{C}$
$\varphi$	Phasenverhältnis von stationärer zu mobile Phase	-

*Sonstige Indizes*

Ads	Adsorption
AS	Ammoniumsulfat
BT	Durchbruch
Des	Desorption
F	Zulauf
I	Komponente i
krit	kritisch
kühl	Kühlung
max	maximal
min	minimal
mix	Misch
Peltier	Peltierelemente
Peak	Elutionspeaks (durch Temperaturzonenverfahren)
R	Retention
Säule	in der Säule
TCZR	Kühlzonen
U	Umgebung
0	Start / Tracer
*	im Gleichgewicht

*Abkürzungen*

AAc	Acrylsäure
AAm	Acrylamid
ACV	4,4'-Azobis(4-cyanovaleriansäure)
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
ECH	Epichlorhydrin

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEDQ	2-Ethoxy-1-Ethoxycarbonyl-1,2-Dihydroquinolin
Fab	Antikörperfragment
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IEP	isoelektrischer Punkt
ItBA	poly(NIPAAm-co-AAc-co-tBAAm-co-MBAAm)
kDa	kilo Dalton
mAU	milli-Absorptionseinheiten
MBAAm	N,N'-Methylenbisacrylamid
NaOH	Natriumhydroxid
NIPAAm	N-Isopropylacrylamid
NPOC	Non-purgable Organic Carbon
PEG	Polyethylenglycol
SCL6B	Sepharose CL6B
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SMB	Simulated Moving Bed
S6pg	Superose 6 prep grade
S400HR	Sephacryl 400 high resolution
tBAAm	<i>tert</i> -Butylacrylamid
TCZR	Travelling Cooling Zone Reactor
TEMED	Tetramethyldiamin
thermoCEX	thermoreponsive Kationenaustauscher
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan