

# **Molekulare Einblicke in die Chromatographie: Virtuelles Design von methacrylatbasierten Chromatographieharzen zur Vorhersage von Langmuir-Konstanten linearer Peptide**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN

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

DISSERTATION

von  
M. Sc. Tim Ballweg  
aus Wertheim am Main

Tag der mündlichen Prüfung: 20.02.2025

Erstgutachter:

Prof. Dr.-Ing. Matthias Franzreb

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Jürgen Hubbuch



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung -  
Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz (CC BY-NC-ND 4.0 DE):  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.de>

*“What we observe is not nature itself, but nature exposed to our method of questioning.”*

— **Werner Heisenberg**





# Danksagung

Ein besonderer Dank gilt zunächst meinem hochgeschätzten Doktorvater, Herrn Prof. Dr.-Ing. Matthias Franzreb, für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Ich danke ihm für die spannende Aufgabenstellung sowie für die uneingeschränkte Unterstützung während aller Phasen dieser Arbeit. Besonders schätze ich das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Freiheit, mich fachlich weiterzuentwickeln und eigene Ideen zu verfolgen.

Ein weiterer Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. Jürgen Hubbuch für die Übernahme des Korreferats zu dieser Arbeit.

Herzlichen Dank schulde ich auch dem Karlsruhe House of Young Scientists für die finanzielle Unterstützung während meines Aufenthalts am University College London.

Mein Dank gilt zudem M. Sc. Eric Hiller, M. Sc. Julian Grimm, M. Sc. David Achauer und B. Sc. Jonathan Döttling, deren engagierte Beiträge im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten dieses Projekt maßgeblich unterstützt haben.

Ein besonderer Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe von Prof. Dr.-Ing. Franzreb für die freundschaftliche und produktive Arbeitsatmosphäre. Hervorzuheben sind meine geschätzten Bürokollegen Dr.-Ing. André Tschöpe, Dr.-Ing. Raphael Greifenstein und M. Sc. Laura Kuger. Weiteren Dank richte ich an M. Sc. Juliane Diehm, M. Sc. Sefkan Kendir, M. Sc. Michael Abt, Dr. Katharina Bleher, M. Sc. Ulrich Thiele, M. Sc. Meriem Kassar, M. Sc. Sebastian Putz und M. Sc. Marcel Bauer für ihre fachlichen Anregungen und wertvollen Diskussionen, die dieser Arbeit wichtige Impulse verliehen haben. Zusätzlich danke ich Dr. Modan Liu und Dr. Elaheh Sedghamiz für die fruchtbare Zusammenarbeit bei der Entwicklung der simulativen Workflows.

Von Herzen danke ich meiner Partnerin Anna Moch, die mir in den letzten Jahren stets zur Seite stand. Ihre bedingungslose Unterstützung gab mir die Kraft, auch in schwierigen Zeiten positiv zu bleiben.

Mein tiefster Dank gilt meinen Eltern, deren unermüdliche Unterstützung und Ermutigung mich nicht nur während meiner akademischen Laufbahn, sondern mein ganzes Leben begleitet haben. Ohne ihre Liebe, ihren Rat und ihre Opferbereitschaft wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.



# Zusammenfassung

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Entwicklung und Validierung von molekularen Modellierungsmethoden zur Simulation der Adsorption von linearen Peptiden an multimodalen Chromatographiehharzen. Im Fokus stand die präzise Simulation der Oberflächenstruktur eines kommerziellen, methacrylatbasierten Chromatographiehharzes in atomistischer Auflösung sowie die detaillierte Analyse dessen Interaktion mit linearen Peptiden. Ziel war es, die komplexen Wechselwirkungen, welche in der multimodalen Chromatographie auftreten, besser verstehen und vorherzusagen zu können.

Der erste Schritt bestand in der Generierung eines detaillierten Modells der Harzoberfläche, welches deren reale Struktur und molekulare Zusammensetzung präzise abbildet. Hierbei wurde der gesamte Herstellungsprozess des Harzes, von der Polymerisation des Trägermaterials bis zur Anbindung der Liganden, in einer virtuellen Umgebung nachgebildet. Diese entwickelte Simulationsabfolge ermöglichte die Erstellung eines atomaren Modells der Oberflächenmorphologie eines kommerziellen, multimodalen Chromatographiehharzes.

Solch präzise Modelle von Chromatographiehharzoberflächen bildeten eine entscheidende Grundlage für eine anschließende mehrstufige Simulationsabfolge zur Berechnung von Bindeposen und -energien mit linearen Peptiden. Eine Analyse der Ergebnisse dieser Simulationen ergab, dass die räumliche Anordnung der Liganden, die Ligandendichte sowie die Flexibilität sowohl des Peptids als auch der Harzoberfläche einen maßgeblichen Einfluss auf die Bindeenergie hatten. Diese Erkenntnisse verdeutlichten die Komplexität der Adsorptionsmechanismen und die Vielzahl der Faktoren, welche bei der Simulation dieser berücksichtigt werden müssen.

Um die komplexe Anwendung dieser molekularen Modellierungsmethoden zu erleichtern, wurden die entwickelten Simulationsabfolgen in Workflow-Management-Systemen (WMSs) automatisiert. Diese Integration in WMSs trägt nicht nur dazu bei, dass die Simulationsprozesse systematisch und reproduzierbar durchgeführt werden können, sondern ermöglicht es auch Nutzern ohne tiefgehende Erfahrung in molekularen Simulationen, diese Methoden anzuwenden. Durch die öffentliche Bereitstellung dieser Workflows soll zusätzlich die Integration molekularer Simulationen in die Forschung und Entwicklung von chromatographischen Verfahren gefördert werden.

Die Validierung der simulativen Ergebnisse erfolgte durch experimentelle Laborarbeit.

Um die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der experimentellen Ergebnisse zu maximieren, wurde ein Robotiklabor zur automatisierten Aufnahme von Adsorptionsisothermen etabliert und erfolgreich angewendet. Die experimentellen Daten zeigten, dass alle untersuchten Peptide ein klassisches Langmuir-Adsorptionsverhalten aufwiesen. Die durch Anpassungsfunktionen an die experimentellen Daten erhaltenen Langmuir-Konstanten ( $K_L$ ) zeigten eine starke, negativ logarithmische Beziehung zu den zuvor simulierten Bindeenergien der Peptide. Durch eine Kreuzvalidierung konnte, mit einem  $R^2$  von 0,96, eine gute Vorhersagekraft für  $K_L$ -Werte des entwickelten Modellierungsansatzes bestätigt werden. Diese genauen Vorhersagen verdeutlichen, dass die simulierten Modelle in der Lage sind, reale Adsorptionsprozesse präzise abzubilden und Bindeaffinitäten genau zu berechnen.

Zusätzlich wurde ein umfassender Vergleich mit bestehenden Modellierungsansätzen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die in dieser Arbeit entwickelten molekularen Modelle der Chromatographieharzoberflächen sowie der neue Workflow zur Berechnung von Bindungsenergien herkömmliche Methoden in der Vorhersagegenauigkeit von  $K_L$ -Werten übertrafen. Dies ist wahrscheinlich auf eine realistischere Darstellung der Harzoberfläche und eine detaillierte Berücksichtigung der strukturellen und chemischen Eigenschaften des Harzes zurückzuführen. Die Möglichkeit, subatomare Effekte und die Flexibilität des Polymer-Rückgrats in die Simulationen einzubeziehen, erwiesen sich als Hauptmerkmale, welche den entwickelten Ansatz von bisherigen Methoden und Modellen abhoben.

Insgesamt wurde in dieser Dissertation ein innovativer Ansatz zur Simulation der Peptidadsorption an Chromatographieharzen entwickelt und erfolgreich validiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die detaillierte Modellierung der Harzoberfläche und der entwickelte Ansatz zur Bestimmung von Bindeenergien wesentliche Fortschritte in der präzisen Vorhersage von Bindeaffinitäten ermöglichen. Die Automatisierung in WMSs erweitert die Anwendbarkeit dieser Methoden und stellt ein leistungsfähiges Instrument dar, welches in Zukunft zur Entwicklung maßgeschneiderter Chromatographieharze oder zum Screening idealer Bindungs- und Elutionsbedingungen verwendet werden könnte. Insbesondere in der biopharmazeutischen Industrie, in der die Effizienz und Genauigkeit von Trennprozessen von entscheidender Bedeutung sind, haben diese Fortschritte das Potenzial, zu verbesserten Prozessen und somit niedrigeren Produktionskosten beizutragen.

# Abstract

This dissertation presents the development and validation of molecular modeling methods designed to simulate the adsorption of linear peptides onto multimodal chromatography resins. The main objective was to accurately model the surface structure of a commercial methacrylate-based chromatography resin at an atomic resolution and to conduct a detailed analysis of its interactions with linear peptides. The overarching goal was to improve the understanding and predictive accuracy of the complex interactions that occur in multimodal chromatography.

The initial step involved the generation of a detailed model of the resin surface, accurately reflecting its molecular structure and composition. This was achieved by virtually recreating the entire manufacturing process of the resin, from the polymerization of the backbone to the subsequent attachment of ligands. This multistage simulation process resulted in the creation of an all-atom model of the resin's surface morphology. Such precise models were crucial for subsequent simulations aimed at calculating the binding poses and energies of linear peptides. By analyzing the results of these simulations, we identified that the spatial arrangement and density of ligands, as well as the flexibility of both the peptide and the resin surface, are key factors significantly influencing the overall binding energy. These findings underscore the complexity of the adsorption mechanisms in chromatography and the multitude of factors that must be considered when modeling these interactions.

To streamline and automate the execution of the complex modeling methods, the developed simulation sequences were integrated into workflow management systems (WMSs). This integration ensures that the simulation processes are conducted systematically and reproducibly while also making them accessible to users without extensive molecular simulation experience. By sharing these workflows publicly, we aim to promote a broader adoption of molecular simulations within the chromatographic community.

The validity of the simulation results was confirmed through experimental work. To ensure high accuracy and reproducibility of the experimental results, a robotics lab was established and successfully utilized for the automated measurement of adsorption isotherms. The experimental data showed that all investigated peptides exhibited Langmuir-like adsorption behavior. The Langmuir constants ( $K_L$ ) derived from these experiments demonstrated

a strong negative logarithmic relationship with the simulated binding energies of the peptides. A cross-validation, yielding an  $R^2$  of 0.96, confirmed the high predictive power of the developed modeling approach in estimating  $K_L$  values. These results demonstrate that the simulated models can accurately replicate real adsorption processes and predict binding affinities with high precision.

Furthermore, a comprehensive comparison with existing modeling approaches was conducted. The findings clearly showed that the molecular models of chromatography resin surfaces developed in this work, as well as the new workflow for calculating binding energies, outperform conventional methods in predicting  $K_L$  values. This improvement is likely due to the more realistic representation of the resin surface and the detailed consideration of its structural and chemical properties. The inclusion of subatomic effects and the flexibility of the polymer backbone in the simulations further set this approach apart from previous methods and models.

In conclusion, this dissertation successfully developed and validated an innovative approach for simulating peptide adsorption on chromatography resins. The results highlight significant advancements in accurately predicting binding affinities through detailed resin surface modeling and the developed binding energy calculation method. The automation of these methods within WMSs broadens their applicability, offering a powerful tool for developing custom-tailored chromatography resins or screening optimal binding and elution conditions. In the biopharmaceutical industry, where the efficiency and accuracy of separation processes are paramount, these advancements have the potential to further improve chromatographic separations and thereby reduce production costs.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>Formelverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>2. Theoretischer Hintergrund</b>	<b>3</b>
2.1. Grundlagen der Flüssigchromatographie . . . . .	3
2.1.1. Arten der Chromatographie . . . . .	5
2.1.2. Stationäre Phasen in der Chromatographie . . . . .	9
2.1.3. Massentransfer in der Chromatographie . . . . .	13
2.1.4. Grundlagen der Adsorption . . . . .	14
2.1.5. Hochdurchsatz-Screening und Prozessentwicklung . . . . .	18
2.1.6. Modellierung in der Chromatographie . . . . .	20
2.2. Grundlagen molekularer Simulationen . . . . .	22
2.2.1. Molekularmechanische Simulationen . . . . .	23
2.2.2. Molekulardynamische Simulationen . . . . .	26
2.2.3. Coarse-Grained Simulationen . . . . .	29
2.2.4. Quantenmechanische Simulationen . . . . .	30
2.2.5. Berechnung der Gibbs-Energie . . . . .	32
2.2.6. Workflow-Management-Systeme . . . . .	36
2.2.7. Molekulare Simulationen in der Chromatographie . . . . .	37
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>41</b>
3.1. Auswahl des Chromatographieharzes und der Zielmoleküle . . . . .	41
3.2. Molekulare Simulationen zur Bestimmung von Bindeenergien . . . . .	42
3.2.1. Generierung molekularer Modelle der Oberflächen von methacrylatbasierenden Chromatographieharzen . . . . .	42
3.2.2. Simulation der Adsorption von Peptiden . . . . .	46

3.2.3.	Automatisierung der Simulationen in WMSs . . . . .	50
3.2.4.	Vergleich mit etablierten Modellen der Harzoberfläche . . . . .	53
3.3.	Entwicklung eines flexiblen Robotiklabors für Hochdurchsatzscreenings . .	55
3.3.1.	Aufbau und Automatisierungskonzept des Robotiklabors . . . . .	55
3.3.2.	Ansteuerung des Pipettierroboters . . . . .	57
3.3.3.	Ansteuerung des Roboterarms . . . . .	59
3.3.4.	Ansteuerung der Vakuumpumpe . . . . .	62
3.4.	Aufnahme von Adsorptionsisothermen . . . . .	63
3.4.1.	Befüllung der Filterplatten mit Chromatographieharz . . . . .	63
3.4.2.	Automatisierung der chargenweisen Inkubationschromatographie .	65
3.4.3.	Funktionstest des Robotiklabors . . . . .	68
3.4.4.	Aufnahme der Adsorptionsisothermen von Peptiden . . . . .	70
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>73</b>
4.1.	Molekulare Simulationen zur Bestimmung von Bindeenergien . . . . .	73
4.1.1.	Automatisierung der simulativen Methoden in WMSs . . . . .	73
4.1.2.	Generierung molekularer Modelle der Oberflächen von methacryl- atbasierten Chromatographieharzen . . . . .	77
4.1.3.	Simulation der Adsorption von Peptiden . . . . .	81
4.2.	Automatisierte Aufnahme von Adsorptionsisothermen . . . . .	92
4.2.1.	Implementierung des Robotiklabors . . . . .	92
4.2.2.	Funktionstest des Robotiklabors . . . . .	93
4.2.3.	Aufnahme der Adsorptionsisothermen von Peptiden . . . . .	95
4.3.	Validierung und Benchmarking des entwickelten Modellierungsansatzes . .	98
4.3.1.	Modellvalidierung durch die Vorhersage von Langmuir-Konstanten	98
4.3.2.	Vergleich mit etablierten Modellen von Chromatographieharzen . .	101
4.3.3.	Benchmarking des Workflows zur Bestimmung von Bindeenergien	105
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>107</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>111</b>
	<b>Anhang</b>	<b>123</b>
A.	Chemikalien, Software, Geräte und Messinstrumente . . . . .	123
A.1.	Chemikalien . . . . .	123
A.2.	Software . . . . .	123
A.3.	Geräte und Messinstrumente . . . . .	124
B.	Eingabeparameter und Flussdiagramm des KNIME-Workflows . . . . .	125
B.1.	Eingabeparameter des KNIME-Workflows . . . . .	125
B.2.	Flussdiagramm des KNIME-Workflows . . . . .	126
C.	Python Skript zur Steuerung des Robotiklabors . . . . .	127



<b>Akademischer Lebenslauf</b>	<b>129</b>
<b>Publikationen</b>	<b>129</b>



## Tabellenverzeichnis

3.1. Polymerisationschema und Reaktionsraten . . . . .	45
3.2. Verwendete Modbus-Register und -Werte zur Steuerung der Vakuumpumpe	62
3.3. Liste der Zielmoleküle verwendete Peptide . . . . .	71
A.1. Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien mit Hersteller . . . . .	123
A.2. Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien mit Hersteller . . . . .	123
A.3. Auflistung verwendeten Messinstrumente und Geräte mit Herstellern. . . . .	124
B.4. Liste der Eingabeparameter des „LigPrep“-Knotens in KNIME . . . . .	125
B.5. Auflistung der Eingabeparameter des „Glide Docking“-Knotens in KNIME	125



## Abbildungsverzeichnis

2.1. Häufig genutzte Liganden in der IEX . . . . .	6
2.2. Reaktionsgleichung zur Modifizierung von GMA . . . . .	11
2.3. Reaktionsgleichung zur Hydrophilisierung von GMA . . . . .	12
2.4. Graphischer Verlauf der Langmuir-Isotherme . . . . .	17
2.5. Verlauf des Lennard-Jones-Potentials . . . . .	25
2.6. Flussdiagramm des MD-Simulationsprozesses . . . . .	27
2.7. Ergebnisse einer Docking-Simulation . . . . .	35
3.1. Größenordnung von Oberflächenmodellen in der Chromatographie . . . . .	43
3.2. Veranschaulichung der Abfolge der Simulationsschritte des zweiten simulativen Workflows . . . . .	49
3.3. Auswählbare Polymerbausteine im SimStack-Workflow . . . . .	51
3.4. Etablierte Modelle von Chromatographieharzoberflächen . . . . .	54
3.5. Schematische Darstellung und Fotografie des Robotiklabors . . . . .	56
3.6. Übersicht des modularen Aufbaus des Steuerungssystems des Robotiklabor . . . . .	57
3.7. Technische Zeichnungen des additiv gefertigten Greifarms . . . . .	60
3.8. Aufbau der Zustandsnachrichten des UR5e . . . . .	61
3.9. Aufbau des MediaScout ResiQuot zur Befüllung von 96-Well-Filterplatten . . . . .	64
3.10. Fließschema des automatisierten Gesamtprozesses zur Aufnahme von Adsorptionsisothermen . . . . .	66
3.11. Fließschema des Unterprozesses für das Spülen der Filterplatten . . . . .	67
4.1. Schematische Darstellung und Screenshot des in SimStack automatisierten Workflows zur Generierung atomistischer Modelle von Chromatographieharzoberflächen . . . . .	74
4.2. Screenshot des entwickelten KNIME-Workflows zur Berechnung von Bindeenergien und -posen zwischen molekularen Oberflächenmodellen und Peptiden . . . . .	76
4.3. Atomares Modell der MMC-Harzoberfläche . . . . .	79
4.4. Darstellung der vier verschiedenen Bindeposen von Oktapeptid-2 auf der Oberfläche des Chromatographieharzes . . . . .	82
4.5. Konformationsänderung der Bindepose durch Energieminimierung . . . . .	83

---

4.6. Alle verfeinerten Bindeposen von Oktapeptid-2 mit dem MOC . . . . .	85
4.7. Vergleich der Bindeenergien mit und ohne Liganden . . . . .	87
4.8. Schematische Darstellung von vier verschiedenen Bindungsszenarien zwischen Peptid und Adsorbensoberfläche . . . . .	89
4.9. Ergebnisse der Funktionstests des Robotiklabors . . . . .	94
4.10. Adsorptionsisothermen der Peptide . . . . .	95
4.11. Nettoladung der Peptide bei pH 4 im Vergleich zu deren, aus den Langmuir-Isothermen-Fits abgeleiteten, $K_L$ -Werten . . . . .	96
4.12. Experimentelle Validierung des simulativen Ansatzes . . . . .	100
4.13. Analyse der Bindeenergie und -posen von Hexapeptid-9 . . . . .	102
4.14. Validierungsplots des Modellvergleichs . . . . .	104
4.15. Vergleich der RMSE von Modellierungsansätzen . . . . .	105
 B.1. Erweiterte Übersicht des KNIME-Workflows . . . . .	 126
C.2. Schematische Darstellung des Vorlage-Programms zur Steuerung des Robotiklabors . . . . .	127

# Formelverzeichnis

## Lateinische Formelzeichen

$A$	Freie Adsorptionsstelle
$c$	Konzentration
$c_R$	Referenzzustand
$E_{\text{Bindung}}$	Bindungsenergie
$E_{\text{Coul}}$	Coulomb'sche Energie
$E_T$	Torsionsenergie
$E_{\text{vdW}}$	Van-der-Waals-Energie
$E_{\text{Winkel}}$	Winkelenergie
$F$	Kraft
$G$	Gibbs'sche freie Energie
$H$	Enthalpie
$\hat{H}$	Hamilton-Operator
$K$	Verteilungskoeffizient
$k$	Geschwindigkeitskonstante
$k_b$	Kraftkonstante der Bindung
$k_B$	Boltzmann-Konstante
$K_{\text{eq}}$	Gleichgewichtskonstante
$K_L$	Langmuir-Konstante
$k_\theta$	Kraftkonstante des Winkels
$L_{\text{CG}}$	Längeneinheit in CG-Simulation
$M$	Molekül in Lösung
$MA$	An Adsorptionsstelle adsorbiertes Molekül
$m$	Masse
$q$	Beladung
$q_p$	Partialladung
$R$	Universelle Gaskonstante
$r$	Reaktionsgeschwindigkeit

$r_a$	Abstand zwischen zwei Atomen
$r_b$	Aktuelle Bindungslänge
$r_{b,0}$	Gleichgewichtsbindungslänge
$r_{\text{CG}}$	Abstand zwischen zwei verbundenen Coarse-Grained Beads
$r_p$	Position des Atoms
$T$	Temperatur
$T_0$	Zieltemperatur
$U$	Potenzielle Energie
$V$	Volumen
$v$	Geschwindigkeit
$V_n$	Amplitude

## Griechische Formelzeichen

$\alpha$	Aktivität
$\epsilon$	Tiefe der Potentialmulde
$\epsilon_0$	Elektrische Feldkonstante
$\phi$	Torsionswinkel
$\gamma$	Phasenverschiebung
$\gamma_a$	Aktivitätskoeffizient
$\sigma$	Abstand mit Potential gleich null
$\theta$	Bedeckungsgrad
$\theta_b$	Aktueller Bindungswinkel
$\theta_{b,0}$	Gleichgewichtsbindungswinkel
$\tau_T$	Zeitkonstante
$\tau_{\text{CG}}$	Zeiteinheit in CG-Simulation
$\psi$	Wellenfunktion





## Abkürzungsverzeichnis

<b>AA</b>	Atomistisch
<b>AC</b>	Affinitätschromatographie
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>CG</b>	Grobkörnig
<b>DFT</b>	Dichtefunktionaltheorie
<b>DHPMA</b>	2,3-Dihydroxypropylmethacrylat
<b>EDGMA</b>	Ethylenglykoldimethacrylat
<b>GB</b>	Generalized Born
<b>GMA</b>	Glycidylmethacrylat
<b>HEMA</b>	2-Hydroxyethylmethacrylat
<b>HIC</b>	Hydrophobe Interaktionschromatographie
<b>HILIC</b>	Hydrophile Interaktionschromatographie
<b>HTS</b>	Hochdurchsatz-Screening
<b>IEX</b>	Ionenaustauschchromatographie
<b>LHS</b>	Pipettierroboter
<b>LM</b>	Liganden Modell
<b>MD</b>	Molekulardynamik
<b>MM</b>	Molekulare Mechanik
<b>MOC</b>	Molekulares Oberflächenmodell des Chromatographieharzes
<b>PD</b>	Prozentuale Abweichung
<b>PI</b>	Isoelektrische Punkt
<b>QM</b>	Quantenmechanik
<b>QSPA</b>	Quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen
<b>QSPR</b>	Quantitative Struktur-Eigenschafts-Beziehungen
<b>SEC</b>	Größenausschlusschromatographie
<b>SP</b>	Standardpräzision
<b>TI</b>	Thermodynamische Integration
<b>Trp</b>	Tryptophan
<b>VdW</b>	Van-der-Waal
<b>XP</b>	Extrapräzision



# 1. Einleitung und Zielsetzung

Die präparative Flüssigchromatographie ist ein essenzielles Verfahren in der biopharmazeutischen Industrie, welches zur Aufreinigung und Trennung komplexer Gemische eingesetzt wird [1, 2, 3]. Dabei basiert der Prozess auf unterschiedlichen Wechselwirkungen von Biomolekülen mit einer stationären und einer mobilen Phase [4]. Ein signifikanter Fortschritt in diesem Bereich war die Einführung der multimodalen Chromatographie (MMC), welche mehrere Wechselwirkungstypen, wie elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen, zwischen den Liganden und den zu trennenden Molekülen kombiniert [5, 6, 7]. Diese Methode hat sich insbesondere bei der Trennung von Molekülen bewährt, welche mit herkömmlichen chromatographischen Techniken nur schwer zu isolieren sind [8]. Neben ihren Vorteilen bringt die MMC jedoch auch eine erhöhte Komplexität des Adsorptionsmechanismus mit sich [9]. Dies stellt eine besondere Herausforderung bei der Bestimmung optimaler Binde- und Elutionsbedingungen während der frühen Entwicklungsphase eines Prozesses dar [10], da hier umfangreiche empirische Screenings durch eine limitierte Verfügbarkeit und hohe Kosten von Produktproben begrenzt sind [11]. Um diese Problemstellung zu adressieren, war die Entwicklung computergestützter Modellierungsmethoden in den letzten Jahrzehnten ein bedeutender Forschungsschwerpunkt in der Chromatographie. Molekulare Simulationen erwiesen sich hierbei als eine vielversprechende Methode, um die Wechselwirkungen von Biomolekülen mit chromatographischen Medien unter verschiedenen Bedingungen vorherzusagen [12, 13].

Eine Herausforderung bei molekularen Simulationsansätzen stellt jedoch die genaue Modellierung der Oberflächenstruktur von Chromatographiehharzen dar [13]. Die Komplexität der Harze, insbesondere deren molekulare Oberflächenbeschaffenheit, wurde in Modellen zuvor meist vereinfacht, indem Liganden an planare oder leicht abgerundete Oberflächen gebunden wurden [14, 10, 15]. Diese Vereinfachungen vernachlässigen jedoch, dass Harze aufgrund der nanostrukturellen Beschaffenheit des Trägermaterials in der Realität keine planaren Oberflächen und keine gleichmäßige Ligandendichte aufweisen. Darüber hinaus

kann bei polymerbasierten Chromatographiematerialien, wie beispielsweise bei methacrylatbasierten Harzen, das Trägermaterial selbst hydrophobe Eigenschaften besitzen, welche die Gesamtaffinität gegenüber Zielmolekülen beeinflussen können [16]. Zusätzlich erfordert die technische Komplexität bei der Einrichtung und Durchführung molekularer Simulationen spezielles Fachwissen und erhebliche Rechenressourcen [17]. Diese Herausforderungen haben die Nutzung molekularer Simulationen in chromatographischen Anwendungen bislang auf eine Nische beschränkt, weshalb ihr Potenzial nur unzureichend ausgeschöpft werden konnte. Dies unterstreicht den dringenden Bedarf an detaillierten Modellen von Chromatographieharzoberflächen, welche eine präzise Vorhersage des Adsorptionsverhaltens von Biomolekülen ermöglichen und gleichzeitig auf zugänglicheren sowie ressourcenschonenderen Simulationsmethoden beruhen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, molekulare Modellierungs-Workflows zu entwickeln, die eine präzise Vorhersage des Adsorptionsverhaltens von Peptiden an Chromatographieharzoberflächen ermöglichen. Zunächst sollte hierfür eine Methode zur Erstellung detaillierter molekularer Modelle von methacrylatbasierten Chromatographieharzoberflächen entwickelt werden, welche die Struktur des Trägermaterials miteinbeziehen. Ein anschließender Workflow sollte durch effiziente Simulationsmethoden schnelle Screenings von Bindeposen und -energien zwischen Harzoberflächen und Peptiden ermöglichen. Um eine einfache Anwendung durch graphische Benutzeroberflächen und eine hohe Reproduzierbarkeit der Simulationsergebnisse zu gewährleisten, sollten die simulierten Abläufe in Workflow-Management-Systemen automatisiert werden. Für eine experimentelle Validierung sollte ein Robotiklabor geplant und etabliert werden, um das Adsorptionsverhalten der Peptide präzise und reproduzierbar messen zu können. Abschließend sollten die entwickelten Modelle und Methoden gegen etablierte Ansätze gebenchmarkt werden, um ihre Anwendbarkeit und Vorhersagekraft für experimentelle Parameter zu evaluieren.

## 2. Theoretischer Hintergrund

In diesem Kapitel wird die zugrundeliegende Theorie der experimentellen und simulativen Durchführungen dieser Arbeit erläutert. Hierbei wird zunächst auf die Grundlagen der Flüssigchromatographie und anschließend auf die Grundlagen von molekularen Simulationen eingegangen.

### 2.1. Grundlagen der Flüssigchromatographie

Die Chromatographie ist ein Trennverfahren, welches auf der unterschiedlichen Verteilung der Stoffe eines Gemischs zwischen zwei Phasen beruht. Hierbei wird zwischen einer stationären Phase, welche meist in einer Chromatographiesäule immobilisiert ist und einer mobilen Phase, welche durch die stationäre Phase fließt, unterschieden. Die stationäre Phase kann ein Feststoff oder ein Fluid sein, welches allerdings nicht mit der mobilen Phase mischbar sein darf. Die mobile Phase führt das Stoffgemisch mit und kann ebenfalls unterschiedliche Aggregatzustände aufweisen. Ist diese eine Flüssigkeit, wird von Flüssigchromatographie gesprochen und bei Gasen von Gaschromatographie. [4]

Die Flüssigchromatographie ist eine zentrale Technik, welche in der Chemie, Biochemie, Pharmazie und Umweltwissenschaften weit verbreitet ist. Sie ermöglicht sowohl die Trennung als auch die Identifizierung und Quantifizierung von Komponenten in komplexen Mischungen. Grundsätzlich wird zwischen analytischer und präparativer Flüssigchromatographie unterschieden. Während die analytische Flüssigchromatographie hauptsächlich zur Identifizierung und Quantifizierung von Substanzen in kleinen Probenmengen eingesetzt wird, konzentriert sich die präparative Flüssigchromatographie auf die Trennung und Reinigung größerer Mengen von Substanzen. [18]

Die präparative Flüssigchromatographie wird beispielsweise in der biopharmazeutischen Industrie für die Aufreinigung und Isolation von Proteinen, Peptiden und anderen biomolekularen Verbindungen angewendet. Ein Hauptgrund hierfür ist, dass diese großen Moleküle

durch konformative Veränderungen ihre Wirksamkeit verlieren können, was durch eine schonende chromatographische Aufreinigung verhindert werden kann [19]. Das hierbei grundlegende Funktionsprinzip beruht auf unterschiedlichen Wechselwirkungen der Zielmoleküle mit der stationären Phase. Dies führt dazu, dass sich die Analyten, nach der Aufgabe auf die Trennsäule, mit verschiedenen Geschwindigkeiten durch das System bewegen [4]. Stark wechselwirkende Komponenten weisen aufgrund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften ein intensiveres Bindeverhalten an die stationäre Phase auf. Somit werden diese stärker zurückgehalten als Moleküle mit einer geringeren Wechselwirkung. Dies führt zu einer Trennung der Analyten aufgrund der resultierenden Geschwindigkeitsunterschiede der Moleküle beim Wandern durch die Trennsäule.

Die Wechselwirkung einer Komponente mit beiden Phasen wird durch den Verteilungskoeffizienten ( $K$ ) ausgedrückt. Dieser beschreibt das Verhältnis der Konzentrationen einer Komponente  $i$ , welche sich nach Erreichen des Gleichgewichts in der stationären Phase ( $c_{i,stat}^*$ ) und in der mobilen Phase ( $c_{i,mob}^*$ ) eingestellt haben:

$$K = \frac{c_{i,stat}^*}{c_{i,mob}^*} \quad (2.1)$$

Die durch die Rückhaltung einer Komponente entstehende Verringerung ihrer Wanderungsgeschwindigkeit in der Trennsäule, wird als Retention bezeichnet. Die Retentionszeit steigt mit dem Grad der Zurückhaltung durch die stationäre Phase und kann durch Detektoren am Säulenausgang gemessen werden. Häufig verwendete Detektoren in der präparativen Chromatographie sind UV-Vis-Spektrometer, Fluoreszenzdetektoren, Konduktometer und Massenspektrometer, welche eine genaue Überwachung der Elution ermöglichen [20]. Neben Detektoren besteht ein präparatives Flüssigchromatographiesystem aus mehreren wesentlichen Komponenten. Pumpen treiben die mobile Phase unter Druck durch die Trennsäule. Zur Einführung der Probe in die mobile Phase werden Injektionssysteme benutzt. Die Säule, in der die Trennung der Analyten erfolgt, ist mit der stationären Phase gefüllt und kann je nach Anwendung verschiedenste Materialien enthalten. Die Auswahl und der Aufbau der stationären Phase spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Verschiedene Harze weisen, durch gezielte Modifikation erzielte, spezifische Eigenschaften auf. Somit kann durch die Auswahl eines geeigneten Harzes die Trennungseffizienz maximiert werden. [21]

Zusammenfassend, ist die präparative Flüssigchromatographie eine weit verbreitete Technik für die Aufreinigung von Biomolekülen. Durch eine sorgfältige Auswahl und Optimierung der chromatographischen Bedingungen kann die Wechselwirkungen zwischen Analyten und der stationären Phase optimiert werden, um eine maximale Trennungseffizienz zu gewährleisten. Hierbei trägt vor allem die Weiterentwicklung von stationären Phasen zu einer kontinuierlichen Verbesserung der Leistungsfähigkeit und Anwendbarkeit der präparativen Chromatographie bei.

### 2.1.1. Arten der Chromatographie

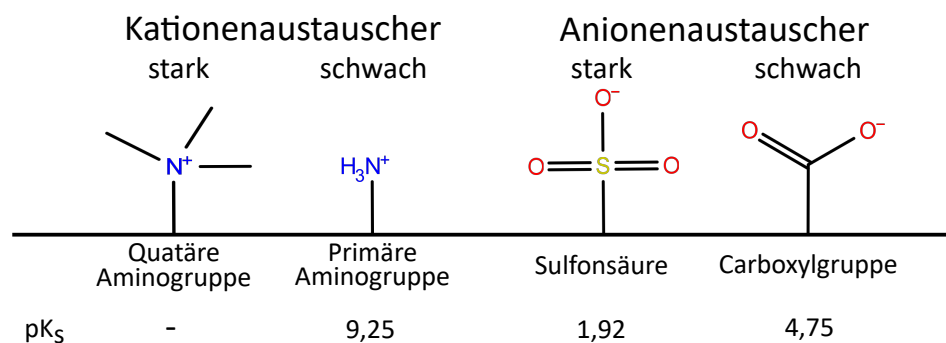
Chromatographieharze bestehen aus einer Gerüststruktur, oder Rückgrat, an deren Oberfläche Liganden kovalent gebunden sind [18]. Die Liganden sind maßgeblich für die Interaktion der stationären Phase mit den Zielmolekülen verantwortlich. In der Flüssigchromatographie wird zwischen mehrere Arten unterschieden, welche anhand der Binde-mechanismen zwischen den Liganden und potentiellen Zielmoleküle klassifiziert werden. Häufig genutzte Arten in der Aufreinigung von Biomolekülen umfassen die Ionenaustauschchromatographie (engl. *Ion Exchange Chromatography* (IEX)), die hydrophobe Interaktionschromatographie (engl. *Hydrophobic Interaction Chromatography* (HIC)), die hydrophile Interaktionschromatographie (engl. *Hydrophilic Interaction Chromatography* (HILIC)), die Größenausschlusschromatographie (engl. *Size Exclusion Chromatography* (SEC)), die Affinitätschromatographie (AC) und die multimodale Chromatographie (MMC) [22]. Im Folgenden wird genauer auf die für diese Arbeit relevanten Arten, IEX, HIC und MMC eingegangen.

#### 2.1.1.1. Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie ist eine weit verbreitete Technik zur Trennung und Aufreinigung von Proteinen, Nukleinsäuren und anderen biomolekularen Verbindungen. Sie beruht auf der elektrostatischen Wechselwirkung mit geladenen Analyten und nutzt die Abhängigkeit der Ladung biologischer Moleküle vom pH-Wert, um eine gezielte Trennung zu ermöglichen. [23, 24]

Bei der IEX wird die stationäre Phase mit ionischen Liganden modifiziert, welche entweder positiv oder negativ geladen sind. Die Kationenaustauschchromatographie verwendet negativ geladene Gruppen, wie Sulfat- oder Carboxylgruppen, um positiv geladene Analyten zu binden. Im Gegensatz dazu nutzt die Anionenaustauschchromatographie positiv geladene Gruppen, wie quaternäre Ammoniumverbindungen, um negativ geladene Analyten zu adsorbieren. Ein entscheidender Aspekt in der IEX ist die Unterscheidung zwischen starken und schwachen Ionenaustauschharzen. Starke Ionenaustauscher sind über einen weiten pH-Bereich stabil und behalten ihre Ladung unabhängig vom pH-Wert der mobilen Phase bei. Schwache Ionenaustauscher hingegen ändern ihre Ladung in Abhängigkeit vom pH-Wert. Entscheidend ist hier der  $pK_s$ -Wert der Liganden. Dieser gibt an, bei welchem pH-Wert die stationäre Phase ihre Ladung ändert und ist ein kritischer Parameter für die Auswahl eines geeigneten Harzes [25]. Starke Kationenaustauscher sollten somit einen möglichst niedrigen  $pK_s$ -Wert und starke Anionenaustauscher einen möglichst hohen  $pK_s$ -Wert aufweisen [24]. Abbildung 2.1 zeigt beispielhaft häufig genutzte Liganden in der IEX mit Angabe ihrer  $pK_s$ -Werte.

Die Elution der adsorbierten Analyten kann durch Veränderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke der mobilen Phase erreicht werden [26]. Bei einer Änderung des pH-Wertes



**Abbildung 2.1.:** Häufig genutzte Liganden in der IEX - Die Abbildung zeigt Beispiele für Liganden jeweils starker und schwacher Kationen- sowie Anionenaustauscher und ihre pK<sub>s</sub>-Werte bei 25°C.

kann sich die Ladung der Zielmoleküle oder der Liganden ändern, was zu einer Verringerung der elektrostatischen Wechselwirkungen führen kann, welche die Zielmoleküle von der stationären Phase eluieren kann. Bei der Erhöhung der Ionenstärke konkurrieren Salze mit den Zielmolekülen um die Bindestellen an der stationären Phase. Wenn die Affinität der Salze die der Zielmoleküle übersteigt, werden die Zielmoleküle durch die Salze verdrängt und eluieren. [18]

Ein tiefes Verständnis des Zusammenhangs der Parameter, welche die IEX beeinflussen, ist entscheidend für eine erfolgreiche Anwendung. Hierzu gehören der pH-Wert der mobilen Phase, der isoelektrische Punkt (pI) des Zielmoleküls und der pK<sub>s</sub>-Wert der funktionellen Gruppen auf der stationären Phase. Der pH-Wert der mobilen Phase muss somit so gewählt werden, dass er zwischen dem pI des Zielmoleküls und dem pK<sub>s</sub> des Liganden liegt. Nur in diesem Bereich sind die stationäre Phase und das Zielprotein gegensätzlich geladen, was Grundvoraussetzung für eine effektive Adsorption ist. [25]

Zusammenfassend kann die Ionenaustauschchromatographie durch eine präzise Kontrolle der Trennparameter eine effektive Aufreinigung von biomolekularen Verbindungen ermöglicht. Die richtige Auswahl und Optimierung der chromatographischen Bedingungen sind entscheidend, um eine maximale Trennungseffizienz und Reinheit der Zielanalyten zu erreichen.

#### 2.1.1.2. Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die HIC nutzt die hydrophoben Eigenschaften von Zielmolekülen, um eine effektive Trennung eines Stoffgemischs zu erreichen. Im Gegensatz zur Umkehrphasenchromatographie verwendet die HIC wässrige Lösungen als mobile Phase, was eine schonendere Adsorption und Elution ermöglicht und die Denaturierung von Proteinen minimiert [27]. In wässrigen Lösungen neigen die unpolaren Seitenketten der Aminosäuren dazu, sich gegenseitig anzuziehen und hydrophobe, vom Wasser abgeschirmte Bereiche im Protein inneren zu bilden. Im Gegensatz hierzu befinden sich die hydrophilen Seitenketten bevorzugt an der Proteinoberfläche und bilden Wasserstoffbrücken mit den Wassermolekülen, was die



Löslichkeit der Proteine unterstützt [28]. Einige unpolare Seitenketten verbleiben jedoch an der Oberfläche und bilden hydrophobe Bereiche, welche in der HIC genutzt werden, um Proteine an die hydrophoben Liganden der stationären Phase zu binden [29]. Typische Liganden in der HIC sind Phenyl-, Butyl- oder Octylgruppen. Hierbei wird das Trennverhalten maßgeblich von der durchschnittlichen Hydrophobizität und die Verteilung der hydrophoben Bereiche der Zielmoleküle bestimmt [30].

Die hohe Oberflächenspannung von Wasser wird durch die Dipoleigenschaften und die zahlreichen Bindungen zwischen den Wassermolekülen stabilisiert. Wenn hydrophobe Bereiche von Makromolekülen in Wasser gelöst werden sollen, müssen die benachbarten Wassermoleküle ihre Bindungen trennen, was Energie erfordert. Lagern sich hydrophobe Bereiche hingegen aneinander, können die Wassermoleküle ihre Bindungen wiederherstellen und Energie wird freigesetzt. Dieser entropiegetriebene Prozess ist sowohl für die Aggregation von Proteinen untereinander als auch für deren Bindung an hydrophobe Liganden in der HIC verantwortlich. [28]

Durch die Zugabe bestimmter Salze zu wässrigen Lösungen können die dissoziierten Ionen Wasserstoffbrücken mit den Wassermolekülen bilden und die Oberflächenspannung des Wassers reduzieren. Je höher die Salzkonzentration, desto weniger Wassermoleküle stehen für die Interaktion mit der hydrophilen Proteinoberfläche zur Verfügung, was zu einer verstärkten Aggregation der Proteine führt [28]. Dieser Effekt, bekannt als Aussalzen, hängt sowohl von der Salzkonzentration als auch von der Art des Salzes ab. Kosmotrope Salze verstärken hydrophobe Wechselwirkungen, während chaotrope Salze diese schwächen und die Löslichkeit von Proteinen erhöhen können, was jedoch zur Denaturierung führen kann. Die Stärke von kosmotropen und chaotropen Salzen wird durch die Hofmeister-Reihe klassifiziert [31].

Neben Salzen können auch organische Lösungsmittel wie Alkohole oder Acetonitril sowie der pH-Wert hydrophobe Wechselwirkungen beeinflussen [32]. Organische Lösungsmittel ändern die Polarität der mobilen Phase und somit die Oberflächenspannung. Zudem konkurrieren sie mit den Proteinen um Bindungsstellen an der stationären Phase. Entspricht der pH des Laufmittels dem isoelektrischen Punkt des Zielproteins, besitzt dieses eine Nettoladung von Null, wodurch die elektrostatischen Abstoßungen minimiert und somit die hydrophoben Wechselwirkungen maximiert werden [33].

Die Adsorption an hydrophobe Liganden in der HIC erfolgt in mehreren Schritten. Zunächst werden die Zielmoleküle und der Ligand dehydriert bzw. deionisiert. Anschließend erfolgt die Adsorption durch Van-der-Waals-Kräfte zwischen dem Protein und dem Liganden. Danach kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins, gefolgt von einer Neuordnung der Wassermoleküle bzw. Ionen in der mobilen Phase. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist hierbei die Konformationsänderung des Proteins. Die Menge an adsorbiertem Protein steigt zunächst fast linear mit der Zugabe kosmotroper

Salze und bei weiterer Erhöhung der Ionenstärke exponentiell [27]. Die Sättigung hängt unter anderem vom Substitutionsgrad der immobilisierten Liganden und der Fähigkeit der Proteine ab, an mehrere Liganden gleichzeitig zu binden.

Bei HIC Läufen wird die Probe allgemein bei hoher kosmotroper Salzkonzentration auf die Säule gegeben, und die Elution erfolgt durch Reduktion der Salzkonzentration, um die hydrophoben Wechselwirkungen zu schwächen. Alternativ können organische Lösungsmittel hinzugefügt werden, um hydrophobe Wechselwirkungen zu reduzieren, wobei das Risiko der Denaturierung oder Deaktivierung der Proteine besteht. Auch chaotrope Salze oder Detergenzien können zur Elution verwendet werden, wobei ebenfalls eine Denaturierung der Proteine möglich ist. [32]

Insgesamt bietet die HIC eine effektive Methode zur schonenden Trennung und Reinigung von Proteinen, wobei die Wahl der mobilen Phase, die Art der Liganden und die genutzten Salze entscheidend für den Erfolg der Trennung sind.

### 2.1.1.3. Multimodale Chromatographie

Die multimodale Chromatographie ist eine fortschrittliche Trenntechnik, welche verschiedene Wechselwirkungsmechanismen kombiniert, um die Trennung von Stoffgemischen zu optimieren. Diese Methode nutzt Liganden, welche mehrere Arten von Interaktionen mit Zielmolekülen eingehen können, wie zum Beispiel ionische und hydrophobe Interaktionen. [9]

In der biopharmazeutischen Industrie erfordert die Aufreinigung von Proteinen oft mehrere aufeinanderfolgende Chromatographieschritte, um die gewünschte Reinheit des Produkts zu erreichen. Diese Trennmechanismen sollten idealerweise orthogonal zueinander sein, um die Selektivität und Spezifität zu maximieren. MMC verspricht durch die Kombination mehrerer Interaktionsmechanismen eine höhere Selektivität und Spezifität in einem einzigen Schritt. Dies kann den Bedarf an mehreren Trennschritten verringern, was sowohl den Materialverbrauch als auch die Abfallmenge reduziert. Darüber hinaus wird MMC häufig bei Trennproblemen eingesetzt, bei denen die Zielmoleküle durch herkömmliche Methoden nur schwer aufgereinigt werden können [34].

Historisch gesehen, waren multiple Interaktionsmodi auch ohne bewusste Anwendung von MMC bekannt. Beispielsweise wurden hydrophobe Wechselwirkungen bei der IEX und der Affinitätschromatographie beobachtet. Solche sekundären Interaktionen können zur Peakverbreiterungen führen und wurden daher in traditionellen Methoden versucht zu vermeiden [35]. Heutzutage wird MMC jedoch erfolgreich eingesetzt, um Peptide und Proteine zu aufzureinigen [9], Aggregate und heterogene Antikörper zu trennen [36] und kleine Moleküle aufzubereiten [37].

MMC-Medien können grundsätzlich in drei Kategorien eingeteilt werden. Typ 1 verwendet zwei unterschiedliche Medien mit separaten Trennmechanismen in einer Säule. Typ 2

Medien verfügen über eine gemeinsame Matrix, deren Oberfläche mit einer Mischung von Liganden modifiziert ist, welche jeweils unterschiedliche Funktionalitäten besitzen. Aufgrund der begrenzten Leistung dieser beiden Medientypen werden vorwiegend Typ 3 Medien verwendet. Diese Medien besitzen eine einzige Art von funktionellen Liganden, welche an die Matrix gebunden sind. Diese Liganden können sowohl positive als auch negative Ladungen, hydrophobe Bereiche sowie polare Gruppen enthalten, was eine Vielzahl von Interaktionsmöglichkeiten bietet. Ein typisches Beispiel für einen multimodalen Liganden ist einer, der sowohl hydrophobe als auch ionische Wechselwirkungen eingehen kann, was ihn besonders effektiv für die Trennung von Proteinen mit variablen Eigenschaften macht. Liganden solcher HIC/IEX Medien bestehen beispielsweise aus einer hydrophoben Kette, an die eine ionisierbare Gruppe gebunden ist. Diese Ladung kann nahe der Oberfläche der Matrix in die hydrophobe Kette eingebettet sein oder sich am Ende der Kette befinden. [7]

Obwohl die Kombination mehrerer Interaktionen viele Möglichkeiten eröffnet, müssen die Wechselwirkungen in MMC-Medien gut ausbalanciert sein, um eine zu starke Adsorption zu vermeiden. Beispielsweise haben Salze bei HIC und IEX entgegengesetzte Einflüsse. Dies führt dazu, dass Proteine sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Salzkonzentrationen an die stationäre Phase adsorbieren [22]. Bei niedrigen Konzentrationen sind elektrostatische Wechselwirkungen für die Adsorption verantwortlich, während bei hohen Konzentrationen hydrophobe Wechselwirkungen verstärkt werden. Zwischen diesen Extremen gibt es ein Minimum an Bindestärke, was zu einer charakteristischen U-Form führt, wenn die Bindestärke gegen die Salzkonzentration aufgetragen wird [38]. Dieses Phänomen erschwert die Elution, da die Bindestärke am Minimum noch groß genug für die Adsorption sein kann, sodass beispielsweise organische Lösungsmittel für die Elution notwendig sind. Darüber hinaus erfordert die Bestimmung der optimalen Prozessbedingungen mehr Entwicklungsaufwand und ein tieferes Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen [39].

Zusammenfassend stellt die multimodale Chromatographie eine neuartige Technik zur Trennung und Aufreinigung von Biomolekülen dar. Durch die Kombination verschiedener Wechselwirkungsmechanismen ermöglicht sie eine höhere Selektivität und Effizienz bei der Trennung komplexer Mischungen. Durch die erhöhte Komplexität der Interaktionen mit Zielmolekülen, ist die Auswahl und Optimierung der chromatographischen Bedingungen zunehmend erschwert. Deshalb werden in der Prozessentwicklung oftmals Hochdurchsatzscreenings verwendet, um die Vorteile dieser Technik voll ausschöpfen zu können.

### 2.1.2. Stationäre Phasen in der Chromatographie

Stationäre Phasen sind grundlegende Elemente im chromatographischen Prozess und bieten die Oberfläche, auf der die Trennung der Analyten erfolgt. Sie bestehen in der

Regel aus einem Trägermaterial mit großer spezifischer Oberfläche und darauf kovalent gebundenen Liganden. Die Eigenschaften dieser Materialien variieren je nach Einsatzgebiet, wobei die Wahl des Trägermaterials entscheidend für die Effizienz, Selektivität und Stabilität der Trennung ist. [22]

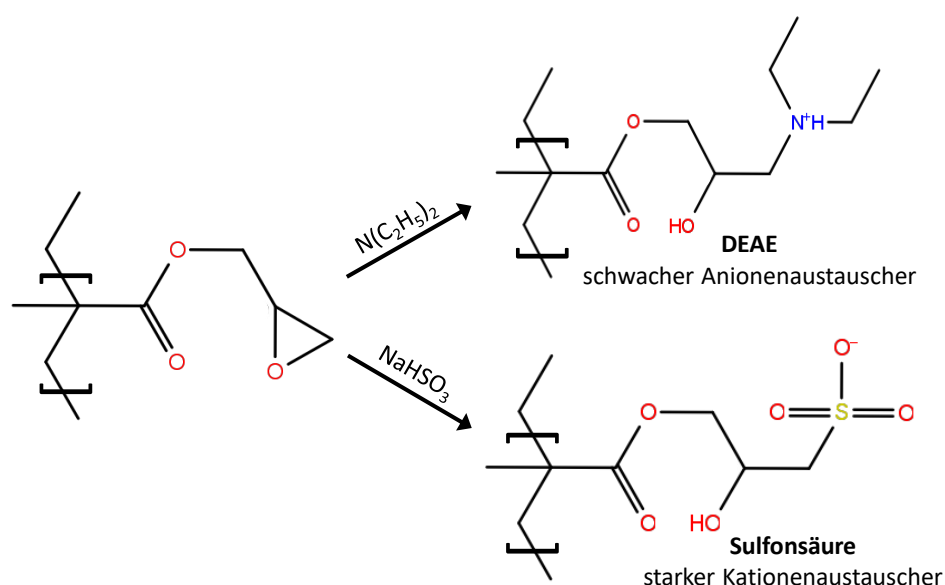
Siliziumdioxid, besser bekannt als Silica, ist eines der am häufigsten verwendeten Materialien, vor allem in der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) [40]. Silica zeichnet sich durch eine hohe mechanische Stabilität, eine große spezifische Oberfläche und vielfältige Möglichkeiten zur chemischen Modifikation aus. Ein wesentlicher Nachteil von Silica ist seine Anfälligkeit für pH-Werte außerhalb des Bereichs von 2 bis 8, was seine Anwendung in bestimmten Trennverfahren einschränkt [41]. Aluminiumoxid wird häufig in der analytischen Chromatographie eingesetzt und bietet hohe thermische Stabilität sowie gute mechanische Eigenschaften [42]. Allerdings weist es eine noch geringere chemische Stabilität als Silica auf und wird unter extremen pH-Bedingungen abgebaut [43].

Polymerbasierte stationäre Phasen, wie polystyrolbasierte Harze, zeichnen sich durch hohe chemische und pH-Stabilität aus und sind in vielen chromatographischen Anwendungen nützlich [22]. Sie sind besonders vorteilhaft in der Ionenaustauschchromatographie und bei Anwendungen, welche eine hohe pH-Stabilität erfordern. Im Vergleich zu Silica haben sie jedoch eine geringere Hydrophililität, mechanische Stabilität und spezifische Oberfläche [44]. Agarose, ein Polysaccharid aus Meerestang, ist aufgrund seiner biokompatiblen und ungiftigen Eigenschaften weit verbreitet in der Biochemie und Molekularbiologie [45]. Agarose-Gele sind ideal für die Trennung von Proteinen, Nukleinsäuren und anderen Biomolekülen, da sie eine hohe Porosität aufweisen, welche die Diffusion großer Moleküle erleichtert [46]. Ein Nachteil von Agarose ist jedoch ihre begrenzte mechanische Stabilität, welche ihren Einsatz in Hochdruckanwendungen einschränkt. Kohlenstoffbasierte Materialien wie Aktivkohle und graphitische Kohlenstoffe bieten einzigartige Eigenschaften für die Adsorptionschromatographie und werden für spezielle Anwendungen genutzt [47]. Diese Materialien haben eine hohe spezifische Oberfläche und starke Adsorptionskräfte, sind jedoch oft schwierig zu regenerieren und können Probleme mit der Reproduzierbarkeit aufweisen.

Die Entwicklung stationärer Phasen reicht historisch bis in die frühen Tage der Chromatographie zurück, als natürliche Materialien wie Stärke, Zucker und Kieselgur verwendet wurden. Mit der Weiterentwicklung der chromatographischen Techniken kamen spezialisierte synthetische Materialien zum Einsatz. In den 1960er und 1970er Jahren führte die Entwicklung der HPLC zur weit verbreiteten Nutzung von Silica als Trägermaterial, das aufgrund seiner hohen Stabilität und chemischen Modifizierbarkeit geschätzt wurde. Fortschritte in der Materialwissenschaft haben in den letzten Jahrzehnten zur Entwicklung neuer polymerbasierter Materialien geführt, welche speziell für anspruchsvolle chromatographische Anwendungen entwickelt wurden. [22]

Methacrylatbasierte Chromatographieharze stellen eine bedeutende Klasse unter den polymerbasierten stationären Phasen dar. Diese Materialien bieten chemische Stabilität, Anpassungsfähigkeit und vielfältige Möglichkeiten zur chemischen Modifikation. Methacrylatbasierte stationäre Phasen bestehen aus einem Netzwerk von Poly(methacrylat)-Polymeren, welche durch radikalische Polymerisation von Methacrylat-Monomeren und -Vernetzern hergestellt werden [16]. Typische Monomere sind Glycidylmethacrylat (GMA) [48] und 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) [49], wobei Ethylendimethacrylat (EDGMA) oft als Vernetzer eingesetzt wird [50]. Die Polymerisation dieser Komponenten führt zu einem quervernetzten Polymernetzwerk, welches eine hohe mechanische und chemische Stabilität aufweist. Die Synthese kann durch Emulsions-, Suspensions- oder Lösungspolymerisation erfolgen, wobei die Wahl der Methode die Porenstruktur und physikalischen Eigenschaften des Endprodukts beeinflusst [16].

Methacrylatbasierte Materialien sind in einem weiten pH-Bereich stabil und widerstandsfähig gegenüber vielen organischen Lösungsmitteln, was ihre Anwendung in diversen chromatographischen Methoden ermöglicht. Die chemische Struktur der Methacrylat-Monomere erlaubt eine einfache Einführung verschiedener funktioneller Gruppen, wodurch die Oberfläche der stationären Phase spezifisch für bestimmte Analyten modifiziert werden kann [51]. Dies bietet eine hohe Flexibilität bei der Entwicklung maßgeschneiderter Trennmaterien. Abbildung 2.2 zeigt beispielhaft die Reaktionsgleichung zur Modifizierung von GMA mit einem schwachen Anionenaustauscherliganden und einem starken Kationenaustauscherliganden [16]. Zusätzlich bieten methacrylatbasierte Polymere ausreichende mechanische Festigkeit für Hochleistungsanwendungen und können in verschiedenen Partikelgrößen und mit unterschiedlichen Porositäten hergestellt werden, um spezifischen Trennanforderungen gerecht zu werden.



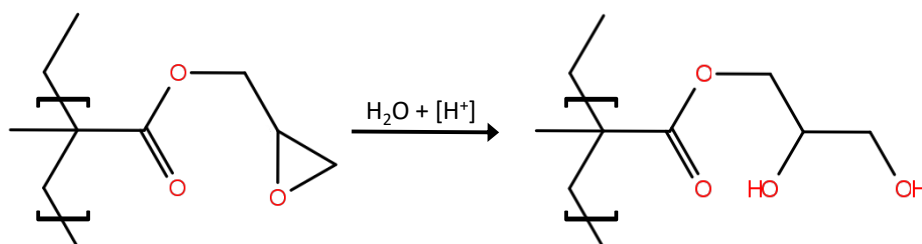
**Abbildung 2.2.:** Reaktionsgleichung zur Modifizierung von GMA - Die Abbildung zeigt beispielhaft Reaktionsgleichungen zur Modifizierung von GMA mit Sulfonsäure und DEAE.

Trotz ihrer vielen Vorteile haben methacrylatbasierte stationäre Phasen auch einige Nachteile. Ihre mechanische Stabilität ist im Allgemeinen geringer als die von silicabasierten Materialien, jedoch höher als die von agarosebasierten Materialien. Dies kann zu einer eingeschränkten Nutzungsdauer unter extremen Betriebsbedingungen führen [52]. Zudem besitzen methacrylatbasierte Polymere typischerweise hydrophobere Eigenschaften als Silica oder Agarose, was die Affinität bestimmter Zielmoleküle zur stationären Phase beeinflussen kann [53]. Ein Beispiel hierfür ist Bovines Serumalbumin (BSA), ein Protein mit hohem Anteil an hydrophoben Bereichen. Bei pH 7 adsorbiert üblicherweise mehr als 50 % des BSA an das Trägermaterial von unmodifizierten, GMA-basierten Partikeln. Solche unspezifischen Interaktionen werden in chromatographischen Methoden meist versucht zu vermeiden, da diese zu Peakverbreiterung, Tailing und geringerer Trenneffizienz führen können. [16]

Eine Möglichkeit, unspezifische Wechselwirkungen zu minimieren, ist die Hydrophilisierung der Polymeroberfläche. Bei GMA kann dies durch Spaltung der Epoxygruppe erreicht werden, wobei 2,3-Dihydroxypropylmethacrylat (DHPMA) entsteht [54]. Die hydrophilen Hydroxygruppen an den Seitenketten des Methacrylat-Monomers schirmen den hydrophoben Teil des Polymerrückgrats ab. Durch diese Hydrophilisierung kann eine vollständige Elution von BSA bei pH 7 erreicht werden [16]. Abbildung 2.3 zeigt beispielhaft die Reaktionsgleichung zur Hydrophilisierung von GMA.

Es ist jedoch zu beachten, dass hierbei nur die Methacrylat-Monomere hydrophilisiert werden. Der weit verbreitete methacrylatbasierte Vernetzer EGDMA bleibt in seiner ursprünglichen hydrophoben Form [55]. Somit steigt bei GMA-co-EDGMA-Partikeln die Gesamthydrophobizität mit dem Vernetzungsgrad. Zudem steigt die spezifische Oberfläche sowie die mechanische Stabilität der Partikel mit zunehmendem Vernetzungsanteil [56]. Eine gründliche Optimierung des Herstellungsprozesses von methacrylatbasierten Chromatographieharzen ist somit für einen effizienten Trennprozess unerlässlich. Dies macht die Entwicklung dieser komplexen funktionalisierten Polymere oft aufwendig und kostenintensiv.

Heutzutage finden methacrylatbasierte stationäre Phasen eine breite Anwendung in der



**Abbildung 2.3.:** Reaktionsgleichung zur Hydrophilisierung von GMA - DHPMA entsteht durch die Öffnung der Epoxygruppe von GMA. Die hydrophilen Hydroxygruppen an den Seitenketten des Methacrylat-Monomers schirmen den hydrophoben Teil des Polymerrückgrats ab.

Trennung von Biomolekülen, insbesondere Proteinen und Nukleinsäuren, in der biopharmazeutischen Industrie [16, 57]. Durch ihre Anpassungsfähigkeit und chemische Stabilität eignen sie sich besonders für Anwendungen, welche spezifische Oberflächenmodifikationen und robuste Betriebsbedingungen erfordern. Mit fortschreitender Forschung und Entwicklung werden neue Synthesemethoden und Modifikationstechniken erwartet, welche die Leistungsfähigkeit und Anwendungsmöglichkeiten dieser Materialien weiter verbessern werden.

Zusammenfassend bieten stationäre Phasen in der Chromatographie eine breite Palette von Materialien und Eigenschaften, welche je nach Anforderung der Anwendung ausgewählt werden können. Methacrylatbasierte stationäre Phasen stellen eine wichtige Weiterentwicklung dar, welche durch ihre Vielseitigkeit und chemische Robustheit zahlreiche Vorteile bieten. Ein tiefes Verständnis der Eigenschaften und Synthesemethoden dieser Materialien ist entscheidend für die Optimierung von Trennprozessen und die Entwicklung neuer Anwendungen in der analytischen und präparativen Chromatographie.

### 2.1.3. Massentransfer in der Chromatographie

Die Adsorption von Zielmolekülen an die Oberfläche stationärer Phasen ist ein zentraler Mechanismus, welcher die Effizienz und Trennleistung in der Chromatographie wesentlich beeinflusst. Ein ebenso wichtiger Faktor ist jedoch auch der Transport von in der mobilen Phase gelösten Molekülen zur stationären Phase und wieder zurück. Dieser Vorgang wird als Massentransfer bezeichnet. [4]

Wenn ein Molekül in das Zwischenkornvolumen einer Trennsäule aufgegeben wird, muss es zunächst zu den Adsorbenspartikeln gelangen. Dieser Prozess wird maßgeblich durch die Konvektion in der Säule beeinflusst. Höhere Strömungsgeschwindigkeiten der mobilen Phase im Zwischenkornvolumen können den Massentransfer verbessern, da eine höhere Flussrate die Zielmoleküle schneller zur stationären Phase transportiert. Allerdings kann eine zu hohe Flussrate die Trennungseffizienz ebenso beeinträchtigen, da die Moleküle weniger Zeit haben, in die Partikelporen zu diffundieren [18]. Neben der Konvektion wird die Bewegung der Moleküle im Zwischenkornvolumen auch durch Diffusionsvorgänge beeinflusst. Hier wird zwischen der axialen Dispersion und der radialen Dispersion unterschieden [58]. Die axiale Dispersion beschreibt die Diffusion der Zielmoleküle entlang der Strömungsrichtung, während sich die radiale Dispersion auf die Diffusion der Zielmoleküle senkrecht zur Strömungsrichtung bezieht.

Gelangt ein Molekül zu einem Partikel der stationären Phase, kann der Massentransfer hier in mehrere Schritte unterteilt werden, welche jeweils zur Verweilzeitverteilung in der Säule beitragen. Die Partikel der stationären Phase sind von einem unbewegten Flüssigkeitsfilm, der sogenannten Grenzschicht, umgeben. Der Weg durch die Grenzschicht und in die Pore stellt die Schritte zwei und drei des Massentransports zur Partikeloberfläche dar.

Diese sind in der Regel die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte. Hierbei hängt die Diffusionsgeschwindigkeit sowohl von der Größe und Form der Moleküle als auch von der Viskosität der mobilen Phase ab. Kleinere Moleküle diffundieren schneller als größere, was zu einer effizienteren Trennung führen kann. Zusätzlich wird dieser Transportprozess von der Porenstruktur der stationären Phase beeinflusst. Die Porengröße bestimmt, bis zu welcher Größe Moleküle in die Poren eindringen können. Größere Moleküle, welche diesen Grenzwert überschreiten, haben nur einen begrenzten Zugang zur Adsorptionsoberfläche. Die Porenform und das Porenvolumen beeinflussen zusätzlich die Zeit, welche ein Molekül benötigt, um in die Pore zu diffundieren und diese wieder zu verlassen. Dieser Vorgang wird auch als intrapartikuläre Diffusion oder Porendiffusion bezeichnet. Erst wenn ein Molekül nach diesem letzten Schritt an der Porenoberfläche angekommen, kann es zu Adsorption kommen. [4, 18, 59]

Zusammenfassend wird der Massentransfer in der Chromatographie durch mehrere Faktoren beeinflusst, darunter Konvektion, axiale und radiale Dispersion sowie der Porendiffusion in der stationären Phase. Das Verständnis dieser Prozesse ist entscheidend für die Optimierung der Trennleistung und Effizienz chromatographischer Verfahren.

#### 2.1.4. Grundlagen der Adsorption

Die Adsorption von Molekülen an Adsorbensoberflächen ist ein dynamischer Gleichgewichtsprozess, bei dem Moleküle von der mobilen Phase auf die Oberfläche der stationären Phase übergehen und umgekehrt. Dieses Gleichgewicht wird durch die Wechselwirkungen zwischen den Molekülen und den Adsorptionsstellen auf der Oberfläche sowie die Konzentration der Moleküle in der mobilen Phase bestimmt [60]. Im dynamischen Gleichgewicht besteht eine Balance zwischen der Adsorption von Molekülen auf die Oberfläche und der Desorption von der Oberfläche zurück in die mobile Phase [61]. Diese Prozesse können durch die folgenden Reaktionsgleichungen beschrieben werden [62]:



wobei  $M$  das freie Molekül in Lösung,  $A$  eine freie Adsorptionsstelle und  $MA$  das adsorbierte Molekül an einer Adsorptionsstelle darstellt. Die Geschwindigkeiten der Adsorption ( $r_{\text{ads}}$ ) und Desorption ( $r_{\text{des}}$ ) können als Funktion der Aktivitäten der freien Moleküle in Lösung ( $\alpha_M$ ) sowie der freien ( $\alpha_A$ ) und belegten Adsorptionsstellen ( $\alpha_{MA}$ ) beschrieben werden [63]:

$$r_{\text{ads}} = k_{\text{ads}} \cdot \alpha_M \cdot \alpha_A \quad (2.3)$$

$$r_{\text{des}} = -k_{\text{des}} \cdot \alpha_{MA} \quad (2.4)$$

wobei  $k_{\text{ads}}$  und  $k_{\text{des}}$  die Geschwindigkeitskonstanten der Adsorption und Desorption darstellen. Die Nettoadsorptionsrate kann als die Summe zwischen Adsorptions- und Desorp-



tionsgeschwindigkeit geschrieben werden [62, 63]:

$$\frac{d\alpha_{MA}}{dt} = k_{ads} \cdot \alpha_M \cdot \alpha_A - k_{des} \cdot \alpha_{MA} \quad (2.5)$$

Die Aktivität der freien Adsorptionsstellen kann durch die Aktivität der Gesamtzahl an Adsorptionsstellen  $\alpha_{MA,max}$  und die Aktivität der besetzten Adsorptionsstellen beschrieben werden:

$$\alpha_A = \alpha_{MA,max} - \alpha_{MA} \quad (2.6)$$

Durch Einsetzen von Formel 2.6 in Formel 2.5 ergibt sich:

$$\frac{d\alpha_M}{dt} = k_{ads} \cdot \alpha_M \cdot (\alpha_{MA,max} - \alpha_{MA}) - k_{des} \cdot \alpha_{MA} \quad (2.7)$$

Sobald sich das Gleichgewicht zwischen der Aktivität der adsorbierten Moleküle und der Moleküle in der mobilen Phase eingestellt hat, ist die Nettoadsorptionsrate gleich Null. Somit gilt [64]:

$$k_{ads} \cdot \alpha_M \cdot (\alpha_{MA,max} - \alpha_{MA}) = k_{des} \cdot \alpha_{MA} \quad (2.8)$$

Die Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}$  wird definiert durch das Verhältnis der Adsorptions- und Desorptionsgeschwindigkeiten im Gleichgewicht [65]:

$$K_{eq} = \frac{k_{ads}}{k_{des}} \quad (2.9)$$

Da der Bedeckungsgrad  $\theta$  der Anteil der besetzten Adsorptionsstellen ist, gilt:

$$\theta = \frac{\alpha_{MA}}{\alpha_{MA,max}} \quad (2.10)$$

Durch Einsetzen von Formel 2.9 und Formel 2.10 in Formel 2.8 und Umformen ergibt sich folgende Formel für den Bedeckungsgrad:

$$\theta = \frac{K_{eq} \cdot \alpha_M}{1 + K_{eq} \cdot \alpha_M} \quad (2.11)$$

Diese Gleichung ähnelt der Langmuir-Isotherme. Dieses Isothermenmodell wurde ursprünglich von Irving Langmuir zur Beschreibung der Adsorption von Gasmolekülen an Aktivkohle mathematisch hergeleitet [66]. Traditionell wird das Modell ebenso erfolgreich für die Adsorption von in Flüssigkeit gelösten Stoffen an Festkörpern, wie in der Chromatographie, eingesetzt [67]. Um seine Anwendbarkeit sicherstellen, müssen mehrere grundlegende Annahmen erfüllt sein. Erstens wird angenommen, dass die Adsorption ausschließlich in einer einzigen Schicht auf der Oberfläche stattfindet, wobei jedes Molekül nur an eine Bindestelle des Adsorbens binden kann. Zweitens geht das Modell von einer homogenen Adsorbensoberfläche aus, was bedeutet, dass alle Bindestellen energetisch gleichwertig sind und die gleiche Affinität für die adsorbierten Moleküle aufweisen. Drittens wird ange-

nommen, dass keine Wechselwirkungen zwischen den adsorbierten Molekülen existieren, sodass die Anwesenheit eines Moleküls an einer Bindungsstelle die Adsorption anderer Moleküle an benachbarten Bindungsstellen nicht beeinflusst. Diese Annahmen ermöglichen eine einfache mathematische Beschreibung der Adsorptionsprozesse, obwohl in der Praxis oft Abweichungen auftreten können. Mathematisch wird die Langmuir-Isotherme durch folgende Formel ausgedrückt [66, 67]:

$$q^* = q_{\max} \cdot \frac{K_L \cdot c^*}{1 + K_L \cdot c^*} \quad (2.12)$$

Hierbei ist  $q^*$  die Gleichgewichtsbeladung,  $q_{\max}$  die maximale Gleichgewichtsbeladung und  $c^*$  ist die Gleichgewichtskonzentration der Zielmoleküle in der mobilen Phase.  $K_L$  ist die Langmuir-Konstante, welche die Affinität der adsorbierenden Moleküle zu den Adsorptionsstellen beschreibt. Ein hoher Wert von  $K_L$  deutet auf eine hohe Affinität eines Moleküles zur Adsorptionsoberfläche hin, welches somit stark adsorbiert [64].

Die Langmuir-Isotherme beschreibt somit, wie die Beladung eines Adsorbens im Gleichgewicht von der Konzentration des Zielmoleküls in der mobilen Phase abhängt und wie die Sättigung der Oberfläche bei hohen Konzentrationen erreicht wird [68]. Abbildung 2.4 zeigt den typischen Verlauf einer Langmuir-Isotherme. Auf der x-Achse ist  $c^*$  und auf der y-Achse  $q^*$  dargestellt. Der Verlauf der Kurve zeigt zunächst einen steilen Anstieg der Beladung bei niedrigen Konzentrationen, gefolgt von einer Plateauphase bei höheren Konzentrationen. Dieses Plateau repräsentiert  $q_{\max}$ , bei der alle verfügbaren Adsorptionsstellen besetzt sind und keine weitere Adsorption stattfinden kann.  $K_L$  kann ebenfalls aus dem Langmuirplot abgelesen werden. Bei halbmaximaler Maximalbeladung ( $\frac{q_{\max}}{2}$ ) entspricht die Gleichgewichtskonzentration  $K_L^{-1}$ .

Der Bedeckungsgrad kann auch beschrieben werden als [64]:

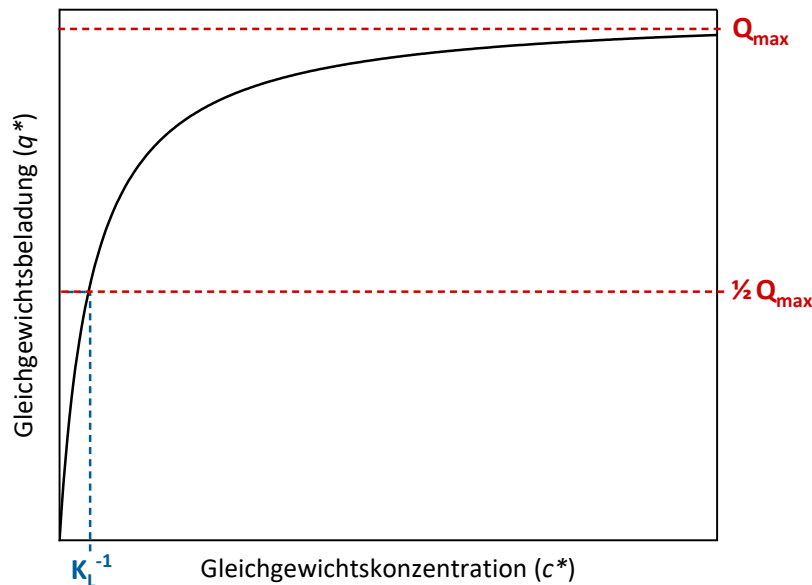
$$\theta = \frac{q^*}{q_{\max}} \quad (2.13)$$

Desweiteren wird die Aktivität in Flüssigkeit gelöster Stoffe wie folgt definiert [64, 69]:

$$\alpha_M = \gamma_a \cdot \frac{c^*}{c_R} \quad (2.14)$$

hierbei ist  $\gamma_a$  der Aktivitätskoeffizient und  $c_R$  der Referenzzustand, welcher zur Normierung der Aktivität verwendet wird. Üblicherweise wird  $c_R$  als die Standardkonzentration von 1 mol/L definiert. Durch Einsetzen von Formel 2.13 und Formel 2.14 in Formel 2.12 und Vergleich mit Formel 2.11 lässt sich folgender Zusammenhang zwischen der Langmuir-Konstante und der Gleichgewichtskonstante ermitteln [64]:

$$K_{eq} = K_L \cdot \frac{c_R}{\gamma} \quad (2.15)$$



**Abbildung 2.4.:** Graphischer Verlauf der Langmuir-Isotherme - Die x-Achse zeigt die Gleichgewichtskonzentration des Zielmoleküls in der mobilen Phase, während die y-Achse die Gleichgewichtsbeladung darstellt. Das Plateau der Kurve repräsentiert die maximale Beladung. Bei halbmaximaler Gleichgewichtsbeladung kann das Reziproke der Langmuirkonstante abgelesen werden.

Dieser mathematischen Herleitung zugrundeliegend postulierten Ghosal und Gupta, dass  $K_L$  und  $K_{eq}$  numerisch gleich sein können. Denn für nicht-ionische Spezies oder ionische Substanzen in verdünnter Lösungen ist  $\gamma$  gleich eins. Nimmt die Konzentration des ionischen gelösten Stoffes zu, unterscheidet sich die Aktivität jedoch von der molaren Konzentration. Wenn die Lösung mehrere unterschiedliche ionische Spezies enthält, kann die Aktivität maßgeblich beeinflusst werden, was zu Werteunterschieden von  $K_L$  und  $K_{eq}$  führt. [64]

Zusammenfassend ist Adsorption ein dynamischer Gleichgewichtsprozess, welcher durch Wechselwirkungen zwischen Molekülen und Adsorptionsstellen sowie durch die Konzentration der Moleküle in der mobilen Phase bestimmt wird. Die Langmuir-Isotherme beschreibt dieses Gleichgewicht und gibt Aufschluss über die maximale Beladung und die Affinität der Moleküle zur Adsorptionsoberfläche. Zusätzlich besteht eine numerische Gleichheit zwischen der Langmuir-Konstante und der Gleichgewichtskonstante der Adsorption, jedoch lediglich für nicht-ionische Spezies oder ionische Substanzen in verdünnter Lösungen.

Im Gegensatz zu dieser kinetischen Beschreibung kann die Adsorption auch thermodynamisch betrachtet werden. Die thermodynamischen Grundlagen der Adsorption sind vor allem entscheidend, um die Bindeenergien und Gleichgewichtszustände zu verstehen, welche bei der Adsorption von Molekülen auf Oberflächen auftreten [70]. Eine wichtige thermodynamische Größe ist die Gibbs'sche freie Energie ( $\Delta G$ ), welche den Energieunterschied zwischen dem adsorbierten und dem nicht-adsorbierten Zustand eines Systems beschreibt [71].  $\Delta G$  kann verwendet werden, um die Spontaneität des Adsorptionspro-

zesses zu bestimmen und kann wie folgt berechnet werden [62]

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (2.16)$$

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K_{\text{eq}} \quad (2.17)$$

Hierbei ist  $\Delta H$  die Enthalpieänderung,  $\Delta S$  die Entropieänderung,  $R$  die universelle Gaskonstante und  $T$  die Temperatur. Negative und positive Werte von  $\Delta G$  spiegeln jeweils den spontanen beziehungsweise nicht-spontanen Adsorptionsprozess wider. Somit hängt die thermodynamische Durchführbarkeit einer Reaktion letztendlich von  $\Delta G$  ab. Die korrekte Schätzung dieses thermodynamischen Parameters ist also entscheidend für die Beschreibung des Adsorptionsprozesses. [72]

Die zur Berechnung von  $\Delta G$  benötigten thermodynamischen Parameter können mittels der van't Hoff Gleichung bestimmt werden [73]

$$\ln K_{\text{eq}} = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (2.18)$$

Durch die Darstellung von  $\ln K_{\text{eq}}$  gegen  $\frac{1}{T}$  kann  $\Delta H$  aus der Steigung der resultierenden Gerade bestimmt werden, und  $\Delta S$  kann aus dem Achsenabschnitt abgeleitet werden.

$\Delta H$  gibt die Wärmemenge an, welche bei der Adsorption freigesetzt oder aufgenommen wird. Ein negativer Wert deutet auf einen exothermen Prozess hin, bei dem Wärme freigesetzt wird, was oft auf eine starke Bindung zwischen den Adsorbat und Adsorptionsstellen hinweist. Ein positiver Wert von  $\Delta H$  zeigt einen endothermen Prozess an, bei dem Wärme aufgenommen wird, was auf schwächere Wechselwirkungen hinweist. [64]

$\Delta S$  ist ein Maß für die Änderung der Unordnung im System während der Adsorption. Eine positive Entropieänderung bedeutet, dass die Unordnung im System zunimmt, was häufig bei der Freisetzung von Lösungsmittelmolekülen von der Oberfläche auftritt. Eine negative Entropieänderung deutet darauf hin, dass die Unordnung abnimmt, was bei der Ordnung der Adsorbatmoleküle auf der Oberfläche der Fall sein kann. [74]

Zusammenfassend bietet die Thermodynamik Einblicke in die Energieänderungen und Gleichgewichtszustände, welche während der Adsorption auftreten. Die Gibbs'sche freie Energie, die Enthalpie und die Entropie sind wesentliche Parameter, welche die Spontaneität und das Verhalten des Adsorptionsprozesses bestimmen.

### 2.1.5. Hochdurchsatz-Screening und Prozessentwicklung

In der modernen Biotechnologie spielen Hochdurchsatz-Screenings (engl.: *High-Throughput-Screening* (HTS)) und Prozessmodellierung eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Optimierung von Prozessen. Diese fortschrittlichen Technologien haben die Anzahl notwendiger Experimente erheblich reduziert und somit auch die Kosten gesenkt [75]. Um

jedoch präzise und verlässliche Modelle zu erstellen, ist eine solide Datengrundlage unerlässlich [76]. Hierfür kann HTS genutzt werden, um täglich Tausende von Datenpunkten zu generieren.

HTS wurde ursprünglich in der pharmazeutischen Industrie zur Wirkstoffentdeckung entwickelt [77]. Mit der Zeit wurde klar, dass die Entdeckungsrate neuer Wirkstoffe trotz steigender Investitionen in Forschung und Entwicklung zurückging [78]. Um diesem Trend entgegenzuwirken, wurden Methoden entwickelt, welche große Mengen an chemischen Verbindungen gegen biologische Zielmoleküle testen konnten. Diese Methoden basieren auf Prinzipien wie Miniaturisierung, Parallelisierung, Automatisierung und umfassender Datenanalyse [77]. Regulatorische Initiativen und der hohe Wettbewerbsdruck in der Pharmaindustrie haben die Weiterentwicklung und Verbreitung von HTS zusätzlich beschleunigt.

Ein wesentlicher Vorteil von HTS ist die Fähigkeit, den Materialbedarf und die damit verbundenen Kosten zu reduzieren. Traditionell war die Prozessentwicklung durch hohe Materialkosten und die Anzahl möglicher Experimente begrenzt. Dank der Miniaturisierung und Parallelisierung können nun mehr Experimente in kürzerer Zeit durchgeführt werden, wodurch ein breiteres Spektrum an Bedingungen getestet werden kann. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, optimale Betriebsbedingungen zu finden und robuste Arbeitsbereiche zu etablieren [79].

Die Miniaturisierung in der Biotechnologie hat sich von Milliliter-Maßstäben in Proberöhrchen hin zu Mikrotiterplatten und Chip-Technologien entwickelt [80]. Mikrotiterplatten waren ein bedeutender Schritt in Richtung HTS, da sie die parallele Verarbeitung vieler Proben auf einer kleinen Fläche ermöglichen. Anfangs hatten diese Platten 96 Wells mit jeweils 100-200 Mikroliter Arbeitsvolumen. Die zunehmende Verwendung von Pipettierrobotern führte zu einer erneuten Erhöhung der Probendichte mit Platten mit bis zu 384 Wells und einem Volumen von nur 1-2 Mikrolitern. Diese Entwicklung hat die Kosten für Probenmaterialien erheblich gesenkt und die benötigte Zeit für Experimente verkürzt.

Die Automatisierung hat zusätzliche signifikante Fortschritte ermöglicht. Pipettierroboter (engl. *Liquid Handling Station* (LHS)) können standardisierte Experimente im Mikroliter-Maßstab schnell und präzise durchführen. Dies minimiert nicht nur menschliche Fehler, sondern erhöht ebenso die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse [78]. Roboter übernehmen zudem Aufgaben wie den Transfer von Mikrotiterplatten zu Analysegeräten. UV/VIS-Plattenleser können automatisierte Absorptionsmessungen durchführen, und durch die Integration von Datenverarbeitungsprogrammen kann die Analyse und Entscheidungsfindung vereinfacht werden [79]. Dies ermöglicht die vollständige Automatisierung und Auswertung komplexer Arbeitsabläufe im Labor.

Ein kostenintensiver Bereich in der pharmazeutischen Produktion ist die chromatographische Aufarbeitung [79]. Hier sind HTS-Methoden nützlich, da sie die Effizienz und

Effektivität der Trennprozesse verbessern können. Für ein erstes Screening in der frühen Phase der Prozessentwicklung werden häufig 96-Well Filterplatten für chargenweise Inkubationschromatographieexperimente verwendet [81]. Hierbei werden die Wells der Platten zu Beginn der Versuche mit einer definierten Menge an Chromatographieharz gefüllt. Der Boden der Wells besteht aus einem Filtern, welcher Flüssigkeiten zunächst zurückhält. Wird an der Unterseite der Platte jedoch ein Unterdruck angelegt, oder werden die Platten in eine Zentrifuge gestellt, passiert die Flüssigkeit die Filter und wird aus den Wells gezogen [82]. Da das Chromatographieharz die Filter nicht passieren kann, verbleibt es in den Wells. Diese Technik ist besonders nützlich für die schnelle Charakterisierung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen und die Optimierung von Aufreinigungsprozessen in der biopharmazeutischen Industrie.

Eine weitere Hochdurchsatzmethode in der Chromatographie sind sogenannte Robocolumns. Diese sind kleine Chromatographiesäulen mit Volumina von 50 bis 600 Mikrolitern und wurden entwickelt um von LHSs betrieben zu werden. Somit wird eine automatisierte und parallele Durchführung von Säulenexperimente ermöglicht. Ein entscheidender Vorteil zu Filterplatten ist hierbei, dass ebenfalls säulenspezifische Prozessparameter, wie Flussraten, untersucht werden können. Zu den Nachteilen von Robocolumns zählen die vergleichsweise hohen Investitionskosten, da die Säulen lediglich bereits gepackt gekauft werden können. [11]

Zusammenfassend haben Hochdurchsatz-Screenings die biotechnologische Prozessentwicklung revolutioniert. Diese Technologien ermöglichen Kostensenkungen, schnelle Prozessoptimierung und eine einhergehende Effizienzsteigerung bei gleichzeitiger Reduzierung von Personalkosten. Zudem können große Mengen experimentelle Daten in kurzer Zeit aufgenommen werden, was für die Validierung und das Training von Modellen vorteilhaft ist.

#### **2.1.6. Modellierung in der Chromatographie**

Die Bestimmung idealer Binde- und Elutionsbedingungen für Biomoleküle stellt in der Prozessentwicklung eine komplexe Herausforderung dar. Diese Komplexität wird durch die begrenzte Verfügbarkeit und die hohen Kosten von Produktproben in den frühen Phasen der Arzneimittelentwicklung noch verschärft, da umfangreiche empirische Untersuchungen nicht möglich sind. [11].

Um diese Herausforderungen zu bewältigen, haben sich computergestützte Modellierungsmethoden als nützlich erwiesen. Seit der Mitte des 20. Jahrhunderts wurden grundlegende empirische Modelle entwickelt, welche das Verständnis der Kinetik und Thermodynamik chromatographischer Prozesse ermöglichten [83, 84, 85]. Diese frühen Modelle wurden zu fortschrittlicheren mechanistischen Modellen weiterentwickelt, welche auf physikalischen und chemischen Prinzipien basieren und ein tieferes Verständnis der chromatographischen Prozesse boten [86, 87]. Ein wichtiger Fortschritt in diesem Bereich war die

Entwicklung neuer Isothermen, wie der SMA-Isotherme für die Ionenaustauschchromatographie [88]. Ebenso wurde das Adsorptionsverhalten in der MMC durch die Integration elektrostatischer und hydrophober Wechselwirkungen in den Isothermengleichungen besser beschrieben [9, 89, 90]. Mechanistische Modelle ermöglichen eine genaue Vorhersage des Chromatogramms und bieten zusätzlich einen detaillierteren Einblick in den chromatographischen Prozesses.

Quantitative Struktur-Eigenschafts-Beziehungen (engl. *Quantitative Structure-Property Relationships* (QSPR)) und Quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen *Quantitative Structure-Activity Relationships* (QSAR)) etablierten sich in den späten 1970er und frühen 1980er Jahren als weitere bedeutende Modellierungsansätze [91]. Ursprünglich basierten diese Modelle auf einfachen Korrelationen zwischen molekularen Deskriptoren und chromatographischen Ergebnissen. Heutzutage umfassen sie eine breite Palette von Deskriptoren und nutzen komplexe statistische Methoden, einschließlich maschinellen Lernens [92, 93]. Besonders in der MMC ermöglichten diese Modelle, das Verhalten von komplexen Molekülen, wie Proteinen, unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen präzise vorherzusagen [94].

Mit dem Beginn der 2000er Jahre fanden molekulare Simulationen Einzug in die Chromatographie [12, 13, 95, 14, 96]. Fortschritte in der Rechenleistung und in den Algorithmen erlaubten detaillierte und genaue Simulationen, welche Einblicke in die molekularen Wechselwirkungen innerhalb chromatographischer Systeme boten [14]. Im Gegensatz zu QSPR und QSAR Ansätzen wurde hierbei die Bindeenergie zwischen den Zielmolekülen und der stationären Phase direkt berechnet. Diese Simulationen erwiesen sich als äußerst vielversprechend, insbesondere für die Vorhersage des Binde- und Elutionsverhaltens von Peptiden und Proteinen in der Ionenaustausch- [12, 14, 10] und der multimodalen Chromatographie [95, 96].

Zusammenfassend brachten die Fortschritte in der Modellierung der Chromatographie bereits bedeutende Verbesserungen im Verständnis und in der Effizienz der Trennmethode. Zusätzlich bieten sie wertvolle Einblicke, welche zur Optimierung und Beschleunigung der biotechnologischen Forschung und Prozessentwicklung beitragen. Die zukünftige Weiterentwicklung dieser Methoden verspricht die Innovationskraft und Wettbewerbsfähigkeit der Branche weiter zu stärken und könnte sich als entscheidend erweisen, um den wachsenden Anforderungen und den Wettbewerbsdruck in der Biotechnologie und Pharmaindustrie gerecht zu werden.

## 2.2. Grundlagen molekularer Simulationen

Molekulare Simulationen sind computerbasierte Methoden zur Modellierung und Vorhersage des Verhaltens von Atomen und Molekülen in verschiedenen Systemen. Sie ermöglichen Einblicke in dynamische Prozesse auf molekularer Ebene, welche experimentell oft nur schwer zugänglich sind [97]. Basierend auf physikalischen Modellen und mathematischen Algorithmen beschreiben diese Techniken die Wechselwirkungen zwischen den Teilchen eines Systems. Durch die Simulation von Atombewegungen und Molekülwechselwirkungen erlauben molekulare Simulationen das Studium der Struktur und Dynamik chemischer und biologischer Systeme [98].

Die Geschichte der molekularen Simulationen begann in den 1950er-Jahren, als die ersten computerbasierten Modelle entwickelt wurden. Anfangs waren diese Modelle auf einfache Systeme beschränkt, da die Rechenleistung der Computer zu jener Zeit sehr begrenzt war. Ein Meilenstein war die Einführung der Monte-Carlo-Methode und der Molekulardynamik-(MD)-Simulationen, welche es ermöglichten, das Verhalten von Flüssigkeiten und Gasen auf atomarer Ebene zu untersuchen [99]. Die Monte-Carlo-Methode, ursprünglich für Probleme der statistischen Physik entwickelt, wurde an die Bedürfnisse der Chemie angepasst, um Gleichgewichtseigenschaften von Molekülsystemen zu berechnen [100]. Molekulardynamik-Simulationen, welche auf den Bewegungsgleichungen von Newton basieren, ermöglichten es, die zeitliche Entwicklung von Systemen zu verfolgen und dynamische Prozesse zu untersuchen [101].

In den folgenden Jahrzehnten wurden die Methoden und Algorithmen der molekularen Simulationen kontinuierlich weiterentwickelt. Die Einführung leistungsfähigerer Computer und paralleler Rechenarchitekturen ermöglichte die Simulation größerer Systeme über längere Zeiträume. Mitte der 1980er-Jahre wurden die ersten kommerziellen Softwarepakete für molekulare Simulationen entwickelt, welche den Zugang zu diesen Techniken erleichterten. Mit der Entwicklung fortschrittlicher Kraftfelder, welche die Wechselwirkungen zwischen Atomen genauer beschreiben, konnten realistischere Modelle von Biomolekülen und Materialien erstellt werden [102, 103, 104].

Heute sind molekulare Simulationen in vielen Bereichen der Wissenschaft und Technik weit verbreitet. In der Chemie und Biochemie werden sie eingesetzt, um die Struktur und Funktion von Proteinen, Nukleinsäuren und anderen Biomolekülen zu verstehen [17]. Sie helfen dabei, die Mechanismen von enzymatischen Reaktionen, Protein-Ligand-Wechselwirkungen und den Einfluss von Mutationen auf die Molekülstruktur zu untersuchen. In der Materialwissenschaft ermöglichen molekulare Simulationen die Vorhersage der Eigenschaften neuer Materialien, die Optimierung von Katalysatoren und die Untersuchung von Oberflächenprozessen. Auch in der Pharmazie und Nanotechnologie finden molekulare Simulationen eine breite Anwendung.

Mit den Fortschritten in der Hardware und der Entwicklung neuer Algorithmen hat sich



das Spektrum der molekularen Simulationen zunehmend erweitert. *High-Performance Computing* und die Verwendung von GPU-Beschleunigung ermöglichen die Simulation großer biomolekularer Komplexe und die Durchführung langer Simulationsläufe. Methoden wie die Freie-Energie-Berechnungen, die Dichtefunktionaltheorie (DFT) und hybride Quantenmechanik/Molekulardynamik-Simulationen bieten tiefe Einblicke in chemische Reaktionen und molekulare Mechanismen [98].

Im folgenden Kapitel werden die Grundlagen der Molekularmechanik und Molekulardynamik näher erläutert. Darauf aufbauend werden Einführungen in Coarse-Grained Simulationen und die Quantenmechanik gegeben. Abschließend werden gängige Methoden zur Berechnung der freien Gibbs-Energie präsentiert.

### 2.2.1. Molekularmechanische Simulationen

Die Molekulare Mechanik (MM) stellt eine grundlegende Methode dar, um die Struktur und Energie von Molekülen mithilfe von Computersimulationen auf Basis klassischer physikalischer Prinzipien zu modellieren und vorherzusagen. Anstelle der in quantenmechanischen Methoden detailliert beschriebenen Elektronenverteilungen verwendet die Molekulare Mechanik eine vereinfachte Darstellung, bei der Atome als Kugeln und Bindungen als Federn modelliert werden [105]. Diese Herangehensweise ermöglicht es, die potenzielle Energie eines Systems zu berechnen und durch deren Minimierung die Konformation von Molekülen zu untersuchen [106].

In molekularen Simulationen wird die potenzielle Energie eines Moleküls durch ein Kraftfeld, welches aus verschiedenen Energiebeiträgen besteht, beschrieben. Ein typisches Kraftfeld umfasst Komponenten wie Bindungsstreckung, Bindungswinkelbiegung, Torsionswinkel und nicht-bindende Wechselwirkungen [103]. Die Energieänderung durch die Dehnung oder Stauchung einer Bindung wird als harmonischer Oszillator modelliert, wobei die Bindungsenergie ( $E_{\text{Bindung}}$ ) durch die Gleichung 2.19 definiert wird [106]. Hierbei ist  $k_b$  die Kraftkonstante der Bindung,  $r_b$  die aktuelle Bindungslänge und  $r_{b,0}$  die Gleichgewichtsbindungs-länge.

$$E_{\text{Bindung}} = k_b(r_b - r_{b,0})^2 \quad (2.19)$$

Die Energieänderung durch die Änderung der Winkelenergie ( $E_{\text{Winkel}}$ ) wird ebenfalls als harmonischer Oszillator modelliert (Gleichung 2.20), wobei  $k_\theta$  die Kraftkonstante des Winkels,  $\theta_b$  der aktuelle Bindungswinkel und  $\theta_{b,0}$  der Gleichgewichtsbindungs-winkel sind.

$$E_{\text{Winkel}} = k_\theta(\theta_b - \theta_{b,0})^2 \quad (2.20)$$

Die Energieänderung durch die Drehung um eine Bindung wird durch eine periodische Funktion beschrieben. Die Torsionsenergie ( $E_T$ ) hängt von der Amplitude ( $V_n$ ), der

Periodizität ( $n$ ), dem Torsionswinkel ( $\phi$ ) und der Phasenverschiebung ( $\gamma$ ) ab. Dabei bestimmt  $V_n$  die Höhe der Energiebarriere, welche überwunden werden muss, wenn das Molekül von einer bevorzugten Konformation zur nächsten wechselt. Je größer  $V_n$ , desto höher ist die Energiebarriere für die Rotation um die Bindung. Der Parameter  $n$  gibt die Anzahl der bevorzugten Konformationen innerhalb einer vollständigen 360-Grad-Drehung an. Ein Wert von  $n = 2$  bedeutet beispielsweise, dass es zwei bevorzugte Konformation gibt.  $\phi$  beschreibt den aktuellen Winkel zwischen den Atomen, welche durch die Drehung um die Bindung verbunden sind.  $\gamma$  bestimmt, bei welchem Wert von  $\phi$  die Energiebarriere ihren Höhepunkt oder ihr Minimum erreicht [105].

$$E_T = \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \quad (2.21)$$

Nicht-bindende Wechselwirkungen werden beispielsweise durch van-der-Waals-Kräfte oder elektrostatische Wechselwirkungen modelliert. Der Energiebeitrag der van-der-Waals-Kräfte ( $E_{\text{vdW}}$ ) wird typischerweise durch das Lennard-Jones-Potential beschrieben (Gleichung 2.22) [107].

$$E_{\text{vdW}} = 4\epsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r_a} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r_a} \right)^6 \right] \quad (2.22)$$

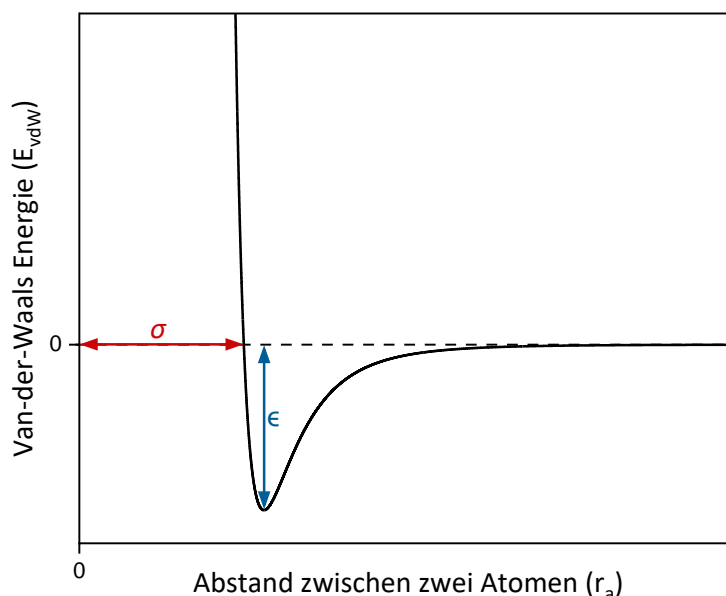
Hierbei ist  $\epsilon$  die Tiefe des Potentialminimums,  $\sigma$  der endliche Abstand, bei dem das Potential null wird, und  $r_a$  der Abstand zwischen zwei Atomen. Das Lennard-Jones-Potential zeigt somit den Verlauf der Wechselwirkungsenergie zwischen zwei ungebundenen Atomen in Abhängigkeit ihres Abstands. In Abbildung 2.5 ist das Potential graphisch dargestellt, wobei auf der x-Achse der Abstand zwischen zwei Atomen und auf der y-Achse die van-der-Waals-Energie nach Lennard-Jones aufgetragen ist. Die Parameter  $\sigma$  und  $\epsilon$  sind ebenfalls im Diagramm eingezeichnet. Bei sehr kleinen Abständen steigt die Energie aufgrund starker abstoßender Kräfte steil an. Mit zunehmendem Abstand sinkt die Energie und erreicht ein Minimum bei  $r_a = \sigma$ , welches durch  $\epsilon$  bestimmt wird. Bei großen Abständen nähert sich die Energie null an, da die anziehenden van-der-Waals-Kräfte schwächer werden.

Elektrostatische Wechselwirkungen werden häufig durch die Anwendung des Coulomb'schen Gesetzes modelliert. Die Coulomb'sche Energie ( $E_{\text{Coul}}$ ) ist definiert als [108]:

$$E_{\text{Coul}} = \frac{q_{p,i} q_{p,j}}{4\pi\epsilon_0 r_a} \quad (2.23)$$

wobei  $q_{p,i}$  und  $q_{p,j}$  die Partialladungen der Atome sind und  $\epsilon_0$  die elektrische Feldkonstante [106].

Die Konstanten der Terme für die Teilenergien in den Kraftfeldern stammen aus verschiedenen Quellen. Experimentelle Daten wie Röntgenkristallstrukturanalysen, Infrarotspektroskopie und Kernspinresonanz liefern direkte Informationen über die geometrischen und



**Abbildung 2.5.:** Verlauf des Lennard-Jones-Potentials - Das Diagramm zeigt die van-der-Waals-Energie nach Lennard-Jones in Abhängigkeit vom Abstand zwischen zwei ungebundenen Atomen. Die Parameter  $\sigma$  und  $\epsilon$  sind im Diagramm markiert.

energetischen Eigenschaften von Molekülen [105]. Zusätzlich können quantenmechanische Methoden verwendet werden, um die Parameter zu berechnen. Einige Kraftfeldparameter werden durch empirische Anpassung an experimentelle Daten bestimmt, um die beste Übereinstimmung mit bekannten physikalischen Eigenschaften und Verhaltensweisen der Moleküle zu erzielen. Bekannte Kraftfelder wie AMBER [109], CHARMM [106] und OPLS [103] verfügen über umfangreiche Sammlungen von Parametern, welche über viele Jahre hinweg entwickelt und validiert wurden. Sie bieten standardisierte Parameter für eine Vielzahl von Molekülen und funktionellen Gruppen.

Die Gesamtenergie eines Moleküls ergibt sich als Summe aller Teilenergien der kovalenten und nicht-kovalenten Wechselwirkungen. Durch die Minimierung dieser potenziellen Energie können die stabilsten Konformationen eines Moleküls ermittelt werden. Zur Energieoptimierung werden Algorithmen wie der Gradientenabstieg, das Newton-Raphson-Verfahren oder konjugierte Gradientenmethoden eingesetzt. Diese Algorithmen suchen nach der Konformation, bei der die erste Ableitung der Energie null ist, was einem Energieminimum entspricht. Während der Gradientenabstieg die Atome in Richtung des steilsten Energieabfalls bewegt, nutzen das Newton-Raphson-Verfahren und die konjugierten Gradienten komplexere Ansätze für eine schnellere Konvergenz [110].

Die Berechnung der nicht-bindenden Wechselwirkungen ist hierbei der rechenaufwendigste Teil der Simulation. Die Anzahl der intramolekularen Wechselwirkungen ist proportional zur Anzahl der Teilchen im System. Dagegen nehmen die nicht-bindenden Wechselwirkungen mit der Ordnung  $N^2$  zu, da jedes Teilchenpaar im System berücksichtigt werden muss. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, eine Cutoff-Distanz zu definieren, ab welcher

bestimmte Wechselwirkungen vernachlässigbar sind. Beispielsweise wird häufig ein Cutoff von  $2,5\sigma$  bei der Lennard-Jones-Wechselwirkung angewendet [110]. Die Cutoff-Strategie führt jedoch zu Diskontinuitäten in der potenziellen Energie, weshalb Verschiebungsfunktionen implementiert werden müssen, um eine kontinuierliche Gesamtenergie zu gewährleisten [105].

Die molekulare Mechanik stellt somit eine effektive Methode dar, um die Struktur und Energie von Molekülen zu modellieren und vorherzusagen. Durch den Einsatz von Kraftfeldern und Energieoptimierungsverfahren lassen sich die stabilsten Konformationen sowie die dynamischen Eigenschaften von Molekülen erforschen. Dies ermöglicht detaillierte Einblicke in die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Molekülen und Materialien.

### 2.2.2. Molekulardynamische Simulationen

Die Molekulardynamik (MD) ist eine Simulationsmethode zur Untersuchung der zeitlichen Evolution von atomaren Systemen. Im Gegensatz zur MM, welche statische Eigenschaften untersucht, ermöglicht die MD die Untersuchung dynamischer Prozesse, indem sie die unter Einwirkung von Kräften resultierenden Bewegungen von Atomen simuliert. Diese Vorgehensweise basiert auf den klassischen Newtonschen Bewegungsgleichungen und verwendet Kraftfelder, um die Kräfte zwischen den Atomen zu berechnen [100, 101]. Somit können MD-Simulationen detaillierte Informationen über die Struktur und Dynamik eines Systems liefern und finden breite Anwendung in der Chemie, Biophysik und Materialwissenschaft [104].

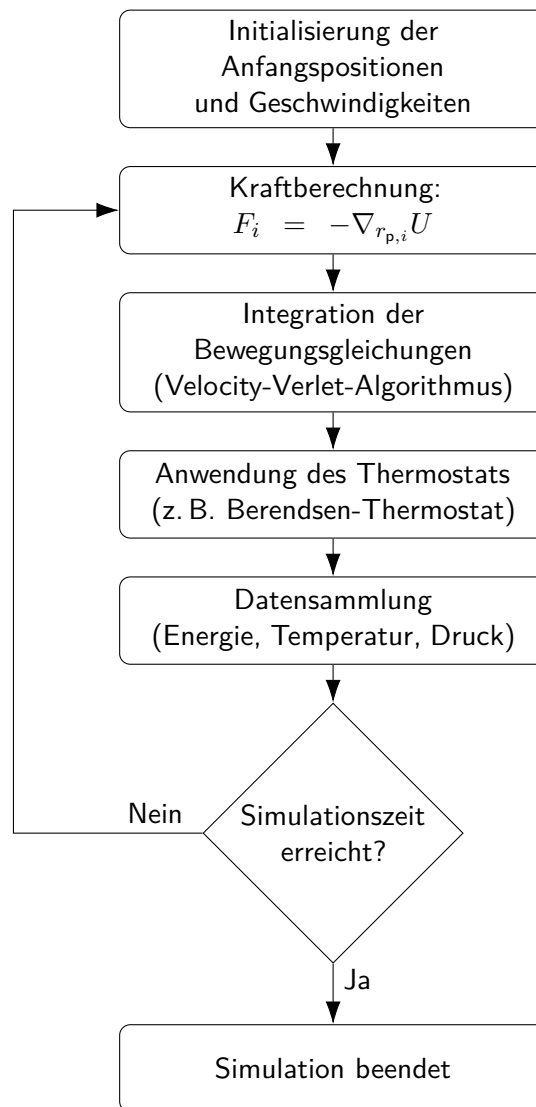
Abbildung 2.6 bietet eine Übersicht über die iterativen Prozessschritte einer MD-Simulation. Im Folgenden werden die hierbei aufeinanderfolgenden Abläufe genauer erläutert. Der erste Schritt ist die Initialisierung der Anfangsbedingungen. Die Anfangspositionen der Atome ( $r_{p,i}(0)$ ) werden häufig aus experimentellen Strukturdaten oder vorherigen Simulationen übernommen. Die Anfangsgeschwindigkeiten ( $v_i(0)$ ) werden in der Regel gemäß der Maxwell-Boltzmann-Verteilung bei einer bestimmten Temperatur ( $T$ ) zugewiesen [98]:

$$f(v) = \left(\frac{m}{2\pi k_B T}\right)^{3/2} \exp\left(-\frac{mv^2}{2k_B T}\right) \quad (2.24)$$

wobei  $k_B$  die Boltzmann-Konstante,  $m$  die Masse des Atoms und  $v$  der Betrag der Geschwindigkeit ist.

Im nächsten Schritt erfolgt die Kraftberechnung. Die auf jedes Atom wirkende Kraft ( $F_i$ ) wird als negativer Gradient der potenziellen Energie ( $U$ ) nach der Position ( $r_{p,i}$ ) berechnet:

$$F_i = -\nabla_{r_{p,i}} U \quad (2.25)$$



**Abbildung 2.6.:** Flussdiagramm des Ablaufs einer MD-Simulation – Die aufeinanderfolgenden Schritte der Initialisierung, Kraftberechnung, Integration der Bewegungsgleichungen, Temperaturkontrolle und Datensammlung werden wiederholt, bis die gewünschte Simulationszeit erreicht ist.

Diese Kraftberechnung basiert, wie bei MM-Methoden, auf dem verwendeten Kraftfeld, welches die Wechselwirkungen zwischen den Atomen beschreibt.

Um die neuen Positionen und Geschwindigkeiten der Atome zu bestimmen, werden anschließend die Newtonschen Bewegungsgleichungen [111] numerisch integriert:

$$m_i \frac{d^2 r_{p,i}}{dt^2} = F_i \quad (2.26)$$

Hierbei ist  $m_i$  die Masse des  $i$ -ten Atoms. Ein verbreiteter Integrationsalgorithmus ist der Velocity-Verlet-Algorithmus [112, 113], welcher die neuen Positionen  $r_{p,i}(t + \Delta t)$  und Geschwindigkeiten  $v_i(t + \Delta t)$  wie folgt berechnet:

$$r_{p,i}(t + \Delta t) = r_{p,i}(t) + v_i(t)\Delta t + \frac{1}{2}a_i(t)(\Delta t)^2 \quad (2.27)$$

$$v_i(t + \Delta t) = v_i(t) + \frac{1}{2}[a_i(t) + a_i(t + \Delta t)]\Delta t \quad (2.28)$$

Hierbei ist  $a_i(t) = \frac{F_i(t)}{m_i}$  die Beschleunigung des Atoms.

Um die Temperatur des Systems regulieren zu können, wird nach der Integration ein Thermostat angewendet. Ein häufig verwendetes Thermostat ist hierbei das Berendsen-Thermostat. Dieses passt die Geschwindigkeiten der Atome an, um die Temperatur schrittweise an eine Zieltemperatur anzupassen. Dies wird durch eine Modifikation der Geschwindigkeiten erreicht [114]:

$$v_i(t) = v_i(t) \times \lambda \quad (2.29)$$

mit dem Skalierungsfaktor

$$\lambda = \sqrt{1 + \frac{\Delta t}{\tau_T} \left( \frac{T_0}{T(t)} - 1 \right)} \quad (2.30)$$

wobei  $\tau_T$  eine Zeitkonstante,  $T_0$  die Zieltemperatur und  $T(t)$  die aktuelle Temperatur ist. Das Berendsen-Thermostat sorgt für eine sanfte Annäherung an die Zieltemperatur. Jedoch kann das korrekte kanonische Ensemble hierbei nicht vollständig aufrechterhalten werden, da die Verteilung der Geschwindigkeiten nach der Maxwell-Boltzmann-Statistik gestört wird [114]. Andere Thermostate, wie der Nosé-Hoover-Thermostat, sind hingegen in der Lage, das korrekte kanonische Ensemble zu erzeugen [115, 116]. Dies wird durch eine zusätzliche Dämpfungskraft erreicht, welche proportional zu den Geschwindigkeiten der Atome ist. Diese Kraft wird den Bewegungsgleichungen hinzugefügt und wirkt wie eine Reibung, welche die Geschwindigkeiten der Atome reguliert, um die Temperatur des Systems konstant zu halten.

Während der Simulation werden physikalische Größen wie Energie, Temperatur und Druck kontinuierlich gesammelt und analysiert. Diese Datensammlung ist ein entscheidender Schritt, um das Verhalten des Systems zu überwachen und wichtige Informationen zu extrahieren. Die Gesamtenergie des Systems kann beispielsweise überprüft werden, um die Energieerhaltung zu gewährleisten und eventuelle numerische Instabilitäten zu erkennen. Die Temperatur  $T$  des Systems kann aus den kinetischen Energien der Atome berechnet werden [110, 113]:

$$T = \frac{2}{3Nk_B} \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} m_i v_i^2 \quad (2.31)$$

Der Druck kann mithilfe des Virialsatzes berechnet werden, was Informationen über mechanische Eigenschaften des Systems liefert. Die Datensammlung ermöglicht es, den Verlauf der Simulation zu analysieren, Gleichgewichtszustände zu identifizieren und physikalische Eigenschaften abzuleiten. Dieser Zyklus aus Kraftberechnung, Integration, Thermostatisierung und Datensammlung wird für jeden Zeitschritt  $\Delta t$  wiederholt, bis die gewünschte Simulationszeit erreicht ist.

Zusammenfassend können MD-Simulationen durch diesen iterativen Prozess dynamische Prozesse auf atomarer Ebene untersuchen. Dies ermöglicht die Analyse von Phänomenen wie Diffusion, Protein-Faltung, Phasenübergängen und chemischen Reaktionen. Somit können Forscher Einblicke in komplexe molekulare Systeme gewinnen, welche experimentell nur schwer zugänglich sind.

### 2.2.3. Coarse-Grained Simulationen

Coarse-Grained (CG) Simulationen stellen eine effiziente Methode dar, um große und komplexe molekulare Systeme zu untersuchen, indem sie die Anzahl der zu berücksichtigenden Freiheitsgrade reduzieren. Anstatt jedes einzelne Atom zu simulieren, wie es in AA Simulationen der Fall ist, werden in CG Modellen mehrere Atome oder funktionelle Gruppen zu Beads zusammengefasst [117]. Diese Vereinfachung ermöglicht es, längere Zeitskalen und größere Strukturen zu simulieren, welche in AA-Simulationen nicht praktikabel wären.

Der erste Schritt bei der Erstellung eines CG Modells ist das Mapping, bei dem entschieden wird, welche Atome oder Atomgruppen zu einem Bead aggregiert werden. Diese Entscheidung beeinflusst maßgeblich die Genauigkeit und Effizienz der Simulation. Nach dem Mapping folgt die Parametrisierung der Wechselwirkungspotentiale zwischen den Beads. Diese Potentiale müssen so gewählt werden, dass sie die thermodynamischen und strukturellen Eigenschaften des ursprünglichen Systems korrekt wiedergeben. [118]

Für die Simulation von Polymeren hat sich das Kremer-Grest Modell als besonders geeignet erwiesen. In diesem Ansatz werden Polymerketten durch lineare Sequenzen von Beads dargestellt, welche über ein *Finite Extensible Nonlinear Elastic* (FENE) Potential miteinander verbunden sind. Das FENE Potential ist folgendermaßen definiert:

$$U_{\text{FENE}}(r) = -\frac{1}{2}kR_0^2 \ln \left( 1 - \left( \frac{r_{\text{GC}}}{R_0} \right)^2 \right)$$

Hierbei ist  $r_{\text{GC}}$  der Abstand zwischen zwei verbundenen Beads,  $k$  die Federkonstante und  $R_0$  die maximale Bindungslänge. Dieses Potential modelliert die kovalenten Bindungen zwischen den Beads und stellt sicher, dass die Bindung eine endliche Dehnbarkeit aufweist, wodurch unphysikalisches Überdehnen verhindert wird. Nicht-bindende Wechselwirkungen zwischen den Beads werden durch ein abgeschnittenes Lennard-Jones Potential

beschrieben (Gleichung 2.22), welches sowohl abstoßende als auch anziehende Kräfte berücksichtigt. Die Kombination aus FENE und Lennard-Jones Potentials ermöglicht eine realistische Abbildung der mechanischen und dynamischen Eigenschaften von Polymerketten, während die Rechenkosten durch die Vereinfachung der Modellierung niedrig gehalten werden. [119, 120]

Ein charakteristisches Merkmal von CG Simulationen ist die Verwendung spezifischer Längen- und Zeiteinheiten, welche aus den Parametern des Modells abgeleitet werden. Im Kremer-Grest Modell dient der Lennard-Jones Parameter  $\sigma$  als Längeneinheit, welcher dem effektiven Durchmesser eines Beads entspricht. Die Energieeinheit wird aus der Tiefe des Lennard-Jones Potentials ( $\epsilon$ ) bestimmt. Die daraus resultierende Zeiteinheit  $\tau$  ergibt sich aus  $\tau = \sigma\sqrt{m/\epsilon}$ , wobei  $m$  die Masse eines Beads ist. Diese natürlichen Einheiten ermöglichen eine dimensionslose Darstellung der Simulationsergebnisse und erleichtern den Vergleich unterschiedlicher Systeme. [119]

Um Simulationsergebnisse mit experimentellen Daten zu vergleichen, ist eine Skalierung auf reale physikalische Einheiten erforderlich. Dies kann durch Anpassung der Modellparameter an experimentell bestimmte Größen wie Diffusionskoeffizienten oder Viskositäten erfolgen. Durch diese Skalierung wird sichergestellt, dass die Simulation realistische Vorhersagen über das Verhalten des Materials liefern kann. [121]

Zusammenfassend bieten Coarse-Grained Simulationen mit dem Fokus auf das Kremer-Grest Modell eine Methode zur Untersuchung von Polymermaterialien. Die Reduktion der Komplexität durch Bead-Modellierung, kombiniert mit einer sorgfältigen Parametrisierung und Skalierung, ermöglicht es, detaillierte Einblicke in die Dynamik und Struktur großer Systeme zu gewinnen, welche mit AA Simulationen unzugänglich wären.

#### 2.2.4. Quantenmechanische Simulationen

Die Quantenmechanik (QM) bildet die Grundlage für das Verständnis der elektronischen Struktur von Molekülen und Materialien. Sie berücksichtigt die Wellennatur von Teilchen und die Prinzipien der Unschärferelation, was insbesondere für die Beschreibung von Elektronen in Atomen und Molekülen essentiell ist [122, 123, 124]. Während Molekularmechanik und Molekulardynamik auf klassischen physikalischen Prinzipien basieren und Atome als punktförmige Teilchen behandeln, ermöglicht die Quantenmechanik eine detaillierte Beschreibung der elektronischen Zustände und ihrer Wechselwirkungen.

Die grundlegende Gleichung der Quantenmechanik ist die zeitunabhängige Schrödinger-Gleichung:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi, \quad (2.32)$$

wobei  $\hat{H}$  der Hamilton-Operator,  $\Psi$  die Wellenfunktion des Systems und  $E$  die Gesamtenergie ist. Eine exakte analytische Lösung dieser Gleichung ist für Systeme mit mehr



als einem Elektron jedoch nicht möglich, da die Elektron-Elektron-Wechselwirkungen zu komplexen Kopplungen führen [125]. Daher wurden verschiedene Näherungsmethoden entwickelt, um solche Systeme zu behandeln.

Ab-initio-Methoden sind quantenmechanische Berechnungsverfahren, welche direkt auf den ersten Prinzipien der Quantenmechanik basieren und keine empirischen Parameter verwenden [126]. Ein bekanntes Beispiel ist die Hartree-Fock-Methode, bei der die Wellenfunktion als Slater-Determinante aus Ein-Elektronen-Orbitalen dargestellt wird, um das Pauli-Prinzip zu berücksichtigen [127, 128]. Diese Methoden liefern in der Regel genaue Ergebnisse für kleine Systeme, sind jedoch mit hohem Rechenaufwand verbunden und daher für große Systeme wie Biomoleküle oft nicht praktikabel [126].

Hier setzen semiempirische Methoden an, welche die grundlegenden Prinzipien der Quantenmechanik mit empirischen Parametern kombinieren, um die Berechnungen effizienter zu gestalten [129]. Eine moderne und effiziente semiempirische Methode ist GFN2-xTB (engl.: *Geometry, Frequency, Noncovalent, extended Tight Binding*). GFN2-xTB wurde entwickelt, um eine breite Palette von chemischen Systemen mit hoher Effizienz und guter Genauigkeit zu beschreiben [130]. Sie basiert auf dem erweiterten Tight-Binding-Ansatz, bei dem die elektronische Struktur durch vereinfachte quantenmechanische Berechnungen und die Verwendung empirischer Parameter ermittelt wird.

Die GFN2-xTB-Methode verwendet eine minimalistische atomzentrierte Basis und parametrisiert die Wechselwirkungen zwischen den Atomen durch effektive Ein- und Zwei-Zentren-Integrale [130]. Eine zentrale Vereinfachung besteht darin, dass komplexe Mehrzentren-Integrale, welche in ab-initio-Methoden berechnet werden müssen, durch effektive Parameter und vereinfachte funktionale Formen ersetzt werden. Dies reduziert den Rechenaufwand erheblich, da die Anzahl der zu berechnenden Integrale drastisch verringert wird. Zudem verzichtet GFN2-xTB auf die explizite Behandlung der Elektronenkorrelationen, welche in ab-initio-Methoden einen Großteil des Rechenaufwands ausmachen [130]. Stattdessen werden empirisch angepasste Korrekturen eingeführt, um die wichtigsten Korrelationseffekte zu berücksichtigen, ohne die Komplexität der Berechnungen signifikant zu erhöhen.

Durch die Kombination dieser Vereinfachungen kann GFN2-xTB die elektronische Struktur großer Systeme mit deutlich reduziertem Rechenaufwand berechnen, ohne dabei die Genauigkeit wesentlich zu beeinträchtigen. Ein weiterer Aspekt ist die Verwendung von optimierten Parametern, welche durch Anpassung an umfangreiche Datensätze aus hochgenauen quantenmechanischen Berechnungen und experimentellen Daten gewonnen wurden [130]. Dies gewährleistet, dass die Methode für eine Vielzahl von chemischen Elementen und Bindungssituationen zuverlässig angewendet werden kann.

GFN2-xTB ist besonders geeignet für die Berechnung von Molekülgeometrien, Schwingungsfrequenzen und die Modellierung nicht-kovalenter Wechselwirkungen [130]. Die

Methode wurde erfolgreich in verschiedenen Bereichen eingesetzt, darunter die Untersuchung von Biomolekülen, Materialien und supramolekularen Systemen. Ein wesentlicher Vorteil von GFN2-xTB ist die Fähigkeit, große Systeme mit mehreren tausend Atomen in vertretbarer Rechenzeit zu behandeln, was mit ab-initio-Methoden wie der Hartree-Fock-Methode oder selbst mit vielen Dichtefunktionaltheorie (DFT)-Ansätzen nicht praktikabel wäre [130].

Zusammenfassend ermöglichen quantenmechanische Simulationen die detaillierte Untersuchung der elektronischen Strukturen von Molekülen und Materialien. Ab-initio-Methoden liefern genaue Ergebnisse für kleine Systeme, sind jedoch für große Systeme oft zu rechenaufwendig. Semiempirische Ansätze wie GFN2-xTB kombinieren quantenmechanische Prinzipien mit empirischen Parametern, um effiziente Berechnungen auch für große Systeme zu ermöglichen und bieten somit Einblicke, welche mit klassischen Methoden nicht erreichbar sind.

### 2.2.5. Berechnung der Gibbs-Energie

Die Berechnung der Gibbs-Energie ( $G$ ) und ihrer Änderung ist ein zentrales Thema in der theoretischen Chemie und Biophysik. Die Gibbs-Energie eines Systems kombiniert die Einflüsse der Enthalpie und der Entropie (Formel 2.17) [131]. In molekularen Simulationen wird die Änderung der Gibbs-Energie ( $\Delta G$ ) oft in mehreren Schritten berechnet, wobei verschiedene Beiträge wie die Bindeenergie, die Solvatationsenergie und die Entropie berücksichtigt werden. Die Enthalpie setzt sich aus der inneren Energie des Systems, einschließlich der kinetischen und potentiellen Energie, sowie dem Druck-Volumen-Term zusammen [98]:

$$H = U + pV \quad (2.33)$$

wobei  $U$  die innere Energie,  $p$  der Druck und  $V$  das Volumen des Systems sind. Die Entropie wird in Simulationen häufig durch die Analyse der Bewegungen und Zustände der Atome berechnet [132]. Da die direkte Berechnung der Entropie oft schwierig ist, werden approximative Methoden wie die Normalmodenanalyse oder empirische Ansätze verwendet [133].

Im Folgenden werden verschiedene Methoden zur Berechnung der Gibbs-Energie vorgestellt, darunter die Thermodynamische Integration, die Differenz der freien Energien, MM-GBSA und molekulares Docking.

#### 2.2.5.1. Thermodynamische Integration

Die thermodynamische Integration (TI) ist eine Methode zur Berechnung von  $\Delta G$ , welcher der freie Energieunterschied zwischen zwei Zuständen A und B durch Integration

der mittleren Energiegradienten entlang eines interpolierten Pfades im Parameterraum ermittelt wird [134]. Ein kontinuierlicher Parameter  $\lambda$  interpoliert zwischen den Zuständen A ( $\lambda = 0$ ) und B ( $\lambda = 1$ ). Die Änderung der Gibbs-Energie ergibt sich aus:

$$\Delta G = \int_0^1 \left\langle \frac{\partial U(\lambda)}{\partial \lambda} \right\rangle_{\lambda} d\lambda \quad (2.34)$$

wobei  $\langle \cdot \rangle_{\lambda}$  den Ensemblemittelwert bei festem  $\lambda$  bezeichnet und  $U(\lambda)$  die potentielle Energie des Systems in Abhängigkeit von  $\lambda$  ist [135]. Durch Simulationen bei verschiedenen  $\lambda$ -Werten können die mittleren Ableitungen  $\frac{\partial U(\lambda)}{\partial \lambda}$  berechnet und das Integral numerisch ausgewertet werden. TI zeichnet sich durch hohe Genauigkeit und die Berücksichtigung komplexer Wechselwirkungen aus [98], erfordert jedoch einen erheblichen Rechenaufwand aufgrund der Vielzahl benötigter Simulationen.

### 2.2.5.2. Differenz der freien Energien

Eine weitere Methode zur Bestimmung von  $\Delta G$  ist die Berechnung der Differenz der freien Energien zwischen den einzelnen Komponenten und dem Komplex [136, 137]:

$$\Delta G = G_K - (G_L + G_P) \quad (2.35)$$

wobei  $G_L$  die Gibbs-Energie des freien Liganden,  $G_P$  die Gibbs-Energie des freien Proteins und  $G_K$  die Gibbs-Energie des gebundenen Komplexes aus Ligand und Protein ist. Diese Methode setzt voraus, dass alle energetischen und entropischen Beiträge, einschließlich Solvationseffekten, korrekt erfasst werden [138]. In der Praxis werden häufig Näherungsmodelle und empirische Parameter verwendet, um die Berechnungen zu vereinfachen.

Obwohl diese Methode konzeptionell einfach ist und theoretisch alle energetischen Beiträge berücksichtigt, ist die genaue Berechnung der absoluten freien Energien oft mit Unsicherheiten behaftet. Insbesondere die Bestimmung der Entropiebeiträge kann herausfordernd sein und zu Fehlern in  $\Delta G$  führen [98]. Zudem berücksichtigt die Methode nicht die Übergangszustände oder energetischen Barrieren zwischen den Zuständen, was bei signifikanten strukturellen Änderungen zu unvollständigen Beschreibungen führen kann.

### 2.2.5.3. MM-GBSA

Die *Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area* (MM-GBSA) Methode kombiniert molekulare Mechanik mit impliziter Solvationsmodellierung, um die Gibbs-Energieänderung bei der Bildung eines Molekülkomplexes zu berechnen [139]:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{solv}} + \Delta G_{\text{SA}} \quad (2.36)$$

Hierbei ist  $\Delta E_{\text{MM}}$  die molekularmechanische Energie,  $\Delta G_{\text{solv}}$  die Solvationsenergie, berechnet mithilfe des Generalized Born (GB) Modells, und  $\Delta G_{\text{SA}}$  die Oberflächenenergie, welche hydrophobe Effekte durch die Berechnung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche berücksichtigt [140].

MM-GBSA bietet einen guten Kompromiss zwischen Genauigkeit und Rechenaufwand und wird häufig für die Evaluierung von Bindungsaffinitäten und in der Wirkstoffentwicklung eingesetzt [141]. Die Genauigkeit der Methode hängt jedoch stark von der Qualität der verwendeten Kraftfelder und Solvationsmodelle ab. Zudem kann die Methode empfindlich auf Konformationsänderungen und die Flexibilität der Moleküle reagieren, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert [139].

#### 2.2.5.4. Molekulares Docking

Molekulares Docking dient der Vorhersage bevorzugter Bindungsorientierungen eines Liganden an ein Zielprotein, um stabile Komplexe zu bilden [142]. Das Programm Glide von Schrödinger ist ein führendes Tool in diesem Bereich und verwendet empirische Zielfunktionen, um Bindeposen und Affinitäten von Liganden vorherzusagen [143]. Glide bietet zwei Hauptmodi des Dockings: Standardpräzision (SP) [142] und Extrapräzision (XP) [143]. SP-Docking ist schneller und für Hochdurchsatz-Screening geeignet, während XP-Docking genauer ist und für die Optimierung von Leitstrukturen und detaillierte Analysen verwendet wird.

Der Docking-Prozess in Glide umfasst mehrere Schritte. Zunächst wird das aktive Zentrum des Zielproteins definiert, in das die Liganden gedockt werden sollen. Glide verwendet einen rasterbasierten Ansatz, um die Form und Eigenschaften der Rezeptor-Bindestelle zu repräsentieren. Dieses *Receptor Grid* wird erstellt, indem ein dreidimensionales Gitter über die Bindestelle gelegt wird, wobei jeder Gitterpunkt spezifische physikochemische Eigenschaften wie hydrophobe Bereiche, Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren sowie elektrostatische Potentiale repräsentiert [142, 144].

Die Vorbereitung der Liganden beinhaltet die Zuweisung korrekter Protonierungszustände und die Optimierung der Geometrien, um sicherzustellen, dass sie in geeigneter Form für das Docking vorliegen. Während der Docking-Berechnungen platziert Glide die Liganden in verschiedenen Orientierungen und Konformationen innerhalb des Rezeptor-Rasters. Hierbei wird eine hierarchische Filterstrategie verwendet, um effizient die besten Bindeposen zu identifizieren [142].

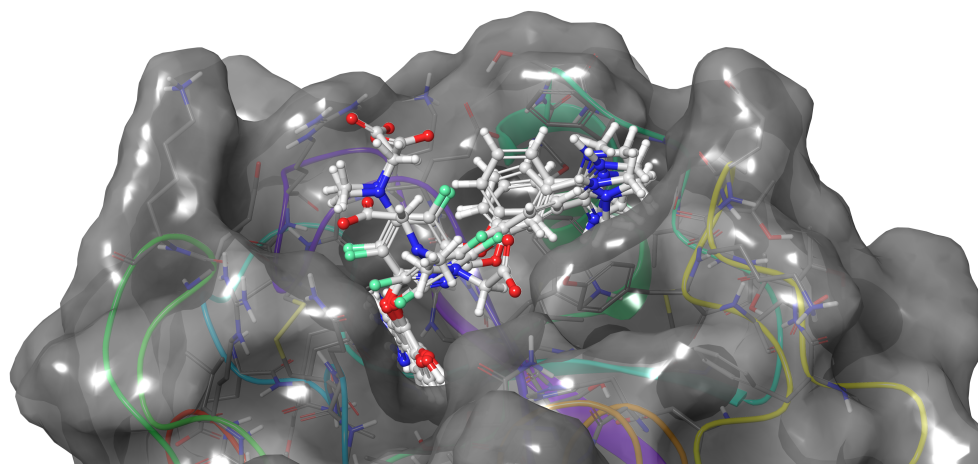
Der Prozess beginnt mit einem groben Screening, bei dem eine große Anzahl von Ligandenkonformationen schnell bewertet wird. Vereinfachte Zielfunktionen, die primär auf sterischen Kriterien und elektrostatischer Komplementarität basieren, werden eingesetzt, um ungeeignete Posen auszuschließen. Nach diesem initialen Filtern folgt eine genauere Bewertung der verbleibenden Posen mit detaillierteren Zielfunktionen, welche zusätzliche

Faktoren wie Wasserstoffbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen und Solvatationseffekte berücksichtigen [143].

Ein exemplarisches Ergebnis einer Docking-Simulation ist in Abbildung 2.7 dargestellt. Diese Abbildung zeigt das aktive Zentrum des Gerinnungsfaktors Xa, in das ein potenzieller Inhibitor gedockt wurde. Die drei überlagernden Dockingposen verdeutlichen die Vielfalt möglicher Bindungsorientierungen und die Fähigkeit des Docking-Programms, verschiedene energetisch günstige Bindepositionen zu identifizieren.

Die finale Auswahl der besten Posen basiert auf einem umfassenden Scoring-Algorithmus, der die energetischen Beiträge aller relevanten Interaktionen summiert. Dieser hierarchische Ansatz ermöglicht eine Balance zwischen Rechenaufwand und Genauigkeit, indem zunächst grobe und anschließend immer präzisere Filter angewendet werden, um die besten Bindeposen zu identifizieren [145].

Ein wesentlicher Vorteil des molekularen Dockings ist seine Effizienz und die Fähigkeit, große Ligand-Datenbanken gegen ein Zielprotein zu durchsuchen [146]. Dies ist besonders nützlich in der frühen Phase der Wirkstoffentwicklung, um potenzielle Bindungspartner zu identifizieren und zu priorisieren. Um den geringen Rechenaufwand zu ermöglichen, müssen jedoch mehrere Annahmen getroffen werden. Eine wesentliche Annahme ist, dass die Konformation des Proteins während der Bindung statisch bleibt, obwohl Proteine in Wirklichkeit flexible Strukturen sind und Konformationsänderungen auftreten können. Zudem basieren die Zielfunktionen auf vereinfachten Modellen der molekularen Wechselwirkungen und spiegeln nicht immer die realen physikalischen Bedingungen vollständig wider [147]. Die Genauigkeit der Vorhersagen hängt stark von der Qualität der verwendeten Zielfunktionen, dem Kraftfeld und der Behandlung der Flexibilität von



**Abbildung 2.7.:** Ergebnisse einer Docking-Simulation. Die Abbildung zeigt das aktive Zentrum des Gerinnungsfaktors Xa mit drei überlagernden Dockingposen eines potentiellen Inhibitors.

Ligand und Protein ab. Entropische Beiträge werden oft nicht adäquat berücksichtigt, was zu ungenauen Gibbs-Energieabschätzungen führen kann [146].

Molekulares Docking bleibt dennoch ein weit verbreitetes Verfahren in der frühen Phase der Wirkstoffentwicklung und der Leitstrukturenoptimierung. Die Ergebnisse können durch anschließende Methoden wie Molekulardynamik-Simulationen oder MM-GBSA-Berechnungen weiter verfeinert werden, um präzisere Bindungsenergieabschätzungen zu erhalten.

### 2.2.6. Workflow-Management-Systeme

Workflow-Management-Systeme (WMS) sind essenzielle Werkzeuge in der molekularen Simulation, welche die Planung, Ausführung und Überwachung komplexer Arbeitsabläufe ermöglichen [148]. Sie strukturieren Prozesse in einzelne, miteinander verbundene Knoten, welche spezifische Aufgaben repräsentieren und in einem Workflow grafisch angeordnet werden [149]. Diese Knoten können Datenverarbeitungs- oder Simulationsschritte darstellen, und durch Verbindungen wird der Datenfluss zwischen ihnen definiert.

Ein signifikanter Vorteil von WMS ist ihre Benutzerfreundlichkeit. Einmal entwickelte Workflows können leicht an Personen mit weniger technischer Expertise weitergegeben werden [150]. Durch intuitive grafische Benutzeroberflächen ist es möglich, komplexe Prozesse ohne tiefgehende Programmierkenntnisse zu erstellen und auszuführen. Dies fördert die interdisziplinäre Zusammenarbeit und ermöglicht es, dass auch Anwender ohne spezifisches Fachwissen die Workflows effizient nutzen können. Die Verwendung von WMS kann außerdem zu einer Steigerung der Effizienz und Reproduzierbarkeit wissenschaftlicher Arbeiten führen [151]. Durch die Automatisierung wiederkehrender Prozesse werden Fehler minimiert und konsistente Ergebnisse sichergestellt. Zudem erleichtert die Knoten-basierte Struktur die Anpassung und Erweiterung bestehender Workflows, was die Skalierbarkeit von Projekten unterstützt [152].

Allerdings gibt es auch Herausforderungen bei der Implementierung von WMS. Die initiale Einrichtung und Konfiguration von Workflows kann komplex und zeitaufwendig sein, insbesondere für Benutzer ohne Erfahrung in der Workflow-Entwicklung. Zudem erfordern WMS eine kontinuierliche Wartung und Aktualisierung, um mit den sich ständig weiterentwickelnden Softwarekomponenten und Simulationstools kompatibel zu bleiben. Ein weiterer Nachteil ist die Abhängigkeit von der Stabilität der eingesetzten Software, was zu potenziellen Problemen bei der Ausführung von Workflows führen kann, wenn bestimmte Softwarekomponenten nicht mehr unterstützt werden oder Fehler aufweisen.

Beispiele für WMS sind KNIME und SimStack. KNIME besitzt eine modulare Architektur und stellt eine Vielzahl an vorkonfigurierten Knoten zur Verfügung [150]. SimStack hingegen ist ein spezialisiertes WMS für molekulare Simulationen, das die Verwaltung und Automatisierung von Simulationsabläufen erleichtert [153]. Es bietet Schnittstellen zu

gängigen Simulationssoftwarepaketen und unterstützt die Skalierung auf Hochleistungsrechnern.

Insgesamt bieten Workflow-Management-Systeme wie KNIME und SimStack leistungsfähige Plattformen zur Automatisierung und Optimierung molekularer Simulationsprozesse. Sie ermöglichen eine intuitive Anwendung durch Knoten-basierte Strukturen, erhöhen die Reproduzierbarkeit von Abläufen und fördern die Zusammenarbeit über unterschiedliche Expertisen hinweg.

### 2.2.7. Molekulare Simulationen in der Chromatographie

Molekulare Simulationen können zur Vorhersage der komplexen Adsorptionsprozesse in der Chromatographie verwendet werden. Sie bieten das Potential atomare Einblicke in die Wechselwirkungsmechanismen zwischen Zielmolekülen und Chromatographiehharzen unter verschiedenen Bedingungen zu erhalten. Allerdings stehen Forschende hierbei vor zwei wesentlichen Herausforderungen. Zum einen fehlt häufig ein detailliertes atomares Modell der Harzoberfläche, da die nanoskalige Struktur der Harze oft nicht bekannt ist. Zum anderen sind die bevorzugten Bindestellen und -orientierungen der Zielmoleküle auf den Harzoberflächen meist unklar. Besonders bei Biomolekülen wie Proteinen oder flexiblen linearen Peptiden ergeben sich viele potentielle Bindestellen, welche in Simulationen berücksichtigt werden müssen.

Dismer und Hubbuch entwickelten Ansätze, um diese Herausforderungen zu adressieren. Sie nutzten vereinfachte Harzmodelle, um die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Ionenaustauschern auf atomarer Ebene zu simulieren. In ihren Arbeiten untersuchten sie die Adsorption von Lysozym und Ribonuklease A auf verschiedenen Harzen wie Source 15 S, EMD Fractogel SO<sub>3</sub>, SP Sepharose Fast Flow und SP Sepharose XL. Für die Modellierung der Harze verwendeten sie idealisierte planare Oberflächen, auf denen die funktionellen Gruppen (z. B. Sulfonsäuregruppen) in festgelegten Abständen platziert wurden. Die Proteine wurden systematisch über dieser Oberfläche positioniert und rotiert, um die energetisch günstigsten Bindungspositionen zu ermitteln [14, 12, 10].

Mit diesem Ansatz konnten sie die Bindungsorientierung der Proteine sowie das Retentionsverhalten auf den verschiedenen Harzoberflächen vorhersagen. So sagten sie beispielsweise bei einem optimalen Ligandenabstand von 10 Å die Retentionsvolumina von Lysozym und Ribonuklease A auf SP Sepharose Fast Flow unter verschiedenen Bedingungen erfolgreich voraus [10]. Eine andere Analyse zeigte, dass Lysozym auf tentakelartigen Harzen wie EMD Fractogel SO<sub>3</sub> und SP Sepharose XL eine multipunktueller Bindung eingeht, was zu höherer Bindungskapazität führt [14]. Zudem wurde vorhergesagt, wie sich die Bindungsorientierung der Proteine bei unterschiedlichen pH-Werten und Ionenstärken verändert [12].

Parimal et al. erweiterten die Anwendung molekularer Simulationen auf die multimodale

Chromatographie, indem sie die Interaktionen von multimodalen Liganden mit Proteinen untersuchten. Sie modellierten die Liganden von Capto MMC und Nuvia cPrime als freie Moleküle in Lösung, welche mit Proteinen wie Ubiquitin, Cytochrom C und  $\alpha$ -Chymotrypsinogen A interagieren. Die Simulationen zeigten, dass Capto MMC aufgrund seiner aliphatischen Gruppe stärkere hydrophobe Wechselwirkungen mit den Proteinen eingeht, was durch die Flexibilität des Liganden begünstigt wird. Es wurden Bindestärken, bevorzugte Bindestellen auf den Proteinoberflächen und der Einfluss verschiedener chemischer Gruppen vorhergesagt [95].

Banerjee und Chen untersuchten die Proteinadsorption in der multimodalen Chromatographie, indem sie multimodale Liganden auf einer idealisierten Monolayer-Oberfläche immobilisierten. Ohne ein spezifisches Trägermaterial zu simulieren, analysierten sie die Interaktionen mit Proteinen durch Molekulardynamik-Simulationen und Freie-Energie-Berechnungen. Sie konnten die Retentionsfaktoren vorhersagen sowie die Salzkonzentrationen für die Elution von Proteinen wie Ubiquitin und Ribonuklease A bestimmen [96].

Während molekulare Simulationen in der Aufreinigung von Biomolekülen bereits wertvolle Einblicke geliefert haben, wurden sie in der chiralen Chromatographie sogar noch früher eingesetzt, um die Mechanismen der Enantioseparation auf molekularer Ebene zu verstehen. Chirale Verbindungen sind allgegenwärtig und spielen insbesondere in der pharmazeutischen Industrie eine entscheidende Rolle, da unterschiedliche Enantiomere oft verschiedene biologische Aktivitäten aufweisen. Molekulare Simulationen bieten hier den Vorteil, die komplexen enantioselektiven Wechselwirkungen zwischen Analyten und chiralen stationären Phasen detailliert analysieren zu können. Sie ermöglichen es, die grundlegenden Prinzipien der chiralen Erkennung zu erforschen und chromatographische Parameter wie die Elutionsreihenfolge vorherzusagen. [13]

Weinstein et al. (1980) legten mit der Entwicklung eines Interkalationsmodells zur Erklärung der Enantiomerentrennung in der Gas-Flüssig-Chromatographie die Grundlagen für das Verständnis der chiralen Erkennung. Sie beschrieben die Bildung von diastereomeren Komplexen zwischen Gast- und Wirtsmolekülen, wobei Wasserstoffbrücken und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen eine zentrale Rolle spielen. [154].

Lipkowitz und Lindner führten Molekulardynamik-Simulationen durch, um die Mechanismen der chiralen Erkennung auf cinchona-alkaloidbasierten chiralen stationären Phasen (CSP) zu untersuchen. Sie konzentrierten sich auf die Wechselwirkungen zwischen den Analyten und dem chiralen Selektor und konnten somit die Elutionsreihenfolge der diastereomeren Komplexe erfolgreich vorhersagen [155, 156, 157].

Ortuso et al. (2013) modellierten eine chirale stationäre Phase auf Basis von Cellulose tris(4-methylbenzoat), indem sie ein Polysaccharidmodell mit 16 Glucoseeinheiten in einer L-Helix erstellten. An die Glucoseeinheiten wurden 4-Methylbenzoatgruppen gebunden, um die tatsächliche Struktur der stationären Phase nachzubilden. Durch Docking-



Simulationen, welche anschließend mittels MD-Simulationen in einem Ethanolmedium verfeinert wurden, konnten sie entscheidende Wechselwirkungen wie van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen beobachten und die Elutionsreihenfolge der Enantiomere vorhersagen [158].

Zhao et al. (2019) untersuchten die Wechselwirkungen zwischen Enantiomeren und der cellulose tris(3,5-dichlorphenylcarbamate)-basierten CSP auf einer Chiralpak IC-Säule. Durch Docking-Simulationen zwischen dem Ligand des Harzes und den Analyten identifizierten sie zentrale Bindemechanismen und -energien. Anhand dieser konnten sie die Enantioselektivität bestimmen [159].

Zusammenfassend konnte durch molekulare Simulationen das Verständnis der Adsorptions- und Trennmechanismen in der Chromatographie verbessert werden. Insbesondere konnten durch die modellierten Wechselwirkungen zwischen Zielmolekülen und den Liganden von stationären Phasen präzise Vorhersagen über das Retentionsverhalten und die Bindeorientierung von kleineren chiralen Molekülen und großen Biomolekülen getroffen werden. Dieses detaillierte Verständnis des Adsorptionsprozesses zusammen mit einer genauen Vorhersage von Prozessparametern könnte in Zukunft wesentlich zur Verbesserung und schnelleren Auslegung von chromatographischen Prozessschritten beitragen.



## 3. Material und Methoden

Dieses Kapitel geht auf die in dieser Arbeit entwickelten und angewendeten Methoden sowie die verwendeten Materialien ein. Zuerst wird die Auswahl des Chromatographieharzes und der Zielmoleküle erklärt. Anschließend werden die entwickelten simulativen Methoden zur Berechnung von Bindeenergien zwischen Chromatographieharzoberflächen und linearen Peptiden vorgestellt. Zuletzt wird das für den experimentellen Teil dieser Arbeit etablierte Robotiklabor und die Methodik zur automatisierten Aufnahme von Adsorptionsisothermen erläutert. Auflistungen aller verwendeten Chemikalien, Software, Geräte und Messinstrumente sind in Kapitel A des Anhangs zu finden. Dieses Kapitel bezieht sich auf Kapitel 2.1 bis 2.5 folgender Veröffentlichung: [160].

### 3.1. Auswahl des Chromatographieharzes und der Zielmoleküle

Zuerst wurde festgelegt, welches Chromatographieharz als Basis für die Erstellung eines molekularen Modells der Adsorberoberfläche dienen sollte. Die Wahl des Trägermaterials fiel hierbei auf Polymethacrylate. Ein wesentlicher Grund hierfür waren die bekannten hydrophoben Eigenschaften von methacrylatbasierten Harzen [16], welche in vereinfachten Modellen der Adsorberoberfläche oft nicht ausreichend berücksichtigt werden [12]. Darüber hinaus werden diese Harze mittels radikalischer Polymerisation hergestellt, ein Prozess, welcher bereits in einer vorherigen Studie auf molekularer Ebene erfolgreich simuliert werden konnte [121]. Für den zu untersuchenden Chromatographietyp wurde die multimodale Chromatographie (MMC) ausgewählt. Da dieser Typ auf mehreren unterschiedlichen Bindemechanismen zwischen den Liganden und Zielmolekülen beruht, gestaltet sich die Vorhersage optimaler Binde- und Elutionsbedingungen in der Prozessentwicklung oftmals als schwierig [95]. Ein prädiktives Modell hätte daher hierbei einen großen Nutzen.

Schließlich wurde das kommerzielle multimodale Chromatographieharz TOYOPEARL MX-Trp-650M von Tosoh Bioscience ausgewählt, da es alle oben genannten Kriterien

erfüllt. Dieses Harz kam sowohl in den simulativen als auch den experimentellen Arbeitsabläufen zum Einsatz. Es zeichnet sich durch ein hydroxiliertes Polymethacrylat-Rückgrat aus und ist über die N-terminale Aminogruppe mit einem Tryptophan (Trp)-Liganden funktionalisiert [161]. Dieser Ligand kann durch die Kombination von elektrostatischen und hydrophoben Eigenschaften, bedingt durch seine negativ geladene Carboxylgruppe und seinen Indolring, komplexe Wechselwirkungen mit verschiedenen Zielmolekülen eingehen.

Als Zielmoleküle wurden lineare biopharmazeutische Peptide gewählt, welche von der Biomol GmbH bezogen wurden. Die Auswahlkriterien umfassten das Molekulargewicht, strukturelle Merkmale und die Nettoladung bei einem pH-Wert von 4, welcher als optimal für die Bindung an den Tryptophan-Liganden ermittelt wurde [161]. Besonders die Molekülgröße spielte eine entscheidende Rolle, da sie sowohl die inhärente Flexibilität der Peptide als auch die Simulationsdauer beeinflusst. Die experimentelle Detektion dieser Peptide erfolgte mittels UV-Absorptionsspektroskopie, deren Details in Kapitel 3.4.4 beschrieben sind. Von allen zehn linearen Peptiden, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, sind die Bezeichnung, die Wellenlänge für die UV-Absorptionsspektroskopie sowie das Molekulargewicht zusammen mit der molekulare Struktur in Tabelle 3.3 (Kapitel 3.4.4) gelistet.

## 3.2. Molekulare Simulationen zur Bestimmung von Bindeenergien

Um die Änderung der Gibbs-Energie, im Folgenden als Bindeenergie bezeichnet, bei der Adsorption der Zielmoleküle an die Oberflächen von Chromatographieharzen zu berechnen, wurden zwei aufeinander aufbauende, mehrstufige Workflows entwickelt. Der erste Workflow diente der Modellierung von Chromatographieharzoberflächen in molekularer Auflösung. Der zweite Workflow wurde konzipiert, um die Bindeenergie zwischen den zuvor generierten Oberflächenmodellen der Chromatographieharze und den Zielmolekülen effizient zu screenen. Beide Workflows wurden in Workflow-Management-Systemen (WMSs) automatisiert. Im folgenden wird näher auf die Methodik der beiden Workflows und deren Automatisierung in WMSs eingegangen. Des Weiteren wird beschrieben, wie die entwickelten Oberflächenmodelle gegen bereits etablierten Modellansätze getestet wurden.

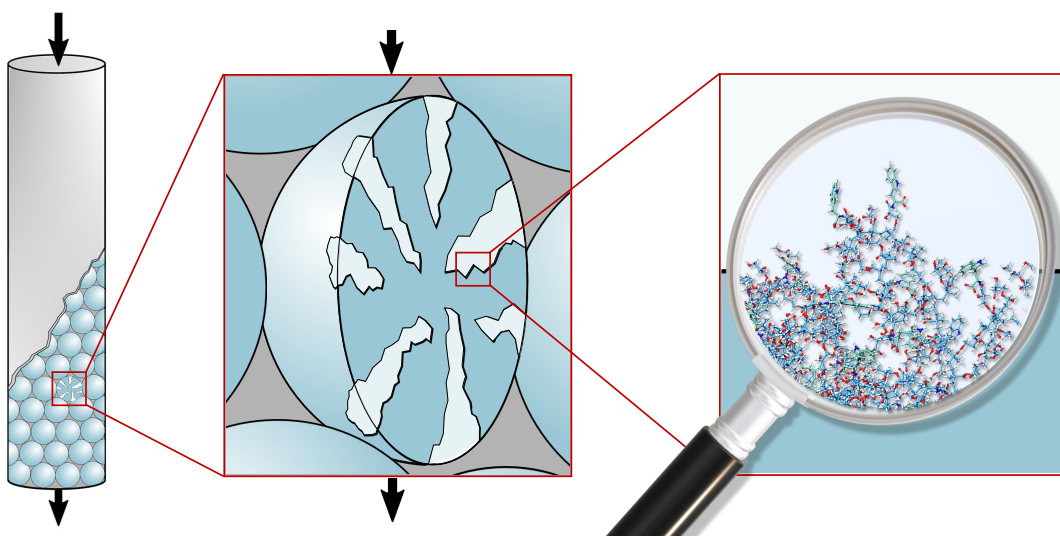
### 3.2.1. Generierung molekularer Modelle der Oberflächen von methacrylatbasierenden Chromatographieharzen

In diesem Unterkapitel wird die Methodik zur Modellierung der Oberfläche des methacrylatbasierten Chromatographieharz TOYOPEARL MX-Trp-650M beschrieben. Das Harz-Modell kann in einem darauffolgenden zweiten Simulationsschritt für die Simulation des Adsorptionsverhaltens von Peptiden verwendet werden (siehe Kapitel 3.2.2). Um den

Adsorptionsprozess später akkurat simulieren zu können, ist ein detailliertes Modell der Harzoberfläche unerlässlich. Deshalb wurde das Oberflächenmodell in atomarer Auflösung erstellt, inklusive des methacrylatbasierten Trägermaterials. Die Methodik hierfür wurde von Dr. Modan Liu aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Wolfgang Wenzel am Institut für Nanotechnologie des KIT im Rahmen eines gemeinsamen Projekts zu virtuellen Materialien etabliert. Zur Visualisierung der Größenordnungen zeigt Abbildung 3.1 einen schematischen Vergleich der Größe eines Oberflächenmodells eines Chromatographieharzes im Verhältnis zu der Größe einer Chromatographiesäule.

Das Harz wurde im entwickelten Modellansatz als ein quaderförmiger Abschnitt dargestellt, welcher aus dem Randbereich einer Partikelpore extrahiert wurde. Die y,x-Ebene am oberen Ende in z-Richtung stellt die Grenzfläche zwischen der stationären und mobilen Phase dar, während die verbleibenden Oberflächen Schnittkanten bezüglich des weiteren Verlaufs des Chromatographieharzskelettes sind und somit Molekülfragmente enthalten können.

Für die Dimensionen des Modells wurde eine Größe von 10/15/15 nm (Höhe/Breite/Tiefe) gewählt, um die Nanostruktur der Oberfläche genau wiedergeben und die Adsorption von Biomolekülen simulieren zu können. Aufgrund dieser erweiterten Längenskala wäre die Anforderung an die Rechenleistung zu groß, um das gesamte Polymernetzwerk direkt auf atomistischer Ebene zu konstruieren. Deshalb wurde ein mehrstufiger Ansatz entwickelt, welcher grobkörnige coarse grained (CG)) und atomistische (engl.: *all-atom* (AA)) molekulardynamische Simulationsprotokolle zur Erstellung der Polymernetzwerkstruktur des Harzes kombiniert. Der CG-Teil der Simulation replizierte die Schritte, welche bei der experimentellen Synthese von Chromatographieharzen durchgeführt werden. Zuerst wurde hierbei die radikalische Polymerisation des methacrylatbasierten Trägermaterials



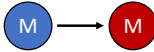
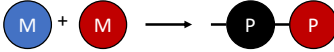
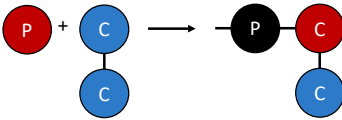
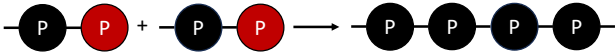
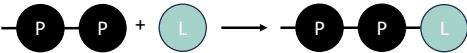
**Abbildung 3.1.:** Größenordnung von Oberflächenmodellen in der Chromatographie - Die Abbildung bietet einen schematischen Vergleich zwischen dem Maßstab der atomaren Modelle von Harzoberflächen und der Größe einer Chromatographiesäule.

simuliert. Anschließend wurde das entstandene quervernetzte Polymer durch die Bindung von Liganden funktionalisiert. Das resultierende CG-Modell lieferte eine Referenztopologie, welche die Anfangskoordinaten des Polymernetzwerks definierte. Anschließend wurde das CG-Modell in eine AA-Darstellung umgewandelt, wobei eine strukturelle Relaxation die endgültigen Koordinaten lieferte.

Um den dynamischen Polymerisationsprozess zu simulieren, wurde eine Simulationsbox erstellt, welche alle hierfür benötigten Komponenten enthielt: methacrylatbasierte Monomere und Vernetzer zur Bildung des Polymerträgermaterials, Liganden, welche später an das Trägermaterial gebunden werden, und Porogenmoleküle, mit denen die Polymerdichte kontrolliert werden kann. Da die verwendeten Monomere und Vernetzer des kommerziellen Harzes nicht öffentlich bekannt sind, wurde ein repräsentatives System weit verbreiteter Komponenten modelliert. Die in der Literatur am häufigsten genannten Komponenten sind 2,3-Dihydroxypropylmethacrylat (DHPMA) als Monomer und Ethylenglykoldimethacrylat (EDGMA) als Vernetzer. Diese Komponenten wurden deshalb für die Simulation des Trägermaterials verwendet. Das Verhältnis von Monomer zu Vernetzer wurde auf 1:5 festgelegt, was gängigen Praktiken entspricht [16]. Der Ligand des Harzes war mit Tryptophan bekannt.

Zu Generierung des CG-Modells wurden eine reaktionsratenbasiertes Modell erstellt, welches den dynamischen Prozess der Polymerisation repliziert [121]. In diesem Modell wurden unter Anwendung der Kremer-Grest-Parametrisierung DHPMA-Dimere als einzelne Kugeln und EDGMA als zwei Kugeln dargestellt. Der Trp-Ligand, welcher durch eine einzelne Kugel repräsentiert wurde, wurde erst nach Abschluss der Polymerisation in das Polymernetzwerk integriert. Das Porogen wurde lediglich durch seine Größe dargestellt. Jede Kugel im CG-Schema entsprach etwa 100 Da Molekulargewicht und befand sich innerhalb einer Länge von 1/1/1 nm. Um die Grenzfläche zwischen der mobilen und der stationären Phase innerhalb des Modells zu erzeugen, wurde die obere Hälfte der anfänglichen Simulationsbox in z-Richtung mit Porogenkugeln gefüllt. Dieses Porogen wurde so konzipiert, dass es nicht in die untere Hälfte der Bindebox diffundieren kann. Die untere Hälfte der Box wurde mit einer definierten Mischung aus Monomeren, Vernetzern, Liganden und zusätzlichem Porogenen gefüllt. Hier wurden allgemeine Reaktionsraten auf radikalbasierte Aktivierung, Polymerisation, Vernetzung und Kombination angewendet, wie in Tabelle 3.1 aufgeführt. Freie Monomere werden als blaues „M“ und Monomere im Polymernetzwerk als schwarzes „P“ dargestellt. Vernetzer sind als zwei verbundene blaue „C-C“ dargestellt. Die Liganden sind als grünes „L“ gekennzeichnet. Im CG-Modell wurde die Längeneinheit ( $L_{CG}$ ) auf 1 nm skaliert. Das Lennard-Jones-ähnliche Potential, das den räumlichen Ausschluss für einzelne Moleküle beschreibt, wurde in einer vereinfachten Einheitskala dargestellt. Diese sogenannten reduzierten Einheiten ermöglichen effizientere Berechnungen in den Simulationen. Um jedoch genaue und realitätsnahe Ergebnisse zu erzielen, muss ein Skalierungsfaktor bestimmt werden. Dieser Faktor kann

**Tabelle 3.1.:** Reaktionsschema und Reaktionsraten der Polymerisation von freien Monomeren (blaues M), im Polymer eingebundenen Monomeren (schwarzes P), Vernetzern (blaues C-C) und Liganden (grünes L). Aktivierte Komponenten sind in roter Farbe dargestellt.

Bezeichnung	Reaktionsrate	Reaktionsschema
Initiierung von Monomeren	$\frac{1}{\tau_{CG}}$	
Fortpflanzung des Netzwerks	$\frac{1}{\tau_{CG}}$	
Einbindung von Vernetzern	$\frac{1}{\tau_{CG}}$	
Kombination aktivierter Polymerketten	$\frac{1}{\tau_{CG}}$	
Funktionalisierung mit Ligand	$\frac{1}{\tau_{CG}}$	

ermittelt werden, indem die simulierten Daten mit experimentellen Messdaten über die Zeit verglichen werden. In diesem Zusammenhang steht  $\tau_{CG}$  für die Zeiteinheit, welche in der CG-Darstellung der Simulationen verwendet wird.

Während der anschließenden dynamischen Bindungsbildung zwischen dem Polymernetzwerk und dem Liganden wurde die Reaktionsrate auf die gleichen Werte wie bei der Polymerisation gesetzt. Der Schwellenabstand, definiert als die maximale Distanz, bei der zwei Moleküle eine Bindung eingehen können, wurde auf  $1,12 L_{CG}$  mit einer Wahrscheinlichkeit von 90 % pro  $22 \tau_{CG}$  gesetzt. Im radikalbasierten Polymerisationsschema können die Monomere aktiviert werden, um die Polymerisationsreaktionen zu initiieren. Aktivierte Komponenten sind in roter Farbe dargestellt. Nur diese Stellen sind in der Lage, eine zusätzliche Bindung zu bilden. Die Radikale werden während der Wachstumsreaktionen und der Vernetzung entlang des Polymers weitergegeben. Wenn eine Bindung zwischen zwei aktivierten Stellen gebildet wird, werden die Radikale verbraucht. Der Ligand bleibt während der Polymerisationsreaktionen neutral. Erst nach der Bildung des Polymernetzwerks wird den Liganden erlaubt an die Monomere in den Polymerketten zu binden.

Der zweiten Schritt bestand darin, die grobkörnigen Kugeln durch einzelne DHPMA-, EGDMA- und Trp-Moleküle zu ersetzen, welche unter Verwendung von LigParGen [162] optimiert wurden. Die Moleküle wurden so angeordnet, dass sie in eine Box von  $1,1/1,1/1,1$  nm passen, um überlappende Atome nach der Umwandlung zu vermeiden. Zwischenmolekulare Bindungen, wie „C-C“- und „C-N“-Bindungen, wurden nach dem Entfernen der Wasserstoffatome von den Bindungsstellen eingebaut. Die Ladungen beider Seiten der neuen Bindung wurden anschließend zurückgesetzt. Während der Relaxationsphase

wurde die erweiterte Simulationsbox isometrisch komprimiert, um ihre ursprünglichen Dimensionen wiederherzustellen. Eine AA-Relaxation, basierend auf der OPLS-aa [163] Parametrisierung, wurde mit inkrementellen Zeitschritten durchgeführt, wobei anfänglich Kollisionen mit sub-femtosekundären zeitlichen Auflösungen gelöst wurden und später ein  $2 \text{ fs } \Delta T$  für schnellere kollektive Bewegungen des Polymers verwendet wurde. Sowohl die CG- als auch die AA-Molekulardynamik-Simulationen wurden mit LAMMPS [164] ausgeführt.

Um eine mechanische Stabilität des Polymers sicherzustellen, was in der Realität eine dichte Trägermaterialstruktur erfordert, wurden die Mengen der DHPMA- und EDGMA-Moleküle in der anfänglichen Simulationsbox sorgfältig angepasst. Diese Anpassung erfolgte empirisch, indem die Anzahl der Moleküle schrittweise erhöht wurde, bis das Modell ein dichtes, vernetztes Polymernetzwerk aufwies. Das Verhältnis von Monomer zu Vernetzer wurde jedoch konstant gehalten. Anschließend wurde die Trp-Ligand-Konzentration erhöht, um ideale Ligandabstände von 5 bis  $15 \text{ \AA}$  zu erreichen, welche in der Literatur für einfachere Modelle als ideal berichtet wurden [14, 96]. Für die endgültige Konfiguration des Modells wurde die untere Hälfte der anfänglichen Bindungsbox mit den Abmessungen  $10/15/15 \text{ nm}$  (Höhe/Breite/Tiefe) in z-Richtung mit folgender spezifischer molekularer Zusammensetzung gefüllt: 690 DHPMA-Dimere, 260 EDGMA-Vernetzer, 400 Trp-Liganden und 320 Porogene.

Die Harzstruktur, welche als Output aus der Simulation gewonnen wurde, wurde für weitere manuelle Verfeinerungsschritte in Maestro 13.7 (Schrödinger Release 2023-2) importiert. In dieser Nachbearbeitungsphase wurden kleinere Polymermoleküle, welche nicht in das Hauptpolymernetzwerk integriert waren, entfernt und die Carboxylgruppen deprotoniert. Anschließend wurde die Struktur einer zweiten Energieminimierung unterzogen, welche mit MacroModel durchgeführt wurde. Während dieser Minimierung wurden die Restgruppen an den äußeren Schnittkanten des Modells immobilisiert, um dessen strukturelle Integrität zu bewahren. Die durch diesen Prozess verfeinerte Struktur diente als Ausgangspunkt für weitere Simulationsschritte zur Bestimmung der Bindeposen und -energien von Peptiden.

### 3.2.2. Simulation der Adsorption von Peptiden

Dieser Abschnitt beschreibt den zweiten simulativen Workflow dieser Arbeit, welcher sich auf die Bestimmung von Bindeposen und -energien zwischen linearen Peptiden und den AA Modellen der methacrylatbasierten Chromatographieharzoberflächen (siehe Kapitel 3.2.1) konzentriert. Dieser Ansatz sollte schnelle Screenings von Zielmolekülen ermöglichen und für herkömmliche Bürocomputer geeignet sein, weshalb Wert auf recheneffiziente Methoden gelegt wurde.

Alle Simulationen wurden mittels Maestro 13.6 (Schrödinger, Release 2023-2) durchgeführt. Um Bindeposen berechnen zu können, wurden zunächst die molekularen Strukturen



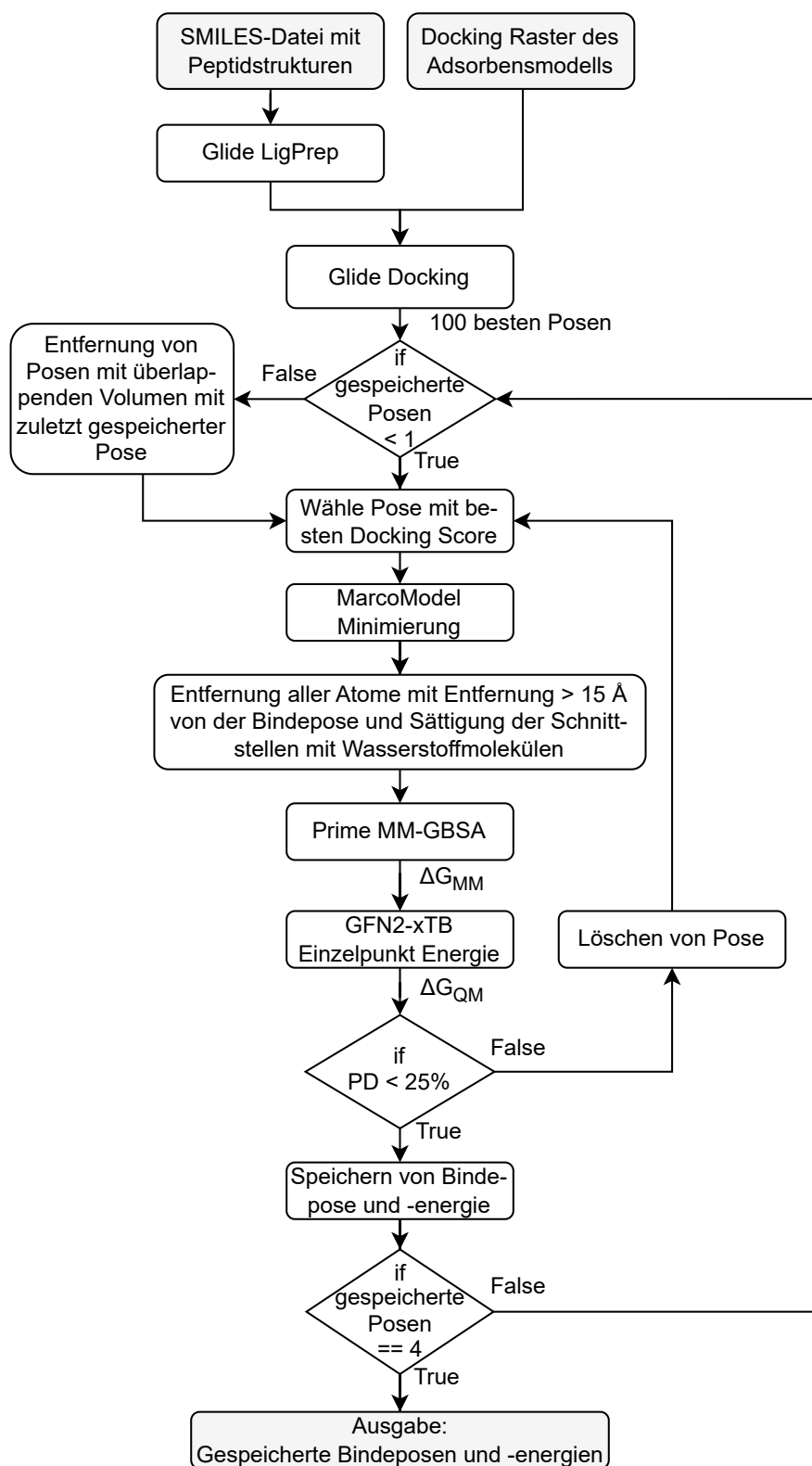
der Peptide und der Adsorbensoberfläche als Eingabe für die Simulation benötigt. Die SMILES-Zeichenfolgen der Peptide wurden von Datenblättern des Herstellers erlangt und als SMILES-Datei in Maestro importiert. Mittels LigPrep wurden anschließend die 3D-Strukturen der Peptide und ihre Protonierungszustände in Abhängigkeit des pH-Werts berechnet. Die molekulare Struktur der Adsorbtoberfläche wurde mittels des simulativen Workflows von Kapitel 3.2.1 generiert. Von diesem Modell wurde ein Docking-Raster erstellt, welches in der Mitte der Adsorbensoberfläche positioniert wurde. Der Durchmesser der Mittelbox wurde für alle Achsen auf das Maximum von 40 Å gesetzt.

Anschließend wurde ein initiales Screening potentieller Bindungspose mittels Glide-Docking durchgeführt. Hierbei wurden 5000 initiale Posen getestet und die 100 Posen mit den höchsten finalen Docking-Score für weitere Simulationsschritte ausgegeben [145]. Während dieses Docking-Schritts wurde die Adsorberstruktur als starr angenommen und lediglich das Peptid wurde flexibel simuliert. Anschließend wurde der Komplex aus Zielmolekül und Adsorbens mit dem besten Docking-Score durch das MacroModel-Modul einer strukturellen Minimierung unterzogen. Hierbei wurde ein implizites Lösungsmittelmodell von Wasser und das OPLS4-Kraftfelds [165] verwendet. Dieser Schritt war entscheidend, um die Flexibilität des Polymerrückgrats während des Adsorptionsprozesses zu simulieren, welchem nun erlaubt wurde auf die Adsorption des Peptids zu reagieren. Um die Recheneffizienz zu steigern, wurden Atome im Adsorbensmodell, welche mehr als 5 Å vom Docking-Raster entfernt waren, während dieser Minimierungsphase fixiert. Im Anschluss wurde die Bindepose durch eine MM-GBSA-Simulation ein letztes Mal verfeinert und die Bindeenergie ( $\Delta G_{MM}$ ) berechnet. Um die Energieberechnungen zu beschleunigen, wurden Atome, welche mehr als 15 Å vom Zielmolekül entfernt waren, gelöscht, und das abgeschnittene Modell wurde an den Schnittstellen mit Wasserstoffmolekülen gesättigt.

In Abhängigkeit des Kraftfelds können bei der Simulation von Bindeposen potenziell falsch-positive Posen berechnet werden [166]. Dies bedeutet, dass aufgrund der Kraftfeldparametrisierung die berechnete Bindeenergie höher ist als die reale Bindeenergie und die Pose somit eigentlich verworfen werden müsste. Um dieses Problem anzugehen, wurden für die finale Bindepose eine weitere Bindeenergie ( $\Delta G_{QM}$ ) durch die semiempirische Quantenmechanik-Methode GFN2-xTB [130] berechnet. GFN2-xTB wurde aufgrund seines Gleichgewichts zwischen rechnerischer Effizienz und Genauigkeit bei der Modellierung nichtkovalenter Wechselwirkungen wie  $\pi$ - oder van-der-Waals-Wechselwirkungen gewählt [167], welche in dem verwendeten System von großer Bedeutung sind.  $\Delta G_{QM}$  wurde unter Verwendung der freien Energien des Zielmoleküls, des Adsorbensmodells und des gebildeten Komplexes anhand von Formel 2.35 berechnet. Wenn die prozentuale Abweichung ( $PD$ ) zwischen  $\Delta G_{MM}$  und  $\Delta G_{QM}$  mehr als 25 % betrug, wurde die Pose als falsch-positiv betrachtet. Dieses künstliche Stoppkriterium wurde gewählt, da eine vollständige Minimierung der Pose durch GFN2-xTB zu hohe Anforderungen an die Rechenleistung stellen würde. Somit wurde eine Balance zwischen der Erreichung einer

präzisen vollständigen Minimierung und der Verwaltung der Rechenkosten innerhalb des Hochdurchsatz-Workflows gefunden. In der Praxis sollten also durch die Verwendung von QM-basierten Einpunktenergie-Berechnungen falsch-positive Posen effektiv identifiziert und die Bindeenergien gleichzeitig verfeinert werden.

Nach der Identifizierung einer falsch-positiven Pose wurde diese aus der Liste der 100 ausgegebenen Posen der Docking-Simulation entfernt. Anschließend wurde die Bindungspose in der Liste mit dem nächstniedrigeren Docking-Score für die weiter folgende Nachbearbeitung ausgewählt. Dies umfasste, wie zuvor, eine erneute Runde der MacroModel-Minimierung, gefolgt von MM-GBSA- und GFN2-xTB-Berechnungen. Sobald eine Bindepose eine  $PD$  kleiner als 25 % aufwies, wurde diese zusammen mit ihrer entsprechenden Bindeenergie gespeichert. Anschließend wurden alle verbleibenden Docking-Posen der Liste, welche eine molekulare Überlappung mit dieser gespeicherten Pose aufwiesen, gelöscht. Der Prozess wurde anschließend nochmals dreimal wiederholt und somit wurden vier verschiedene Bindeposen für jedes Zielmolekül ohne überlappendes Volumen generiert. Diese finalen vier Posen und deren Bindeenergien waren die letztendlichen Ausgaben der Simulation. Zur Veranschaulichung der Abfolge der Simulationsschritte ist der gesamte simulative Workflow als Flussdiagramm in Abbildung 3.2 dargestellt. Die Eingabeparameter der einzelnen Simulationsschritte sind in den Tabellen B.4 und B.5 im Anhang aufgeführt, wobei die Standardeinstellungen verwendet wurden, wenn keine spezifischen Parameter erwähnt sind.



**Abbildung 3.2.:** Veranschaulichung der Abfolge der Simulationsschritte des zweiten simulativen Workflows - Das Flussdiagramm zeigt die angewandten Simulationsschritte zur Berechnung von Bindeposen und -energien zwischen Peptiden und atomaren Modellen von Chromatographiearsoberflächen.

### 3.2.3. Automatisierung der Simulationen in WMSs

Trotz des vielversprechenden Potenzials und der fortschreitenden Entwicklungen in molekularen Simulationen ist deren breite Anwendung in der chromatographischen Forschung nach wie vor eingeschränkt. Eine vielversprechende Lösung zur Überwindung dieser Hürde könnte die Nutzung von Workflow-Management-Systemen (WMSs) darstellen. Diese Softwareumgebungen sind speziell darauf ausgelegt, die Automatisierung von Simulationen und das Datenmanagement, insbesondere auf Supercomputing-Plattformen, zu erleichtern. WMSs ermöglichen die Planung und parallele Verarbeitung einzelner Aufgaben und bieten zugleich flexible Gestaltungsmöglichkeiten für komplexe Workflows. Ein besonderer Vorteil dieser Systeme liegt in der Bereitstellung benutzerfreundlicher grafischer Oberflächen, welche es Forschern unabhängig von ihrem Vorwissen ermöglichen, fortschrittliche molekulare Modellierungen über optimierte „Ein-Klick“-Operationen durchzuführen. Dadurch wird die Zugänglichkeit anspruchsvoller Simulationsmethoden erhöht, was deren Anwendung in der wissenschaftlichen Forschung erheblich erweitern kann.

In diesem Kapitel werden zwei WMSs, SimStack und KNIME, vorgestellt, welche eingesetzt wurden, um die entwickelten Modellierungsansätze zu automatisieren. Der erste Workflow, welcher der Erstellung molekularer Oberflächenmodelle von Chromatographieharzen dient, wurde durch das WMS SimStack automatisiert. Die Methodik der mehrstufigen Simulationsschritte ist detailliert in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Die Automatisierung und Implementierung dieses Workflows wurde von Dr. Modan Liu entwickelt.

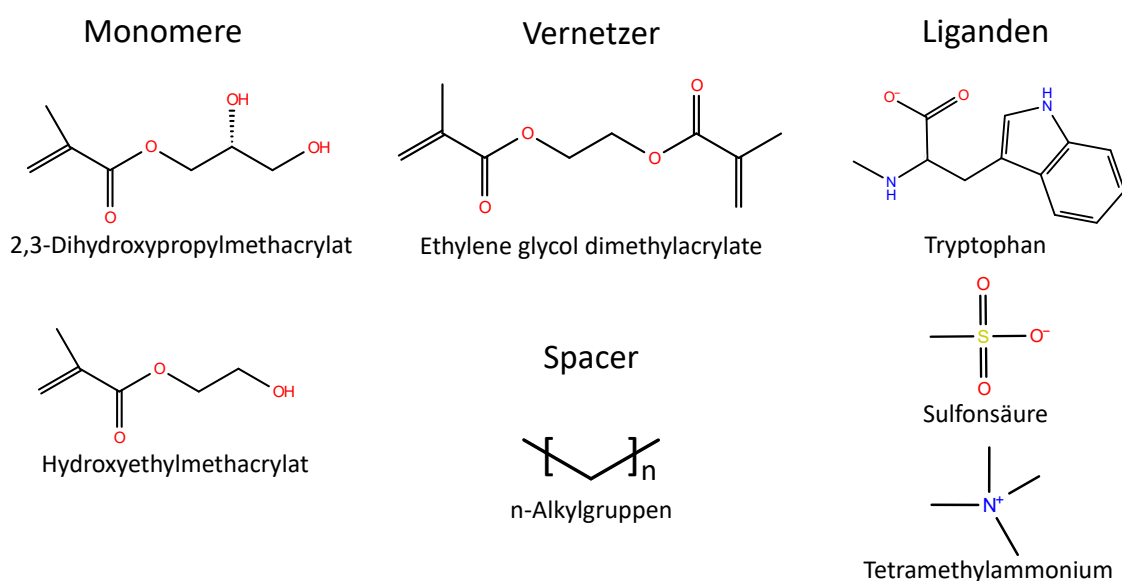
In SimStack können Workflows in mehrere Unterkomponenten unterteilt werden, welche als aktive Workflow-Knoten (engl.: *Workflow Active Nodes* (WaNos)) bezeichnet werden. Jedes WaNo ist typischerweise einer spezifischen Simulationssoftware und dem dazugehörigen Simulationsprotokoll zugeordnet, beispielsweise VASP für DFT-basierte Einzelpunktberechnungen, oder LAMMPS für atomare und grobkörnige Molekulardynamik-Simulationen. Die Zwischenergebnisse werden zwischen den WaNos nahtlos übertragen, sodass die Ausgabe eines Vorgänger-WaNos direkt als Eingabe für das nachfolgende WaNo verwendet werden kann.

Zur Automatisierung wurde der Workflow zur Generierung von methacrylatbasierten Chromatographieharzoberflächen in fünf Blöcke unterteilt, für welche jeweils ein WaNo entwickelt wurde. Der SimStack-Workflow beginnt mit einem speziellen Eingabe-WaNo, welcher die benötigten Bausteine für das Chromatographieharz als Eingabeparameter sammelt. In diesem „Input\_Polymer-Building-Blocks“ WaNo können Anwender die chemische Zusammensetzung des Chromatographieharzes festlegen. Zur Erweiterung der Funktionalität des Workflows wurden neben den in Kapitel 3.2.1 vorgestellten Harzbausteinen weitere gängige Ionenaustausch-Liganden, kurze Spacer-Moleküle und methacrylatbasierte Monomere integriert. Das Harz wird somit aus vier Hauptbausteinen konstruiert: methacrylatbasierte Monomeren und Vernetzern, sowie Spacern und Liganden. Die Spacer

dienen hierbei als Abstandhalter zwischen Monomeren und Liganden und bestehen aus linearen Alkylketten, deren Länge variabel durch eine Benutzereingabe gewählt werden kann. In der aktuellen Version des Workflows kann bei dem Monomeren zwischen HEMA und DHPMA gewählt werden, der Vernetzer ist EGDMA, und bei dem Liganden kann zwischen Trp, Sulfonsäure und Tetramethylammonium entschieden werden. Die Strukturen aller auswählbaren Polymerbausteine sind in Abbildung 3.3 dargestellt.

Anschließend folgt das „CG-Polymerisation“ WaNo, welches zur dynamischen Erzeugung eines Kremer-Grest-Polymers in grobkörniger Auflösung dient. Hier wird zuerst die Polymerisation des methacrylatbasierten Rückgrats und anschließend die Bindung der Liganden an die Monomere simuliert. Die Dimensionen der Simulationsbox sind wichtige benutzerdefinierte Eingabeparameter dieses WaNos. Die Dichte des Polymers wird sowohl durch die Größe der Simulationsbox als auch durch die absolute Anzahl der Moleküle im „Input\_Polymer-Building-Blocks“ WaNo bestimmt. Das dritte WaNo Namens „Conversion\_CG-to-AA“ wandelt die grobkörnige Darstellung in eine atomistische Darstellung um. Dabei werden AA-Vorlagen der spezifizierten Bausteine aus dem „Input\_Polymer-Building-Blocks“ WaNo genutzt. Bei der Umwandlung werden zunächst die atomistischen Molekülstrukturen gemäß der Vorlage aus dem CG-Polymernetzwerk platziert und verbunden. Danach werden die Kraftfeldparameter angepasst.

Im anschließenden „MD-Relaxation“ WaNo wird schließlich die Molekulardynamik-Simulation zur Strukturrelaxation durchgeführt, wobei ein erweiterter Skriptmodus verwendet wird, um die Simulation mit einem vordefinierten Simulationsprotokoll aus dem „Input\_Polymer-Building-Blocks“ WaNo und den automatisch generierten LAMMPS-Daten aus dem



**Abbildung 3.3.:** Auswählbare Polymerbausteine im SimStack-Workflow – Die Abbildung präsentiert die in der aktuellen Version des Workflows verfügbaren Monomere, Vernetzer, Spacer und Liganden, die zur Erstellung virtueller Modelle von Chromatographieharzoberflächen verwendet werden können

„Conversion\_CG-to-AA“ WaNo auszuführen. Der Workflow endet mit einem Ausgabe-WaNo („Output\_AA-structure“), welches die einfache Extraktion der endgültigen atomistischen Struktur im LAMMPS- oder MOL2-Datenformat ermöglicht. Hierfür werden mittels der Bindungsinformationen aus dem „Conversion\_CG-to-AA“ WaNo die Bindungstypen, wie tetraedrische „C-C“- , aromatische „C-C“- , „C=C“- und „C=O“-Bindungen während der Konvertierung der LAMMPS-Daten in das MOL2-Format zugewiesen. Die MOL2-Datei kann anschließend als Eingabe in die Schrödinger-Software für das Screening von Bindeposen und -energien von Peptiden verwendet werden.

Der zweite simulative Workflow (siehe Kapitel 3.2.2) wurde vollständig in KNIME Version 4.7.1 unter Verwendung der Schrödinger-Erweiterungen aus dem Release 2023-2 automatisiert. In KNIME bestehen Workflows aus Knoten, welche einzelne Simulations- oder Datenverarbeitungsschritte des Gesamtprozesses repräsentieren. Zur besseren Übersicht können bei großen Workflows mehrere Knoten zu einem Metaknoten zusammengefasst werden. KNIME wurde aufgrund der vorhandenen Integration von Schrödinger-Erweiterungen gewählt, welche vorkonfigurierte Knoten für wichtige Simulationsschritte, wie Glide LigPrep, Glide Docking, MacroModel-Minimierung und Prime MM-GBSA bereitstellen. Zusätzlich kam der „Volume Overlap Matrix“-Knoten zum Einsatz, um Posen zu eliminieren, welche sich mit einer zuvor gespeicherten Pose überschneiden. Der „Run Maestro Command“-Knoten wurde verwendet, um Befehle innerhalb von Maestro auszuführen, wie beispielsweise die Zusammenführung der Zielmolekül- und Adsorbensstruktur zu einer Datei, was für den MacroModel-Minimierungsschritt erforderlich war. Zusätzlich wurde derselbe Knoten genutzt, um die Strukturen nach der Minimierung wieder zu trennen, das Modell durch Entfernen von Atomen, welche mehr als 15 Å vom Zielmolekül entfernt waren, zu verkleinern und die so entstandenen Schnittstellen mit Wasserstoff zu sättigen.

Da kein vorkonfigurierter Knoten für die semiempirische QM Einzelpunktenergie-Berechnungen zur Verfügung stand, wurde der „Chemistry External Tool“-Knoten verwendet, um die GFN2-xTB-Simulationen einzurichten. Die Ergebnisse der Simulation, einschließlich der berechneten freien Energien des Zielmoleküls, des Adsorbens und ihres Komplexes, wurden in einem vorgesehenen Unterordner gespeichert. Ein benutzerdefiniertes Python-Skript, welches über den „Python Script“-Knoten ausgeführt wurde, importierte diese Energien und berechnete daraus die Bindeenergie.

Um  $\Delta G$ -Screenings für verschiedene Adsorbensstrukturen und Zielmoleküle weiter zu vereinfachen, wurden mehrere Schleifen in den Workflow integriert. Abbildung B.1 bietet eine erweiterte Ansicht des Simulationsworkflows, einschließlich aller Schleifenmechanismen. Die so erweiterte Funktionalität des Workflows ermöglicht Benutzern nun mehrere Docking-Raster von virtuell entworfenen Chromatographieharzen zusammen mit SMILES-Strings mehrerer Zielmoleküle gleichzeitig einzugeben. Der Workflow verarbeitet jedes Harz nacheinander durch einen Schleifenmechanismus, wobei für jedes Harz iterativ durch

alle Zielmoleküle gescreent wird. Dieser automatisierte Ansatz erleichtert die Berechnung von  $\Delta G$  für jede mögliche Kombination von Zielmolekül und Chromatographieharz. Nach Abschluss der Simulationen werden alle berechneten  $\Delta G$ -Werte in einer Excel-Tabelle zusammengefasst, welche systematisch nach den entsprechenden Docking-Raster und Zielmolekülnamen organisiert ist, aus denen die jeweiligen  $\Delta G$ -Werte berechnet wurden. Die dazugehörigen Bindeposen werden in ein Schrödinger-Projekt importiert.

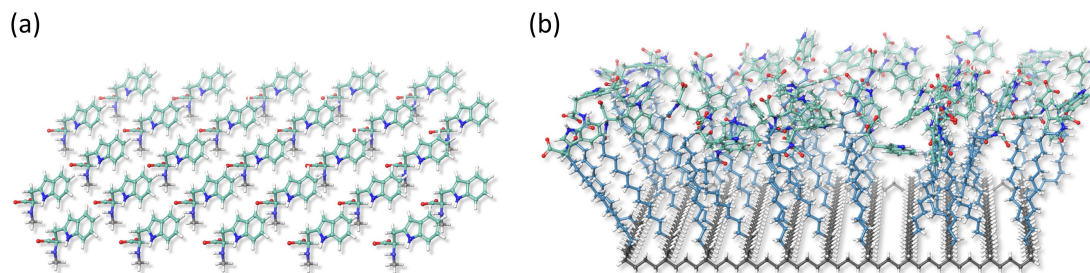
#### 3.2.4. Vergleich mit etablierten Modellen der Harzoberfläche

Zur Bewertung der Effektivität des entwickelten molekularen Oberflächenmodells des Chromatographieharzes (MOC), wurden dieses mit etablierten Ansätzen zur Modellierung von Harzoberflächen verglichen. Nach Durchsicht der vorhandenen Literatur wurde festgestellt, dass die bisherigen Modellansätze zur Darstellung von Harzoberflächen im Allgemeinen in zwei verschiedene Kategorien eingeordnet werden können. Die erste Kategorie umfasst Modelle, bei welchen die Liganden im Raum fixiert sind und eine planare Oberfläche mit einheitlicher Ligandenausrichtung erzeugen, was zu hochsymmetrischen Modellen führt [12, 14, 10, 15, 168, 169, 170]. Im Gegensatz dazu beinhalten die Modelle der zweiten Kategorie Liganden, welche an Kohlenstoffketten oder ähnliche Abstandshalter gebunden sind, welche wiederum mit einer planaren oder leicht gekrümmten Oberfläche verbunden sind [96, 171, 172, 173]. Diese Konfiguration ermöglicht eine größere Ligandenmobilität, was nach einer Energieminimierung zu einer inhomogenen Oberflächenerscheinung führt. Die meisten Studien ermittelten einen optimalen Ligandenabstand von 5 bis 15 Å [14, 96], ein Wert, welcher auch bei der Modellierung des MOC angestrebt wurde, um realistische Ligandendichten zu replizieren.

Für jede Kategorie wurde ein Modell mithilfe des „Build“-Werkzeugs in Maestro 13.6 (Schrödinger Release 2023-2) erstellt. Visuelle Darstellungen der beiden erzeugten Standard-Modelle sind in Abbildung 3.4 dargestellt. Im ersten der Ligandenmodelle (LM1, gezeigt in Abbildung 3.4a) sind die Liganden einheitlich ausgerichtet und durch ein einzelnes Kohlenstoffatom frei im Raum verankert. Im zweiten Ligandenmodell (SM2, dargestellt in Abbildung 3.4b) sind die Liganden an C12-Kohlenstoffketten gebunden, welche mit einer flachen Kohlenstoffoberfläche verbunden sind. Vor der Berechnung des Docking-Rasters wurden alle Modelle einer Energieminimierung unterzogen, für welche das MacroModel-Modul verwendet wurde. Während dieses Prozesses wurden die verankernden Kohlenstoffatome in LM1 und die Kohlenstoffoberfläche, welche mit den C12-Ketten in LM2 verbunden ist, fixiert, um die strukturelle Stabilität der Modelle zu gewährleisten.

Nach dem Minimierungsprozess wurde ein Docking-Raster mit einer Mittelpunktsbox von 40 Å innerhalb jedes Modells zentriert. Um zu verhindern, dass Zielmoleküle an den Kohlenstoffketten oder an Bereichen unterhalb der Modelloberfläche adsorbieren, wurden diese Regionen während der Rastererzeugung als ausgeschlossene Volumina definiert.

Diese Raster dienten als Eingaben für den in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Workflow zur Berechnung der Bindeenergien mit Zielmolekülen.



**Abbildung 3.4.:** Etablierte Modelle von Chromatographieharzoberflächen – Die Abbildung zeigt zwei anhand von etablierten Ansätzen erstellte Modelle von Harzoberflächen für einen Vergleich mit dem entwickelten MOC. Das LM1 (a) setzt sich aus Liganden zusammen, welche im Raum verankert sind und eine planare Oberfläche bilden, während die Liganden von LM2 (b) an C12-Kohlenstoffketten gebunden sind, welche wiederum mit einer planaren Kohlenstoffoberfläche verankert sind. Beide Modelle vereinfachen die Oberfläche, indem das Trägermaterial des Harzes nicht berücksichtigt wird.



### 3.3. Entwicklung eines flexiblen Robotiklabors für Hochdurchsatzscreenings

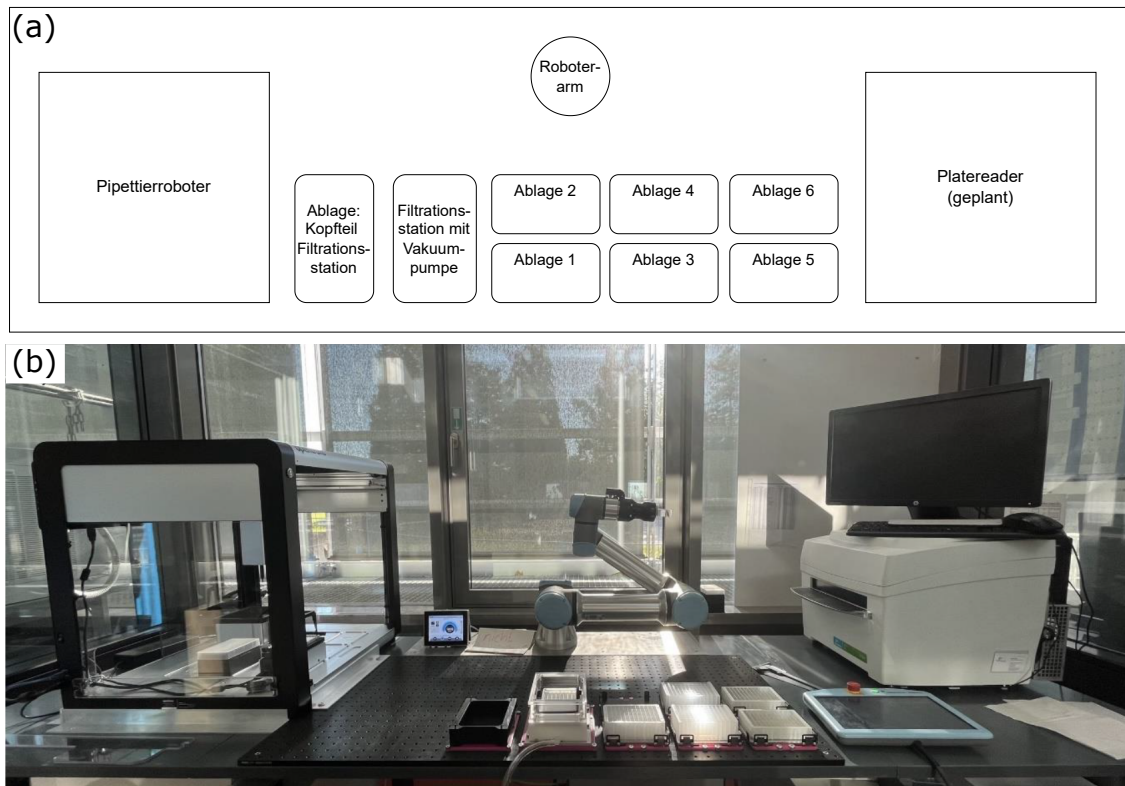
Um die simulativen Ergebnisse aus Kapitel 3.2 zu validieren, wurden experimentell Adsorptionsisothermen mit den für diese Arbeit ausgewählten Peptiden und Chromatographieharz aufgenommen. Für eine aussagekräftige Validierung waren genaue und reproduzierbare experimentelle Ergebnisse essentiell. Deshalb wurde ein Robotiklabor implementiert, welches Adsorptionsisothermen teilautomatisiert aufnehmen kann. Durch Laborautomatisierung kann die Effizienz der Versuche und die Qualität der Ergebnisse maximiert werden. Der Hauptvorteil für diese Arbeit besteht in der Standardisierung und Gleichschaltung dieses Prozesses, was zu einer höheren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und der Eliminierung menschlicher Fehlerquellen führt. Zusätzlich kann durch die höheren Durchsatzraten dieser Prozesse die Verarbeitung einer größeren Anzahl von Proben ermöglicht werden.

In diesem Kapitel werden die Methoden zur teilautomatisierten Aufnahme von Adsorptionsisothermen beschrieben. Zunächst wird die Etablierung des Robotiklabors, einschließlich des Aufbaus und des Gesamtkonzepts zur Steuerung des Labors sowie der Ansteuerung der einzelnen Geräte, erläutert. Abschließend werden die durchgeführten Versuche zur Aufnahme von Adsorptionsisothermen mittels chargenweisen Inkubationsversuchen in 96-Well Filterplatten beschrieben.

#### 3.3.1. Aufbau und Automatisierungskonzept des Robotiklabors

Dieses Unterkapitel beschreibt den Aufbau des Robotiklabors sowie das zugrundeliegende Automatisierungskonzept. Zunächst werden der Aufbau und das Steuerungssystem des Labors erläutert, gefolgt von einer detaillierten Beschreibung der verwendeten Geräte und ihrer Ansteuerung. Das Automatisierungskonzept sowie dessen Umsetzung wurde von B. Sc. Jonathan Döttling im Rahmen seiner Bachelorarbeit erarbeitet.

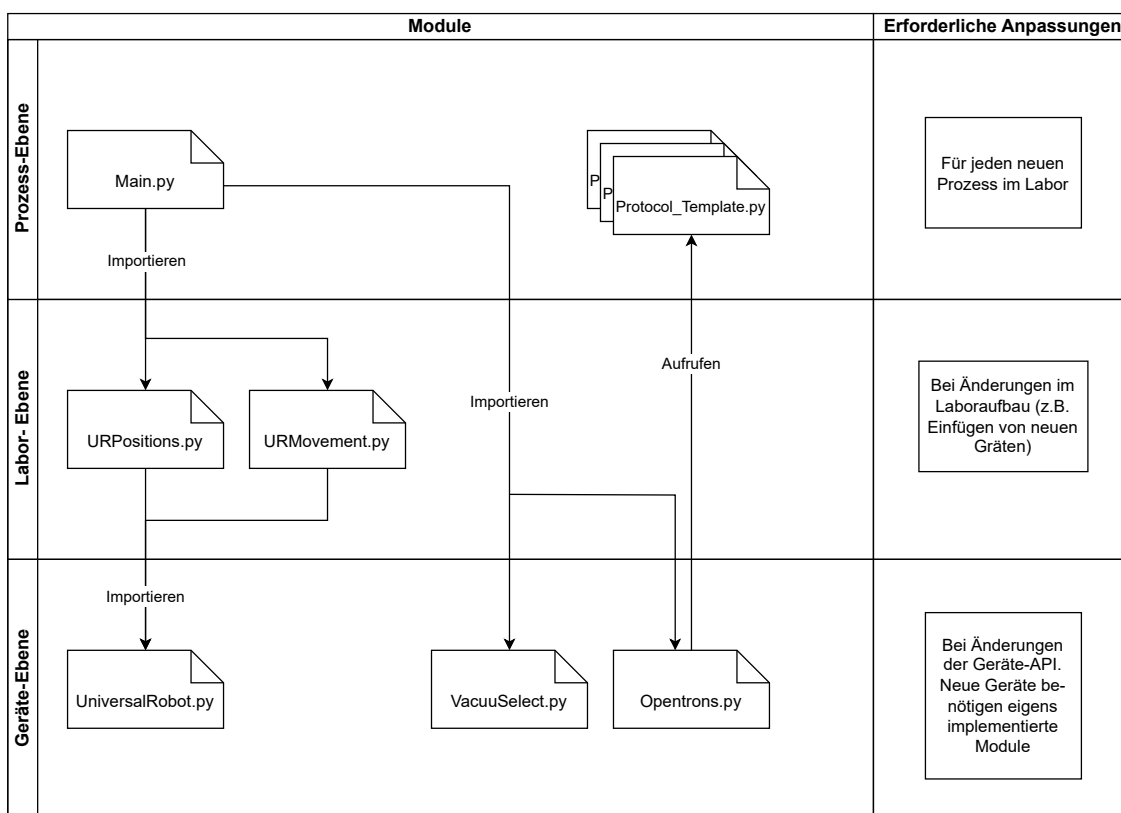
Das Robotiklabor bestand zum Zeitpunkt dieser Arbeit aus dem Pipettierroboter (engl.: *Liquid Handling Station* (LHS)) OT-2 von Opentrons, dem Roboterarm UR5e von Universal Robots und der Vakuumpumpe MD 4 Vario select von Vacuubrand, welche über Schläuche mit einer Filtrationsstation verbunden war. Das Labor wurde speziell für die Durchführung von Experimenten im 96-Well-Format konzipiert. Eine schematische Darstellung und ein Foto des Labors sind in Abbildung 3.5 dargestellt. Zentral wurde der Roboterarm verbaut, welcher zum Plattentransfer zwischen den Geräten diente. Links befand sich der LHS, mit welchem alle Prozessschritte zur Flüssigkeitshantierung durchgeführt wurden. Rechts war ein Platz für einen Tecan Spark Platereader vorgesehen, welcher jedoch zum Zeitpunkt der Arbeit nicht verfügbar war, sodass der finale Plattentransfer zur UV-Spektrometrie manuell durchgeführt werden musste. Vor dem Roboterarm befanden sich sechs Ablagepositionen für 96-Well Platten sowie eine Station zur Filtration mit 96-Well Filterplatten. Um den hierfür benötigten Unterdruck zu erzeugen, war die



**Abbildung 3.5.:** Schematische Darstellung und Fotografie des Robotiklabors - (a) zeigt eine schematische Darstellung in Draufsicht und (b) eine Fotografie des Robotiklabors mit allen verwendeten Geräten und Ablagepositionen.

Unterseite der Filterstation an der Vakuumpumpe angeschlossen. Links davon befand sich eine Ablage für das abnehmbare Kopfteil der Station, das für den Zugang zu den Auffangplatten im Inneren entfernt werden musste. Das Kopfteil wurde an dieser Ablage in einer definierten Position zwischengelagert, um es für das spätere Anbringen wieder mit dem Roboterarm anheben zu können. Die Steuerung des Robotiklabors erfolgte über ein leicht anpassbares Python-Programm. Für jedes Gerät wurde eine spezifische Klasse entwickelt, deren Methoden die Steuerung des jeweiligen Geräts ermöglichten. Durch den objektorientierten Ansatz können bei späteren Ergänzungen des Labors neue Geräte problemlos integriert werden, indem zusätzliche Objekte der entsprechenden Klasse im Hauptprogramm integriert werden. Diese Klassen waren in separate Module unterteilt, um ein übersichtliches und strukturiertes Labor-Framework mit verschiedenen Ebenen zu schaffen. Änderungen im Labor konnten somit leicht nachvollzogen und entsprechende Module angepasst werden.

Abbildung 3.6 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Ebenen des Steuerungssystems und die zugehörigen Module. Auf der Geräteebe befinden sich die Module zur Ansteuerung der Geräte: UR5e (UniversalRobot.py), OT-2 (Opentrons.py) und MD4 Vario select (VacuuSelect.py). Diese Module mussten nur bei herstellerseitigen Änderungen der Geräte-APIs oder zur Implementierung neuer Funktionen modifiziert werden. Soll ein weiteres Gerät integriert werden, muss ein neues Modul für dessen Ansteuerung ent-



**Abbildung 3.6.:** Übersicht des modularen Aufbaus des Steuerungssystems des Robotiklabor – Die Abbildung zeigt die verschiedenen Ebenen des Steuerungssystems und die zugehörigen Module, welche zur Ansteuerung der Geräte, Definition von Bewegungsabläufen und Steuerung des gesamten Prozesses verwendet wurden. Zusätzlich werden erforderliche Anpassungen bei Änderungen in einzelnen Ebenen erklärt.

wickelt werden. Auf der Laborebene befinden sich die Module, welche spezifische, sich wiederholende Prozesse innerhalb des Robotiklabors definieren, wie Positionen, welche der UR5e ansteuern soll (URPosition.py), oder Bewegungsabläufe, welche dieser ausführt (URMovement.py). Diese Module mussten bei Änderungen des Laboraufbaus oder bei neuen Bewegungsabläufen angepasst werden. Auf der Prozessebene befinden sich die Module, welche für jeden automatisierten Prozess neu angepasst werden mussten. Dazu gehörten das Hauptprogramm (Main.py), welches den gesamten Ablauf steuert, und die Protokolle, welche der OT-2 ausführen soll (siehe Kapitel 3.3.2).

### 3.3.2. Ansteuerung des Pipettierroboters

Der Opentrons OT-2 ist ein Tischplatten-Pipettierroboter mit vielfältigen Anpassungsmöglichkeiten durch austauschbare Module. Der Roboter verfügt über 11 Steckplätze für Module, Gestelle oder Wellplatten, sowie einen fest installierten Abfallbehälter. Der Roboterarm kann mit zwei Pipetten mit Volumenbereichen von 1–20 µL, 20–300 µL, 100–1000 µL sowie einer 8-Kanal-Multipipette für 20–300 µL bestückt werden. Zusätzlich ist ein Thermoschüttler-Modul in Slot 1 verbaut, welches Erhitzen bis 95°C und horizontales Schütteln mit Drehzahlen von 200 bis 3000 rpm ermöglicht.

Dank seines Open-Source-Ansatzes und einer Python-API bietet der OT-2 flexible Programmiermöglichkeiten. Die Opentrons-eigene API wurde entwickelt, um eine leicht zugängliche Laborautomation in Python zu ermöglichen. Ein Automatisierungsprogramm, das diese API verwendet, wird als Protokoll bezeichnet. Ein Protokoll gliedert sich in mehrere Abschnitte. Zunächst werden Metadaten wie API-Version, Protokollname, Zweck und Autor definiert. Anschließend werden die eingesetzten Pipetten, Pipettenspitzen, Module, Wellplatten und Probengestelle initialisiert. Hierfür stellt die API von Opentrons Klassenobjekte zur Verfügung. Für Wellplatten und Probengestelle gibt es neben bestehenden Klassen einen Klassengenerator auf der Hersteller-Webseite, mit welchem benutzerdefinierte Laborware basierend auf deren Maße erstellt werden kann. Nach der Initialisierung können die durch die API bereitgestellten Pipettierbefehle genutzt werden, um lineare oder iterative Pipettierschritte auszuführen. Zusätzlich wurde die Transferfunktion um eine Nachverfolgung des Füllstandes der Proberöhrchen erweitert. Dies ermöglichte die Pipetten nur bis zur minimal nötigen Tiefe in die Probelösung einzutauchen und so Ungenauigkeiten durch verbleibende Tropfen an der Außenseite der Pipette zu minimieren. Zusätzlich wurde die „Touch-Tip“-Funktion verwendet, um dennoch verbleibende Tropfen am Rand des Wells abzustreifen. Die erstellten Protokolle können in die von Opentrons bereitgestellte App geladen und manuell auf einem verbundenen OT-2 ausgeführt werden. Für eine vollständige Automatisierung ist ein manuelles Starten jedoch unpraktikabel, da dies eine Anwenderinteraktion erfordert.

Um den Start eines Protokolls zu automatisieren, wurde zunächst die Möglichkeit der direkten Verbindung per SSH mit dem im OT-2 verbauten Raspberry Pi, welcher das Gerät steuert, in Betracht gezogen. Dabei kann das Protokoll direkt über die Befehlszeile oder über die Standard-Bibliothek *subprocess* von Python ausgeführt werden. Allerdings gehen bei dieser Methode alle Zusatzfunktionen verloren, welche die Opentrons-App bietet, wie die Übertragung von Kalibrierungsdaten für die Positionierung der Pipetten, welche somit anderweitig erfasst und initialisiert werden müssten. Zusätzlich musste das Hauptprogramm pausiert werden, während die SSH-Verbindung aufgebaut war. Diese erwies sich als problematisch, da der Datenaustausch über den Protokollfortschritt zwischen dem OT-2 und dem Hauptprogramm behindert wurde.

Daher wurde die Steuerung des OT-2 schließlich über die HTTP API implementiert. Diese ist eine alternative und umfassendere Steuerungsmöglichkeit, welche von Opentrons als primäre Kommunikationsmethode zwischen der App und dem OT-2 genutzt wird und ebenso direkt von einem Python-Programm angesprochen werden kann. Die *Representational State Transfer* (REST) API kommuniziert über JSON-Anfragen und -Antworten. Durch die Nutzung der HTTP API können alle Funktionen des OT-2, welche über die App zugänglich sind, auch direkt angesteuert werden. Zudem ermöglicht dies eine einfachere Nutzung der Kalibrierungsdaten aus der Opentrons-App. Hierfür wurde die Open-Source-Bibliothek *requests* verwendet, um vordefinierte JSON-Objekte, welche

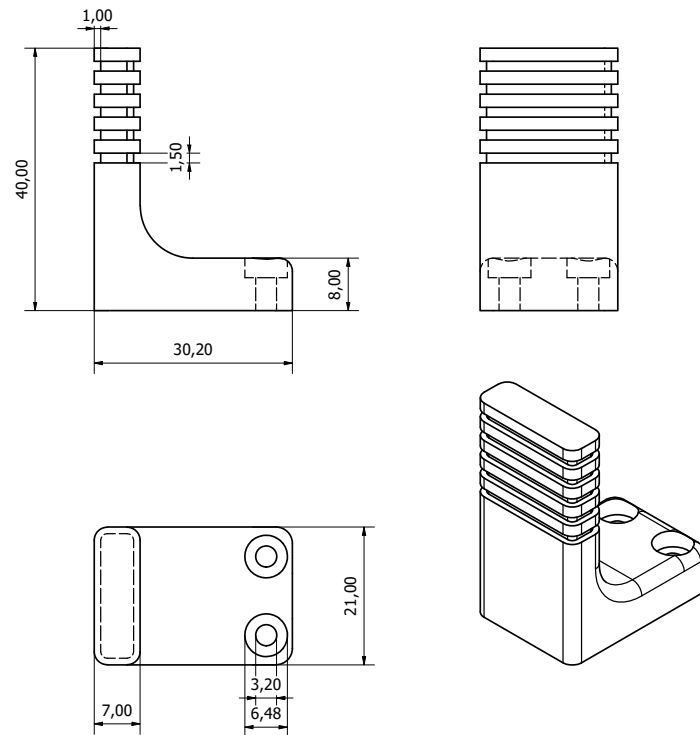
mit der Python-Standard-Bibliothek *json* erstellt wurden, zwischen dem Hauptprogramm und dem OT-2 auszutauschen. Dies ermöglichte das Hochladen und Ausführen eines Protokolls auf den OT-2. Zusätzlich konnte der Status des aktuellen Protokolldurchlaufs abgefragt werden. Diese Funktion war essentiell für eine Kommunikation zwischen den Laborgeräten. Denn erst sobald der Pipettiervorgang beendet ist, kann beispielsweise der Roboterarm die Platte zur nächsten Station transportieren.

Zusammenfassend bietet die HTTP API eine leistungsfähige und flexible Lösung zur Steuerung des Opentrons OT-2, welche die Einschränkungen der direkten SSH-Verbindung überwindet und eine umfassende Nutzung der von Opentrons bereitgestellten Funktionalitäten ermöglicht. Mit dieser API konnten fertige Opentrons Protokolle automatisiert an den Pipettierroboter geschickt und ausgeführt, sowie der Status des Geräts abgefragt werden.

### 3.3.3. Ansteuerung des Roboterarms

Der Universal Robots 5e ist ein Roboterarm mit sechs Gelenken. Er hat eine Reichweite von 850 mm und kann Lasten bis zu 5 kg anheben. An seinem unterem Ende wurde er in seiner Arbeitsumgebung, in diesem Fall an eine Tischplatte, montiert. An seinem oberen Ende wurde ein adaptiver Greifer (Robotiq Hand-E) befestigt. Die mitgelieferten metallenen Arme des Greifers erwiesen sich jedoch als unzureichend, da sie nicht weit genug öffnen konnten, um 96-Well-Platten zu greifen. Aus diesem Grund wurden sie durch speziell entwickelte, additiv gefertigte Greifarme ersetzt. Das Design, wie in Abbildung 3.7 dargestellt, wurde mit einem Stratasys Objet260 Connex 1-2-3 3D-Drucker aus VeroClear, einem methylnmethacrylatbasierten Material, hergestellt. Diese L-förmigen Greifarme sind mit je zwei Löchern in der Basis ausgestattet, an welchen sie am Greifer befestigt wurden. Um die Greifeigenschaften zu verbessern, wurden an den Spitzen der Greifarme je fünf O-Ringe mit einer Dicke von 2 mm und einem Innendurchmesser von 20 mm in 1 mm tiefe Rillen angebracht. Tests zeigten, dass die neuen polymerbasierten Greifarme auch der maximalen Kraft und Geschwindigkeit, mit denen der Greifer öffnet und schließt, standhielten.

Der UR5e kann direkt über einen angeschlossenen Touchscreen gesteuert werden, auf welchem die Steuerungssoftware Polyscope läuft. Diese Software ermöglicht die Aufnahme von Wegpunkten, indem der Roboter entweder im Freedrive-Modus von Hand oder mithilfe der Pfeiltasten der grafischen Benutzeroberfläche in die gewünschte Position bewegt wird. Diese Wegpunkte können anschließend durch *Drag and Drop* über Bewegungsfunktionen zu einem Workflow verknüpft werden. Über die Software können diese Workflows als Skripte der UR-eigenen Steuersprache URScript gespeichert und auf einen USB-Stick exportiert werden. Über eine TCP/IP-Verbindung können so exportierte Skripte an den UR5e gesendet und ausgeführt werden.



**Abbildung 3.7.:** Technische Zeichnungen des additiv gefertigten Greifarms - Die Abbildung zeigt verschiedene Ansichten des 3D-gedruckten Greifarms, welcher an den adaptiven Greifer des Roboterarms montiert wurde. Design und Entwicklung von Dr.-Ing. André Tschöpe (KIT).

Zum empfangen von URScript-Befehle verfügt der Steuerungsrechner des UR5e über einen TCP/IP-Server. Über Port 30001 können sowohl vollständige Skripte als auch einzelne Befehle gesendet werden. Zusätzlich sendet der Server Roboterzustandsdaten und weitere Informationen mit einer Frequenz von 10 Hz an verbundene Clients. Diese Daten werden als Multibyte-Zeichenfolgen im 8-Bit *Universal Coded Character Set Transformation Format* (UTF-8) kodiert und in verschiedene Unterpakete aufgeteilt. Eine Übersicht über den Aufbau dieser Nachrichten ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Die ersten vier Bytes geben die Länge der gesamten Nachricht an, während das fünfte Byte den Nachrichtentyp enthält. Anschließend folgen die verschiedenen Unterpakete, welche ebenfalls aus einer Längenangabe in den ersten vier Bytes, einer Typenidentifizierungszahl im nächsten Byte und den eigentlichen Informationen bestehen. Die spezifischen Datentypen dieser Informationspakete sind detailliert in der Dokumentation des UR5e beschrieben. Von besonderem Interesse sind die *Robot State*-Nachrichten mit dem messageType 16 sowie die Unterpakete *Robot Mode Data* (packageType 0) und *Joint Data* (packageType 1), da diese den aktuellen Zustand des Roboters überwachen. Um diese API zu nutzen, muss der Client eine Verbindung mit dem Server herstellen, UTF-8-kodierte Befehle senden und die empfangenen Statusnachrichten dekodieren und verarbeiten. Es ist zu beachten, dass die Echtzeiteigenschaften des UR5e über diese primäre API nicht vollständig genutzt werden können, da die Befehle vom Roboter kompiliert werden müssen, was die

4 bytes (int)	Länge des Gesamtpakets
1 byte (uchar)	Nachrichten-Typ
4 bytes (int)	Länge des Pakets
1 byte (uchar)	Paket-Typ
n bytes (int)	Inhalt des Pakets
4 bytes (int)	Länge des Paktes
1 byte (uchar)	Paket-Typ
m bytes (int)	Inhalt des Paktes
...	...

**Abbildung 3.8.:** Aufbau der Zustandsnachrichten des UR5e - Die Abbildung zeigt die Struktur der vom UR5e gesendeten Nachrichten, welche über die Primäre Schnittstelle auf Port 30001 gesendet werden. Die Multibyte-Zeichenfolge ist in UTF8 kodiert und in verschiedene Unterpakete unterteilt.

Aktualisierungsrate beeinträchtigen kann.

Um einen Prozess zu automatisieren, mussten zunächst alle Positionen definiert werden, welche der Roboterarm hierbei anfahren muss. Dazu wurde der Roboter mittels der zuvor beschriebenen Funktionen über den Touchscreen an die gewünschten Stellen bewegt. Die exakten Positionen wurden durch Abwarten der nächsten übertragenen Nachricht des UR5e mit dem messageType 16 und Dekodieren des Unterpakets mit dem packageType 1 mithilfe der Python-Standardbibliothek *struct* erfasst. Diese so erhaltenen Gelenkpositionen in Radiant wurden in einem Modul namens UR-Position in einer Position-Datenklasse gespeichert. Ein weiteres Modul des Hauptskripts namens URMovement fasste mehrere Methodenaufrufe zur Bewegungs- und Greifer-Steuerung zusammen, darunter auch Methoden zum Aufnehmen und Abstellen von Laborware an festgelegten Positionen. Eine leicht oberhalb der Greifposition definierte Abstellposition verhinderte Kollisionen der Laborware mit der Ablagefläche. Um einen Bewegungsablauf zu erstellen, konnten die gespeicherten Positionen durch Bewegungsbefehle verbunden werden. Der MoveJ-Befehl, welcher ein Objekt der Positionsklasse sowie optional zwei Werte für maximale Geschwindigkeit (m/s) und maximale Beschleunigung (m/s<sup>2</sup>) erfordert, sendet einen UTF-8-kodierten URScript-Befehl an den UR5e. Dabei bewegt sich der Greifer entlang

einer linearen Beschleunigungskurve, was zu einer kurvenförmigen Bewegung führt. Der MoveL-Befehl funktioniert ähnlich, bewegt den Greifer jedoch auf einem linearen Weg zwischen Start- und Zielposition. Für eine effektive Kommunikation zwischen den Geräten war es notwendig, den Status des Roboterarms kontinuierlich abzufragen. Dazu wurde auf die nächste übertragene Nachricht des UR5e mit dem messageType 16 gewartet und das Unterpaket mit dem packageType 0 dekodiert. Der im Paket enthaltene boolesche Wert „isProgramRunning“ diente zur Überwachung des aktuellen Status des Roboterarms.

### 3.3.4. Ansteuerung der Vakuumpumpe

Die Vacuubrand MD 4 VARIO select ist eine dreistufige Membranpumpe mit einem maximalen Saugvermögen von 5,7 m<sup>3</sup>/h und einem Endvakuum von 1 mbar. Ihre Steuerung erfolgt über den Vacuuselect-Controller, welcher durch vordefinierte Vakuumprozesse eine benutzerfreundliche Anwendung im Labor ermöglicht. Der Controller verfügt über eine TCP/IP-Modbus-API auf Port 502, welche Schreib- und Lese-Register zur Prozesssteuerung und -überwachung bereitstellt. Tabelle 3.2 bietet eine Übersicht über die verwendeten Register und deren Werte.

Um die Pumpe zu steuern, wurde die Python-Bibliothek pymodbus verwendet, welche das Lesen und Schreiben der Modbus-Register ermöglicht. Zuerst wurde eine TCP/IP-Modbus-Verbindung mit der aktuellen IP-Adresse des Pumpencontrollers hergestellt. Danach wurde der Fernsteuerungsmodus des Controllers aktiviert. Im nächsten Schritt wurde der Zielwert für den vorgefertigten Prozess „Vakuum regeln“ auf den gewünschten Zielunterdruck gesetzt und die Prozessdauer in Sekunden festgelegt. Nach Abschluss dieser Einstellungen wurde der Fernsteuerungsmodus des Controllers deaktiviert und die Modbus-Verbindung geschlossen.

**Tabelle 3.2.:** Verwendete Modbus-Register und -Werte zur Steuerung der Vakuumpumpe.

Register	Register Beschreibung	Wert	Wert Beschreibung
40802	Fernsteuerungsmodus	0	Fernsteuerung Aus
		1	Fernsteuerung Ein
40902	Prozess ID	0	Abpumpen
		6	Vakuum regeln
41104 - 41106	Druck	0,001 - 1	Einzustellender Druck in bar
41107	Drehzahl	0 - 100	Maximale Drehzahl in %
40903	Prozess Modus	0	Prozess Stopp
		1	Prozess Start
40909	Prozessdauer	0 - ∞	Prozessdauer in s



### 3.4. Aufnahme von Adsorptionsisothermen

Um die Affinität der Peptide an das Chromatographieharz experimentell zu bestimmen, wurden Adsorptionsisothermen aufgenommen. Hierbei wurden Lösungen mit spezifischen Konzentrationen des Zielmoleküls mit einer definierten Menge an Chromatographiematerial inkubiert, bis der Adsorptionsprozess sein Gleichgewicht erreichte. Alternativ kann die Konzentration des Zielmoleküls konstant gehalten und unterschiedliche Mengen an Chromatographieharz hinzugefügt werden. Für die Darstellung der Isotherme, wird die Beladung des Harzes über die verbleibende Zielmolekülkonzentration in Lösung im Gleichgewicht aufgetragen. Schließlich können die Datenpunkte durch einen Fit gängiger Isothermenmodelle, wie dem Langmuir-Modell, approximiert werden.

Für eine spätere Validierung der Simulationen aus Kapitel 3.2 sind sehr genaue und reproduzierbare experimentelle Ergebnisse von entscheidender Bedeutung. Aus diesem Grund wurde das in Kapitel 3.3 entwickelte Robotiklabor verwendet, um die Qualität der Ergebnisse zu maximieren und den Einfluss menschlicher Fehler zu minimieren. Die chargenweisen Inkubationschromatographieexperimente zur Aufnahme der Adsorptionsisothermen wurden in 96-Well Filterplatten durchgeführt. Hierbei wurde das Volumen pro Messpunkt der Isotherme auf das Volumen eines Wells herunterskaliert. Zusätzlich konnten in einer Filterplatte 96 Messpunkte gleichzeitig gemessen werden. Durch diese Miniaturisierung und Parallelisierung der Adsorptionsversuche konnte die benötigte Menge an Zielmolekülen minimiert und der Durchsatz der Experimente maximiert werden. Die Automatisierung des gesamten Prozesses in der Robotikanlage trug ebenso zu einer zusätzlichen Erhöhung des Durchsatzes und einer Minimierung des erforderlichen Arbeitsaufwands bei.

In den folgenden Kapiteln werden die Prozessschritte zur teilautomatisierten Aufnahme von Adsorptionsisothermen in 96-Well Filterplatten erläutert. Als erstes wird das Verfahren der Befüllen der Filterplatten mit Chromatographieharz vorgestellt. Anschließend wird dargelegt, wie der Inkubationsprozess mit dem Robotiklabor automatisiert und getestet wurde. Abschließend wird auf die Aufnahme der Adsorptionsisothermen von Peptiden eingegangen.

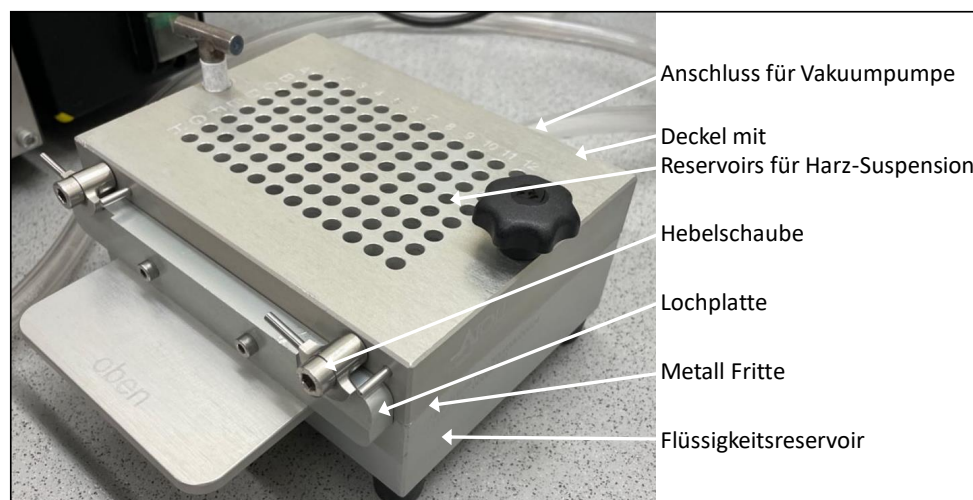
#### 3.4.1. Befüllung der Filterplatten mit Chromatographieharz

Zu Beginn wurde jedes Well der Filterplatten mit einer definierten Menge an Chromatographieharz befüllt. Dabei war entscheidend, nicht nur die gleiche Masse an Harz in jedes Well zu geben, sondern auch eine repräsentative Partikelgrößenverteilung zu gewährleisten. Eine übliche Methode zur Befüllung von Filterplatten besteht darin, eine definierte Menge einer geschüttelten Lösungsmittel-Harz-Suspension in die einzelnen Wells zu pipettieren. Diese Methode hat jedoch den Nachteil, dass kleinere Harzpartikel in einer geschüttelten Suspension höher aufsteigen als größere, wodurch die aufgesammelten Partikelgrößen in

Abhängigkeit der Eindringtiefe der Pipette variieren können. Dies kann zu einer nicht repräsentativen Verteilung der Partikelgrößen in den Wells führen [82].

Um dieses Problem zu umgehen, wurde der ResiQuot [82] von MediaScout (Abbildung 3.9) zur Befüllung der Filterplatten eingesetzt. Hierbei wurden AcroPrep Advance 0,2  $\mu\text{m}$  Supor 96-Well Filterplatten von Pall mit einem Well-Volumen von 1 mL verwendet. Der ResiQuot hat eine Abdeckung mit Löchern, welche der Anordnung der Wells einer Standard 96-Well-Mikrotiterplatte entsprechen und als Reservoirs für die Chromatographiematerial-Suspension dienen. Unterhalb der Abdeckung befindet sich eine perforierte Metallplatte mit definierten Bohrungen, welche ein exaktes Volumen von 7,7  $\mu\text{L}$  haben und zentral unter den Reservoirs der Abdeckung angeordnet sind. Darunter befindet sich eine Metallfritte mit einer Porengröße von 10  $\mu\text{m}$ . Das unterste Bauteil ist ein großes zusammenhängendes Reservoir unter der Fritte, welches mit einem Adapter verbunden ist, an welchem eine Vakuumpumpe angeschlossen werden kann. Die Bauteile wurden fest aufeinander geschraubt, wobei durch Hebelschrauben sichergestellt wurde, dass die perforierte Platte an ihrer definierten Position fixiert ist. Zur Abdichtung zwischen den Bauteilen sind O-Ringe verbaut.

Vor der Befüllung musste das Chromatographieharz gewaschen werden, um mögliche Faserrückstände aus der Synthese zu entfernen, welche die Poren der Fritte oder der Filterplatten verstopfen könnten. Dazu wurden 10 mL der gekauten Suspension in ein Probengefäß pipettiert und gewartet, bis sich die Harzpartikel abgesetzt hatten. Der Überstand wurde dann durch Pipettieren entfernt. Anschließend wurden 15 mL von 20 % (v/v) Ethanol hinzugefügt und die Suspension gemischt. Nachdem sich die Partikel erneut abgesetzt hatten, wurde dieser Vorgang wiederholt. Das gewaschene Chromatographieharz wurde in ein Reservoir für Multipipetten gefüllt, der MediaScout ResiQuot zusammengebaut und an eine Vakuumpumpe angeschlossen.



**Abbildung 3.9.:** Aufbau des MediaScout ResiQuot zur Befüllung von 96-Well-Filterplatten - Die Abbildung zeigt den ResiQuot im zusammengebauten Zustand.

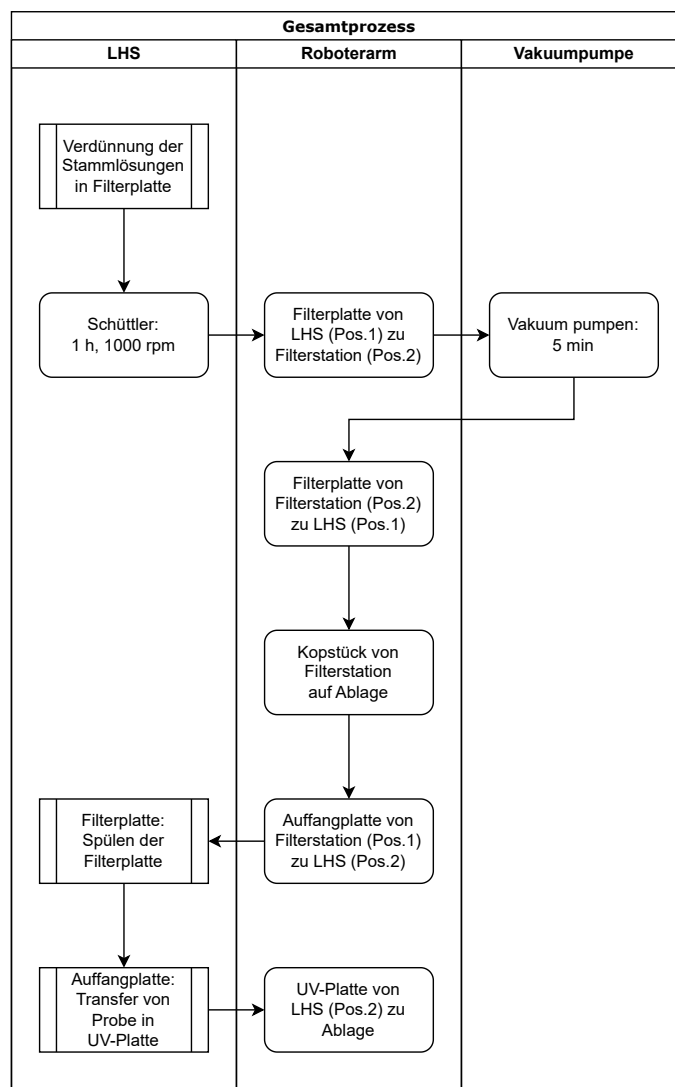
Mit einer Multipipette wurden 70  $\mu\text{L}$  der Suspension in jedes Well des ResiQuot pipettiert. Falls ein Well nicht ausreichend gefüllt war, wurde mit einer Einfachpipette zusätzliche Suspension hinzugefügt. Danach wurde die Pumpe eingeschaltet und ein Vakuum von 1 mbar eingestellt. Danach wurden jedes Well nochmals mit 300  $\mu\text{L}$  20 % Ethanol gespült. Durch das Vakuum an der Unterseite wurde die Flüssigkeit von den Reservoirs, über die Bohrungen der perforierten Platte in das untere Reservoir gezogen. Die Harzpartikel wurden von der Fritte zurückgehalten und verblieben somit in den Bohrungen der Platte. So entstanden gleichmäßig gepackte Pellets in den Bohrungen.

Nachdem alle Bohrungen vollständig mit Partikeln gefüllt waren, wurde 90 Sekunden lang bei angelegtem Vakuum gewartet. Dadurch trockneten die Partikel so weit, dass sie zusammenhaftende Pellets bildeten. Der ResiQuot wurde anschließend auseinandergebaut, um die perforierte Platte zu entnehmen. Überschüssige Partikel an der Ober- und Unterseite der Platte wurden abgewischt und die Pellets in den Bohrungen mit einem speziellen Stempel in 96-Well-Filterplatten gedrückt. So erhielt jedes Well einen 7,7  $\mu\text{L}$  Partikelplaque. Abschließend wurden 200  $\mu\text{L}$  20 % Ethanol in jedes Well pipettiert, um die Plaques zu lösen und ein Austrocknen des Harzes zu verhindern. Zum Einlagern wurde die Filterplatte mit einer Abdeckfolie versiegelt. Durch diese Vorgehensweise konnte eine gleichmäßige und repräsentative Größenverteilung des Chromatographieharzes in den Wells gewährleistet werden, was für genaue experimentelle Untersuchungen von entscheidender Bedeutung ist.

### 3.4.2. Automatisierung der chargenweisen Inkubationschromatographie

Im Folgenden wird der durch das Robotiklabor automatisierte Prozessablauf der chargenweisen Inkubationschromatographie zur Aufnahme von Adsorptionsisothermen detailliert beschrieben. Vor Beginn des automatisierten Ablaufs mussten einige manuelle Schritte durchgeführt werden. Zuerst wurden die Filterplatten gemäß Kapitel 3.4.1 mit Chromatographieharz gefüllt. Zusätzlich wurden Pufferlösungen angesetzt und Stammlösungen der Zielmoleküle hergestellt. Vor Beginn des Experiments musste die Filterplatte im entsprechenden Puffer equilibriert werden. Um ein Austrocknen des Harzes zu verhindern, wurde der Puffer in den Filterplatten erst kurz vor Beginn des Experiments in der Filtrationsstation abgepumpt. Anschließend wurde die Filterplatte auf den Schüttler des LHS platziert. Der Puffer und die Stammlösungen wurden in Probenröhrchen abgefüllt und in die vorgesehenen Gestelle des LHS gestellt.

Nun konnte der automatisierte Laborprozess gestartet werden. Abbildung 3.10 zeigt ein Fließschema des Gesamtprozesses. Zunächst wurden die Stammlösungen mit den jeweiligen Puffern in der Filterplatte verdünnt, um eine definierte Zielmolekülkonzentration in jedem Well einzustellen. Dabei wurde darauf geachtet, zuerst den Puffer und dann die Stammlösung zum Chromatographieharz in den Wells zu pipettieren, um zu verhindern, dass die Zielmoleküle bereits mit der höheren Stammlösungskonzentration an das

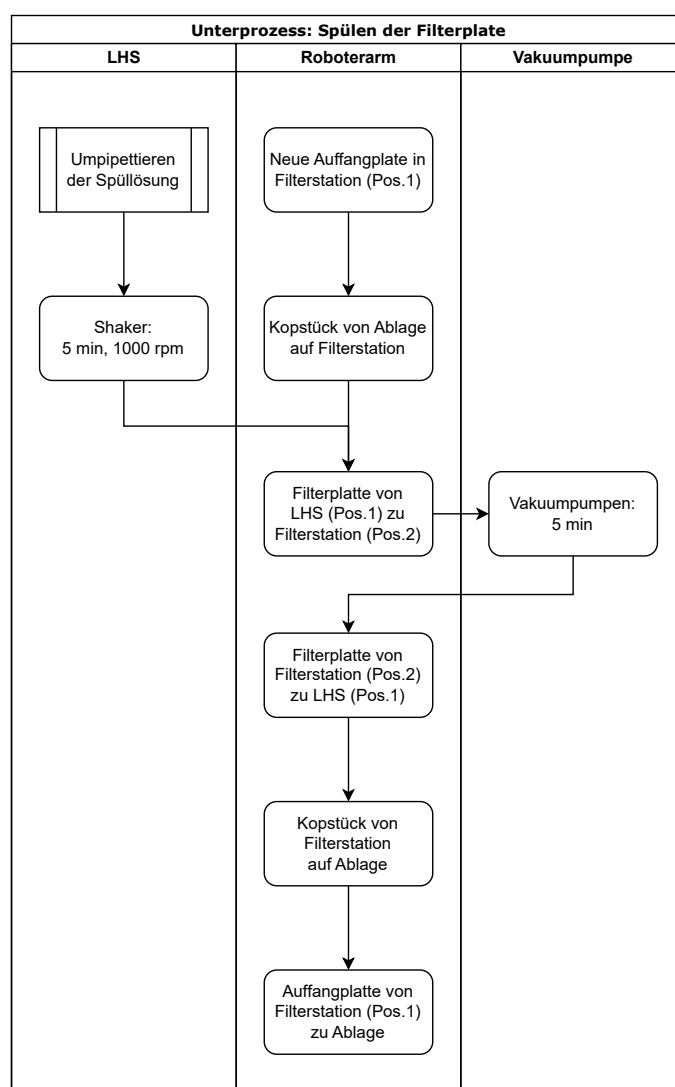


**Abbildung 3.10.:** Fließschema des automatisierten Gesamtprozesses zur Aufnahme von Adsorptionsisothermen - Die Abbildung zeigt die einzelnen Schritte des automatisierten Laborprozesses und durch welches Laborgerät sie durchgeführt wurden.

Harz binden. Nachdem die Filterplatte gefüllt war, wurde sie für 1 Stunde bei 1000 rpm geschüttelt. Anschließend setzte der Roboterarm die Platte auf die obere Ablage der Filtrationsstation (Pos. 1). Durch das Anlegen von Vakuum wurde die Flüssigkeit durch den Filter aus den Wells gezogen. In der unteren Ablage der Filtrationsstation (Pos. 2) befand sich eine 96-Well-Auffangplatte mit einem Well-Volumen von 1 mL, in welcher die durch die Filter gepumpte Flüssigkeit aufgefangen wurde. Nachdem die gesamte Flüssigkeit aus den Wells entfernt war, stellte der Roboterarm die Filterplatte wieder auf den Schüttler des LHS. Das Kopfstück der Filtrationsstation wurde durch den Roboterarm entfernt und auf die dafür vorgesehene Ablage gesetzt. Nachdem das Kopfstück entfernt war, konnte der Roboterarm die Auffangplatte erreichen und auf Position 2 des LHS abstellen. Um ein Austrocknen des Chromatographieharzes zu verhindern, wurde anschließend ein Unterprozess zum Spülen der Platte gestartet. Danach wurde die Flüssigkeit in der Auffangplatte durch den LHS in eine UV-Platte (UV-Star 96-Well-Mikrotiterplatten, Greiner Bio-One

GmbH) pipettiert. Proben mit hoher UV-Absorbanz wurden dabei verdünnt. Abschließend stellte der Roboterarm die UV-Platte auf eine der Plattenablagen. Die Konzentration der Proben wurde mittels UV-Spektroskopie in einem Plattenlesegerät (Tecan Spark) bestimmt.

Der Spülprozess der Filterplatte ist in Abbildung 3.11 als Flussdiagramm dargestellt. Dieser Prozess kann beispielsweise verwendet werden, um die Platten zu waschen, zu eluieren, zu reequilibrieren oder einzulagern. Zu Beginn setzt der Roboterarm eine neue Auffangplatte in Position 1 der Filterstation und bringt das Kopfstück anschließend wieder an. Währenddessen wird die für das Spülen der Platten vorgesehene Flüssigkeit von dem LHS in die Wells transferiert. Danach wird die Platte bei 1000 rpm geschüttelt. Im Folgenden wird die Flüssigkeit in den Filterplatten, wie bereits beim Gesamtprozess beschrieben, in



**Abbildung 3.11.:** Fließschema des Unterprozesses für das Spülen der Filterplatten - Die Abbildung stellt den Ablauf des Spülprozesses, sowie die Laborgeräte für dessen automatisierte durchgeführt dar. Der Prozess kann zum Waschen, Eluieren, Reequilibrieren oder Einlagern der Filterplatten verwendet werden.

der Filterstation entfernt. Diesmal wird die Auffangplatte anschließend jedoch nicht zum LHS gebracht, sondern auf eine der Ablagen für Platten gestellt. Dieser Spülvorgang kann beliebig oft wiederholt werden und ist nur durch die Anzahl der verfügbaren Ablageflächen begrenzt.

### 3.4.3. Funktionstest des Robotiklabors

In diesem Kapitel wird die Erprobung des etablierten Robotiklabors (Kapitel 3.3) und des automatisierten Prozessablaufs zur Aufnahme von Isothermen (Kapitel 3.4.2) beschrieben. Als Zielmolekül wurde der Farbstoff Methylenblau verwendet, welcher sich aufgrund seiner Absorption im sichtbaren Lichtspektrum sowohl mit dem menschlichen Auge als auch für mittels UV-Spektrometrie gut detektieren lässt. Der Farbstoff war für erste Tests zudem eine kostengünstige Alternative zu den biopharmazeutischen Peptiden.

Zur Vorbereitung der Versuche wurden zunächst 100 mM Natriumacetatpuffer mit pH 4 und eine Stammlösung von 0,5 g/L Methylenblau hergestellt. Eine Kalibriergerade der Stammlösung wurde erstellt, indem die Konzentration von 0,05 g/L bis 0,5 g/L in Schritten von 0,05 g/L erhöht wurde, was zu zehn Messpunkten führte. Die Absorptionsspektren dieser Lösungen wurden mit dem Spark Multimode-Mikroplatten-Reader von Tecan aufgenommen. Für die photometrischen Konzentrationsbestimmungen wurde eine Wellenlänge von 400 nm gewählt. Die Absorptionswerte des reinen Puffers wurden von den Absorptionswerten der Farbstofflösungen subtrahiert, um den Einfluss der Pufferlösung zu eliminieren. Diese bereinigten Werte wurden gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen und mithilfe eines linearen Fits wurden Geradengleichungen zur späteren Berechnung der Farbstoffkonzentrationen aus den Absorptionsmessungen erstellt.

Um mögliche Fehlerquellen während der automatisierten Aufnahme der Isothermen zu vermeiden, wurde vor jedem Versuch zunächst ein Testprogramm ausgeführt. Dieses Programm überprüfte die korrekte Ansteuerung aller Laborgeräte und ob die Kalibrierung des LHS oder des Roboterarms aktualisiert werden musste. Dabei wurden alle Arten von Pipettenspitzen einmal aufgenommen und der Benutzer musste die erfolgreiche Aufnahme bestätigen. Falls die Aufnahme fehlschlug, musste die Kalibrierung des OT-2 per Opentrons-App erneuert werden. Zudem wurden einige Positionen des UR5e überprüft, um sicherzustellen, dass dieser die Platten korrekt greifen und abstellen konnte. Hierfür wurde eine Platte von Ablage 1 gegriffen, in die Pumpstation gestellt und anschließend in den OT-2 transferiert. Der Benutzer bestätigte das erfolgreiche Greifen und Abstellen. Falls dies fehlschlug, wurden Anweisungen zur Rekalibrierung der UR5e-Positionen gegeben. Schließlich wurde die Pumpe für 10 Sekunden bei 10 % der maximalen Drehzahl betrieben. Bei Verbindungsfehlern gab das Programm Anweisungen zur Behebung, welche die Überprüfung der IP-Adressen und Operationsmodi der Geräte beinhalteten. Durch

dieses Testprogramm konnten Fehler während der Versuchsausführung, welche schwer zu korrigieren wären, vermieden werden.

Nach einem erfolgreichen Labortest wurde der in Kapitel 3.4.2 beschriebene Prozess sowohl mit als auch ohne Adsorbens in den Filterplatten getestet. Ohne Adsorbens konnte überprüft werden, ob in jedes Well die richtige Konzentration eingestellt wird und ob der Filter einen Teil des Farbstoffs adsorbiert. Mit Adsorbens konnten schließlich Adsorptionsisothermen aufgenommen werden. Hierfür wurden die Platten zuvor mit Chromatographieharz befüllt (siehe Kapitel 3.4.1). Im ersten Unterprozess „Verdünnung der Stammlösungen in Filterplatte“ wurden Puffer- und Farbstoffstammlösungen in 12 Verdünnungsschritten mit dem LHS in 96-Well Filterplatten pipettiert. In den ersten Well wurden 50 µL Farbstoffstammlösung und 550 µL Puffer gegeben. Mit jedem Schritt wurde das Volumen der Farbstoffstammlösung um 50 µL erhöht und das Puffervolumen entsprechend verringert, um das Gesamtvolumen von 600 µL konstant zu halten. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt, um Mehrfachbestimmungen durchzuführen. Nach dem Abpumpen der Farbstofflösung wurde der zweite Unterprozess „Spülen der Filterplatten“ mehrmals hintereinander angewendet. Zuerst wurden die Platten mit Wasser gewaschen, um zu verhindern, dass Salze in der folgende Elution mit 20 % Ethanol ausfallen. Um alle Reste an Farbstoff vollends von den Harzpartikeln zu entfernen, wurde insgesamt dreimal hintereinander eluiert. Danach wurde die Platte wieder mit Wasser gewaschen und für weitere Versuche mit Puffer equilibriert. Von der Auffangplatte wurden 200 µL jeder Probe mit dem LHS in eine Messplatte pipettiert. Nach Abschluss des automatisierten Teilprozesses wurde die Messplatte manuell in den UV/VIS-Plattenleser gestellt und die Absorption bei den ermittelten Wellenlängen gemessen. Mit den zuvor bestimmten Gera-dengleichungen konnten die Absorptionswerte in Konzentrationen umgerechnet werden, um die Genauigkeit des Prozesses zu überprüfen.

Nach der Messung der Gleichgewichtskonzentrationen der mobilen Phase konnte die Beladung im Gleichgewichtszustand mit folgender Formel berechnet werden:

$$q^* = \frac{(c_0 - c^*) \cdot V_0}{V_{\text{ads}}} \quad (3.1)$$

Hierbei ist  $q^*$  die Gleichgewichtsbeladung des Farbstoffs an das Adsorbens in g/L,  $c^*$  die Gleichgewichtskonzentration des Farbstoffs in Lösung in g/L,  $c_0$  die initiale Farbstoffkonzentration in g/L,  $V_0$  das Gesamtvolumen der zugegebenen Lösung in L und  $V_{\text{ads}}$  das Volumen des zugegebenen Adsorbens pro Well in L. Aus den Vierfachbestimmungen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Gleichgewichtsbeladung wurde gegen die Gleichgewichtskonzentration aufgetragen und Datenpunkte durch einen Fit des Langmuir-Modells (Formel 2.12) approximiert.

#### 3.4.4. Aufnahme der Adsorptionsisothermen von Peptiden

Die Adsorption der Peptide an das Chromatographieharz wurde bei pH 4 gemessen, da dieser pH sich ideal für die Bindung an den Tryptophan Liganden eignet. Deshalb wurde ein 100 mM Acetatpuffer mit pH 4 hergestellt. Mit der Pufferlösung wurden Stammlösungen für alle 10 Peptide mit Konzentrationen von 5 g/L hergestellt. Alle Peptide waren bei dieser Konzentration löslich. Die Konzentrationsbestimmung der Peptidlösungen erfolgte photometrisch. Hierfür wurden zuerst UV-Spektren der Peptid-Stammlösungen und des Puffers im Plattenleser in einem Bereich von 200 bis 1000 nm aufgenommen. Zur Detektion wurden Wellenlängen ausgewählt, welche eine maximale Differenz mit der Adsorption des Puffers aufwiesen. Die festgelegten Wellenlängen für jedes Peptid sind in Tabelle 3.3 gelistet. Nachdem die Wellenlängen für die Messungen festgelegt waren, wurden Kalibriergeraden für alle 10 Peptide aufgenommen. Hierfür wurde simultan zu den Schilderungen in Kapitel 3.4.3 vorgegangen.

Die Bestimmung der Adsorptionsisothermen der Peptiden und dem TOYOPEARL MX-Trp-650M MMC-Harz erfolgte ebenso, wie bereits in Kapitel 3.4.3 für den Farbstoff beschrieben. Lediglich der Unterprozess „Verdünnung der Stammlösungen in Filterplatte“ wurde abgeändert. Statt einem Gesamtvolumen von 600  $\mu\text{L}$  wurden 300  $\mu\text{L}$  in jedes Well pipettiert. In Spalte 1 wurden 260  $\mu\text{L}$  Pufferlösung pipettiert und bis Spalte 6 immer 40  $\mu\text{L}$  weniger. Ab Spalte 7 wurde die Reihenfolge wiederholt. Sobald alle Wells mit Puffer befüllt waren, wurde Peptidlösung hinzu pipettiert. Aufgrund des geringeren Volumens im Vergleich zu den Farbstoffen wurden für eine bessere Durchmischung nach der Stammlösungszugabe einmal 200  $\mu\text{L}$  auf- und abpipettiert. Der Unterprozess „Spülen der Filterplatten“ wurde zum Waschen mit Wasser und zur anschließenden Elution mit 40 % Ethanol verwendet. Bei einer erneuten Versuchsreihe wurden die Platten zunächst mit Wasser gewaschen und anschließend mit Puffer equilibriert. Sollten die Platten eingelagert werden, wurden sie mit 20 % Ethanol gespült und ebenso darin gelagert. Zur Kontrolle wurden vor dem Beginn des Prozesses die Konzentrationen der Stammlösungen gemessen. Die sonstige Berechnung der Beladung erfolgte wie bereits in Kapitel 3.4.3 ausgeführt.







## 4. Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse des simulativen und experimentellen Teils dieser Arbeit umfassend beschrieben und analysiert. Der erste Abschnitt widmet sich den Resultaten der Modellierungen von Chromatographieharzoberflächen sowie der Simulation von Bindeposen und -energien von Peptiden. Danach werden die Ergebnisse der automatisierten Aufnahme von Adsorptionsisothermen präsentiert. Schließlich erfolgt die experimentelle Validierung der simulativen Resultate, gefolgt von einem Benchmarking der entwickelten Modelle und Methoden mit etablierten Ansätzen. Dieses Kapitel bezieht sich auf Kapitel 3.1 bis 3.5 folgender Veröffentlichung: [160].

### 4.1. Molekulare Simulationen zur Bestimmung von Bindeenergien

Dieses Unterkapitel fokussiert sich auf die Ergebnisse der entwickelten simulativen Workflows. Zunächst wird deren Automatisierung in Workflow-Management-Systemen (WMSs) und die dabei erzielten Fortschritte vorgestellt. Daraufhin folgt eine detaillierte Betrachtung der Generierung molekularer Modelle der Oberflächen von methacrylatbasierten Chromatographieharzen. Abschließend werden die Ergebnisse der Simulationen der Adsorption von Peptiden präsentiert, aus welchen final die zu bestimmenden Bindeposen und -energien resultierten.

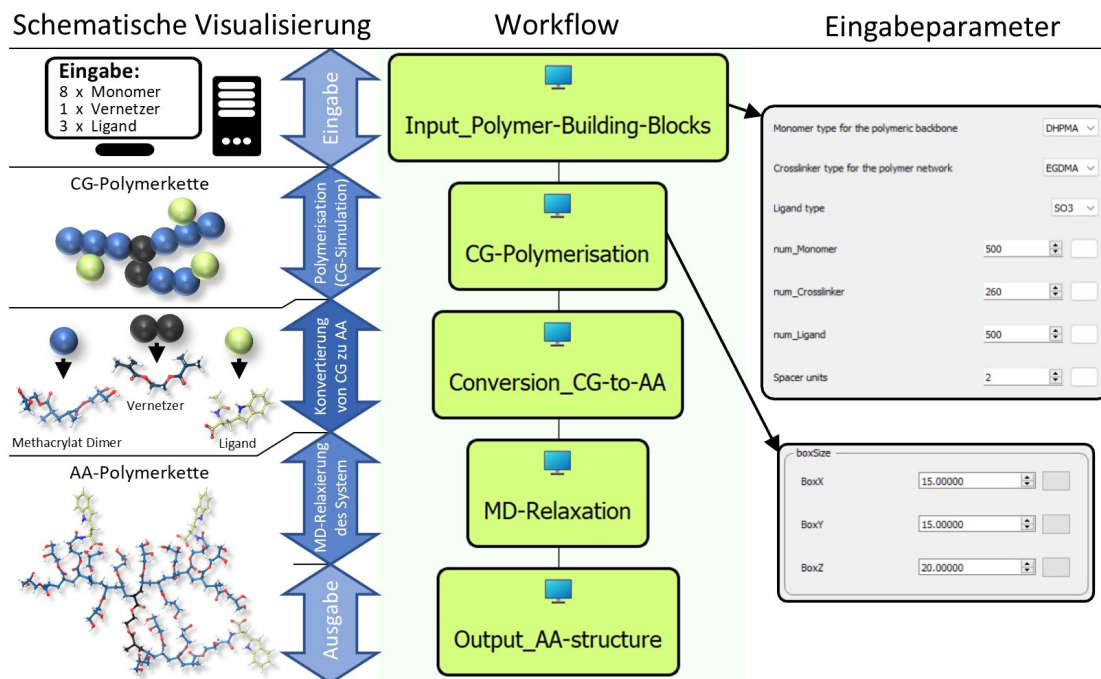
#### 4.1.1. Automatisierung der simulativen Methoden in WMSs

Um die in dieser Arbeit entwickelten simulativen Methoden für Anwender möglichst benutzerfreundlich zu gestalten, wurden diese in WMSs automatisiert. Kapitel 3.2.1 beschreibt detailliert die Methodik, während Kapitel 3.2.3 die Umsetzung des Automatisierungskonzepts für den ersten Workflow zur Generierung atomistischer Modelle der Oberflächen von Chromatographieharzen erläutert. Die aktuellste Version des Workflows kann unter folgendem Link heruntergeladen werden:

<https://github.com/KIT-Workflows/GenChromatographyResin>

Abbildung 4.1 zeigt einen Screenshot des in SimStack automatisierten Workflows mit allen, in grün dargestellten, aktiven Workflow-Knoten (engl.: *Workflow Active Nodes* (WaNos)) und deren Eingabeparametern. Auf der linken Seite der Abbildung sind die durch die jeweiligen WaNos automatisierten Simulationsschritte schematisch visualisiert. Zunächst erfolgt eine coarse grained (CG)-Simulation, welche die Polymernetzwerkstruktur anhand von Benutzereingaben erzeugt. Anschließend wird das CG-Modell in eine atomistische (engl.: *all-atom* (AA))-Darstellung umgewandelt und unter Umgebungsbedingungen relaxiert.

Auf der rechten Seite von Abbildung 4.1 wird veranschaulicht, wie Anwender im Eingabe-WaNo („Input\_Polymer-Building-Blocks“) alle relevanten Parameter für die Zusammensetzung der initialen Simulationsbox festlegen können. Über Dropdown-Menüs kann zwischen verschiedenen Monomeren, Vernetzern und Liganden gewählt werden. Alle in der aktuellen Version des Workflows verfügbaren Polymerbausteine sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Darüber hinaus können die Länge der Spacermoleküle sowie die Anzahl der einzelnen Polymerbausteinmoleküle in der initialen Simulationsbox eingestellt werden. Im „CG-Polymerisation“ WaNo lässt sich zusätzlich die Größe der Simulationsbox festlegen. Dabei ist zu beachten, dass die finale Polymerdichte nicht nur durch die Größe der



**Abbildung 4.1.:** Schematische Darstellung und Screenshot des in SimStack automatisierten Workflows zur Generierung atomistischer Modelle von Chromatographieharzoberflächen - Die linke Seite der Abbildung visualisiert schematisch die aufeinanderfolgenden Simulationsschritte. In der Mitte ist ein Screenshot der Benutzeroberfläche des Workflows in StimStack und auf der rechten Seite wird die Oberfläche zur Definition von relevanten Eingabeparametern entsprechender WaNOs dargestellt.

Simulationsbox, sondern auch durch die absolute Anzahl der Moleküle im „Input\_Polymer-Building-Blocks“ WaNo bestimmt wird. Für Hochdurchsatzsimulationen erweist es sich als vorteilhaft, zunächst die Simulationsboxgröße festzulegen und die Polymerdichte über die absolute Molekülzahl im „Input\_Polymer-Building-Blocks“ WaNo anzupassen, da das AA-Relaxationsprotokoll („MD-Relaxation“) für mittlere Simulationsboxgrößen von etwa 20x20x30 nm optimiert ist. Nach erfolgreicher Vollendung der Simulation kann der Benutzer das final relaxierte AA-Modell im LAMMPS- oder MOL2-Datenformat über das Ausgabe-WaNo („Output\_AA-structure“) herunterladen.

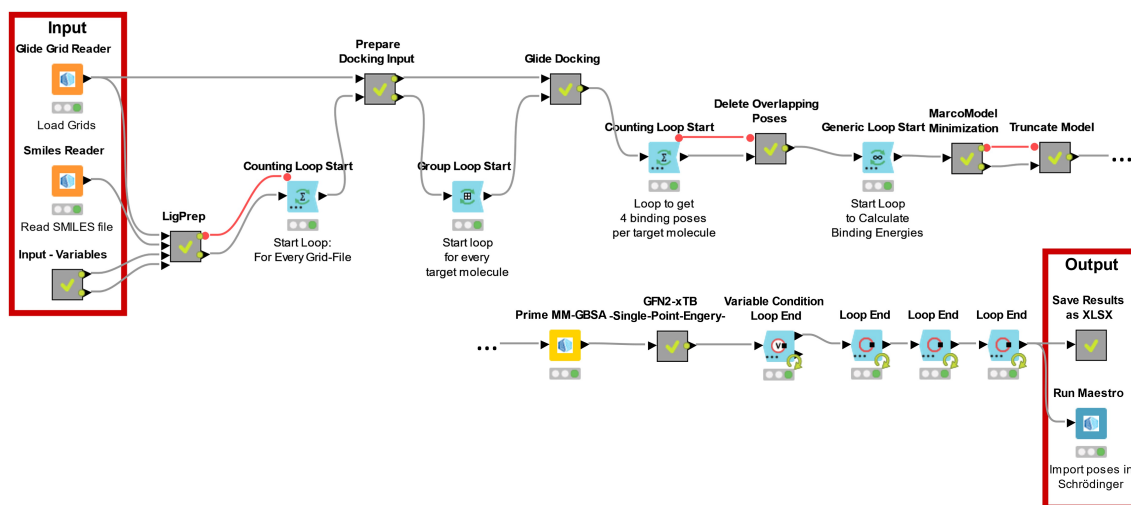
Durch die Integration von gängigen Ionenaustausch-Liganden und methacrylatbasierten Monomeren sowie Spacer-Molekülen mit variabel festlegbaren Längen, wurde eine bedeutende Erweiterung der Simulationsmöglichkeiten für die Generierung von Chromatographieharzmodellen erreicht. Die Vielfalt an auswählbaren Bausteinen ermöglicht es Nutzern, ein breites Spektrum an möglichen Chromatographieharzen zu simulieren. Neben seiner Benutzerfreundlichkeit liegt ein wesentlicher Vorteil des Workflows in seiner Flexibilität, welche es erlaubt, die molekulare Zusammensetzung der virtuellen Harze im Rahmen der implementierten Molekültypen beliebig zu variieren.

Nach der Erstellung von Docking-Rastern der molekularen Oberflächenmodelle können diese in den zweiten, in dieser Arbeit entwickelten, Workflow integriert werden, um die Bindeposen und -energien mit linearen Peptiden zu berechnen. Die hierfür zugrundeliegende Methodik wird in Kapitel 3.2.2 ausführlich beschrieben, während die Implementierung der Automatisierung in das WMS KNIME in Kapitel 3.2.3 dargelegt wird. Der Workflow lässt sich über den folgenden Link herunterladen oder direkt in eine lokal installierte KNIME-Umgebung einfügen:

<https://hub.knime.com/s/bPcNwd0wgg5zvWH3>

Abbildung 4.2 zeigt einen Screenshot des entwickelten KNIME-Workflows. Um die Komplexität zu reduzieren und die Übersichtlichkeit zu erhöhen, wurden mehrere Knoten zu einzelnen Metaknoten zusammengefasst, welche in KNIME Grau dargestellt werden. Die so erzielte Strukturierung spiegelt das in Abbildung 3.2 dargestellte Flussdiagramm des Prozesses wider und soll somit das Verständnis der aufeinanderfolgenden Rechenschritte im Workflow erleichtern. Fortgeschrittene Benutzer haben die Möglichkeit, durch einen Doppelklick auf die Metaknoten die darunterliegenden Knoten zu erkunden oder Anpassungen an der Workflow-Konfiguration vorzunehmen. Die integrierten Schleifenmechanismen des Workflows sind an hellblauen Knoten mit entsprechender Beschriftung zu erkennen. Hierdurch wurde eine gleichzeitige Eingabe mehrerer Adsorbensstrukturen und linearer Peptide ermöglicht.

Um eine Simulation zu starten, müssen Anwender lediglich die drei rot umrandeten Knoten auf der linken Seite des Workflows konfigurieren. Im „Glide Grid Reader“-Knoten



**Abbildung 4.2.:** Screenshot des entwickelten KNIME-Workflows zur Berechnung von Bindeenergien und -poses zwischen molekularen Oberflächenmodellen und Peptiden - Die grauen Metaknoten fassen mehrere Simulationsschritte zusammen. Die Integration von Schleifenmechanismen (hellblaue Knoten) ermöglicht ein automatisiertes Screening mehrerer Zielmoleküle und Harzstrukturen.

können die Docking-Raster und im „Smiles Reader“-Knoten SMILES-Dateien der Peptide hochgeladen werden. Der „Input-Variables“-Metaknoten ermöglicht die Definition zusätzlicher relevanter Eingabeparameter für die Simulation. Beispielsweise können hier die Parameter für den „LigPrep“-Knoten festgelegt werden, welcher aus den SMILES-Strings die 3D-Strukturen und die Protonierungsgrade der Peptide berechnet. Nennenswerte Eingabeparameter sind hierbei „LigPrep-ph“ und „LigPrep-pht“, welche den pH-Wert und die Toleranz des pH-Wertes in der LigPrep-Simulation festlegen. Um den Ablageort der Simulationsergebnisse zu bestimmen, muss der Benutzer einen Pfad für ein Simulationsverzeichnis angeben. Außerdem muss vor dem Start der Simulation für jedes eingegebene Docking-Raster ein SBC-Dateipfad hinterlegt werden. In diesen SBC-Dateien werden die bei der Energieminimierung zu fixierenden Atome definiert.

Nach der Eingabe der erforderlichen Parameter kann der Workflow gestartet werden, und von diesem Punkt an läuft die Simulation vollautomatisiert ab. Am Ende des Workflows werden alle Bindeenergien in einer Excel-Datei zusammengefasst und im definierten Simulationsverzeichnis gespeichert. Die Bindeposes werden für eine spätere Analyse in ein Schrödinger-Projekt importiert. Der Pfad zu diesem Projekt kann im rot umrandeten „Run Maestro“-Knoten auf der rechten Seite des Workflows festgelegt werden. Falls kein Pfad angegeben wird, öffnet sich Maestro nach Abschluss der Simulation und die Posen werden in ein nicht gespeichertes Projekt importiert.

Ein zentraler Vorteil dieses Workflows liegt in seiner Benutzerfreundlichkeit durch seine klare Strukturierung und die Möglichkeit, Parameter über leicht zugängliche Knoten anzupassen. Die Automatisierung von Simulationsschritten, welche traditionell manuelle Eingriffe erfordert hätten, wie die Kalkulation molekularer Überlappungen oder das

Zusammenführen und Trennen von Dateien, erhöht die Effizienz und minimiert Fehlerquellen beim Reproduzieren der Ergebnisse. Die Möglichkeit, Bindeenergien mehrerer Peptide mit unterschiedlichen Adsorbensstrukturen automatisiert zu simulieren, erweitert die Anwendbarkeit des Workflows auf Hochdurchsatz-Screenings, was vor allem in der frühen Prozessentwicklung von großem Wert sein kann. Die abschließende Zusammenstellung der Ergebnisse in einer strukturierten Excel-Datei erleichtert zudem die Analyse und Weiterverarbeitung der Daten.

Zusammenfassend stellen die in dieser Arbeit entwickelten Workflows zur Generierung von Chromatographieharzmodellen und zur Berechnung von Bindeposen und -energien zwischen Harzoberflächen und Peptiden einen wichtigen Schritt zur Verbesserung der Zugänglichkeit und Effizienz molekularer Simulationsmethoden in der Chromatographie dar. Durch die einfache Bedienbarkeit, insbesondere durch klar strukturierte Benutzeroberflächen und die Möglichkeit zur einfachen Anpassung von Eingabeparametern, konnten die Hürden für die Anwendung dieser komplexen Techniken deutlich gesenkt werden. Dies ermöglicht Forschern, unabhängig ihres technischen Hintergrunds, präzise und reproduzierbare Simulationen durchzuführen und in ihre tägliche Forschungsarbeit zu integrieren.

Durch die Automatisierung der simulativen Methoden in WMSs und deren öffentliche Bereitstellung soll die Chromatographiegemeinschaft ermutigt werden, diese Werkzeuge in ihrer Forschung zu integrieren und auf den entwickelten Methoden aufzubauen. Durch die gemeinschaftliche Nutzung und kontinuierliche Verbesserung dieser Werkzeuge können neue Erkenntnisse gewonnen und bestehende Methoden weiter optimiert werden. Dies könnte nicht nur die Genauigkeit der Modellierungen erhöhen, sondern auch die Entwicklung neuartiger Chromatographiematerialien und -methoden beschleunigen.

Die entwickelten Workflows stellen also nicht nur ein leistungsstarkes Werkzeug für die molekulare Modellierung in der Chromatographie dar, sondern leisten auch einen Beitrag zur Förderung der Zusammenarbeit und des Wissensaustauschs innerhalb der wissenschaftlichen Gemeinschaft. Durch die Kombination von Benutzerfreundlichkeit und öffentlicher Zugänglichkeit könnten sie zur Weiterentwicklung der molekularen Modellierung in der Chromatographie beitragen und den Grundstein für zukünftige Innovationen in diesem Bereich legen.

#### **4.1.2. Generierung molekularer Modelle der Oberflächen von methacrylatbasierten Chromatographieharzen**

Dieser Abschnitt präsentiert die Ergebnisse des ersten simulativen Workflows zur molekularen Simulation der Oberflächen von methacrylatbasierten Chromatographieharzen. Das Ziel war, die Oberfläche des kommerziellen, multimodalen Chromatographie (MMC)-Harzes TOYOPEARL MX-Trp-650M von Tosoh Bioscience so detailgetreu wie möglich zu modellieren. Die Methodik der Simulation und deren Automatisierung ist in den

Kapiteln 3.2.1 und 3.2.3 beschrieben. Zur Durchführung der Simulationen wurde der in Kapitel 4.1.1 vorgestellte SimStack-Workflow verwendet. Als Eingabewerte für den Workflow wurde eine Bindebox mit den Dimensionen 20x15x15 nm (Höhe/Breite/Tiefe) gewählt. Die initiale Molekülzusammensetzung bestand aus 690 DHPMA-Dimeren, 260 EDGMA-Vernetzern, 400 Trp-Liganden und 320 Porogenen. Die Prozessorzeit betrug 12 h für die CG-Simulation der Polymerisation, 120 h für die AA-Relaxierung und 5 h für alle restlichen Simulations- und Datenverarbeitungsschritte.

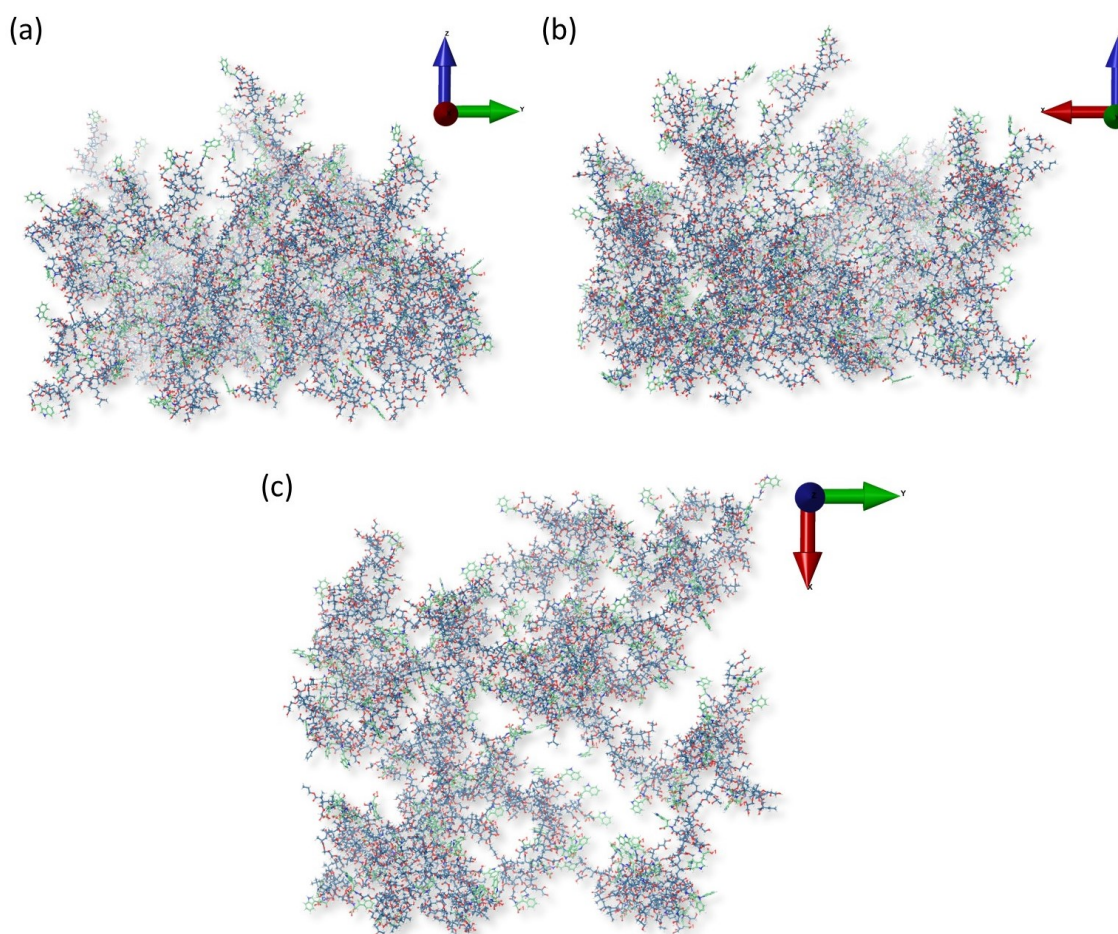
Die vom Workflow ausgegebene Struktur enthielt kleinere Polymerketten, welche nicht mit dem größeren Gesamtnetzwerk verbunden waren. Zusätzlich diffundierten einzelne größere Polymerketten durch die periodischen Randbedingungen in den oberen Teil des Modells. Alle diese Polymerketten wurden manuell entfernt. Im finalen Modell waren letztendlich 891 DHPMA, 167 EDGMA und 241 Trp Moleküle gebunden. Somit wurden 64 % der initialen Monomere und Quervernetzer und 60 % der initialen Liganden im finalen Modell inkorporiert. Das Entfernen der kleineren Polymerketten hatte also keinen signifikanten Einfluss auf den anfänglich eingestellten Quervernetzungsgrad oder das Liganden-Monomer-Verhältnis des Gesamtsystems.

Die nach einer abschließenden Energieminimierung resultierende Polymerstruktur des Harzes ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Dabei sind die Kohlenstoffatome des methacrylatbasierten Trägermaterials blau und die Kohlenstoffatome des Trp-Liganden grün gefärbt. Abbildung 4.3a und 4.3b zeigen die Seitenansichten des Modells entlang der z,y-Ebene bzw. der z,x-Ebene. Abbildung 4.3c zeigt die Draufsicht auf das Modell in der x,y-Ebene. Der obere Bereich des Modells in z-Richtung repräsentiert die mobile Phase bzw. das Innere einer Makropore, während der untere Bereich die stationäre Phase darstellt. In der Draufsicht ist erkennbar, dass mehrere Mesoporen das gesamte Modell durchdringen.

In Abbildung 4.3a und 4.3b ist zu sehen, dass effektiv eine Grenzfläche zwischen der stationären und der mobilen Phase generiert wurde. Bei der Betrachtung des Modells von oben entlang der z-Achse fallen zunächst einzelne Polymerketten auf, welche in die mobile Phase hineinragen und für eine stark inhomogene Oberfläche sorgen. Weiter unten in z-Richtung verdichtet sich die stationäre Phase zunehmend und bildet ein enges, quervernetztes Polymernetzwerk. Um diese Beobachtung quantitativ untersuchen zu können wurde das Modell entlang z-Achse geviertelt. Das oberste Viertel wies eine Atomdichte von  $2,1 \text{ nm}^{-3}$  auf. In den Abschnitten darunter erhöhte sich die Atomdichte zunächst auf  $12,5 \text{ nm}^{-3}$  und anschließend auf  $18,9 \text{ nm}^{-3}$ . Im letzten Viertel in z-Richtung blieb die Atomdichte daraufhin mit  $18,3 \text{ nm}^{-3}$  relativ konstant. Somit konnte der visuelle Eindruck, dass die Atomdichte des Modells in Annäherung an die Makroporenoberfläche immer geringer wird, bestätigt werden.

Die im finalen Modell gebundenen Liganden wiesen einen durchschnittlichen Abstand von etwa  $12 \text{ \AA}$  auf und lagen somit im angestrebten Bereich von 5 bis  $15 \text{ \AA}$ , welcher in der





**Abbildung 4.3.:** Atomares Modell der MMC-Harzoberfläche – Die Abbildung zeigt das molekulare Modell der Oberfläche des MMC-Harzes TOYOPEARL MX-Trp-650M. Die Kohlenstoffatome des methacrylatbasierten Trägermaterials sind blau und die des Trp-Liganden grün dargestellt. (a) und (b) zeigen die Seitenansichten der Harzoberfläche entlang der z,y-Ebene beziehungsweise der z,x-Ebene. (c) bietet eine Draufsicht auf die Oberfläche und zeigt Mesoporen, welche das gesamte Modell durchdringen.

Literatur als optimal für etablierte Modelle angegeben wird [14, 96]. Jedoch waren die Liganden nicht homogen im Modell verteilt, sondern wiesen ortsabhängige Dichteunterschiede über die Oberfläche des gesamten Modells auf. Um dies zu validieren wurde das Modell in der x,y-Ebene in neun gleichgroße Quader mit einer Grundfläche von 5x5 nm zerteilt. Anschließend wurde die Anzahl an Liganden in den einzelnen Quadern verglichen. Die Ligandenanzahl der Quader variierte von 26 bis 41 mit einer durchschnittlichen Ligandenanzahl von 34. Dies verdeutlicht die Existenz von lokalen Ligandenclustern und ebenso Bereichen mit geringeren Ligandenkonzentrationen. Durch die Polymerketten, welche in das Innere der Makropore ragen und die Mesoporen in der Adsorbensoberfläche, ist außerdem eine signifikante Variation der Ligandenkoordinaten in z-Richtung zu beobachten. Diese Eigenschaft hebt das Modell insbesondere von etablierten Chromatographieharzmodellen mit planaren Oberflächen ab.

Die Heterogenität der Ligandenverteilung wurde dadurch erreicht, dass nach der Poly-

merisationssimulation die Liganden in der Bindebox diffundieren konnten. Näherten sich Liganden einem Monomer des Trägermaterials bis auf einen definierten Schwellenabstand, bestand eine Wahrscheinlichkeit von 90 %, dass sie eine Bindung eingingen. Dieser Schritt spiegelt somit den realen Syntheseprozess von Harzpartikeln wider, bei dem die Liganden erst nach der Polymerisation an die Monomere des Trägermaterials gebunden werden [16].

Nach der experimentellen Synthese von Chromatographieharzen müssen die fertigen Partikel mehrfach gewaschen werden, um kleine Polymerfasern auszuspülen, welche ansonsten Fritten oder Kapillaren verstopfen könnten. Dies zeigt, dass nicht nur die Simulation der radikalischen Polymerisation, sondern auch das Entfernen nicht an das Gesamtnetzwerk gebundener Polymerketten reale Bedingungen reflektiert. Dies trifft ebenso auf die erfolgreiche Modellierung der Grenzfläche zwischen stationärer und mobiler Phase zu. In der Realität besetzt das Porogen während der Suspensionspolymerisation die Bereiche, in denen später Makro- und Mesoporen entstehen. In der Simulation wurden anfänglich in die obere Hälfte der Bindebox ausschließlich Porogene eingefügt. Diese wurden so konzipiert, dass sie nicht in die untere Hälfte diffundieren konnten. Äußere Seitenarme des Polymernetzwerks konnten dennoch während der Polymerisation und der anschließenden molekulardynamischen Relaxation in die obere Hälfte ragen. Somit konnte die Entstehung der Makroporenoberfläche repliziert werden, ohne die gesamte Pore zu simulieren. Mesoporen wurden kreiert, indem in der unteren Hälfte der Bindebox ebenfalls Porogen eingefügt wurde. Durch das Verhältnis und die Gesamtzahl an Porogen und Monomer in dieser Hälfte konnte zusätzlich die Dichte des Polymers gesteuert werden.

Zusammenfassend repliziert der entwickelte simulative Workflow die Bedingungen der realen Synthese von Harzpartikeln durch eine sorgfältige Berücksichtigung der verschiedenen Syntheseschritte. Entscheidend für die Genauigkeit des Modells sind hierbei die radikale Polymerisationsreaktion, die anschließende Bindung der Liganden und die Kontrolle der Porengröße mittels Porogen. Somit konnte ein detailliertes Modell der Oberfläche eines kommerziellen Chromatographieharzes generiert werden. Eine nennenswerte Innovation dieses Ansatzes ist die Einbindung der Struktur des methacrylatbasierten Trägermaterials. Diese Eigenschaft wurde, soweit bekannt, erstmals im Kontext der Modellierung von Chromatographieharzoberflächen in einer solchen Skala implementiert. Durch diese Ergänzung bietet das Modell eine komplexere und realistischere Darstellung der Harzoberfläche, indem es die inhärenten Unregelmäßigkeiten besser erfasst als die traditionell flacheren und gleichmäßigeren Oberflächen bestehender Modelle. Diese detaillierte Darstellung des Trägermaterials verbessert nicht nur die visuelle und strukturelle Repräsentation, sondern könnte auch das Verständnis verbessern, wie Biomoleküle auf molekularer Ebene mit der Harzoberfläche interagieren. Dieser Fortschritt in der Modellierung könnte die Entwicklung der nächsten Generation von Chromatographieharzen vorantreiben. Insbesondere könnten durch den Einsatz von *Rational-Design*-Ansätzen neue Harze entwickelt werden, welche durch optimierte Oberflächeneigenschaften verbesserte Leistungsmerkmale aufwei-

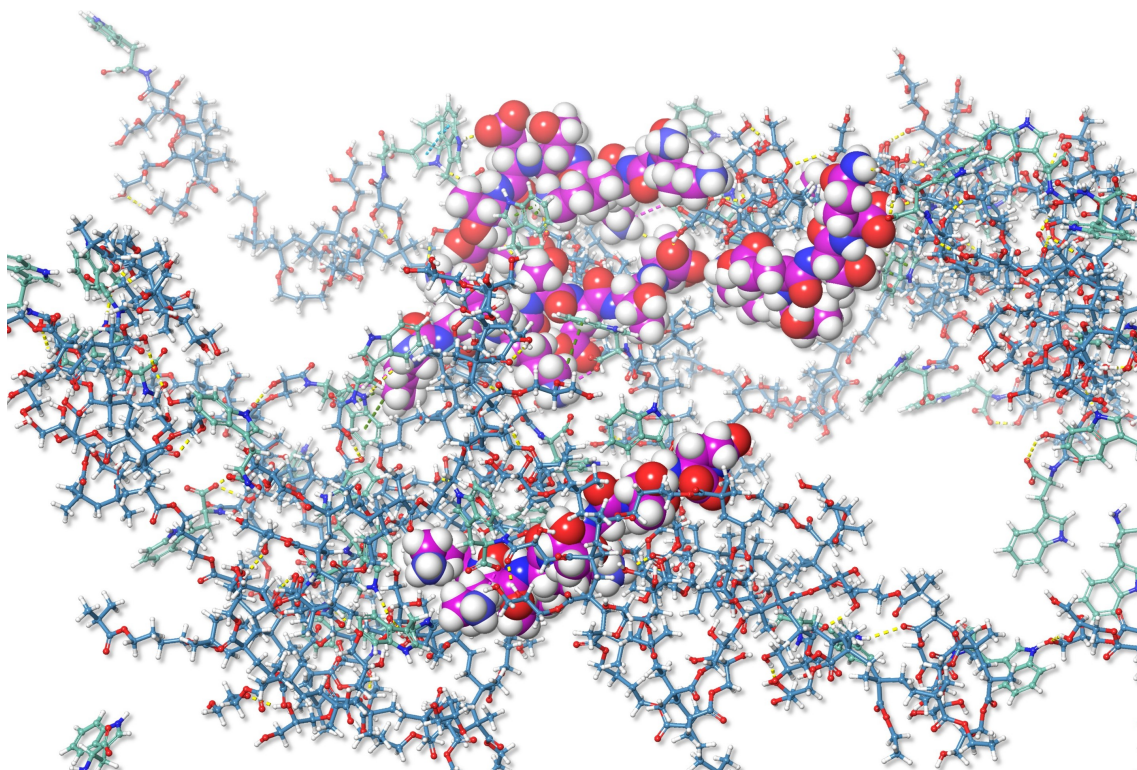
sen. Dies könnte zu Fortschritten in der Effizienz und Genauigkeit chromatographischer Verfahren führen.

#### 4.1.3. Simulation der Adsorption von Peptiden

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse des entwickelten simulativen Ansatzes zur Bestimmung von Bindeposen und -energien von linearen Peptiden an Adsorbensoberflächen vorgestellt und diskutiert. Die Simulationen wurden mithilfe des in Kapitel 4.1.1 vorgestellten Workflows in KNIME durchgeführt. Als Eingabedaten dienten das in Kapitel 4.1.2 beschriebene molekulare Oberflächenmodell des Chromatographieharzes (MOC) und die SMILES-Strings der zehn Peptide (siehe Tabelle 3.3). Es konnten erfolgreich Bindeposen und -energien für alle Peptide berechnet werden. Für jedes Peptid wurden innerhalb des Docking-Grids vier unterschiedliche Bindeposen identifiziert, wobei Posen nur als unterschiedlich betrachtet wurden, wenn sie keine molekulare Überlappung aufwiesen.

Im Folgenden werden die Zwischenergebnisse und das Hauptresultat des Workflows am Beispiel von „Oktapeptid-2“ dargestellt. Mit einem Molekulargewicht von 975 Da war es das größte Peptid in der Liste der Zielmoleküle und hatte bei einem pH-Wert von 4 eine positive Nettoladung von 3. Diese setzte sich aus vier positiv geladenen Aminogruppen und einer negativ geladenen Carboxylgruppe zusammen. Abbildung 4.4 zeigt die vier unterschiedlichen Posen von Oktapeptid-2 nach dem Posenscreening-Schritt des Workflows. Um die Strukturen visuell voneinander abzuheben, ist das MOC durch eine Kugel-Stab-Darstellung und die Peptide durch eine Kalottendarstellung dargestellt. Die Kohlenstoffatome des Trägermaterials des MOC sind blau, die der Trp-Liganden grün und die der Peptide rosa gefärbt. Nicht-kovalente Bindungen sind durch gestrichelte Linien angedeutet: Blau steht für  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen, grün für  $\pi$ -Kation-Interaktionen, gelb für Wasserstoffbrücken und rosa für Salzbrücken. Van-der-Waals-Wechselwirkungen sind nicht eingezeichnet. Alle vier Posen befinden sich direkt auf der Oberfläche des Harzmodells, wobei das Peptid in jeder Pose eine unterschiedliche Konformation aufweist und die Bindestellen starke visuelle Unterschiede zeigen.

Die Tatsache, dass vier verschiedene Posen von Oktapeptid-2 in das Docking-Grid passten, zeigt die räumliche Eignung für alle anderen Peptide. Die Variabilität der Konformationen des Peptids zwischen den Posen könnte auf die Heterogenität der Oberfläche des MOC und die Flexibilität des Peptids zurückzuführen sein. Die Heterogenität der Oberfläche des MOC trägt wesentlich zur Vielfalt der Bindeposen bei. Unterschiedliche Oberflächenstrukturen bieten verschiedene Bindestellen, welche von dem Peptid unterschiedlich genutzt werden können. Die Flexibilität der Peptide ermöglicht es ihnen, sich an die verschiedenen topologischen Merkmale der Oberfläche anzupassen, was zu einer breiten Palette möglicher Bindekonformationen führt. Diese Kombination aus vielfältigen Bindestellen und Bindekonformationen konnte nur durch eine erschöpfende Suche hinreichend genau gelöst werden. Hierzu eignete sich das molekulare Docking, welches durch seinen hierarchischen

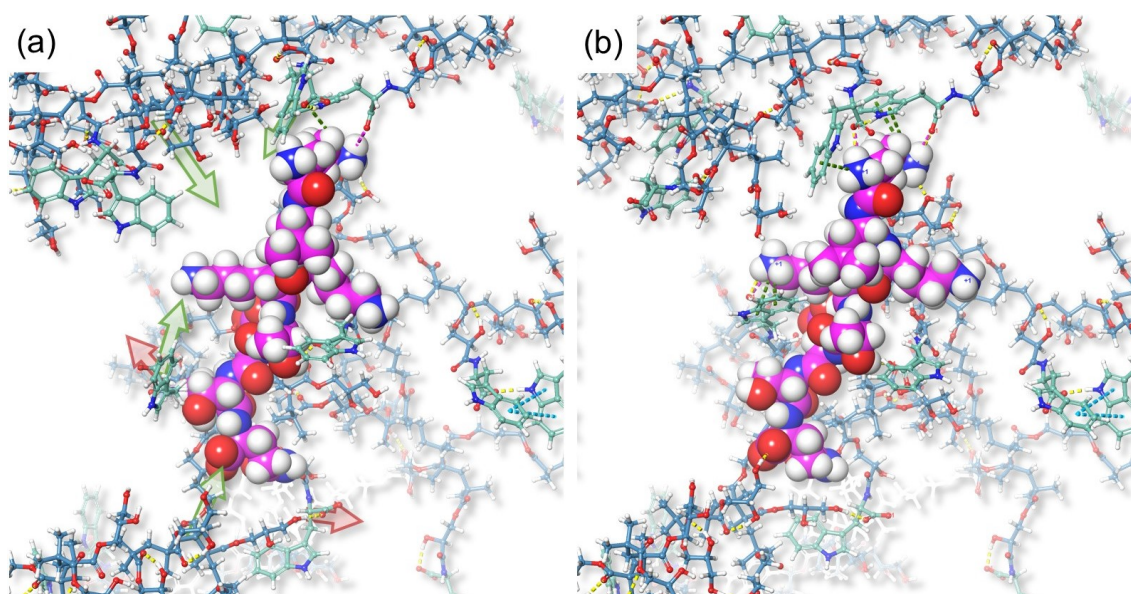


**Abbildung 4.4.:** Darstellung der vier verschiedenen Bindeposen von Oktapeptid-2 auf der Oberfläche des Chromatographiehharzes - Das MOC ist in einer Kugel-Stab-Darstellung und die Peptide in einer Kugeldarstellung abgebildet. Kohlenstoffatome des Trägermaterials sind blau, die des Trp-Liganden grün und die der Peptide rosa gefärbt. Nicht-kovalente Bindungen sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet: Blau für  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen, grün für  $\pi$ -Kation-Interaktionen, gelb für Wasserstoffbrücken und rosa für Salzbrücken. Alle vier Posen befinden sich direkt auf der Oberfläche des Harzmodells, wobei das Peptid in jeder Pose eine unterschiedliche Konformation aufweist.

Ansatz eine Balance zwischen Rechenaufwand und Genauigkeit bot. Somit konnten über 5000 potenzielle Posen selbst an einem Standardbürocomputer gescreent werden, um die vier initialen Bindeposen zu erhalten.

Bei der Docking-Simulation wird jedoch nur das Peptid als flexibel angenommen, während das Harzmodell als starr behandelt wird. Deshalb wurde für jede Bindepose nach dem Posenscreening eine Energieminimierung des gesamten Systems berechnet. Hierbei wurde dem Polymer erstmals erlaubt auf die Adsorption des Peptids zu reagieren. Abbildung 4.5 zeigt exemplarisch eine Bindepose von Oktapeptid-2 nach dem Posenscreening (4.5a) und nach der anschließenden Energieminimierung (4.5b). Bemerkenswert ist, dass während des Minimierungsschritts signifikante konformationelle Veränderungen im Polymer als Reaktion auf die Peptidadsorption beobachtet wurden. Diese zukünftigen Konformationsänderungen sind in Abbildung 4.5a mit Pfeilen gekennzeichnet. Grüne Pfeile zeigen Veränderungen aufgrund anziehender Kräfte, während rote Pfeile die atomare Bewegung





**Abbildung 4.5.:** Konformationsänderung der Bindepose durch Energieminimierung - (a) zeigt die anfängliche Bindepose nach der Docking-Simulation, wobei zukünftige Konformationsänderungen des Polymers durch Pfeile angezeigt werden. (b) zeigt die Pose nach der Minimierung und verdeutlicht die Neuorientierung des Harzes. Die farbcodierten gestrichelten Linien repräsentieren verschiedene Interaktionstypen: pink für Salzbrücken, gelb für Wasserstoffbrücken, grün für  $\pi$ -Kationen-Wechselwirkungen und blau für  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen.

durch abstoßende Kräfte symbolisieren.

Das Peptid ist in der Bindepose von insgesamt fünf Liganden umgeben. In Abbildung 4.5a interagiert jedoch nur eine der vier positiv geladenen Aminogruppen des Peptids durch  $\pi$ -Kationen-Wechselwirkungen und Salzbrücken mit einem Trp-Liganden. Nach dem Minimierungsschritt nähern sich zwei zusätzliche Liganden den Aminogruppen des Peptids an, sodass insgesamt drei Liganden  $\pi$ -Kationen-Wechselwirkungen und Salzbrücken mit dem Peptid bilden. Ein weiterer Ligand an der unteren Seite des Bilds entfernt sich jedoch nach der Minimierung vom Peptid. Auch das methacrylatbasierte Trägermaterial ändert seine Konformation. In der oberen, rechten und unteren Seite der Abbildung ist zu erkennen, dass sich einzelne Polymerketten zum Peptid hinbewegen.

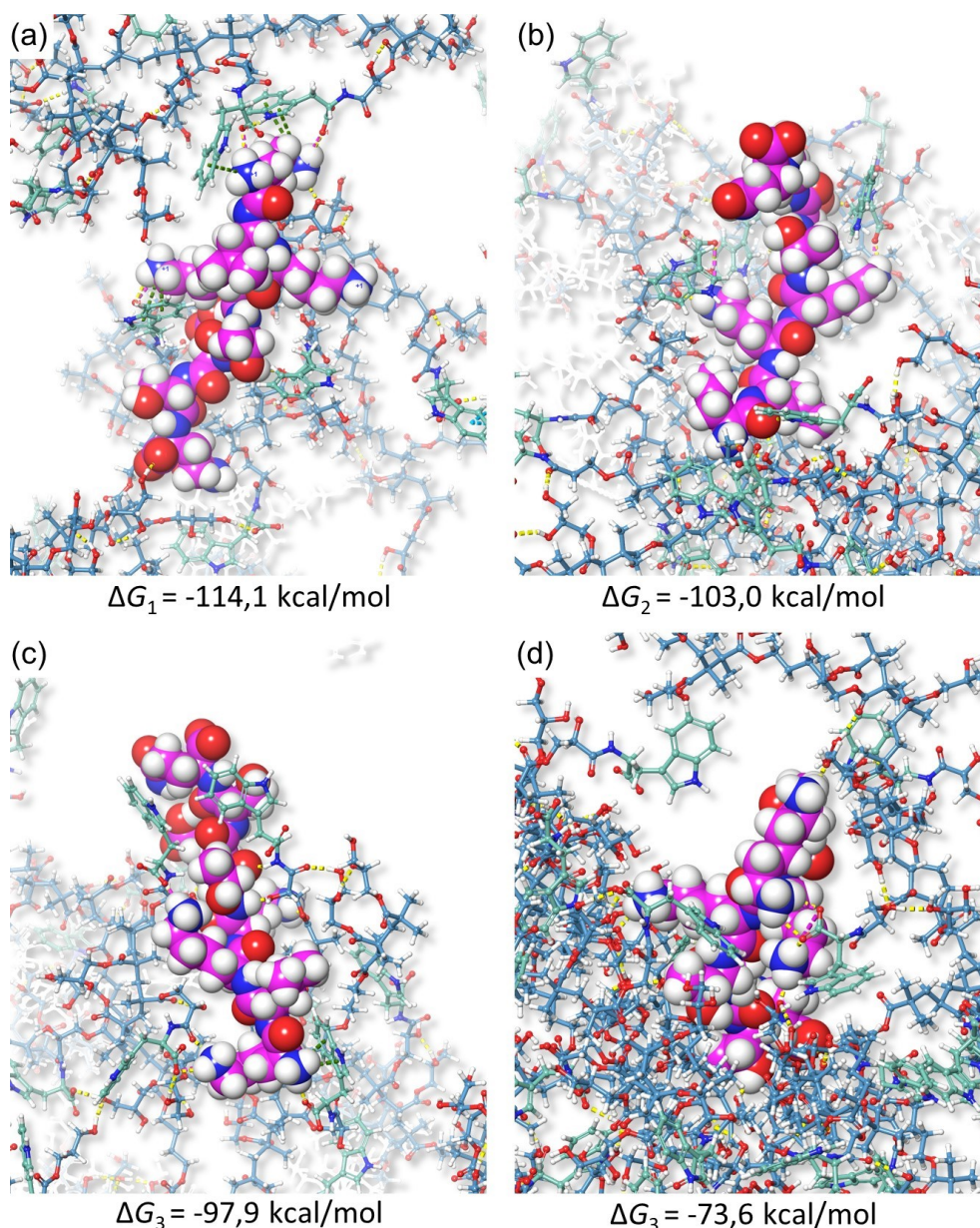
Die Konformationsänderung des Polymers könnte durch die Anziehung zwischen den positiv geladenen Aminogruppen und den negativ geladenen Carboxylgruppen der Trp-Liganden in deren unmittelbarer Nähe initiiert worden sein. Diese Coulomb-Interaktionen sind, im Vergleich zu anderen nicht-kovalenten Wechselwirkungen, für ihre weite Reichweite bekannt. Aufgrund des hohen Quervernetzungsgrades erscheint eine starke Konformationsänderung des Polymers zunächst unwahrscheinlich. Jedoch ist zu beachten, dass die Adsorption auf der Oberfläche des Polymers stattfindet. Hier treten vermehrt nicht stark vernetzte und somit freier bewegliche Enden von Polymerketten auf. Signifikante Konformationsänderungen wurden in den Simulationen lediglich an solchen Kettenenden des Polymers beobachtet. Die durch Coulomb-Kräfte angezogenen Liganden können nach

der Annäherung zusätzlich durch  $\pi$ -Kationen-Wechselwirkungen mit den Aminogruppen interagieren.

Neben den positiven Ladungen besitzt Oktapeptid-2 auch eine negativ geladene Carboxylgruppe, welche auf der unteren Seite des Bildes sichtbar ist. Hier ist zu erkennen, dass die beiden Liganden in der Nähe der negativen Ladung abgestoßen werden und sich von dieser Gruppe wegbewegen. Im Gegensatz dazu nähert sich das Polymer-Rückgrat nach der Energieminimierung der Carboxylgruppe an. Diese Annäherung von Polymerketten zur Bindepose wurde auch an anderen Stellen beobachtet. Hierbei entstehen Wasserstoffbrücken und van-der-Waals-Wechselwirkungen. Diese Neuorientierung stabilisiert wahrscheinlich die Bindepose, indem sie die freie Energie des Komplexes aus Peptid und Harz verringert. Durch den Energieminimierungsschritt werden spezifische intermolekulare Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrücken, van-der-Waals-Kräfte und Coulomb-Wechselwirkungen optimiert. Diese Wechselwirkungen tragen maßgeblich zur Stabilität des Komplexes bei, indem sie energetisch günstigere Konfigurationen ermöglichen. Die Anpassungsfähigkeit des Polymernetzwerks zu berücksichtigen scheint hierbei entscheidend für die Reduktion der freien Energie und die Stabilisierung der Bindepose zu sein.

Am Ende des Workflows wurden semiempirische Quantenmechanik-Methoden angewendet, um die Bindeenergien ( $\Delta G$ ) der verfeinerten Bindeposen präzise zu berechnen. Aus diesen vier Bindeenergien pro Peptid wurde anschließend die mittlere Bindeenergie ( $\Delta G_{MW}$ ) berechnet. Im Folgenden wird bei vergleichenden Aussagen immer der Betrag der Bindungsenergien betrachtet. Posen mit den stärksten negativen Bindungsenergien haben also die höchste Bindungsenergie. Unter allen untersuchten Peptiden hatte Oktapeptid-2 mit einem  $\Delta G_{MW}$  von -97,1 kcal/mol die höchste und N-acetyl-L-Carnosine mit einem  $\Delta G_{MW}$  von -32,0 kcal/mol die niedrigste gemittelte Bindeenergie. Dabei zeigte sich eine signifikante Variation der  $\Delta G$ -Werte zwischen den vier Posen der einzelnen Peptide. Für einige Peptide betrug die Differenz zwischen dem höchsten und niedrigsten berechneten  $\Delta G$  der vier Posen lediglich 5 kcal/mol, während bei anderen Peptiden eine Differenz von bis zu 40 kcal/mol festgestellt wurde. Diese Unterschiede entsprachen prozentualen Abweichungen von 10 % bis 38 %, mit einer durchschnittlichen Variation von 27 % über die Posen aller Peptide. Die durchschnittlichen Bindeenergien aller Peptide sind in Abbildung 4.12a auf der y-Achse dargestellt, wobei die Fehlerbalken die Variation dieser Energien anzeigen.

Abbildung 4.6 bis 4.6d zeigen die vier verfeinerten Bindeposen von Oktapeptid-2, zusammen mit den jeweiligen berechneten Bindeenergien. Die Posen sind so geordnet, dass die Bindeenergien von 4.6a nach 4.6d abnehmen. Im Folgenden werden die Posen entsprechend dieser Reihenfolge nummeriert. Die Pose mit der höchsten Bindeenergie wird als Pose 1 und schlussfolgernd die Pose mit der geringsten Bindeenergie als Pose 4 bezeichnet. Die Bindeenergien zwischen Pose 1 und Pose 4 variierten für Oktapeptid-2



**Abbildung 4.6.:** Alle verfeinerten Bindeposen von Oktapeptid-2 mit dem MOC - (a) bis (d) zeigen die vier unterschiedlichen Bindeposen von Oktapeptid-2 nach der Energieminimierung. Die Posen sind nach sinkender Bindeenergie geordnet und zeigen visuelle Variationen in Liganden- und Polymerdichte.

von  $-114,1 \text{ kcal/mol}$  bis  $-73,6 \text{ kcal/mol}$ . Die vergrößerten Darstellungen der einzelnen Posen verdeutlichen die signifikanten Unterschiede in den Peptidkonformationen und den Polymerbindestellen. Ebenso ist zu erkennen, dass die Ligandendichte der einzelnen Posen variieren: Pose 1 hat fünf, Pose 2 sieben, Pose 3 fünf und Pose 4 drei Liganden in unmittelbarer Nähe zur Bindepose. Zudem unterscheidet sich die Dichte des Trägermaterials. In Pose 2 und Pose 4 bindet das Peptid in dichten Polymer-Taschen, während es in Pose 1 und Pose 3 eher mit längeren Seitenarmen des Polymers interagiert, welche eine geringere Dichte aufweisen. Bei allen Posen zeigt die Carboxylgruppe des Peptids eher nach oben, weg von der Polymeroberfläche, während die Aminogruppen zum Polymer

gerichtet sind.

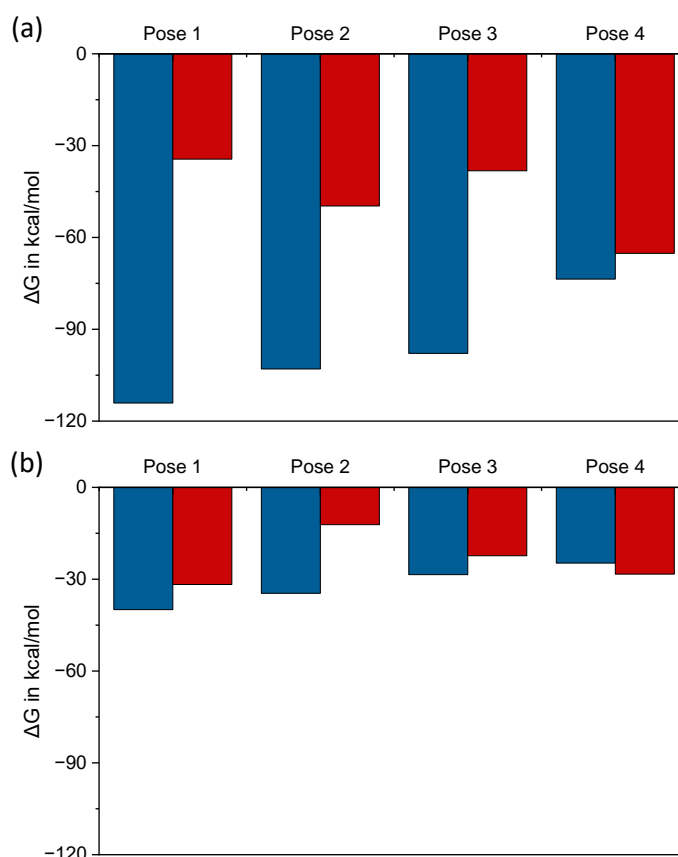
Die visuellen Unterschiede allein lassen keinen klaren Trend in Bezug auf die variierenden Bindeenergien erkennen. Tendenziell scheinen höhere Ligandendichten im Fall von Oktapeptid-2 zu höheren Bindeenergien zu führen. Allerdings weist die Pose mit der höchsten Bindeenergie nur eine mittlere Ligandendichte im Vergleich zu den anderen Posen auf. Ebenso scheint die visuelle Polymerdichte keinen direkten Einfluss auf die Bindeenergie zu haben. Dies deutet darauf hin, dass sowohl spezifische intermolekulare Wechselwirkungen als auch die räumliche Anordnung der Liganden und des Trägermaterials eine wesentliche Rolle bei der Stabilität der Bindeposen spielen.

Die zur Generierung dieser finalen Posen erforderliche Rechenzeit variierte signifikant in Abhängigkeit von der Peptidgröße und -flexibilität. Das Peptid mit der niedrigsten molaren Masse, N-Acetyl-L-Carnosin, benötigte auf einem Computer mit einem Intel Core i7-10700 Prozessor und 32 GB Arbeitsspeicher lediglich 2 Stunden und 55 Minuten für den Workflow-Durchlauf. Im Gegensatz dazu erforderte die Berechnung für Oktapeptid-2 auf derselben Hardware 13 Stunden und 52 Minuten. Durch den Einsatz effizienter Simulationsmethoden konnten die Anforderungen an die Rechenleistung zur Bestimmung der finalen Bindeposen und Energien gering gehalten werden. Somit ist der Workflow für Anwender selbst auf Standard-Bürocomputern ausführbar und erfordert keinen Zugang zu Supercomputern.

Eine Besonderheit des MOC ist, dass Einflüsse des methacrylatbasierten Trägermaterials berücksichtigt werden können. Um die Interaktion des Trägermaterials mit den Peptiden isoliert analysieren zu können, wurden die Atome der Trp-Liganden aus den verfeinerten Bindeposen gelöscht, sodass lediglich das Trägermaterial und das Peptid zurückblieb. Um Fehler in der Lewis-Struktur des Modells zu vermeiden, wurden die Schnittstellen mit Wasserstoffatomen gesättigt. Anschließend wurde erneut eine Einzelpunkt-Energieberechnung mittels GFN2-xTB durchgeführt. Dieses Vorgehen ermöglichte eine isolierte Berechnung der Bindeenergie zwischen dem methacrylatbasierten Polymer-Rückgrat und den Peptiden. Abbildung 4.7 veranschaulicht die Ergebnisse dieser Simulationen für zwei ausgewählte Peptide. In Abbildung 4.7a sind die Ergebnisse für Oktapeptid-2 dargestellt, während Abbildung 4.7b die Ergebnisse für N-acetyl-L-Carnosin zeigt. Letzteres Peptid hat eine molare Masse von 268 Da und eine Nettoladung von 0 bei einem pH-Wert von 4. Die Bindeenergien mit dem MOC sind durch blaue Balken repräsentiert, während die Bindeenergien ausschließlich mit dem Trägermaterial durch rote Balken dargestellt sind.

Für Oktapeptid-2 zeigten die Ergebnisse neben der signifikanten Variation der Gesamtbindeenergie ebenfalls erhebliche Unterschiede im Anteil des Trägermaterials an der Gesamtenergie. Pose 1, für welche die höchste Gesamtbindeenergie berechnet wurde, wies einen Trägermaterialanteil von 30 % zur Gesamtbindeenergie auf. Pose 4, mit der niedrigsten Gesamtbindeenergie, hatte einen deutlich höheren Anteil von 89 %. Pose 2





**Abbildung 4.7.:** Vergleich der Bindeenergien mit und ohne Liganden - (a) zeigt die Bindeenergien für Oktapeptid-2 und (b) für N-acetyl-L-Carnosin. Die blauen Balken repräsentieren die Gesamtbindeenergien des Peptids mit dem methacrylatbasierten Chromatographieharz inklusive der Trp-Liganden, während die roten Balken die isolierten Bindeenergien des Peptids mit dem Trägermaterial ohne Liganden darstellen.

und Pose 3 wiesen Anteile des Trägermaterials von 48 % bzw. 39 % auf. Die absolute Variation der Gesamtbindeenergie war für N-acetyl-L-Carnosin geringer als für Oktapeptid-2. Dennoch zeigte sich auch hier eine signifikante prozentuale Abweichung zwischen den Posen, welche vergleichbar mit denen von Oktapeptid-2 ist. Bei N-acetyl-L-Carnosin betrug die Abweichung der Gesamtenergie zwischen den Posen 38 %, während sie sich bei Oktapeptid-2 auf 36 % belief. Auch bei N-acetyl-L-Carnosin variierten die prozentualen Anteile des Trägermaterials an der Gesamtbindeenergie zwischen den Posen stark: Bei Pose 1 entsprach der Anteil 79 %, bei Pose 2 35 %, bei Pose 3 78 % und bei Pose 4 sogar 115 %. Der Anteil des Trägermaterials an der Bindeenergie war absolut für N-acetyl-L-Carnosin geringer, aber der durchschnittliche prozentuale Anteil des Rückgrats an der Gesamtenergie war höher als bei Oktapeptid-2.

Die Unterschiede im Anteils des Trägermaterials an der Bindeenergie für Oktapeptid-2 passen zu den visuellen Beobachtungen der Polymerdichte in den Bindeposen. Pose 1 und Pose 3 zeigten eine geringere Polymerdichte, während bei Pose 2 und Pose 4 eine höhere Dichte beobachtet wurde. Eine höhere Dichte des Trägermaterials um die Bindepose korrelierte somit mit einer höheren Bindeenergien mit dem Trägermaterial. Ebenso wie bei

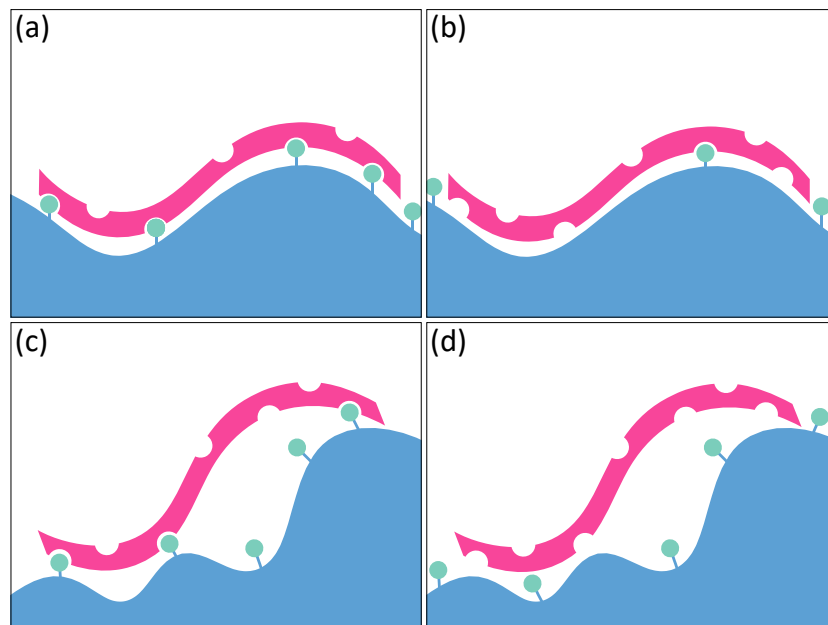
der Ligandendichte, lässt sich dennoch kein klarer Trend zwischen der Bindeenergie mit den Trägermaterial und der Gesamtbindeenergie erkennen. Ähnliche Beobachtungen gelten für N-acetyl-L-Carnosin. Besonders auffällig ist der Unterschied zwischen Pose 2 und Pose 4, welcher möglicherweise durch die spezifische Ladungsverteilung des Peptids bedingt ist. Trotz einer Nettoladung von 0 bei pH 4 hat N-acetyl-L-Carnosin eine negativ geladene Carboxylgruppe und eine positiv geladene Pyrimidingruppe. Bei Bindestellen mit mehreren Liganden in der Nähe der negativen Ladung können Abstoßungseffekte auftreten. Diese Effekte können die Gesamtbindeenergie negativ beeinflussen, was dazu führt, dass das Trägermaterial eine höhere Bindeenergie zum Peptid aufweist als die Gesamtbindeenergie, wie in Pose 4 beobachtet. Umgekehrt können Liganden, welche sich im Bereich der positiven Ladung konzentrieren, zu einer Erhöhung der coulombschen Anziehungskräfte und somit zu einer Erhöhung der Gesamtbindeenergie führen, wie in Pose 2 zu beobachten. Diese Untersuchung verdeutlicht, dass sowohl die Eigenschaften des Polymers als auch der Liganden entscheidende Faktoren für die Bindeenergie darstellen. Wahrscheinlich beeinflussen sich diese Faktoren gegenseitig, weshalb keine isolierte Korrelation zwischen einem einzelnen Faktor und der Gesamtbindeenergie hergestellt werden konnte.

Abbildung 4.8 zeigt schematisch vier verschiedene Bindszenarien, welche die unterschiedlichen Beiträge des Trägermaterials und der Liganden erklären könnten. Das Polymerrückgrat ist als blaue Oberfläche dargestellt, die Liganden als grüne Kugeln und das Peptid als rosa Linie. Die halbkreisförmigen Einbuchtungen im Peptid repräsentieren potentielle Bindestellen für die Liganden. In Szenario 4.8a wird ein ideales Bindszenario für das Peptid dargestellt. Die Oberfläche an der Bindestelle ist so geformt, dass das Peptid perfekt hineinpasst. Dadurch kommt es sehr nahe an das Trägermaterial, wo Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Interaktionen entstehen können. Die Liganden sind optimal an der Oberfläche positioniert, sodass sie genau an den Bindestellen des Peptids liegen, sobald es sich in die Bindetasche gelegt hat. Diese Pose weist eine hohe Bindeenergie auf, mit bedeutenden Beiträgen sowohl von den Liganden als auch vom Trägermaterial, ähnlich wie in den Posen 2 und 3 von Oktapeptid-2 beobachtet. In Abbildung 4.8b zeigt die Bindetasche dieselbe Form wie in 4.8a. Jedoch kann das Peptid, wenn es in der Bindetasche liegt, nur mit einem Liganden interagieren, da die Ligandendichte geringer ist oder die Liganden räumlich nicht in der Nähe potentieller Bindestellen des Peptids liegen. Bei dieser Pose ist die Gesamtbindeenergie etwas geringer, wodurch der prozentuale Anteil des Trägermaterials in Vergleich zu 4.8a steigt. Dieses Szenario könnte Pose 4 von Oktapeptid-2 entsprechen.

In Abbildung 4.8c ist die Adsorbensoberfläche so geformt, dass sich das Peptid nicht ideal in die Bindetasche legen kann. Die Liganden sind jedoch an dieser Stelle sehr freistehend, sodass das Peptid an mehreren Bindestellen mit ihnen interagieren kann. Da das Peptid jedoch weiter von der Polymeroberfläche entfernt ist, können die Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Wechselwirkungen nicht so effektiv ausgebildet werden wie in

4.8a und 4.8b. Der Anteil des Trägermaterials an der Gesamtbindeenergie ist somit geringer. Dennoch bleibt die Gesamtbindeenergie hoch, da das Peptid effektiv mit mehreren Liganden interagiert. Dieses Szenario könnte dem von Pose 1 von Oktapeptid-2 ähneln. Im letzten gezeigten Szenario in Abbildung 4.8d ist die Harzoberfläche ähnlich wie in 4.8c. Jedoch sind die Liganden hier räumlich nicht in der Nähe potentieller Bindestellen des Peptids oder die Ligandendichte ist zu gering. Dadurch kann das Peptid weder effektiv an das Trägermaterial adsorbieren noch mit den Liganden interagieren. Die Gesamtbindeenergie an dieser Bindestelle wäre wahrscheinlich für eine effektive Adsorption des Peptid zu gering und würde im Posenscreening-Schritt der Simulation verworfen werden.

Hierbei anzumerken ist, dass bei den Szenarien die Flexibilität sowohl des Peptids als auch des Polymers mit berücksichtigt ist. Wie bereits in Abbildung 4.5 gezeigt, können Liganden, welche sich zunächst nicht in optimaler Position befinden, durch Anziehungskräfte zu den Bindestellen des Peptids bewegt werden. Mit Liganden, welche wegen ihrer räumlichen Anordnung nicht an das Peptid binden können sind solche gemeint, welche nicht in unmittelbarer Nähe der Bindestelle sind und deshalb keine ausreichende Anziehungskraft erfahren, um sich signifikant zu bewegen. Das lineare Peptid weist ebenfalls einen flexiblen Charakter auf, welcher ihm ermöglicht, sich an unterschiedliche Kavitätfor-



**Abbildung 4.8.:** Schematische Darstellung von vier verschiedenen Bindungsszenarien zwischen Peptid und Adsorbensoberfläche - In Szenario (a) ist die Bindetasche optimal geformt, sodass das Peptid sowohl nahe an das Trägermaterial als auch an mehrere Liganden binden kann. Szenario (b) zeigt eine ähnliche Bindetasche, jedoch mit geringerer Ligandendichte, was zu einer geringeren Gesamtbindeenergie führt. In Szenario (c) ist die Bindetasche des Polymers unpassender, ermöglicht aber viele Interaktionen mit freistehenden Liganden, wodurch die Gesamtbindeenergie hoch bleibt, während der Einfluss des Trägermaterials gering ist. Szenario (d) zeigt eine ungünstige Kombination aus unpassender Polymeroberfläche und geringer Ligandendichte, was zu einer minimalen Gesamtbindeenergie führt.

men anzupassen. Somit sind bei Oberflächen wie in 4.8c und 4.8d, solche gemeint, bei welchen das Peptid trotz seiner Flexibilität nicht ideal in die Kavität passt.

Zusammenfassend wurden für 10 Peptide erfolgreich jeweils vier unterschiedliche Bindeposen und -energien an ein Modell einer kommerziellen Chromatographieharzoberfläche simuliert. Dabei traten signifikante Konformationsänderungen des Harzes als Reaktion auf die Adsorption der Peptide auf. Diese Änderungen waren bedingt durch eine Reorientierung der Liganden und eine Annäherungen von Polymerketten des Trägermaterials zur Bindepose. Ebenfalls wurde eine signifikante Variation der berechneten Bindeenergien zwischen den einzelnen Posen jedes Peptids festgestellt. Diese Variation könnte auf zwei Hauptfaktoren zurückzuführen sein: Einerseits könnten sie aus Fehlern im Screening der Bindeposen resultieren. Hierbei könnten falsch-positive oder falsch-negative Bindeposen eine Rolle spielen. Zusätzlich können bei dem nicht zeitaufgelösten Docking die Peptide ebenso an Bindestellen gelangen, welche für sie normalerweise durch Diffusion nicht erreichbar wären. Zum anderen könnte die Variation in den Bindeenergien jedoch auch die tatsächliche Vielfalt der Bindungsszenarien widerspiegeln. Die simulativen Ergebnisse zeigten Unterschiede in den Bindedomänen des Harzes, welche durch die nicht einheitliche Ligandendichte sowie Struktur des Polymer-Rückgrats bedingt waren und zu den Variationen der Bindeenergien beitrugen. Darüber hinaus konnte der Anteil des Polymerrückgrats an der Gesamtbindeenergie berechnet werden. Dieser Anteil war für alle berechneten Posen signifikant und sollte daher in Simulationen von Bindeenergien mit Peptiden nicht vernachlässigt werden. In einer abschließenden Analyse wurde gezeigt, dass die Stärke der Bindung zwischen den Peptiden und Adsorbensoberflächen von mehreren Faktoren abhängt, welche miteinander in Wechselwirkung stehen. Die molekulare Flexibilität, die Ligandendichte, und die dreidimensionale Struktur der Bindepose müssen alle berücksichtigt werden, um ein umfassendes Verständnis der Bindungsmechanismen zu erhalten. Die durchgeführten Berechnungen und Beobachtungen verdeutlichen die Komplexität der Adsorptionsprozesse und heben die Bedeutung detaillierter molekularer Modelle hervor, um die vielfältigen Wechselwirkungen zwischen Peptiden und Harzoberflächen fundiert zu verstehen. Das atomistische Modell der Chromatographieharzoberfläche bildete hierbei eine zentrale Grundlage. Darüber hinaus erwies sich das umfassende Screening nach potentiellen Bindeposen sowie die Berücksichtigung der molekularen Flexibilität der gesamten Bindekonstellation als entscheidend.

Die Berechnungen der Interaktionen zwischen Peptiden und Chromatographieharzen könnten eine genauere Vorhersage des Verhaltens von Peptiden in unterschiedlichen chromatographischen Systemen ermöglichen. Durch den Einsatz effizienter Simulationsmethoden kann die Bestimmung der Bindeenergie von Peptiden auf herkömmlichen Bürocomputern erfolgen, wodurch Anwender für die Ausführung des Workflows keinen Zugang zu Supercomputern benötigen. Die Kombination aus der öffentlichen Verfügbarkeit des Workflows und der Unabhängigkeit von leistungsstarken Rechenressourcen könnte die bestehenden

Einstiegsbarrieren molekularer Simulationen abbauen und deren Verbreitung im Bereich der Chromatographie fördern. Die Fähigkeit zum Hochdurchsatz-Screening kann insbesondere in der frühen Prozessentwicklung chromatographischer Schritte von großem Wert sein. Hier könnte der Workflow künftig dazu eingesetzt werden, in virtuellen Umgebungen das am besten geeignete Chromatographieharz sowie optimale Binde- und Elutionsbedingungen für spezifische Trennprobleme zu identifizieren.

## 4.2. Automatisierte Aufnahme von Adsorptionsisothermen

Um die simulativen Ergebnisse zu validieren, wurden experimentelle Adsorptionsstudien durchgeführt. Hierbei war die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von hoher Bedeutung, weshalb in dieser Arbeit ein Robotiklabor etabliert wurde. Das folgende Kapitel widmet sich den Einsatzmöglichkeiten dieses Labors und der Analyse der damit erzielten experimentellen Ergebnisse. Zunächst wird erläutert, wie das Robotiklabor auf die Durchführung verschiedener Prozesse angepasst werden kann und in welchem Maß die Automatisierung der Laborstraße realisiert wurde. Anschließend folgt eine Diskussion über die Funktionstests des Labors, aus denen Rückschlüsse auf die Genauigkeit und den Nutzen gezogen werden. Abschließend werden die Adsorptionsisothermen der linearen Peptide präsentiert und ausführlich erläutert.

### 4.2.1. Implementierung des Robotiklabors

Ein Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Implementierung eines zentral steuerbaren Robotiklabors. Dieses bestand aus einem Pipettierroboter, einem Roboterarm und einer Filtrationsstation mit Vakuumpumpe (siehe Abbildung 3.5). Hierbei wurde durch die Etablierung von Klassen für die einzelnen Laborgeräte eine flexible Programmierung von Laborprozessen ermöglicht, welche an die Anforderungen unterschiedlicher Aufgaben angepasst werden kann. Zur Unterstützung der Anwender wurde ein Vorlage-Programm erstellt (Abbildung C.2), dessen Funktionsweise nachfolgend erläutert wird. Das Programm beginnt mit einem Kommentarblock zur Erläuterung des Programms (Zeilen 3-9). Anschließend werden die Module des Robotiklabors importiert (Zeilen 11-16) und die Geräte initialisiert (Zeilen 18-21). Über Methodenaufrufe kann der UR5e-Roboterarm bewegt (Zeilen 27-39), ein Protokoll auf dem OT-2 Pipettierroboter gestartet (Zeilen 41-44) oder ein Pumpvorgang durchgeführt werden (Zeilen 47-52). Zum Abschluss wird der UR5e in seine Ruheposition zurückbewegt und die Verbindungen zu den Geräten werden geschlossen (Zeilen 51-59).

Die intuitive Bedienbarkeit des Labors ermöglicht eine schnelle Anpassung an unterschiedliche Prozesse und gewährleistet somit einen flexiblen Einsatz in der Forschung. Das bereitgestellte Testprogramm unterstützt die Nutzer dabei, bei auftretenden Problemen die volle Funktionalität schnell wiederherzustellen. Ein herausfordernder Aspekt bei der Erstellung neuer Bewegungsmuster für den UR5e-Roboterarm ist der zeitaufwändige Prozess der Ermittlung von Gelenk-Koordinaten. Da diese nicht einfach in kartesische Koordinaten umgerechnet werden können, muss jeder Bewegungsablauf einmal manuell durchgeführt und alle dafür benötigten Gelenk-Koordinaten aufgezeichnet werden. Der Prozess zur Aufnahme von Adsorptionsisothermen konnte, abgesehen vom Befüllen der Filterplatten, der Pufferherstellung und der Durchführung der Absorptionsmessungen, vollständig automatisiert werden. Die verbleibenden manuellen Schritte führen jedoch

nicht zwangsläufig zu zeitlichen Verzögerungen. Die Pufferherstellung und Plattenbefüllung können im Voraus vorbereitet werden, und die UV-Messungen lassen sich am Ende der Experimente gesammelt durchführen. Diese manuellen Tätigkeiten können parallel zu einem bereits laufenden automatisierten Versuch ausgeführt werden, wodurch der Gesamtprozess effizient bleibt.

#### 4.2.2. Funktionstest des Robotiklabors

Zur Demonstration der Funktionalität des Robotiklabors zur Aufnahme von Adsorptionsisothermen wurde der Farbstoff Methylenblau als Zielmolekül gewählt. In diesem Abschnitt werden die hierbei erzielten Ergebnisse präsentiert und diskutiert, um Rückschlüsse auf die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit des automatisierten Prozesses zu ziehen.

In Vorversuchen wurde zunächst eine Kalibriergerade mit zehn Messpunkten für die photometrische Konzentrationsbestimmung des Farbstoffs erstellt. Das Bestimmtheitsmaß der Gerade lag bei 0,9997. Anschließend wurde der gesamte Versuch zur automatisierten Aufnahme der Isothermen durchgeführt, jedoch ohne die Filterplatte vorher mit Adsorbens zu befüllen. Diese Vorgehensweise diente der Untersuchung des Einflusses der Filterplatte auf die Messergebnisse sowie der Überprüfung der Funktionalität des entwickelten Prozesses. Der Versuch wurde in zwölfacher Bestimmung ausgeführt. Die Messergebnisse und der gefittete lineare Verlauf sind in Abbildung 4.9a dargestellt. Die gemessenen Überstandskonzentrationen wurden gegen die Ausgangskonzentrationen aufgetragen. Ein linearer Fit ermöglichte die Bestimmung einer Geradengleichung, welche Rückschlüsse auf den Einfluss der Filterplatte erlaubte. Hierbei ergab sich eine Gerade mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9995, einer Steigung von 1,0069 und einer durchschnittlichen Standardabweichung von 0,0037 g/L.

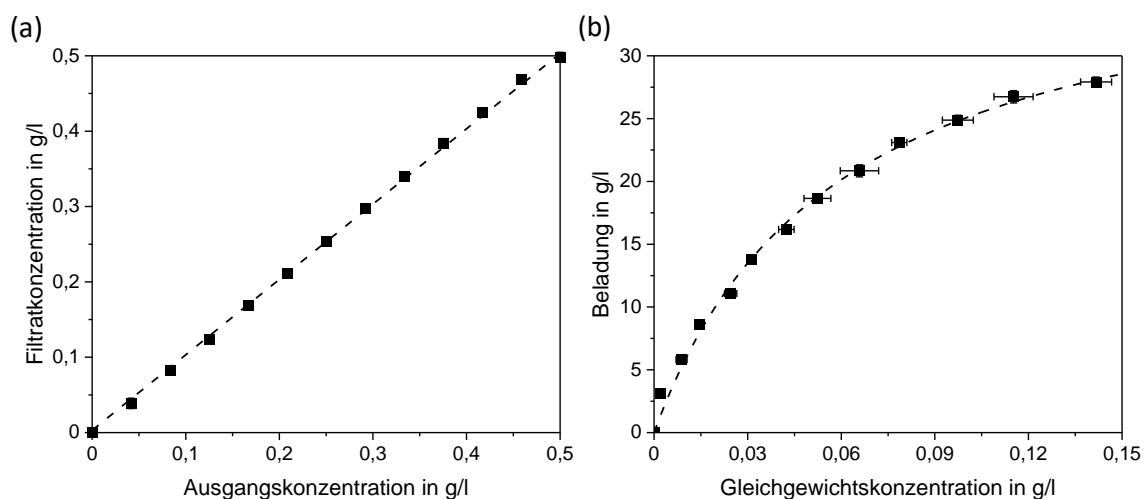
Da die Filterplatten nicht mit Adsorbens gefüllt waren, entspräche in einem perfekten Prozess die Überstandskonzentration der Ausgangskonzentration. Die geringen Abweichungen der Geradensteigung von 1 und der minimalen Y-Achsenabschnitt der Anpassungsgerade deuten darauf hin, dass die Filterplatte keinen nennenswerten Einfluss hatte. Hätte die Filterplatte Farbstoff adsorbiert, wäre die Filtratkonzentration niedriger als die Ausgangskonzentration und die Steigung der Geraden hätte einen Wert kleiner als eins. Zusammen mit den hohen Bestimmtheitsmaßen und der geringen Standardabweichung der Messpunkte demonstrierten die Ergebnisse dieses ersten Tests des Robotiklabors eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des entwickelten Gesamtprozesses.

Zur Bestimmung einer Adsorptionsisotherme wurde derselbe Prozess nur diesmal mit vorab befüllten und equilibrierten Filterplatten erneut durchgeführt. Gemäß der Beschreibung in Kapitel 3.4.1 wurden 7,7  $\mu\text{L}$  des Chromatographieharzes TOYOPEARL MX-Trp-650M in jedes Well der Filterplatte überführt. Die Isotherme von Methylenblau wurde in Vierfachbestimmung aufgenommen. Aus den gemessenen Gleichgewichtskonzentrationen wurden die

Beladungen im Gleichgewichtszustand mithilfe der Formel 3.1 berechnet. Die Mittelwerte der Gleichgewichtsbeladungen wurden gegen die mittleren Gleichgewichtskonzentrationen aufgetragen (Abbildung 4.9b). Die Isotherme zeigt bei niedrigen Konzentrationen eine nahezu lineare Steigung, welche mit zunehmender Gleichgewichtskonzentration allmählich abflacht und schließlich gegen einen Sättigungswert konvergiert. Dies entspricht einem klassischen Langmuir-Verhalten, weshalb die Datenpunkte mittels der Langmuir-Isothermengleichung approximiert wurden. Der Isothermen-Fit für Methylenblau wies ein Bestimmtheitsmaß von 0,9953 auf, während die durchschnittliche Standardabweichung der Messwerte 0,1271 betrug, mit einer maximalen Standardabweichung von 0,4882 g/L.

Der gesamte Prozess, einschließlich der manuellen Vorbereitung des Labors und des im Anschluss händisch durchgeführten Transfers der Platten in den UV/Vis-Reader, benötigte insgesamt 140 Minuten. Bei ausreichender Verfügbarkeit von Ablageplätzen für Messplatten kann theoretisch ein Maximaldurchsatz von 10 Versuchen oder 960 ermittelten Messpunkten pro Tag erreicht werden. Wird der Spülprozess ausgelagert und die manuellen Schritte parallel durchgeführt, kann diese Zahl sogar noch weiter erhöht werden.

Die elektrostatische Anziehung zwischen den negativ geladenen Trp-Liganden des Chromatographieharzes und dem bei pH 4 positiv geladenen Methylenblau könnte die beobachtete Adsorption begründen. Die höheren Standardabweichungen im Vergleich zu Abbildung 4.9a könnten durch leicht abweichende Adsorbensmengen pro Well verursacht worden sein. Trotz dieser leicht erhöhten Standardabweichung zeigte der automatisierte



**Abbildung 4.9.:** Ergebnisse der Funktionstests des Robotiklabors - (a) zeigt den ersten Test, bei welchem die Filterplatten nicht mit Adsorbens gefüllt wurden. Der lineare Fit zeigt eine hohe Genauigkeit des automatisierten Prozesses, mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9995. (b) zeigt den zweiten Test, diesmal unter Verwendung von mit Adsorbens gefüllten Platten. Die resultierende Isotherme zeigt ein klassisches Langmuir-Verhalten mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9953.



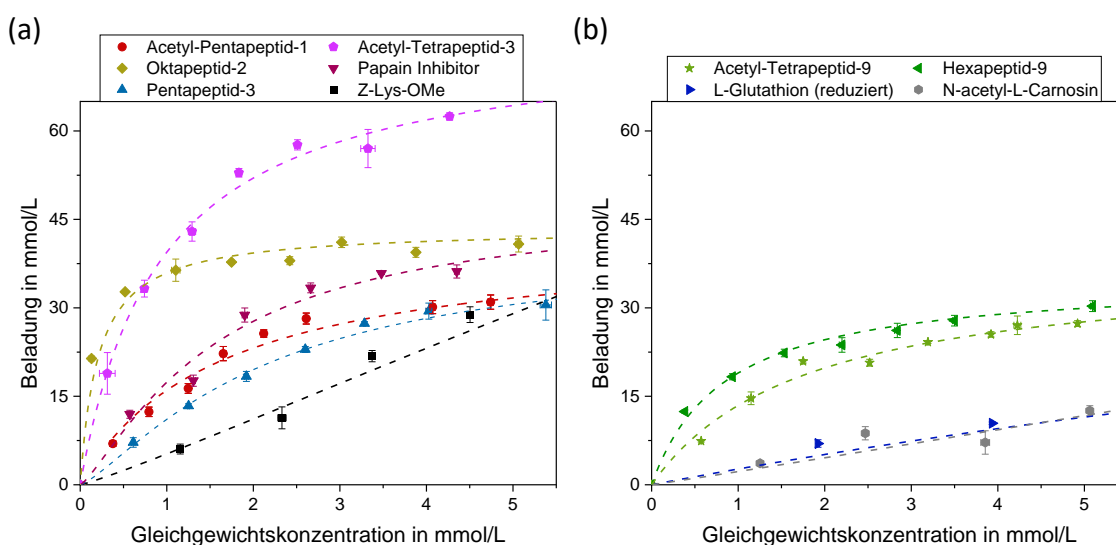
Prozess ein hohes Maß an Genauigkeit und Reproduzierbarkeit. Mit einer Kapazität, täglich bis zu 80 Isothermen mit jeweils 12 Messpunkten aufzunehmen, ist das Robotiklabor ebenso für Hochdurchsatzscreenings geeignet.

Zusammenfassend demonstrierten die Tests des Robotiklabors die Effizienz und Präzision des Prozesses zur automatisierten Aufnahme von Adsorptionsisothermen. Die hohe Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Messungen bestätigen die Eignung des Robotiklabors für detaillierte Adsorptionsstudien, welche für die Validierung der experimentellen Ergebnisse essentiell waren.

#### 4.2.3. Aufnahme der Adsorptionsisothermen von Peptiden

Der in Kapitel 4.2.2 erfolgreich getestete Prozess zur automatisierten Aufnahme von Adsorptionsisothermen wurde verwendet, um das Adsorptionsverhalten der für diese Studie ausgewählten Zielmoleküle zu untersuchen. Abbildung 4.10 zeigt die gemessenen Adsorptionsisothermen für alle zehn Peptide bei einem pH-Wert von 4. Abbildung 4.10a illustriert die Isothermen der bei pH 4 positiv geladenen Peptide, während Abbildung 4.10b die Isothermen der neutral und negativ geladenen Peptide darstellt. Alle Isothermen zeigten ein Langmuir-ähnliches Adsorptionsverhalten, weshalb ein Fit der Langmuir-Isothermengleichung durch die Messdaten gelegt wurde. So konnten die Langmuir-Parameter für jedes Peptid ermittelt werden. Das Bestimmtheitsmaß lag für alle Fits über einen Wert von 0,94.

Bei der Analyse der Plots von Abbildung 4.10 sollte beachtet werden, dass die Beladung und die Gleichgewichtskonzentration in molaren Einheiten angegeben sind, anstatt in den

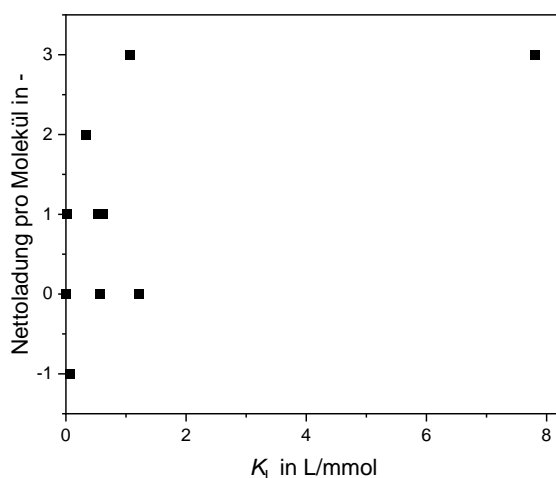


**Abbildung 4.10.:** Adsorptionsisothermen der zehn Peptide bei pH 4 - (a) zeigt die Isothermen der bei pH 4 positiv geladenen Peptide, und (b) die der bei pH 4 neutral oder negativ geladenen Peptide. Alle Isothermen wiesen ein Langmuir-ähnliches Adsorptionsverhalten auf, mit Fits der Langmuir-Isothermengleichung, deren  $R^2$  über 0,94 lagen.

üblichen gravimetrischen Einheiten. Dies diene der späteren Validierung der simulativen Ergebnisse. Daher erscheinen die Isothermen der Peptide mit höherem Molekulargewicht, wie Oktapeptid-2, etwas gestauchter, während die Isothermen von Peptiden mit geringerem Molekulargewicht vergleichsweise gestreckter wirken. Dies führt dazu, dass nicht alle aufgenommenen Datenpunkte im angezeigten Diagrammbereich sichtbar sind.

Bei der Betrachtung der Isothermen fällt eine sehr geringe Standardabweichung zwischen den Doppelbestimmungen auf, was erneut die hohe Präzision des automatisierten Prozesses unterstreicht. Auffällig ist, dass die positiv geladenen Peptide tendenziell eine größere Anfangssteigung aufweisen als neutral oder negativ geladene Peptide. Eine Ausnahme bildet hier Z-Lys-OMe, welches trotz positiver Ladung eine geringe Anfangssteigung zeigt. Es scheint zudem eine Tendenz zu bestehen, dass mit steigender Anfangssteigung auch die maximale Beladung steigt. Wesentliche Ausnahmen dieser Tendenz sind Acetyl-Tetrapeptid-3, welches eine geringere Anfangssteigung als Oktapeptid-2, aber eine höhere molare Beladung aufweist, sowie Z-Lys-OMe, das trotz geringer Anfangssteigung eine vergleichsweise hohe Maximalbeladung zeigt.

Um die beobachteten visuellen Trends detaillierter zu analysieren, wurden in Abbildung 4.11 die Nettoladungen der Peptide bei pH 4 gegen deren, durch die Fits der Isothermen erhaltenen, Langmuir-Konstanten ( $K_L$ ) aufgetragen. Die Langmuir-Konstante diene hierbei als Maß für die Affinität des Zielmoleküls zum Adsorbens [64] und entspricht dem Kehrwert der Gleichgewichtskonzentration bei halbmaximaler Gleichgewichtsbeladung. Eine Betrachtung der Daten in Abbildung 4.11 zeigt jedoch, dass keine ersichtliche Korrelation zwischen den Nettoladungen und  $K_L$ -Werten der untersuchten Peptide existierte. Obwohl Peptide mit höherer positiver Nettoladung tendenziell höhere  $K_L$ -Werte aufwiesen, was angesichts des negativ geladenen Liganden plausibel ist, treten Ausnahmen



**Abbildung 4.11.:** Nettoladung der Peptide bei pH 4 im Vergleich zu deren, aus den Langmuir-Isothermen-Fits abgeleiteten,  $K_L$ -Werten - Die Analyse zeigt, dass keine ersichtliche Korrelation zwischen der Gesamtladung der untersuchten Zielmoleküle und deren Bindeaffinitäten zu dem multimodalen Chromatographieharz existierte.

auf. Insbesondere wies Hexapeptid-9, trotz einer Nettoladung von null, den zweithöchsten gemessenen  $K_L$ -Wert auf.

Diese Diskrepanz verdeutlicht die Komplexität der Wechselwirkungen in der multimodalen Chromatographie, bei der sowohl elektrostatische als auch hydrophobe Wechselwirkungen relevant sind. Während elektrostatische Wechselwirkungen häufig dominieren, können lokal konzentrierte positive Ladungen auf Peptiden mit insgesamt niedriger Nettoladung dennoch eine starke Affinität zum Harz zeigen. Zusätzlich können hydrophobe Wechselwirkungen, obwohl sie sekundär sind, signifikant zur Gesamtbindeaffinität beitragen. Die Vorhersage des Bindeverhaltens allein anhand der Ladung des Zielmoleküls ist daher schwierig und oft unzureichend.

Zusammenfassend zeigten alle analysierten Peptide ein Langmuir-ähnliches Verhalten. Die hohe Präzision der automatisierten Prozesse, wie durch die geringen Standardabweichungen zwischen den Doppelbestimmungen belegt, bestätigte die Zuverlässigkeit der experimentellen Methodik und lässt auf eine hohe Genauigkeit der Ergebnisse schließen. Trotz der beobachteten Tendenz zu höheren Anfangssteigungen bei positiv geladenen Peptiden, konnte durch eine detaillierte Betrachtung der Langmuir-Konstanten im Vergleich zu den Nettoladungen keine Korrelation gefunden werden. Dies verdeutlicht, dass die Bindeaffinität in der multimodalen Chromatographie nicht nur von der Nettoladung des Peptids, sondern auch von dessen Ladungsverteilung und den hydrophoben Eigenschaften abhängt. Dies unterstreicht nochmals die Notwendigkeit eines umfassenderen Ansatzes, welcher die dreidimensionale Interaktion zwischen den Peptiden und dem Harz detailliert untersucht, um diese besser zu verstehen und vorhersagen zu können.

### 4.3. Validierung und Benchmarking des entwickelten Modellierungsansatzes

Dieses Kapitel widmet sich der Validierung der in Kapitel 4.1 beschriebenen simulativen Ergebnisse anhand der experimentellen Daten aus Kapitel 4.2. Zudem wird untersucht und diskutiert, inwiefern der entwickelte simulative Ansatz geeignet ist, experimentell bestimmte Adsorptionsparameter vorherzusagen. Abschließend erfolgt ein Vergleich des entwickelten MOC mit etablierten Modellen von Adsorbensoberflächen hinsichtlich ihrer Vorhersagegenauigkeit. Zudem wird der Workflow zur Bestimmung von Bindeenergien gegen einen hierfür bereits etablierten Ansatz gebenchmarkt.

#### 4.3.1. Modellvalidierung durch die Vorhersage von Langmuir-Konstanten

Für die Entwicklung von effektiven Trennprozessen ist eine präzise Bestimmung von Adsorptionsparametern, wie der Langmuir-Konstante, entscheidend. Der Einsatz experimenteller Methoden zur Bestimmung dieser Parameter ist jedoch oft zeitaufwendig und kostenintensiv. Um diese Einschränkungen zu umgehen, wurde in dieser Arbeit ein simulativer Ansatz zur Berechnung der freien Bindeenergie entwickelt. Diese berechneten  $\Delta G$  sollten nach der theoretischen Studie von Ghosal und Gupta eine negativ logarithmisch Beziehung zu  $K_L$  aufweisen, wenn  $K_L$  in molaren Einheiten wie L/mol oder L/mmol angegeben wird.

In Abbildung 4.12a sind die berechneten  $\Delta G$ -Werte, gemittelt über alle vier ermittelten Bindeposen ( $\Delta G_{MW}$ ), gegen die experimentell bestimmten  $K_L$ -Werte für jedes Peptid geplottet. Jeder Datenpunkt des Diagramms repräsentiert die Bindeenergie bzw. den  $K_L$  der Isotherme eines Peptids. Die Fehlerbalken auf der y-Achse zeigen die Variabilität von  $\Delta G$  über die vier verschiedenen Bindeposen hinweg. Die Daten weisen eine starke logarithmische Korrelation zwischen  $K_L$  und  $\Delta G_{MW}$  ohne offensichtliche Ausreißer auf. Zur Analyse dieser Beziehung wurde eine logarithmische Funktion mit drei Parametern verwendet, um die Datenpunkte zu approximieren:

$$y(x) = a \ln(x + b) + c \quad (4.1)$$

Hierbei sind a, b und c die Parameter, welche zur Anpassung der Funktion an die Daten verwendet werden. Parameter a skaliert den Logarithmus, b verschiebt ihn horizontal und c bewirkt eine vertikale Verschiebung. Die Anpassung wurde mit der Software OriginPro 2023 durchgeführt. Die hierbei beste Anpassung ist durch Formel 4.2 gegeben und in Abbildung 4.12a als gestrichelte Linie dargestellt.

$$y(x) = -24.7 \ln(x + 0.7) - 43.8 \quad (4.2)$$

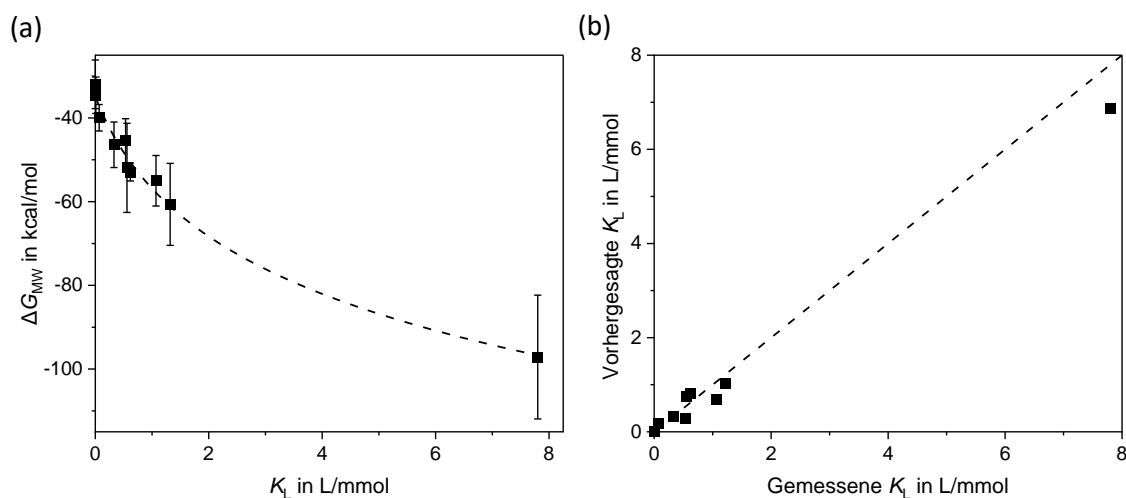
Oktapeptid-2 zeigte mit einem  $K_L$  von 7,8 L/mmol und einem  $\Delta G_{MW}$  von -97,1 kcal/mol, die höchsten Werte der beiden Größen auf. N-acetyl-Carnosin, Z-Lys-OMe und reduziertes

L-Gluthathion, wiesen geringe  $K_L$ -Werte von unter 0,1 L/mmol auf. Die entsprechenden  $\Delta G_{MW}$ -Werte dieser Peptide lagen im Bereich von -40 bis -32 kcal/mol. Dieser Bereich scheint eine Schwelle für die Adsorption darzustellen, was darauf hindeutet, dass Peptide einen minimalen  $\Delta G_{MW}$  von etwa -40 kcal/mol benötigen, um effektiv an das Harz adsorbieren zu können. Die finale logarithmische Anpassungsfunktion wies ein Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) von 0,98 auf. Dies bestätigt eine starke negative logarithmische Korrelation zwischen  $\Delta G_{MW}$  und den  $K_L$ -Werten in dieser Studie.

Zur Beurteilung, ob der simulative Ansatz ebenfalls zur Vorhersage von  $K_L$  geeignet ist, wurde eine 2-fache Kreuzvalidierung mit MatlabR2023a durchgeführt, wobei ebenfalls die Anpassungsfunktion aus Formel 4.1 verwendet wurde. Die Methode der Kreuzvalidierung wurde aufgrund ihrer Wirksamkeit bei der Bewertung der Modellleistung über zwei Datensätze hinweg ausgewählt. Hierfür wurden die Daten zufällig in ein Trainingsset und ein Testset aufgeteilt. Zunächst wurden anhand des Trainingsset die Parameter der Anpassungsfunktion bestimmt. Anschließend wurde mit diesen Parametern der  $K_L$  des unbekannten Testsets vorhergesagt. Daraufhin wurden die Rollen von Test- und Trainingsset vertauscht und der Vorgang wurde nochmals wiederholt. Abschließend konnten die durch den simulativen Ansatz vorhergesagten  $K_L$ -Werte mit den experimentell bestimmten  $K_L$ -Werten verglichen werden.

Diese Ergebnisse sind in Abbildung 4.12b dargestellt. Hierbei sind auf der y-Achse die durch den Workflow vorhergesagten  $K_L$ -Werte und auf der x-Achse die experimentell gemessenen  $K_L$ -Werte aufgetragen. In einem perfekten Modell würden alle Datenpunkte entlang der gestrichelten Linie mit einer Steigung von 1 liegen. Mit einem  $R^2$ -Wert von 0,96 und einen mittleren quadratischen Fehler (engl. *Root Mean Square Error* (RMSE)) von 0,38 L/mmol, kam das Modell sehr nah an die besagte Gerade heran. Hierbei konnten ebenfalls keine signifikanten Ausreißer beobachtet werden. Dies lässt auf eine sehr genaue Vorhersagekraft für Langmuir-Konstanten durch den entwickelten simulativen Ansatzes schließen.

Eine nennenswerter Eigenschaft ist hierbei die Wirksamkeit der Vorhersage über einen weiten Bereich von  $K_L$ -Werten. Dies ist entscheidend für die genaue Vorhersage von Binde- und Elutionsbedingungen. Durch diese effektive Vorhersage bietet das Modell ein wertvolles Werkzeug für das In-Silico Screening von Harzen. Somit könnte der Auswahlprozess von Harzen optimiert werden, indem Harze identifiziert werden können, welche die geeignetsten Binde- und Elutionseigenschaften für spezifische Zielmoleküle aufweisen, wodurch der Bedarf an umfangreichen experimentellen Screenings reduziert würde. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass für die untersuchten Peptide die Anfangssteigung des Graphen, welcher die erreichten Beladungen gegen die entsprechenden Gleichgewichtskonzentrationen aufträgt, ebenfalls eine starke logarithmische Korrelation mit den berechneten  $\Delta G_{MW}$ -Werten aufweist und einen  $R^2$ -Wert von 0,88 erreicht. Diese Erkenntnis könnte wertvoll für die Analyse von Systemen sein, deren Bindungsverhalten stark



**Abbildung 4.12.:** Experimentelle Validierung des simulativen Ansatzes - (a) zeigt die Beziehung zwischen den berechneten  $\Delta G_{MW}$  und den experimentell bestimmten  $K_L$ -Werten. (b) zeigt die Ergebnisse der Kreuzvalidierung, wobei vorhergesagte  $K_L$ -Werte mit experimentell bestimmten  $K_L$ -Werten verglichen werden.

vom Langmuir-Adsorptionsverhalten abweicht.

Zum Abschluss werden die inhärenten Einschränkungen des Modellierungsansatzes erläutert, insbesondere warum dieser sich nicht für die Vorhersage des zweiten Parameters der Langmuir-Isotherme, der maximalen Beladungskapazität ( $q_{max}$ ), eignet. Die Unterscheidung in der Fähigkeit des Modells,  $K_L$  vorhersagen zu können und  $q_{max}$  nicht, ergibt sich hauptsächlich aus der Natur der Parameter selbst und den Daten, welche zu deren Vorhersage erforderlich sind. Die Langmuir-Konstante spiegelt die Affinität oder Stärke der Wechselwirkung zwischen dem Peptid und dem Chromatographieharz wider. Dieser Parameter kann direkt aus der freien Bindeenergie abgeleitet werden, welche durch die simulativen Workflows berechnet werden kann. Es existiert also eine thermodynamisch begründbare Beziehung zwischen  $\Delta G$  und  $K_L$ , basierend auf kalkulierbaren energetischen Wechselwirkungen. Im Gegensatz dazu hängt  $q_{max}$  nicht nur von den molekularen Wechselwirkungen ab, sondern auch von den physikalischen und morphologischen Eigenschaften des Harzes, wie der zugänglichen Oberfläche, der Porengröße und der -verteilung sowie von möglichen Mehrschichteffekten der Zielmoleküle. Diese Faktoren beeinflussen, wie viele Moleküle effektiv physikalisch an das Harz bei Sättigung binden können. Da diese Parameter nicht direkt aus dem Oberflächenmodell abgeleitet werden können, welches sich auf Berechnungen von Bindeenergien konzentriert, liegen sie nicht im Rahmen der aktuellen Fähigkeiten des Modells.

Nichtsdestotrotz ermöglicht die Vorhersage von  $K_L$  die Bestimmung der Affinität zwischen Peptiden und chromatographischen Harzen, was für effiziente Trennprozesse unerlässlich ist. Durch die Bereitstellung eines zuverlässigen Workflows zur Vorhersage von  $K_L$ -Werten dient das Modell als wertvolles Werkzeug zur Verbesserung der Vorhersagbarkeit von Peptid-Harz-Wechselwirkungen und zur Förderung der Entwicklung effektiverer

chromatographischer Systeme. Somit könnte die vorläufige Auswahl der am besten geeigneten Harze erleichtert und der Bedarf an umfangreichen empirischen Tests reduziert werden. Da die Affinität zu potenziellen Zielmolekülen für Chromatographieharze von entscheidender Bedeutung ist, könnte dieser Ansatz ebenso für das rationale Design von Chromatographieharzen genutzt werden. Somit könnten maßgeschneiderte Harze mit verbesserten Leistungsmerkmalen für anspruchsvolle Trennaufgaben entwickelt werden.

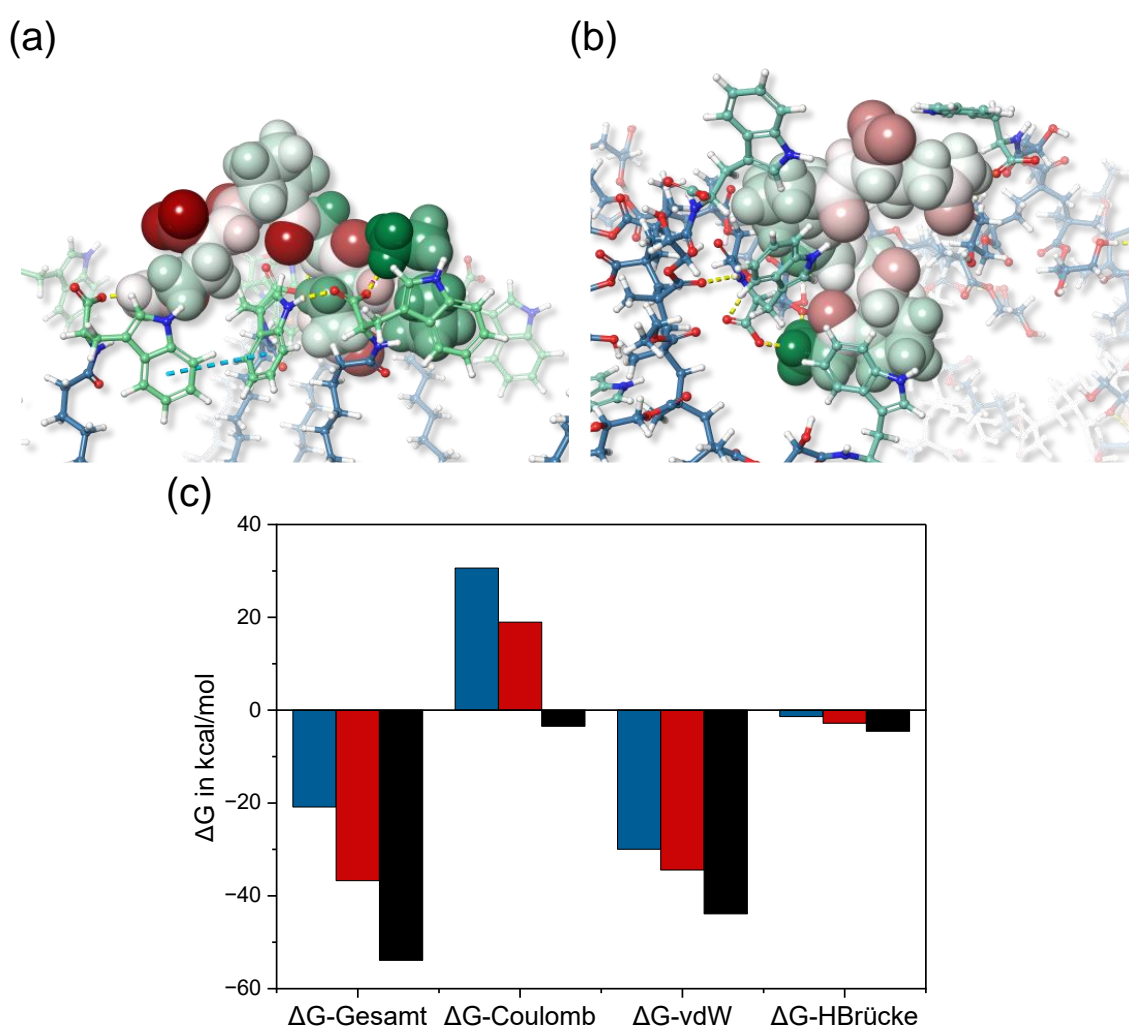
Zusammenfassend zeigt dieses Kapitel, dass der entwickelte simulative Ansatz zur Berechnung der freien Bindeenergie eine präzise Vorhersage der Langmuir-Konstanten für die untersuchten Peptide ermöglicht. Durch eine zweifache Kreuzvalidierung konnten experimentell bestimmte  $K_L$ -Werte mit einem  $R^2$  von 0,96 vorhergesagt werden, was eine hohe Vorhersagekraft des Modells bestätigt. Während die Methode erfolgreich für die Bestimmung von  $K_L$  eingesetzt werden kann, wurden auch die Grenzen des Ansatzes, insbesondere in Bezug auf die Vorhersage der maximalen Beladungskapazität, aufgezeigt. Dennoch stellt der Workflow ein wertvolles Werkzeug für die Optimierung chromatographischer Trennprozesse dar und bietet signifikantes Potenzial für das In-Silico Screening von Harzen sowie für *Rational-Design*-Ansätze zur Entwicklung neuartiger Chromatographiematerialien.

#### 4.3.2. Vergleich mit etablierten Modellen von Chromatographieharzen

Diese Analyse zielt darauf ab, die Vorhersagekraft des entwickelten MOC mit etablierten Ansätzen zur Simulation von Harzoberflächenmodellen zu vergleichen. Hierfür wurden Ligandenmodell 1 (LM1) und Ligandenmodell 2 (LM2) (siehe Abbildung 3.4) gemäß den in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Methoden erstellt. Die Oberflächen dieser vereinfachten Modelle bestehen ausschließlich aus Liganden, ohne Berücksichtigung des polymerischen Trägermaterials. Die Liganden von LM1 sind starr und geordnet auf einer planaren Fläche befestigt, während die LM2-Liganden an Kohlenstoffketten gebunden sind. Dies führt zu einer höheren Flexibilität der Ligandenbewegung und einer heterogeneren Oberflächenstruktur von LM2. Die Docking-Grids aller drei Modelle wurden als Eingabe an den Workflow übergeben, welcher in Kapitel 3.2.2 beschrieben ist, um die Bindeenergien mit den 10 ausgewählten Peptiden zu berechnen. Diese Kompatibilität mit verschiedenen Adsorbensmodellen unterstreicht nochmals die Vielseitigkeit des entwickelten Workflows.

Die Rechenzeit des Workflows war für die Ligandenmodelle geringer als für das MOC. Für die Berechnung der Bindeenergien von Oktapeptid-2 benötigte ein Computer mit einem Intel Core i7-10700 Prozessor und 32 GB Arbeitsspeicher 2 h und 42 min mit LM1 sowie 2 h und 55 min für LM2. Im Gegensatz dazu brauchte derselbe Rechner mit dem MOC 13 h und 52 min. Dieser signifikante Unterschied ist hauptsächlich auf die erhöhte Anzahl an Atomen und die größere Flexibilität der Liganden im MOC zurückzuführen. LM1 und LM2 wiesen vergleichbare Rechenzeiten auf, wobei LM2 aufgrund der etwas höheren Ligandenflexibilität eine geringfügig längere Berechnungsdauer aufwies.

Um die Unterschiede zwischen den Ligandenmodellen und dem MOC zu verdeutlichen, wird exemplarisch die Bindung von Hexapeptid-9 analysiert, welches trotz einer Nettoladung von null den zweithöchsten experimentell gemessenen  $K_L$  aufwies. Abbildung 4.13a und 4.13b zeigen eine Bindepose von Hexapeptid-9 mit LM2 bzw. dem MOC. Die Peptidreste sind farbcodiert, um ihren Beitrag zur Gesamtbindungsenergie darzustellen. Rötlichere Töne signalisieren Abstoßung, während grünere Töne eine stärkere Anziehung anzeigen. Abbildung 4.13c präsentiert eine Analyse der Bindeenergien, aufgeschlüsselt nach den Beiträgen von Coulomb- und van-der-Waals (vdW)-Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrücken, gemittelt über alle vier für Hexapeptid-9 berechneten Posen. Die Balken von LM1 sind hierbei blau, die von LM2 rot und die des MOC schwarz dargestellt. Eine bemerkenswerte Beobachtung ist, dass in den Ligandenmodellen abstoßende



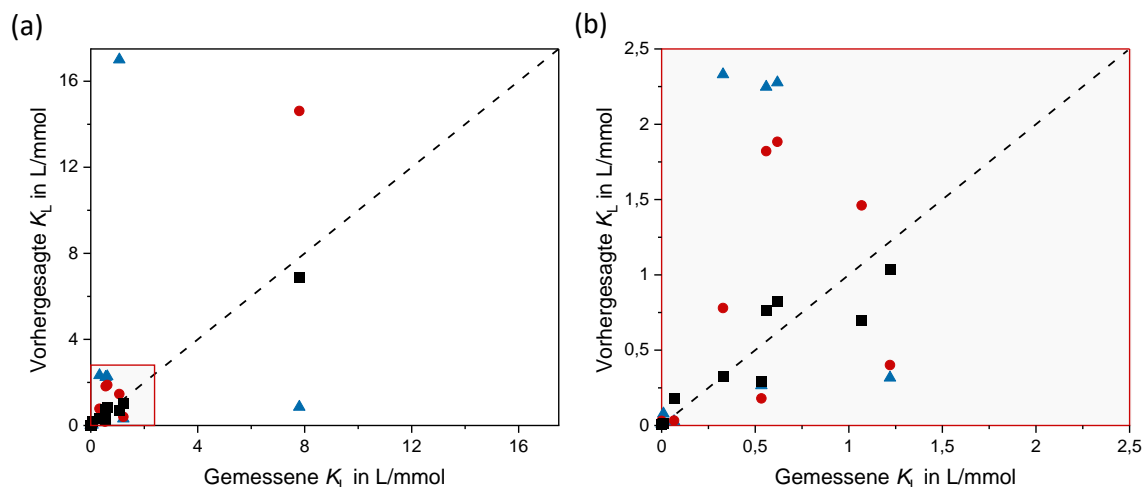
**Abbildung 4.13.:** Analyse der Bindeenergie und -posen von Hexapeptid-9 - (a) und (b) zeigen Bindeposen von Hexapeptid-9 mit dem LM2 beziehungsweise dem MOC, wobei die Peptidreste basierend auf ihrem Beitrag zu  $\Delta G$  farbcodiert sind. Panel (c) vergleicht die  $\Delta G$  von Hexapeptid-9 mit dem LM1 (blau), dem LM2 (rot) und dem MOC (schwarz) und visualisiert die Beiträge von Coulomb- und vdW-Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrücken, gemittelt über alle berechneten Posen.



Coulomb-Wechselwirkungen auftreten, bedingt durch die negativ geladene Carboxylgruppe von Hexapeptid-9. Im Gegensatz dazu zeigt das MOC leicht anziehende Coulomb-Wechselwirkungen aufgrund der Anziehung zur positiv geladenen Aminogruppe. Dieser Unterschied könnte auf die verschiedenen Ligandenorientierungen und -flexibilitäten in den Modellen zurückgeführt werden. Trotz ähnlicher Ligandendichten ermöglichen die Liganden in LM1 und LM2 durch ihre Exposition und Orientierung effektivere elektrostatische Wechselwirkungen. Im MOC hingegen moduliert die Polymerstruktur des Rückgrats die Orientierung und Flexibilität der Liganden, was es ihnen erlaubt, sich von negativen Bereichen weg und zu positiven Ladungen hin zu bewegen, wie in Abbildung 4.5 gezeigt. Dieser Trend wurde bei verschiedenen Peptiden beobachtet und zeigt systematische Unterschiede in der Beeinflussung der elektrostatischen Wechselwirkungen durch das Polymer-Rückgrat auf. Darüber hinaus trägt das polymere Rückgrat im MOC eine signifikante Teil zur gesamten Bindeenergie bei, wie in Abbildung 4.7 zu sehen. Daher verzeichnete das MOC die höchsten Gesamtbindeenergie, während LM1 und LM2 deutlich geringere Werte aufwiesen. Bei Peptiden mit stärkeren positiven Ladungen zeigte sich ein gegenteiliger Trend. Hier wiesen LM1 und LM2 oft vergleichsweise hohe Bindeenergien auf, da die exponierten Liganden stärkere elektrostatische Anziehungen ermöglichten.

Für quantitative Aussagen über die Vorhersagefähigkeit von Langmuir-Konstanten der Modelle, wurde das MOC gegen die beiden vereinfachten Harzoberflächenmodelle gebenchmarkt. Diese Bewertung umfasste die Durchführung einer Kreuzvalidierung für jedes Modell, wie in Kapitel 4.3.3 für das MOC beschrieben. Abbildung 4.14a zeigt das resultierende Validierungsdiagramm, in dem das MOC mit schwarzen Quadraten, LM1 mit blauen Dreiecken und LM2 mit roten Kreisen dargestellt sind. Eine zentrale Beobachtung ist hierbei, dass beide vereinfachten Modelle, LM1 und LM2, signifikante Ausreißer aufweisen. Insbesondere für LM1 war Acetyl-Tetrapeptid-3 ein Ausreißer, und für LM2 war es Oktapeptid-1, mit Nettoladungen von 1 bzw. 3. In beiden Fällen waren die vorhergesagten  $K_L$ -Werte deutlich höher als die experimentell bestimmten  $K_L$ -Werte. Für eine detailliertere Untersuchung der niedrigeren  $K_L$ -Werte zeigt Abbildung 4.14b eine vergrößerte Ansicht von Abbildung 4.14a. Hier wird ersichtlich, dass die Datenpunkte von LM1 und LM2 konsistent weiter von der idealen Vorhersagelinie abweichen als die des MOC. Interessanterweise neigen LM1 und LM2 dazu  $K_L$  für Peptide mit positiveren Ladungen zu überschätzen und für solche mit neutralen oder negativen Ladungen zu unterschätzen. Dieser Trend korreliert mit den zuvor diskutierten Ergebnissen, wo aufgezeigt wurde, dass die Ligandenmodelle höhere  $\Delta G$  für positiv geladene und niedrigere  $\Delta G$  für negativ geladene Peptide im Vergleich zum MOC aufweisen. Zudem zeigt sich, dass LM1 und LM2 bei niedrigeren  $K_L$ -Werten präzisere Vorhersagen liefern als bei höheren  $K_L$ -Werten, was sie eher zur Vorhersage von Elutions- als von Bindebedingungen in der Chromatographie geeignet macht.

Zur quantitativen Bewertung der Vorhersagefähigkeiten der Modelle zeigt Abbildung 4.15



**Abbildung 4.14.:** Validierungsplots des Modellvergleichs - (a) zeigt die Ergebnisse der Kreuzvalidierungen für das MOC (schwarze Quadrate) und der zwei Liganden-Modelle der Harzoberfläche, LM2 (rote Kreise) und LM1 (blaue Dreiecke). Vorhergesagte  $K_L$ -Werte sind gegen experimentell bestimmte  $K_L$ -Werte aufgetragen. Panel (b) bietet eine vergrößerte Ansicht von (a) für eine bessere Sichtbarkeit von  $K_L$ -Werten unter 2,5 L/mmol.

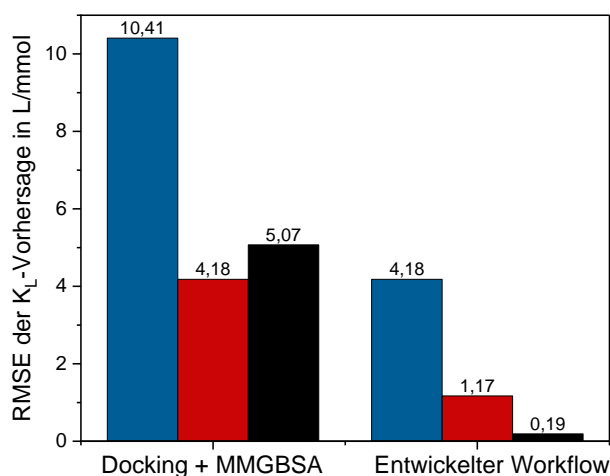
drei Balken auf der rechten Seite, welche jeweils die RMSE des MOCs (schwarz) und der beiden Ligandenmodelle (LM1 blau und LM2 rot) für die  $K_L$ -Vorhersage darstellen. Hierbei zeigt LM1 die geringste Präzision bei den Vorhersagen mit einem RMSE von 5,49 L/mmol, während LM2 mit einem RMSE von 1,17 L/mmol eine bemerkenswerte Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit aufweist. Diese gesteigerte Genauigkeit könnte auf die verbesserte Ligandenflexibilität in LM2 zurückzuführen sein, welche zu einer heterogeneren Oberflächenkonfiguration führt, ein Merkmal, das LM2 deutlich von LM1 unterscheidet. Das MOC übertrifft beide vereinfachten Modelle und erreicht den niedrigsten RMSE von 0,19 L/mmol. Diese erhöhte Genauigkeit kann wahrscheinlich der realistischeren Darstellung der Harzoberfläche zugeschrieben werden, welche durch die Einbeziehung des Polymer-Rückgrats in das Modell erreicht wurde.

Zusammenfassend zeigt dieses Unterkapitel, dass das entwickelte MOC eine überlegene Vorhersagegenauigkeit für Langmuir-Konstanten der untersuchten Peptide im Vergleich zu den etablierten Ligandenmodellen bietet. Insbesondere die Integration des methacrylatbasierenden Rückgrats im MOC ermöglicht eine detailliertere Simulation der Harzoberfläche, was zu präziseren Vorhersagen der Langmuir-Konstanten führte. Während die vereinfachten Modelle dazu neigten den  $K_L$  positiv geladener Peptide über- und negativ geladene Peptide unterzubestimmen, konnte das MOC durchweg genauere Vorhersagen treffen. Diese verbesserte Genauigkeit unterstreicht die Bedeutung der Berücksichtigung von Polymerflexibilität und -hydrophobizität, sowie der Oberflächenheterogenität in der Modellierung von Chromatographiehharzen. Die Berücksichtigung dieser Eigenschaften macht das MOC zu einem wertvollen Werkzeug für die präzise Bestimmung von Langmuir-Konstanten.

### 4.3.3. Benchmarking des Workflows zur Bestimmung von Bindeenergien

In einer zweiten Analyse wurde der entwickelte Workflow zur Berechnung von  $\Delta G_{\text{MW}}$  gegen eine hierfür bereits etablierte Methode gebenchmarkt. Diese etablierte Methode wurde für die Berechnung von Wechselwirkungen zwischen Enzymen und Liganden entwickelt und besteht aus einer Glide-Docking Simulation mit nachfolgender MM-GBSA-Berechnung zur Bestimmung der Bindeenergie [145]. Abbildung 4.15 präsentiert diesen Vergleich, wobei die Balken auf der linken Seite den RMSE für die  $K_L$ -Vorhersagen unter Verwendung des etablierten Workflows für alle drei untersuchten Harzoberflächenmodelle zeigen. Eine auffällige Beobachtung aus diesem Vergleich ist, dass alle Modelle höhere RMSE-Werte aufweisen, wenn die Bindeenergien mit der herkömmlichen Methode berechnet werden, im Vergleich mit dem neu entwickelten Workflow. Das LM1 zeigte den höchsten RMSE für beide Workflows, was darauf hindeutet, dass das geordnete und starre Design möglicherweise die Komplexität der realen Harzoberfläche nicht genau nachbilden kann. Darüber hinaus wiesen sowohl das LM2 als auch das MOC RMSE-Werte von über 4 L/mmol bei der etablierten Methode auf, was deutlich höher ist als der durchschnittliche gemessene  $K_L$  von 1,3 L/mmol. Dies weist auf eine unzureichende Genauigkeit der Vorhersagen hin und unterstreicht, wie stark die Effektivität eines Modells von der verwendeten Berechnungsmethode abhängen kann. Zusätzlich wird verdeutlicht, dass molekulare Simulationsansätze, welche für eine bestimmte Anwendung etabliert sind, sich nicht immer problemlos auf andere Systeme übertragen lassen können.

Ein wesentlicher Unterschied des entwickelten Workflows zu der etablierten Methode ist seine Fähigkeit, die Flexibilität des Polymer-Rückgrats des Harzes zu berücksichtigen. Dies wurde durch einen Minimierungsschritt erreicht, welcher es der Harzoberfläche er-



**Abbildung 4.15.:** Vergleich der RMSE von Modellierungsansätzen – Die Abbildung zeigt die RMSE für  $K_L$ -Vorhersagen über verschiedene Modelle hinweg. Die Balken auf der linken Seite repräsentieren die RMSE des etablierten Glide-Docking- und MM-GBSA-Workflows, während die Balken auf der rechten Seite die RMSE des in dieser Arbeit entwickelten Workflows darstellen. Die RMSE des MOC sind in schwarzen Balken, sowie die des LM1 und des LM2 in blauen beziehungsweise roten Balken angezeigt.

möglichst, sich nach der Adsorption des Peptids anzupassen. Mit diesem Ansatz blieb der Rechenaufwand jedoch trotzdem vergleichsweise gering, insbesondere im Vergleich zu zeitaufgelösten Molekulardynamik-Simulationen. Darüber hinaus integriert der Workflow subatomare Effekte durch die Verwendung einer semiempirischen Quantenmechanik-Methode. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich die Hauptfaktoren für die gesteigerte Genauigkeit des MOC, da es LM2 in der Vorhersagegenauigkeit nur übertrifft, wenn diese Aspekte berücksichtigt werden. Diese Benchmarking-Studie verdeutlicht die Bedeutung der Auswahl beziehungsweise der Entwicklung geeigneter Berechnungsmethoden, welche auf die spezifischen Eigenschaften und Komplexitäten der untersuchten Systeme angepasst sind. Dies gilt insbesondere bei Anwendungen wie der Chromatographie, welche komplexe molekulare Wechselwirkungen beinhalten.

Zusammenfassend zeigt der Vergleich, dass der entwickelte Workflow zur Berechnung der Bindeenergie gegenüber der bereits etablierten Methode signifikante Vorteile bietet, insbesondere durch die Berücksichtigung der Flexibilität des Polymer-Rückgrats in den Harzmodellen. Die Kombination erhöhter Genauigkeit mit trotzdem geringen Rechenaufwand macht den entwickelten Workflow zu einem effektiven Werkzeug für die Simulation komplexer molekularer Wechselwirkungen in der Chromatographie und stellt eine Weiterentwicklung zum aktuellen Stand der Forschung dar.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Im experimentellen Teil dieser Arbeit wurden zunächst die Bindeaffinitäten zwischen linearen Peptiden und einem multimodalen Chromatographieharz bestimmt. Hierfür wurde ein Robotiklabor etabliert, welches Adsorptionsisothermen automatisiert aufnehmen konnte. Dies ermöglichte eine hohe Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der experimentellen Daten. Die resultierenden Adsorptionsisothermen der zehn untersuchten Peptide zeigten ein klassisches Langmuir-Verhalten. Eine Analyse der Ergebnisse offenbarte, dass die Bindeaffinitäten zu dem multimodalen Chromatographieharz nicht allein aus der Nettoladung der Peptide ableitbar waren, sondern unter anderem auch von der spezifischen Ladungsverteilung und den hydrophoben Eigenschaften der Peptide abhingen. Dies verdeutlichte die Notwendigkeit eines umfassenderen Ansatzes zur Vorhersage von Bindeaffinitäten, welcher die dreidimensionalen Interaktionen zwischen Peptiden und der Harzoberfläche berücksichtigt, anstatt sich ausschließlich auf einzelne Deskriptoren, wie die Nettoladung, zu stützen.

Deshalb wurden in dieser Arbeit molekulare Modellierungsabläufe zur Simulation der Adsorption von Peptiden an Chromatographieharze entwickelt und validiert. In einem ersten Workflow wurde ein detailliertes Modell der Oberfläche eines kommerziellen, methacrylatbasierten, multimodalen Chromatographieharzes erstellt. Dabei wurde der Herstellungsprozess des Harzes, einschließlich der Polymerisation des Trägermaterials und der anschließenden Ligandenbindung, in einer virtuellen Umgebung nachgebildet. Das resultierende atomistische Modell diente als Eingabe für einen zweiten Workflow, welcher die Interaktionen zwischen der Harzoberfläche und den linearen Peptiden simulierte. Hierbei konnten für jedes der zehn Peptide vier unterschiedliche Bindeposen identifiziert werden. Die berechneten Bindeenergien zwischen den Posen jedes Peptids wiesen jedoch signifikante Unterschiede auf. Diese Variationen verdeutlichen nochmals die Komplexität des Adsorptionsprozesses, da die finalen Bindeenergien von unterschiedlichsten Faktoren abhingen. Durch detaillierte Analysen konnte gezeigt werden, dass die Ligandendichte, die

Struktur der Harzoberfläche sowie die Peptid- und Polymerflexibilität hierbei entscheidende Faktoren sind, welche die resultierende Bindeenergie maßgeblich beeinflussen können. Die entwickelten mehrstufigen Simulationsprozesse wurden zusätzlich in WMSs automatisiert und öffentlich verfügbar gemacht. Dies sollte dazu beitragen, deren Effizienz und Reproduzierbarkeit zu steigern und die Methodik für Forscher zugänglicher zu machen, welche möglicherweise nicht über tiefgehende Simulationskenntnisse verfügen.

Der etablierte simulative Ansatz zeigte seine Stärke insbesondere bei der Vorhersage von Bindeaffinitäten. In einer detaillierten Studie konnte eine starke, negativ logarithmische Korrelation zwischen den berechneten Bindeenergien und den experimentell bestimmten Langmuir-Konstanten der Peptide festgestellt werden. Eine Kreuzvalidierung mit einem  $R^2$  von 0,96 und einem RMSE von 0,38 L/mmol bestätigte eine hohe Vorhersagekraft des Modells für experimentell bestimmte  $K_L$ -Werte. Dies zeigt, dass die entwickelten Simulationsmethoden präzise Vorhersagen des Adsorptionsverhaltens in chromatographischen Systemen ermöglichen.

Ein Vergleich des entwickelten Oberflächenmodells mit etablierten Modellierungsmethoden von Chromatographieharzen offenbarte, dass der in dieser Arbeit entwickelte Modellierungsansatz eine höhere Vorhersagegenauigkeit für Langmuirkonstanten besitzt. Dies ist wahrscheinlich auf die realistischere Darstellung der Harzoberfläche zurückzuführen, welche das polymerische Trägermaterial und die komplexe dreidimensionale Struktur der Harzoberfläche berücksichtigt. In einer finalen Benchmarkstudie wurde der neuen Workflows zur Berechnung der Bindeenergie mit einer etablierten Hochdurchsatz-Methode verglichen. Hierbei stellte sich heraus, dass der neue Workflow durch die Berücksichtigung der Flexibilität des Trägermaterials und die Integration subatomarer Effekte eine höhere Genauigkeit bei der Vorhersage der  $K_L$ -Werten bot.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Arbeit einen Grundstein zur präziseren und effizienteren molekularen Modellierung von Chromatographieharzen und deren Adsorptionsmechanismen mit Peptiden bildet. Die detaillierten atomistischen Modelle könnten in Zukunft neue Möglichkeiten für das Design und die Entwicklung von Harzen mit verbesserten Leistungsmerkmalen und maßgeschneiderten Liganden bieten. Außerdem könnten mit den öffentlich verfügbaren Workflows in der Prozessentwicklung potentielle Chromatographieharze sowie ideale Binde- und Elutionsbedingungen für gegebene Trennprobleme gescreent werden. Diese Fortschritte wären insbesondere in der biopharmazeutischen Industrie von großer Bedeutung, da sie die Effizienz und Genauigkeit von Trennprozessen erhöhen und letztlich zu niedrigeren Produktionskosten führen könnten.

Zukünftige Forschungsarbeiten können auf den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen aufbauen. Eine mögliche Richtung ist die weitere Verfeinerung des molekularen Oberflächenmodells, um die Genauigkeit der simulierten Bindeposen und -energien weiter zu steigern. Experimentelle oder empirische Untersuchungen könnten genutzt werden,

um Modellparameter wie Ligandendichte, Quervernetzungsgrad und Polymerdichte zu optimieren.

Darüber hinaus sollten die entwickelten Methoden und Modelle auf eine breitere Palette von Zielmolekülen und Harztypen angewendet werden. Dies würde nicht nur die Generalisierbarkeit und Robustheit des Ansatzes demonstrieren, sondern auch wertvolle Einblicke in die Wechselwirkungen und Trennmechanismen von verschiedenen chromatographischen Systemen bieten. Die Kombination aus detaillierten molekularen Modellen, fortschrittlichen Simulations- und Datenanalysetools sowie experimenteller Validierung könnte zur Weiterentwicklung und Optimierung chromatographischer Trennverfahren entscheidend beitragen.

Ein weiterer wichtiger Punkt für die Zukunft ist die Erweiterung des Workflows zur Berücksichtigung größerer Biomoleküle, wie beispielsweise Proteinen. Derzeit ist der Glide-Docking-Schritt auf Moleküle mit maximal 500 Atomen oder 100 rotierbaren Bindungen beschränkt, was den Anwendungsbereich auf kleinere Biomoleküle wie lineare Peptide limitiert. Eine Erweiterung des Workflows könnte seine Anwendbarkeit und Relevanz in der chromatographischen Forschung maßgeblich steigern.





## Literaturverzeichnis

- [1] GUIOCHON, Georges ; BEAVER, Lois A.: Separation science is the key to successful biopharmaceuticals. In: *Journal of Chromatography A* 1218 (2011), Dezember, Nr. 49, S. 8836–8858. – ISSN 0021–9673
- [2] BABI, Deenesh K. ; GRIESBACH, Jan ; HUNT, Stephen ; INSAIDOO, Francis ; ROUSH, David ; TODD, Robert ; STABY, Arne ; WELSH, John ; WITTKOPP, Felix: Opportunities and challenges for model utilization in the biopharmaceutical industry: current versus future state. In: *Current Opinion in Chemical Engineering* 36 (2022), Juni, S. 100813. – ISSN 2211–3398
- [3] LOSACCO, Gioacchino L. ; HICKS, Michael B. ; DASILVA, Jimmy O. ; WANG, Heather ; POTAPENKO, Miraslava ; TSAY, Fuh-Rong ; AHMAD, Imad A. H. ; MANGION, Ian ; GUILLARME, Davy ; REGALADO, Erik L.: Automated ion exchange chromatography screening combined with in silico multifactorial simulation for efficient method development and purification of biopharmaceutical targets. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 414 (2022), Mai, Nr. 12, S. 3581–3591. – ISSN 1618–2650
- [4] SEIDEL-MORGENSTERN, Andreas ; SCHULTE, Michael ; EPPING, Achim: Fundamentals and General Terminology. In: *Preparative Chromatography*. John Wiley & Sons, Ltd, 2012. – ISBN 978–3–527–64928–0, S. 7–46
- [5] HANCOCK, W. S. ; SPARROW, James T.: Use of mixed-mode, high-performance liquid chromatography for the separation of peptide and protein mixtures. In: *Journal of Chromatography A* 206 (1981), Februar, Nr. 1, S. 71–82. – ISSN 0021–9673
- [6] ZHAO, Guofeng ; DONG, Xiao-Yan ; SUN, Yan: Ligands for mixed-mode protein chromatography: Principles, characteristics and design. In: *Journal of Biotechnology* 144 (2009), Oktober, Nr. 1, S. 3–11. – ISSN 0168–1656
- [7] ZHANG, Kelly ; LIU, Xiaodong: Reprint of “Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications”. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 130 (2016), Oktober, S. 19–34. – ISSN 0731–7085
- [8] MUCA, Renata ; ANTOS, Dorota: Protein association on multimodal chromatography media. In: *Journal of Chromatography A* 1691 (2023), Februar, S. 463827. – ISSN 0021–9673
- [9] KALLBERG, Kristian ; JOHANSSON, Hans-Olof ; BULOW, Leif: Multimodal chromatography: An efficient tool in downstream processing of proteins. In: *Biotechnology Journal* 7 (2012), Nr. 12, S. 1485–1495. – ISSN 1860–7314
- [10] DISMER, Florian ; HUBBUCH, Juergen: 3D structure-based protein retention prediction for ion-exchange chromatography. In: *Journal of Chromatography A* 1217 (2010), Februar, Nr. 8, S. 1343–1353. – ISSN 0021–9673
- [11] SHUKLA, Abhinav A. ; RAMEEZ, Shahid ; WOLFE, Leslie S. ; OIEN, Nathan: High-Throughput Process Development for Biopharmaceuticals. In: KISS, Bob (Hrsg.) ; GOTTSCHALK, Uwe (Hrsg.) ; POHLSCHIEDT, Michael (Hrsg.): *New Bioprocessing Strategies: Development and Manufacturing of Recombinant Antibodies and Proteins*. Cham : Springer International Publishing, 2018. – ISBN 978–3–319–97110–0, S. 401–441
- [12] DISMER, Florian ; PETZOLD, Martin ; HUBBUCH, Jürgen: Effects of ionic strength and mobile phase pH on the binding orientation of lysozyme on different ion-exchange adsorbents. In: *Journal of Chromatography A* 1194 (2008), Juni, Nr. 1, S. 11–21. – ISSN 0021–9673
- [13] SARDELLA, Roccaldo ; CAMAIONI, Emidio ; MACCHIARULO, Antonio ; GIOIELLO, Antimo ; MARINOZZI, Maura ; CAROTTI, Andrea: Computational studies in enantioselective liquid chromatography: Forty years of evolution in docking- and molecular dynamics-based simulations. In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 122 (2020), Januar, S. 115703. – ISSN 0165–9936
- [14] DISMER, Florian ; HUBBUCH, Jürgen: A novel approach to characterize the binding orientation of lysozyme on ion-exchange resins. In: *Journal of Chromatography A* 1149 (2007), Mai, Nr. 2, S. 312–320. – ISSN 0021–9673

- [15] KITTELMANN, Jörg ; LANG, Katharina M. H. ; OTTENS, Marcel ; HUBBUCH, Jürgen: An orientation sensitive approach in biomolecule interaction quantitative structure–activity relationship modeling and its application in ion-exchange chromatography. In: *Journal of Chromatography A* 1482 (2017), Januar, S. 48–56. – ISSN 0021–9673
- [16] BENES, Milan J. ; HORÁK, Daniel ; SVEC, Frantisek: Methacrylate-based chromatographic media. In: *Journal of Separation Science* 28 (2005), Nr. 15, S. 1855–1875. – ISSN 1615–9314
- [17] DROR, Ron O. ; DIRKS, Robert M. ; GROSSMAN, J. P. ; XU, Huafeng ; SHAW, David E.: Biomolecular Simulation: A Computational Microscope for Molecular Biology. In: *Annual Review of Biophysics* 41 (2012), Juni, Nr. Volume 41, 2012, S. 429–452. – ISSN 1936–122X, 1936–1238
- [18] APRENTAS: Chromatographie Grundlagen. In: APRENTAS (Hrsg.): *Laborpraxis Band 3: Trennungsmethoden*. Cham : Springer International Publishing, 2017. – ISBN 978–3–0348–0969–6 978–3–0348–0970–2, S. 187–223
- [19] UNGER, Klaus K. ; DITZ, R. ; MACHTEJEVAS, E. ; SKUDAS, R.: Flüssigkeitschromatographie – ihre Entwicklung und Bedeutung für die Lebenswissenschaften. In: *Angewandte Chemie* 122 (2010), Nr. 13, S. 2350–2363. – ISSN 1521–3757
- [20] SCOTT, Raymond P.: Liquid chromatography detectors. In: *Chrom-Ed Book Series* (2003), S. 1–104
- [21] SCOTT, Raymond P.: Preparative chromatography. In: *Chrom-Ed Book Series* (2003), S. 22–36
- [22] SCHULTE, Michael ; JÖHNCK, Matthias ; SKUDAS, Romas ; UNGER, Klaus K. ; HOHENESCHE, Cedric du Fresne v. ; WEWERS, Wolfgang ; DINGENEN, Jules ; KINKEL, Joachim: Stationary Phases and Chromatographic Systems. In: *Preparative Chromatography*. John Wiley & Sons, Ltd, 2012. – ISBN 978–3–527–64928–0, S. 47–198
- [23] JUNGBAUER, Alois ; HAHN, Rainer: Chapter 22 Ion-Exchange Chromatography. In: BURGESS, Richard R. (Hrsg.) ; DEUTSCHER, Murray P. (Hrsg.): *Methods in Enzymology* Bd. 463. Academic Press, Januar 2009, S. 349–371
- [24] FEKETE, Szabolcs ; BECK, Alain ; VEUTHEY, Jean-Luc ; GUILLARME, Davy: Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 113 (2015), September, S. 43–55. – ISSN 0731–7085
- [25] YAMAMOTO, Shuichi ; NAKANISHI, Kazahiro ; MATSUNO, Ryuichi: *Ion-Exchange Chromatography of Proteins*. CRC Press, 1988. – ISBN 978–0–8247–7903–0
- [26] CUMMINS, Philip M. ; ROCHFORD, Keith D. ; O’CONNOR, Brendan F.: Ion-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application. In: WALLS, Dermot (Hrsg.) ; LOUGHRAN, Sinéad T. (Hrsg.): *Protein Chromatography: Methods and Protocols*. New York, NY : Springer, 2017. – ISBN 978–1–4939–6412–3, S. 209–223
- [27] QUEIROZ, J. A. ; TOMAZ, C. T. ; CABRAL, J. M. S.: Hydrophobic interaction chromatography of proteins. In: *Journal of Biotechnology* 87 (2001), Mai, Nr. 2, S. 143–159. – ISSN 0168–1656
- [28] FEKETE, Szabolcs ; VEUTHEY, Jean-Luc ; BECK, Alain ; GUILLARME, Davy: Hydrophobic interaction chromatography for the characterization of monoclonal antibodies and related products. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 130 (2016), Oktober, S. 3–18. – ISSN 0731–7085
- [29] OCHOA, J. L.: Hydrophobic (interaction) chromatography. In: *Biochimie* 60 (1978), März, Nr. 1, S. 1–15. – ISSN 0300–9084
- [30] MAHN, Andrea ; ASENJO, Juan A.: Prediction of protein retention in hydrophobic interaction chromatography. In: *Biotechnology Advances* 23 (2005), Juli, Nr. 5, S. 359–368. – ISSN 0734–9750
- [31] HOFMEISTER, Franz: Zur Lehre von der Wirkung der Salze. In: *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 24 (1888), Februar, Nr. 4, S. 247–260. – ISSN 1432–1912
- [32] MCCUE, Justin T.: Chapter 25 Theory and Use of Hydrophobic Interaction Chromatography in Protein Purification Applications. In: BURGESS, Richard R. (Hrsg.) ; DEUTSCHER, Murray P. (Hrsg.): *Methods in Enzymology* Bd. 463. Academic Press, Januar 2009, S. 405–414
- [33] LIENQUEO, M. E. ; MAHN, Andrea ; SALGADO, J. C. ; ASENJO, Juan A.: Current insights on protein behaviour in hydrophobic interaction chromatography. In: *Journal of Chromatography B* 849 (2007), April, Nr. 1, S. 53–68. – ISSN 1570–0232
- [34] ISSAQ, Haleem J. ; CHAN, King C. ; JANINI, George M. ; MUSCHIK, Gary M.: Multidimensional Multimodal Instrumental Separation of Complex Mixtures. In: *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 23 (2000), Januar, Nr. 1, S. 145–154. – ISSN 1082–6076

- [35] YANG, Yun ; GENG, Xindu: Mixed-mode chromatography and its applications to biopolymers. In: *Journal of Chromatography A* 1218 (2011), Dezember, Nr. 49, S. 8813–8825. – ISSN 0021–9673
- [36] PINTO, Inês F. ; AIRES-BARROS, Maria R. ; AZEVEDO, Ana M.: Multimodal chromatography: debottlenecking the downstream processing of monoclonal antibodies. In: *Pharmaceutical Bioprocessing* 3 (2015), Juni, Nr. 3, S. 263–279. – ISSN 2048–9145, 2048–9153
- [37] R. MANSOUR, Fotouh ; D. DANIELSON, Neil: Multimodal liquid chromatography of small molecules. In: *Analytical Methods* 5 (2013), Nr. 19, S. 4955–4972. <http://dx.doi.org/10.1039/C3AY40302E>. – DOI 10.1039/C3AY40302E
- [38] NFOR, Beckley K. ; NOVERRAZ, Marc ; CHILAMKURTHI, Sreekanth ; VERHAERT, Peter D. E. M. ; WIELEN, Luuk A. M. d. ; OTTENS, Marcel: High-throughput isotherm determination and thermodynamic modeling of protein adsorption on mixed mode adsorbents. In: *Journal of Chromatography A* 1217 (2010), Oktober, Nr. 44, S. 6829–6850. – ISSN 0021–9673
- [39] ITOH, Daisuke ; YOSHIMOTO, Noriko ; YAMAMOTO, Shuichi: Retention Mechanism of Proteins in Hydroxyapatite Chromatography – Multimodal Interaction Based Protein Separations: A Model Study. In: *Current Protein and Peptide Science* 20 (2019), Januar, Nr. 1, S. 75–81
- [40] QIU, Hongdeng ; LIANG, Xiaojing ; SUN, Min ; JIANG, Shengxiang: Development of silica-based stationary phases for high-performance liquid chromatography. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399 (2011), April, Nr. 10, S. 3307–3322. – ISSN 1618–2650
- [41] YANG, Yan-Bo ; HARRISON, Kervin ; KINDSVATER, John: Characterization of a novel stationary phase derived from a hydrophilic polystyrene-based resin for protein cation-exchange high-performance liquid chromatography. In: *Journal of Chromatography A* 723 (1996), Februar, Nr. 1, S. 1–10. – ISSN 0021–9673
- [42] NAWROCKI, J. ; DUNLAP, C. ; LI, J. ; ZHAO, J. ; MCNEFF, C. V. ; MCCORMICK, A. ; CARR, P. W.: Part II. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. In: *Journal of Chromatography A* 1028 (2004), Februar, Nr. 1, S. 31–62. – ISSN 0021–9673
- [43] NAWROCKI, J. ; DUNLAP, C. ; MCCORMICK, A. ; CARR, P. W.: Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. In: *Journal of Chromatography A* 1028 (2004), Februar, Nr. 1, S. 1–30. – ISSN 0021–9673
- [44] TANAKA, Nobuo ; HASHIZUME, Katsushi ; ARAKI, Mikio: Comparison of polymer-based stationary phases with silica-based stationary phases in reversed-phase liquid chromatography: Selective binding of rigid, compact molecules by alkylated polymer gels. In: *Journal of Chromatography A* 400 (1987), Juli, S. 33–45. – ISSN 0021–9673
- [45] NWEKE, Mauryn C. ; MCCARTNEY, R. G. ; BRACEWELL, Daniel G.: Mechanical characterisation of agarose-based chromatography resins for biopharmaceutical manufacture. In: *Journal of Chromatography A* 1530 (2017), Dezember, S. 129–137. – ISSN 0021–9673
- [46] JIANG, Feng ; XU, Xin-Wei ; CHEN, Fu-Quan ; WENG, Hui-Fen ; CHEN, Jun ; RU, Yi ; XIAO, Qiong ; XIAO, An-Feng: Extraction, Modification and Biomedical Application of Agarose Hydrogels: A Review. In: *Marine Drugs* 21 (2023), Mai, Nr. 5, S. 299. – ISSN 1660–3397
- [47] ISHIHARA, Takashi ; MIYAHARA, Maki ; YAMAMOTO, Koichi: Monoclonal antibody purification using activated carbon as a replacement for Protein A affinity chromatography. In: *Journal of Chromatography B* 1102–1103 (2018), Dezember, S. 1–7. – ISSN 1570–0232
- [48] ŠVEC, František ; HRADIL, Jiří ; ČOUPEK, Jiří ; KÁLAL, Jaroslav: Reactive polymers I. Macroporous methacrylate copolymers containing epoxy groups. In: *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* 48 (1975), Nr. 1, S. 135–143. – ISSN 1522–9505
- [49] BUKOWSKA, Agnieszka ; BUKOWSKI, Wiktor ; NOWORÓŁ, Jarosław: New 2-hydroxyethyl methacrylate resins with good swelling characteristics. In: *Journal of Applied Polymer Science* 101 (2006), Nr. 3, S. 1487–1493. – ISSN 1097–4628
- [50] ALVAREZ, Cecilia I. ; GOMEZ, Cesar G. ; STRUMIA, Miriam C.: Influence of the polymeric morphology of sorbents on their properties in affinity chromatography. In: *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 49 (2001), Oktober, Nr. 1, S. 141–151. – ISSN 0165–022X
- [51] BUSZEWSKI, Bogusław ; JAĆKOWSKA, Magdalena ; BOCIAN, Szymon ; KOSOBUECKI, Przemysław ; GAWDZIK, Barbara: Functionalized polymeric stationary phases for ion chromatography. In: *Journal of Separation Science* 34 (2011), Nr. 6, S. 601–608. – ISSN 1615–9314

- [52] HORÁK, D. ; ŠVEC, F. ; BLEHA, M. ; KÁLAL, J.: Reactive polymers, XXXV. The effect of polymerization conditions on the specific surface area of macroporous copolymers from glycidylmethacrylate-ethylenedimethacrylate. In: *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* 95 (1981), Nr. 1, S. 109–115. – ISSN 1522–9505
- [53] JIANG, Zhengjin ; SMITH, Norman W. ; FERGUSON, Paul D. ; TAYLOR, Mark R.: Hydrophilic Interaction Chromatography Using Methacrylate-Based Monolithic Capillary Column for the Separation of Polar Analytes. In: *Analytical Chemistry* 79 (2007), Februar, Nr. 3, S. 1243–1250. – ISSN 0003–2700
- [54] GIL, Julie ; PASSALACQUA, Gaëtan ; DELOCHE, Adrien ; VIDAL, François-Xavier ; DUGAS, Vincent ; DEMESMAY, Claire: Optimization of the Preparation of Hydrophilic Poly(DHPMA-co-MBA) Monolithic Capillary Columns: A New Support for Affinity Chromatography. In: *Separations* 10 (2023), August, Nr. 8, S. 437. – ISSN 2297–8739
- [55] SAKAI, Yoshiro ; MATUGUCHI, Masanobu ; SADAOKA, Yoshihiko ; HIRAYAMA, Kazuko: A Humidity Sensor Composed of Interpenetrating Polymer Networks of Hydrophilic and Hydrophobic Methacrylate Polymers. In: *Journal of The Electrochemical Society* 140 (1993), Februar, Nr. 2, S. 432–436. – ISSN 0013–4651, 1945–7111
- [56] SMIGOL, Vladimír ; SVEC, Frantisek: Preparation and properties of uniform beads based on macroporous glycidyl methacrylate–ethylene dimethacrylate copolymer: Use of chain transfer agent for control of pore-size distribution. In: *Journal of Applied Polymer Science* 48 (1993), Nr. 11, S. 2033–2039. – ISSN 1097–4628
- [57] COUPEK, J. ; KRIVAKOVA, M. ; POKORNY, S.: New hydrophilic materials for chromatography: Glycol methacrylates. In: *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia* 42 (1973), Nr. 1, S. 185–190. – ISSN 1936–0959
- [58] BESSELINK, Tamara ; PADT, Albert van d. ; JANSSEN, Anja E. M. ; BOOM, Remko M.: Are axial and radial flow chromatography different? In: *Journal of Chromatography A* 1271 (2013), Januar, Nr. 1, S. 105–114. – ISSN 0021–9673
- [59] HAMILTON, Paul B. ; BOGUE, Donald C. ; ANDERSON, Roberta A.: Ion exchange chromatography of amino acids. Analysis of diffusion (Mass transfer) mechanisms. In: *Analytical Chemistry* 32 (1960), Dezember, Nr. 13, S. 1782–1792. – ISSN 0003–2700, 1520–6882
- [60] ADAMSON, Arthur W. ; GAST, Alice P.: *Physical chemistry of surfaces*. Bd. 150. Interscience publishers New York, 1967. – ISBN 0–306–09012–0
- [61] RUTHVEN, Douglas M.: *Principles of Adsorption and Adsorption Processes*. John Wiley & Sons, 1984. – ISBN 978–0–471–86606–0
- [62] ATKINS, Peter W. ; PAULA, Julio D. ; KEELER, James: *Atkins' Physical Chemistry*. Oxford University Press, 2023. – ISBN 978–0–19–884781–6
- [63] SOHN, Seungman ; KIM, Dongsu: Modification of Langmuir isotherm in solution systems—definition and utilization of concentration dependent factor. In: *Chemosphere* 58 (2005), Januar, Nr. 1, S. 115–123. – ISSN 0045–6535
- [64] GHOSAL, Partha S. ; GUPTA, Ashok K.: Determination of thermodynamic parameters from Langmuir isotherm constant-revisited. In: *Journal of Molecular Liquids* 225 (2017), Januar, S. 137–146. – ISSN 0167–7322
- [65] HILL, Terrell L.: *An Introduction to Statistical Thermodynamics*. Courier Corporation, 1986. – ISBN 978–0–486–65242–9
- [66] LANGMUIR, Irving: THE ADSORPTION OF GASES ON PLANE SURFACES OF GLASS, MICA AND PLATINUM. In: *Journal of the American Chemical Society* 40 (1918), September, Nr. 9, S. 1361–1403. – ISSN 0002–7863
- [67] LEVAN, M. D. ; VERMEULEN, Theodore: Binary Langmuir and Freundlich isotherms for ideal adsorbed solutions. In: *The Journal of Physical Chemistry* 85 (1981), Oktober, Nr. 22, S. 3247–3250. – ISSN 0022–3654, 1541–5740
- [68] JARONIEC, M.: Adsorption on heterogeneous surfaces: The exponential equation for the overall adsorption isotherm. In: *Surface Science* 50 (1975), Juni, Nr. 2, S. 553–564. – ISSN 0039–6028
- [69] SAWYER, Clair N. ; MCCARTY, Perry L. ; PARKIN, Gene F.: *Chemistry for Environmental Engineering and Science*. McGraw-Hill, 2003. – ISBN 978–0–07–119888–2
- [70] YANG, Ralph T.: *Gas Separation By Adsorption Processes*. World Scientific, 1997. – ISBN 978–1–911298–10–6
- [71] PRAUSNITZ, John M. ; LICHTENTHALER, Rudiger N. ; AZEVEDO, Edmundo Gomes d.: *Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria*. Pearson Education, 1998. – ISBN 978–0–13–244050–9
- [72] NESS, H. C. V.: *Classical Thermodynamics of Non-Electrolyte Solutions*. Elsevier, 2013. – ISBN 978–1–4832–2547–0

- [73] HOFF, Jacobus Henricus v. ; HOFF, Jacobus H.: *Études de dynamique chimique*. F. Muller & Company, 1884
- [74] TADASHI, Mizutani: *Thermodynamics*. BoD – Books on Demand, 2011. – ISBN 978-953-307-544-0
- [75] LIU, Bailing ; LI, Songjun ; HU, Jie: Technological Advances in High-Throughput Screening. In: *American Journal of Pharmacogenomics* 4 (2004), August, Nr. 4, S. 263–276. – ISSN 1175-2203
- [76] ZAKHAROV, Alexey V. ; PEACH, Megan L. ; SITZMANN, Markus ; NICKLAUS, Marc C.: QSAR Modeling of Imbalanced High-Throughput Screening Data in PubChem. In: *Journal of Chemical Information and Modeling* 54 (2014), März, Nr. 3, S. 705–712. – ISSN 1549-9596
- [77] MAYR, Lorenz M. ; BOJANIC, Dejan: Novel trends in high-throughput screening. In: *Current Opinion in Pharmacology* 9 (2009), Oktober, Nr. 5, S. 580–588. – ISSN 1471-4892
- [78] SILVA, Tiago C. ; EPPINK, Michel ; OTTENS, Marcel: Automation and miniaturization: enabling tools for fast, high-throughput process development in integrated continuous biomanufacturing. In: *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 97 (2022), Nr. 9, S. 2365–2375. – ISSN 1097-4660
- [79] CHHATRE, Sunil ; TITCHENER-HOOKER, Nigel J.: Review: Microscale methods for high-throughput chromatography development in the pharmaceutical industry. In: *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 84 (2009), Nr. 7, S. 927–940. – ISSN 1097-4660
- [80] BHAMBURE, Rahul ; KUMAR, Kaushal ; RATHORE, Anurag S.: High-throughput process development for biopharmaceutical drug substances. In: *Trends in Biotechnology* 29 (2011), März, Nr. 3, S. 127–135. – ISSN 0167-7799, 1879-3096
- [81] COFFMAN, Jonathan L. ; KRAMARCZYK, Jack F. ; KELLEY, Brian D.: High-throughput screening of chromatographic separations: I. Method development and column modeling. In: *Biotechnology and Bioengineering* 100 (2008), Nr. 4, S. 605–618. – ISSN 1097-0290
- [82] HERRMANN, Tim ; SCHRÖDER, Magnus ; HUBBUCH, Jürgen: Generation of Equally Sized Particle Plaques Using Solid-Liquid Suspensions. In: *Biotechnology Progress* 22 (2006), Nr. 3, S. 914–918. <http://dx.doi.org/10.1021/bp050296i>. – DOI 10.1021/bp050296i. – ISSN 1520-6033
- [83] GIDDINGS, J. C.: The role of lateral diffusion as a rate-controlling mechanism in chromatography. In: *Journal of Chromatography A* 5 (1961), Januar, S. 46–60. – ISSN 0021-9673
- [84] DEEMTER, J. J. ; ZUIDERWEG, F. J. ; KLINKENBERG, A.: Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. In: *Chemical Engineering Science* 5 (1956), September, Nr. 6, S. 271–289. – ISSN 0009-2509
- [85] GLUECKAUF, Eugen: Theory of chromatography. Part 10.—Formulæ for diffusion into spheres and their application to chromatography. In: *Transactions of the Faraday Society* 51 (1955), S. 1540–1551
- [86] SCHNEIDER, P. ; SMITH, J. M.: Adsorption rate constants from chromatography. In: *AIChE Journal* 14 (1968), Nr. 5, S. 762–771. – ISSN 1547-5905
- [87] HORVÁTH, Csaba ; LIN, Hung-Jye: Band spreading in liquid chromatography: General plate height equation and a method for the evaluation of the individual plate height contributions. In: *Journal of Chromatography A* 149 (1978), Februar, S. 43–70. – ISSN 0021-9673
- [88] BROOKS, Clayton A. ; CRAMER, Steven M.: Steric mass-action ion exchange: Displacement profiles and induced salt gradients. In: *AIChE Journal* 38 (1992), Nr. 12, S. 1969–1978. – ISSN 1547-5905
- [89] KARKOV, Hanne S. ; SEJERGAARD, Lars ; CRAMER, Steven M.: Methods development in multimodal chromatography with mobile phase modifiers using the steric mass action model. In: *Journal of Chromatography A* 1318 (2013), November, S. 149–155. – ISSN 0021-9673
- [90] HESS, Rudger ; YUN, Doil ; SALEH, David ; BRISKOT, Till ; GROSCH, Jan-Hendrik ; WANG, Gang ; SCHWAB, Thomas ; HUBBUCH, Jürgen: Standardized method for mechanistic modeling of multimodal anion exchange chromatography in flow through operation. In: *Journal of Chromatography A* 1690 (2023), Februar, S. 463789. – ISSN 0021-9673
- [91] STANTON, David T. ; JURIS, Peter C.: Development and use of charged partial surface area structural descriptors in computer-assisted quantitative structure-property relationship studies. In: *Analytical Chemistry* 62 (1990), November, Nr. 21, S. 2323–2329. – ISSN 0003-2700, 1520-6882

- [92] SAGANDYKOVA, Gulyaim ; BUSZEWSKI, Bogusław: Perspectives and recent advances in quantitative structure-retention relationships for high performance liquid chromatography. How far are we? In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 141 (2021), August, S. 116294. – ISSN 0165–9936
- [93] SINGH, Yash R. ; SHAH, Darshil B. ; MAHESHWARI, Dilip G. ; SHAH, Jignesh S. ; SHAH, Shreeraj: Advances in AI-Driven Retention Prediction for Different Chromatographic Techniques: Unraveling the Complexity. In: *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 0 (2023), Nr. 0, S. 1–11. – ISSN 1040–8347
- [94] HESS, Rudger ; FAESSLER, Jan ; YUN, Doil ; SALEH, David ; GROSCH, Jan-Hendrik ; SCHWAB, Thomas ; HUBBUCH, Jürgen: Antibody sequence-based prediction of pH gradient elution in multimodal chromatography. In: *Journal of Chromatography A* 1711 (2023), November, S. 464437. – ISSN 0021–9673
- [95] PARIMAL, Siddharth ; GARDE, Shekhar ; CRAMER, Steven M.: Interactions of Multimodal Ligands with Proteins: Insights into Selectivity Using Molecular Dynamics Simulations. In: *Langmuir* 31 (2015), Juli, Nr. 27, S. 7512–7523. – ISSN 0743–7463
- [96] BANERJEE, Suvrajit ; PARIMAL, Siddharth ; CRAMER, Steven M.: A molecular modeling based method to predict elution behavior and binding patches of proteins in multimodal chromatography. In: *Journal of Chromatography A* 1511 (2017), August, S. 45–58. – ISSN 0021–9673
- [97] ALLEN, Michael P. ; TILDESLEY, Dominic J.: Introduction. In: ALLEN, Michael P. (Hrsg.) ; TILDESLEY, Dominic J. (Hrsg.): *Computer Simulation of Liquids*. Oxford University Press, Juni 2017. – ISBN 978–0–19–880319–5, S. 0
- [98] FRENKEL, Daan ; SMIT, Berend: *Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications*. Elsevier, 2023. – ISBN 978–0–323–91318–8
- [99] METROPOLIS, Nicholas ; ROSENBLUTH, Arianna W. ; ROSENBLUTH, Marshall N. ; TELLER, Augusta H. ; TELLER, Edward: Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. In: *The Journal of Chemical Physics* 21 (1953), Juni, Nr. 6, S. 1087–1092. – ISSN 0021–9606
- [100] ALDER, B. J. ; WAINWRIGHT, T. E.: Studies in Molecular Dynamics. I. General Method. In: *The Journal of Chemical Physics* 31 (1959), August, Nr. 2, S. 459–466. <http://dx.doi.org/10.1063/1.1730376>. – DOI 10.1063/1.1730376
- [101] RAHMAN, A.: Correlations in the Motion of Atoms in Liquid Argon. In: *Physical Review* 136 (1964), Oktober, Nr. 2A, S. A405–A411. – ISSN 0031–899X
- [102] CORNELL, Wendy D. ; CIEPLAK, Piotr ; BAYLY, Christopher I. ; GOULD, Ian R. ; MERZ, Kenneth M. ; FERGUSON, David M. ; SPELLMEYER, David C. ; FOX, Thomas ; CALDWELL, James W. ; KOLLMAN, Peter A.: A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. In: *Journal of the American Chemical Society* 117 (1995), Mai, Nr. 19, S. 5179–5197. – ISSN 0002–7863, 1520–5126
- [103] JORGENSEN, William L. ; TIRADO-RIVES, Julian: The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. In: *Journal of the American Chemical Society* 110 (1988), März, Nr. 6, S. 1657–1666. – ISSN 0002–7863, 1520–5126
- [104] KARPLUS, Martin ; MCCAMMON, J. A.: Molecular dynamics simulations of biomolecules. In: *Nature Structural Biology* 9 (2002), September, Nr. 9, S. 646–652. – ISSN 1545–9985
- [105] LEACH, Andrew R.: *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Pearson Education, 2001. – ISBN 978–0–582–38210–7
- [106] BROOKS, Bernard R. ; BRUCCOLERI, Robert E. ; OLAFSON, Barry D. ; STATES, David J. ; SWAMINATHAN, S. ; KARPLUS, Martin: CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. In: *Journal of Computational Chemistry* 4 (1983), Nr. 2, S. 187–217. – ISSN 1096–987X
- [107] JONES, J. E. ; CHAPMAN, Sydney: On the determination of molecular fields.—I. From the variation of the viscosity of a gas with temperature. In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character* 106 (1997), Januar, Nr. 738, S. 441–462. – Publisher: Royal Society
- [108] COULOMB, C. A. (Charles A. ; FOSSIER, ill ; LE GOUAZ, Yves-Marie ; ADAM, engraver ; BURNDY LIBRARY, donor D. ; ACADEMIE ROYALE DES SCIENCES (FRANCE): *Mémoires sur l'électricité et la magnétisme*. Paris : Chez Bachelier, libraire ..., 1789
- [109] CASE, David A. ; AKTULGA, H. M. ; BELFON, Kellon ; BEN-SHALOM, Ido ; BROZELL, Scott R. ; CERUTTI, David S. ; III, Thomas E. C. ; CRUZEIRO, Vinicius Wilian D. ; DARDEN, Tom A. ; DUKE, Robert E. ; GIAMBASU,

- George ; GILSON, Michael K. ; GOHLKE, Holger ; GOETZ, Andreas W. ; HARRIS, Robert ; IZADI, Saeed ; IZMAILOV, Sergei A. ; JIN, Chi ; KASAVAJHALA, Koushik ; KAYMAK, Mehmet C. ; KING, Edward ; KOVALENKO, Andriy ; KURTZMAN, Tom ; LEE, Taisung ; LEGRAND, Scott ; LI, Pengfei ; LIN, Charles ; LIU, Jian ; LUCHKO, Tyler ; LUO, Ray ; MACHADO, Matias ; MAN, Viet ; MANATHUNGA, Madushanka ; MERZ, Kenneth M. ; MIAO, Yinglong ; MIKHAILOVSKII, Oleg ; MONARD, Gérald ; NGUYEN, Hai ; O'HEARN, Kurt A. ; ONUFRIEV, Alexey ; PAN, Feng ; PANTANO, Sergio ; QI, Ruxi ; RAHNAMEOUN, Ali ; ROE, Daniel R. ; ROITBERG, Adrian ; SAGUI, Celeste ; SCHOTT-VERDUGO, Stephan ; SHEN, Jana ; SIMMERLING, Carlos L. ; SKRYNNIKOV, Nikolai R. ; SMITH, Jamie ; SWAILS, Jason ; WALKER, Ross C. ; WANG, Junmei ; WEI, Haixin ; WOLF, Romain M. ; WU, Xiongwu ; XUE, Yi ; YORK, Darrin M. ; ZHAO, Shiji ; KOLLMAN, Peter A.: *Amber 2021*. University of California, San Francisco, 2021
- [110] RAPAPORT, D. C.: *The Art of Molecular Dynamics Simulation*. Cambridge University Press, 2004. – ISBN 978-0-521-82568-9
- [111] NEWTON, Isaac: *The Mathematical Principles of Natural Philosophy*. Sherwood, Neely, and Jones, 1803
- [112] VERLET, Loup: Computer "Experiments" on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. In: *Physical Review* 159 (1967), Juli, Nr. 1, S. 98–103
- [113] ALLEN, Michael P. ; TILDESLEY, Dominic J.: *Computer Simulation of Liquids*. Oxford University Press, 2017. – ISBN 978-0-19-252470-6. – Google-Books-ID: WFExDwAAQBAJ
- [114] BERENDSEN, H. J. C. ; POSTMA, J. P. M. ; GUNSTEREN, W. F. ; DI NOLA, A. ; HAAK, J. R.: Molecular dynamics with coupling to an external bath. In: *The Journal of Chemical Physics* 81 (1984), Oktober, Nr. 8, S. 3684–3690. – ISSN 0021-9606
- [115] NOSÉ, Shuichi: A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. In: *The Journal of chemical physics* 81 (1984), Nr. 1, S. 511–519
- [116] HOOVER, William G.: Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. In: *Physical Review A* 31 (1985), März, Nr. 3, S. 1695–1697. <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevA.31.1695>. – DOI 10.1103/PhysRevA.31.1695
- [117] NOID, W. G.: Perspective: Coarse-grained models for biomolecular systems. In: *The Journal of Chemical Physics* 139 (2013), September, Nr. 9, S. 090901. – ISSN 1089-7690
- [118] VOTH, Gregory A. (Hrsg.): *Coarse-Graining of Condensed Phase and Biomolecular Systems*. Boca Raton : CRC Press, 2008. – ISBN 978-0-429-13729-7
- [119] KREMER, Kurt ; GREST, Gary S.: Dynamics of entangled linear polymer melts: A molecular-dynamics simulation. In: *The Journal of Chemical Physics* 92 (1990), April, Nr. 8, S. 5057–5086. – ISSN 0021-9606
- [120] MORTHOUS, Julien ; FUSCO, Claudio ; ZHAI, Zengqiang ; LAME, Olivier ; PEREZ, Michel: Crystallization of finite-extensible nonlinear elastic Lennard-Jones coarse-grained polymers. In: *Physical Review E* 96 (2017), November, Nr. 5, S. 052502
- [121] SEDGHAMIZ, Elaheh ; LIU, Modan ; WENZEL, Wolfgang: Challenges and limits of mechanical stability in 3D direct laser writing. In: *Nature Communications* 13 (2022), April, Nr. 1, S. 2115. – ISSN 2041-1723
- [122] HEISENBERG, W.: Über den anschaulichen Inhalt der quantentheoretischen Kinematik und Mechanik. In: *Zeitschrift für Physik* 43 (1927), März, Nr. 3, S. 172–198. – ISSN 0044-3328
- [123] SCHRÖDINGER, E.: Quantisierung als Eigenwertproblem. In: *Annalen der Physik* 384 (1926), Nr. 4, S. 361–376. – ISSN 1521-3889
- [124] DIRAC, Paul Adrien M.: *The Principles of Quantum Mechanics*. Clarendon Press, 1981. – ISBN 978-0-19-852011-5
- [125] LEVINE, Ira N.: *Quantum Chemistry*. Pearson, 2014. – ISBN 978-0-321-89060-3
- [126] SZABO, Attila ; OSTLUND, Neil S.: *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*. Courier Corporation, 2012. – ISBN 978-0-486-13459-8
- [127] HARTREE, D. R.: The Wave Mechanics of an Atom with a Non-Coulomb Central Field. Part I. Theory and Methods. In: *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* 24 (1928), Januar, Nr. 1, S. 89–110. – ISSN 1469-8064, 0305-0041
- [128] FOCK, V.: Näherungsmethode zur Lösung des quantenmechanischen Mehrkörperproblems. In: *Zeitschrift für Physik* 61 (1930), Januar, Nr. 1, S. 126–148. – ISSN 0044-3328

- [129] POPLE, John A.: Nobel Lecture: Quantum chemical models. In: *Reviews of Modern Physics* 71 (1999), Oktober, Nr. 5, S. 1267–1274. – ISSN 0034–6861, 1539–0756
- [130] BANNWARTH, Christoph ; EHLERT, Sebastian ; GRIMME, Stefan: GFN2-xTB—An Accurate and Broadly Parametrized Self-Consistent Tight-Binding Quantum Chemical Method with Multipole Electrostatics and Density-Dependent Dispersion Contributions. In: *Journal of Chemical Theory and Computation* 15 (2019), März, Nr. 3, S. 1652–1671. – ISSN 1549–9618
- [131] GIBBS, J. W.: *A Method of Geometrical Representation of the Thermodynamic Properties of Substances by Means of Surfaces*. 1873
- [132] CHANDLER, David ; PERCUS, Jerome K.: *Introduction to Modern Statistical Mechanics*. In: *Physics Today* 41 (1988), Dezember, Nr. 12, S. 114–118. – ISSN 0031–9228, 1945–0699
- [133] KARPLUS, Martin ; KUSHICK, Joseph N.: Method for estimating the configurational entropy of macromolecules. In: *Macromolecules* 14 (1981), März, Nr. 2, S. 325–332. – ISSN 0024–9297, 1520–5835
- [134] TORRIE, G. M. ; VALLEAU, J. P.: Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. In: *Journal of Computational Physics* 23 (1977), Februar, Nr. 2, S. 187–199. – ISSN 0021–9991
- [135] KIRKWOOD, John G.: Statistical Mechanics of Fluid Mixtures. In: *The Journal of Chemical Physics* 3 (1935), Mai, Nr. 5, S. 300–313. – ISSN 0021–9606
- [136] KOLLMAN, Peter.: Free energy calculations: Applications to chemical and biochemical phenomena. In: *Chemical Reviews* 93 (1993), November, Nr. 7, S. 2395–2417. – ISSN 0009–2665
- [137] GILSON, Michael K. ; ZHOU, Huan-Xiang: Calculation of Protein-Ligand Binding Affinities. In: *Annual Review of Biophysics* 36 (2007), Juni, Nr. Volume 36, 2007, S. 21–42. – ISSN 1936–122X, 1936–1238
- [138] CHEN, Yuan-qiang ; SHENG, Yan-jing ; MA, Yu-qiang ; DING, Hong-ming: Efficient calculation of protein–ligand binding free energy using GFN methods: the power of the cluster model. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 24 (2022), Juni, Nr. 23, S. 14339–14347. – ISSN 1463–9084
- [139] UL-HAQ, Zaheer ; MADURA, Jeffry D.: *Frontiers in Computational Chemistry: Volume 1: Computer Applications for Drug Design and Biomolecular Systems*. Elsevier, 2015. – ISBN 978–1–60805–864–8
- [140] BASHFORD, Donald ; CASE, David A.: Generalized Born Models of Macromolecular Solvation Effects. In: *Annual Review of Physical Chemistry* 51 (2000), Oktober, Nr. Volume 51, 2000, S. 129–152. – ISSN 0066–426X, 1545–1593
- [141] DU, Juan ; SUN, Huijun ; XI, Lili ; LI, Jiazhong ; YANG, Ying ; LIU, Huanxiang ; YAO, Xiaojun: Molecular modeling study of checkpoint kinase 1 inhibitors by multiple docking strategies and prime/MM–GBSA calculation. In: *Journal of Computational Chemistry* 32 (2011), Nr. 13, S. 2800–2809. – ISSN 1096–987X
- [142] FRIESNER, Richard A. ; BANKS, Jay L. ; MURPHY, Robert B. ; HALGREN, Thomas A. ; KLICIC, Jasna J. ; MAINZ, Daniel T. ; REPASKY, Matthew P. ; KNOLL, Eric H. ; SHELLEY, Mee ; PERRY, Jason K. ; SHAW, David E. ; FRANCIS, Perry ; SHENKIN, Peter S.: Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. In: *Journal of Medicinal Chemistry* 47 (2004), März, Nr. 7, S. 1739–1749. – ISSN 0022–2623
- [143] FRIESNER, Richard A. ; MURPHY, Robert B. ; REPASKY, Matthew P. ; FRYE, Leah L. ; GREENWOOD, Jeremy R. ; HALGREN, Thomas A. ; SANSCHAGRIN, Paul C. ; MAINZ, Daniel T.: Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. In: *Journal of Medicinal Chemistry* 49 (2006), Oktober, Nr. 21, S. 6177–6196. – ISSN 0022–2623
- [144] REPASKY, Matthew P. ; SHELLEY, Mee ; FRIESNER, Richard A.: Flexible Ligand Docking with Glide. In: *Current Protocols in Bioinformatics* 18 (2007), Nr. 1, S. 8.12.1–8.12.36. – ISSN 1934–340X
- [145] TUBERT-BROHMAN, Ivan ; SHERMAN, Woody ; REPASKY, Matt ; BEUMING, Thijs: Improved Docking of Polypeptides with Glide. In: *Journal of Chemical Information and Modeling* 53 (2013), Juli, Nr. 7, S. 1689–1699. – ISSN 1549–9596
- [146] BAUER, Matthias R. ; IBRAHIM, Tamer M. ; VOGEL, Simon M. ; BOECKLER, Frank M.: Evaluation and Optimization of Virtual Screening Workflows with DEKOIS 2.0 – A Public Library of Challenging Docking Benchmark Sets. In: *Journal of Chemical Information and Modeling* 53 (2013), Juni, Nr. 6, S. 1447–1462. – ISSN 1549–9596
- [147] FAN, Jiyu ; FU, Ailing ; ZHANG, Le: Progress in molecular docking. In: *Quantitative Biology* 7 (2019), Juni, Nr. 2, S. 83–89. – ISSN 2095–4697



- [148] DEELMAN, Ewa ; GANNON, Dennis ; SHIELDS, Matthew ; TAYLOR, Ian: Workflows and e-Science: An overview of workflow system features and capabilities. In: *Future Generation Computer Systems* 25 (2009), Mai, Nr. 5, S. 528–540. – ISSN 0167–739X
- [149] LUDÄSCHER, Bertram ; ALTINTAS, Ilkay ; BERKLEY, Chad ; HIGGINS, Dan ; JAEGER, Efrat ; JONES, Matthew ; LEE, Edward A. ; TAO, Jing ; ZHAO, Yang: Scientific workflow management and the Kepler system. In: *Concurrency and Computation: Practice and Experience* 18 (2006), Nr. 10, S. 1039–1065. – ISSN 1532–0634
- [150] BERTHOLD, Michael R. ; CEBRON, Nicolas ; DILL, Fabian ; GABRIEL, Thomas R. ; KÖTTER, Tobias ; MEINL, Thorsten ; OHL, Peter ; THIEL, Kilian ; WISWEDEL, Bernd: KNIME - the Konstanz information miner: version 2.0 and beyond. In: *SIGKDD Explor. Newsl.* 11 (2009), November, Nr. 1, S. 26–31. – ISSN 1931–0145
- [151] TAYLOR, Ian J. (Hrsg.) ; DEELMAN, Ewa (Hrsg.) ; GANNON, Dennis B. (Hrsg.) ; SHIELDS, Matthew (Hrsg.): *Workflows for e-Science*. London : Springer, 2007. – ISBN 978–1–84628–519–6 978–1–84628–757–2
- [152] GIL, Yolanda ; DEELMAN, Ewa ; ELLISMAN, Mark ; FAHRINGER, Thomas ; FOX, Geoffrey ; GANNON, Dennis ; GOBLE, Carole ; LIVNY, Miron ; MOREAU, Luc ; MYERS, Jim: Examining the Challenges of Scientific Workflows. In: *Computer* 40 (2007), Dezember, Nr. 12, S. 24–32. – ISSN 1558–0814
- [153] RÊGO, Celso R. C. ; SCHAARSCHMIDT, Jörg ; SCHLÖDER, Tobias ; PENALOZA-AMION, Montserrat ; BAG, Saientan ; NEUMANN, Tobias ; STRUNK, Timo ; WENZEL, Wolfgang: SimStack: An Intuitive Workflow Framework. In: *Frontiers in Materials* 9 (2022), Mai. – ISSN 2296–8016. – Publisher: Frontiers
- [154] WEINSTEIN, S. ; LEISEROWITZ, L. ; GIL-AV, E.: Chiral secondary amides. 2. Molecular packing and chiral recognition. In: *Journal of the American Chemical Society* 102 (1980), April, Nr. 8, S. 2768–2772. – ISSN 0002–7863
- [155] SCHEFZICK, Sabine ; LINDNER, Wolfgang ; LIPKOWITZ, Kenny B. ; JALAIE, Mehran: Enantiodiscrimination by a quinine-based chiral stationary phase: A computational study. In: *Chirality* 12 (2000), Nr. 1, S. 7–15. – ISSN 1520–636X
- [156] MAIER, Norbert M. ; SCHEFZICK, Sabine ; LOMBARDO, G. M. ; FELIZ, Miguel ; RISSANEN, Kari ; LINDNER, Wolfgang ; LIPKOWITZ, Kenny B.: Elucidation of the Chiral Recognition Mechanism of Cinchona Alkaloid Carbamate-type Receptors for 3,5-Dinitrobenzoyl Amino Acids. In: *Journal of the American Chemical Society* 124 (2002), Juli, Nr. 29, S. 8611–8629. – ISSN 0002–7863
- [157] CZERWENKA, Christoph ; ZHANG, Mei M. ; KÄHLIG, Hanspeter ; MAIER, Norbert M. ; LIPKOWITZ, Kenny B. ; LINDNER, Wolfgang: Chiral Recognition of Peptide Enantiomers by Cinchona Alkaloid Derived Chiral Selectors: Mechanistic Investigations by Liquid Chromatography, NMR Spectroscopy, and Molecular Modeling. In: *The Journal of Organic Chemistry* 68 (2003), Oktober, Nr. 22, S. 8315–8327. – ISSN 0022–3263
- [158] ORTUSO, Francesco ; ALCARO, Stefano ; MENTA, Sergio ; FIORAVANTI, Rossella ; CIRILLI, Roberto: A chromatographic and computational study on the driving force operating in the exceptionally large enantioseparation of N-thiocarbamoyl-3-(4'-biphenyl)-5-phenyl-4,5-dihydro-(1H) pyrazole on a 4-methylbenzoate cellulose-based chiral stationary phase. In: *Journal of Chromatography A* 1324 (2014), Januar, S. 71–77. – ISSN 0021–9673
- [159] ZHAO, Yu ; LI, Shuang ; WANG, Xia ; YU, Jia ; SONG, Yongbo ; GUO, Xingjie: Enantioseparation and molecular modeling study of five adrenergic blockers on Chiralpak IC column. In: *Chirality* 31 (2019), Nr. 7, S. 502–512. – ISSN 1520–636X
- [160] BALLWEG, Tim ; LIU, Modan ; GRIMM, Julian ; SEDGHAMIZ, Elaheh ; WENZEL, Wolfgang ; FRANZREB, Matthias: All-atom modeling of methacrylate-based multi-modal chromatography resins for Langmuir constant prediction of peptides. In: *Journal of Chromatography A* 1730 (2024), August, S. 465089. – ISSN 0021–9673
- [161] ARAKAWA, Tsutomu: Isoform Separation by a Mixed-mode Resin, TOYOPEARL MX-Trp-650M. In: *Current Protein and Peptide Science* 20 (2019), Januar, Nr. 1, S. 61–64
- [162] DODDA, Leela S. ; CABEZA DE VACA, Israel ; TIRADO-RIVES, Julian ; JORGENSEN, William L.: LigParGen web server: an automatic OPLS-AA parameter generator for organic ligands. In: *Nucleic Acids Research* 45 (2017), Juli, Nr. W1, S. W331–W336. – ISSN 0305–1048
- [163] JORGENSEN, William L. ; MAXWELL, David S. ; TIRADO-RIVES, Julian: Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. In: *Journal of the American Chemical Society* 118 (1996), November, Nr. 45, S. 11225–11236. – ISSN 0002–7863

- [164] THOMPSON, Aidan P. ; AKTULGA, H. M. ; BERGER, Richard ; BOLINTINEANU, Dan S. ; BROWN, W. M. ; CROZIER, Paul S. ; VELD, Pieter J. ' ; KOHLMAYER, Axel ; MOORE, Stan G. ; NGUYEN, Trung D. ; SHAN, Ray ; STEVENS, Mark J. ; TRANCHIDA, Julien ; TROTT, Christian ; PLIMPTON, Steven J.: LAMMPS - a flexible simulation tool for particle-based materials modeling at the atomic, meso, and continuum scales. In: *Computer Physics Communications* 271 (2022), Februar, S. 108171. – ISSN 0010–4655
- [165] LU, Chao ; WU, Chuanjie ; GHOREISHI, Delaram ; CHEN, Wei ; WANG, Lingle ; DAMM, Wolfgang ; ROSS, Gregory A. ; DAHLGREN, Markus K. ; RUSSELL, Ellery ; VON BARGEN, Christopher D. ; ABEL, Robert ; FRIESNER, Richard A. ; HARDER, Edward D.: OPLS4: Improving Force Field Accuracy on Challenging Regimes of Chemical Space. In: *Journal of Chemical Theory and Computation* 17 (2021), Juli, Nr. 7, S. 4291–4300. – ISSN 1549–9618
- [166] KHANJIWALA, Zahara ; KHALE, Anubha ; PRABHU, Arati: Docking structurally similar analogues: Dealing with the false-positive. In: *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 93 (2019), Dezember, S. 107451. – ISSN 1093–3263
- [167] GORGES, Johannes ; BÄDORF, Benedikt ; GRIMME, Stefan ; HANSEN, Andreas: Efficient Computation of the Interaction Energies of Very Large Non-covalently Bound Complexes. In: *Synlett* 34 (2023), Juni, Nr. 10, S. 1135–1146. – ISSN 0936–5214, 1437–2096
- [168] LANG, Katharina M. H. ; KITTELMANN, Jörg ; DÜRR, Cathrin ; OSBERGHAUS, Anna ; HUBBUCH, Jürgen: A comprehensive molecular dynamics approach to protein retention modeling in ion exchange chromatography. In: *Journal of Chromatography A* 1381 (2015), Februar, S. 184–193. – ISSN 0021–9673
- [169] LANG, Katharina M. H. ; KITTELMANN, Jörg ; PILGRAM, Florian ; OSBERGHAUS, Anna ; HUBBUCH, Jürgen: Custom-tailored adsorbers: A molecular dynamics study on optimal design of ion exchange chromatography material. In: *Journal of Chromatography A* 1413 (2015), September, S. 60–67. – ISSN 0021–9673
- [170] ZHOU, Jian ; TSAO, Heng-Kwong ; SHENG, Yu-Jane ; JIANG, Shaoyi: Monte Carlo simulations of antibody adsorption and orientation on charged surfaces. In: *The Journal of Chemical Physics* 121 (2004), Juli, Nr. 2, S. 1050–1057. – ISSN 0021–9606
- [171] LIANG, Juan ; FIEG, Georg ; KEIL, Frerich J. ; JAKOBTORWEIHEN, Sven: Adsorption of Proteins onto Ion-Exchange Chromatographic Media: A Molecular Dynamics Study. In: *Industrial & Engineering Chemistry Research* 51 (2012), Dezember, Nr. 49, S. 16049–16058. – ISSN 0888–5885. – Publisher: American Chemical Society
- [172] ZHANG, Lin ; ZHAO, Guofeng ; SUN, Yan: Molecular Insight into Protein Conformational Transition in Hydrophobic Charge Induction Chromatography: A Molecular Dynamics Simulation. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 113 (2009), Mai, Nr. 19, S. 6873–6880. – ISSN 1520–6106
- [173] ZHANG, Lin ; ZHAO, Guofeng ; SUN, Yan: Effects of Ligand Density on Hydrophobic Charge Induction Chromatography: Molecular Dynamics Simulation. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 114 (2010), Februar, Nr. 6, S. 2203–2211. – ISSN 1520–6106
- [174] Flüssigchromatographie, HPLC. In: APRENTAS (Hrsg.): *Laborpraxis Band 3: Trennungsmethoden*. Cham : Springer International Publishing, 2017. – ISBN 978–3–0348–0970–2, S. 259–291
- [175] MARTIN, A. J. P. ; SYNGE, R. L. M.: A new form of chromatogram employing two liquid phases. In: *Biochemical Journal* 35 (1941), Dezember, Nr. 12, S. 1358–1368. – ISSN 0264–6021
- [176] LEVISON, Peter R.: Large-scale ion-exchange column chromatography of proteins: Comparison of different formats. In: *Journal of Chromatography B* 790 (2003), Juni, Nr. 1, S. 17–33. – ISSN 1570–0232
- [177] CHINN, Michael ; DONINGER, Katharina ; AL-KHALEDY, Ranya ; ZHANG, Emily ; KIM, Hakyoun ; WERZ, Silke ; SCHELTER, Florian: A comprehensive assessment of the applicability of RoboColumn as a chromatography scale-down model for use in biopharmaceutical process validation. In: *Journal of Chromatography A* 1710 (2023), November, S. 464391. – ISSN 0021–9673
- [178] ALLINGER, Norman L.: Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. In: *Journal of the American Chemical Society* 99 (1977), Dezember, Nr. 25, S. 8127–8134. – ISSN 0002–7863, 1520–5126
- [179] RAHMAN, A.: Correlations in the Motion of Atoms in Liquid Argon. In: *Physical Review* 136 (1964), Oktober, Nr. 2A, S. A405–A411. <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRev.136.A405>. – DOI 10.1103/PhysRev.136.A405
- [180] PARR, Robert G. ; WEITAO, Yang: *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*. Oxford University Press, 1994. – ISBN 978–0–19–535773–8

- 
- [181] HOHENBERG, P. ; KOHN, W.: Inhomogeneous Electron Gas. In: *Physical Review* 136 (1964), November, Nr. 3B, S. B864–B871
- [182] KOHN, W. ; SHAM, L. J.: Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. In: *Physical Review* 140 (1965), November, Nr. 4A, S. A1133–A1138
- [183] BECKE, Axel D.: Density-functional thermochemistry. I. The effect of the exchange-only gradient correction. In: *The Journal of Chemical Physics* 96 (1992), Februar, Nr. 3, S. 2155–2160. – ISSN 0021–9606
- [184] CABALEIRO-LAGO, Enrique M. ; FERNÁNDEZ, Berta ; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, Roberto ; RODRÍGUEZ-OTERO, Jesús ; VÁZQUEZ, Saulo A.: Functional group corrections to the GFN2-xTB and PM6 semiempirical methods for noncovalent interactions in alkanes and alkenes. In: *The Journal of Chemical Physics* 158 (2023), März, Nr. 12, S. 124105. – ISSN 0021–9606
- [185] ONUFRIEV, Alexey ; BASHFORD, Donald ; CASE, David A.: Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized born model. In: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 55 (2004), Nr. 2, S. 383–394. – ISSN 1097–0134
- [186] TROTT, Oleg ; OLSON, Arthur J.: AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. In: *Journal of Computational Chemistry* 31 (2010), Nr. 2, S. 455–461. – ISSN 1096–987X



# Anhang

## A. Chemikalien, Software, Geräte und Messinstrumente

In diesem Kapitel werden die für die Generierung der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse benötigten Chemikalien, Software, Geräte und Messinstrumente gelistet.

### A.1. Chemikalien

**Tabelle A.1.:** Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien mit Hersteller

Chemikalie	Hersteller
Acetyl-Pentapeptid-1	Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland)
Acetyl-Tetrapeptid-3	Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland)
Acetyl-Tetrapeptid-9	Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland)
Essigsäureanhydrid	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Hexapeptid-9	Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland)
L-Glutathion, reduziert	Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland)
N-acetyl-L-Carnosin	Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland)
Natriumacetat-Trihydrat	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Oktapeptid-2	Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland)
Papain Inhibitor	Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland)
Pentapeptid-3	Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland)
Toyopearl MX-Trp-650 M	Tosoh Bioscience (Tokyo, Japan)
Z-Lys-OMe	Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland)

### A.2. Software

**Tabelle A.2.:** Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien mit Hersteller

Chemikalie	Hersteller
Anaconda	Anaconda Inc. (Austin, USA)
KNIME 6.2	Knime AG (Zürich, Schweiz)
LAMMPS	Sandia National Laboratories (Albuquerque, USA)
Maestro 13.6	Schrödinger Inc. (New York, USA)
MATLAB R2023a	MathWorks (Natick, USA)
Origin 2023	OriginLab Corporation (Northampton, USA)
SimStack	Nanomatch GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Visual Studio Code	Microsoft Corporation (Redmond, USA)

### A.3. Geräte und Messinstrumente

**Tabelle A.3.:** Auflistung verwendeten Messinstrumente und Geräte mit Herstellern.

Gerät	Modell	Hersteller
Analysewaage	Analytic AC 210 S	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Feinwaage	EW-3000-2M	KERN & SOHN GmbH (Balingen, Deutschland)
Magnetrührer	RH basic 2	IKA GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland)
pH-Meter	765 Calimatic	Knick GmbH & Co KG (Berlin, Deutschland)
Pipettierroboter	OT-2	Opentrons Labworks Inc. (Brooklyn, USA)
Plate Reader	Spark	Tecan (Männedorf, Schweiz)
ResiQuot	MediaScout ResiQuot	Atoll GmbH (Weingarten, Deutschland)
Roboterarm	UR5e	Teradyne Robotics (München, Germany)
Vakuumpumpe	MD 4C VARIO select	Vacuubrand GmbH & Co KG (Wertheim, Deutschland)
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q Gradient A10	Millipore (Burlington, USA)

## B. Eingabeparameter und Flussdiagramm des KNIME-Workflows

Tabelle B.4 und Tabelle B.5 listen alle relevanten Eingabeparameter für den KNIME-Workflow zur Generierung von Bindeposen und -energien zwischen molekularen Modellen von Adsorbensoberflächen und linearen Peptiden. Abbildung B.1 zeigt ein detailliertes Flussdiagramm dieses Workflows zur Veranschaulichung aller relevanten Simulationsschritte, Schleifenmechanismen und Eingabe- sowie Ausgabeinformationen.

### B.1. Eingabeparameter des KNIME-Workflows

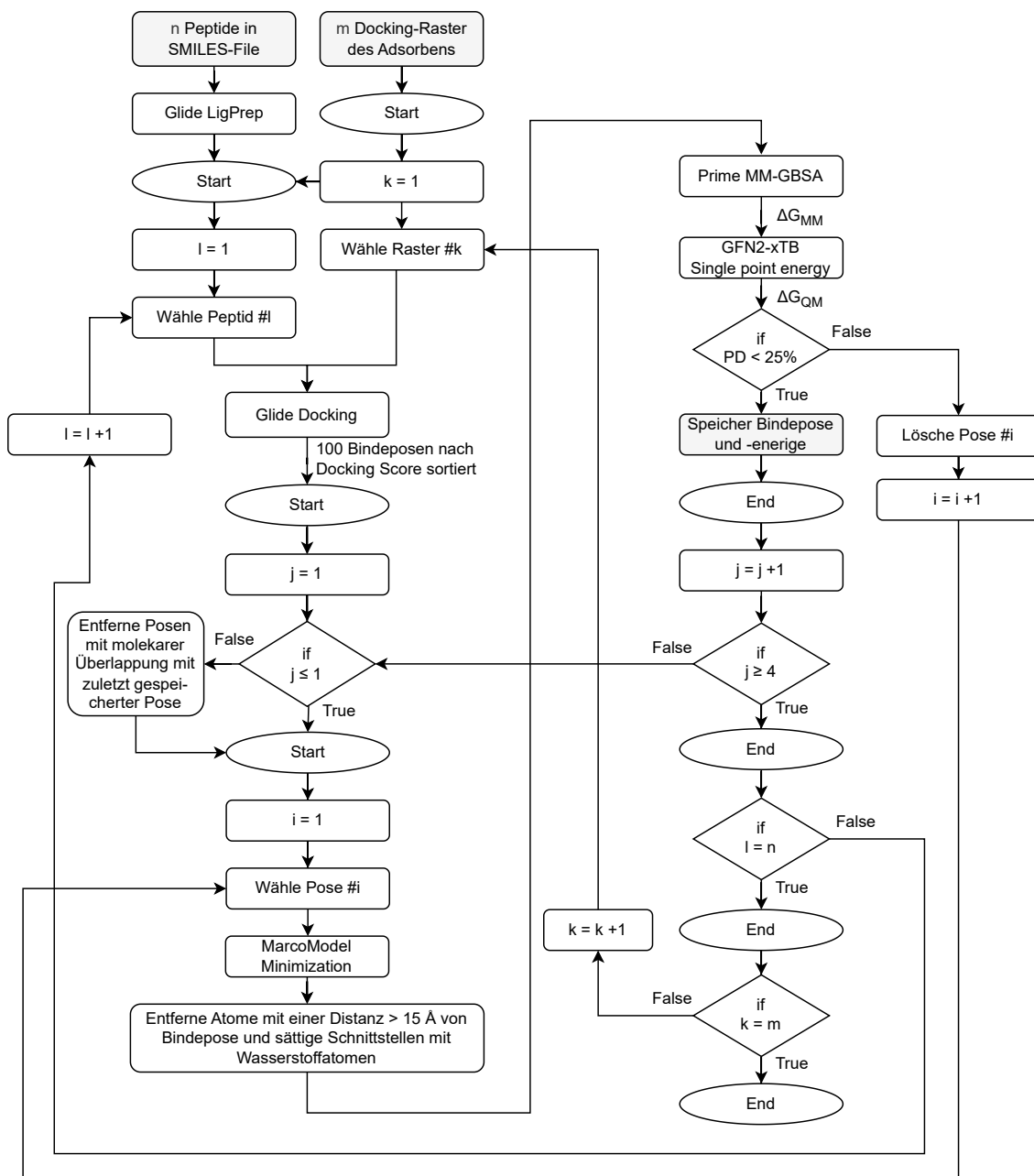
**Tabelle B.4.:** Liste der Eingabeparameter des „LigPrep“-Knotens in KNIME

Bezeichnung in KNIME	Wert
LigPrep-ph	4.00
LigPrep-pht	0.00
LigPrep-epik	_on_
LigPrep-emb	_off_
LigPrep-s	1
LigPrep-ac	_off_

**Tabelle B.5.:** Auflistung der Eingabeparameter des „Glide Docking“-Knotens in KNIME

Bezeichnung in KNIME	Wert
GlideDockingInput-LIG_VSCALE	0.8
GlideDockingInput-LIG_CCUT	0.15
GlideDockingInput-PRECISION	SP-Peptide
GlideDockingInput-REWARD_INTRA_HBONDS	FALSE
GlideDockingInput-MAXKEEP	5000
GlideDockingInput-SCORING_CUTOFF	100
GlideDockingInput-MAXREF	400
GlideDockingInput-EXPANDED_SAMPLING	TRUE
GlideDockingInput-GLIDE_DIELCO	2.00
GlideDockingInput-HBOND_DONOR_AROMH	FALSE
GlideDockingInput-BOND_DONOR_AROMH_CHARGE	0.50
GlideDockingInput-POSES_PER_LIG	100
GlideDockingInput-POSTDOCK_NPOSE	200
GlideDockingInput-POSTDOCKSTRAIN	FALSE
GlideDockingInput-CV_CUTOFF	0.00
GlideDockingInput-POSE_RMSD	0.5
GlideDockingInput-POSE_DISPLACEMENT	2.0

## B.2. Flussdiagramm des KNIME-Workflows



**Abbildung B.1.:** Erweiterte Übersicht des KNIME-Workflows - Das Flowchart zeigt alle relevanten Simulationsschritte und Schleifen innerhalb des mit KNIME automatisierten Workflows zu Berechnung von Bindeenergien zwischen Adsorbensoberflächen und Peptiden.



## C. Python Skript zur Steuerung des Robotiklabors

Abbildung C.2 zeigt das entwickelte Vorlage-Programm für eine benutzerfreundliche Steuerung des Robotiklabors.

```
3  """
4  Name:      Main_Templaten.py
5  Description:  Template for Using the IFG Robotics Laboratory
6              with Examples for Usage of the Devices
7  Date:      19.08.2023
8  Version:   1.1
9  Author:    Jonathan Doettling
10 """
11
12 from Devices.Opentrons import Opentrons
13 from Devices.UniversalRobot import UniversalRobot
14 from Devices.VacuuSelect import VacuuSelect
15 from Devices.URMovement import *
16 import Devices.URPosition
17 import time
18
19 #initialize devices
20 ot2 = Opentrons("141.52.21.238")
21 ur5e = UniversalRobot("141.52.21.235")
22 pump = VacuuSelect("141.52.21.198")
23
24 #process goes here
25 #####
26 print("Starting Process")
27
28 # example 1: direct UR control:
29 ur5e.MoveJ(URPosition.vm_home_up)
30 ur5e.MoveL(URPosition.vm_home_down)
31 ur5e.Open_Gripper()
32
33 # example2: indirect UR Control
34 Grab_from_pump_pos1(robot=ur5e)
35 Place_at_storage1(robot=ur5e)
36 Place_Vacuum_Manifold(robot=ur5e)
37
38 # example 3: get UR data
39 s = ur5e.Get_Rounded_Joint_Position()
40 print(str(s))
41
42 # example 4: run a protocol on OT-2
43 path = "C:/Users/messung/Documents/OT2Test.py"
44 prot_id = ot2.Upload_Protocol(path, info_server=False)
45 run_id = ot2.Run_Protocol(prot_id, info_server=False)
46
47 # example 5: running pump
48 pump_speed = 10
49 pump_duration = 15
50 pump.Run_Pump_Speed(pump_speed, pump_duration)
51
52 print("Process completed")
53 ur5e.MoveJ(URPosition.home)
54
55 #####
56 #process end
57
58 #close device connections (not needed for Opentrons)
59 ur5e.Disconnect_Robot()
60 pump.Disconnect_Pump()
```

**Abbildung C.2.:** Schematische Darstellung des Vorlage-Programms zur Steuerung des Robotiklabors - Methodenaufrufe ermöglichen die Bewegung des UR5e-Roboterarms, das Starten von Protokollen auf dem OT-2 und die Durchführung von Pumpvorgängen. Abschließend wird der UR5e in seine Ruheposition zurückbewegt und die Verbindungen zu den Geräten werden geschlossen. Das Ansteuerungskonzept wurde von Jonathan Döttling im Zuge seiner Bachelorarbeit entwickelt.



## Publikationen

### Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Putz, S., Döttling, J., Ballweg, T., Tschöpe, A., Biniyaminov, V. and Franzreb, M. (2025), Self-Driving Lab for Solid-Phase Extraction Process Optimization and Application to Nucleic Acid Purification. *Adv. Intell. Syst.*, 7: 2400564.

Greifenstein, R., Röhrs, D., Ballweg, T., Pfeifer, J., Gottwald, E., Takamiya, M., ... & Wöll, C. Integrating Biocatalysts into Metal-Organic Frameworks: Disentangling the Roles of Affinity, Molecular Weight, and Size. *ChemBioChem*, e202400625.

Ballweg, T., Liu, M., Grimm, J., Sedghamiz, E., Wenzel, W., & Franzreb, M. (2024). All-Atom Modeling of Methacrylate-Based Multi-Modal Chromatography Resins for Langmuir Constant Prediction of Peptides. *Journal of Chromatography A*, 1730, 465089.

Diehm, J., Ballweg, T., & Franzreb, M. (2023). Development of a 3D printed micro simulated moving bed chromatography system. *Journal of Chromatography A*, 1695, 463928.

Greifenstein, R., Ballweg, T., Hashem, T., Gottwald, E., Achauer, D., Kirschhöfer, F., ... & Wöll, C. (2022). MOF-Hosted Enzymes for Continuous Flow Catalysis in Aqueous and Organic Solvents. *Angewandte Chemie International Edition*, 61(18), e202117144.

### Vorträge

Ballweg, T., Liu, M., Hiller, E., Wenzel, W., & Franzreb, M.: All-Atom Modelling of Methacrylate-Based Multi-Modal Chromatography Resins for Isotherm Parameter Prediction. *36th International Symposium on Preparative and Process Chromatography*, 2024, Philadelphia

Ballweg, T., Liu, M., Grimm, J., Wenzel, W., & Franzreb, M.: All-Atom Modelling of Methacrylate-Based Multi-Modal Chromatography Resins for Isotherm Parameter Prediction of Peptides. *19th International PhD Seminar on Chromatographic Separation Science*, 2024, Lund

Ballweg, T., Liu, M., Hiller, E., Wenzel, W., & Franzreb, M.: Development of a Digital Twin for a Methacrylate-Based Multimodal Chromatography Resin. *18th International PhD Seminar on Chromatographic Separation Science*, 2023, Jülich

Ballweg, T., Liu, M., Hiller, E., & Franzreb, M.: Development of a Digital Twin for a Methacrylate-Based Multimodal Chromatography Resin. *15th Mediterranean Congress of Chemical Engineering*, 2023, Barcelona

Ballweg, T., Hiller, E., Liu, M., & Franzreb, M.: Towards the Development of a Digital Twin for a Multimodal Chromatography Resin. *17th International PhD Seminar on Chromatographic Separation Science*, 2022, Karlsruhe

### Poster

Ballweg, T., Liu, M., Grimm, J., Wenzel, W., & Franzreb, M.: Virtual Design of Methacrylate-Based Multi-Modal Chromatography Resins for Langmuir Constant Prediction of Peptides. *Recovery of Biological Products XX*, 2024, Sunriver

Ballweg, T., Liu, M., & Franzreb, M.: Development of a Digital Twin for a Multimodal Chromatography Resin. *CECAM Workshop on Virtual Materials Design*, 2022, Karlsruhe

Ballweg, T., Hiller, E., Liu, M., & Franzreb, M.: Towards the Development of a Digital Twin for a Multimodal Chromatography Resin. *18th International Symposium on Preparative and Industrial Chromatography and Allied Techniques*, 2022, Lissabon

