

Entwicklung und Einsatz eines
spezifischen Peptid-Affinitätsliganden für
die fließbettchromatographische Aufreinigung
eines Proteins aus Säugetierzellkulturen

Von der Technischen Fakultät
der Universität Bielefeld
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D I S S E R T A T I O N

von
Dipl.-Biol. Nicole Melanie Ameskamp
aus Bielefeld

2001

1. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Jürgen Lehmann
Lehrstuhl für Zellkulturtechnik,
Technische Fakultät, Universität Bielefeld
2. Gutachter: Prof. Dr. Norbert Sewald
Arbeitsgruppe Organische und Bioorganische Chemie,
Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld

Tag der Disputation: 14. Dezember 2001

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1997 bis Dezember 2001 am Lehrstuhl für Zellkulturtechnik der Technischen Fakultät an der Universität Bielefeld unter der Leitung von Herrn Prof. Dr.–Ing. J. Lehmann angefertigt.

Herrn Prof. Dr.–Ing. J. Lehmann danke ich für die Möglichkeit der Dissertation, für die interessante Themenstellung und die vielfältige Unterstützung sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die er am Lehrstuhl für Zellkulturtechnik etabliert hat.

Herrn Prof. Dr. N. Sewald (Fakultät für Chemie, Abteilung Organische Chemie III) danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens, die Bereitschaft zur fachspezifischen Diskussion und die Möglichkeit, in Zusammenarbeit mit ihm und seinen MitarbeiterInnen die Herstellung der durch Festphasensynthese gewonnenen Peptide zu realisieren.

Herrn Prof. Dr. E. Flaschel möchte ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und die Referenzen danken, die mir eine Konferenzteilnahme und die Zusage für ein Abschlußstipendium ermöglichten.

Herrn Dr. D. Lütkemeyer danke ich für die langjährige Betreuung, die produktive Zusammenarbeit sowie die vielen anregenden Auseinandersetzungen und das ständig entgegengebrachte Interesse an meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. R. Frank (Abteilung Molekulare Erkennung, Gesellschaft für biotechnologische Forschung mbH, GBF, Braunschweig) für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Suche geeigneter Peptidliganden. Die in seiner Arbeitsgruppe durchgeführten Spot-Synthesen sowie seine permanente Bereitschaft zur Diskussion und Planung von Versuchen gaben mir die ausschlaggebende Unterstützung für den erfolgreichen Abschluß meines Promotionsvorhabens.

Herrn Dr. W. Tegge (Abteilung Molekulare Erkennung, GBF Gesellschaft für biotechnologische Forschung, Braunschweig) danke ich für die hilfreiche fachliche Unterstützung bei der direkten Synthese des Peptidliganden an das Chromatographiematerial und für die Vermessung der Matrixproben in der Sequenz- und Aminosäureanalytik.

Bei Herrn Dipl.-Chem. D. Bächle (Fakultät für Chemie, Abteilung Organische Chemie III) möchte ich mich für die ergiebige Zusammenarbeit bei der Entwicklung der Kupplungsstrategie unter Verwendung geschützter Peptidliganden, die Herstellung der notwendigen Sequenzen sowie die unermüdliche Bereitschaft zur fachspezifischen Diskussion bedanken.

Frau Dipl.-Chem. E. M. Bartsch und Herrn Dipl.-Biol. C. Priesner gilt mein besonderer Dank für die exzellente Zusammenarbeit und die gewissenhafte Durchführung der dieser Dissertation assoziierten Diplomarbeiten.

Allen MitarbeiterInnen am Lehrstuhl für Zellkulturtechnik möchte ich für das ausgezeichnete Arbeitsklima, die hervorragende Zusammenarbeit und die vielfältige Hilfsbereitschaft danken.

Der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) und ihren MitarbeiterInnen, darunter insbesondere Herrn Dr. L.-J. Larsson, danke ich für die fachliche und finanzielle Unterstützung meiner Arbeit sowie die Bereitstellung des fließbettchromatographischen Prototypmaterials.

Der Weidmüller Stiftung und ihren MitarbeiterInnen danke ich für das entgegengebrachte Interesse an meinem Promotionsvorhaben, das sie durch die Gewährung eines Stipendiums finanziell unterstützt haben.

Der Bayer AG (Wuppertal) und insbesondere Herrn Dr. U. Gottschalk möchte ich für das Interesse an meiner Arbeit, der Möglichkeit Ergebnisse vorstellen und diskutieren zu können sowie dem Einverständnis zur Verwendung ihrer Produktzelllinie danken.

Mein besonderer Dank gilt zu guter letzt meinen Eltern und Geschwistern, die mich während der gesamten Zeit der Promotion in jeglicher Form unterstützt haben. Meiner Schwester Simone danke ich dabei insbesondere für die hilfreiche und sorgfältige Durchsicht der vorliegenden Arbeit und anderer Veröffentlichungen.

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit wurden vorab wie folgt publiziert:

Publikationen

Ameskamp N., Priesner C., Lehmann J., Lütkemeyer D. (1999): Pilot Scale Recovery of Monoclonal Antibodies by Expanded Bed Ion Exchange Adsorption; *Bioseparation 8 (1-5): 169-188, 1999*

Lütkemeyer D., **Ameskamp N.**, Tebbe H., Wittler J., Lehmann J. (1999): Estimation of Cell Damage in Bench- and Pilot-Scale Affinity Expanded-Bed Chromatography for the Purification of Monoclonal Antibodies. *Biotechnology & Bioengineering 65(1) Oct. 5: 114-119, 1999*

Feuser J., Halfar M., Lütkemeyer D., **Ameskamp N.**, Kula M.R., Thömmes J. (1999): Interaction of Mammalian Cell Culture Broth with Adsorbents in Expanded Bed Adsorption of Monoclonal Antibodies; *Process Biochemistry 34 (2): 159-165, 1999*

Lütkemeyer D., **Ameskamp N.**, Priesner C., Bartsch E. M., Lehmann J. (2000): Capture of Proteins from Mammalian Cells in Pilot Scale Using Different StreamlineTM Adsorbents; *Bioseparation, in press*

Kongreßvorträge

Ameskamp N., Priesner C., Lehmann J., Lütkemeyer D. (1998): Pilot Scale Recovery of Monoclonal Antibodies by Expanded Bed Ion Exchange Adsorption; *2nd International Conference on Expanded Bed Adsorption, Napa Valley, CA, USA, Juni 1998*

Ameskamp N., Frank R., Sewald N., Lehmann J., Lütkemeyer D. (2001): Entwicklung und Einsatz eines Peptid-Affinitätsliganden für die chromatographische Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers aus Maus/Maus-Hybridomkulturen; *19. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Leipzig, März 2001*

Posterpräsentationen & sonstige Veröffentlichungen

Lütkemeyer D., **Ameskamp N.**, Tebbe H., Bracht K., Lehmann J. (1996): Direct Capture of Monoclonal Antibodies Using High Capacity Membrane Ion Exchangers in Pilot Scale; *14th ESACT-Meeting, Vilamoura, Portugal, 1996*

Ameskamp N., Lütkemeyer D., Tebbe H., Wittler J., Lehmann J. (1996): Purification of Murine IgG₁ from Cell Culture Broth by Expanded Bed Chromatography Using StreamlineTM rProtein A; *Pharmacia Biotech, Downstream, 22, 24-26, 1996*

Lütkemeyer D., **Ameskamp N.**, Tebbe H., Wittler J., Lehmann J. (1996): Direct Capture of MAbs Using a New rProtein A Matrix in Fluidized Bed Chromatography under Lysis-Free Conditions; *Engineering Foundation Conference: Recovery of Biological Products VIII, Tucson, USA, 1996*

Lütkemeyer D., **Ameskamp N.**, Tebbe H., Wittler J., Lehmann J. (1996): Investigation of Cell Damage in Pilot Scale Fluidized Bed Chromatography for Direct Capture of Monoclonal Antibodies; *1st International Conference on Expanded Bed Adsorption, Queens' College, Cambridge, UK, 1996*

Ameskamp N., Lütkemeyer D., Tebbe H., Wittler J., Lehmann J. (1996): Optimizing Direct Capture of MAbs from Cell Culture Broth Using rProtein A in Fluidized Bed Chromatography under Lysis-Free Conditions; *1st International Conference on Expanded Bed adsorption, Queens' College, Cambridge, UK, 1996*

Ameskamp N., Lütkemeyer D., Tebbe H., Lehmann J. (1997): Downstream Processing im Pilotmaßstab: Direkte affinitätschromatographische Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Hybridomkulturen im stabilen Fließbett; *Bioscope 5: 14-22, 1997*

Ameskamp N., Lütkemeyer D. (1997): Purification of Murine IgG₁ from Cell Culture Broth by Expanded Bed Adsorption at Lab Scale; *Application Note StreamlineTM rProtein A, Pharmacia Biotech, 1997*

Ameskamp N., Lütkemeyer D., Tebbe H., Wittler J., Lehmann J. (1997): Purification of Murine IgG₁ from Spent Culture Medium by Expanded Bed Adsorption Chromatography; *Science Tools from Pharmacia Biotech 2,1, 1997*

Lütkemeyer D., **Ameskamp N.**, Tebbe H., Lehmann J. (1997): Schonende Fließbettchromatographie für die direkte Reinigung von Antikörpern aus zell-haltigen Kulturbrühen im Pilotmaßstab; *15. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Münster, 1997*

Priesner C., **Ameskamp N.**, Lütkemeyer D., Lehmann J. (1997): Direct Capture of Monoclonal Antibodies with a New High Capacity StreamlineTM SP_XL Ion Exchanger; *15th ESACT-Meeting, Tours, Frankreich, 1997*

Priesner C., **Ameskamp N.**, Lütkemeyer D., Lehmann J. (1997): From Bench to Pilot Scale: Recovery of Monoclonal Antibodies from Unclarified Cell Culture Broth by Expanded Bed Ion Exchange Chromatography; *Downstream Processing Conference, Amsterdam, Niederlande, 1997*

Ameskamp N., Priesner C., Lehmann J., Lütkemeyer D. (1998): Pilot Scale Recovery of Monoclonal Antibodies by Expanded Bed Ion Exchange Adsorption; *2nd International Conference on Expanded Bed Adsorption, Napa Valley, CA, USA, 1998*

Ameskamp N., Bartsch E. M., Shi H., Lehmann J., Lütkemeyer D. (2000): Optimization and Scale Up of an IMAC Expanded Bed Process for the Recovery of Recombinant Prothrombin Expressed in CHO Cells; *3rd International Conference on Expanded Bed Adsorption, Garmisch-Partenkirchen, Deutschland, 2000*

Lütkemeyer D., **Ameskamp N.**, Priesner C., Bartsch E. M., Lehmann J. (2000): Capture of Proteins from Mammalian Cells in Pilot Scale Using Different StreamlineTM Adsorbents; *3rd International Conference on Expanded Bed Adsorption, Garmisch-Partenkirchen, Deutschland, 2000*

Ameskamp N., Frank R., Lehmann J., Lütkemeyer D. (2001): Expanded Bed Adsorption of a Monoclonal Antibody Using a Small Peptide Ligand in Comparison to rProtein A. *Recovery of Biological Products X, Cancun, Mexico, 2001*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Problemstellung und Zielsetzung	3
1.3	Theoretische Grundlagen	7
1.3.1	Fließbettchromatographie	7
1.3.2	Peptidchemie	22
2	Material und Methoden	39
2.1	Herstellung der Peptid-Affinitätsmatrix	39
2.1.1	Suche eines geeigneten Peptidliganden	39
2.1.2	Peptidkupplung an die Basalmatrix	44
2.2	Produktgewinnung	52
2.2.1	Produkt, Zellelinie und Kulturmedium	53
2.2.2	Kultivierungssystem und Prozeßführung	53
2.3	Chromatographie	54
2.3.1	Chromatographieanlagen	55
2.3.2	Prozeßführung in der Chromatographie	57
2.3.3	Charakterisierung der Matrices	62
2.4	Analytik	66
2.4.1	Produktquantifizierung mittels ELISA	66
2.4.2	Analytische Gelfiltration	69
2.4.3	SDS-PAGE und Silberfärbung	70
2.4.4	Western-Blot Analyse	72
2.4.5	Casy1: Aufnahme von Partikelgrößenverteilungen	75
2.4.6	Quantitative DNA-Bestimmung	76
2.4.7	Bestimmung der LDH-Aktivität	78
2.4.8	Aminosäureanalytik	79

3	Ergebnisse und Diskussion	83
3.1	Selektion eines geeigneten Peptidliganden	84
3.1.1	Erster Selektionszyklus	85
3.1.2	Zweiter Selektionszyklus	87
3.1.3	Dritter Selektionszyklus	89
3.1.4	Untersuchung von Sequenzmutationen	92
3.1.5	Theoretische Charakterisierung der Peptidliganden	96
3.1.6	Zusammenfassung	99
3.2	Peptidkupplung an die Basalmatrix	101
3.2.1	Kupplung Fmoc-geschützter Peptide	101
3.2.2	Peptidkupplung über einen Disulfid-Austausch	107
3.2.3	Direkte Synthese an NHS-Sepharose TM	110
3.2.4	N-terminale Kupplung an NHS-Sepharose TM	116
3.2.5	Zusammenfassung	118
3.3	Festbettchromatographie	120
3.3.1	Aufarbeitung von Kulturüberstand	120
3.3.2	Abreicherung von Fremdproteinen	124
3.3.3	Abreicherung von DNA	126
3.3.4	Abreicherung niedermolekularer Substanzen	128
3.3.5	Untersuchung der Bindungsspezifität	130
3.3.6	Untersuchung der Bindungskapazität	132
3.3.7	Untersuchung des Verweilzeitverhaltens	143
3.3.8	Optimierung der Regeneration	150
3.3.9	Stabilitätstest	153
3.3.10	Zusammenfassung	156
3.4	Fließbettchromatographie	159
3.4.1	Festlegung der Betriebsparameter	159
3.4.2	Aufreinigung aus Kultursuspensionen	162
3.4.3	Abreicherung der Biomasse	170
3.4.4	Zellschädigung	174
3.4.5	Biomasse/Matrix Interaktionen	180
3.4.6	Zusammenfassung	187
4	Zusammenfassung und Ausblick	191
A	Abkürzungsverzeichnis	I
B	Literaturverzeichnis	V

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Einführung

Die Biotechnologie hat in den vergangenen Jahrzehnten eine rasante Entwicklung gemacht und bildet heute eine wichtige Grundlage für die großtechnische Herstellung einer Vielzahl von Produkten. Eines der bedeutendsten Anwendungsgebiete ist die Medizin. War die Gewinnung therapeutischer und diagnostischer Pharmazeutika früher nur durch die komplizierte und kostenintensive Isolierung aus lebenden Organismen oder durch eine aufwendige chemische Synthese möglich, so bietet die Biotechnologie auf dem derzeitigen Stand der Forschung und der Technik eine wertvolle Alternative, die im Laufe der letzten Jahre zahlreiche klassische Verfahren erfolgreich abgelöst hat.

Für die medizinische Diagnostik waren die Arbeiten von KÖHLER und MILSTEIN von besonderer Bedeutung [KÖHLER & MILSTEIN, 1975]. Ihnen gelang es, durch die Fusion von Myelomzellen mit B-Lymphozyten immortalisierte Hybridomzellen herzustellen, die nach Selektionierung zur Produktion monoklonaler Antikörper fähig waren. Diese kommen heute in vielen medizinischen Routinetests, aber auch als Affinitätsliganden oder sogar zur therapeutischen Behandlung von Krebs und anderen Erkrankungen zum Einsatz [MILLER & LEVY, 1981; NOWINSKI ET AL., 1983; OLSSON & KAPLAN, 1980; PETERS & BAUMGARTEN, 1990].

Ein entscheidender Fortschritt der Biotechnologie wurde mit der Entdeckung der DNA-Doppelhelix und des genetischen Codes gemacht [WATSON & CRICK, 1953; CRICK, 1966], auf der die spätere Entwicklung der Gentechnik beruhte, die seitdem die Darstellung verschiedenster rekombinanter Proteine mit gewünschter Struktur und Funktion ermöglicht hat.

Als Expressionssysteme werden neben den weniger bedeutenden Insekten- und Pflanzenzellen in erster Linie Prokaryonten oder Säugetierzellen eingesetzt. Für die

Produktion komplexer Proteine bietet sich die Kultivierung von Eukaryontenzellen an, da nur sie korrekte posttranslationale Modifikationen wie Glykosilierungen und Ausbildungen von Disulfidbrücken gewährleisten kann, die einen entscheidenden Einfluß auf die biologische Aktivität der Moleküle haben [LIU, 1992]. Eine besondere Bedeutung hat dieser Aspekt bei der Herstellung rekombinanter Proteine für die therapeutische Anwendung, da diese eine präzise humanidentische Wirksamkeit aufweisen müssen [WERNER & HOFFMANN, 1989].

Durch die Entwicklung geeigneter Fermentationssysteme ist es gelungen, wichtige biotechnische Herstellungsverfahren bis in den Industriemaßstab zu etablieren [WERNER, 1990; BREUKER & DREES, 1984; PULLEN ET AL., 1985]. Auf diese Weise kann heute ein Großteil des weltweiten Bedarfs an therapeutischen Produkten wie beispielsweise das Erythropoietin oder der Blutgerinnungsfaktor VIII weitgehend durch die Gewinnung aus Zellkulturen gedeckt werden.

Außer von der Eignung der Expressions- und Kultivierungssysteme hängt die Qualität eines biotechnisch gewonnenen Produkts im wesentlichen von der Effizienz der anschließenden Aufarbeitungsstrategie ab. Die Reinheit ist eines der wichtigsten Kriterien für den Einsatz von Proteinen in der Medizin [BERTHOLD & WALTER, 1994]. Während in der *in vitro* Diagnostik häufig eine Reinheit von 95 % ausreicht, dürfen die Kontaminationen in therapeutischen Produkten nur 1-2 ppm betragen, was einem Reinheitsgrad von 99,9998 % entspricht [WHEELWRIGHT, 1989]. Da das Zielmolekül in der Regel aus einem sehr komplexen Gemisch von Biomasse, Fremdproteinen, niedermolekularen Substanzen, DNA und sonstigen Medienbestandteilen isoliert werden muß, stellt die Aufarbeitung häufig den aufwendigsten Prozeßabschnitt dar und kann einen Kostenanteil von bis zu 80 % ausmachen [DARTAR ET AL., 1993].

Über den Erfolg eines Aufreinigungsprozesses entscheiden neben dem erzielten Reinheitsgrad die Gewährleistung der Stabilität des Zielmoleküls sowie ökonomische Aspekte wie etwa der methodisch bedingte Produktverlust und der Material- und Zeitaufwand des Verfahrens.

Der Aufarbeitungsprozeß für die Reingewinnung extrazellulärer Proteine gliedert sich in die aufeinanderfolgenden Schritte der Biomasseabtrennung, der Konzentrierung, der Fraktionierung, der Subfraktionierung und der Formulierung des Produkts. Sämtliche dazu eingesetzten Verfahren müssen optimal aufeinander abgestimmt werden [HARRISON, 1994; SADANA & BEELARAM, 1994].

Die Klärung erfolgt üblicherweise in Sedimentations-, Zentrifugations- oder Mikrofiltrationsverfahren [GÖLKER, 1994;], die die Zellintegrität zum Schutz des Produkts vor enzymatischem Abbau gewährleisten müssen [LIND ET AL., 1991; MUNZERT

ET AL., 1995]. Für die anschließende Konzentrierung des Zielproteins werden neben der Extraktion mit wässrigen 2-Phasen-Systemen und Fällungsreaktionen durch Zugabe von Salzen, organischen Lösungsmitteln oder Polymeren häufig Membranfiltrationsprozesse wie die Ultrafiltration eingesetzt [NAVEH & SIEGEL, 1991]. Für die Fraktionierung von Proteinen haben sich chromatographische Methoden durchgesetzt, die aufgrund der großen Auswahl an verfügbaren Matrices und der Variabilität der Bindungsbedingungen für nahezu jedes Zielmolekül optimierbar sind [ANSPACH ET AL., 1996]. In der klassischen Säulenchromatographie werden gepackte Matrices aus kugelförmigen synthetischen oder natürlichen Polymeren [ARSHADY, 1991] eingesetzt, die in Abhängigkeit von ihrem jeweiligen Liganden nach verschiedenen Adsorptionsprinzipien arbeiten [ROBERTSON & KENNEDY, 1996; SCOPES, 1996].

Aufgrund des hohen Kostenaufwands der herkömmlichen vielstufigen Aufarbeitungsprozesse genießen derzeit alternative integrative Verfahren das wachsende Interesse der industriellen Anwender. Dabei versucht man, die Produktverluste und den Material- und Zeitaufwand durch die Zusammenführung mehrerer Prozessschritte effizient zu reduzieren. In den letzten Jahren hat sich die Entwicklung verstärkt auf die Anpassung adsorptiver Verfahren für den Einsatz in der Primäraufarbeitung konzentriert. Daraus ging die Methode der Fließbettadsorption hervor, bei der die Klärung, Konzentrierung und erste Grobfraktionierung des Zielmoleküls in einem Schritt erfolgen [BATT ET AL., 1995; CHASE, 1994; HANSSON ET AL., 1994; HJORTH, 1997; THÖMMES, 1997]. Die heute erhältlichen Matrices sind in ihrer strukturellen Beschaffenheit dem Fließbettverfahren angepaßt, so daß hohe Durchsätze erreicht werden können. Die grundlegenden chromatographischen Charakteristika und Bindungsprinzipien sind dabei mit denen klassischer Festbettmaterialien vergleichbar. Da durch den Kontakt mit der Biomasse jedoch intensivere Regenerationsprozesse erforderlich sind, und insbesondere bei den weniger spezifisch bindenden Matrices Interaktionen mit den Zellen auftreten können, stellt die Fließbettadsorption neue Anforderungen an die Stabilität und Selektivität der verwendeten Liganden.

1.2 Problemstellung und Zielsetzung

In der klassischen Säulenchromatographie werden in der Regel Matrices mit gruppen- oder bioaffinitätsspezifisch bindenden Liganden eingesetzt, die sich nur bedingt für die Verwendung in der Fließbettadsorption eignen und auch im Festbettbetrieb eine Anzahl individueller Nachteile aufweisen.

Die ladungs- oder gruppenspezifisch wechselwirkenden Matrices wie die Ionenaustauscher oder HIC-Materialien (*Hydrophobe Interaktions-Chromatographie*) zeichnen sich durch eine hohe Stabilität sowie niedrige Anschaffungs- und Betriebskosten aus. Aufgrund mangelnder Selektivität ist mit ihnen jedoch meist keine einschrittige Isolierung des Produkts möglich.

Eine optimale Abreicherung von Kontaminationen kann häufig nur durch den Einsatz hochspezifischer Affinitätsmatrices erreicht werden [JONES 1991; LOWE ET AL., 1992; NARAYANAN, 1994], der allerdings mit einem relativ hohen Kostenaufwand verbunden ist. Die verwendeten Proteinliganden weisen eine hohe Sensibilität gegenüber Denaturierungsprozessen auf, was insbesondere die Regeneration sehr aufwendig machen kann [BURGOYNE ET AL., 1993; GIROT ET AL., 1990], und die Standzeiten meist vergleichsweise kurz werden läßt.

Die Nachteile der herkömmlichen Liganden führen in der Fließbettchromatographie zu noch gravierenderen Problemen. Da das Bindungsprinzip der kleinen funktionellen Liganden der ladungs- und gruppenspezifischen Matrices auf einfachen physikochemischen Wechselwirkungen beruht, wird unter bestimmten Aufarbeitungsbedingungen auch die Biomasse an dem Chromatographiematerial zurückgehalten. Dieser Effekt tritt besonders massiv bei dem Einsatz von Ionenaustauschern auf [AMESKAMP ET AL., 1999; FEUSER ET AL., 1998]. Die optimale Bindung des Zielproteins erfordert häufig sehr unphysiologische pH-Werte und Salzkonzentrationen, unter denen auch die Biomasse mit den Liganden interagieren kann. Das Ausmaß der Zellrückhaltung und die Auswirkungen auf die Stabilität der Prozeßführung sind für die Einzelexperimente nicht kalkulierbar [FERNÁNDEZ-LAHOURE ET AL., 1999]. Wegen der mangelnden Reproduzierbarkeit der Aufarbeitungsergebnisse, der teilweise sehr ausgeprägten Produktverluste und der Schwierigkeiten bei der Regeneration der verklebten Matrices ist ein zuverlässiger standardisierter Einsatz dieser Fließbettmethode für viele Zellkulturprodukte nicht möglich.

Das Problem der Biomasseadsorption besteht bei der Verwendung von hochselektiven Affinitätsmatrices nicht. Allerdings ist hier die Instabilität der Liganden der limitierende Faktor, da der Kontakt mit der Biomasse höhere Anforderungen an die Regenerationsprozesse stellt. Die vollständige Beseitigung vorhandener Zellrückstände kann nur durch die Behandlung mit speziellen Reagenzien gewährleistet werden, die sich jedoch häufig nicht mit dem proteinogenen Charakter der Liganden vereinbaren lassen [HALE ET AL., 1994]. Infolgedessen müssen äußerst material- und zeitaufwendige Reinigungsprozesse entwickelt werden, die sich zusätzlich zu den hohen Anschaffungskosten nachteilig auf die Prozeßökonomie auswirken.

Um die Effizienz der fließbettchromatographischen Verfahren zu steigern, müßte idealerweise eine Matrix entwickelt werden, mit der sich die hochselektiven Bin-

dungseigenschaften eines Affinitätsgels mit der hohen Stabilität der gruppenspezifischen Materialien vereinen lassen. Auf diese Weise ließen sich Biomasse/Matrix Interaktionen und die daraus resultierenden Prozeßinstabilitäten verhindern und gleichzeitig einfache standardisierte Regenerationsprotokolle realisieren, die die Standzeiten der Fließbettsäulen verlängern und die Kostenintensität des Gesamtprozesses verringern könnten. An dieser Stelle setzt die grundlegende Idee der vorliegenden Arbeit ein, in der die Vorteile der beiden Matrixtypen durch die Verwendung von Peptidliganden kombiniert werden sollten.

Bisher liegen nur wenige Publikationen über die Entwicklung und den Einsatz von Peptidliganden vor. Dabei handelt es sich in erster Linie um Strukturen, die aus bekannten Bindungsdomänen eines Zielproteins abgeleitet und ausschließlich in der Festbettchromatographie getestet wurden [FERRIS ET AL., 1992; FISCHER ET AL., 1996; HUANG ET AL., 1996; MAKRIYANNIS & CLONIS, 1997].

Die Selektionierung geeigneter Bindungspartner kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Die Arbeit mit löslichen Peptidgemischen, in denen das Zielprotein an einer Matrix fixiert oder über semipermeable Membranen räumlich von der Ligan denlösung getrennt wird und als „molekulare Falle“ für affine Sequenzen fungiert, hat bereits zu einigen Erfolgen geführt [HUANG ET AL., 1999; LÓPEZ-FANDIÑO, 1993; SWANN ET AL., 1996]. Allerdings ist diese Methode insbesondere bei der Verwendung von sehr komplexen Gemischen aufgrund des hohen Aufwands für die Abtrennung, Reinigung und Identifizierung der Bindungspartner zu kompliziert für einen standardisierten Einsatz.

Heute konzentriert sich die Selektionierung von Affinitätsliganden für die Chromatographie in den wenigen bisher publizierten Anwendungen auf die Verwendung von Peptidbibliotheken, die biologisch durch das *Phage-Display* [HAMMOND, 1998; PATWARDHAN ET AL., 1997] oder chemisch durch die *multiple Peptidsynthese* [AMATSCHEK ET AL., 2000; NECINA ET AL., 1998] gewonnen wurden.

Mit dem Phage-Display läßt sich mit relativ geringem Aufwand eine große Anzahl von randomisierten Peptidsequenzen einer spezifischen Länge auf der Oberfläche von Phagenpartikeln herstellen, die dann in sogenannten *High-Throughput-Screening* Tests verwendet werden können. Die Methode wird im allgemeinen für biochemisch und medizinisch relevante Studien zur Aufklärung von Molekülwechselwirkungen und zur Auffindung pharmazeutisch wirksamer Strukturen eingesetzt [CESARENI ET AL., 1999; HOOGENBOOM ET AL., 1998; JEFFERIES, 1998; LOWMAN, 1997; MCGREGOR, 1996; MARKS & SHARP, 2000; WILSON & FINLAY, 1998].

Durch geeignete kombinatorische Strategien können auch mit der multiplen Peptidsynthese Bibliotheken erstellt werden, die eine hohe Sequenzdiversität aufweisen und sich ebenfalls für Bindungsstudien unterschiedlicher Art einsetzen lassen

[FRANK, 1995; GEYSEN ET AL., 1984; GORDON ET AL., 1994; HOUGHTEN, 1985; JUNG & BECK-SICKINGER, 1992; KENAN ET AL., 1994; PAVIA ET AL., 1993].

Für die unspezifische Suche nach einem Affinitätsliganden eignet sich besonders das Verfahren der Spot-Synthese auf Cellulosemembranen [FRANK, 1992; 1994]. Es bietet die Möglichkeit, kombinatorische Peptidbibliotheken herzustellen, mit denen Bindungsstudien durchgeführt werden können, in denen sich die späteren Bedingungen in der Chromatographie hervorragend simulieren lassen. Dies betrifft außer den frei wählbaren pH- und Salzbedingungen auch die Zugänglichkeit zwischen den Reaktionspartnern. Wie in der Chromatographie liegen die Peptidsequenzen in den Bindungsnachweisen mit den Spotmembranen fixiert am Trägermaterial und das Zielprotein in gelöster Form vor. Dies verspricht einen Vorteil gegenüber dem Phage-Display, bei dem das Zielprotein an eine feste Phase gekuppelt wird, und sich die Phagenpartikel mit den auf der Oberfläche exponierten Peptiden in Lösung befinden.

Vergleichende Interaktionsstudien, in denen CHOULIER ET AL. beide Selektionsmethoden einander gegenüberstellten, ergaben tatsächlich Unterschiede in den Ergebnissen, die auf die unterschiedliche Präsentation der Reaktionspartner zurückgeführt wurden [CHOULIER ET AL., 2001]. Zudem scheint die Phage-Display Methode insbesondere für die Untersuchung von kleinen Oligopeptiden ungeeignet zu sein, da das Ergebnis durch die Interaktionen seitens der Phagenhüllproteine verfälscht werden kann, wie die Arbeiten von GASKIN ET AL. zeigten. Dort erwies sich ein im Phage-Display selektioniertes Heptapeptid als chromatographischer Affinitätsligand unbrauchbar, während an dem immobilisierten kompletten Phagenpartikel eine signifikante Bindung des Zielproteins erzielt werden konnte [GASKIN ET AL., 2001].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, ein Herstellungsverfahren für eine Peptid-Affinitätsmatrix zu etablieren, das auf beliebige Produkte der Zellkulturtechnik übertragbar ist. Die Methodenentwicklung erfolgt exemplarisch anhand eines Modellproteins, bei dem es sich um einen aus Maus/Maus Hybridomkulturen gewonnenen monoklonalen Antikörper handelt.

Um ein möglichst stabiles Chromatographiematerial zu erhalten, soll sich die Suche nach dem Peptidkandidaten auf kurze, einfache Oligosequenzen beschränken, die jedoch gleichzeitig eine ausreichend hohe Bindungsaffinität und -intensität zu dem Zielmolekül aufweisen müssen. Die Verwendung kombinatorischer Peptidbibliotheken auf Basis der Spot-Synthese erscheint aus den besagten Gründen für einen zuverlässigen Bindungsnachweis am besten geeignet und entspricht zudem dem gesetzten Kriterium der universellen Einsetzbarkeit.

Nach der Ermittlung des Affinitätsliganden soll eine optimale Kupplungsmethode für dessen Fixierung an das Chromatographiematerial entwickelt werden. Dabei sollen die Peptide in der gleichen Ausrichtung wie auf den Spotmembranen mit der Matrix verknüpft werden, da nur unter diesen Bedingungen ähnliche Bindungseigenschaften wie in den zugrundeliegenden Bindungsstudien zu erwarten sind. Die Arbeiten von AMATSCHEK ET AL. zeigten zudem, daß eine völlig ungerichtete Orientierung an der Matrix aufgrund der schlechten Ligandenzugänglichkeit in sehr geringen Bindungskapazitäten resultieren kann, was hier vermieden werden soll [AMATSCHEK ET AL., 1999].

Sämtliche Methoden zur Fixierung der Peptide an die Basalmatrix müssen ebenfalls auch für andere Zielproteine bzw. deren spezifische Liganden einsetzbar oder zumindest durch geringfügige Modifikationen übertragbar sein. Für die Entwicklung der Kupplungsstrategien sind Versuche mit 1 ml Fertigsäulen vorgesehen. Nach ausführlichen Charakterisierungen und Vergleichen in der Festbettchromatographie soll die erfolgreichste Kupplungsmethode für die Anfertigung einer Fließbett-Prototypmatrix übernommen werden.

Neben den üblichen chromatographischen Kriterien wie der Reinheit und der Bindungskapazität sind hinreichende Untersuchungen zur Stabilität und zu den eventuell auftretenden Biomasse/Matrix Interaktionen geplant. Der Vergleich mit zwei herkömmlichen Fließbettmatrices, bei denen es sich um einen Ionenaustauscher und ein rekombinantes Protein A Gel handelt, soll abschließend die Beurteilung der Peptid-Affinitätschromatographie für den Einsatz in der Fließbettadsorption ermöglichen und die Frage klären, ob es mit den neuartigen Liganden tatsächlich gelingt, die Vorteile der gruppen- und bioaffinitätsspezifischen Matrixtypen miteinander zu verknüpfen.

1.3 Theoretische Grundlagen

1.3.1 Fließbettchromatographie

Die Fließbettchromatographie (EBA) ist ein integratives säulenchromatographisches Aufreinigungsverfahren, mit dem Biomoleküle direkt aus ungeklärten Kultursuspensionen aufgearbeitet werden können. Wie aus der in Abbildung 1.1 dargestellten Einordnung des EBA-Verfahrens in das konventionelle Aufarbeitungsschema hervorgeht, vereint die Fließbettchromatographie die Arbeitsschritte der Biomasseabtrennung sowie der Aufkonzentrierung und ersten Grobreinigung des Produkts in einem einstufigen Prozeß.

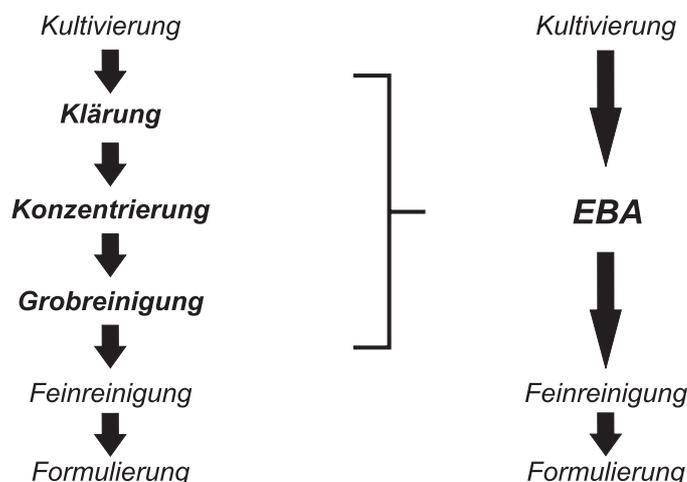


Abbildung 1.1: Einordnung des EBA-Verfahrens in das konventionelle Aufarbeitungsschema

Das Prinzip der Fließbettchromatographie beruht auf der Vergrößerung des Lückengrads in der Adsorberschüttung, wodurch die Beladung mit feststoffbelasteten Lösungen ermöglicht wird, ohne daß die Matrix verblockt. Während der Passage wird das Zielmolekül adsorptiv aus der Suspension an den funktionellen Gruppen des Gels zurückgehalten und in einem anschließenden Elutionsschritt analog zur Festbettchromatographie wieder abgelöst.

1.3.1.1 Historische Entwicklung der Fließbettchromatographie

Die Entwicklung zur heutigen Fließbettchromatographie (*Expanded Bed Adsorption*, EBA) begann in den fünfziger Jahren mit einfachen diskontinuierlichen Verfahren, in denen ein Adsorbermaterial direkt in ein abgeschlossenes, gerührtes System gegeben wurde, und die Produktbindung satzweise unter vollständiger Rückvermischung erfolgte. Solche Methoden boten sich an, wenn die Zielsubstanz aus einer großvolumigen, partikelhaltigen Vorlage isoliert werden mußte, und die notwendigen Klärungs- und Applikationsprozesse für die Festbettchromatographie zu aufwendig und verlustträchtig erschienen. Auf diese Weise wurde beispielsweise lange Zeit unter Einsatz von DEAE Sephadex der Blutgerinnungsfaktor IX kommerziell aus Plasma gewonnen [BRUMMELHUIS, 1980]. Weitere industrielle Anwendungen bestanden im Bereich der Antibiotikaherstellung wie der Isolierung von Streptomycin, Novobiocin oder der Aufreinigung von Immunomycin aus ungeklärten *Streptomyces* Kulturen [BARTHELS ET AL., 1958; BELTER ET AL., 1973; GAILLIOT ET AL., 1990]. Auch wenn einige der Verfahren semi-kontinuierlich verliefen, hatten sie kaum Vorteile gegenüber der ursprünglichen satzweisen Adsorption, da starke Turbulenz- und Rückvermischungseffekte immer nur einen singulären Equilibrierungszustand

erzeugten, der zu einem frühen und flachen Proteindurchbruch mit der Folge geringer Effizienz und Produktivität führte [SOMERS, 1989].

Es wurden zahlreiche Versuche unternommen, die Dispersion des Adsorbers zu verringern, um eine ähnliche Separationscharakteristik wie in der Festbettchromatographie zu erreichen. Abbildung 1.2 gibt einige der Ansätze wieder, die ausgehend von der Festbettchromatographie zur Entwicklung der heutigen Fließbettadsorption im expandierten Gelbett führten.

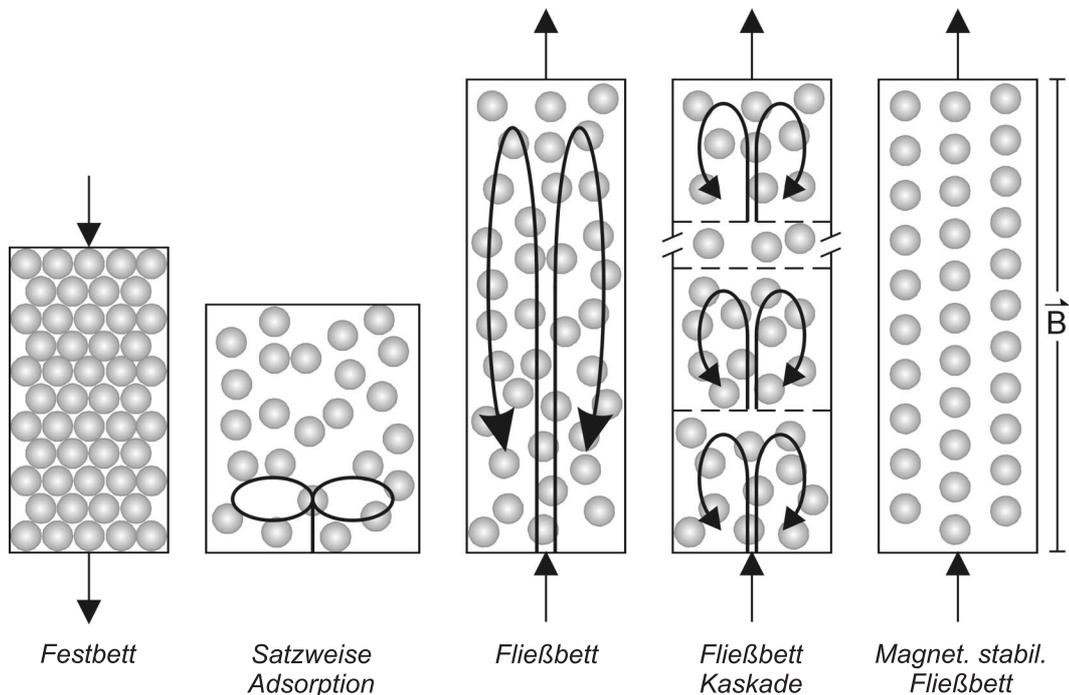


Abbildung 1.2: Entwicklungsansätze zur Realisierung der Fließbettchromatographie

BUIJS und WESSELINGH beschrieben eine Reduzierung des Problems durch das Einbringen mehrerer horizontaler, perforierter Trennböden, die den Freiheitsgrad der Gelpartikel limitierten [BUIJS, WESSELINGH, 1980]. Das Prinzip dieser Fließbettkolonne wurde später noch von AGOSTO ET AL. zur Aufarbeitung von Aminosäuren aus biomassehaltigen Suspensionen aufgegriffen [AGOSTO ET AL., 1993], jedoch ließ sich eine optimale Trennung nur über eine entsprechend große Anzahl solcher Böden realisieren, was mit einem hohen apparativen Aufwand verbunden war.

Ein weiterer Ansatz bestand in dem Versuch, das Fließbett magnetisch zu stabilisieren [BURNS, GRAVES, 1985]. Dabei wurde der fluidisierte Zustand der Matrix unter Einsatz ferromagnetischer Partikel über ein angelegtes Magnetfeld fixiert und Prozeßleistungen analog der Festbettchromatographie erreicht. Da die Expansion unter diesen Bedingungen weitgehend unabhängig von der Geschwindigkeit

des Flüssigkeitsstroms ist, eröffnete diese Methode ein weites Spektrum von Durchsatzraten bei konstanter Betthöhe [NIXON ET AL., 1991]. Der Nachteil dieser Technik war allerdings neben der Wärmeentwicklung beim Aufbau des magnetischen Feldes wieder ein sehr hoher apparativer Aufwand, der das Verfahren insbesondere unter dem Aspekt der Maßstabvergrößerung unrentabel machte.

Erst zu Beginn des letzten Jahrzehnts gelang es DRAEGER und CHASE, ein stabiles expandiertes Gelbett auf der Basis von konventionellen Agarosemedien zu realisieren [DRAEGER, CHASE, 1990]. Durch die Entwicklung einer speziellen Verteilerkonstruktion für den Flüssigkeitseinlaß konnte in der Säule eine Pfropfenströmung aufgebaut werden, die ohne weitere Maßnahmen eine ähnliche chromatographische Charakteristik wie im gepackten Gel ermöglichte. Zahlreiche Anwendungen bewiesen das Potential dieser Technik für die direkte Aufarbeitung von Proteinen aus partikelhaltigen Suspensionen [DRAEGER, CHASE, 1991; CHASE, DRAEGER, 1992; 1992A]. Jedoch erwiesen sich die herkömmlichen Adsorbentmaterialien sowie später entwickelte Modifikationen auf Silicabasis [DASARI ET AL., 1993] für die Verwendung im Fließbett als ungeeignet, da ihre geringe Dichte bzw. Partikelgröße nur sehr niedrige Anströmgeschwindigkeiten erlaubte.

Ein überzeugender Durchbruch der Fließbett-Technologie gelang erst mit der Weiterentwicklung der Basalmatrices, die weitgehend durch die physikalischen und hydrodynamischen Untersuchungen von DRAEGER und CHASE forciert wurde. Die spezifische Beschwerung der Agarosepartikel ermöglichte höhere Fließgeschwindigkeiten und verbesserte die Prozeßleistung. Gleichzeitig führte ein definierter Größen- und Dichtegradient bei gegebener Anströmung zu einer geordneten Matrixverteilung in einem klassierenden Fließbetts mit reduzierter Partikelbeweglichkeit und minimaler Rückvermischung. Auf diesem Prinzip basierend setzte sich ein neues Adsorbentmaterial durch, das unter dem Namen StreamlineTM (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) kommerziell erhältlich ist und mit einer weit gefächerten Auswahl von Liganden angeboten wird [GILCHRIST ET AL., 1994]. Der Einsatz der StreamlineTM Matrices und der dazugehörigen, speziell auf den Fließbettmodus abgestimmten Säulen und Chromatographiesysteme bietet heute eine wertvolle Alternative zum klassischen mehrstufigen Aufarbeitungsschema. Aufgrund ihrer Bedeutung für die vorliegende Arbeit werden in den folgenden Abschnitten die allgemeine Prozeßführung, die verfügbaren Ligandenausstattungen sowie die physikalischen Grundlagen der Fluidisierung detailliert erläutert.

1.3.1.2 Prozeßschritte der Fließbettchromatographie

Die Prozeßführung in der Fließbettadsorption verläuft nach den klassischen Chromatographieschritten, die sich aus der Equilibrierung, dem Probenauftrag, der

Auswaschung ungebundener Substanzen und der Elution des Produkts sowie der abschließenden Regeneration der Matrix für einen neuen Aufarbeitungslauf zusammensetzen. Abbildung 1.3 veranschaulicht die Vorgehensweise bei der Verwendung des StreamlineTM Systems der Firma Amersham Pharmacia Biotech.

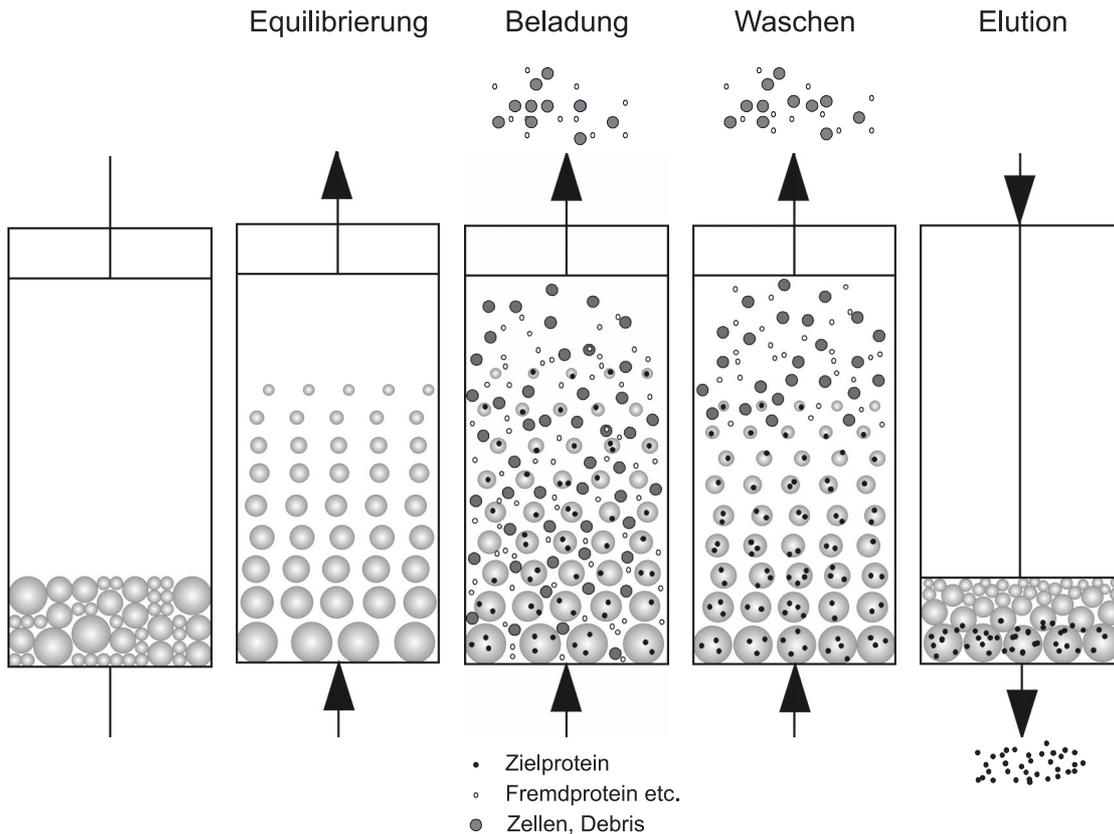


Abbildung 1.3: EBA-Prozessschritte mit dem StreamlineTM System

Während der **Equilibrierung** werden die Gelpartikel mit der mobilen Phase fluidisiert und die Zwischenräume innerhalb der Schüttung vergrößert. Die Anströmung verläuft über eine Verteilerplatte mit kreisförmig angeordneten Bohrungen, die dem Aufbau einer Pfropfenströmung dienen. Ein aufliegendes feinporiges Drahtnetz unterstützt den gleichmäßigen Flüssigkeitseintrag. Durch den Größen- und Dichtegradienten der Partikel baut sich ein klassierendes Fließbett auf, in dem sich die größeren, schwereren Kügelchen im unteren und die kleineren, leichteren im oberen Bereich der Säule anordnen. Auf diese Weise entsteht eine stabile Expansion, die sich durch geringe Rückvermischungen und Verwirbelungen auszeichnet. Die Fließgeschwindigkeit wird in einem durch Anströmungsexperimente definierten Bereich eingestellt und ergibt in der Regel eine gegenüber dem gepackten Gel um den Faktor zwei bis vier vergrößerte Expansionshöhe [CHANG & CHASE, 1996].

Die anschließende **Beladung** mit der Probe erfolgt ebenfalls im expandierten Modus. Durch die Aufschwemmung wird der Auftrag partikelhaltiger Lösungen möglich, ohne daß das Chromatographiematerial verblockt. Somit können ungeklärte Kultursuspensionen direkt verarbeitet werden. Während die Zellen und andere Feststoffe die Säule ungehindert passieren, wird das Zielprodukt am Adsorber zurückgehalten. Gleichzeitig lassen sich vorhandene Fremdproteine sowie DNA und sonstige Kontaminationen, die nicht mit den Liganden interagieren, abreichern. Die Güte der Produktisolation hängt dabei wesentlich von der Selektivität der eingesetzten Matrix und der Einstellung der Bindungsbedingungen ab.

Da der Wechsel vom Equilibrierungspuffer auf die Kultursuspension meist mit einer Veränderung der Viskosität und Dichte der Flüssigphase verbunden ist, treten häufig leichte Unterschiede in der Expansionshöhe auf. Um Komplikationen zu verhindern, wird der hydraulisch bewegliche Säulenadapter deshalb vor Beginn eines Aufarbeitungslaufs auf eine Höhe von 2 bis 5 cm oberhalb der fluidisierten Matrix arretiert oder die Fließgeschwindigkeit in Anpassung an einen konstanten Expansionsgrad variiert.

Im Anschluß an die Beladung erfolgt ein **Waschschritt** mit Equilibrierungspuffer, in dem ungebundene Substanzen sowie die restliche Biomasse ausgespült werden. Der Wechsel findet auch hier zunächst ohne eine Unterbrechung der aufwärts gerichteten Anströmung statt. Nach Beendigung der Austragung schaltet man den Fluß jedoch ab und läßt die Matrix sedimentieren. Zur Vorbereitung des letzten Chromatographieschritts wird der obere Säulenadapter anschließend bis auf die Oberfläche des Gels abgesenkt, so daß man eine mit den klassischen Festbettaulen vergleichbare Adsorberpackung erhält.

Für die **Elution** des gebundenen Produkts können sämtliche Betriebsparameter aus der Festbettchromatographie übernommen werden. Sie erfolgt im allgemeinen bei niedrigerer Strömungsgeschwindigkeit und in umgekehrter Flußrichtung. Auf diese Weise läßt sich das Elutionsvolumen minimieren und das Zielmolekül optimal ankonzentrieren.

Nach jedem Aufarbeitungslauf sollte vor der Wiederverwendung eine gründliche **Regeneration** der Matrix erfolgen. Da das Adsorbermaterial in der Fließbettchromatographie mit der rohen Kultursuspension in Kontakt kommt, unterliegen die Regenerationsprotokolle (*Cleaning-In-Place*, CIP) höheren Anforderungen als in den meisten Festbettverfahren. Die Regeneration muß die vollständige Beseitigung von zellulären Rückständen und Kontaminationen mit Zellinhaltsstoffen wie Nukleinsäuren und Lipiden gewährleisten. Je nach Stabilität und Bindungseigenschaften der Liganden sind dazu unterschiedliche angepaßte CIP-Prozeduren erforderlich.

1.3.1.3 Herkömmliche Fließbettmatrices

Seit 1993 bietet die Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) unter dem Produktnamen StreamlineTM diverse Matrices an, die speziell für den Einsatz in der Fließbettchromatographie modifiziert wurden. Das Basalmaterial besteht aus einem stark quervernetzten 4 oder 6 %igen Agarosederivat, das sich durch eine hohe physikochemische Stabilität und niedrige unspezifische Adsorptionseigenschaften auszeichnet. Im Unterschied zu den gängigen Festbettmedien weisen die kugelförmigen Gelpartikel der EBA-Matrices einen größeren und heterogeneren Durchmesser auf. Zusätzlich sind sie durch inerte Kerne beschwert, so daß auch bei höheren Fließgeschwindigkeiten eine stabile Expansion gewährleistet werden kann. Die StreamlineTM Matrices werden mit unterschiedlichen Ligandenausstattungen angeboten. Abbildung 1.4 gibt einen Überblick über die wichtigsten Vertreter.

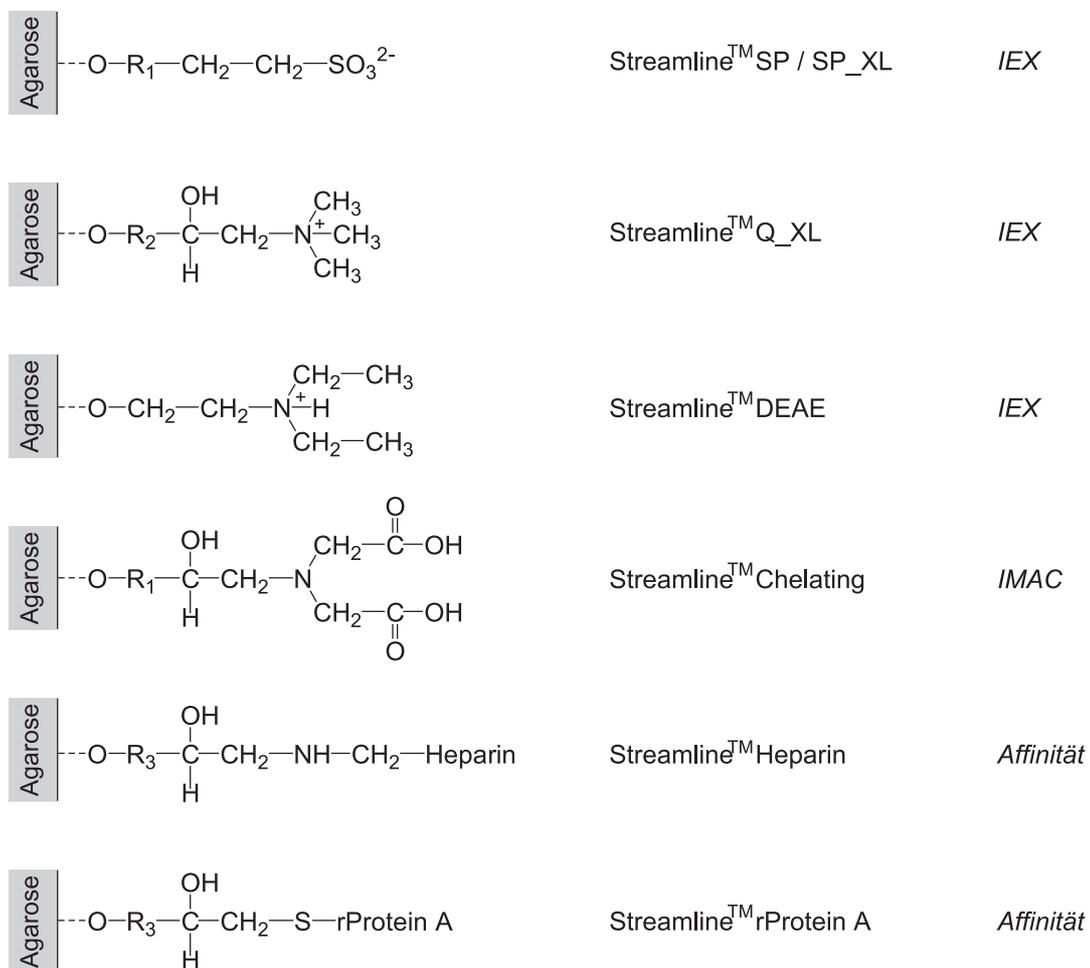


Abbildung 1.4: Ligandenstrukturen bedeutender StreamlineTM Matrices

Aufgrund der Bedeutung für die vorliegende Arbeit werden im folgenden zwei der dargestellten Matrixtypen und ihre Bindungsprinzipien näher vorgestellt. Dabei handelt es sich um den Kationenaustauscher SP_XL und die Affinitätsmatrix rProtein A.

StreamlineTM SP_XL [THÖMMES ET AL., 2001; TRINH ET AL., 2000] gehört wie SP, DEAE und Q_XL zu der Gruppe der Ionenaustauscher. Bei den XL-Varianten (*extreme load*) handelt es sich um hochkapazitive Matrices, bei denen die Liganden über lange Dextransketten an dem Basalmaterial aus 6 %iger Agarose verankert sind, was das Interaktionsvolumen und die sterische Zugänglichkeit gegenüber den anderen Vertretern erhöht. StreamlineTM SP_XL ist ein starker Kationenaustauscher, der mit Sulphopropyl-Gruppen substituiert ist. Die Gelpartikel weisen einen Durchmesser von 100 bis 300 μm auf und sind durch die Einlagerung von Quarzkernen auf eine mittlere Dichte von 1,2 g/ml spezifisch beschwert.

Die Ionenaustauschchromatographie IEX ist eine weitverbreitete Methode zur Aufreinigung von Proteinen aus komplexen Lösungen. Die Bindung ist unspezifisch und beruht auf den elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der Matrix und den aufzureinigenden Molekülen. Die funktionellen Gruppen der Anionenaustauscher sind positiv und die der Kationenaustauscher negativ geladen. Die Wahl der Matrix richtet sich nach dem isoelektrischen Punkt pI des Zielproteins, das durch Erhöhung oder Erniedrigung des pH-Werts eine negative bzw. positive Nettoladung erhält und an einem entsprechend entgegengesetzt geladenen Austauscher gebunden werden kann. Der Zusammenhang zwischen dem amphoterem Verhalten von Proteinen und den daraus resultierenden Aufarbeitungsbedingungen für das jeweilige Austauschermaterial ist in Abbildung 1.5 dargestellt.

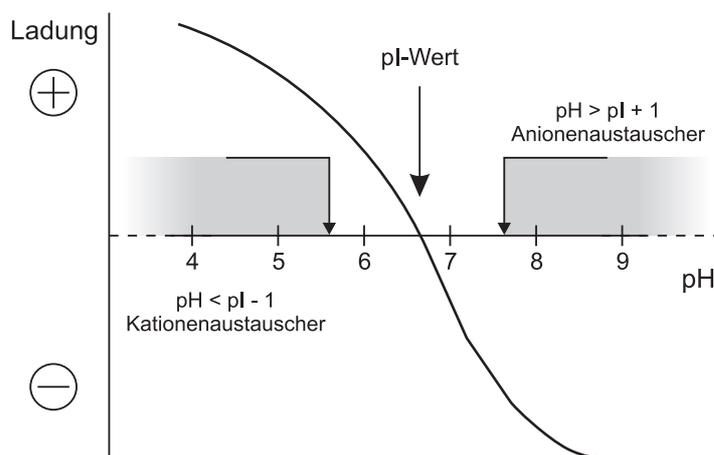


Abbildung 1.5: Titrationskurve: Abhängigkeit der Protein-Nettoladung vom pH-Wert

Im Equilibrierungsschritt werden die Ladungen der Matrix durch Gegenionen neutralisiert. Während der anschließenden Beladung konkurrieren die gleich geladenen Probenmoleküle mit den sogenannten *Counterionen* um einen Platz auf der stationären Phase und werden gegen sie ausgetauscht. Zur Elution trägt man einen Puffer mit verändertem pH-Wert oder erhöhter Ionenstärke auf, wodurch die ladungsbedingten Bindungen aufgehoben bzw. die Substanzen von den funktionellen Gruppen verdrängt werden.

Die Wahl des Austauschers und der Chromatographiebedingungen ist auch abhängig von den Begleitproteinen in der Lösung. Je nach ihrem pI besteht die Möglichkeit der Kochromatographie, die aufgrund der resultierenden Kapazitätsverluste und Produktkontaminationen vermieden werden sollte. Eine Stufen- oder Gradientenelution kann in einigen Fällen den Reinheitsgrads der Zielmoleküle erhöhen. Ionenaustauscher haben den Vorteil einer hohen chemischen Stabilität und sind zudem relativ preisgünstig. Sie sind in einem weiten pH-Bereich einsetzbar und durch die Behandlung mit 1 M Natronlauge regenerierbar. Die geringe Empfindlichkeit der Liganden erlaubt zudem das Autoklavieren der Matrices.

Da unter geeigneten Bedingungen nahezu jedes Biomolekül gebunden werden kann, gehören sie zu den am häufigsten eingesetzten Gelen in der Festbettchromatographie und finden sich in nahezu jedem Aufreinigungsschema wieder. Die unterschiedliche Ladungscharakteristik der Zielmoleküle und die Bindungseinbußen bei hohen Salzkonzentrationen erfordern jedoch häufig sehr unphysiologische Aufarbeitungsbedingungen, die die Verwendung in zellintegrativen Verfahren wie der Fließbettadsorption erschweren. Zudem besteht die Gefahr, daß durch das unspezifische, ladungsabhängige Bindungsverhalten auch Biomasse/Matrix Interaktionen auftreten, die für manche Anwendungen zu kaum lösbaren Problemen führen [AMESKAMP ET AL., 1999, FEUSER ET AL. 1999].

StreamlineTM rProtein A ist eine fließbettchromatographische Affinitätsmatrix für die Aufreinigung von mono- und polyklonalen Antikörpern [AMESKAMP ET AL., 1997; FAHRNER ET AL., 1999]. Die Matrixpartikel bestehen aus quervernetzter 4 %iger Agarose und enthalten zur Erhöhung ihres spezifischen Gewichts eingestreute Kerne aus einer inerten Metallegierung. Die Partikel haben eine mittlere Dichte von 1,3 g/ml und einen Durchmesser zwischen 80 und 165 μm .

Allgemein läßt sich mit der Affinitätschromatographie eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine unter Ausnutzung ihrer biologischen Funktion oder chemischen Struktur aufreinigen [LABROU & CLONIS, 1994]. Sie ist die Trennmethode mit der größten Spezifität. Das aufzureinigende Molekül wird aus der Lösung reversibel an die feste Matrix gebunden und kann anschließend durch ein Konzentrat einer zum

Reaktionspartner analogen Struktur oder durch eine pH-Änderung eluiert werden. Man unterscheidet zwischen mono- und gruppenspezifischen Liganden, die entweder eine bestimmte Substanz selektiv oder eine ganze Molekülklasse binden. Eine gruppenspezifische Affinität liegt z. B. bei dem Einsatz von Lektinen vor, die mit sämtlichen Proteinen eines bestimmten Glykosilierungsmusters wechselwirken. Bei der monospezifischen Bindung macht man sich hingegen die hohe Selektivität von Hormon/Rezeptor-, Enzym/Substrat- oder Antigen/Antikörper-Interaktionen zunutze. Da die Wechselwirkungen hierbei im wesentlichen von der strukturellen Paßform der beiden Bindungspartner abhängig sind, und diese für jedes Protein individuell ist, erreicht man bei der Trennung eine sehr hohe Selektivität. Aus diesem Grund lassen sich mit dieser Methode Biomoleküle auch aus komplexen Lösungen mit zahlreichen Begleitproteinen effizient isolieren.

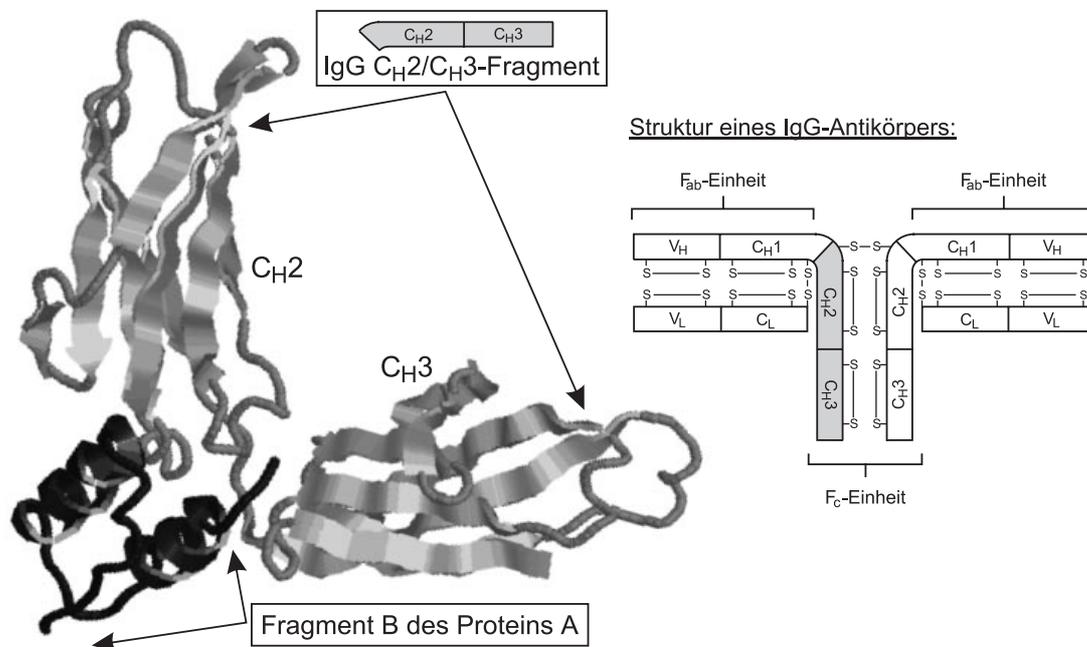


Abbildung 1.6: Struktur eines Komplexes aus der F_c -Einheit eines Antikörpers und dem Fragment B des Proteins A nach DEISENHOFER

Bei dem Liganden der StreamlineTM Matrix handelt es sich um ein rekombinantes Protein A, das wie seine native Variante eine hohe Affinität zur F_c -Region von Immunglobulinen vom Typ IgG aufweist [FUGLISTALLER, 1989; MACKENZIE ET AL., 1978]. Abbildung 1.6 gibt die auf Basis von kristallographischen Untersuchungen ermittelte Struktur eines Komplexes aus der F_c -Einheit eines Antikörpers und dem Fragment B eines Protein A Moleküls wieder [DEISENHOFER, 1981]. Das vollständige Protein A ist ein etwa 42 kDa großes Zellwandprotein, das von vielen Stämmen des

Gram-positiven Bakteriums *Staphylococcus aureus* auf der Oberfläche exponiert wird. In der Natur bewirkt es die Bedeckung des Bakteriums mit wirtseigenen Antikörpern, deren Antigenbindungsstellen F_{ab} dann nach außen weisen und den Prokaryonten gegenüber immunologischen Abwehrreaktionen maskieren.

In der Chromatographie wird die hohe Bindungsspezifität und -selektivität des Proteins zur Aufreinigung von Antikörpern aus Kultursuspensionen genutzt. Der rekombinante Ligand des StreamlineTM Gels wird in *Escherichia coli* hergestellt und vor der Kupplung an die Agarose über mehrere Chromatographieschritte gereinigt. Er unterscheidet sich vom nativen in erster Linie durch die Deletion einer Albumin-Bindungsstelle und einen zusätzlichen Cysteinrest am C-Terminus, der eine bevorzugte Orientierung bei der Verknüpfung des Moleküls an die Basalmatrix ermöglicht. Auf diese Weise verbessert man die sterischen Bedingungen, die die Interaktionen zwischen dem Protein A und den F_c -Regionen der aufzureinigenden Antikörper und somit die Bindungskapazität des Materials stark erhöhen. Die Nachteile der rProtein A Matrix sind die hohen Anschaffungskosten und die chemische und physikalische Instabilität der Liganden, die die Lagerung und Reinigung der Gele erschwert. Schon nach verhältnismäßig wenigen Chromatographiezyklen kann es zu Ausblutungseffekten oder Verminderung der Bindungsaktivität kommen, wodurch die Standzeiten im Vergleich zu anderen Matrices stark verkürzt werden.

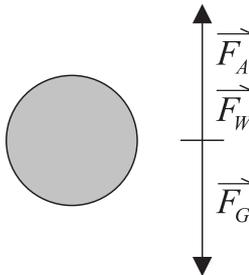
1.3.1.4 Physikalische Grundlagen der Fluidisierung

Um in der Fließbettchromatographie ähnliche Ergebnisse bzgl. Kapazität und Trennleistung wie mit klassischen Festbettsäulen erzielen zu können, darf die aufgeschwemmte Matrix möglichst wenig Verwirbelungen haben. Eine stabile Fluidisierung wird dann erreicht, wenn sich sämtliche auf ein einzelnes Adsorberpartikel wirkenden Kräfte aufheben und eine Art schwebender Gleichgewichtszustand besteht. Durch die Größen- und Dichteunterschiede der speziell für den Einsatz in der Fließbettchromatographie konzipierten Matrices ordnen sich die Gelpartikel auf verschiedener Säulenhöhe an und bilden im Idealfall ein streng klassierendes Adsorberbett mit geringen Rückvermischungseffekten aus.

Im folgenden werden die grundlegenden physikalisch-mathematischen Zusammenhänge des Expansionsverhaltens einer angeströmten Matrixschüttung näher erläutert [DE LUCA L. ET AL., 1994]. Eine genaue Charakterisierung durch analytische Ansätze ist bis heute jedoch nur unvollständig gelöst [DI FELICE, 1995]. Aufgrund der Komplexität der Vorgänge spielen nach wie vor empirisch ermittelte Lösungsansätze für die Bestimmung der Betriebsparameter eine wichtige Rolle.

Fluidisierungsverhalten einer umströmten Kugel

Betrachtet man ein einzelnes fluidisiertes Gelpartikel, so muß die Wirkung von drei unterschiedlichen Kräften berücksichtigt werden: Die Gewichtskraft F_G und die Auftriebskraft F_A nach ARCHIMEDES sowie die Widerstandskraft F_W nach NEWTON. Für kugelförmige Partikel im Schwerfeld sind sie gegeben durch:



$$F_G = m_p g = \rho_p \frac{\pi d_p^3}{6} g \quad (1.1)$$

$$F_A = V_p \rho_l g = \rho_l \frac{\pi d_p^3}{6} g \quad (1.2)$$

$$F_W = c_W A_p \frac{\rho_l}{2} U^2 = c_W \frac{\pi d_p^2}{4} \frac{\rho_p U^2}{2} \quad (1.3)$$

mit:	m_p	Partikelmasse	[kg]
	g	Fallbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$	$[\text{m}\cdot\text{s}^{-2}]$
	d_p	Partikeldurchmesser	[m]
	V_p	Partikelvolumen	$[\text{m}^3]$
	A_p	Partikelquerschnitt	$[\text{m}^2]$
	ρ_p	Dichte des Partikels	$[\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}]$
	ρ_l	Dichte der Flüssigkeit	$[\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}]$
	U	Relativgeschwindigkeit	$[\text{m}\cdot\text{s}^{-1}]$
	c_W	Widerstandsbeiwert	[-]

Die nach unten gerichtete Gewichtskraft F_G eines Teilchens berechnet sich aus seiner Masse m_p und der Fallbeschleunigung g . Die ihr entgegengesetzte Auftriebskraft F_A ist gleich der Gewichtskraft der verdrängten Flüssigkeit. Die ebenfalls nach oben gerichtete Widerstandskraft F_W entsteht durch den Reibungs- und Druckwiderstand des sich relativ zur umgebenden Flüssigkeit bewegendem Partikels. Sie setzt sich aus dem Widerstandsbeiwert c_W , der Querschnittsfläche des Teilchens A_p und dem dynamischen Druck der Anströmung zusammen. Der dimensionslose Widerstandsbeiwert c_W ist von der Form und Oberflächenbeschaffenheit des Teilchens und von der jeweiligen Strömungsart abhängig, die durch die Reynoldszahl Re charakterisiert wird. Tabelle 1.1 gibt den empirisch ermittelten Zusammenhang zwischen dem Widerstandsbeiwert c_W und der Reynoldszahl Re für ein kugelförmiges Partikel in den verschiedenen Strömungsbereichen wieder [MÜLLER, 1983].

Tabelle 1.1: Empirisch ermittelter Zusammenhang zwischen der Reynoldszahl Re und dem Widerstandsbeiwert c_W für die Umströmung von Kugeln in verschiedenen Strömungsbereichen

	STOKES Bereich	Übergangsbereich	NEWTON Bereich
Strömungsart	laminar	intermediär	turbulent
Re	0 – 0,5	0,5 – 500	300 – 150.000
c_W	$24/Re$	$18,5/Re^{0,6}$	0,44

In der Praxis wird die Widerstandskraft F_W aus Gleichung 1.3 über die in Tabelle 1.1 dargestellte mathematische Abhängigkeit des Widerstandsbeiwerts c_W von der Reynoldszahl Re berechnet. Dabei läßt sich die Reynoldszahl Re durch folgende Beziehung ersetzen:

$$Re = \frac{d_p \rho_l U}{\eta_l} = \frac{d_p U}{v_l} \quad (1.4)$$

mit: η_l dynamische Viskosität der Flüssigkeit [kg·m⁻¹·s⁻²]
 v_l kinematische Viskosität der Flüssigkeit [m²·s⁻¹]

Durch Umformung von Gleichung 1.3 erhält man für die Widerstandskraft F_W einer Kugel im laminaren Strömungsprofil (STOKES'scher Bereich) eine Abhängigkeit nach dem STOKES'schen Gesetz:

$$F_W = 3 \pi \eta_l d_p U \quad \text{für } Re < 0,5 \quad (1.5)$$

Reduziert man die Matrixexpansion in der Fließbettchromatographie auf die Betrachtung eines einzelnen kugelförmigen Gelpartikels, so besteht für jede Anströmgeschwindigkeit oberhalb eines bestimmten Grenzwerts u_{min} ein Gleichgewichtszustand, in dem die Summe aus der Widerstands- und der Auftriebskraft gleich der Gewichtskraft ist, und das Teilchen stabil in der Schwebelage gehalten wird:

$$F_G = F_W + F_A \quad (1.6)$$

Dieser Gleichgewichtszustand wird durch den Druckabfall innerhalb der Säule bestimmt. Die nach oben gerichteten Kräfte nehmen aufgrund des Druckabfalls mit zunehmender Höhe ab und treiben das Partikel nur solange aufwärts, bis die Gewichtskraft sie gerade ausgleicht. An diesem Punkt ist die vektorielle Summe aller einwirkenden Kräfte gleich Null und die Relativgeschwindigkeit U zwischen dem

Teilchen und dem umströmenden Fluid maximal. Sie entspricht unter diesen Bedingungen der terminalen Fallgeschwindigkeit u_t des Partikels, die die maximale Anströmgeschwindigkeit u_{max} bestimmt. Unter der Annahme, daß es sich um ein sphärisches Partikel handelt, und ein laminares Strömungsprofil vorliegt, läßt sich die terminale Fallgeschwindigkeit u_t durch Einsetzen der Beziehungen aus Gleichungen 1.1, 1.2 und 1.5 in Gleichung 1.6 wie folgt berechnen:

$$u_t = u_{max} = \frac{d_p^2 g}{18 \eta_l} (\rho_p - \rho_l) \quad (1.7)$$

Bei einer Anströmgeschwindigkeit oberhalb von u_t bzw. u_{max} kann der Gleichgewichtszustand bei gegebener Säulenhöhe nicht mehr erreicht werden, so daß das Partikel ausgespült wird. Somit wird der Durchsatz bei der Beladung des Chromatographiematerials durch die terminale Fallgeschwindigkeit der Gelpartikel limitiert. Die Effizienz eines Fließbettprozesses hängt folglich neben der Bindungscharakteristik und Kapazität im wesentlichen von den physikalischen Eigenschaften der Basalmatrix ab, die eine Gleichgewichtseinstellung innerhalb der Säule bei möglichst hoher Fließgeschwindigkeit gewährleisten müssen. Dies erreicht man in erster Linie durch eine Erhöhung der Gewichtskraft, die in der Praxis über eine Erhöhung der spezifischen Dichte durch eingelagerte Quarz- oder Metallkerne realisiert wird.

Fluidisierungsverhalten eines Gelbetts

Da die Partikel in einem fluidisierten Gel aufgrund der Interaktionen durch Adhäsionskräfte nicht unabhängig voneinander betrachtet werden können, ist die mathematisch-physikalische Charakterisierung in der Realität wesentlich komplexer. Es existiert eine Vielzahl von Theorien und Gleichungen, die die Fluidisierung verschiedener Schüttungssysteme beschreiben [DI FELICE, 1995]. Eine einfache empirische Korrelation ist von Richardson und Zaki festgestellt worden [RICHARDSON J.F. & ZAKI W.N., 1954]. Sie stellt die Beziehung zwischen der Fließgeschwindigkeit u und dem Lückengrad ϵ der expandierten Schüttung als Funktion der terminalen Fallgeschwindigkeit u_t eines einzelnen Partikels und dem systemspezifischen sogenannten Expansionsindex oder Richardson-Zaki-Koeffizienten n dar:

$$u = u_t \epsilon^n \quad (1.8)$$

Obwohl der Zusammenhang aus dem Fluidisierungsverhalten monodisperser, sphärischer Materialien abgeleitet wurde, kann er in hinreichend genauer Näherung für die Charakterisierung der heterogenen Matrices in dem verwendeten Fließbettsystem herangezogen werden [KARAU ET AL., 1997].

Durch Logarithmieren erhält man die in Gleichung 1.9 wiedergegebene lineare Beziehung, über die sich anhand von Fluidisierungsversuchen die terminale Fallgeschwindigkeit u_t und der Richardson-Zaki-Koeffizient n experimentell ermitteln lassen.

$$\ln U = n \ln \epsilon + \ln U_t \quad (1.9)$$

Dazu mißt man zunächst die Bettexpansion in Abhängigkeit von der Anströmgeschwindigkeit u und bestimmt dann nach Gleichung 1.10 den dazugehörigen Lückengrad ϵ aus der Höhe des fluidisierten Gelbetts H sowie der Höhe H_0 und des Lückengrads ϵ_0 der sedimentierten Matrix. Letzterer beträgt für gleichförmige Kugeln bei maximaler Packungsdichte etwa einen Wert von 0,4, der auch für das Adsorbiermaterial mit ausreichender Genauigkeit angenommen werden kann.

$$\epsilon = 1 - (1 - \epsilon_0) \frac{H_0}{H} \quad (1.10)$$

Durch die doppeltlogarithmische Darstellung der Fließgeschwindigkeit u gegen den Lückengrad ϵ nach Gleichung 1.9 lassen sich die Richardson-Zaki-Parameter dann aus der resultierenden Regressionsgeraden bestimmen. Dabei entspricht die Steigung dem Expansionskoeffizienten n , während die terminale Fallgeschwindigkeit u_t nach Extrapolation aus dem Ordinatenabschnitt berechnet wird.

Eine mathematische Abschätzung des Expansionskoeffizienten n , der durch die Partikelform, die Reynoldszahl und durch Wandeffekte beeinflusst wird, ist nach RICHARDSON und MEIKLE für sphärische Partikel durch Gleichung 1.11 gegeben [RICHARDSON & MEIKLE, 1961].

$$n = 4,65 + \frac{19,5 d_p}{d_c} \quad (1.11)$$

Die Fluidisierungscharakteristik wird nach DI FELICE jedoch nur dann von Wandeffekten beeinflusst, wenn der Partikeldurchmesser d_p und der Säulendurchmesser d_c eine ähnliche Größenordnung aufweisen, was für die Fließbettchromatographie nicht zutrifft.

Aus detaillierteren mathematischen Beschreibungen nach MARTIN et al. können die Richardson-Zaki-Parameter auch über die dimensionslose Gallileozahl Ga (Gl. 1.12) und die terminale Reynoldszahl Re_t (Gl. 1.13) berechnet werden [MARTIN B.L.A. ET AL., 1981].

$$Ga = \frac{\rho_p g (\rho_p - \rho_g) d_p^3}{\eta_t^2} \quad (1.12)$$

$$Re_t = \left(\frac{23}{Ga} + \frac{0,6}{Ga^{0,5}} \right)^{-1} \frac{1}{1 + 2,35 \frac{d_p}{d_c}} \quad (1.13)$$

Die Kalkulation der terminalen Fallgeschwindigkeit u_t erfolgt dann nach Umstellen der Gleichung 1.4 und Einsetzen der terminalen Reynoldszahl Re_t aus Gleichung 1.14, während der Expansionsindex n über die in Gleichung 1.15 dargestellte Korrelation zur Gallileozahl Ga ermittelt wird.

$$U_t = U_{max} = \frac{Re_t \cdot \eta_l}{\rho_l \cdot d_p} \quad (1.14)$$

$$\frac{5,1 - n}{n - 2,4} = 0,016 \cdot Ga^{0,67} \quad (1.15)$$

Zur Verbesserung der Auflösung und Kapazität wird in der Chromatographie die Realisierung einer Pfropfenströmung mit minimaler Rückvermischung angestrebt. In der Fließbettadsorption versucht man, dies durch den Aufbau einer klassierenden Expansion zu erreichen. Dazu werden die Matrices aus Partikeln mit definierten Größen- und Dichtegradienten eingesetzt. Durch die unterschiedlichen terminalen Fallgeschwindigkeiten der Teilchen werden sie auf verschiedener Säulenhöhe im Kräftegleichgewicht gehalten und nehmen im Idealfall stabile, nahezu stationäre Positionen ein. Die entstehende Klassierung verringert die Bildung von Rückvermischungseffekten im Vergleich zu einer fluidisierten homogenen Matrix stark, so daß sich der Zustand einer Pfropfenströmung besser realisieren läßt.

Bei der Kalkulation der hydrodynamischen Verhältnisse müssen die heterogenen Partikeleigenschaften der EBA-Medien strenggenommen durch dementsprechend modifizierte Gleichungen berücksichtigt werden [AL-DIBOUNI M.R. ET AL., 1979]. Zur Abschätzung der Richardson-Zaki Parameter reicht es in hinreichend genauer Näherung jedoch aus, die mittlere Partikelgröße und -dichte in die aufgeführten Gleichungen einzusetzen.

1.3.2 Peptidchemie

Peptide sind durch ihre vielfältigen Strukturen und Funktionen in der Biochemie von großer Bedeutung. In Organismen sind sie als Hormone, Neurotransmitter sowie Immuno- und Neuromodulatoren an einer großen Anzahl von Regulationsmechanismen beteiligt. Dazu gehören beispielsweise die Pankreashormone Insulin [MARGLIN & MERRIFIELD, 1966] und Glucagon, die auf den Blutzuckerspiegel Einfluß nehmen, aber auch die mit 8 bzw. 13 Aminosäuren wesentlich kleineren Hormone Angiotensin II und Neurotensin, die eine blutdrucksteigernde bzw. -senkende Wirkung haben, sowie die Neuropeptide Enkephalin und Endorphin oder die zu den Tachykininen gehörige Substanz P, die im neuralen Gewebe als Neuromodulator

oder -transmitter fungiert. Weitere in der Natur vorkommende Peptide sind neben zahlreichen Peptidalkaloiden und -insektiziden die Peptidtoxine, die aus Pilz-, Schlangen- oder Insektengiften isoliert werden konnten.

Von großer medizinischer Bedeutung sind die natürlichen und synthetischen Peptidantibiotika, die auf unterschiedliche Weise das Wachstum oder die Vermehrung von Mikroorganismen hemmen. Sie stellen eine äußerst heterogene Stoffklasse dar, zu der beispielsweise die Cephalosporine, die Actinomycine oder die zu den Ionophoren zählenden Gramacidine A-C und das Valinomycin gehören. Auch für die 1928 von FLEMING entdeckten Penicilline besteht aufgrund der biosynthetischen Bildung aus Aminosäuren eine formale Beziehung zu den Peptidantibiotika.

Die industrielle Nutzung biologisch aktiver Peptide gewann in den letzten Jahrzehnten durch die Verbesserung der Strukturaufklärung und anderer analytischer Methoden immer größere Bedeutung. Ein besonderer Schwerpunkt liegt dabei auf der Entwicklung pharmazeutisch nutzbarer Substanzen, wie Enzyminhibitoren, Impfstoffen, Immunsuppressiva oder neuartiger Antibiotika. In der Lebensmittelindustrie finden Geschmacks- oder Zuckeraustauschstoffe wie das Aspartam bereits heute eine weitverbreitete Anwendung.

Ein neues Einsatzgebiet der Peptide bietet die in den vergangenen Jahren stark forcierte Biotechnologie. Die Vielfalt der in der Natur vorkommenden spezifischen Wechselwirkungen zu anderen Biomolekülen macht sie zu idealen potentiellen Liganden für die Verwendung in der Chromatographie. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen bereits heute, daß sie die klassischen Proteinliganden aus der Affinitätschromatographie effektiv ersetzen können. Bisher lag der Schwerpunkt dabei in erster Linie auf der Modifikation bestehender Liganden, mit dem Ziel, sie stabiler zu machen und eine ökonomisch preiswertere Herstellung zu realisieren. Als Beispiel sind die sogenannten *Affibodies* zu nennen, bei denen es sich um auf den funktionellen Bereich reduzierte Protein A Moleküle handelt [NORD ET AL., 2000].

Für die medizinische und biotechnische Nutzung von Peptiden ist neben der Struktur die detaillierte Kenntnis der biologischen Funktion und Wirksamkeit erforderlich. Durch Modifikation und Austausch oder Deletion von Aminosäurebausteinen lassen sich die Wirkstoffe gezielt für ihre Anwendung optimieren. Derartige Untersuchungen können jedoch nur durchgeführt werden, wenn das betreffende Peptid in ausreichender Menge zur Verfügung steht. Da sich das natürliche Vorkommen häufig nur im Nanogrammbereich bewegt, muß auf andere Quellen zurückgegriffen werden. Eine echte Alternative bietet neben der gentechnischen Herstellung die Chemosynthese von Peptidanaloga, die gleichzeitig ein großes Spektrum von Modifikationsmöglichkeiten eröffnet.

Heute ermöglicht die automatisierte Festphasen-Synthese eine verhältnismäßig einfache und schnelle Produktion unzähliger Peptidstrukturen. Von besonderer Bedeutung sind die daraus entwickelten Verfahren der *multiplen Synthese*, bei der es sich um die gleichzeitige Synthese einer Vielzahl von Peptidsequenzen unterschiedlicher Länge und beliebiger Aminosäurezusammensetzung handelt. Durch die lokale Trennung auf einem festen Träger lassen sich vielfältige Peptidbibliotheken erstellen, die dann in Screening-Tests für die Entwicklung pharmazeutisch nutzbarer Substanzen oder zur gezielten Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen eingesetzt werden können. Peptidbibliotheken dieser Art sind somit auch für Bindungsstudien zur Selektion und Optimierung von potentiellen Affinitätsliganden für die chromatographische Aufarbeitung biotechnisch hergestellter Produkte geeignet.

1.3.2.1 Struktureller Aufbau von Peptiden

Peptide und Proteine sind Oligo- und Polymere der Aminosäuren, die über Amidbindungen (Peptidbindungen) miteinander verknüpft sind. Abbildung 1.7 veranschaulicht die Bildung eines Dipeptids, bei der die α -Carboxylgruppe einer Aminosäure unter Abspaltung eines Wassermoleküls mit der α -Aminogruppe einer zweiten Aminosäure reagiert.

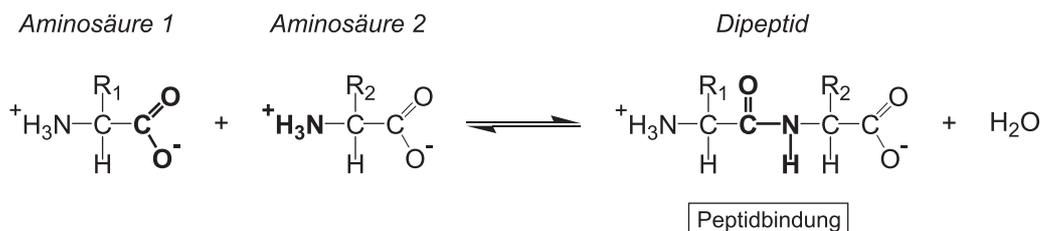


Abbildung 1.7: Bildung eines Dipeptids aus zwei Aminosäuren

Die Grenze zwischen diesem einfachen Peptid und den Proteinen wird in neueren Veröffentlichungen mit 50 und in älteren mit 100 Aminosäurebausteinen angegeben. Bei einer Kettenlänge von weniger als 10 bis 15 Aminosäuren spricht man von Oligopeptiden (griech. *oligos* = wenige). Das Molekulargewicht einer Aminosäure beträgt etwa 110 *Dalton* (d), so daß Polypeptidketten mit einer Masse von bis zu 5500 d (11000 d) noch der Klasse der Peptide zugerechnet werden können, wobei die Abgrenzung zum Protein jedoch nicht immer klar definiert ist.

Die natürlich vorkommenden Verbindungen setzen sich in der Regel aus verschiedenen Kombinationen von 19 α -Aminosäuren und der Iminosäure Prolin zusammen. Diese unterscheiden sich in ihren Seitengruppen R voneinander, die die biochemi-

sche Wirkung des Gesamtmoleküls bestimmen. Da die Enden der Aminosäuren zwei unterschiedliche funktionelle Gruppen aufweisen, ist die Primärstruktur einer Polypeptidkette durch eine definierte Ausrichtung gekennzeichnet. Vereinbarungsgemäß betrachtet man das Aminoende (N-Terminus) als Beginn der Kette, was auch für die Schreibweise im Ein- oder Drei-Buchstaben-Code gilt.

Der Abstand zwischen dem C- und dem N-Atom einer Peptidbindung (0,132 nm) ist gegenüber einer normalen C-N-Einfachbindung (0,149 nm) verkürzt. Aufgrund der Delokalisierung der π -Elektronen des benachbarten Sauerstoffs weist sie teilweise die Charakteristik einer Doppelbindung (0,127 nm) auf, was die Rotationsfreiheit stark einschränkt. Es existieren zwei Isomere, die *cis*- und die *trans*-Peptidbindung, wobei letztere durch die energetisch günstigere Anordnung mit einem Anteil von etwa 99,95 % stark überwiegt. Eine Ausnahme bildet die Iminosäure Prolin. Da die Energie der *trans*-Xaa-Pro-Bindung etwas erhöht ist, bildet die *cis*-Orientierung hier einen Anteil von 6,5 %. Die enzymkatalysierte *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidbindungen am N-Terminus eines Prolinbausteins ist für die biochemische Funktion vieler Peptide und Proteine von großer Bedeutung. Des Weiteren verursacht das Ringsystem der Iminosäure einen Knick in der ansonsten regelmäßig strukturierten Peptidkette und verhindert die Ausbildung einer α -Helix.

Neben den dominierenden linearen Verbindungen kommen auch zyklische Peptide vor, die formal durch die Knüpfung einer Peptidbindung zwischen dem N- und dem C-Terminus einer Kette entstehen. Man unterscheidet bei der Charakterisierung von Peptiden und Proteinen zwischen der Primär-, der Sekundär- und der Tertiärstruktur.

Die Primärstruktur gibt lediglich Auskunft über die Anzahl und Reihenfolge der Einzelbausteine, die sich durch Aminosäureanalysen nach Totalhydrolyse und sukzessive Sequenzanalysen im stufenweisen EDMAN-Abbau aufklären lassen.

Der partielle Doppelbindungscharakter der Peptidbindungen bedingt eine planare Anordnung des Moleküls. Durch die periodische Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Sauerstoff- und dem Stickstoffatom zweier Peptidbindungen tritt jedoch häufig eine verhältnismäßig stabile dreidimensionale Konformation auf, die als Sekundärstruktur bezeichnet wird. Dabei handelt es sich in erster Linie um die Formierung einer gleichmäßigen α -Helix oder Faltblattstruktur. Jedoch zählen auch Elemente wie β -Schleifen, die durch eine H-Brücke zwischen den endständigen Peptidgruppen von vier aufeinanderfolgenden Aminosäureresten stabilisiert werden, und sonstige nach dem gleichen Prinzip gebildete Rückfaltungsstrukturen dazu.

Die Tertiärstruktur bzw. endgültige Raumstruktur einer Peptidkette wird neben den Wasserstoffbrücken zwischen den Atomen der Peptidbindungen noch durch weitere Bindungen und Wechselwirkungen festgelegt. Diese beruhen auf den Interaktionen zwischen den Seitenketten der trifunktionellen Aminosäurebausteine. Hierzu gehören die Disulfidbindungen, die durch Oxidation der SH-Gruppen zweier Cysteinreste sowohl intra- als auch intermolekular auftreten können und sich durch die Zugabe von Thiolreagenzien, wie Mercaptoethanol oder Dithioerythrit (DTE) reduktiv spalten lassen.

Neben den kovalenten Disulfidbindungen sind jedoch auch die Wasserstoffbrücken zwischen geeigneten Drittfunktionen sowie die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen sauren und basischen Aminosäureresten für die Konformation des Moleküls von Bedeutung. Letztere basieren auf der vollständigen oder partiellen Ionisierung der Carboxyl- und Aminogruppen am C- und N-Terminus sowie der Seitenkettenfunktionen von Aspartat, Glutamat, Arginin, Lysin und Histidin. Die elektrostatischen Wechselwirkungen von geladenen Funktionen sind stark von den äußeren Bedingungen wie dem pH-Wert, der Salzkonzentration und der Dielektrizitätskonstante des Mediums abhängig.

Eine eher untergeordnete Rolle spielen die Van-der-Waals-Bindungen, bei denen es sich um eine unspezifische Anziehungskraft handelt, die aufgrund einer zeitweisen Asymmetrie der Elektronenverteilung in einem Abstand von 0,3 bis 0,4 nm zwischen zwei Atomen auftritt. Demgegenüber geht ein weiterer wichtiger Beitrag zur Stabilisierung der Molekülkonformation von den hydrophoben Interaktionen zwischen den aliphatischen und aromatischen Seitenketten der Aminosäuren aus. Diese Form der Wechselwirkung tritt nur im wässrigen Milieu auf, da sie nicht auf der Affinität der unpolaren Gruppen zueinander sondern auf der energetisch günstigeren Anordnung der umgebenden Wassermoleküle beruht. Diese sind bestrebt, möglichst viele Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen, die in der strengen Anordnung um vereinzelte hydrophobe Bereiche stark dezimiert werden. Der Freiheitsgrad (Entropie) der Wasserdipole nimmt bei Aggregation solcher Regionen zu, so daß bei der Betrachtung eines Gesamtsystems die Zusammenlagerung unpolarer Funktionen immer favorisiert wird. Aus diesem Grund findet man in der globulären Konformation längerer Polypeptidketten die Aminosäuren mit aliphatischen oder aromatischen Seitenketten meist assoziiert im Inneren des Moleküls vor.

Das Zusammenwirken aller beschriebenen Bindungen und Wechselwirkungen bestimmt letztendlich die Konformation und somit auch die biochemische Funktion einer Peptidkette.

1.3.2.2 Festphasenpeptidsynthese

Bis Anfang der sechziger Jahre wurden Peptide ausschließlich in Lösung synthetisiert. Diese konventionelle Methode führte zwar zu beachtlichen Erfolgen, wie der Herstellung von Ribonuclease A oder der Synthese von Insulin, jedoch war sie mit einem hohen Arbeitsaufwand und einigen Komplikationen verbunden. Das größte Problem bestand in der schlechten Löslichkeit längerer Peptidketten, die zu unvollständigen Kupplungsreaktionen und starken Einbußen in der Ausbeute führte. Der Durchbruch für eine weitverbreitete Herstellung synthetischer Peptide wurde erst 1963 von MERRIFIELD mit der Entwicklung der Festphasen-Peptidsynthese (*Solid Phase Peptide Synthesis*, SPPS) erreicht, für die er 1984 den Nobelpreis für Chemie erhielt [MERRIFIELD & STEWART, 1965; MERRIFIELD, 1969].

Der Grundgedanke der Festphasen-Synthesestrategie besteht in dem sukzessiven Aufbau einer Polypeptidkette an einem leicht filtrierbaren polymeren Träger, wodurch die Auswaschung von Nebenprodukten bzw. überschüssigen Reagenzien und die Isolierung der Zielsequenz stark vereinfacht werden. Abbildung 1.8 gibt das Prinzip der MERRIFIELD-Synthese wieder, die noch heute die Basis der meisten praktizierten Techniken bildet.

Nach Einführung einer geeigneten Ankergruppierung am polymeren Trägermaterial (1) wird die erste Aminosäure über einen C-terminalen Aktivierungsmechanismus am Harz verankert (2). Der Einsatz N^α-geschützter Aminosäuren verhindert dabei eine multiple Aneinanderreihung der Einzelbausteine. Zur Vermeidung anderer Neben- oder Fehlreaktionen werden die reaktiven Funktionen der Seitenketten zusätzlich durch semipermanente Schutzgruppen abgeschirmt. Nach selektiver Deblockierung der α -Aminofunktionen (3) kann dann die Kupplung der zweiten Aminosäure erfolgen. Die zyklische Wiederholung der Reaktionsschritte (2) und (3) führt durch den schrittweisen Aufbau vom C- zum N-Terminus zu der gewünschten Peptidsequenz (4). Den Abschluß der Festphasensynthese bildet die Spaltung der kovalenten Bindung zwischen der C-terminalen Aminosäure und der Ankergruppierung am Polymer. Je nach Wahl des Reagenz läßt sich dabei eine simultane Entfernung der semipermanenten Schutzgruppen vornehmen (5), so daß das fertige Peptid nur noch durch einfache Filtration vom unlöslichen Träger abgetrennt werden muß. Durch eine anschließende HPLC-Reinigung (*High Performance Liquid Chromatography*) können mögliche Nebenprodukte abgereichert und die Zielsequenz in Reindarstellung erhalten werden.

Über die Qualität der Synthese entscheidet jede einzelne Kupplungs- und Deblockierungsreaktion. Für einen quantitativen Umsatz müssen die Aminosäurederivate in großem Überschuß eingesetzt werden. Sollte sich nach einer Aminosäure-

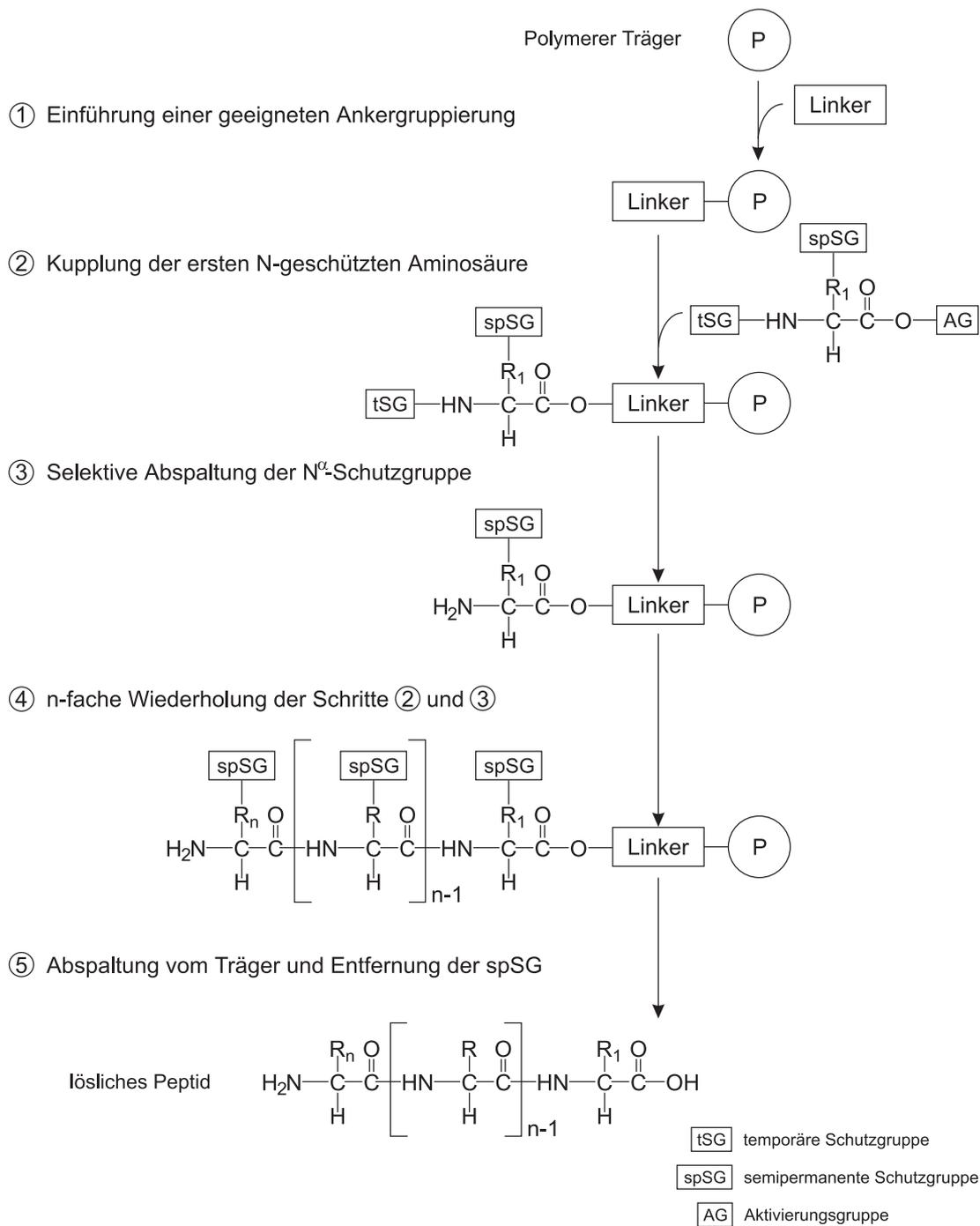


Abbildung 1.8: Schema der MERRIFIELD'schen Festphasen-Peptidsynthese

kupplung durch geeignete Reaktionskontrollen dennoch ein größerer Anteil freier N^α-Aminofunktionen nachweisen lassen, so besteht die Möglichkeit, diese durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid oder N-Acetylimidazol für eine Fortsetzung

der Synthese in späteren Zyklen zu blockieren (Reaktionsschritt nicht dargestellt). Ein *Capping*-Schritt dieser Art erleichtert die Abtrennung solcher Rumpfsequenzen bei der Endproduktreinigung.

Trotz zahlreicher Optimierungsansätze für die chemische Peptidsynthese lassen sich Nebenreaktionen oder Schädigungen des Produkts nie vollständig ausschließen. Die Vielzahl der existierenden Strategien zeigt, daß es keine einheitliche Methode der Wahl gibt, sondern für jede Zielsequenz ein geeignetes Konzept entwickelt werden muß. Dies betrifft im wesentlichen die Auswahl der Trägermaterialien und Linkersysteme sowie der anzuwendenden Schutzgruppentaktik, die gleichermaßen über die Kupplungsqualität, die notwendigen Synthesebedingungen und einzusetzenden Reagenzien entscheiden. Im folgenden werden die wichtigsten Reaktionsmechanismen der Festphasensynthese vorgestellt, wobei der Schwerpunkt auf den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Materialien und Methoden liegt.

Aktivierungsmethoden

Da die Verknüpfung zwischen einer Carboxy- und einer Aminogruppe bei Raumtemperatur nicht spontan abläuft, müssen geeignete Aktivierungsmethoden eingesetzt werden, die die Ausbildung einer Amidbindung unter milden Reaktionsbedingungen ermöglichen. In der Praxis erfolgt dies an der Carboxyfunktion einer Aminosäure, über die dann nach dem in Abbildung 1.9 dargestellten Prinzip die Peptidbindung geknüpft wird.

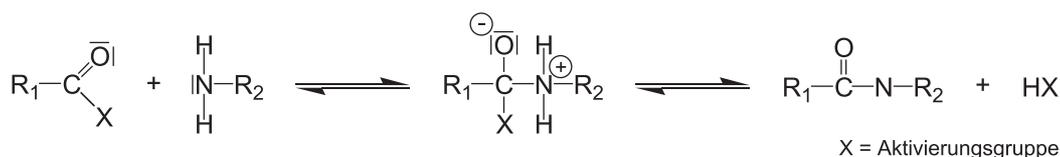


Abbildung 1.9: Knüpfung einer Peptidbindung durch Aktivierung der Carboxyfunktion

Durch Einführung eines elektronenziehenden Substituenten X wird die Elektronendichte am Carbonyl-C-Atom so stark herabgesetzt, daß ein nucleophiler Angriff der Aminokomponente möglich wird und eine intermediäre Verbindung entsteht. Der Übergangszustand zerfällt dann unter Dissoziation der X-Gruppe, wodurch die Verbindung zwischen der Carboxy- und der Aminogruppe in Form einer Amidbindung stabilisiert wird.

Da jede Peptidsynthese unterschiedliche Anforderungen an das Aktivierungsreagenz X stellt, konnte sich keine universell geeignete Methode etablieren. Bisher

wurden mehr als 150 verschiedene Varianten beschrieben, deren Vor- und Nachteile für jede spezielle Zielsetzung erneut bilanziert werden müssen. Von praktischer Bedeutung sind die klassischen Verfahren der Carbodiimid-, Azid-, Anhydrid- und Aktivester-Methode, deren detaillierte Beschreibung jedoch den Rahmen der vorliegenden Arbeit überschreiten würde.

Für eine Vielzahl von Peptidsynthesen wird heute mit Carbodiimiden gearbeitet. Um Nebenreaktionen wie Racemisierungen zu unterdrücken, werden dem Kupplungsansatz dabei häufig spezielle Additive wie das HOBt zugesetzt, die die hochreaktiven Zwischenprodukte in weniger problematische Aktivester überführen, die dann den eigentlichen Reaktionspartner für die Aminofunktionen darstellen. Unter diesen Umständen dient das Carbodiimid nur der Voraktivierung und ist selbst kein Bestandteil der entstehenden reaktiven Verbindung.

Die Phosphonium- oder Uroniumsalze des HOBt (BOP, PyBOP bzw. HBTU, TBTU) können auch als einzelnes Aktivierungsreagenz eingesetzt werden. Abbildung 1.10 gibt das Reaktionsschema der Carboxy-Aktivierung mittels TBTU wieder, nach dem auch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Peptidsynthesen erfolgten.

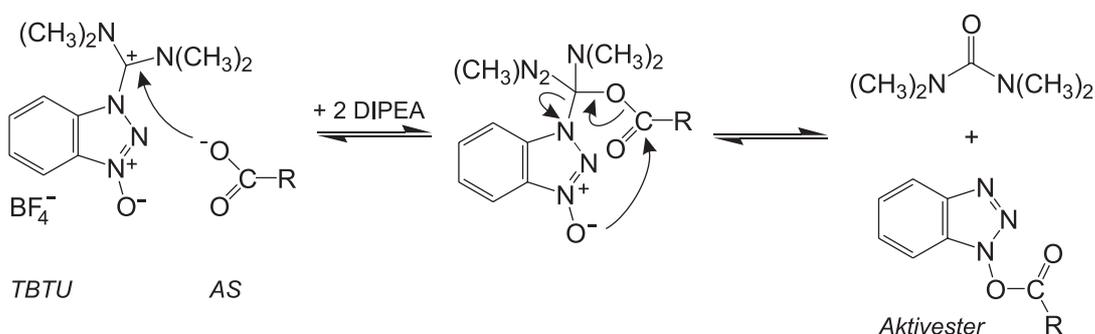


Abbildung 1.10: Carboxy-Aktivierung mittels TBTU

Für die Bildung des Aktivesters ist eine Deprotonierung der Carboxygruppe der Aminosäure notwendig. Aus diesem Grund setzt man das Kupplungsreagenz TBTU in Kombination mit zwei Äquivalenten einer tertiären Base (DIPEA) ein, was einen vollständigen Umsatz gewährleistet.

Schutzgruppenstrategien

Um in der Peptidsynthese ein einheitliches Endprodukt zu erhalten, müssen Mehrfachkupplungen und sonstige Nebenreaktionen ausgeschlossen werden. Dies kann mit einer Vielzahl verschiedener Schutzgruppenstrategien verhindert werden, die

durch gezielte Abschirmung und selektive Deblockierung nur bestimmte Verknüpfungsreaktionen zulassen.

Neben der N^α -Aminogruppe müssen auch die reaktiven Drittfunktionen in den Seitenketten der Aminosäuren spezifisch maskiert werden. Dazu werden Schutzgruppen eingesetzt, die sich unter den Spaltbedingungen zur Deblockierung der N^α -Aminofunktionen für die Kupplung der nächsten Aminosäure stabil verhalten. In der Festphasen-Peptidsynthese haben sich *Boc/Bzl*- und *Fmoc/tBu*-Schutzgruppenstrategien durchgesetzt.

In der *Boc/Bzl*-Schutzgruppentaktik werden die N^α -Aminofunktionen durch die säurelabile *tert.*-Butylcarbonylgruppe und die Seitenketten durch Maskierungsgruppen auf Benzylbasis blockiert. Letztere zeichnen sich durch eine wesentlich höhere Säurestabilität aus, so daß die Selektivität der Abspaltungsreaktionen durch eine abgestufte Acidolyse gewährleistet werden kann.

Bei der *Fmoc/tBu*-Taktik [FIELDS & NOBLE, 1989] handelt es sich um ein zweidimensionales orthogonales Schutzgruppenschema. Die Abspaltung der temporären und semipermanenten Schutzgruppen verläuft über vollständig unterschiedliche chemische Mechanismen. Die N^α -Blockierung erfolgt mit der basenlabilen Fluorenyl-9-methoxycarbonylgruppe (Fmoc-Gruppe), die sich durch die in Abbildung 1.11 dargestellte Reaktion mittels Piperidin eliminieren läßt.

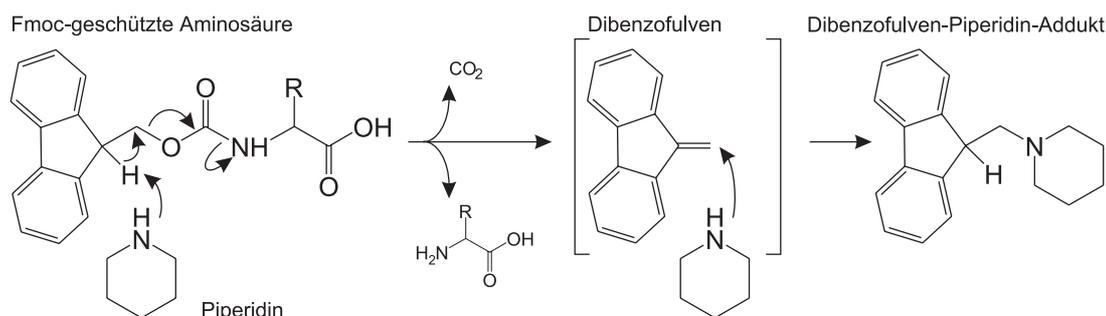


Abbildung 1.11: Schema der Fmoc-Deblockierung an einer N^α -Aminofunktion

Demgegenüber basiert der Seitenkettenschutz auf *tert.*-Butyl-Gruppierungen (*t*Bu), die am Ende der Synthese durch eine Acidolyse mit Trifluoressigsäure abgespalten werden. Das Gesamtkonzept der von ATHERTON und SHEPPARD beschriebenen orthogonalen *Fmoc/tBu*-Schutzgruppentaktik ist in Abbildung 1.12 am Beispiel der Festphasensynthese eines Tripeptids aus Aspartat, Glycin und Tyrosin wiedergegeben [ATHERTON, SHEPPARD; 1989, 261].

Nach der zweidimensionalen Strategie erfolgt die Ablösung des Peptids vom Syntheseharz unter den gleichen Bedingungen wie die Deblockierung der Seitenketten und wird demnach in einem einstufigen Reaktionsschritt durchgeführt. Demge-

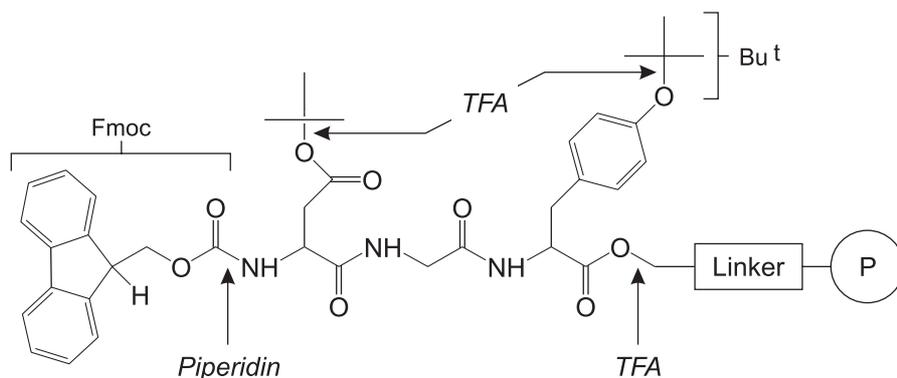


Abbildung 1.12: Konzept der orthogonalen *Fmoc*/^t*Bu*-Schutzgruppentaktik nach SHEPPARD

genüber sind auch orthogonale Schutzkonzepte nach dreidimensionalem Schema entwickelt worden, bei denen sowohl die Entfernung der temporären und semipermanenten Gruppen als auch die Abspaltung vom Trägermaterial nach unterschiedlichen Mechanismen verläuft [BARANY, MERRIFIELD; 1963, 257]. Auf diese Weise kann die Reihenfolge der Spaltungen beliebig ausgewählt und beispielsweise die Herstellung voll oder partiell geschützter Peptidketten realisiert werden.

Durch die Vielfalt der existierenden Schutzgruppen und Kupplungsmethoden läßt sich für nahezu jede Anwendung eine geeignete Synthesestrategie entwickeln, die durch optimale Modifikationen theoretisch auch sehr spezifische Zielsetzungen erlaubt.

Trägermaterialien und Linkersysteme

Ein Trägermaterial für die Festphasensynthese muß hohen Anforderungen gerecht werden. Es sollte chemisch inert, leicht filtrierbar und vollständig unlöslich in den verwendeten Lösungsmitteln wie beispielsweise DMF, DCM oder TFA sein. Häufig ergeben sich Probleme durch eine unzureichende mechanische Stabilität, geringe Beladungskapazitäten oder ein ungünstiges Quell- und Diffusionsverhalten, das insbesondere infolge von Aggregationserscheinungen bei längeren Peptidketten auftritt.

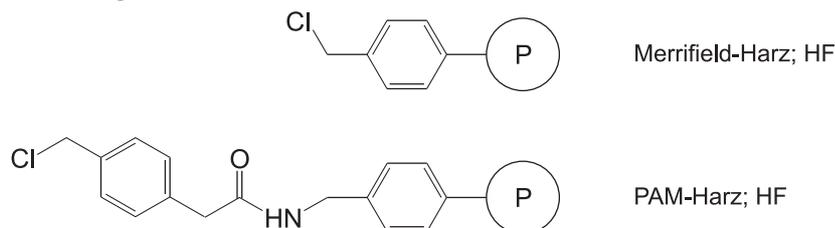
Für die Festphasensynthese haben sich vorwiegend Harze aus Polystyrol mit einem Divinylbenzolanteil (DVB) von 1-2 % etabliert. Sie quellen in den gängigen Lösungsmitteln auf das bis zu fünf- oder sechsfache ihres Trockenvolumens an und weisen eine gute Solvatisierung auf. Neben diesen mikroporösen Materialien, wurden auch makroporöse Matrices entwickelt, die aus stärker vernetzten Copolymerisaten bestehen und über eine starre Struktur mit großer innerer Oberfläche verfügen.

Neben den weitverbreiteten Trägern aus Polystyrol werden auch Harze aus anderen Basalmaterialien eingesetzt. Dazu gehören unter anderem hydrophilere Matrices, die von den gebräuchlichen Lösungsmitteln besser solvatisierbar sind und eine peptidähnlichere Polarität aufweisen, die viele Syntheseoperationen begünstigt. Zudem wurden einige Versuche mit biokompatiblen Materialien wie Cellulose, Chitin oder Agarose unternommen, die sich besonders gut für die Verwendung in biologischen Nachweis- und Bindungsstudien eignen.

Die wichtigste Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz eines Syntheseharzes ist die Verfügbarkeit einer tauglichen Ankergruppierung für die Anknüpfung der ersten Aminosäure. Um ein lösliches Endprodukt erhalten zu können, müssen diese Linker unter solchen Bedingungen spaltbar sein, die die Stabilität der Zielsequenz nicht beeinflussen. Abbildung 1.13 gibt eine Übersicht über einige ausgewählte Linkersysteme, die in der Festphasen-Peptidsynthese vorwiegend eingesetzt werden. Das klassische MERRIFIELD-Harz auf Polystyrol/DVB-Basis wurde durch Chlor-methylierung funktionalisiert. Heute arbeitet man in der *Boc*-Strategie jedoch häufig mit bifunktionellen Linkern, die einerseits die Verknüpfung mit einer unter milden Bedingungen abspaltbaren Schutzgruppe erlauben und andererseits die strukturellen Voraussetzungen für die Verankerung am Trägermaterial mit sich bringen. Ein Beispiel hierfür ist das Phenylacetamidomethylester-System (PAM).

In der *Fmoc*-Strategie hat sich vor allem das Wang-Harz durchgesetzt. Es besteht

Boc-Strategie:



Fmoc-Strategie:

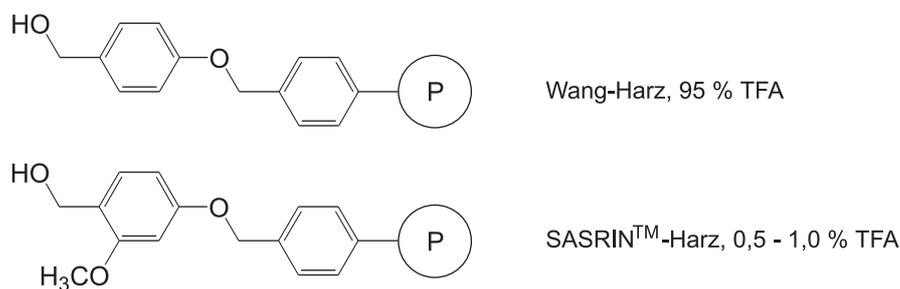


Abbildung 1.13: Auswahl einiger Linkersysteme für die Festphasen-Peptidsynthese

aus 1 % DVB-vernetztem Polystyren und ist mit *p*-Hydroxybenzyl-Linkern ausgestattet. Die Spaltung erfolgt mit 95 %iger TFA und wird in der Regel gleichzeitig mit der Entfernung der semipermanenten Schutzgruppen vorgenommen. Eine Alternative bietet unter anderem das SASRINTM-Harz, das durch eine zusätzliche *o*-Methoxygruppe bereits mit 0,5 bis 1,0 %iger TFA gespalten werden kann. Es bietet sich demnach für Anwendungen an, bei denen der Seitenkettenschutz der gelösten Peptidkette erhalten bleiben soll.

Neben den hier vorgestellten Linkersystemen, existieren noch zahlreiche weitere Ankergruppierungen, deren Spaltungsmechanismen teilweise auf völlig anderen Prinzipien beruhen. Hierzu gehören beispielsweise Strukturen, die sich acidolytisch stabil verhalten, jedoch in Anwesenheit von Basen oder auch durch Licht bestimmter Wellenlänge gespalten werden können.

Für spezifische Anwendungen in der Biologie oder Biotechnologie ist eine Ablösung vom Trägermaterial nicht notwendig oder sogar unzweckmäßig. In solchen Fällen greift man auf stabilere Ankerstrukturen zurück, die den kompletten Syntheseprozess unversehrt überstehen. Prinzipiell reicht hierfür eine einfache Aminofunktionalisierung der Harze für die Kupplung der ersten Aminosäure aus.

1.3.2.3 Erzeugung kombinatorischer Peptidbibliotheken

Für viele pharmakologische und biologische Forschungszwecke bedarf es einer großen Vielfalt heterogener Teststrukturen. Dazu zählen in erster Linie die sogenannten *High-Throughput-Screening*-Verfahren im Bereich der medizinischen Wirkstoffentwicklung sowie Testsysteme zur Strukturaufklärung oder Untersuchung molekularer Wechselwirkungen. Einen wichtigen Beitrag liefert die *kombinatorische Chemie*, durch die mit verhältnismäßig geringem Aufwand die parallele Herstellung zahlreicher unterschiedlicher Verbindungen ermöglicht wird [HOUGHTEN ET AL., 1991]. Durch spezielle Methoden der *multiplen* oder *parallelen Peptidsynthese* lassen sich sehr vielfältige Bibliotheken erstellen, die in ihrer Diversität und Zusammensetzung dem jeweiligen Verwendungszweck gezielt angepaßt werden können. In Kombination mit geeigneten biochemischen und biologischen Testverfahren bieten solche synthetischen *Peptidbibliotheken* eine wertvolle Alternative zur Beantwortung unterschiedlicher wissenschaftlicher Fragestellungen.

Die Herstellung von Peptidbibliotheken erfolgt grundlegend nach den Prinzipien der in Abschnitt 1.3.2.2 beschriebenen Festphasensynthese. Die Nutzbarkeit als Bioassays erfordert jedoch die Entwicklung spezieller Konzepte und apparativer Systeme. Für die separierte Synthese der Einzelstrukturen wurden zahlreiche

Verfahren etabliert, die sich im verwendeten Trägermaterial, in der Anzahl der generierbaren Strukturvarianten und in der Menge der erhaltenen Peptidprodukte voneinander unterscheiden. Beispiele sind die sogenannte *Teebeutel*-Methode und die parallele Peptidsynthese an Polyethylenstäbchen (*Pin*-Methode). Abbildung 1.14 gibt die prinzipiellen Vorgehensweisen wieder.

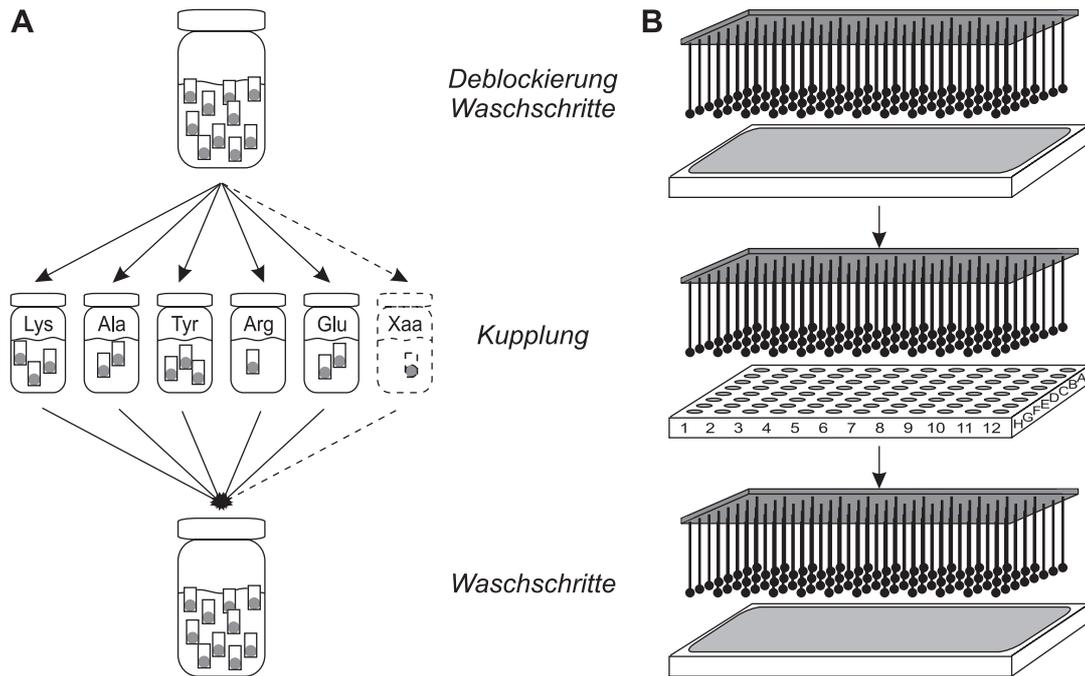


Abbildung 1.14: Peptidsynthese nach der *Teebeutel*- (A) und der *Pin*-Methode (B)

Bei der *Teebeutel*-Methode werden Einzelportionen herkömmlicher Syntheseharze in Polypropylnetze eingeschweißt und nach unterschiedlichen Schemata in den Kupplungslösungen reiner Aminosäuren inkubiert. Die Wasch- und Deblockierungsschritte können in einem gemeinsamen Ansatz erfolgen. Von Nachteil ist der relativ hohe Arbeitsaufwand, da beispielsweise das Sortieren der Beutel nur manuell durchgeführt werden kann. Demgegenüber läßt sich die Synthese nach der *Pin*-Methode unter Einsatz einer geeigneten Apparatur komplett automatisieren. Der Aufbau der Peptide erfolgt hier an einer starren Anordnung aminfunktionalisierter Polyethylenstäbchen, die in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte eingetaucht werden. Durch die systematische Befüllung der einzelnen Reaktionskammern mit unterschiedlichen Aminosäurelösungen, läßt sich an jedem Stäbchen ein beliebiges Peptid synthetisieren. Anschließend ermöglicht die gewählte Pinanordnung im Format konventioneller ELISA-Platten den direkten Einsatz in Bindungsstudien oder sonstigen Nachweisverfahren.

Eine Alternative zu den genannten Methoden bietet die *Spot-Synthese*. Als polymerer Träger wird hierbei gewöhnliches Cellulosepapier (Whatman540) verwendet, das sich durch eine besonders gute Kompatibilität mit biologischen Testverfahren auszeichnet. Durch eine spezielle Tüpfeltechnik kann auf einer einzelnen Membran eine Vielzahl von Peptidsequenzen unterschiedlicher Länge und beliebiger Aminosäuresequenz gleichzeitig und separiert voneinander synthetisiert werden. Die fertigen Papiere lassen sich dann ähnlich wie die geblotteten Membranen eines Westernblots behandeln und in Bindungsstudien einsetzen.

Abbildung 1.15 veranschaulicht die Prozessschritte der Spot-Synthese. Grundsätzlich wird zunächst eine Startaminosäure (häufig β -Alanin) C-terminal durch Ester-

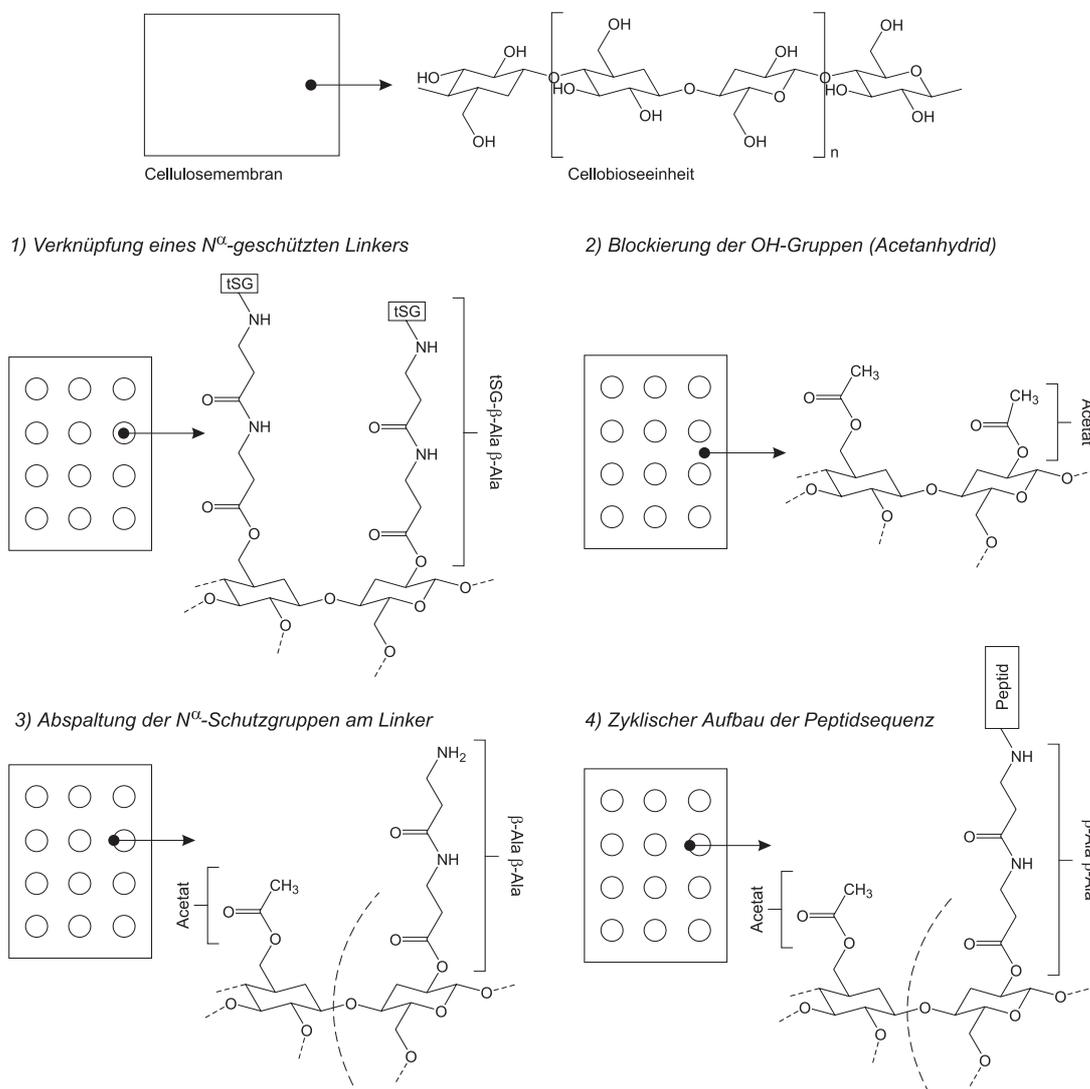


Abbildung 1.15: Prozessschritte der Spot-Synthese auf Cellulosemembranen

bindung mit den Hydroxygruppen der Cellulose an der Membran verankert (1). Dies geschieht in ortsgerichteten Tüpfelreaktionen, in denen kleine Aliquote des Kupplungsreagenz nur an definierten Stellen des Papiers aufgebracht werden, so daß ein Spot-Raster für die anschließende Synthese entsteht. Nach Blockierung der freien OH-Funktionen des Trägers (2) mit Acetanhydrid oder N-Ethyl-diisopropylamin und Abspaltung der Aminoschutzgruppen am Linker (3) beginnt der schrittweise Aufbau der gewünschten Peptide (4). Dabei arbeitet man in den für die Festphasensynthese gängigen Zyklen aus Aminosäurekupplungen, Deblockierungen und Waschschritten.

Die Kupplungslösungen werden punktuell entlang der Spot-Rasterung aufgetragen. Durch Einhaltung eines vordefinierten Pipettierschemas lassen sich somit in jedem Reaktionskreis individuelle Sequenzen synthetisieren. Alle anderen Arbeitsschritte erfolgen durch Eintauchen der kompletten Membranen in die entsprechenden Lösungsmittelbäder. Nach abschließender Abspaltung der Seitenschutzgruppen liegt eine fertige Peptidbibliothek vor, die in diversen Bindungsstudien eingesetzt werden kann und wegen ihrer guten Regenerierbarkeit mehrfach verwendbar ist (s. Tab. 2.2, S. 44). Unter Einsatz eines spaltbaren Linkers wäre zudem nach Ausstanzen der Einzelspots eine separate Ablösung der Peptide möglich.

Durch Miniaturisierung und Zuhilfenahme eines Pipettierroboters lassen sich mit der Spot-Synthese zahlreiche unterschiedliche Sequenzen auf kleinstem Raum und mit sehr geringem Materialaufwand herstellen. Durch die Weiterentwicklung der Trägermaterialien können mittlerweile bis zu 40.000 separierte Spots auf das Format einer handelsüblichen CD aus oberflächenmodifiziertem Polypropylen erzeugt werden. Für dieses Format ist zudem ein apparatives System entwickelt worden, mit dem auch Arbeitsschritte wie das Waschen und Deblockieren vollautomatisch durchführbar sind.

Trotz der Optimierungen der Spot-Synthese hinsichtlich des Raum- und Materialbedarfs bietet sich für bestimmte Anwendungen wie beispielsweise die unspezifische Suche eines bindenden Epitops statt der Herstellung genauestens definierter Einzelsequenzen häufig eher die Synthese von Aminosäuremischungen an. In der sogenannten X-Strategie werden neben den reinen Bausteinen auch Gemische (X) eingesetzt, so daß sich ein Spot aus der Gesamtheit der Strukturen einer Peptidfamilie zusammensetzt. Diese zeichnen sich dadurch aus, daß sie in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der X-Gemische neben den übereinstimmenden Bereichen auch variable Aminosäurebelegungen aufweisen. In der Simultansynthese werden dazu dann Raster zur Erzeugung der Teilbibliotheken angelegt.

Die X-Strategie wird in verschiedenen Formen eingesetzt. Für die Suche eines geeigneten Affinitätskandidaten ABCDEF aus einer Hexapeptidbibliothek, die auf Basis der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren schon eine Größe von $20^6 = 64$ Mio. Einzelsubstanzen aufweist, bietet sich ein zweipositionales Suchschema an (s. Abschnitt 2.1.1.1, S. 40 ff). Dabei synthetisiert man zunächst 400 Peptidfamilien mit der Sequenzcharakteristik XX12XX, wobei 1 und 2 definierte, für jeden Spot konstante Aminosäuren und X ein Gemisch der 20 natürlich vorkommenden ist. Die daraus resultierende aktivste Gruppe dient dann als Ausgangspunkt für die nächste Synthese mit der Belegung X1CD2X, in der C und D für alle Spots gleich sind und aus den zuvor ermittelten Aminosäuren bestehen. Nach einem letzten Selektionsschritt 1BCDE2 läßt sich der geeignetste Bindungspartner somit aus insgesamt nur 1.200 Spots ermitteln. Die Spot-Synthese bietet daher in Kombination mit einer X-Strategie eine schnelle Methode für die unspezifische Suche hochaffiner Bindungspartner, die sich dann beispielsweise als Inhibitoren oder chromatographische Affinitätsliganden einsetzen lassen.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Herstellung der Peptid-Affinitätsmatrix

Die Entwicklung einer Peptid-Affinitätsmatrix für den Einsatz in der Fließbetadsorption wurde exemplarisch anhand eines Modellproteins durchgeführt. Dabei handelte es sich um einen monoklonalen Antikörper (mAK), auf dessen Spezifikation und Herstellungsweise in Kapitel 2.2 näher eingegangen wird. Die Herstellung des Chromatographiematerials gliederte sich in die Suche nach einem geeigneten Peptidliganden und dessen Kupplung an die Basalmatrix. In den folgenden Abschnitten werden die dafür eingesetzten Methoden und Materialien vorgestellt.

2.1.1 Suche eines geeigneten Peptidliganden

Die Suche nach einem geeigneten Peptid-Affinitätsliganden für die chromatographische Aufreinigung des mAK erfolgte in dieser Arbeit durch Bindungsstudien mit Peptidbibliotheken. Dabei handelte es sich um gerasterte Teilbibliotheken, die durch Spot-Synthese auf Cellulosemembranen hergestellt wurden. Die theoretischen Grundlagen dieser Methode sind in Abschnitt 1.3.2.3 der Einleitung zusammengefasst.

Die Peptidbibliotheken wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Ronald Frank (AG Molekulare Erkennung, Gesellschaft für biotechnologische Forschung mbH, GBF, Braunschweig) mit einem speziell auf die Spot-Synthese Technik abgestimmten Peptidsynthese-Automaten hergestellt.

In den folgenden Abschnitten werden das kombinatorische Prinzip der verwendeten Peptidbibliotheken und die Arbeitsvorschrift für die dazugehörigen Bindungstests mit dem Zielmolekül vorgestellt.

2.1.1.1 Kombinatorik der Peptidbibliotheken

Die Auswahl eines potentiellen Affinitätsliganden für den mAk konzentrierte sich auf die Untersuchung von Hexapeptidbibliotheken. Unter Berücksichtigung der bestehenden 20 proteinogenen Aminosäuren gibt es demnach 64 Mio. Sequenzvarianten, die als Kandidaten getestet werden mußten. Um den Arbeits- und Materialaufwand zu minimieren, wurde jedoch eine spezielle Kombinatorik angewendet, mit der die Selektionierung der optimalen Bindungssequenz für den Antikörper durch die Synthese von lediglich 1.200 Peptidspots realisiert werden konnte.

Die Auswahl erfolgte in drei Selektionszyklen, die sich jeweils aus der Synthese von 400 Peptidspots und dem zugehörigen immunologisch/enzymatischen Bindungstest mit dem Zielprotein zusammensetzten. Die Kombinatorik basierte auf einem dualen Scanmodus, in dem der optimale Aufbau des potentiellen Peptidkandidaten ABCDEF sukzessive für jeweils zwei der sechs Sequenzpositionen ermittelt wurde. Abbildung 2.1 gibt das Selektionierungsschema wieder.

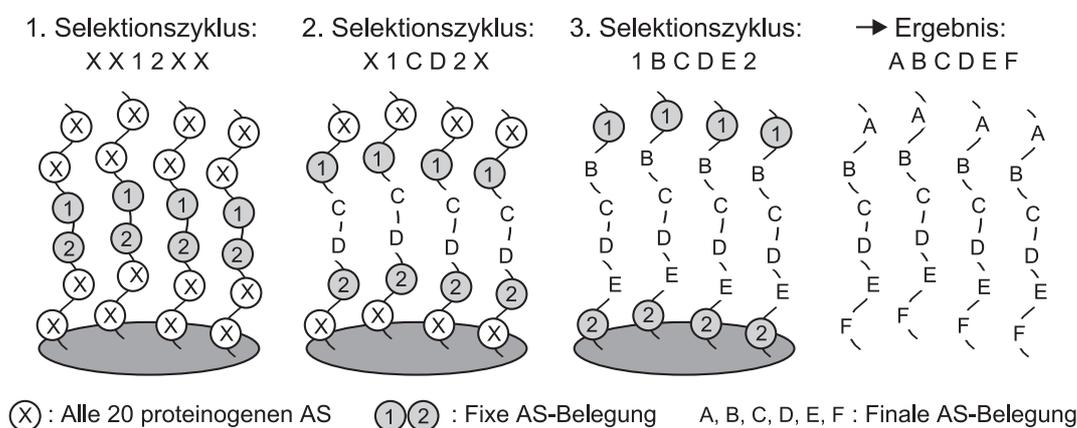


Abbildung 2.1: Kombinatorik der Spot-Synthese für die Bindungsstudien.

Im ersten Zyklus wurden Hexapeptide vom Typ XX12XX hergestellt, die nur in der dritten und vierten Position eine fixe Aminosäurebelegung aufwiesen. Dabei waren sämtliche Kombinationen der proteinogenen Aminosäuren durch jeweils einen Spot berücksichtigt ($20^2 = 400$). Die Verteilung im Spot-Raster ist aus Abbildung 2.2 ersichtlich. Für die X-Positionen wurde jeweils eine Mischung aller 20 Aminosäuren eingesetzt, so daß sich jeder Spot aus einer Peptidfamilie zusammensetzte, deren Gemeinsamkeit die Aminosäurekombination in den beiden mittleren Positionen war. Da die Synthese der X-Positionen bezüglich der eingesetzten Menge der einzelnen Aminosäuren auf die unterschiedlichen Kupplungseigenschaften abgestimmt war, enthielt die erste Membran somit alle 64 Mio. Hexapeptid-Varianten. Aus einem Bindungstest mit dem monoklonalen Antikörper wurde der Spot mit der

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1	AA	CC	DD	EE	FF	GG	HH	II	KK	LL	MM	NN	PP	QQ	RR	SS	TT	VV	WW	YY	CC	GG	QQ	RR	WW
2	AA	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AK	AL	AM	AN	AP	AQ	AR	AS	AT	AV	AW	AY	CA	CC	CD	CE	CF
3	CG	CH	CI	CK	CL	CM	CN	CP	CQ	CR	CS	CT	CV	CW	CY	DA	DC	DD	DE	DF	DG	DH	DI	DK	DL
4	DM	DN	DP	DQ	DR	DS	DT	DV	DW	DY	EA	EC	ED	EE	EF	EG	EH	EI	EK	EL	EM	EN	EP	EQ	ER
5	ES	ET	EV	EW	EY	FA	FC	FD	FE	FF	FG	FH	FI	FK	FL	FM	FN	FP	FQ	FR	FS	FT	FV	FW	FY
6	GA	GC	GD	GE	GF	GG	GH	GI	GK	GL	GM	GN	GP	GQ	GR	GS	GT	GV	GW	GY	HA	HC	HD	HE	HF
7	HG	HH	HI	HK	HL	HM	HN	HP	HQ	HR	HS	HT	HV	HW	HY	IA	IC	ID	IE	IF	IG	IH	II	IK	IL
8	IM	IN	IP	IQ	IR	IS	IT	IV	IW	IY	KA	KC	KD	KE	KF	KG	KH	KI	KK	KL	KM	KN	KP	KQ	KR
9	KS	KT	KV	KW	KY	LA	LC	LD	LE	LF	LG	LH	LI	LK	LL	LM	LN	LP	LQ	LR	LS	LT	LV	LW	LY
10	MA	MC	MD	ME	MF	MG	MH	MI	MK	ML	MM	MN	MP	MQ	MR	MS	MT	MV	MW	MY	NA	NC	ND	NE	NF
11	NG	NH	NI	NK	NL	NM	NN	NP	NQ	NR	NS	NT	NV	NW	NY	PA	PC	PD	PE	PF	PG	PH	PI	PK	PL
12	PM	PN	PP	PQ	PR	PS	PT	PV	PW	PY	QA	QC	QD	QE	QF	QG	QH	QI	QK	QL	QM	QN	QP	QQ	QR
13	QS	QT	QV	QW	QY	RA	RC	RD	RE	RF	RG	RH	RI	RK	RL	RM	RN	RP	RQ	RR	RS	RT	RV	RW	RY
14	SA	SC	SD	SE	SF	SG	SH	SI	SK	SL	SM	SN	SP	SQ	SR	SS	ST	SV	SW	SY	TA	TC	TD	TE	TF
15	TG	TH	TI	TK	TL	TM	TN	TP	TQ	TR	TS	TT	TV	TW	TY	VA	VC	VD	VE	VF	VG	VH	VI	VK	VL
16	VM	VN	VP	VQ	VR	VS	VT	VV	VW	VY	WA	WC	WD	WE	WF	WG	WH	WI	WK	WL	WM	WN	WP	WQ	WR
17	WS	WT	WV	WW	WY	YA	YC	YD	YE	YF	YG	YH	YI	YK	YL	YM	YN	YP	YQ	YR	YS	YT	YV	YW	YY

Abbildung 2.2: Belegungsschema der Aminosäurepositionen 1 und 2 bei der Spot-Synthese.

besten Wechselwirkung zum Zielprotein ermittelt. Die dazugehörige 1,2-Belegung diente dann als Ausgangsinformation für die Synthese der nächsten Membran. Sie wurde im zweiten Selektionszyklus für alle Spots übernommen und als fixer Bestandteil der endgültigen Sequenz des Affinitätsliganden festgelegt. Die Belegung der restlichen Positionen erfolgte nach der gleichen kombinatorischen Systematik wie auf der ersten Membran. Im Unterschied dazu wurden die spotspezifischen 1- und 2-Aminosäuren nun in der zweiten und fünften Position der Hexapeptide eingebaut, wodurch das Syntheschema X1CD2X entstand. Nach erneutem Bindungstest stand somit die beste Viererkombination zur Bindung des mAk fest. Im dritten Selektionszyklus wurden dann nur noch die flankierenden Aminosäuren des Peptidliganden ermittelt (1BCDE2) und die Suche nach der hochaffinen Sequenz ABCDEF für die Bindung des Antikörpers abgeschlossen.

2.1.1.2 Bindungstest

Für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den Peptiden einer Spot-Membran und einem Zielprotein bestehen verschiedene Detektionsmethoden. Der Bindungsnachweis kann einerseits direkt über das Protein erfolgen, das dazu radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wird.

Im indirekten Verfahren greift man dagegen auf immunologisch/enzymatische Testsysteme zurück, die in ELISA und Western Blots gebräuchlich sind. Um Fehlinterpretationen der Ergebnisse zu vermeiden, muß dabei jedoch zunächst eine Fremd-

bindung zwischen den eingesetzten Antikörpern und den Peptiden ausgeschlossen werden. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche stand ein indirektes Testsystem zur Verfügung, das diesen Anforderungen entsprach. Tabelle 2.1 gibt die Vorgehensweise und die Zusammensetzung der Reagenzien wieder. Die Menge der eingesetzten Lösungen wurde der Größe der Papiere (ca. 8 x 11 cm) angepaßt, so daß eine vollständige Bedeckung während der Inkubation stets gewährleistet war.

Im ersten Schritt des Bindungstests wurden die Membranen zur Minimierung der Fremdadorption mit einem Albumin- und Saccharose-reichen Blockingpuffer abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Zielprotein. Dazu wurde eine affinitätschromatographisch gereinigte (rProtein A; Amersham Pharmacia Biotech, Schweden) und aufkonzentrierte Lösung des monoklonalen Antikörpers eingesetzt. Es folgte die Konjugation mit einem Ziege-Anti-Maus Immunglobulin, das mit alkalischer Phosphatase gekuppelt war. Die Produktbindung konnte dann indirekt durch den Umsatz eines Substrats an dem Enzymkonjugat nachgewiesen werden.

Die Verwendung eines Chemilumineszenz-Substrats (Bio-Rad 170-5012) ermöglichte eine besonders sensitive Detektion. Bei Dephosphorylierung durch alkalische Phosphatase entsteht ein intermediäres, metastabiles Anion, das beim Zerfall Licht der Wellenlänge $\lambda = 466$ nm emittiert. Nach Belichtung und Entwicklung eines Röntgenfilms konnte die Intensität der Bindung zwischen dem Zielprotein und den Peptidspots somit anhand der unterschiedlichen Schwärzung des Films abgeschätzt werden.

Einen unempfindlicheren Nachweis als die Chemilumineszenz bot der Einsatz eines MTT/BCIP-Substrats. BCIP wird nach Dephosphorylierung oxidativ in einen blauen Indigofarbstoff überführt (vgl. Abb. 2.9, S. 73). Als Oxidationsmittel dient dabei MTT, das ebenfalls zu einem blauen Farbstoff abreagiert und somit die Anfärbung verstärkt. Beide Produkte sind wasserunlöslich, so daß sie am Ort ihrer Entstehung polymerisieren und einen Niederschlag bilden. Die vorhandenen Wechselwirkungen zwischen dem mAK und den Peptiden ließen sich somit an der resultierenden Blaufärbung der Spots ablesen. Die angefärbten Membranen wurden digitalisiert und mit einer EDV-gestützten Software densitometrisch analysiert. Dadurch konnte die Intensität der mAK-Bindung zur Erleichterung der Sequenzauswahl für die Ligandenausstattung quantifiziert werden.

Nach den Bindungsstudien wurden die Spot-Membranen durch die in Tabelle 2.2 beschriebene Prozedur regeneriert, so daß sie für weitere Tests eingesetzt werden konnten.

Tabelle 2.1: Arbeitsvorschrift für die mAk-Bindungstests mit den Spot-Membranen

Arbeitsschritte			
<i>1. Benetzung</i>	Membran mit EtOH anfeuchten		
<i>2. Waschen</i>	3 x mit 10 ml TBS waschen	je 10 min	Schüttler
<i>3. Blockierung</i>	Inkubation mit 10 ml Blockingpuffer	ü. N.	Schüttler
<i>4. Waschen</i>	1 x mit 10 ml T-TBS waschen	10 min	Schüttler
<i>5. mAk-Auftrag</i>	10 μ l mAk (10 mg/ml, affi.-gereinigt) ad 10 ml Blockingpuffer	120 min	Schüttler
<i>6. Waschen</i>	3 x mit 10 ml T-TBS waschen	je 10 min	Schüttler
<i>7. Konjugation</i>	20 μ l Ziege-Anti-Maus IgG, AP-konjugiert (0,6 mg/ml, Dianova 115-055-071) ad 10 ml Blockingpuffer	90 min	Schüttler
<i>8. Waschen</i>	2 x mit 10 ml T-TBS waschen	je 10 min	Schüttler
<i>9a. Chemilumineszenz</i>			
	<ul style="list-style-type: none"> • Membran abtropfen, mit Filterpapier abtupfen • 3 ml Chemilumineszenz-Substratlösung (Bio-Rad 170-5012) auf Membran verteilen • Transfer der Membran auf Glasplatte, in Frischhaltefolie einwickeln • Röntgenfilm auflegen (Dunkelkammer), 1-10 min Belichtung, Entwicklung • 2 x mit 10 ml PBS waschen, in PBS/0,05 % NaN₃ lagern oder weiter mit 9b. 		
<i>9b. MTT/BCIP</i>			
	<ul style="list-style-type: none"> • 2 x mit CBS waschen • 150 μl MTT/BCIP-Färbelösung ad 10 ml CBS, schwenken, Inkubation bis 30 min • 2 x mit 10 ml PBS waschen, in PBS/0,05 % NaN₃ lagern bis zur Regeneration 		
Lösungen			
TBS:	6,1 g Tris-Base (50 mM) 8,0 g NaCl 0,2 g KCl ad 1 Liter Milli-Q, pH 7,0	PBS:	0,96 g Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O 8,0 g NaCl 0,2 g KCl 0,24 g KH ₂ PO ₄ ad 1 Liter Milli-Q, pH 7,0
T-TBS:	TBS + 0,05 % Tween20		
CBS:	10,5 g C ₆ H ₈ O ₇ × H ₂ O (50 mM) 8,0 g NaCl 0,2 g KCl ad 1 Liter Milli-Q, pH 7,0	Blockingpuffer:	0,3 g BSA 0,5 g Saccharose (5 %) ad 10 ml T-TBS, pH 7,0
MTT/BCIP-Färbelösung:	50 μ l 1 M MgCl ₂ 2,4 mg BCIP in 40 μ l DMF 3,0 mg MTT in 60 μ l 70 % DMF/30 % H ₂ O		

Tabelle 2.2: Regeneration der Spot-Membranen

Arbeitsschritte			
• 2 x mit Wasser waschen	je 10 min	RT	Schüttler
• 1 x mit DMF waschen	10 min	RT	Schüttler
• 1 x mit DMF waschen	bis Farbe entfernt	RT	Ultraschallbad
• 1 x mit DMF waschen	10 min	RT	Schüttler
• 3 x mit Wasser waschen	je 10 min	RT	Schüttler
• 3 x mit Lösung A waschen	je 5 min	RT	Schüttler
	je 5 min	40°C	Ultraschallbad
• 3 x mit Lösung B waschen	je 10 min	RT	Schüttler
• 3 x mit EtOH waschen	je 10 min	RT	Schüttler
• Membran trocknen, bei -20°C lagern			
Lösungen			
Lösung A:	8 M Urea	Lösung B:	10 % Essigsäure
	1 % SDS		50 % EtOH
	0,5 % Mercaptoethanol		40 % H ₂ O
	pH 7,0 mit HAc		

2.1.2 Peptidkupplung an die Basalmatrix

Für die Fixierung der Peptidliganden an das Chromatographiematerial wurden verschiedene Kupplungsstrategien entwickelt, die die gleiche Sequenzausrichtung wie in der Spot-Synthese ermöglichten. Dazu waren spezielle Modifikationen der Basalmatrix und der eingesetzten Peptide notwendig, die in den folgenden Abschnitten vorgestellt werden. Die Entwicklung der Methoden erfolgte im Miniaturmaßstab mit 1 ml-Fertigsäulen. Für die Herstellung der Fließbettmatrix wurde dann das effizienteste Prozeßverfahren übernommen.

2.1.2.1 Die Basalmatrices

Die ersten chromatographischen Experimente im gepackten Modus wurden mit 1 ml-Fertigsäulen vom Typ HiTrapTM NHS-aktivierte SepharoseTM High Performance (Amersham Pharmacia Biotech, Schweden) durchgeführt. Für die geplanten Versuche im Fließbett stellte Amersham Pharmacia Biotech 100 ml des Prototypmaterials StreamlineTM-NHS zur Verfügung. Die beiden Gele unterschieden sich

Tabelle 2.3: Charakteristik der Basalmatrices

	HiTrap TM	EBA-Prototyp
<i>Gel Volumen</i>	1 ml	70 ml
<i>Säulendurchmesser</i>	0,7 cm	2,5 cm
<i>NHS-Substitution</i>	10 $\mu\text{mol/ml}$ Gel	34 $\mu\text{mol/ml}$ Gel
<i>Spacer</i>	Hexamer	Hexamer
<i>Partikelstruktur</i>	quervernetzte 4 %ige Agarose	quervernetzte 6 %ige Agarose
<i>Partikeldurchmesser</i>	34 μm	100 - 300 μm
<i>Druckstabilität</i>	$\leq 0,3$ MPa, 3 bar	k. A.
<i>pH Stabilität</i> ¹	3 - 12	k. A.

¹pH Stabilität in Abhängigkeit vom gekuppelten Liganden

in erster Linie in ihrem strukturellen Aufbau voneinander. Tabelle 2.3 stellt die charakteristischen Merkmale zusammen. Aus den mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 2.3 wird ersichtlich, daß die Partikel der Fließbettmatrix mit etwa 100 bis 300 μm wesentlich größer und heterogener sind als die des HiTrapTM-Materials

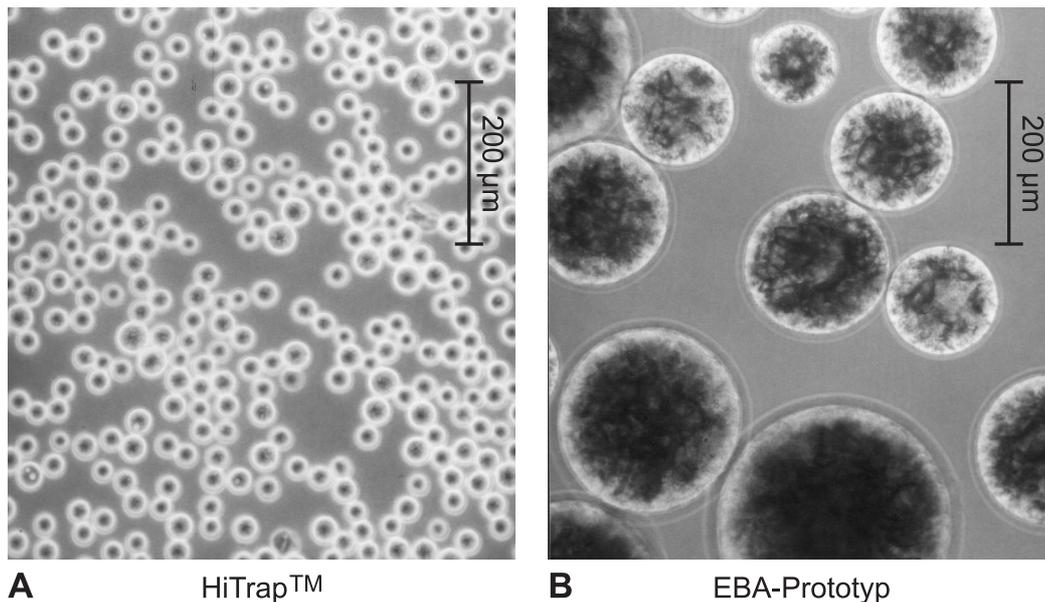


Abbildung 2.3: Mikroskopische Darstellung der Basalmatrices. A: HiTrapTM NHS-aktivierte Sepharose; B: NHS-aktivierter EBA-Prototyp; 100-fache Vergrößerung

(34 μm). Zudem sind sie durch die Einstreuung von Quarzkernen spezifisch beschwert, um den Auftrieb im expandierten Modus einzuschränken. Ein weiterer Unterschied besteht im Grad der Quervernetzung der Harze. Im Gegensatz zur SepharoseTM High Performance setzt sich der Prototyp aus 6 statt 4 %iger Agarose zusammen und hat somit eine geringere Porenweite, wodurch die Zugänglichkeit der Liganden erschwert wird. Um diesen Effekt auszugleichen, wurde das StreamlineTM-Material vom Hersteller mit einer größeren Anzahl von Kupplungs-liganden substituiert (34 respektive 10 μmol NHS/ml Gel).

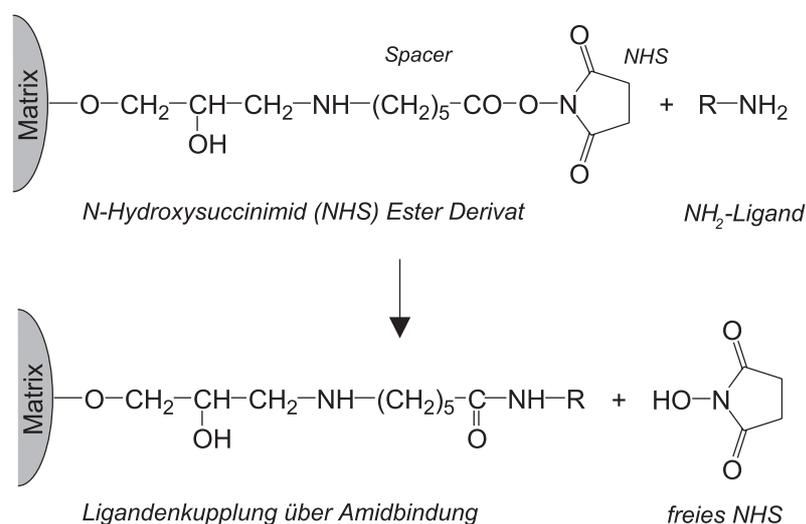


Abbildung 2.4: Ligandenkupplung an NHS-aktivierte Sepharose

Die Ligandenkupplung verläuft für beide Matrices über eine NHS-Aktivierung. Abbildung 2.4 veranschaulicht das Reaktionsschema. Durch Veresterung von epoxygekuppelter 6-Aminohexansäure (Spacer) mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) ist die Agarose mit Aktivistern ausgestattet, die im wässrigen Milieu bei pH 6 - 9 spontan und effizient mit Aminogruppen reagiert. Auf diese Weise lassen sich proteinogene Affinitätsliganden über ihren N-Terminus oder vorhandene Lysin- und Argininreste unter Formierung einer Amidbindung stabil an dem Material verankern. Um die NHS-Aktivierung bis zur Verwendung aufrecht zu erhalten, werden die Basalmatrices in 100 % Isopropanol geliefert.

Mit den HiTrapTM-Säulen wurden verschiedene Strategien zur Herstellung der Peptidmatrix entwickelt. Die Methoden und notwendigen Modifikationen der SepharoseTM werden in den folgenden Abschnitten beschrieben. Nach abschließender Beurteilung hinsichtlich Material- und Zeitaufwand, Stabilität sowie Effizienz der chromatographischen Aufarbeitung wurde der erfolgreichste Prozess für die Fertigung der Fließbettmatrix übernommen.

2.1.2.2 Direkte Kupplung des Peptidliganden an NHS-SepharoseTM

Um ein vorgefertigtes Peptid in gleicher Ausrichtung wie in der Spot-Synthese an der Matrix fixieren zu können, mußte eine speziell modifizierte Sequenz eingesetzt werden, die ausschließlich eine C-terminale Kupplung erlaubte. Dies wurde durch Einführung eines Lysinrests am C-Terminus und gleichzeitige Abschirmung aller weiteren NH₂-Funktionen durch Fmoc-Schutzgruppen realisiert. Die Verknüpfung erfolgte somit gezielt über die freie ϵ -Aminogruppe in der Seitenkette des Lysins. Auf die genaueren Überlegungen und Hintergründe, die zur Entwicklung der Kupplungsstrategie führten, wird an entsprechender Stelle im Ergebnisteil eingegangen. Eine Auflistung der einzelnen Arbeitsschritte und verwendeten Lösungen ist in Tabelle 2.4 zusammengestellt.

Die Herstellung des geschützten Hexapeptids erfolgte mit einem Syntheseautomaten und wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Norbert Sewald bewerkstelligt (Organische Chemie III, Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld). Nach Abreicherung von Fehlsequenzen durch semipräparative HPLC (Säule: VydacTM 218 TP 1022 Efficiency, Protein/Peptide C18, 2,2x25 cm, Phenomenex) und Lyophilisierung standen 6,5 mg (5,4 μ mol) der Sequenz für die Kupplung an eine HiTrapTM Säule zur Verfügung.

Das vorgefertigte Peptid wurde für die Kupplung in einem basischen Puffer gelöst und analog der Standardvorschrift des Herstellers an der NHS-aktivierten SepharoseTM fixiert [AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 2000]. Vor der abschließenden Absättigung freigebliebener Reaktionsstellen mit Ethanolamin erfolgte jedoch zunächst eine Behandlung mit Piperidin, in der die Fmoc-Schutzgruppen abgespalten und die vollständige Sequenz der Hexapeptide freigelegt wurden.

Das hier beschriebene Verfahren zur direkten Kupplung eines Peptids an die Chromatographiematrix diente neben der Verknüpfung des Fmoc(Fmoc)-geschützten Struktur noch zur Herstellung einer reversen Peptid-Affinitätsmatrix. Dabei sollte untersucht werden, ob die Ausrichtung des Liganden tatsächlich einen Einfluß auf die chromatographische Leistung hatte. Zu diesem Zweck wurde auf eine Modifikation des ursprünglichen Hexapeptidkandidaten verzichtet und für die Kupplung ein Lyophilisat der ungeschützten Originalsequenz eingesetzt. Durch den Verzicht auf das C-terminale Lysin ergab sich eine Aminosäurezusammensetzung, die nur am N-Terminus kupplungsfähige NH₂-Gruppen aufwies, so daß die Ligandenverknüpfung in genau umgekehrter Ausrichtung erfolgte.

Die Herstellung der reversen Peptid-Affinitätsmatrix fand mit Ausnahme des fünften Arbeitsschritts ebenfalls nach der in Tabelle 2.4 beschriebenen Vorschrift statt. Für die Kupplung wurden 6,1 mg (7,9 μ mol) der lyophilisierten Sequenz eingesetzt.

Tabelle 2.4: Arbeitsvorschrift für die Kupplung Fmoc-geschützter Peptidliganden

Arbeitsschritte
<ol style="list-style-type: none"> 1. Festphasensynthese des Fmoc(Fmoc)-geschützten Peptidliganden 2. Reinigung des Peptids mittels präparativer HPLC 3. Lyophilisierung des Peptids 4. Peptidkupplung <ul style="list-style-type: none"> • 1 ml NHS-HiTrapTM, beidseitiger Spritzenaufsatz • Spülen mit 6 ml 1 mM HCl, eiskalt • Beladung mit Kupplungsreagenz (6,5 mg Peptid in 2 ml Puffer A) • 60 min Inkubation, gelegentlich hin- und herspülen • Spülen mit 10 ml Puffer A 5. Fmoc-Abspaltung <ul style="list-style-type: none"> • Anschluß der Säule an P1-Pumpe (Amersham Pharmacia Biotech) • Spülen mit 20 ml Milli-Q, 0,5 ml/min • Spülen mit 20 ml DMF, 0,5 ml/min • 30 min Inkubation mit 20 % Piperidin in DMF, 0,5 ml/min • Spülen mit 20 ml DMF, 0,5 ml/min • Spülen mit 20 ml Milli-Q, 0,5 ml/min 6. Absättigung/Waschen der Matrix <ul style="list-style-type: none"> • Anschluß in ein SMARTTM System (Amersham Pharmacia Biotech) • Alternierendes Waschen mit Puffer C und D, je 3x6 ml, 0,4 ml/min • Spülen mit 10 ml Milli-Q, 1 ml/min • Lagerung in 20 % EtOH
Lösungen
Puffer A: 0,2 M NaHCO ₃ , 0,5 M NaCl, pH 8,3 Puffer B: 0,5 M Ethanolamin, 0,5 M NaCl, pH 8,3 Puffer C: 0,1 M Acetat, 0,5 M NaCl, pH 4,0

2.1.2.3 Kupplung aktivierter Peptidliganden an NHS-SepharoseTM

Mit der zweiten Herstellungsmethode wurde der Ligand über eine Thiol-Disulfid Austauschreaktion an das HiTrapTM-Material gekuppelt. Voraussetzung dafür war die Einführung von Thiofunktionen an der NHS-aktivierten SepharoseTM und am Peptid. Letzteres wurde durch den Austausch der letzten Aminosäure am C-Terminus gegen ein Cystein realisiert, wodurch später eine gerichtete Kupplung an die Basalmatrix gewährleistet war.

Nach der Synthese und HPLC-Reinigung erfolgte eine chemische Aktivierung des Peptids durch Verknüpfung des Cysteinrests mit einer Thiopyridylgruppe. Die Arbeitsschritte bis zur Lyophilisierung der aktivierten Sequenz wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Norbert Sewald durchgeführt. Für die Herstellung der Affinitätsmatrix standen etwa 15 mg (13 μ mol) des modifizierten Liganden zur Verfügung.

Die Kupplung des Peptids an die NHS-aktivierte SepharoseTM gliederte sich in die Einführung von Thiofunktionen an das Chromatographiematerial, die Bindung des Liganden und die Absättigung der Matrix. Die Durchführung erfolgte mit einem SMARTTM-System (Amersham Pharmacia Biotech). Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Tabelle 2.5 dargestellt.

Tabelle 2.5: Kupplung aktivierter Peptidliganden an modifizierte NHS-SepharoseTM

1. Cystamin-Kupplung an NHS-aktivierte SepharoseTM

0,1 M Cystamin in 0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,5: 25 μ l/min, 19 ml, ü. N.

2. Reduktion des Cystamins

0,1 M DTE in Milli-Q: 150 μ l/min, 19 ml, ca. 2 h

3. Kupplung des aktivierten Peptidliganden

ca. 15 mg aktiviertes Peptid in 2 ml MeOH lösen, ad 4 ml 10 mM Na-Citrat, pH 3,0:
15 μ l/min, 3,5 ml, ca. 4 h (vorher/nachher Spülen mit je 5 ml 10 mM Na-Citrat, pH 3,0)

4. Absättigung freier Thiole

20 mM PDEA in 50 mM Na-Acetat, 1 M NaCl, pH 4,3: 15 μ l/min, 3,5 ml, ca. 4 h
(vorher/nachher Spülen mit je 5 ml 50 mM Na-Acetat, 1 M NaCl, pH 4,3)

5. Waschen mit alternierendem pH

0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3 und 2 % Essigsäure, pH 2,7: 500 μ l/min, je 2 \times 5 ml

Die Funktionalisierung der Basalmatrix fand mit Cystamin statt, das nach der Kupplung mit DTE (Dithioerythrit) reduziert wurde. Die freigewordenen Sulfhydrylgruppen fungierten dann als Fixierungspunkte für das Thiopyridyl-aktivierte Peptid, das sich unter Ausbildung einer Disulfidbindung über seinen Cysteinrest an der modifizierten NHS-SepharoseTM anlagerte. Im Anschluß wurden die überschüssigen SH-Gruppen mit der Thiol-reaktiven Substanz PDEA abgesättigt. Nach Auswaschung ungebundener Komponenten stand dann eine gebrauchsfertige Peptid-Affinitätsmatrix zur Verfügung, die in chromatographischen Studien eingesetzt werden konnte.

Im Unterschied zu den anderen Herstellungsverfahren basierte die Kupplung in diesem Fall statt auf einer Amid- auf einer Disulfidbindung. Somit war das Material im Hinblick auf Redoxprozesse nur als bedingt stabil einzustufen.

2.1.2.4 Direkte Synthese der Peptidliganden an NHS-SepharoseTM

Im dritten Herstellungsverfahren für die Affinitätsmatrix wurde der Peptidligand nach dem Prinzip der MERRIFIELD'schen Festphasensynthese direkt an das Chromatographiematerial synthetisiert. Eine detaillierte Zusammenfassung des Prozesses ist in Tabelle 2.6 wiedergegeben.

Vor dem sukzessiven Peptidaufbau wurde die NHS-SepharoseTM durch die Kupplung von 1,3-Diaminopropan mit Aminofunktionen ausgestattet, die dann als Startpunkte für die Synthese fungierten. Die Synthese erfolgte nach Fmoc/^tBu-Strategie, in der die N^α-Funktionen durch eine Fmoc-Gruppe und die Seitenketten trifunktioneller Aminosäuren durch säurelabile Gruppen auf *tert.*-Butylbasis geschützt wurden. Die Kettenverlängerung verlief in Reaktionszyklen, die sich aus der Kupplung der einzelnen Aminosäuren und ihrer anschließenden Deblockierung zusammensetzten.

Als Kupplungsreagenzien wurden TBTU und DIPEA eingesetzt. Die selektive Fmoc-Abspaltung am N^α erfolgte mit 20 % Piperidin in DMF. Auf eine Absättigung nicht-reagierender Aminofunktionen durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid und ein abschließendes *Endcapping* wurde verzichtet. Nach acidolytischer Abspaltung der Seitenschutzgruppen mit 95 % Trifluoressigsäure stand eine gebrauchsfertige Affinitätsmatrix für den Einsatz in der Chromatographie zur Verfügung.

Die Methode der direkten Peptidsynthese wurde für zwei HiTrapTM-Säulen und die fließbettchromatographische Prototypmatrix angewendet. Die Aminosäure-Kupplungen an das HiTrapTM-Material erfolgten durch beidseitige Spritzenaufsätze, mit denen das Reagenz während der 1- bis 2-stündigen Inkubation gelegentlich hin- und hergesogen werden konnte. Für alle anderen Vorgänge wurde die Säule an eine P1-Pumpe (Amersham Pharmacia Biotech) angeschlossen.

Bei der Herstellung der großvolumigeren Prototypmatrix erfolgten die Kupplungsschritte sowie die finale Abspaltung der Seitenschutzgruppen in einem 1 L-Glas Kolben. Eine homogene Inkubation konnte dabei durch die Einspannung in einen Überkopfschüttler realisiert werden. Für die Fmoc-Deblockierungen und sonstigen Waschoperationen wurde das Material in ein Glasrohr (d = 4 cm) überführt, das an einem Ende zur Rückhaltung des Gels mit einer Glasfritte abgeschlossen war. Der Anschluß an eine Peristaltikpumpe (Watson Marlow 501 U) ermöglichte einen kontrollierten Volumenstrom. In beiden Versuchsaufbauten wurden die Pumpen gesteuerten Prozesse über einen integrierten UV-Monitor verfolgt, wodurch sich

Tabelle 2.6: Peptidsynthese an modifizierte NHS-SepharoseTM

I) Einführung von Aminofunktionen		
⇒	5 % 1,3-Diaminopropan in Milli-Q, pH 8,3 mit HAc	
⇒	10 ml langsam auftragen	3 h Inkubation 4 °C
⇒	10 ml langsam auftragen	ü. N. Inkubation 4 °C
⇒	Spülen mit Milli-Q	ca. 30 SV 150 cm/h
II) Peptidsynthese		
IIa) Aminosäure-Kupplung		
⇒	0,3 M Fmoc-AS-Derivat, 0,3 M TBTU, 0,6 M DIPEA in DMF	2 SV 1-2 h
⇒	Spülen mit DMF	ca. 15 SV 150 cm/h
IIb) Fmoc-Abspaltung		
⇒	20 % Piperidin in DMF	ca. 10 SV 150 cm/h
⇒	Spülen mit DMF	ca. 15 SV 150 cm/h
III) Capping freier Aminofunktionen		
⇒	5 % Acetanhydrid, 1 % DIPEA in DMF	ca. 15 SV 75 cm/h
⇒	Spülen mit DMF	ca. 15 SV 150 cm/h
IV) Abspaltung der Seitenschutzgruppen		
⇒	Spülen mit DCM	ca. 10 SV 150 cm/h
⇒	Trocknen des Gels mit Druckluft	
⇒	95 % TFA, 2,5 % H ₂ O, 2,5 % Triisobutylsilan	2 SV 3 h
⇒	Spülen mit Essigsäure p. a.	ca. 15 SV 150 cm/h
⇒	Spülen mit 50 % Essigsäure	ca. 15 SV 150 cm/h
⇒	Spülen mit Milli-Q	ca. 15 SV 150 cm/h
Quantitative Bestimmung der Aminofunktionen		
⇒	10 mg/ml Bromphenolblau in DMF	ca. 10 SV 1 ml/min
⇒	Spülen mit EtOH	ca. 25 SV 0,05 ml/min
⇒	Eluieren mit 1 % DIPEA in DMF	ca. 10 SV 1 ml/min
⇒	Spülen mit DMF	ca. 30 SV 1 ml/min
⇒	Photometrische Quantifizierung des BPB im Eluat bei 602 nm ($\epsilon = 106590$)	

die Dauer der Deblockierungs- und Waschprozesse genau anpassen und der Lösungsmittelverbrauch minimieren ließ.

Zur Kontrolle der Peptidsynthese wurde jeweils vor und nach der Fmoc-Deblockierung eine quantitative Bestimmung der freien Aminofunktionen mit Bromphenolblau (BPB) durchgeführt. Der Farbstoff bindet equimolar an NH_2 -Gruppen und kann nach der Elution mit 1 % DIPEA in DMF (Blindwert) photometrisch bei $\lambda = 602 \text{ nm}$ aus dem Lambert-Beerschen Gesetz (Gl. 2.1) nach Umwandlung und Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (V_{ges}/V_P) aus Gleichung 2.2 bestimmt werden. Alternativ läßt sich die Menge der gekuppelten Aminosäuren auch durch die Quantifizierung der abgespaltenen Fmoc-Gruppen in der Piperidin-Fraktion abschätzen. Die Analyse erfolgt photometrisch bei $\lambda = 290 \text{ nm}$ und wird ebenfalls nach Gleichung 2.2 ausgewertet. Als Blindwert wird eine frische Lösung von 20 % Piperidin in DMF eingesetzt.

$$E = c \cdot \epsilon \cdot d \quad (2.1)$$

$$c = \frac{E}{\epsilon \cdot d} \cdot \frac{V_{ges}}{V_P} \quad (2.2)$$

mit:	E	Extinktion	[-]
	c	Konzentration des Absorbens	[mol·L ⁻¹]
	ϵ	molarer Extinktionskoeffizient	[L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]
	ϵ_{BPB}	bei $\lambda = 602 \text{ nm}$	106590 L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹
	ϵ_{Fmoc}	bei $\lambda = 290 \text{ nm}$	4950 L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹
	d	Schichtdicke der Küvette (1 cm)	[cm]
	V_{ges}	Volumen des Meßansatzes	[ml]
	V_P	Volumen der Probe	[ml]

2.2 Produktgewinnung

In den folgenden Abschnitten wird das Modellprotein, für das die Peptid-Affinitätsmatrix entwickelt wurde, und dessen zellkulturtechnischer Herstellungsprozeß vorgestellt. Obwohl die Zellkultivierung in dieser Arbeit nur eine untergeordnete Rolle spielt, sind gewisse Informationen über die Beschaffenheit der Ausgangssuspensionen für die Aufarbeitung in der Fließbettchromatographie und die Untersuchung von Biomasse/Matrix-Interaktionen von großer Bedeutung. Hierzu gehört im wesentlichen die Kenntnis über die Dichte und den Viabilitätszustand der Biomasse,

die durch die Prozeßführung und die Eigenschaften des gewählten Bioreaktors beeinflusst werden, sowie das für alle Aufreinigungsverfahren notwendige Wissen über die Zusammensetzung des Kulturmediums in Bezug auf die Anwesenheit und Menge von Fremdproteinen oder sonstiger Substanzen, die für die Isolierung des Produkts abgereichert werden müssen.

2.2.1 Produkt, Zelllinie und Kulturmedium

Bei der Suche nach einem Modellprotein für die Entwicklung der Peptid-Affinitätsmatrix fiel die Wahl auf einen monoklonalen Antikörper vom Typ IgG₁, der gegen den Blutgerinnungsfaktor VIII gerichtet ist. Zur Unterscheidung von anderen Antikörpern wird er in dieser Arbeit auch als Anti-FVIII bezeichnet. Das Immunglobulin wurde im Rahmen einer Industriekooperation aus der Kultivierung eines Maus/Maus-Hybridoms gewonnen, zu dessen Herkunft aus Gründen der Vertraulichkeit keine weiteren Angaben gemacht werden können.

Zum Kultivierungsbeginn wurden die in Kryoröhrchen über flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagerten Zellen nach Standardmethoden aufgetaut [LINDL, 2000]. Das Kulturmedium basierte auf einer 1:1 Mischung der kommerziell erhältlichen Trockensubstratmischungen *DMEM* (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) und Ham's F12 (Gibco BRL, Eggenstein). Diese Mediumgrundlage enthält Aminosäuren, Vitamine, Glucose und Nukleotidvorstufen sowie einen Phenolrot-Zusatz, der eine optische Kontrolle des pH-Werts ermöglicht.

Die Kultivierung erfolgte unter serumfreien Bedingungen [BÜNTEMEYER ET AL., 1991; JÄGER ET AL., 1988]. Ergänzt wurden jedoch einige essentielle Aminosäuren, die Proteinsupplemente Rinderinsulin (BI, 10 mg/L), Humantransferrin (HT, 10 mg/L) und humanes Serumalbumin (HSA, 500 mg/L) sowie geringe Mengen an Ethanolamin (100 µmol/L). Die pulverförmigen Mediumbestandteile wurden in Reinstwasser (Milli-Q, Millipore) gelöst und sterilfiltriert.

2.2.2 Kultivierungssystem und Prozeßführung

Für die Kultivierung wurden die Hybridomzellen schrittweise aus Gewebekulturflaschen (Nunc) mit Arbeitsvolumina von 10 bis 90 ml in einen SuperSpinner (Braun Biotech International, Melsungen) überführt. Der SuperSpinner ist ein Kultivierungssystem, das mit keiner eigenen Regeleinheit ausgestattet ist [LEHMANN ET AL., 1992; HEIDEMANN ET AL., 1994]. Er besteht aus einer 1-Liter-Duranflasche mit drei verschließbaren Eingängen. Die seitlichen dienen dem Medienwechsel und der Ernte, während durch die zentrale Öffnung die Begasungsschläuche eingeleitet werden. Der mittlere Schraubverschluß ist mit einer Aufhängung für einen Taumelrührer

ausgestattet. Zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen wird die Luft über einen Sterilfilter eingeleitet und das Abgas durch eine Waschflasche mit 0,2 M Natrionlauge aus dem Fermenter entlassen.

Der SuperSpinner wird zur Temperierung in einem Brutschrank bei 37 °C betrieben und über eine Membranpumpe mit wasserdampfgesättigter und 5 % CO₂-konditionierter Luft versorgt. Der Gastransfer verläuft über eine zwei Meter lange, hydrophobe Polypropylen-Hohlfasermembran (Accurel; Enka, Wuppertal), die um die Rührvorrichtung gewickelt wird [LEHMANN ET AL., 1987]. Das blasenfreie Begasungssystem gewährleistet eine hohe Integrität der scherempfindlichen Zellen [ABU-REESCH & KARGI, 1989; NEEDHAM ET AL., 1991] und kann durch den Betrieb auf einem Magnetrührer gleichzeitig zur schonenden Homogenisierung der Kultur genutzt werden.

Sämtliche Kultivierungen wurden im wiederholten satzweisen Betrieb durchgeführt [MUTTZALL, 1993]. Bei dieser Art der Prozeßführung handelt es sich um ein abgeschlossenes System, in das nach Inokulation und Auffüllen des Fermenters mit Medium nicht weiter eingegriffen wird. Nach einer kurzen Adaptationszeit (lag-Phase) vermehren sich die Zellen mit exponentieller Wachstumsgeschwindigkeit (log-Phase), bis das Nährstoffangebot verbraucht ist. Um das Absterben der Kultur zu verhindern, wird der Reaktor zu diesem Zeitpunkt auf etwa 10 % des Volumens abgeerntet und mit frischer Nährlösung aufgefüllt. Auf diese Weise stand in Intervallen von ca. drei Tagen eine definierte Menge produkthaltiger Zellsuspension zur Verfügung, die für die chromatographische Aufarbeitung mit den Peptid-Affinitätsmatrices eingesetzt werden konnte. Im wiederholten satzweisen Betrieb wurden mit dem SuperSpinner Zelldichten von bis zu $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml erreicht. Zum Zeitpunkt der Ernte lag der Produkttiter zwischen 20 und 80 mg/L.

2.3 Chromatographie

Die chromatographischen Experimente stehen im Vordergrund der vorliegenden Arbeit. Im folgenden werden die benutzten Systeme sowie die Prozeßführung für die Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers und die Regeneration der Säulen vorgestellt. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Charakterisierung der Matrices hinsichtlich der Bindungskapazität, der Flüssigphasendispersion und des Expansionsverhaltens des fließbettchromatographischen Prototypmaterials.

2.3.1 Chromatographieanlagen

Für die Durchführung der chromatographischen Experimente standen zwei verschiedene Anlagen zur Verfügung (Amersham Pharmacia Biotech). Die ersten Bindungs- und Charakterisierungsstudien fanden mit einem SMARTTM System statt. Für den anschließenden Fließbettprozeß wurde ein GradiFracTM System mit einer StreamlineTM25 Säule verwendet.

2.3.1.1 Das SMARTTM System

Das SMARTTM System der Firma Amersham Pharmacia Biotech ist ein vollintegriertes, mikropräparatives HPLC-System (*High Performance Liquid Chromatography*), das für die Analyse und Aufarbeitung biologischen Materials im Nanogramm bis Mikrogramm Maßstab konzipiert ist.

Es ist mit zwei 20 ml Präzisionskolbenpumpen ausgestattet, die pulsfrei arbeiten und bei einer Fließgeschwindigkeit zwischen 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 2 ml/min mit hoher Genauigkeit reproduzierbare Gradienten formieren. Die Proben werden über Injektionsschleifen appliziert. Durch den Einsatz spezieller, miniaturisierter Säulen können extrem geringe Produktmengen aufgetrennt und mit Hilfe eines empfindlichen Detektors ($\mu\text{Peak Monitor}$) bis in den ng-Bereich nachgewiesen werden. Die integrierte Separationseinheit ermöglicht die getrennte Sammlung von bis zu 5 μl kleinen Fraktionen. Das System wird über eine PC-gestützte Software (SMARTTM Manager) angesteuert und kontrolliert. Es lassen sich beliebige Methoden programmieren und die Ergebnisse in Form von Chromatogrammen mit allen notwendigen Daten aufzeichnen und archivieren.

Das SMARTTM System wurde aufgrund seiner Maßstabsauslegung, der hohen Präzision und des geringen Totvolumens für die Experimente mit den 1 ml Festbettaulen eingesetzt. Der Einbau erfolgte über einen speziellen Säulenadapter, der zum Lieferumfang der Chromatographieanlage gehört. Für großvolumigere Proben wurde statt der Injektionsschleifen ein 50 ml-Superloop (Amersham Pharmacia Biotech) angeschlossen. Alternativ dazu ließ sich die Beladung auch über die Systempumpen durchführen.

Neben den Versuchen zur Aufarbeitung und Charakterisierung der Peptid-Affinitätsmatrices wurde das SMARTTM System auch für analytische Zwecke genutzt. Dabei handelte es sich in erster Linie um die analytische Auftrennung der Chromatographiefraktionen aus der Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers. Zum Einsatz kam dafür eine systemkompatible Gelfiltrationssäule. Nähere Angaben zur Vorgehensweise werden in Abschnitt 2.4.2 auf Seite 69 gemacht.

2.3.1.2 Das GradiFracTM System mit StreamlineTM 25 Säule

Das GradiFracTM System ist auf die Verarbeitung zellhaltiger Suspensionen in der Fließbettadsorption ausgelegt. Im Gegensatz zu herkömmlichen *FPLC*-Anlagen (*Fast Performance Liquid Chromatography*) läßt sich nicht jede Funktion automatisch steuern, so daß beispielsweise die Strömungsrichtung über manuelle Ventile eingestellt werden muß.

Das System war mit einer StreamlineTM 25 Säule ($l = 1\text{ m}$, $d = 25\text{ mm}$) ausgestattet, die mit 70 ml der Prototypmatrix befüllt wurde. Die resultierende Höhe des sedimentierten Gelbetts betrug etwa 14,3 cm. Die Säulen vom Fabrikationstyp StreamlineTM sind alle aus einem 100 cm langen Glasrohr oder Edelstahlmantel gebaut. Eine Maßstabvergrößerung erfolgt lediglich über den Durchmesser. Die Säulenhöhe läßt sich mit einem hydraulisch verstellbaren Adapter regulieren, so daß sie in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit der jeweiligen Gelexpansion angepaßt werden kann. Zur Optimierung der Anströmverhältnisse sind die Säulen an beiden Enden mit einer radial gelochten Verteilerplatte ausgestattet. Aufgesteckte Netze aus einem feinporigen Drahtgitter verhindern die Ausschwemmung der Matrix und unterstützen zusätzlich den gleichmäßigen Fluß.

Abbildung 2.5 gibt den schematischen Aufbau des GradiFracTM-Systems wieder. Die Ventilstellungen sind entsprechend der Verhältnisse bei der Expansion des

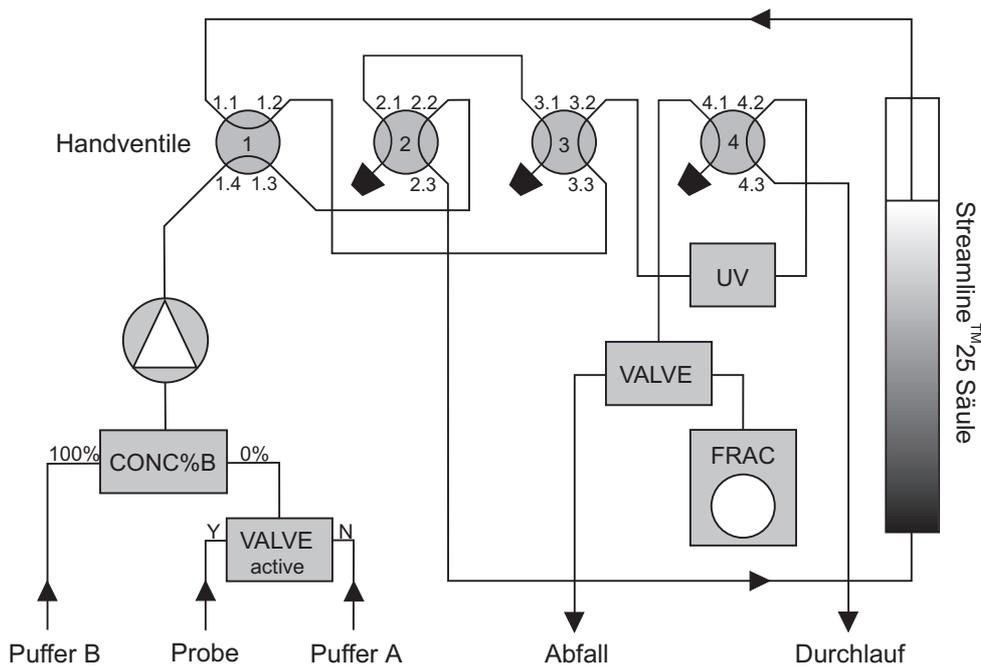


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des GradiFracTM Systems

Gelbetts eingezeichnet. Der Fluß wurde von einer P50-Kolbenpumpe (Amersham Pharmacia Biotech) mit einem Volumenstrom von bis zu 50 ml/min angetrieben. Über die vorgeschalteten 2-Wege-Ventile (Solenoid, PSV-100) *CONC%B* und *VALVE active* ließ sich während der Chromatographieläufe der Wechsel zwischen den Puffern und der Probe steuern. Die Handventile 1 bis 3 dienten der manuellen Einstellung der Flußrichtung. Außerdem ermöglichten sie den Betrieb im Bypass, wodurch die Säule zur Befüllung der Schläuche oder Systemspülung nicht ausgebaut zu werden brauchte. Über Ventil 4 wurde die mobile Phase aus der Anlage entlassen oder alternativ auf einen programmierbaren Fraktionsammler geleitet. Der Chromatographieverlauf konnte über einen integrierten UV-Monitor (UV-1, Amersham Pharmacia Biotech) verfolgt und kontrolliert werden. Für die Dokumentation zeichnete ein angeschlossener Schreiber das Signal bei $\lambda = 280$ nm kontinuierlich auf.

Während der Applikation wurde die Zellsuspension mit einem Magnetrührer homogen gehalten. Die Rührvorrichtung hing frei im Vorlagegefäß und gewährleistete eine reibungsarme Durchmischung. Die Öffnung des Ansaugschlauchs für die Probe war mit dem Rührer kombiniert. Der Eintritt verlief über ein aufgespanntes Stück eines Nylonstrumpfs (Porengröße ca. 0,2 mm), wodurch größere Zellaggregate zurückgehalten bzw. zerkleinert wurden, und sich die Gefahr einer Verblockung der Anlage verringern ließ.

2.3.2 Prozeßführung in der Chromatographie

Die chromatographische Aufarbeitung des monoklonalen Antikörpers Anti-FVIII gliederte sich in die klassischen Schritte der Equilibrierung, des Probenauftrags, der Auswaschung ungebundener Komponenten und der Elution des Produkts. Abschließend erfolgte eine Regeneration der Matrix, die in Abschnitt 2.3.2.3 näher beschrieben wird.

Sämtliche Chromatographieläufe wurden unter den in Tabelle 2.7 aufgeführten Betriebsparametern durchgeführt. Die Einstellungen und Bedingungen gelten sowohl für den Festbett- als auch für den Fließbettmodus. Abweichungen von diesem Schema oder Änderungen des Puffersystems sowie die Menge der aufgetragenen Probe sind im Ergebnis- und Diskussionsteil gesondert dokumentiert.

Nach Equilibrierung der Matrix auf die physiko-chemischen Arbeitsbedingungen wurden die Säulen mit der jeweiligen Produkt-Lösung beladen. Die anschließende Auswaschung ungebundener Substanzen erfolgte in der Regel mit dem gleichen Puffer wie die Equilibrierung (Puffer A). Der Spülprozeß wurde mindestens solange fortgesetzt, bis das UV-Signal wieder eine konstante Basislinie erreichte. Zur

Tabelle 2.7: Betriebsparameter und Puffersystem der Chromatographie

Chromatographie			
<i>1. Equilibrierung</i>	Puffer A	10 Säulenvolumina	300 cm/h
<i>2. Probenauftrag</i>	Zellkultur, Überstand, Konzentrat		300 cm/h
<i>3. Waschen</i>	Puffer A	5 Säulenvolumina	300 cm/h
<i>4. Elution</i>	Puffer B	1 Säulenvolumen	100 cm/h
Puffersystem			
Puffer A:	PBS, pH 7,0 0,96 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,24 g KH_2PO_4 0,2 g KCl 8,0 g NaCl ad 1 Liter Milli-Q, pH 7,0		
Puffer B:	2 % Essigsäure, pH 2,7 (keine pH-Einstellung)		
Puffer C:	1 M Tris, pH 9,0 12,11 g Tris ad 100 ml Milli-Q, pH 9,0 (Vorlage für Elution, 1/4 Vol.-Anteil)		
Zellkultur/Überstand:	keine Konditionierung		
Konzentrat:	Einstellung auf pH 7,0		

Minimierung des Volumens fand die Elution mit einer niedrigeren Fließgeschwindigkeit statt. Sie wurde einstufig durch den direkten Wechsel auf 100 % Puffer B durchgeführt. Die Stabilisierung des Produkts gewährleistete eine basische Puffervorlage, die den pH-Wert der Eluatfraktion sofort neutralisierte. Zugemischt wurde der Puffer C mit einem Anteil von 25 % des Endvolumens.

2.3.2.1 Aufarbeitung in der Festbettchromatographie

Die Chromatographie im Festbettmodus erfolgte mit einem SMARTTM System. Neben den Peptid-Affinitätsmatrices die auf Basis der 1 ml Fertigsäulen vom Typ HiTrapTM hergestellt wurden, kam für vergleichende Studien eine HR5/5-Säule (l = 5 cm, d = 5 mm, Amersham Pharmacia Biotech) zum Einsatz, die mit einem Milliliter des Fließbettmaterials befüllt war. Die Chromatographieprozesse

```

0.00 LOAD {Start: Equilibrierung mit A}
0.00 MIXER_WASH 0 {Mixer mit 0 % B Waschen}
0.00 CONC_B 0 {Konzentration B: 0 %}
0.00 FILL A, 1, 20, 15000 {Befüllen Pumpe A mit 20 ml A}
0.00 FILL B, 1, 20, 15000 {Befüllen Pumpe B mit 20 ml B}
0.00 TRIPLE_WAVELENGTH 280, 254, 220 {UV-Detektor: 280,254,220 nm}
0.00 FLOW 1924 {Fluß: 1924 µl/min; 300 cm/h}
9.00 AUTOZERO {UV-Detektor Autozero}
10.00 INJECT {Wechsel auf 50 ml-Superloop}
10.80 LARGE_TUBE A {Fraktionierung in Gefäß A}
19.00 FILL A, 1, 20, 15000 {Befüllen Pumpe A mit 20 ml A}
25.80 LARGE_TUBE B {Fraktionierung in Gefäß B}
38.00 FILL A, 1, 20, 15000 {Befüllen Pumpe A mit 20 ml A}
40.80 LARGE_TUBE C {Fraktionierung in Gefäß C}
55.00 FILL A, 1, 20, 15000 {Befüllen Pumpe A mit 20 ml A}
55.00 LOAD {Start: Waschschritt mit A}
55.80 LARGE_TUBE Z {Fraktionierung in Gefäß Z}
60.00 CONC_B 0 {Start: Elution}
60.00 CONC_B 100 {Konzentration B: 100 %}
60.00 FLOW 641 {Fluß: 641 µl/min; 100 cm/h}
60.70 NEEDLE_POSITION UP {Start: Eluatfraktionierung}
60.70 GOTO_TUBE 1 {Beginn in Tube 1}
60.70 FRACTION_SIZE 300 {Fraktionsgröße: 300 µl}
62.80 FRAC_STOP {Ende der Fraktionierung}
62.80 FLOW 1924 {Fluß: 1924 µl/min; 300 cm/h}
65.00 CONC_B 100 {Spülen mit A}
65.00 CONC_B 0 {Konzentration B: 0 %}
70.00 CONC_B 0 {Ende der Methode}

```

Abbildung 2.6: Ausdruck einer Programm-Methode für das SMARTTM System. In diesem Beispiel werden 45 ml Probe mit einer HiTrapTM-Säule aufgearbeitet. Die Beladung erfolgt über einen 50 ml-Superloop.

verliefen mit Ausnahme geringer Modifikationen alle nach dem in Abbildung 2.6 dargestellten Programm.

Vor den Läufen wurden sämtliche Flüssigkeiten filtriert (Porenweite 0,2 µm) und die Puffer entgast. Als Ausgangslösungen dienten Überstände aus SuperSpinner Kultivierungen sowie ein affinitätschromatographisch über rProtein A (Amersham Pharmacia Biotech) gereinigtes Produktkonzentrat. Je nach Größe des Probenvolumens erfolgte die Beladung mit kleinen Teflonschleifen, einem externen 50 ml-Superloop oder direkt über die Pumpe A des Systems. Das Programm wurde dementsprechend verändert und die Fraktionsgrößen angepaßt.

Neben den Chromatographieläufen mit dem monoklonalen Antikörper Anti-FVIII wurden nach dem gleichen Prinzip weitere Immunglobuline und Reinsubstanzlösungen verschiedener Proteine aufgearbeitet. Diese Versuche dienten zur Untersuchung der Bindungsselektivität der Matrices. Auch die in Abschnitt 2.3.3.1 beschriebene Erstellung von Durchbruchkurven fand unter ähnlichen Bedingungen statt. Dabei wurde jedoch der Durchlauf während des Probenauftrags stärker fraktioniert oder in regelmäßigen Abständen eine Aliquot-Entnahme vorgenommen.

2.3.2.2 Aufarbeitung in der Fließbettchromatographie

Für die Peptid-Affinitätschromatographie im Fließbett wurde das unter Abschnitt 2.3.1.2 beschriebene GradiFracTM System mit integrierter StreamlineTM25 Säule verwendet. Die Prozeßführung erfolgte nach dem in Abschnitt 1.3.1.2 der Einleitung beschriebenen Prinzip. Nach Equilibrierung und Erreichen einer stabilen Expansion wurde direkt ohne Unterbrechung der Anströmung auf die Beladung mit der zellhaltigen Produktlösung umgeschaltet und für den anschließenden Waschschritt wieder auf Puffer A. Die Elution fand nach Sedimentation der Matrix in umgekehrter Flußrichtung statt. Durch die Absenkung des oberen Säulenadapters auf die Geloberfläche konnte das Elutionsvolumen minimiert und das Produkt optimal ankonzentriert werden.

Für die Aufarbeitung des Antikörpers wurden jeweils 600 bis 1800 Milliliter zellhaltige Kultursuspension aufgetragen, die als Ernte aus einem SuperSpinner hervorgingen. Eine vorausgehende Konditionierung der Proben war bei der Verwendung der Peptid-Affinitätsmatrix nicht notwendig. Die separate Sammlung der einzelnen Chromatographiefractionen fand in allen Versuchen durch den manuellen Wechsel der Auffanggefäße am Austrittsschlauch des Systems statt. Die Begrenzung der Volumina erfolgte UV-kontrolliert unter Berücksichtigung des Totvolumens.

Die einzelnen Läufe wurden hinsichtlich ihres Reinigungserfolgs mittels ELISA und SDS-Gelelektrophorese beurteilt. Neben der Abreicherung von Medienbestandteilen und Zellinhaltsstoffen lag ein weiterer Schwerpunkt auf der Untersuchung von Biomasse/Matrix-Interaktionen und verfahrensbedingter Zellschädigung. Die analytischen Methoden sind im Abschnitt 2.4 ab Seite 66 zusammengefaßt.

2.3.2.3 Regeneration der Matrices

Nach der Prüfung und Beurteilung unterschiedlicher CIP-Prozeduren (*Cleaning In Place*) wurde die Säuberung der Chromatographiematrices standardisiert nach einer einfachen und effektiven Regenerationsmethode mit 0,5 M Natronlauge durchgeführt. Diese lehnte sich an einen Prozeß an, der sich sonst nur für die Behandlung chemisch äußerst stabiler Matrices wie beispielsweise der Ionenaustauscher eignet. Tabelle 2.8 listet die einzelnen Arbeitsschritte der Prozedur auf.

Die Regenerationslösung wurde bei niedriger Fließgeschwindigkeit für eine Kontaktzeit von 120 Minuten über die Säule gepumpt. Anschließend erfolgte eine Reequilibrierung für den nächsten Chromatographielauf. Für längere Lagerzeiten wurden die Matrices in 20 % Ethanol überführt.

Die Festbettsäulen wurden nur nach jedem fünften bis zehnten Experiment sowie vor einer längeren Nutzungspause durch die beschriebene Langzeitbehandlung

Tabelle 2.8: Regeneration der Peptid-Affinitätsmatrices

Arbeitsschritt	Lösung	Fluß	Kontaktzeit
1. <i>Regeneration</i> ¹	0,5 M NaOH	50 cm/h	120 min
2. <i>Reequilibrierung</i>	PBS, pH 7,0	300 cm/h	20 min

¹Regeneration im Fließbett im expandierten Modus

regeneriert. Jedoch fand standardgemäß nach jedem Lauf eine verkürzte CIP-Prozedur statt, in der die Matrices über eine Injektionsschleife des SmartTM Systems mit 3,5 ml der NaOH bei 500 μ l/min gespült wurden. Für die Fließbettmatrix erfolgte hingegen bereits nach jedem Gebrauch eine gründliche Regeneration im expandierten Modus. Dabei wurde in einzelnen Fällen der Verbrauch an Natronlauge durch Rezyklisierung der Regenerationslösung reduziert.

Die Kontrolle der Regenerationsleistung fand im Fließbett durch Vergleich der Expansionsprofile vor einem Aufarbeitungslauf und nach der abschließenden CIP-Prozedur statt (s. Abschnitt 2.3.3.3). Im Festbett wurde die Beseitigung von Rückständen durch die Chromatographie eines Ratte-Antikörpers getestet, der die κ -leichte Kette von Maus-Antikörpern spezifisch bindet (Maus-Ratte Hybridom HB58, ATCC American Tissue Culture Collection). Da dieser an eventuell vorhandenen Anti-FVIII Rückständen zurückgehalten wird, konnte er zum indirekten Nachweis einer Kontamination der Matrix eingesetzt werden. Der Test fand analog zur Produktaufarbeitung (vgl. Abschnitt 2.3.2) direkt vor und nach der CIP-Prozedur mit jeweils 15 ml eines HB58-Konzentrats (ca. 200 mg/L) statt. Die anschließende Western-Blot Analyse der Chromatographiefraktionen (s. Abschnitt 2.4.4) gab Aufschluß über den Verbleib des HB58 und ermöglichte die Abschätzung des Regenerationserfolgs.

Neben der Abreicherung von Kontaminationen mußte die Gewährleistung der Stabilität des Peptidliganden gegenüber der Natronlauge untersucht werden. Die Kontrolle erfolgte durch Vergleich der Durchbruchkurven eines Anti-FVIII Konzentrats vor und nach der Regeneration. Die Erstellung von Durchbruchprofilen wird unter Abschnitt 2.3.3.1 beschrieben. An der Veränderung der dynamischen Bindungskapazität für das Produkt ließ sich eine eventuelle Schädigung des Peptids ablesen. Zusätzlich wurde das Standzeitverhalten der Matrices durch eine 24-stündige Behandlung mit 0,5 bzw. 1,0 M Natronlauge simuliert und ebenfalls durch den Vergleich der Durchbruchkurven beurteilt.

2.3.3 Charakterisierung der Matrices

Zusätzlich zu den Aufarbeitungsexperimenten wurden die Peptid-Affinitätsmatrices noch hinreichend charakterisiert. Dabei stand die Ermittlung der Bindungskapazität, das Verweilzeitverhalten der unterschiedlichen Basalmatrixes und das Fluidisierungsverhalten des EBA-Prototypen im Vordergrund.

2.3.3.1 Ermittlung der dynamischen Bindungskapazität

Zur Bestimmung der Kapazität der Peptid-Affinitätsmatrices für den Anti-FVIII Antikörper wurden verschiedene Durchbruchstudien nach der frontalen Adsorptionsanalyse durchgeführt. Die notwendige Produktmenge stellten in erster Linie ein affinitätschromatographisch gereinigtes Antikörperkonzentrat sowie partikel-freie Kulturüberstände bereit.

Nach Equilibrierung wurden die Säulen bei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten mit der jeweiligen Antikörperlösung beladen. Während des Auftrags fand in regelmäßigen Abständen eine Probenentnahme aus dem Durchlauf statt, die anschließend im ELISA vermessen wurde (s. Abschnitt 2.4.1). Bei Verarbeitung der Konzentrate konnte der Produktdurchbruch zusätzlich über den Verlauf der optischen Dichte bei 280 nm verfolgt werden. Die Ausgangsprobe enthielt in diesem Fall lediglich den reinen Antikörper, so daß keine Kontaminationen das UV-Signal überlagerten.

Nach Auswertung der ELISA-Ergebnisse wurde der IgG-Gehalt der Durchlaufproben prozentual auf die Konzentration in der ursprünglichen Lösung bezogen und gegen die zum jeweiligen Zeitpunkt aufgetragene Antikörpermenge pro Milliliter Gel aufgetragen. Die dynamische Kapazität der Matrices ließ sich dann graphisch ermitteln. Sie wird per Definition bei einem Produktdurchbruch von 10 % der Ausgangskonzentration am zugehörigen x-Wert abgelesen.

2.3.3.2 Charakterisierung des Verweilzeitverhaltens

Die Adsorptionsleistung säulenchromatographischer Prozesse hängt neben der Anzahl, Verteilung und Güte der Liganden sowie der Zusammensetzung des Puffersystems im wesentlichen vom Strömungsverhalten der Flüssigphase ab. Eine ideale Pfropfenströmung kann durch Inhomogenitäten verhindert werden, die durch Wandeffekte sowie eine ungeeignete Form, Größe oder Packung der Matrixpartikel hervorgerufen werden. Da sich die Basismaterialien der HiTrapTM Säulen und des EBA-Prototypen diesbezüglich stark voneinander unterschieden, mußten ihre Strömungsprofile charakterisiert und miteinander verglichen werden, um mögliche Differenzen in der chromatographischen Leistung diskutieren zu können.

Die axiale Dispersion der Flüssigphase läßt sich durch Untersuchungen des Verweilzeitverhaltens eines Spurstoffs ermitteln. Experimentell wird dies durch den Auftrag eines *Sprung-* oder *Dirac-Impulses* am Säuleneingang und der Auswertung der Verweilzeitverteilung der Substanz am Säulenausgang realisiert. Im folgenden werden die wesentlichen mathematischen Grundlagen zur Auswertung einer solchen Antwortfunktion erläutert. Es sei angemerkt, daß die Verhältnisse im einzelnen wesentlich komplexer sind und detailliertere Informationen aus der entsprechenden Literatur hervorgehen [CHMIEL, 1991; FITZER & FRITZ, 1982; LEVENSPIEL, 1972].

Unter der Annahme, daß sich das Eingangssignal wie ein idealer Dirac-Impuls verhält, kann die aus einem Spurstoffexperiment hervorgehende Verweilzeitverteilung nach der Momentenmethode ausgewertet werden.

Als experimentelles Ergebnis erhält man eine Kurve, die die Konzentration des Stoffs (c) als Funktion der Zeit (t) widerspiegelt:

$$c = f(t) \quad (2.3)$$

Für vergleichende Betrachtungen wird die c -Funktion bezüglich ihres Integrals normiert. Die resultierende dimensionslose E -Funktion (2.4) bzw. normierte Verweilzeitverteilung gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Spurstoffmolekül die Säule zum Zeitpunkt t verläßt.

$$E = \frac{c}{\int_0^{\infty} c \cdot dt} \quad (2.4)$$

Das erste Moment der normierten Antwortfunktion (E) liefert die mittlere Verweilzeit (\bar{t}) als Erwartungswert:

$$\bar{t} = \int_0^{\infty} t \cdot E dt \quad (2.5)$$

Das zweite zentrale Moment entspricht der Varianz (σ_t^2) und beschreibt die Peakbreite:

$$\sigma_t^2 = \int_0^{\infty} (t - \bar{t})^2 E dt \quad (2.6)$$

Für geschlossene Systeme, in denen keine Rückvermischung jenseits der Säulengrenzen stattfindet, ist das Antwortsignal gegenüber dem Eingangsimpuls unter optimalen Strömungsbedingungen lediglich um die Raumzeit bzw. hydrodynamische Verweilzeit (τ) verschoben. Bei rein konvektivem Stofftransport entspricht

sie der mittleren Verweilzeit (\bar{t}) eines Spurstoffmoleküls im System. Die normierte Varianz (σ_{Θ}^2) wird dann wie folgt durch zwei Terme beschrieben:

$$\sigma_{\Theta}^2 = \frac{\sigma_t^2}{\tau^2} = \frac{\sigma_t^2}{\bar{t}^2} \quad (2.7)$$

Die Quantifizierung von Rückvermischungseffekten kann in Anlehnung an das Dispersionsmodell erfolgen. Dieses Modell geht von statistisch verteilten und linear vom Konzentrationsgradienten abhängigen Mischungsvorgängen aus. Diese lassen sich unter nichtadsorbierenden Bedingungen aus folgendem Zusammenhang bilanzieren:

$$\frac{\partial c}{\partial \Theta} = \frac{1}{Bo} \cdot \frac{\partial^2 c}{\partial Z^2} - \frac{\partial c}{\partial Z} \quad (2.8)$$

mit:	c	dimensionslose Konzentration	[-]
	Θ	dimensionslose Zeit	[-]
	Z	dimensionsloser Weg	[-]
	Bo	Bodensteinzahl	[-]

Die Bodensteinzahl (Bo) beschreibt als dimensionslose Kennzahl das Verhältnis von konvektivem zu dispersivem Stofftransport. Sie hängt wesentlich vom axialen Dispersionskoeffizienten (D_{ax}) ab und ist durch Gleichung 2.9 definiert. Sowohl Bo als auch D_{ax} sind wichtige Merkmale zur Charakterisierung von Rückvermischungseffekten. Für ideale Strömungsröhre gilt: $Bo \rightarrow \infty$ und $D_{ax} \rightarrow 0$.

$$Bo = \frac{u_Z \cdot L_S}{D_{ax}} \quad (2.9)$$

mit:	Bo	Bodensteinzahl	[-]
	D_{ax}	axialer Dispersionskoeffizient	[m ² · s ⁻¹]
	u_Z	effektive Lineargeschwindigkeit ($u_Z = \frac{L_S}{\tau}$)	[m · s ⁻¹]
	L_S	Säulenlänge	[m]

Für ein geschlossenes System existiert keine analytische Lösung der Gleichung 2.8. Jedoch besteht zwischen der Bodensteinzahl (Bo) und der aus Formel 2.7 hervorgehenden normierten Varianz (σ_{Θ}^2) der in Gleichung 2.10 dargestellte Zusammenhang, aus dem sich die Bodensteinzahl (Bo) mit Hilfe spezieller Computerprogramme iterativ bestimmen läßt.

$$\sigma_{\Theta}^2 = \frac{2}{Bo} - \frac{2}{Bo^2} [1 - \exp(-Bo)] \quad (2.10)$$

Neben dem Dispersionsmodell können die Effekte der Rückvermischung auch durch das Zellenmodell beschrieben werden. Das Modell geht immer von einem geschlossenen System aus und segmentiert die Säule in eine Kaskade identischer, idealer

Rührkessel, in denen einzeln betrachtet eine vollständige Durchmischung stattfindet. Die Kenngröße ist hierbei die Anzahl der gestaffelten Kessel, die als theoretische Bodenzahl N bezeichnet wird. Sie läßt sich nach Gleichung 2.11 ebenfalls aus der normierten Varianz (σ_{Θ}^2) der E-Funktion berechnen.

$$N = \frac{1}{\sigma_{\Theta}^2} \quad (2.11)$$

Da die theoretische Bodenzahl N von der Länge der Säule abhängig ist, sollte sie für den Vergleich unterschiedlicher Säulen auf eine feste Längeneinheit (N/m) bezogen werden. Alternativ dazu kann die aussagekräftigere Höhe der fiktiven Einzelkessel HETP (*Height Equivalent of Theoretical Plates*) berechnet werden:

$$HETP = \frac{L_S}{N} \quad (2.12)$$

Die Charakterisierung des Verweilzeitverhaltens wurde für eine HiTrapTM und eine HR5/5-Säule, die einen Milliliter der Prototypmatrix enthielt, durchgeführt. Die Spurstoffexperimente fanden bei verschiedenen Anströmungsgeschwindigkeiten im SMARTTM System statt. Als Flüssigphase diente ein auf pH 7,0 eingestellter PBS-Puffer, der für die Herstellung der Spurstofflösung zu 5 % mit Aceton versetzt wurde. Die Applikation des Dirac-Impulses erfolgte über eine 10 μ l Injektionsschleife. Als Antwortfunktion wurde das UV-Signal des Durchlaufs gegen das fortlaufende Volumen aufgezeichnet und für die Bestimmung der Kenngrößen in eine c-Funktion auf Basis der Zeit umgewandelt. An Hand der Daten ließen sich dann die Bodensteinzahl Bo und die Anzahl der theoretischen Böden N mit Hilfe eines von Herrn Dr. Frank-Udo Huneke geschriebenen Computerprogramms nach der Momentenmethode berechnen. Das Programm löst die Gleichungen 2.5 und 2.6 durch numerische Integration nach Simpson und die Gleichung 2.10 iterativ nach der Methode von Newton [HUNEKE, 1995].

2.3.3.3 Aufnahme von Expansionsprofilen im Fließbett

Die Erstellung einer Fluidisierungscharakteristik für die Prototypmatrix diente der Ermittlung der optimalen Fließgeschwindigkeit für die Aufreinigungsexperimente und zur Überprüfung des Regenerationserfolgs. Als Flüssigphase wurde der Equilibrierungspuffer aus der Aufarbeitung (PBS, pH 7,0) verwendet. Die Einstellung der Adapterhöhe betrug 95 cm und wurde während der gesamten Versuchsreihe nicht verändert. Die Anströmung erfolgte mit Fließgeschwindigkeiten zwischen 50 und 600 cm/h, was einem Volumenstrom von 4,1 bis 49,1 ml/min entsprach. Zum Ablesen der jeweiligen Expansionshöhe wurde solange equilibriert, bis die

Fluidisierung des Gels konstant blieb (ca. 20 min). Währenddessen erfolgte eine makroskopische Beurteilung der Stabilität des Fließbetts.

Durch den Bezug der Expansionshöhe H auf die Höhe des sedimentierten Gels H_0 konnte der Expansionsgrad in Abhängigkeit von der Anströmgeschwindigkeit aufgenommen werden. Die graphische Darstellung ließ einen linearen Zusammenhang erkennen, in dessen Grenzen der Arbeitsbereich für die Chromatographie festgelegt wurde. Die Wiederholung der Versuchsreihe im direkten Anschluß an ein Aufarbeitungsexperiment ermöglichte eine Abschätzung der Auswirkungen der Biomassepassage auf das Fluidisierungsverhalten und gab Auskunft über mögliche Adhäsionsrückstände auf der Matrix. Desweiteren konnte die Leistung der CIP-Prozedur durch den Vergleich mit einem nach der Regeneration erstellten Expansionsprofil beurteilt werden.

2.4 Analytik

2.4.1 Produktquantifizierung mittels ELISA

Für den Nachweis und die Quantifizierung gelöster Biomoleküle können verschiedene Arten von Immunoassays durchgeführt werden. Der Detektionsmechanismus dieser Methoden basiert auf spezifischen Antigen/Antikörper-Wechselwirkungen, die eine hohe Selektivität des Tests gewährleisten.

In homogenen Systemen befindet sich die Antikörpersonde und ein nachzuweisendes Hapten in Lösung. Die Bindung wird über eine resultierende Veränderung der Enzymaktivität des entsprechenden Hapten/Enzym-Konjugats quantifiziert. Im Gegensatz dazu wird in heterogenen Systemen das Antigen an eine feste Phase (Kunststoff, vorbehandeltes Glas) gebunden. Der Nachweis erfolgt über die Bindung eines spezifischen Antikörpers, der enzym- (*ELISA*, *enzyme linked immunosorbent assay*) oder radioaktiv markiert (*RIA*, *radio immuno assay*) ist. Dabei wird der markierte Antikörper entweder direkt gegen das Antigen (direkter Immuntest) oder als Zweitantikörper gegen die Spezies eines zuvor gebundenen antigenspezifischen Erstantikörpers (indirekter Immuntest) eingesetzt.

Ein weiteres heterogenes System ist der sogenannte Sandwich-Test, bei dem das Antigen zwischen einer trägergebundenen und einer freien, markierten Antikörperschicht fixiert wird.

Im ELISA wird die hohe Spezifität einer Antigen/Antikörper-Reaktion mit der Empfindlichkeit eines enzymatischen Tests verknüpft. Die Bindung wird indirekt dadurch sichtbar gemacht, daß die gekuppelten Enzyme ein farbloses Chromogen in ein farbiges Reaktionsprodukt umwandeln, das photometrisch bestimmt werden

kann. Setzt man zur Detektion konstante Antikörper- und Substratmengen ein, so kann die Antigenkonzentration in einer unbekanntem Probe über Standarddeichkurven ermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Sandwich-ELISA zur Bestimmung der Produktkonzentrationen in den Kultur- und Aufarbeitungsproben genutzt. Der Probenantikörper fungierte dabei als Antigen, das über Anti-Spezies-Immunglobuline in den Immunoassay eingebettet wurde (s. Abb. 2.7). Tabelle 2.9 faßt die Arbeitsvorschrift zusammen und listet die notwendigen Lösungen auf.

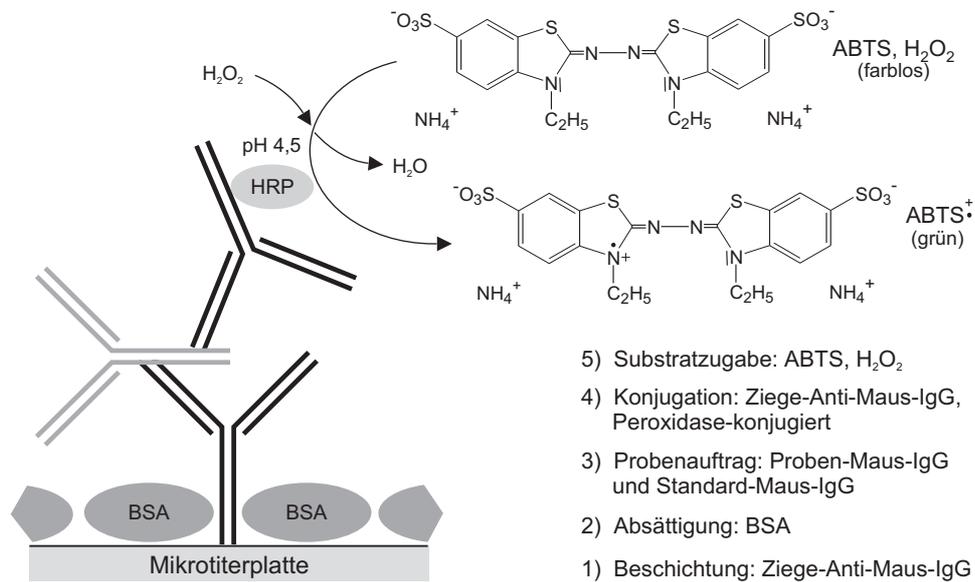


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISAs

Im ersten Schritt wurde die als feste Phase dienende 96-well-Mikrotiterplatte (Nunc-Immuno-Plate MaxiSorp, Nunc, Wiesbaden) mit einem Ziege-Anti-Maus-IgG gegen den Probenantikörper beschichtet. Nach Absättigung der freigebliebenen unspezifischen Bindungsstellen mit Albumin wurden die vorverdünnten Proben und ein Ak-Standard mit bekannter Konzentration nach dem in Abbildung 2.8 dargestellten Schema in einer Vorlage von PBS-Blau aufgetragen und jeweils im Verhältnis 1:2 mit einer Mehrkanalpipette auf der Platte weiterverdünnt. Die anschließende Konjugation erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten Ziege-Anti-Maus-IgG. Als Substrat der Meerrettichperoxidase (HRP) dienten Wasserstoffperoxid und ABTS (2,2'-Azino-di(3-Ethylbenzthiazolin)-6-Sulfonsäure-Diammoniumsalz). Dabei fungiert ABTS als Elektronendonator für die Peroxidase katalysierte Reduktion von H₂O₂ zu H₂O. Die Oxidation des ABTS läßt das stabile Radikalkation ABTS⁺ entstehen, dessen Adsorptionsmaxima bei $\lambda = 415, 650, 728$ und 815 nm liegen [SCOTT ET AL., 1993].

Tabelle 2.9: ELISA Arbeitsvorschrift

Arbeitsschritte				
1. Beschichtung	10 ml Beschichtungspuffer + 25 μ l Ziege-Anti-Maus IgG	100 μ l/well	4°C	ü. N.
2. Absättigung	22,5 ml Phosphatpuffer + 2,5 ml fötales Kälberserum FCS	250 μ l/well	RT	30 min
3. Probenauftrag	Probe-/Standardverdünnungen in PBS-Gelb (PBS-Blau Vorlage)	100 μ l/well	RT	60 min
4. Konjugation	5 ml T-PBS + 5 ml FCS + 6 μ l Ziege-Anti-Maus IgG, Peroxidase-konjugiert	100 μ l/well	RT	60 min
5. Substratzugabe	10 ml Substratpuffer + 10 mg ABTS + 1 μ l H ₂ O ₂	100 μ l/well	RT	15 min
Lösungen				
Beschichtungspuffer:	4,29 g Na ₂ CO ₃ × 10 H ₂ O 2,93 g NaHCO ₃ ad 1 Liter Milli-Q, pH 9,4			
Phosphatpuffer:	13,7 g Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O 9,3 g NaH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O ad 1 Liter Milli-Q, pH 7,0			
PBS:	0,96 g Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O 0,24 g KH ₂ PO ₄ 0,2 g KCl 8,0 g NaCl ad 1 Liter Milli-Q, pH 7,2			
T-PBS:	PBS + 0,5 ml/l Tween 20			
PBS-Gelb:	PBS + 0,1 g/l Tartrazin (Serva 35754)			
PBS-Blau:	T-PBS + 0,1 g/l Alphazurine A (Ega 19814-5) +1,8 g/l Rinderserumalbumin BSA			
Substratpuffer:	0,94 g NaBO ₃ × 4 H ₂ O Citrat-1-Hydrat 21,47 g Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O ad 1 Liter Milli-Q, pH 4,5			

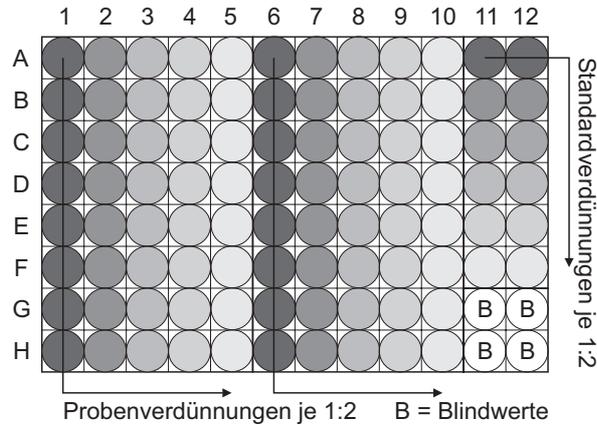


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Probenauftragung im ELISA

Nach einer Inkubationszeit von ca. 15 Minuten im Dunkeln wurde die fortgeschrittene Reaktion bei einer Wellenlänge λ von 405 nm ohne Referenz in einem ELISA-Photometer (ELx 808, Bio-Tek, Neufahrn) gemessen. Über einen angeschlossenen PC mit entsprechender Software (MikroWin 3.0, Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath) wurde aus den aufgetragenen Standardverdünnungen eine Eichkurve ermittelt, mit der über einen Extinktionsvergleich eine automatische Berechnung der unbekanntenen Antikörperkonzentration in den Proben erfolgte.

Mit Hilfe des ELISAs ließen sich die folgenden Bewertungskriterien für die Aufreinigung des Antikörpers in der Chromatographie ermitteln:

$$\text{Bindungsrate [\%]} = \frac{\text{Probe [mg]} - (\text{Durchlauf [mg]} + \text{Waschen [mg]})}{\text{Probe [mg]}} \cdot 100 \%$$

$$\text{Wiederfindungsrate [\%]} = \frac{\text{Eluat [mg]}}{\text{Probe [mg]} - (\text{Durchlauf [mg]} + \text{Waschen [mg]})} \cdot 100 \%$$

$$\text{Ausbeute [\%]} = \frac{\text{Eluat [mg]}}{\text{Probe [mg]}} \cdot 100 \%$$

2.4.2 Analytische Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration wurde als eine Methode zur Untersuchung und Beurteilung des Reinigungserfolgs in der Peptid-Affinitätschromatographie eingesetzt. Zum Einsatz kam eine mikropräparative SuperdexTM 200 PC 3.2/30 Säule (Amersham Pharmacia Biotech), die für den Betrieb im SMARTTM System konzipiert ist. Die Säulenparameter sind in Tabelle 2.10 zusammengefaßt.

Die Säulenabmessungen und die Füllung mit besonders kleinen Gelpartikeln gewährleisten laut Herstellerangaben eine theoretische Bodenzahl (N) von größer

Tabelle 2.10: Säulencharakteristik der SuperdexTM 200 PC 3.2/30

<i>Säulenabmessungen</i>	d = 3,2 mm; l = 300 mm
<i>Gel Volumen</i>	2,4 ml
<i>Basalmatrix</i>	Dextran, quervernetzte Agarose
<i>Partikeldurchmesser</i>	13-15 μm
<i>Porengröße</i>	100-120 \AA
<i>Bodenzahl N</i>	$\geq 30.000 \text{ m}^{-1}$
<i>Separationsbereich</i>	10-600 kDa
<i>Ausschlußgrenze</i>	1.300 Da
<i>Probenvolumen</i>	$\leq 50 \mu\text{l}$
<i>Volumenstrom</i>	$\leq 100 \mu\text{l}/\text{min}$
<i>pH Stabilität</i>	3-12 (1-14 für Regeneration)
<i>Arbeitsdruck</i>	1,5 MPa

als 30.000/m, wodurch eine hochauflösende Trennung von Biomolekülen ermöglicht wird. Der optimale Separationsbereich ist für globuläre Proteine mit 10 bis 600 kDa angegeben.

Die Analyse der einzelnen Fraktionen aus der Peptid-Affinitätschromatographie verlief programmgesteuert über die System-Software SMARTTM Manager. Nach Equilibrierung der Säule mit 10 ml PBS, pH 7,0 wurden jeweils 10 μl der Proben über eine Injektionsschleife appliziert. Der Volumenstrom betrug 40 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die Separation erfolgte in insgesamt 3 ml Puffer und wurde durch kontinuierliche Aufzeichnung des UV-Signals bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ in einem Chromatogramm dokumentiert. Der Vergleich der aufgetrennten Proben aus Kulturüberstand und Eluat ermöglichte abschließend eine Abschätzung des in der Peptid-Affinitätschromatographie erzielten Reinigungserfolgs.

2.4.3 SDS-PAGE und Silberfärbung

Die SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine hochauflösende Separationstechnik zur Analyse von Proteinen. In der nativen PAGE werden die Proteine hinsichtlich ihrer Ladung, Größe und Konformation voneinander getrennt. Im Gegensatz dazu erfolgt die Auftrennung in der SDS-PAGE ausschließlich nach unterschiedlichen Molekülgrößen [GÖRG & WESTERMEIER, 1998]. Durch die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) zum Probenansatz werden die Eigenladungen des

Proteins überdeckt und nichtkovalente Wechselwirkungen aufgehoben. Das stark anionische Detergenz bindet in einem konstanten Massenverhältnis (1,4 g SDS pro 1 g Protein) an die Moleküle. Durch die Anlagerung an hydrophobe Regionen werden die Proteine entfaltet und erhalten eine einheitliche negative Ladungsdichte auf ihrer Oberfläche, so daß die Gesamtladung der Komplexe der Proteinmasse proportional ist. Die elektrophoretische Separation wird somit unabhängig von der ursprünglichen Konformation und Nettoladung der Proteine. Eine vollständige Auffaltung erreicht man durch zusätzliche Behandlung der Proben mit reduzierenden Agenzien, wie β -Mercaptoethanol, das die Disulfidbrücken spaltet und das Protein in seine Polypeptiduntereinheiten teilt. Unter diesen Bedingungen besteht eine Linearität zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts $\log MW$ und der relativen Beweglichkeit R_f im elektrischen Feld. Über mitgeführte Markerproteine bekannter Größe lassen sich die Molekülmassen der Probenproteine bestimmen. Für die SDS-PAGE werden Polyacrylamidgele verwendet, deren Porengröße sich durch Änderung der Totalacrylamidkonzentration T bzw. des Quervernetzeranteils C_q (NN-Methyl-bisacrylamid) variieren läßt, so daß sie auf die Molekülgrößen der zu analysierenden Probe abgestimmt werden können. Der Molekularsiebeffekt der Gele kann zusätzlich durch die Einstellung eines Porengrößengradienten gesteigert werden. Eine Optimierung bezüglich Auflösung und Bandenschärfe erreicht man durch eine diskontinuierliche Gelelektrophorese, in der die Probenmoleküle vor dem Eintritt in das eigentliche Trenngel zunächst durch einen Isotachophoreseschritt in einem grobporigen Sammelgel in schmalen Zonen konzentriert werden.

Die diskontinuierliche SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde in erster Linie zur Abschätzung des Reinigungserfolges bei der Antikörperaufarbeitung in der Chromatographie eingesetzt. Die Trennung fand unter nichtreduzierenden Bedingungen statt, so daß keine exakte Bestimmung des Molekulargewichts möglich war. Eine ungefähre Zuordnung erfolgte über ein reduziertes Standardproteingemisch mit Molekülmassen zwischen 14 und 96 kDa (LMW-Calibration Kit 14-96, Amersham Pharmacia Biotech). Für die Elektrophorese standen ein PhastSystemTM (Amersham Pharmacia Biotech) sowie Fertiggele vom Typ PhastGelTM Gradient 8-25 und entsprechende SDS-haltige Pufferstreifen zur Verfügung. Die Proteinproben wurden im Verhältnis von 1:3 bis 1:10 mit nicht-reduzierendem Puffer (0,063 M Tris/HCl, 1 mM EDTA, 2 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau, pH 8,0) versetzt und in einem speziellen Applikator auf das Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in die Färbereinheit des PhastSystemsTM überführt und zur Detektion der Proteinbanden mit einer Silberfärbung behandelt [HEUKESHOVEN & DERNICK, 1988]. Sowohl die elektrophoretische Trennung als auch die anschließende Färbung

Tabelle 2.11: SDS-PAGE und *Heukeshoven*-Silberfärbung im PhastSystemTM

Elektrophorese						
1	<i>Elektrophorese</i>	150 V	6,0 mA	1,8 W	15°C	90 Vh
2	<i>Aufrechterhaltung der Trennung</i>	50 V	0,1 mA	0,5 W	15°C	0 Vh
⇒ Probenapplikation unter 1: 1 - 10 Vh						
Silberfärbung						
Lösungen		Färbungsschema				
1	<i>Fixierer I:</i> 120 ml Methanol + 280 ml 20 % Trichloressigsäure TCA (80 ml)					
2	<i>Fixierer II:</i> 30 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 60 % H ₂ O (160 ml)	<i>Zulauf</i>	<i>Ablauf</i>	<i>t [min]</i>	<i>T [°C]</i>	
3	<i>Konditionierer:</i> 30 ml Ethanol + 10 ml 4 M Na-Acetat + 0,5 ml Essigsäure	1.	1	0	0,5	25
	10 ml 5 % Glutaraldehyd + 0,2 g Na-Thiosulfat, ad 100 ml mit H ₂ O (80 ml)	2.	2	0	0,4	50
4	<i>Silberabfall:</i> 250 ml-Schottflasche	3.	2	0	4,0	50
5	<i>Wasser:</i> Milli-Q Wasser (560 ml)	4.	3	0	7,0	40
6	<i>Versilberer:</i> 50 ml 0,4 % Silbernitratlösung + 50 µl 37 % Formaldehyd, ad 200 ml mit H ₂ O (160 B ml)	5.	5	0	3,0	50
		6.	5	0	3,0	50
7	<i>Entwickler:</i> 200 ml 2,5 % Natriumcarbonat + 50 µl 37 % Formaldehyd (160 ml)	7.	5	0	3,0	50
		8.	5	0	4,0	50
8	<i>Stoppbad:</i> 50 mM Na-EDTA (80 ml)	9.	5	0	4,0	50
		10.	6	4	8,0	40
9	<i>Konservierer:</i> 10 % Glycerin (80 ml)	11.	6	4	2,0	25
		12.	7	0	0,4	30
0	<i>Abfall:</i> Waschbecken	13.	7	0	4,0	50
		14.	8	0	2,0	50
		15.	5	0	3,0	50
		16.	9	0	4,0	50
		17.	5	0	0,4	25

verliefen programmgesteuert unter den aus Tabelle 2.11 ersichtlichen Bedingungen. Zur Auswertung wurden die Gele mit einem Scanner (GT-6000, Epson, Düsseldorf) digitalisiert.

2.4.4 Western-Blot Analyse

Als Western-Blot bezeichnet man ein Verfahren, mit dem elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Gel auf eine Polymerschicht übertragen und anschließend durch Immundetektion spezifisch nachgewiesen werden können. Generell wird zwischen Elektro- und Kapillartransfer unterschieden. Beim Elektroblothing wird das Gel mit der aufliegenden Trägermembran über puffergetränkte Filterpapiere

zwischen zwei Elektroden eingespannt. Im elektrischen Feld wandern die Proteine in Richtung Anode und adherieren an der Blotmembran. Demgegenüber verläuft der Proteintransfer im Kapillarblot über den kapillaren Sog in einem Feuchtigkeitsgefälle, das durch Auflage von Filterpapieren oder durch Verdunstungseffekte an der Oberfläche der Blotmembran erzeugt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methodik der Western-Blot Analyse zur zweifelsfreien Unterscheidung des für die Matrix-Regenerationstests verwendeten Antikörpers HB-58 vom Produktantikörper Anti-FVIII eingesetzt. Tabelle 2.12 faßt die Arbeitsvorschrift zusammen.

Die Auftrennung der Chromatographiefraktionen erfolgte nach der in Abschnitt 2.4.3 beschriebenen SDS-PAGE. Anschließend wurde ein Kapillarblot durchgeführt. Die Trägermembran bestand aus Nitrocellulose (Porengröße $0,45 \mu\text{m}$, Schleicher & Schuell), die eine gute Zugänglichkeit der geblotteten Proteine für die nachfolgende Antikörperbindung gewährleistet.

Der Proteintransfer fand im PhastSystemTM statt. Durch Temperierung des Gels auf 70°C wurde die Verdunstung an der Blotmembran beschleunigt, so daß der Prozeß bereits nach 15 Minuten abgebrochen werden konnte. Die anschließende Färbung des SDS-Gels erfolgte nach der in Tabelle 2.11 beschriebenen Methode. Für die Immundetektion wurde die Nitrocellulose zunächst mit einem albuminreichen Blockingpuffer abgesättigt. Der Nachweis des HB-58 verlief über ein direktes Biotin/Avidin-System. Dabei setzt man biotinylierte Primärantikörper ein und nutzt die hohe Affinität zu Avidin ($K_D \cong 10^{-15} \text{ M}$) für die Einführung eines Indikators aus. Um eine Kreuzreaktion mit dem murinen Produktantikörper

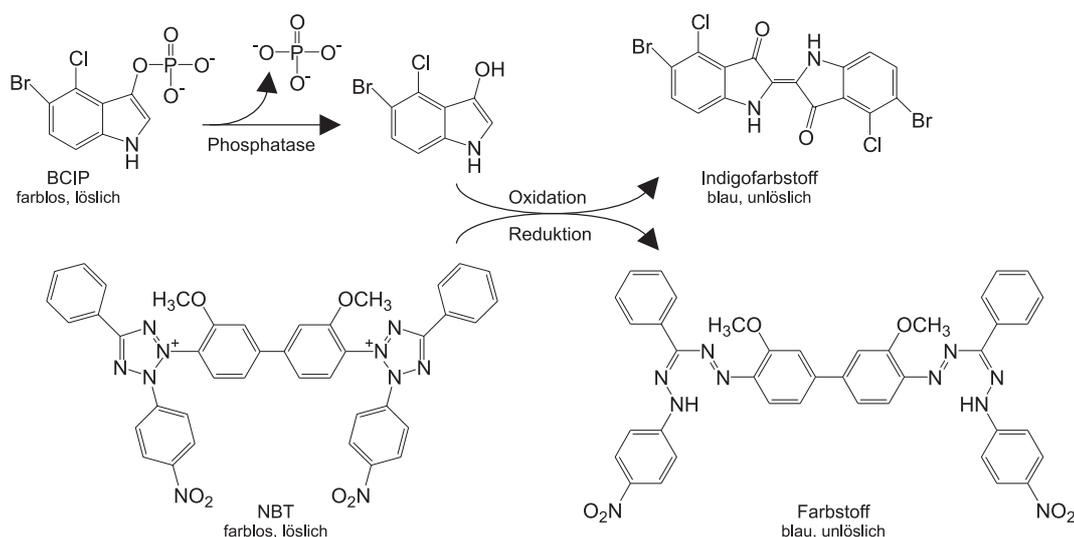


Abbildung 2.9: Reaktionsschema des Phosphatase katalysierten Umsatzes von NBT/BCIP

Tabelle 2.12: Arbeitsvorschrift für den HB-58 Western-Blot

Western-Blot			
I. Elektrophorese	PhastSystem TM , PhastGel TM Gradient 8-25 (s. Kap. 2.4.3)		
II. Kapillarblot	<ul style="list-style-type: none"> - Nitrocellulose (3,8 × 4,3 cm) ca. 15 min in Milli-Q legen - Pufferstreifenhalter aus Elektrophoresekammer entfernen - Nitrocellulose luftblasenfrei auf PhastGel legen - 15 min bei 70 °C blotten 		
III. Silberfärbung	Färbung des PhastGels (s. Kap. 2.4.3)		
IV. Immundetektion	Spezifischer Nachweis des HB-58 auf der Nitrocellulose		
1. Absättigung	10 ml Blockingpuffer	60 min	Schüttler
2. Waschen	10 ml Waschpuffer	2 × 10 min	Schüttler
3. Ak-Auftrag	100 µl Anti-FVIII, biotinyliert (s. u.) ad 10 ml Reaktionspuffer	60 min	Schüttler
4. Waschen	10 ml Waschpuffer	3 × 10 min	Schüttler
5. AP-Konjugat	1 µl SA-AP (Gatc A500.10) ad 10 ml Reaktionspuffer	60 min	Schüttler
6. Waschen	10 ml Waschpuffer	3 × 10 min	Schüttler
	10 ml Substratpuffer	1 × 5 min	Schüttler
7. Färbung	200 µl NBT/BCIP-Stammlösung (Boehringer Mannheim 1681 451) ad 10 ml Substratpuffer	< 30 min	Schwenken
8. Abstoppen	Spülen mit Milli-Q		
9. Fixieren	10 ml 3 % Trichloressigsäure	10 min	Schüttler
Biotinylierung			
<ul style="list-style-type: none"> - 30 µl (ca. 2 mg/ml) affinitätschrom. gereinigter Anti-FVIII + 60 µl PBS - Dialyse¹ gegen 0,1 M NaHCO₃, pH 8,2, RT, 60 min - Dialysat + 40 µl Biotin-X-NHS (1 mg/ml in Milli-Q; Calbiochem 203189) - Inkubation bei RT, 120 min, Schüttler - 3 × Dialyse¹ gegen PBS, RT, je 30 min 			
Lösungen			
PBS:	0,96 g Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O 8,0 g NaCl 0,2 g KCl 0,24 g KH ₂ PO ₄ ad 1 Liter Milli – Q, pH7,0	Waschpuffer:	3,0 g BSA 3,0 ml Tween20 ad 1 Liter PBS, pH 7,0
Substratpuffer:	0,584 g NaCl 0,476 g MgCl ₂ 1,211 g Tris ad 100 ml Milli-Q, pH 9,5	Blockingpuffer:	0,27 g BSA ad 10 ml Waschpuffer
		Reaktionspuffer:	0,07 g BSA ad 10 ml Waschpuffer

¹Dialyseeinheit: Slide-A-LyzerTM Mini Dialysis Units, MWCO 3,5 kDa; Pierce, Rockford, USA

zu verhindern, wurde der Anti-FVIII selbst als Testsubstanz verwendet und vorab nach dem ebenfalls in Tabelle 2.12 dargestellten Verfahren mit Biotin gekuppelt. Die Bindung an das Ratte-IgG erfolgte dann über die Spezifität des HB-58, der gegen die κ -leichte Kette von Maus-Antikörpern gerichtet war [YELTON ET AL., 1981]. Als Indikatorsystem wurden alkalische Phosphatase und das Substrat NBT/BCIP eingesetzt. Durch die aus Abbildung 2.9 ersichtliche enzymkatalysierte Redox-Reaktion entstand ein blauer Niederschlag, der die Anwesenheit des HB-58 Antikörpers sichtbar machte.

2.4.5 Casy1: Aufnahme von Partikelgrößenverteilungen

Mit dem CASY1-System (Schärfe, Reutlingen) läßt sich neben dem Lebend- und Totzelltiter einer Kultursuspension zusätzlich der Zelldebrisanteil quantifizieren. Das System analysiert Partikelgrößenverteilungen nach dem Widerstandsmessprinzip kombiniert mit dem Verfahren der Pulsflächenanalyse [SCHÄRFE, 1988]. Beim Durchtritt eines einzelnen suspendierten Partikels durch eine Rubinmeßpore ändert sich der elektrische Widerstand in Abhängigkeit vom verdrängten Elektrolytvolumen. Diese Widerstandsänderung wird mit einer Frequenz von 1 MHz abgetastet. Das zeitliche Integral über dem Widerstand (Pulsfläche) ist proportional zum Volumen des passierenden Partikels, das von einem integrierten PC mit der entsprechenden Software unter Annahme kugelförmiger Gestalt des Teilchens in einen definierten Durchmesser umgerechnet wird. Je nach Kapillarengroße mißt das CASY-System Partikelgrößenverteilungen zwischen 1,4 und 90 μm , die sich nach Glauner in drei Bereiche unterscheiden lassen [GLAUNER, 1991]. Partikel mit einem Durchmesser zwischen 1,4 und 6 μm werden als Zellbruchstücke (Debris) gewertet, während für lebende Zellen ein Durchmesser größer 10 μm angenommen wird. Den Bereich zwischen diesen beiden Größenklassen (6 - 10 μm) ordnet man den toten Zellen zu, da bei beschädigter Zellmembran das Cytosol mit der Elektrolytlösung in leitender Verbindung steht, und lediglich der kleinere Zellkern über eine Widerstandsänderung identifiziert wird.

Das Casy-System wurde zur Analyse der Klärung und der Zellschädigung in der Fließbettchromatographie eingesetzt. Die Messungen erfolgten mit einer Kapillare, die eine Porenweite von 150 μm aufwies und einen Partikelgrößenbereich von 3,4 bis 90 μm abdeckt. Um gewährleisten zu können, daß die Partikel die Meßpore einzeln passierten, wurden die Proben je nach Ausgangskonzentration mit einem physiologischen Puffer (Casyton) im Verhältnis von 1 : 100 bis 1 : 500 vorverdünnt.

2.4.6 Quantitative DNA-Bestimmung

In Abhängigkeit von der gewünschten Empfindlichkeit wird die quantitative DNA-Analytik in der Praxis mit verschiedenen Methoden durchgeführt. Als Beispiele sind die *PCR* (*polymerase chain reaction*) und das *Southern Blotting* gelelektrophoretisch getrennter DNA-Fragmente zu nennen [ALBERTS ET AL., 1990]. Beide Verfahren sind äußerst empfindlich (PCR-Nachweisgrenze: 1 DNA-Molekül/Probe) und dienen in erster Linie der qualitativen Analyse. Sie finden ihren Einsatz in der pränatalen Diagnostik von Erbkrankheiten, beim Nachweis schwacher Virusinfektionen und in der Gerichtsmedizin zur zweifelsfreien Herkunftsbestimmung menschlicher Zellen. Ein weiteres Anwendungsgebiet liegt in der Endproduktkontrolle biotechnisch hergestellter Proteine, deren DNA-Gehalt für therapeutische Zwecke nicht größer als 10 pg/Dosis sein darf [PETRICCIANI, 1985]. Beide Methoden sind für schnelle quantitative Routineuntersuchungen nicht geeignet. Weniger zeit- und kostenintensiv ist die photometrische DNA-Bestimmung bei 260 nm [MANIATIS ET AL., 1982]. Die Genauigkeit der Extinktionsmessung ist jedoch im starken Maße von der Zusammensetzung der zu untersuchenden Probe abhängig, da Interferenzen mit anderen Komponenten (Proteine: $\lambda_{max} = 280$ nm) auftreten können. Aus diesem Grund ist häufig im Voraus eine Isolierung der DNA erforderlich.

Eine alternative Möglichkeit zur Detektion von DNA bietet die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen (4,6-Diamidinophenylindol *DAPI*, Hoechst 33258) [BRUNK ET AL., 1979; KAPUSCINSKI & SKOCZYLAS, 1977], die in einem konstanten Massenverhältnis an DNA binden. Jedes Fluorochrom hat eine spezifische Anregungs- und Emissionswellenlänge, so daß es im Fluoreszenzspektrometer über monochromatisches Licht und entsprechende Filter selektiv quantifiziert werden kann. Die DNA-Konzentration einer Probe verhält sich proportional zur Emissionsintensität und kann somit über eine Standardgleichgerade ermittelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die fluorimetrische DNA-Analytik zur Bestimmung der DNA-Abreicherung während der Produktaufreinigung eingesetzt. Zusätzlich diente das Verfahren der Abschätzung des Ausmaßes auftretender Zellschädigungen, die durch den integrativen Fließbettprozeß verursacht wurden. Es wurde ein fluorimetrisches Verfahren mit dem Farbstoff PicoGreenTM (P-7581, Molecular Probes, Eugene, USA) angewandt, das Frau Dr. J. Wittler und Herr Dr. H. Tebbe am Institut etabliert und auf seine Eignung für die Untersuchung von Zellkulturüberständen geprüft haben [WITTLER, 1996]. PicoGreenTM ist ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, mit dem doppelsträngige DNA selektiv detektiert werden kann. Er stand als Konzentrat in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst zur Verfügung und wurde für den Gebrauch jeweils frisch im Verhältnis 1:200 mit

TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) verdünnt. Für die Reaktionsansätze wurden 500 μ l Probe mit der gleichen Menge PicoGreenTM Gebrauchslösung versetzt und drei Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte bei 520 nm mit einer Anregungswellenlänge von 480 nm in einem Fluoreszenzspektrometer (Shimadzu RF551).

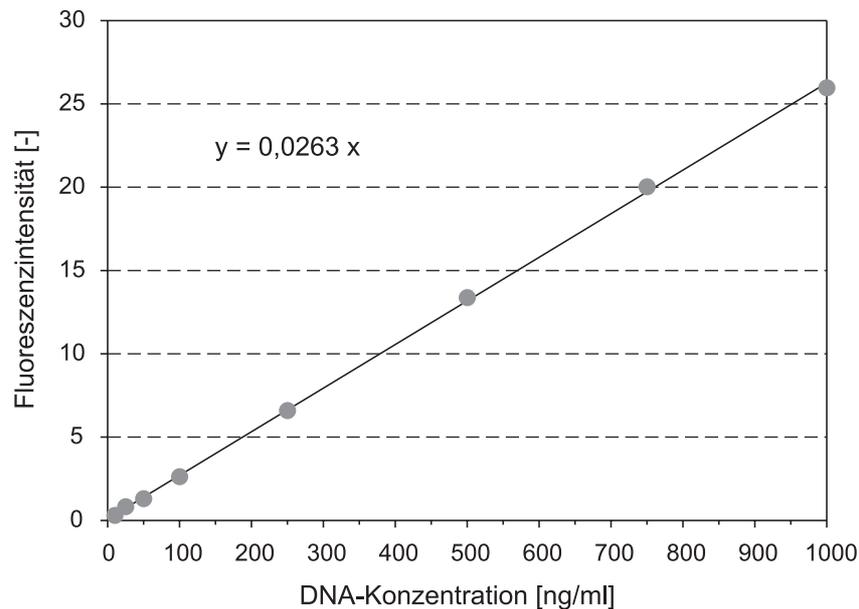


Abbildung 2.10: Standardgerade zur Bestimmung der DNA-Konzentrationen. Fluoreszenzmessung des interkalierenden Farbstoffs PicoGreenTM für definierte Standardlösungen aus Kalbsthymus-DNA. (Gleichung der Trendlinie aus linearer Regression: $y = 0,263 x$)

Um Rückschlüsse auf die DNA-Konzentration in den Proben ziehen zu können, erfolgte eine Kalibrierung mit einem Kalbsthymus-DNA-Standard (Lot 34H9544, Sigma). Dazu wurden nach demselben Prinzip wie bei den Probenansätzen eine Meßreihe mit DNA-Konzentrationen von 10 bis 1000 ng/ml durchgeführt und die ermittelten Fluoreszenzintensitäten anschließend in einem Diagramm aufgetragen. Durch Regression erhielt man die in Abbildung 2.10 dargestellte lineare Abhängigkeit, über die der unbekannte DNA-Gehalt in den Proben bestimmt werden konnte. Um die Übertragbarkeit der Kalibrierung auf die Probenmessungen sichern zu können, und einen eventuellen Einfluß der Mediumbestandteile (Phenolrot, Albumin) auf das Fluoreszenzverhalten zu kompensieren, wurden die notwendigen Standardverdünnungen mit Kulturmedium hergestellt.

2.4.7 Bestimmung der LDH-Aktivität

Die Lactatdehydrogenase (LDH) gehört zur Familie der NADH-abhängigen Dehydrogenasen [BUDDECKE E., 1989]. Sie katalysiert in anaeroben Stoffwechselfvorgängen verschiedener Mikroorganismen die Umsetzung von Pyruvat in Lactat. Diese Reaktion findet auch in den Zellen höherer Organismen statt, wenn der Sauerstoffgehalt zum begrenzenden Faktor der aeroben Zellatmung wird. Die Reaktionsgleichung ist in Abbildung 2.11 dargestellt.

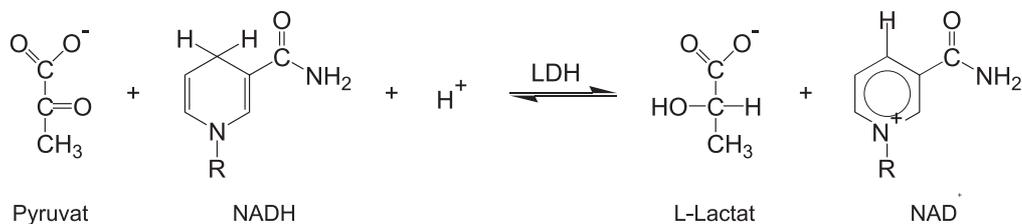


Abbildung 2.11: Reaktionsgleichung des LDH-katalysierten Umsatzes von Pyruvat in Lactat

Das Enzym kommt im Cytosol sämtlicher Säugetierzellen vor. Da die LDH nicht aktiv sezerniert wird, gelangt sie nur nach Schädigung der Plasmamembran bzw. Lyse der Zellen nach außen. Aus diesem Grund kann die Ermittlung der LDH-Konzentration in Zellkulturen zur Abschätzung des Anteils geschädigter und abgestorbener Zellen genutzt werden [WAGNER ET AL., 1992].

Die Menge eines Enzyms wird über seine katalytische Aktivität bestimmt, deren Maßeinheit das Katal (kat) ist. Ein Katal entspricht der Enzymmenge, die unter optimalen Bedingungen ein Mol Substrat pro Sekunde umsetzt. Gebräuchlicher ist heute die Angabe in SI-Einheiten U. Dabei gilt der Zusammenhang: $1 \text{ kat} \equiv 6 \times 10^7 \text{ U}$.

Die Bestimmung der LDH-Aktivität wurde zur Abschätzung der Zellschädigung in der Fließbettchromatographie eingesetzt. Der Test beruhte auf dem indirekten Nachweis des Umsatzes von Pyruvat zu Lactat, der über den equivalenten Verbrauch von NADH photometrisch verfolgt werden kann. Der Protonendonator NADH hat ein Extinktionsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340 \text{ nm}$, bei der das oxidierte NAD^+ nicht absorbiert. Da die LDH-Aktivität mit der NADH-Abnahme korreliert, läßt sie sich aus dem linearen Extinktionsabfall bestimmen. Für die Analysen wurden je nach zu erwartender Enzymaktivität 20 bis 200 μl zellfreier Kulturüberstand mit jeweils 100 μl einer Pyruvat- und einer NADH-Gebrauchslösung (10 bzw. 2,7 mM in Reaktionspuffer) versetzt und in einer Glasküvette mit Reaktionspuffer (30 mM Phosphatpuffer, pH 7,4) auf 1000 μl aufgefüllt. Die Messung erfolgte mit einem rechnergesteuerten Photometer (Uvikon

933, Kontron, Neufahrn), das die Extinktionsabnahme bei 340 nm über einen Zeitraum von zwei Minuten mit 50 Werten pro Minute aufzeichnete. Aus der linearen Regression berechnete die Software (Uvikon 1.51, Kontron, Neufahrn) die Extinktionsabnahme pro Zeiteinheit, aus der sich die Reaktionsgeschwindigkeit bzw. Enzymaktivität nach der vom Lambert-Beerschen Gesetz abgeleiteten Gleichung 2.13 berechnen ließ (vgl. S. 52, Gl. 2.1, 2.2).

$$\nu = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta E}{d \cdot \epsilon \cdot \Delta t} \cdot \frac{V_{ges}}{V_P} \quad (2.13)$$

mit:	ν	Reaktionsgeschwindigkeit	$[\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} = \text{kat} \cdot \text{L}^{-1} = 6 \cdot 10^7 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}]$
	Δc	Konzentrationsdifferenz	$[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$
	ΔE	Extinktionsdifferenz	$[-]$
	d	Schichtdicke der Küvette (1 cm)	$[\text{cm}]$
	Δt	Meßdauer (60 s)	$[\text{s}]$
	ϵ	molarer Extinktionskoeffizient	$[\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$
	ϵ_{NADH}	bei $\lambda = 340 \text{ nm}$	$6300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
	V_{ges}	Volumen des Meßansatzes	$[\text{ml}]$
	V_P	Volumen der Probe	$[\text{ml}]$

2.4.8 Aminosäureanalytik

Die quantitative Bestimmung freier Aminosäuren erfolgte über Umkehrphasenchromatographie (*Reversed-Phase Chromatography*, RPC) mit einem vollautomatischen HPLC-System (*High Performance Liquid Chromatography*) [BÜNTEMEYER, 1988]. Bei der Umkehrphasenchromatographie werden Substanzen aus einem polaren, wässrigen Lösungsmittel über hydrophobe Wechselwirkungen an einer unpolaren stationären Phase zurückgehalten. Dazu werden Trägermatrices eingesetzt, die mit langen Kohlenwasserstoffketten substituiert sind. Die Elution erfolgt mit einem unpolaren organischen Lösungsmittel, das mit den adsorbierten Molekülen um die Bindungsstellen konkurriert. Auflösungsvermögen und Trennkapazität lassen sich dabei durch Veränderungen des Lösungsmittelsystems und des Elutionsgradienten für die jeweiligen Analyten optimieren.

Bei der Reversed-Phase Aminosäureanalytik werden die polaren Aminosäuren in einer integrierten Vorsäulenderivatisierung durch die Kupplung mit einem aromatischen Rest hydrophober und lassen sich ideal an Reversed-Phase-Materialien

trennen. Zudem erhöht der chromo- oder fluorogene Charakter der entstehenden Derivate die Nachweisempfindlichkeit der Analyse, wodurch Detektionsgrenzen von bis zu 50 fmol erreicht werden. Die aufgetrennten Aminosäuren werden in einem UV- oder Fluoreszenzdetektor detektiert und als Chromatogramm auf Basis einer Zeitachse dargestellt. Das Integral der einzelnen Peakflächen ist proportional zur Menge der separierten Derivate. Über den Vergleich mit Standardchromatogrammen, in denen definierte Mengen aller Aminosäuren aufgetrennt sind, lassen sich die Peaks zuordnen und die Aminosäurekonzentrationen einer unbekannt Probe quantifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aminosäureanalytik mit einer RP-C₁₈-Säule (Kromasil C₁₈, 150 × 4 mm, Partikeldurchmesser: 5 μm, Eka Nobel) durchgeführt. Die Derivatisierung und Chromatographie verliefen programmgesteuert mit einem vollautomatischen HPLC-System (BioTek, Neufahrn).

Tabelle 2.13 faßt die Arbeitsvorschrift zusammen und listet die verwendeten Lösungen auf. Da hochmolekulare Substanzen die Analyse erschweren und insbesondere

Tabelle 2.13: HPLC-Aminosäureanalytik Arbeitsvorschrift

Arbeitsschritte				
<i>1. Proteinfällung</i>	50 μl Probe + 50 μl Proteinfällungsreagenz	Zentr.	3 min	15000 × g
<i>2. Alkalisierung</i>	50 μl Überstand + 100 μl Kalium-Boratpuffer	Zentr.	3 min	15000 × g
<i>3. Derivatisierung</i>	20 μl Überstand + 70 μl Derivatisierungsreagenz	Mix	3 min	
<i>4. RP-HPLC</i>	20 μl Injektion ⇒ Trennung über binäres Puffersystem A, B			
Lösungen				
Natrium-Boratpuffer:	6,183 g Borsäure in 100 ml Milli-Q mit 10 M NaOH auf pH 10,4			
Kalium-Boratpuffer:	6,183 g Borsäure in 100 ml Milli-Q mit 10 M KOH auf pH 10,4			
Proteinfällungsreagenz:	300 μM δ-Aminopentanoic Acid (AVA, interner AS-Std.) in 10 % Perchlorsäure			
Derivatisierungsreagenz:	25 mg OPA (<i>ortho</i> -Phthaldialdehyd) + 0,5 ml Methanol + 50 μl 3-Mercaptopropionsäure + 4,5 ml Natrium-Boratpuffer			
Puffer A:	89 % 85 mM Acetat, pH 7,5, 1 % Tetrahydrofuran, 10 % MeOH			
Puffer B:	15 % 85 mM Acetat, pH 5,2, 85 % MeOH			

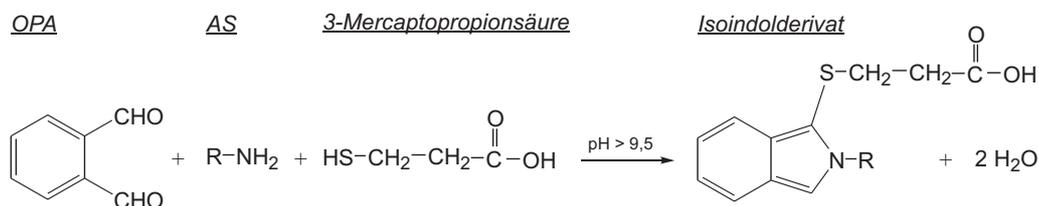


Abbildung 2.12: Derivatisierung von Aminosäuren mit *ortho*-Phthaldialdehyd OPA

bei den stark hydrophoben C₁₈-Matrices zu irreversiblen Schäden führen können, mußten die Proben vorab mit Proteinfällungsreagenz behandelt und zentrifugiert werden. Durch die anschließende Alkalisierung mit einem Boratpuffer wurden die Überstände für die Derivatisierung konditioniert. Diese fand nach dem Prinzip der Vorsäulenderivatisierung als automatisierter Teilschritt der HPLC direkt vor der Chromatographie statt. Die Derivatisierung wurde mit OPA-Reagenz (*ortho*-Phthaldialdehyd) durchgeführt. OPA reagiert ausschließlich mit primären Aminen und bildet im Alkalischen mit Aminosäuren und einer Thiolgruppe ein fluoreszierendes 1-alkylthio-2-alkyl-substituiertes Isoindol (Abb. 2.12). Die auf diese Weise in den zu vermessenden Proben entstandenen Aminosäurederivate wurden während der nachfolgenden RP-Chromatographie auf der Säule zurückgehalten und durch Gradientenelution mit einem binären Puffersystem voneinander getrennt. Ein integrierter Fluoreszenzdetektor (Anregung $\lambda = 340$ nm, Emission $\lambda = 450$ nm) ermöglichte die Dokumentation der separierten Peaks. Eine EDV-gestützte Auswertungssoftware (KromaSystem, BioTek) berechnete abschließend die Aminosäurekonzentrationen in den Proben durch Vergleich mit den Retentionszeiten und Peakflächen von Standardläufen. Aus einem internen Standard (δ -Aminopentanoic Acid, AVA) wurde dabei ein Korrekturfaktor ermittelt, der mögliche Verdünnungsfehler kompensierte.

Mit Hilfe der HPLC-Analytik ließen sich mit Ausnahme von Prolin (sekundäre Aminogruppe, Iminosäure) und Cystein (Quenching der Fluoreszenz) alle im Kulturmedium enthaltenen Aminosäuren quantifizieren. Das Verfahren diente neben der Dokumentation von Kultivierungsverläufen in erster Linie zur Ermittlung der Abreicherung freier Aminosäuren während der Aufarbeitung.

Kapitel 3

Ergebnisse und Diskussion

Ziel der Arbeit war es, mit der Entwicklung einer Peptid-Affinitätsmatrix ein geeignetes Chromatographiematerial für die Aufarbeitung von Proteinen in der Fließbettadsorption herzustellen. Dabei sollte die Methode prinzipiell auf jedes beliebige Zielprotein übertragbar sein, was insbesondere bei der Suche eines brauchbaren Peptidliganden und dessen Kupplung an das basale Chromatographiematerial berücksichtigt werden mußte. Die Studien wurden anhand eines Modellproteins durchgeführt. Es handelte sich dabei um einen monoklonalen Antikörper (Anti-FVIII), der aus Maus/Maus-Hybridomkulturen gewonnen wurde und gegen den Blutgerinnungsfaktor VIII gerichtet war.

Für die Selektion einer hochaffinen Ligandenstruktur wurden Bindungsstudien mit kombinatorischen Peptidbibliotheken auf Basis der Spot-Synthese durchgeführt. Diese haben den Vorteil, daß sie nahezu universell für alle Zielproteine eingesetzt werden können und regenerierbar sind. Bei der Kupplung des Liganden an das Chromatographiematerial wurden mehrere Strategien verfolgt. Als Basalmatrix fungierte NHS-aktivierte SepharoseTM, die zu einem in 1 ml Fertigsäulen vom Typ HiTrapTM vorlag und zum anderen in Form eines speziell für den Einsatz im Fließbett modifizierten Prototyps von der Firma Amersham Pharmacia Biotech zur Verfügung gestellt wurde. Die verschiedenen Herstellungsmethoden geben einen Einblick in die vielseitigen Möglichkeiten, einen Peptidliganden durch gezielte Schutzgruppentaktik oder selektive Kupplungschemie in gewünschter Ausrichtung an einem aktivierten Trägergel zu fixieren.

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen lassen sich in vier aufeinander aufbauende Abschnitte gliedern. Im ersten Kapitel der Ergebnisdiskussion stehen die Versuche zur Selektion eines geeigneten Peptidliganden für die Bindung des Zielproteins im Mittelpunkt. Als zweites werden die unterschiedlichen Kupplungsmethoden zur Herstellung der gebrauchsfertigen Chromatographiemateriali-

en vorgestellt und miteinander verglichen. Im dritten Teil liegt der Schwerpunkt auf den Charakterisierungs- und Aufarbeitungsexperimenten, die mit den 1 ml Festbettsäulen durchgeführt wurden. Dabei steht die Beurteilung der Leistungsfähigkeit der Peptid-Affinitätsmatrices im Vordergrund. Sie wird unter Berücksichtigung verschiedener Kriterien diskutiert, die anhand von Chromatographieläufen und weiterführenden Studien untersucht wurden. Der letzte Abschnitt faßt die Ergebnisse zum fließbettchromatographischen Einsatz des Prototypmaterials zusammen. Neben der Abschätzung des Reinigungserfolgs liegt der Schwerpunkt hier auf den Untersuchungen zum Biomasseverhalten im expandierten Gelbett. Die Ergebnisse werden mit denen anderer Fließbettmatrices verglichen, die im Rahmen des Projekts ebenfalls für die Reinigung des monoklonalen Antikörpers eingesetzt wurden. Dabei handelt es sich um den Ionenaustauscher SP_XL und das Affinitätsgel rProtein A aus der Produktreihe StreamlineTM von Amersham Pharmacia Biotech. Die Gegenüberstellung ermöglichte eine abschließende Beurteilung der Peptid-Affinitätsmatrix und eine schlußfolgernde Abschätzung des Leistungspotentials dieses neuartigen Liganden für die Nutzung in der Fließbettadsorption.

3.1 Selektion eines geeigneten Peptidliganden

Für die Entwicklung der Affinitätsmatrix mußte zunächst eine hochaffine Peptidstruktur gefunden werden, die sich als potentieller Ligand für die chromatographische Aufreinigung des Zielproteins eignete. Die Selektion erfolgte durch Bindungsstudien mit gerasterten Peptidbibliotheken, die in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Ronald Frank in der GBF (Gesellschaft für biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig) mittels Spot-Synthese auf Cellulosemembranen hergestellt wurden. Die prinzipielle Vorgehensweise ist in Kapitel 1.3.2.3 zusammengefaßt. Nachdem der potentielle Ligand gefunden war, wurde die Bindung zu dem monoklonalen Antikörper Anti-FVIII durch Mutationsanalysen der Sequenz charakterisiert.

Die Suche eines geeigneten Peptids beschränkte sich zunächst auf lineare Hexapeptide und hätte bei Mißerfolg gegebenenfalls auf längere oder zyklische Strukturen ausgeweitet werden können. Die Auswahl verlief in drei Selektionszyklen, in denen sukzessive je zwei der sechs Aminosäuren des besten Bindungspartners ermittelt wurden. Die einzelnen Analysen bauten aufeinander auf und setzten sich jeweils aus der Synthese von 400 Peptidspots und dem dazugehörigen Bindungstest mit dem monoklonalen Antikörper zusammen. Die Kandidaten wurden über einen immunologisch-enzymatischen Nachweis durch einen mit alkalischer Phosphatase gekuppelten Anti-Spezies-Antikörper und dem Substrat MTT/BCIP ermittelt. Bei positiver Reaktion bildete sich ein blauer Niederschlag auf den Spots, der durch

densitometrische Analyse Auskunft über die Intensität der Wechselwirkungen zwischen dem Zielprotein und den Peptiden gab.

Mit der angewendeten Methodik konnte das optimale Hexapeptid für die Bindung des Anti-FVIII in nur drei Schritten herausgefunden werden. Obwohl alle 64 Millionen Sequenzvarianten berücksichtigt wurden, ließ sich der Arbeitsaufwand durch die spezielle Kombinatorik in der Spot-Synthese auf die Untersuchung von insgesamt lediglich 1.200 Peptidspots beschränken. Die Ergebnisse der einzelnen Selektionszyklen sind in den folgenden drei Abschnitten dargestellt. Anschließend wird die Bindungscharakteristik anhand der untersuchten Sequenzmutanten vorgestellt und das Peptid durch theoretische Betrachtungen analysiert.

3.1.1 Erster Selektionszyklus

Für den ersten Selektionszyklus stand eine komplette Hexapeptid-Bibliothek zur Verfügung, in der sämtliche 64 Millionen Sequenzvarianten berücksichtigt waren. Sie lagen auf 400 Spots verteilt in Form von Peptidfamilien vor, die sich durch eine charakteristische Aminosäure-Belegung in den Positionen 3 und 4 auszeichneten. Diese waren bekannt und nach dem in Abbildung 2.2 auf Seite 41 dargestellten Schema durch alle dualen Kombinationen der proteinogenen Aminosäuren vertreten. Die übrigen vier Positionen setzten sich in statistisch gleichen Anteilen aus allen 20 Aminosäuren zusammen, so daß das Cellulosepapier jedes strukturell denkbare Hexapeptid enthielt.

Im ersten Selektionszyklus wurden für den Bindungstest mit dem monoklonalen Antikörper Anti-FVIII zwei verschiedene Substrate eingesetzt. Dabei handelte es sich um einen Chemilumineszenz-Farbstoff und MTT/BCIP, die in dieser Reihenfolge nach dem Auftrag des Antikörper/Enzym-Konjugats mit der Spot-Membran inkubiert wurden. Da sich die Testergebnisse der Substrate gegenseitig nicht beeinflussten, konnte auf eine Regeneration zwischen den beiden Anfärbungen verzichtet werden. Stattdessen wurde die Membran nach dem ersten Schritt lediglich in einer gepufferten Lösung gewaschen. Eine vollständige Regeneration nach der in Tabelle 2.2 auf Seite 44 beschriebenen Methode erfolgte erst nach Abschluß des gesamten Bindungstests.

Die Behandlung mit dem Chemilumineszenz-Substrat ermöglichte einen sehr sensitiven Nachweis der Anti-FVIII Bindung. Das Resultat wurde auf einem Röntgenfilm festgehalten und für die Dokumentation digitalisiert. Abbildung 3.1 zeigt eine Aufnahme, die mit einer Belichtungszeit von einer Minute entstanden ist.

Die Schwärzung des Röntgenfilms ließ einige Spots deutlich hervortreten. Besonders intensive Wechselwirkungen zum Zielprotein bestanden mit einer Vielzahl der

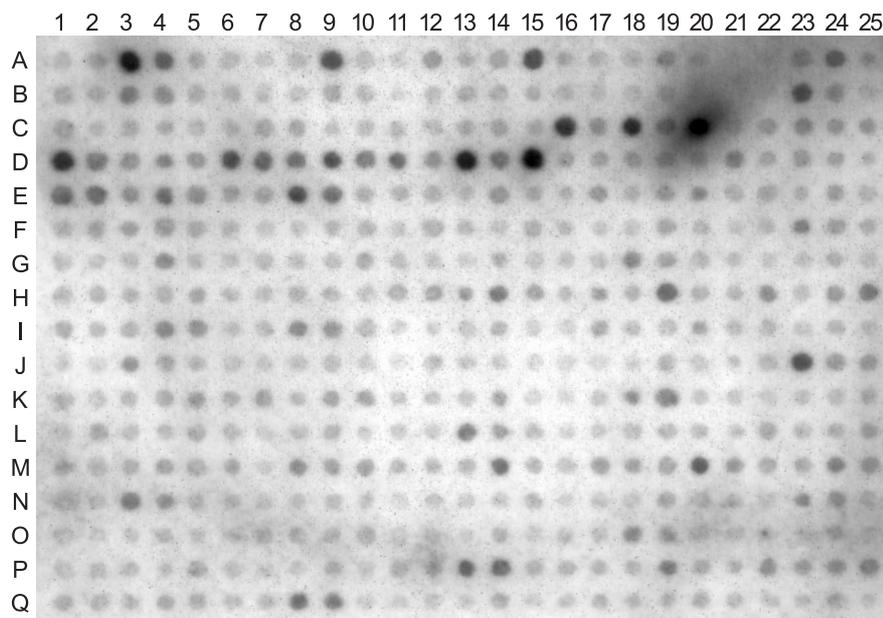


Abbildung 3.1: Chemilumineszenz-Nachweis der Bindung im ersten Selektionszyklus

Peptidfamilien die in der dritten Position mit Glutamat oder Aspartat, also einer sauren Aminosäure belegt waren (C16 - E9). Ferner wurden, wie auch in der obersten Kontrollreihe an Spot A9 und A15 zu sehen ist, rein basische Kombinationen aus Lysin und Arginin angefärbt (H19, H25, M14, M20). Bei diesen sowie den rein sauren konnte jedoch davon ausgegangen werden, daß die Bindung des Anti-FVIII nur auf unspezifischen ionischen Wechselwirkungen beruhte, so daß sie für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt wurden. Auf diese Weise konzentrierte sich die nähere Betrachtung nur noch auf die Peptidfamilien C16, C20, D1 und D15, in denen die Positionen 3 und 4 aus den fixen Aminosäurepaaren Asp-Ala, Asp-Phe, Asp-Met und Glu-Phe bestanden.

Auffällig war die besonders hohe Chemilumineszenz-Aktivität von Spot C20, der Hexapeptide mit dem mittleren Sequenzpaar Aspartat und Phenylalanin enthielt. Auch andere Spots mit ähnlicher Zusammensetzung, d.h. einer sauren und einer aromatischen Aminosäure, waren teilweise sehr stark angefärbt. Als Beispiele sind Glu-Phe, Asp-Trp/Tyr in D15, D9 und D10 oder auch die in umgekehrter Reihenfolge vorliegenden Kombinationen aus Phenylalanin, Tryptophan oder Tyrosin mit jeweils Aspartat oder Glutamat in E8, E9, P13, P14, Q8 sowie Q9 zu nennen. Das Ergebnis deutete darauf hin, daß die mittleren Positionen des Peptidliganden mit einer sauren und einer aromatischen Aminosäure belegt werden mußten.

Im Vergleich zum Nachweisverfahren mit dem Chemilumineszenz-Substrat lieferte die anschließende Inkubation mit MTT/BCIP ein wesentlich signifikanteres Resultat.

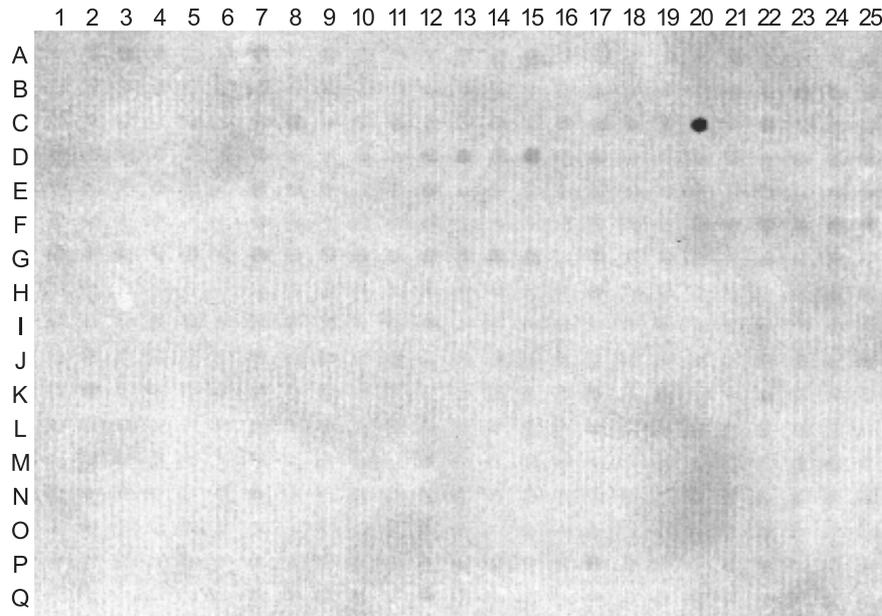


Abbildung 3.2: Nachweis der Anti-FVIII Bindung im ersten Selektionszyklus mit MTT/BCIP

Abbildung 3.2 zeigt eine digitalisierte Aufnahme der Cellulosemembran. Mit dem unempfindlicheren MTT/BCIP Substrat wurde lediglich ein Spot angefärbt. Es handelte sich dabei um die bereits im ersten Test besonders stark hervortretende Peptidfamilie C20. Somit stand fest, daß mit Aspartat und Phenylalanin in den Positionen 3 und 4 eine maximale Bindung des Zielproteins erreicht werden konnte. Diese Information wurde im zweiten Selektionszyklus verwertet, in dem diese Aminosäuren nicht mehr variiert sondern für alle weiteren Spot-Synthesen als fix gesetzt wurden.

3.1.2 Zweiter Selektionszyklus

Die Spot-Synthese für den zweiten Selektionszyklus erfolgte nach dem gleichen kombinatorischen Prinzip wie im ersten Test. Die mittleren Positionen waren nun bekannt und wurden in allen 400 Spots durch Aspartat und Phenylalanin besetzt. Die Aufklärung der optimalen Ligandenstruktur konzentrierte sich in diesem Schritt auf die umliegenden Positionen 2 und 5 des Hexapeptids. Sie wurden wieder nach dem in Abbildung 2.2 auf Seite 41 dargestellten Schema durch alle Variationspaare der 20 Aminosäuren ersetzt. Der Einsatz komplexer Mischungen beschränkte sich somit auf die Synthesepositionen 1 und 6.

Da die Sequenz der Peptide in diesem Fall schon zu einem Drittel auf die Bindung des Zielproteins abgestimmt war, konnte mit stärkeren Wechselwirkungen zum

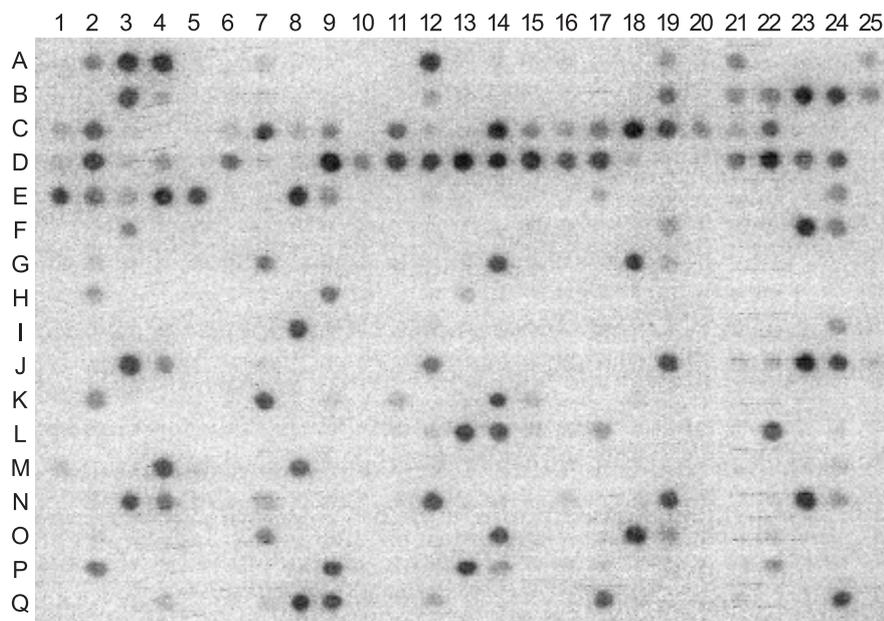


Abbildung 3.3: Nachweis der Anti-FVIII Bindung im zweiten Selektionszyklus mit MTT/BCIP

Anti-FVIII gerechnet werden. Aus diesem Grund wurde auf den sensitiven Nachweis mit dem Chemilumineszenz-Substrat verzichtet und der Bindungstest direkt mit MTT/BCIP durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

Wie erwartet wurden wesentlich mehr Spots als im ersten Selektionszyklus angefärbt. Die intensivsten und meisten Wechselwirkungen lagen im Rasterbereich zwischen den Spots C16 und E5 vor, in dem die zweite Position der Peptidfamilien mit einer sauren Aminosäure belegt war. Gleiches galt umgekehrt für die fünfte Position und insbesondere für die Spots, in denen die Peptide an dieser Stelle Aspartat enthielten.

Zur Quantifizierung der Bindungsstärke zwischen dem Anti-FVIII und den einzelnen Spots wurde die Cellulosemembran desitometrisch analysiert. Das Resultat ist in Abbildung 3.4 wiedergegeben, in der die Farbintensitäten der einzelnen Spots in einem gerasterten Diagramm dargestellt sind. Die Aufteilung entspricht nicht der Reihenfolge der Spots auf dem Cellulosepapier, sondern einer systematischen Anordnung der Kombinationen, die sich aus der Gegenüberstellung der Aminosäure-Belegung in den Positionen 2 (0_1) und 5 (0_2) ergaben. Zusätzlich erstellte die Software eine Liste, in der der Grad der Anfärbung in dimensionslosen Einheiten (*Dye Units*) beziffert wurde. Der höchste Wert und folglich die stärkste Bindung lag für Spot D13 vor, in dem Position 2 der Peptide mit Glutamat und Position 5 mit Aspartat belegt waren.

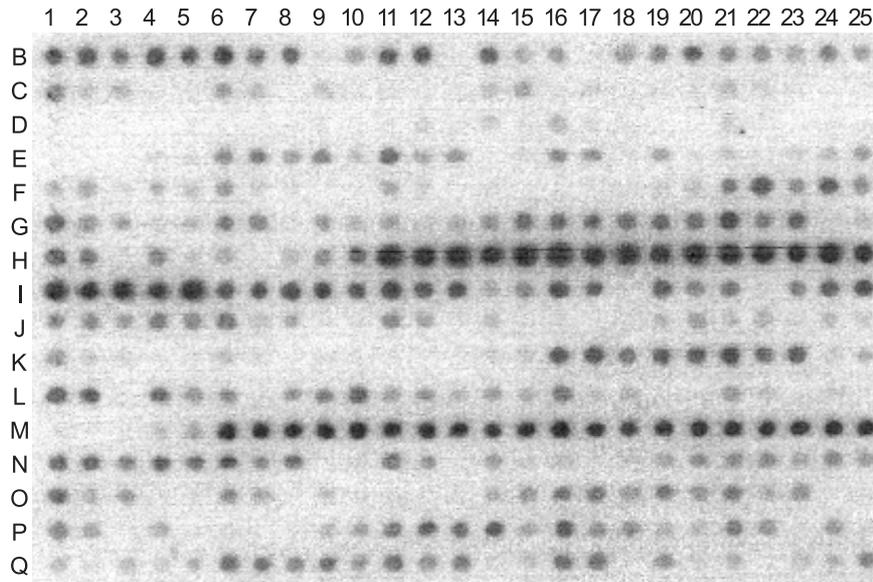


Abbildung 3.5: Nachweis der Anti-FVIII Bindung im zweiten Selektionszyklus mit MTT/BCIP

zigen Peptidsequenz zusammen. Somit konnte aus diesem Bindungstest mit dem monoklonalen Antikörper direkt der beste Kandidat für die Ligandenstruktur abgelesen werden. Abbildung 3.5 zeigt die Cellulosemembran nach der MTT/BCIP Inkubation. Obwohl etwa 50 % der Spots eine mehr oder weniger starke Anfärbung auf

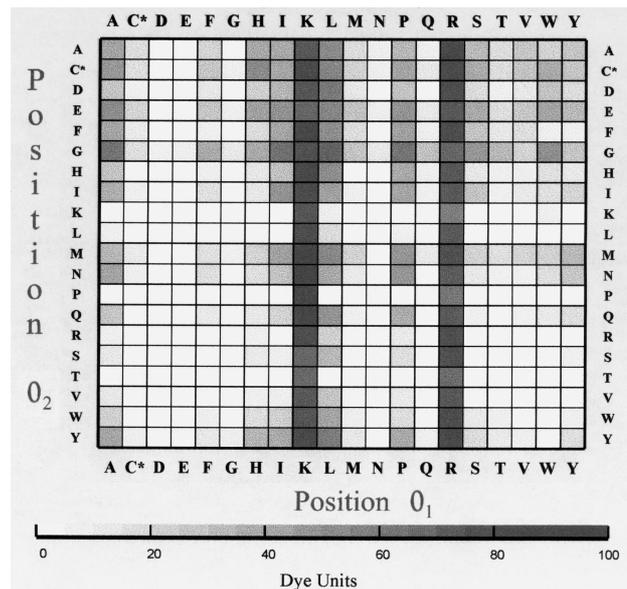


Abbildung 3.6: Densitometrische Analyse der Spotmembran im dritten Selektionszyklus. Alle Peptide mit den Aminosäuren Lysin (K) oder Arginin (R) in der ersten Position (0_1) wiesen eine sehr intensive Anfärbung auf.

aufwiesen, ließ sich das Ergebnis durch deutliche Auffälligkeiten interpretieren. Aus dem Färbungsmuster traten die Bereiche H11 bis I5 und M6 bis M25 besonders hervor. Sämtliche Spots dieser Reihen zeichneten sich durch eine sehr intensive Reaktion mit dem Anti-FVIII aus. Gemeinsames Charakteristikum der zugrundeliegenden Peptide war die Belegung mit einer basischen Aminosäure in der ersten Sequenzposition. Das in Abbildung 3.6 dargestellte Resultat der densitometrischen Analyse veranschaulicht die Zusammenhänge noch prägnanter. Demnach lag für alle Peptide mit einem N-terminalen Lysin oder Arginin eine sehr starke Wechselwirkung mit dem Zielprotein vor, während die Besetzung der sechsten Aminosäure nahezu keinen Einfluß auf die Intensität der Bindung hatte.

Anhand der bisherigen Ergebnisse konnte die Auswahl eines geeigneten Liganden somit auf wenige Kandidaten beschränkt werden. Die besten Bindungspartner für die bevorstehende Chromatographie des monoklonalen Antikörpers waren durch die 40 Hexapeptide gegeben, die sich aus einem Lysin oder Arginin in Position 1, gefolgt von der Sequenz Glutamat-Aspartat-Phenylalanin-Aspartat und einer beliebigen Aminosäure am C-Terminus zusammensetzten. Die letzte Entscheidung fiel durch den Vergleich mit der Sequenz des Blutgerinnungsfaktors VIII, die in Abbildung 3.7 wiedergegeben ist und das Antigen des Immunglobulins darstellt. Genau an einer Stelle bestand eine vollständige Übereinstimmung mit einem der selektionierten Peptidkandidaten. Es handelte sich dabei um die schwarz unterleg-

1	MQIELSTCFF	LCLLRFCFSA	TRRYLGAWE	LSWDYMQSDL	GELPVDARFP	PRVPKSFPPN	TSVVYKKTFL	VEFTDHLFNI	80
81	AKPRPPWML	LGPTIQAEVY	DTVVITLKNM	ASHPVSLHAV	GVSYWKASEG	AEYDDQTSQR	EKEDDKVFPG	GSHTYVWQVL	160
161	KENGPMAADP	LCITYSYLSH	VDLVKDLNSG	LIGALLVCRE	GSLAKEKTQT	LHKFILLFAV	FDEGKSWHSE	TKNSLMQDRD	240
241	AASARAWPKM	HTVNGYVNR	LPGLIGCHRK	SVYWHVIGMG	TPEVHSIFL	EGHTFLVRNH	RQASLEISPI	TFLTAQTLML	320
321	DLGQFLFCH	ISSHQHDGME	AVKVDSCPE	EPQLRMKNNE	EAEDYDDDLT	DSEMDVVRFD	DDNSPSFTQI	RSVAKKHPKT	400
401	WVHYIAAEEE	DWDYAPLVLA	PDDRSYKSOY	LNNGPQRIGR	KYKVRVFMAY	TDETFKTREA	IQHESGILGP	LLYGEVGDTL	480
481	LIIFKNQASR	PYNIYPHGIT	DVRPLYSRRL	PKGVKHLKDF	PILPGEIFKY	KWTVTVEDGP	TKSDPRCLTR	YYSFVNMER	560
561	DLASGLIGPL	LICYKESVDQ	RGNQIMSDKR	NVILFSVFDE	NRSWYLTENI	QRFLPNPAGV	QLEDEPEFQAS	NIMHSINGYV	640
641	FDSLQLSVCL	HEVAYWYILS	IGAQTDFLSV	FFSGYTFKHK	MVYEDTLTLF	PFSGETVFMS	MENPGLWILG	CHNSDFNRNG	720
721	MTALLKVSSC	DKNTGDYED	SYEDISAYLL	SKNNAIEPRS	FSQNSRHPST	RQKQFNATTI	PENDIEKTD	WFAHRTMPK	800
801	IQNVSSDLL	MLLRQSPTPH	GLSLSDLQEA	KYETFSDDP	PGAIDSNNSL	SEMTHFRPQL	HHSGDMVFTP	ESGLQLRLNE	880
881	KLGTAAATEL	KKLDFKVSST	SNNLISTIPS	DNLAAGTDNT	SSLGPPSMPV	HYDSQLDRTL	FGKSSPLTE	SGGPLSLSEE	960
961	NNSKLLSESG	LMNSQESSWG	KNVSTESGR	LFGKRAHGP	ALLTKDNALF	KVISLCLKTN	KTSNNSATNR	KTHIDGPSLL	1040
1041	IENSPSVWQN	ILESDFEFK	VTPLIHDRML	MDKNATALRL	NHMSNKTTS	KMEMVQKK	EGPIPPDAQN	PDMSEFFKMLF	1120
1121	LPESARWIQR	THGKNSLNSG	QGPSKQLVS	LGPEKSVVEG	NFLSEKNKVV	VKGGEFTKDV	GLKEMVFPSS	RNFLTLNLDN	1200
1201	LHENNTHNQE	KKIQEIEKK	ETLIQENVVL	POIHTVTGK	NFMKNLFLS	TRQNVESYD	GAYAPVLQDF	RNLNDSTNRT	1280
1281	KKHTAHFSK	GEEENLEGL	NQTKQIVEKY	ACTRISPN	SQQNFVTRQ	KRALQKFRLP	LEETELEKRI	IVDDTSTQWS	1360
1361	KNMKHLFPST	LTQIDYNEKE	KGAITQSPLS	DCLTRSHSIP	QANRSLPIA	KVSSFPSIRP	IYLRVFLQD	NSSHLPAASY	1440
1441	RKDKSGVQES	SHFLQGAKKN	NLSLAILTLE	MTGDQREVG	LGTSATNSVT	YKKVENTVLP	KPDLPKTSGK	VELLPKVHIY	1520
1521	QKDLFPTETS	NGSPGHLDLV	EGSLLQGTG	AIKWNEANRP	GKVPFLRVAT	ESSAKTPSKL	LDPLAWDNHY	GTQIPKEEWK	1600
1601	SQEKSPKTA	FKKDTILSL	NACESNHAIA	AINEGQNKPE	IEVTWAKQGR	TERLCSQNP	VLKRHRQREIT	RTTLQSDQEE	1680
1681	IDYDDTISVE	MKEDFDIYD	EDENQSPRSF	QKKTRHYFIA	AVERLWDYGM	SSSPHVLNRN	AQSGSVQPK	KVVFQFTD	1760
1761	SFTQPLYRGE	LNEHLGLLGP	YIRAEVEDNI	MVTFRNQASR	PYSFYSSLIS	YEEDQRQGA	PRKNFVKPNE	TKTYFWKVQH	1840
1841	HMAPTKDEFD	CKAWAYFSDV	DLEKDVHSGL	IGPLLVCHTN	TLNPAHGRQV	TVQEFALFFT	IFDETKSWYF	TENMERNCR	1920
1921	PCNIQMEDPT	FKENYRFHAI	NGYIMDTLPG	LVMAQDQRIR	WYLLSMGSNE	NIHSIHFSGH	VFTVRKKEEY	KMALYNLYPG	2000
2001	VFTVEMLPS	KAGIWRVECL	IGEHLHAGMS	TLFLVYSNKC	QTPGLMAGSH	IRDFQITASG	QYQWAPKLA	RLHYSGSINA	2080
2081	WSTKEPFSWI	KVDLLAPMII	HGIKTQGARQ	KFSSLYISQF	IIMYSLDGKK	WQTYRGNSTG	TLMVFFGNVD	SSGIKHNI	2160
2161	PPIIARYIRL	HPTHYSIRST	LRMELMGCDL	NSCSMPLGME	SKAISDAQIT	ASSYFTNMFA	TWSPSKARLH	LQGRSNAWRP	2240
2241	QVNNPKEWLQ	VDFQKTMKVT	GVTTQGVKSL	LTSMYVKEFL	ISSSQDGHQW	TLFFQNGKVK	VFQGNQDSFT	PVNSLDPL	2320
2321	LTRYLRIRHPQ	SWWHQIALRM	EVLGCEAQDL	Y					

Abbildung 3.7: Aminosäuresequenz des Blutgerinnungsfaktors VIII. Grau unterlegt: Bindungsdomäne des von Willebrand Faktors; schwarz unterlegt: potentieller Ligandenkandidat.

te Sequenz KEDFDI (Lys-Glu-Asp-Phe-Asp-Ile). Nach Literaturrecherchen stellte sich heraus, daß dieser Abschnitt des Gerinnungsfaktors in der Bindungsdomäne des *von Willebrand Faktors* liegt, die sich zwischen den Aminosäuren 1.669 und 1.708 des Moleküls befindet und in der Abbildung grau unterlegt ist [BOUMA, 1998; MAZURIER, 2001]. Die Region zeichnet sich somit unter nativen Bedingungen durch eine gute Zugänglichkeit und eine hohe Reaktivität aus, die sie wiederum zu einem idealen Angriffspunkt für die Antikörperbildung in Immunreaktionen machen. Aus diesem Grund konnte mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, daß es sich bei der Sequenz KEDFDI zumindest um ein Teilstück des antigenen Epitops für den Anti-FVIII handelte. Diese Annahme wurde nachträglich von einem Mitarbeiter der Herstellerfirma bestätigt, was die Zuverlässigkeit der Methode für die Selektionierung des Affinitätsliganden bewies.

Obwohl aus der dritten Bindungsstudie eine Gruppe von 40 strukturverwandten Hexapeptiden hervorging, die einen etwa gleichwertigen Chromatographieerfolg erwarten ließen, fiel die Wahl des endgültigen Peptidliganden aufgrund der Analogie zum Antigen auf die Sequenz Lys-Glu-Asp-Phe-Asp-Ile.

3.1.4 Untersuchung von Sequenzmutationen

Um die Bindung zwischen dem ermittelten Liganden KEDFDI und dem Zielprotein näher zu charakterisieren, wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Ronald Frank Untersuchungen mit Varianten der ursprünglichen Peptidsequenz durchgeführt. Die Herstellung der Mutanten erfolgte wieder mittels Spot-Synthese, und auch die Bindungsstudien mit dem monoklonalen Antikörper glichen denen aus den Selektionstests.

In der sogenannten Motivsuche werden systematisch einzelne Positionen der Originalsequenz durch eine Mischung aller 20 Aminosäuren (X) ersetzt. Das Ziel besteht darin, die für die Bindung des Proteins entscheidenden Aminosäuren zu ermitteln. Üblicherweise arbeitet man dabei nach einem Syntheschema, in dem zunächst nur eine und dann schrittweise jeweils eine zusätzliche X-Position eingefügt wird, bis keine Stelle der Struktur mehr mit einer reinen Aminosäure belegt ist. Dabei werden sämtliche Sequenzpositionen und alle sich daraus ergebenden Möglichkeiten der X-Verteilung berücksichtigt und durch je einen Spot repräsentiert. Die Auswertung erfolgt nach einem Bindungstest durch densitometrische Analyse und Vergleich der Farbtintensitäten.

Abbildung 3.8 gibt das Ergebnis der Motivsuche für die Sequenz KEDFDI und den Anti-FVIII wieder. Die Darstellung ist in sieben Blöcke unterteilt, die die Resultate systematisch nach der Anzahl der X-Positionen zusammenfassen. Die gestreiften

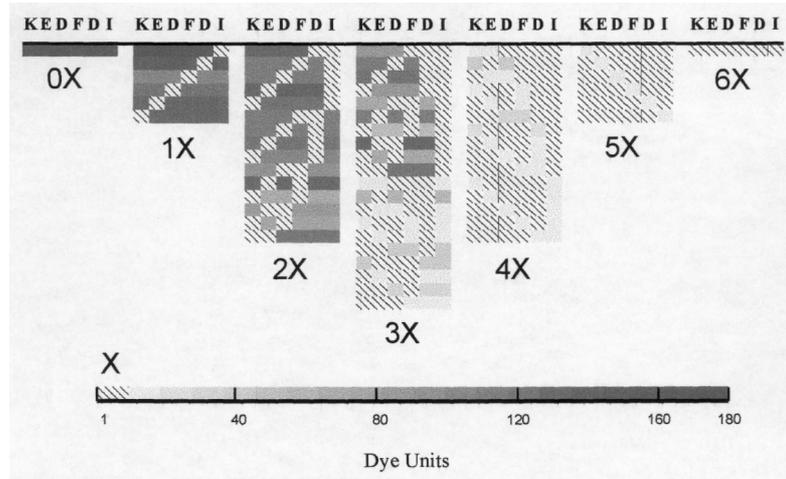


Abbildung 3.8: Motivsuche: Beeinflussung der Bindungsintensität durch Einfügen von X-Positionen in die Originalsequenz

Quadrate zeigen die Stellen an, an denen die Originalsequenz durch das Aminosäuregemisch ersetzt wurde. Demnach enthielt das im letzten Block repräsentierte Peptid nur noch X-Positionen. Es diente bei der Auswertung der densitometrischen Analyse als Blindwert, dem der Wert 1 zugeordnet wurde. Aus der Farbintensität der übrigen Reihen läßt sich somit die entsprechend erhöhte Wechselwirkung zwischen den einzelnen Mutanten und dem Zielprotein ablesen.

Die stärkste Anfärbung lag wie erwartet für die unveränderte Sequenz KEDFDI ohne X-Positionen vor. Die Bindungsintensität war im Vergleich zu dem undefinierten 6X-Peptidgemisch um den Faktor 180 erhöht. Die Darstellung in Abbildung 3.8 läßt deutlich erkennen, daß sich die Wechselwirkungen zum Anti-FVIII mit zunehmender Anzahl der X-Positionen sukzessive verschlechterte. Während die Anfärbung in den 1X-Reihen noch relativ hoch war, nahm sie in den folgenden Blöcken immer weiter ab, bis für die Sequenzen ab vier X-Positionen keine signifikante Bindung mehr vorlag.

Aus den ersten vier Blöcken läßt sich keine eindeutige Motivabhängigkeit erkennen. Das Fehlen einer bestimmten Aminosäure führte nicht zwangsläufig zu einer vollständigen Aufhebung des Bindungsvermögens. Auffällig ist lediglich, daß das C-terminale Isoleucin nahezu keinen Einfluß auf die Intensität der Wechselwirkungen hatte. Dies wird durch den Vergleich ähnlich strukturierter Mutationssequenzen in nebeneinander liegenden Blöcken deutlich. Die Reihen mit gleichen X-Kombinationen weisen unabhängig von einem zusätzlichen Austausch des Isoleucins kaum Unterschiede in ihrer Anfärbung auf. Besonders anschaulich wird dies in der Gegenüberstellung der Originalsequenz mit der ersten Reihe im 1X-

Block, in der ausschließlich das Isoleucin durch ein Aminosäuregemisch ersetzt wurde. Die densitometrische Analyse ergab in beiden Fällen einen Färbungsgrad von 180 Einheiten, so daß für die KEDFDX-Sequenz keinerlei Beeinflussung der Bindungsstärke festgestellt werden konnte. Im Gegensatz dazu führte das Fehlen der übrigen Aminosäuren jeweils zu einer mehr oder weniger starken Einschränkung der Wechselwirkungen. Aus den Ergebnissen läßt sich jedoch insbesondere im Hinblick auf die Blöcke 2X und 3X keine Wichtung einzelner Sequenzpositionen oder -kombinationen vornehmen.

In einer zweiten Mutationsstudie wurde eine Austausch-Analyse durchgeführt. Im Unterschied zur Motivsuche werden die einzelnen Positionen der Originalsequenz in diesem Fall nicht durch Gemische sondern durch Reinformen anderer Aminosäuren ersetzt. Der Austausch erfolgt jeweils nur an einer Stelle, wobei alle 20 proteino-genen Aminosäuren in separaten Spots berücksichtigt werden. Ein anschließender Bindungstest gibt Auskunft über die Bedeutung der Besetzung einzelner Positionen und läßt besser und schlechter geeignete Sequenzmutanten erkennen.

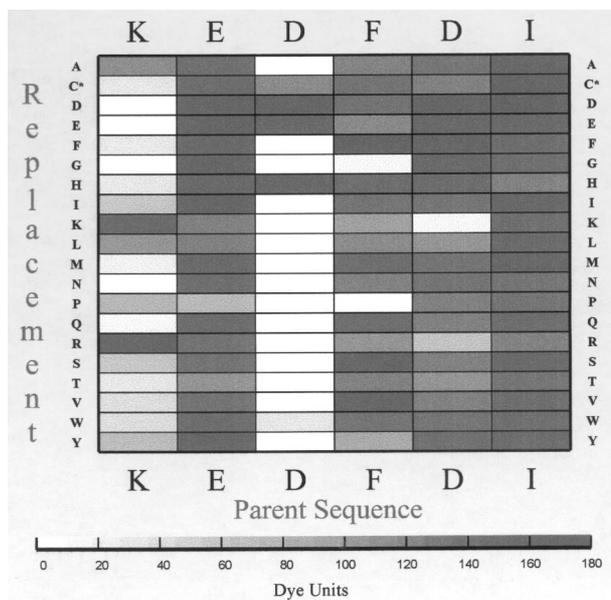


Abbildung 3.9: Austausch-Analyse: Beeinflussung des Bindungsverhaltens durch gezielten Austausch einzelner Aminosäuren der Originalsequenz

Abbildung 3.9 gibt das Ergebnis der densitometrischen Analyse aus den Austausch-Experimenten mit der Ligandensequenz wieder. Deutlich zu erkennen ist, daß ein Großteil der vorgenommenen Mutationen keinen bzw. nur wenig Einfluß auf die Bindung des Anti-FVIII hatte. Die Anfärbung der einzelnen Felder unterscheidet sich in vielen Fällen nur unwesentlich von der Originalsequenz, die durch die Sy-

stematik des AS-Austauschs in jeder der sechs Spalten einmal vertreten ist.

Auffallend ist die geringe Variationsmöglichkeit der ersten und der dritten Aminosäure, deren Belegung somit essentiell für die Bindung des Zielproteins war. Der Austausch des N-terminalen Lysins führte in fast allen Fällen zu einer drastischen Abschwächung der Wechselwirkungen. Die einzige Ausnahme bildete in Übereinstimmung mit den Resultaten aus dem dritten Selektionszyklus das ebenfalls basische Arginin. Es stellt aufgrund seiner ähnlich aufgebauten Seitenkette einen gleichwertigen Ersatz für das Lysin dar.

Noch prägnanter sind die Ergebnisse der Mutationsanalyse mit dem ersten Aspartat. Fast jeder Aminosäure-Austausch resultierte in einem vollständigen Verlust des Bindungsvermögens. Wie beim Lysin konnte auch hier nur durch eine chemisch verwandte Aminosäure (Glutamat) eine mit der Originalsequenz vergleichbar starke Interaktion zum Anti-FVIII aufrecht erhalten werden.

Nicht erklärbar sind die intensiven Anfärbungen der in dieser Position mit Cystein oder Histidin besetzten Peptide. Da das Ergebnis außerdem im Widerspruch zu den Resultaten aus dem ersten Selektionszyklus steht, in dem keine Bindung für eine Cystein- oder Histidin-haltige Sequenz nachgewiesen wurde, wird es in diesem Zusammenhang als Artefakt bewertet und nicht weiter berücksichtigt.

Im Vergleich zu der ersten und dritten Position des Hexapeptids kommt den übrigen Aminosäuren eine wesentlich geringere Bedeutung zu. Sie lassen sich durch zahlreiche andere Aminosäuren ersetzen, ohne daß die Bindungsintensität signifikant geschwächt wird. Die Wechselwirkungen werden im wesentlichen nur dann beeinflusst, wenn eine zur Originalbesetzung vollkommen gegensätzliche Aminosäure eingesetzt wird. Dies gilt beispielsweise für den Austausch des zweiten Aspartats gegen die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin.

Eine weitere Auffälligkeit lag für den Einbau von Prolin vor, der in den ersten vier Positionen und somit selbst im Fall des gut ersetzbaren Glutamats zu starken Einschränkungen der Anti-FVIII Bindung führte. Dieses Phänomen kann durch den besonderen Aufbau des Prolins erklärt werden, dessen Seitenkette außer mit dem α -Kohlenstoffatom zusätzlich mit dem Stickstoffatom der Aminogruppe verbunden ist. Die entstehende Ringanordnung hat einen erheblichen Einfluß auf die Sekundärstruktur des Peptids und kann die räumliche Einpassung des Antikörpers soweit eingeschränkt haben, daß die Bindung verhindert wurde.

Sämtliche Felder der letzten Spalte in Abbildung 3.9 weisen eine nahezu gleich hohe Farbintensität auf. Somit hatte der Austausch des C-terminalen Isoleucins im Vergleich zu allen anderen Sequenzpositionen die geringsten Auswirkungen auf das Bindungsverhalten. Dieses Ergebnis bestätigt die Aussagen aus dem dritten Selektionszyklus und der Motivanalyse. Dies läßt sich auf zweierlei Weise erklären.

Zum einen kann die letzte Aminosäure bereits außerhalb der Bindungsregion des Antikörpers gelegen haben oder zum anderen durch die sterischen Bedingungen auf der Cellulosemembran für das Zielprotein schlecht zugänglich gewesen sein.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Mutationsanalysen zeigt, daß die Bindung zwischen dem Hexapeptid und dem Anti-FVIII in erster Linie auf den Interaktionen seitens des Lysins, der beiden Asparaginsäuren und des Phenylalanins beruht. Somit ist anzunehmen, daß vorwiegend elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und ferner über das Phenylalanin auch hydrophobe Assoziationen beteiligt sind.

Die Abfolge der Aminosäuren in der Peptidsequenz ist von entscheidender Bedeutung. Während durch die ursprüngliche Reihenfolge ein optimaler Bindungspartner gegeben war, führte beispielsweise der Austausch einer sauren gegen eine basische Aminosäure und umgekehrt in allen Fällen zu einer nahezu vollständigen Aufhebung der Wechselwirkungen. Auch die Tatsache, daß eine Veränderung der Sekundärstruktur durch den Einbau von Prolin die Bindung stark beeinflusste, spricht für die Existenz eines exakt auf das Peptid abgestimmten Epitops in der Sequenz des Antikörpers. Somit konnte davon ausgegangen werden, daß die Wechselwirkungen von sehr spezifischer Natur waren, wodurch das ermittelte Hexapeptid als ein geeigneter Ligand für die affinitätschromatographische Aufreinigung des Anti-FVIII eingestuft werden konnte.

Obwohl der Austausch einzelner Aminosäuren des Peptids die Bindungsintensität nachweislich nicht verringerte, wurde bei der Festlegung der finalen Ligandenstruktur die ursprüngliche Sequenz KEDFDI gewählt. Eine Veränderung erschien nach Abschätzung der zu erwartenden Stabilität des Peptids und mangels ökonomischer Vorteile nicht notwendig. Eine Ausnahme bildete die C-terminale Position der Sequenz, die für die Realisierung einer gerichteten Kupplung an das Chromatographiematerial teilweise durch eine andere Aminosäure ersetzt wurde. Ein Einfluß auf das Bindungsverhalten war jedoch aufgrund der Ergebnisse aus den Mutationsanalysen nicht zu erwarten. Im folgenden Abschnitt werden alle Sequenzvarianten, die als Peptidligand zum Einsatz kamen, vorgestellt und charakterisiert.

3.1.5 Theoretische Charakterisierung der Peptidliganden

Für die Herstellung der Peptidaffinitätsmatrices wurden ausgehend von der selektierten Sequenz KEDFDI zwei weitere Hexapeptide mit leicht veränderter Aminosäurezusammensetzung eingesetzt. Die Alternativstrukturen unterschieden sich jedoch lediglich in der Besetzung der sechsten Position voneinander. Anstelle des ursprünglichen Isoleucins wurde ein Lysin bzw. ein Cystein eingebaut, deren Sei-

tenketten für eine spezielle Kupplungschemie bei der Herstellung der Affinitätsmatrices ausgenutzt werden konnten. Abbildung 3.10 gibt die Struktur der drei Sequenzvarianten wieder.

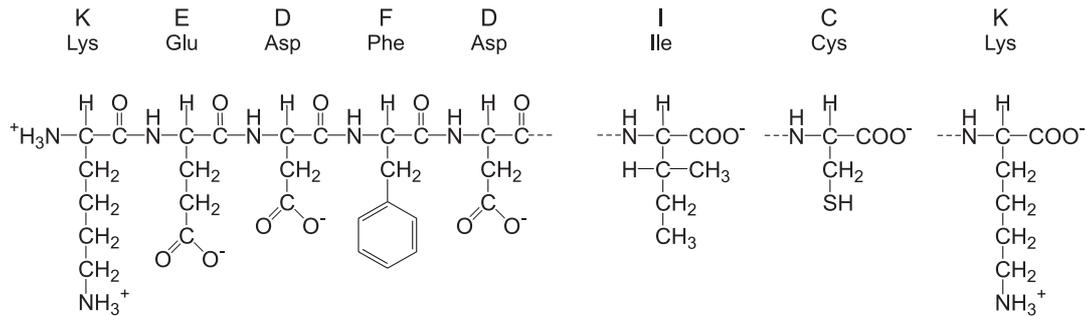


Abbildung 3.10: Struktur der Sequenzvarianten des Peptidliganden

Da für einige der ausgearbeiteten Kupplungsstrategien bestimmte Eigenschaften der Peptide bekannt sein mußten, wurden die Sequenzen mittels theoretischer Berechnungen charakterisiert. Auf den Internetseiten des *Atelier BioInformatique de Marseille* (A.B.I.M.) der Universität der Provence in Marseille werden kostenlose Online-Dienste angeboten, mit denen sich proteinogene Sequenzen analysieren lassen. Diese wurden für die Ermittlung des Molekulargewichts und die Bestimmung des isoelektrischen Punkts *pI* sowie der pH-abhängigen Ladungscharakteristik der Peptide genutzt.

Tabelle 3.1: Charakteristische Größen der Ligandsequenzen

	KEDFDI	KEDFDC	KEDFDK
<i>Molekulargewicht MW</i>	765,8 Da	755,8 Da	780,8 Da
<i>Isoelektrischer Punkt pI</i>	3,86	3,86	4,21

Tabelle 3.1 faßt die Informationen zusammen. Die Abhängigkeit der Molekülladung vom pH-Wert ist aus den Titrationskurven in Abbildung 3.11 ersichtlich. Die theoretischen Berechnungen basieren laut Dienstleister auf folgenden *pK*-Werten: α -NH₃ 9,69; α -COOH 2,34; Lys 10,50; Glu 4,25; Asp 3,86 und Cys 8,33. Die charakteristischen Eigenschaften der Peptide weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Sie sind mit 755 bis 780 Da nahezu gleich groß und werden durch ähnliche isoelektrische Punkte bei etwa pH 4 gekennzeichnet. Alle drei Titrationskurven verlaufen steil über ihren *pI* hinweg aus dem positiven in den negativen

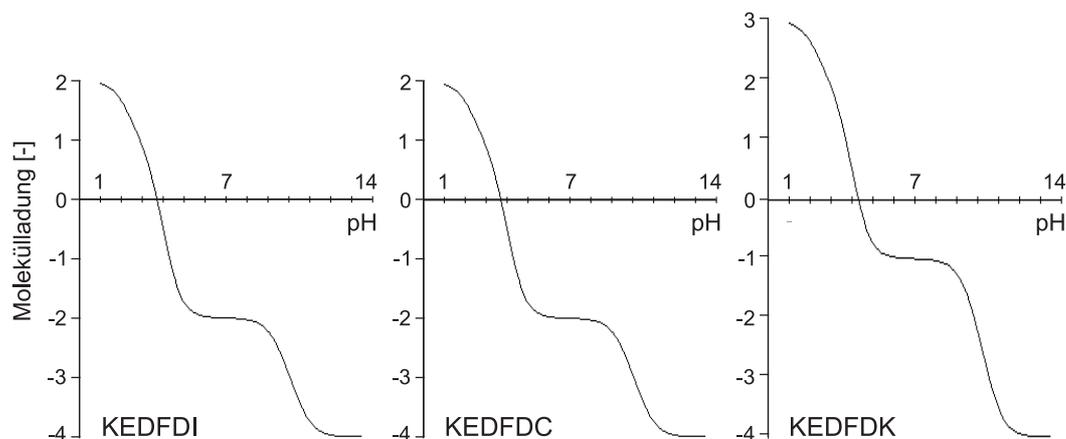


Abbildung 3.11: Theoretisch berechnete Titrationskurven der Ligandsequenzen

Bereich und nehmen zwischen pH 5 und 9 ein Plateau ein. Unter zunehmend basischeren Verhältnissen wird die Molekülladung dann rapide negativer, bevor sie ab pH 11 auf einem konstanten Wert stagniert.

Während die Titrationskurven der Sequenzen KEDFDI und KEDFDC völlig deckungsgleich verlaufen, weist die Variante KEDFDK ein leicht verändertes Ladungsmuster in Abhängigkeit vom pH-Wert auf. Dies betrifft in erster Linie die Verlagerung des Plateauabschnitts in einen um etwa eine relative Einheit weniger negativ geladenen Bereich. Die Ergebnisse aus den Mutationsanalysen in Abschnitt 3.1.4 sprechen jedoch nicht dafür, daß dieser Unterschied zu einem verschlechterten Bindungsvermögen des Antikörpers führt. Außerdem muß berücksichtigt werden, daß die Resultate aus den theoretischen Berechnungen nur bedingt die realen Verhältnisse widerspiegeln. Dabei findet die Integration der letzten Aminosäure in den Kupplungsverbund mit der Basalmatrix beispielsweise keine Berücksichtigung. Da im Fall der KEDFDK Sequenz die Fixierung an das Chromatographiematerial über die NH_2 -Gruppe in der Seitenkette des C-terminalen Lysins erfolgte, war der Peptidligand um eine positive Ladung reduziert. Es ist anzunehmen, daß sich die Titrationskuve unter diesen Umständen in den negativen Bereich verschiebt und dem Ladungsmuster der beiden anderen Sequenzen annähert.

Das mittlere Plateau im Kurvenverlauf zwischen pH 5 und 9 deutet darauf hin, daß die Antikörperbindung der Peptidliganden in weiten Bereichen vom pH-Wert unabhängig ist. Da Zellkulturen im allgemeinen einen pH-Wert von 6,5 bis 7,5 aufweisen, schien eine exakte Konditionierung der Proben für die geplanten Aufarbeitungsexperimenten nicht notwendig. Detailliertere Untersuchungen zu dieser Thematik werden jedoch erst in Abschnitt 3.3.1 ausführlich dokumentiert.

Die theoretische Charakterisierung der Sequenzen ermöglichte neben der Abschätzung des pH-abhängigen Bindungsverhaltens eine molare Quantifizierung der eingesetzten Peptidmengen sowie die Festlegung der Puffersysteme für die Kupplungsprozesse.

3.1.6 Zusammenfassung

Die Kombination der Spot-Synthese auf Cellulosemembranen in Verbindung mit einer geeigneten X-Strategie und einem unkomplizierten immunologisch/enzymatischen Testsystem für den Bindungsnachweis führte schnell und zuverlässig zur Auffindung eines potentiellen Peptidliganden für die chromatographische Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers.

Die Suche basierte auf gerasterten Teilbibliotheken aus linearen Hexapeptiden. Die Wahl fiel auf diese Strukturen, da sie in ihrem Aufbau und ihrer Kettenlänge noch als sehr stabil eingestuft werden können, und ihnen gleichzeitig bereits ein gewisses Potential zur Ausbildung spezifischer Wechselwirkungen zugeschrieben werden konnte. Das Ausmaß der Komplexität eines Peptids beeinflussen die Stabilität und die Spezifität im allgemeinen entgegensätzlich. Je komplizierter und häufig auch größer der Aufbau eines Moleküls ist, umso instabiler wird es; die Möglichkeiten der Interaktionen werden dagegen spezifischer. Für die Auswahl eines Affinitätsliganden mußte der Kandidat beide Bedingungen erfüllen. Aus diesem Grund beschränkte sich die Suche zunächst auf kleine, einfache Sequenzen und wäre bei mangelnder Spezifität dann auf komplexere Peptidstrukturen ausgeweitet worden. In diesem Fall führte die systematische dreistufige Bindungsstudie mit den Hexapeptid-Bibliotheken jedoch bereits zur Selektionierung eines erfolgversprechenden Kandidaten, der eine ausreichend hohe Affinität zu dem Anti-FVIII aufwies. Es handelte sich dabei um die Sequenz KEDFDI (Lys-Glu-Asp-Phe-Asp-Ile), die dann in weiterführenden Mutationsanalysen und theoretischen Untersuchungen charakterisiert wurde.

Es stellte sich heraus, daß die Aminosäurebelegung der C-terminalen Position des Peptids keinen Einfluß auf die Intensität der Zielproteinbindung hatte. Dieses Ergebnis gab einen wichtigen Hinweis für die Planung und die konzeptionellen Überlegungen zur Ligandenkupplung an das Chromatographiematerial. Hierbei konnte die entsprechende Position für notwendige Modifikationen zur Realisierung der gewünschten Sequenzausrichtung ausgenutzt werden, ohne daß eine Einschränkung des Bindungsvermögens zu erwarten war.

Dagegen führte ein Austausch der anderen Aminosäuren zu einer mehr oder minder starken Verringerung des Bindungsvermögens. Dabei schienen das N-terminale Ly-

sin sowie das erste Aspartat eine besondere Bedeutung für die Wechselwirkungen mit dem Zielprotein zu haben, während an den anderen Stellen durchaus Sequenzvariationen ohne eine signifikante Relevanz für die Bindungsintensität möglich gewesen wären. Da eine Veränderung der ursprünglichen Aminosäurezusammensetzung des Peptidkandidaten jedoch keine Vorteile hinsichtlich der Stabilität oder des Kosten- und Materialaufwands bei der Herstellung größerer Mengen für die Ausstattung der Chromatographiematrices versprach, wurde auf einen gezielten Aminosäureaustausch in den ersten fünf Positionen der Sequenz verzichtet.

Die Methode der Ligandenselektionierung auf Basis der Spot-Synthese überzeugte durch eine einfache Handhabung und bewies eine hohe Zuverlässigkeit. Durch die Verwendung kombinatorischer X-Strategien lassen sich in sehr kurzer Zeit und mit einem geringen Arbeitsaufwand geeignete hochaffine Strukturen ermitteln, die als Kandidaten für die Ausstattung von Affinitätsmatrices eingesetzt werden können. Das Verfahren bietet sich aufgrund der konzeptionellen Möglichkeiten in der X-Strategie besonders für die unspezifische Suche solcher Liganden an. Es ist unter methodischen Gesichtspunkten für jedes Zielprotein anwendbar, wobei der Bindungsnachweis jeweils speziell modifiziert werden muß, und sicherlich nicht für alle Biomoleküle ein derart einfacher und kurzer Affinitätspartner zu finden ist.

Ein weiterer Vorteil besteht in der Regenerierbarkeit der Cellulosemembranen, die einen mehrfachen Gebrauch der Peptidbibliotheken für den Einsatz in Bindungsstudien mit unterschiedlichen Zielmolekülen ermöglicht.

Die hohe Zuverlässigkeit des Testsystems wurde mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit bestätigt. Die Suche für den monoklonalen Antikörper führte zur eindeutigen Selektionierung eines Hexapeptids, dessen Sequenz sich anschließend auch als das spezifische antigene Epitop des Immunglobulins herausstellte.

3.2 Peptidkupplung an die Basalmatrix

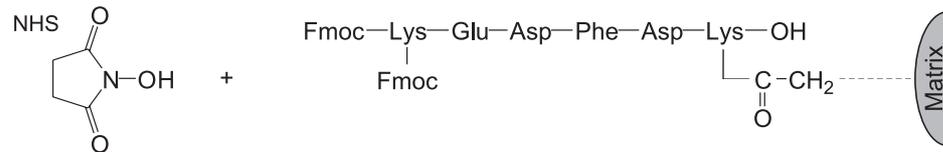
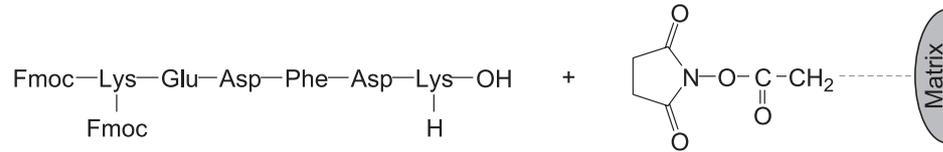
Nachdem das optimale Hexapeptid zur Bindung des monoklonalen Antikörpers gefunden war, mußte eine geeignete Methode entwickelt werden, um es an das NHS-aktivierte Chromatographiematerial zu koppeln. Um eine vergleichbare Zugänglichkeit und Adsorptionsleistung wie in den vorausgehenden Bindungsstudien erwarten zu können, sollte der Peptidligand dabei in gleicher Weise wie auf den Spotmembranen an der Matrix ausgerichtet werden. Während die Sequenzen dort jedoch C-terminal verankert vorlagen, verläuft die Reaktion an NHS-aktivierten Materialien über freie Aminofunktionen, wodurch bei dem vorliegenden Peptid KEDFDI eine reverse Bindung über den N-Terminus stattgefunden hätte. Aus diesem Grund erschien die Herstellung der Affinitätsmatrix durch eine direkte Kupplung des fertigen Hexapeptids ohne spezielle Modifikationen als ungeeignet. Um dieses Problem zu lösen, wurden drei verschiedene Konzepte entwickelt, mit denen sich der Peptidligand trotz der ungünstigen Ausgangsbedingungen gezielt in der gewünschten Ausrichtung an der SepharoseTM fixieren ließ. In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Strategien sowie einige Analysen zu den Kupplungsprozessen vorgestellt und ihre Vor- und Nachteile diskutiert. Um den tatsächlichen Einfluß der Ligandenausrichtung am Chromatographiematerial zu überprüfen, wurde zusätzlich eine Matrix mit N-terminal gekoppelten Peptiden hergestellt.

Für die Entwicklung der Methoden wurden 1 ml Fertigsäulen vom Typ HiTrapTM NHS-aktivierte SepharoseTM High Performance eingesetzt. Nach abschließender Beurteilung hinsichtlich Material- und Zeitaufwand, Stabilität der resultierenden Ligandenbindung sowie Effizienz der chromatographischen Aufarbeitung wurde der erfolgreichste Prozeß für die Fertigung der fließbettchromatographischen Prototypmatrix übernommen. Da in diesem Kapitel auch die Herstellung der EBA-Matrix dokumentiert wird, sei an dieser Stelle bereits vorweggenommen, daß dazu die unter Abschnitt 3.2.4 beschriebene Methode der direkten Synthese an dem Chromatographiematerial verwendet wurde.

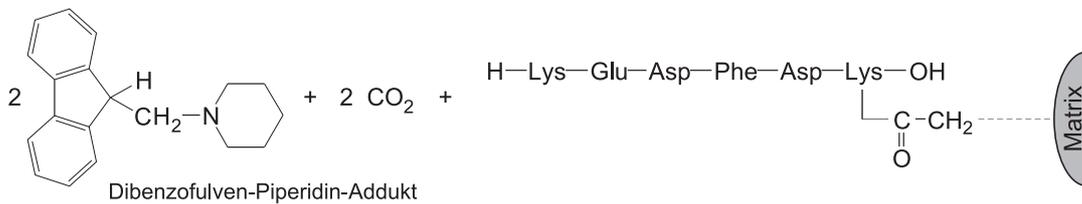
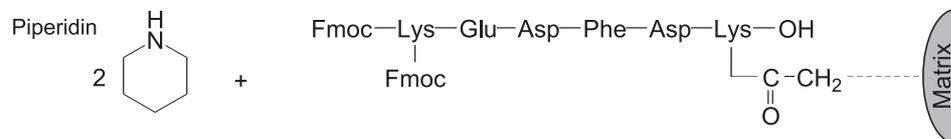
3.2.1 Kupplung Fmoc-geschützter Peptide

Der hier dokumentierte Prozeß zur Herstellung der Affinitätsmatrix basierte auf dem Einsatz vorgefertigter Peptide, die durch einen Aminosäureaustausch und die Anwendung einer speziellen Schutzgruppentaktik direkt über ihren C-Terminus an die NHS-aktivierte SepharoseTM gekoppelt werden sollten. Eine schematische Darstellung der in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl.-Chem. Dirk Bächle aus der Abteilung Organische Chemie III der Universität Bielefeld entwickelten Strategie

1. Kupplung des Fmoc(Fmoc)-geschützten Peptidliganden bei pH 8,3



2. Fmoc-Abspaltung mit 20 % Piperidin



3. Absättigung der Matrix mit Ethanolamin

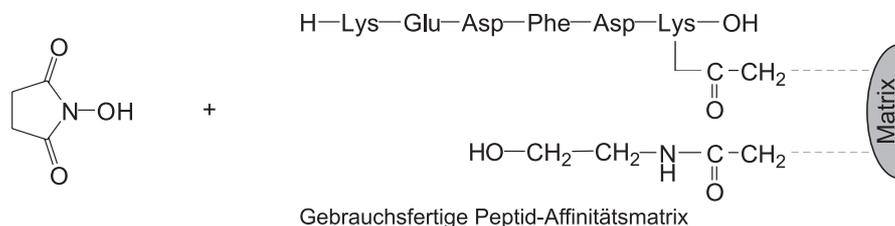
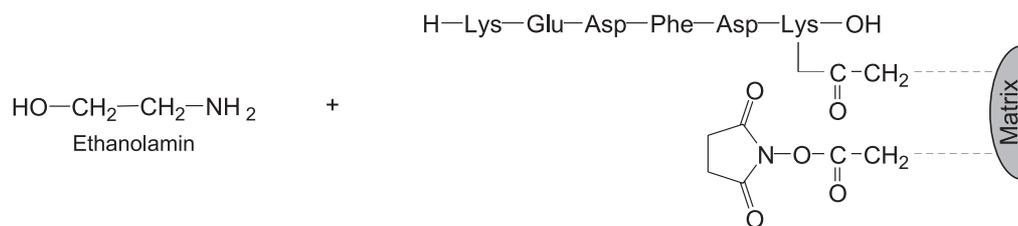


Abbildung 3.12: Strategie zur direkten Kupplung Fmoc(Fmoc)-geschützter Peptide an NHS-SepharoseTM und Überführung in eine gebrauchsfertige Affinitätsmatrix

ist in Abbildung 3.12 dargestellt. Die detaillierte Vorgehensweise geht aus Abschnitt 2.1.2.2 des Material- und Methodenteils hervor.

Die zugrundeliegenden Überlegungen beruhten auf der Erkenntnis aus den Bindungsstudien, daß die C-terminale Aminosäure des Peptids keinen Einfluß auf die Intensität der Wechselwirkungen zum Zielprotein hatte. Sie konnte daher mit einer NHS-reaktiven Aminosäure belegt werden, die eine gerichtete Kupplung der Sequenz ermöglichte. Die Wahl fiel dabei auf Lysin, dessen Seitenkette wie das Arginin die notwendige Aminogruppe enthält. Die resultierende Ligandensequenz lautete somit KEDFDK.

Für eine gerichtete Fixierung über den C-Terminus mußte jedoch gleichzeitig eine mögliche Fehlbindung über andere NH_2 -Gruppen ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Sequenz betraf dies neben der Aminofunktion am eigentlichen N-Terminus auch die in der Seitenkette des N-terminalen Lysins, das aufgrund seiner Bedeutung für die Zielproteinbindung jedoch nicht durch eine andere Aminosäure ersetzt werden konnte.

Die reverse Kupplung des Hexapeptids sollte durch eine Abschirmung der entsprechenden NH_2 -Gruppen verhindert werden. Zu diesem Zweck wurde die Fmoc-Schutzgruppe am N-Terminus des Hexapeptids in der Festphasensynthese nicht wie üblich vor der Spaltung vom Harz, sondern erst nach der Verknüpfung mit der Chromatographiematrix entfernt.

Eine Fehlkupplung über die ϵ -Aminogruppe im N-terminalen Lysinrest ließ sich dadurch ausschließen, daß bei der Synthese an Stelle der sonst verwendeten säurelabilen Seitenschutzgruppen ein doppelt Fmoc-geschütztes Lysin eingesetzt wurde. Die Freilegung der NH_2 -Funktion aus dem Lysinrest erfolgte dann ebenfalls erst durch die Piperidinbehandlung nach der Fixierung an die Matrix.

Obwohl nach dieser Prozedur von einer vollständigen Deaktivierung der NHS-Ester ausgegangen werden konnte, wurde die Säule abschließend wie im Standardprotokoll vorgesehen mit Ethanolamin abgesättigt, bevor sie in chromatographischen Experimenten zum Einsatz kam.

Die Herstellung der notwendigen Menge des Liganden erfolgte mit einem Synthesautomaten und wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Norbert Sewald bewerkstelligt (Organische Chemie III, Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld). Vor der Bindung wurde das Fmoc-geschützte Peptid mittels semipräparativer HPLC (Säule: VydacTM 218 TP 1022 Efficiency, Protein/Peptide C18, 2,2x 25 cm, Phenomenex) gereinigt, so daß synthesebedingte Fehlsequenzen abgereichert waren. Nach Lyophilisierung standen 6,5 mg (5,4 μmol) der Sequenz zur Verfügung. Abbildung 3.13 stellt die Ergebnisse von analytischen HPLC-Läufen des Fmoc-

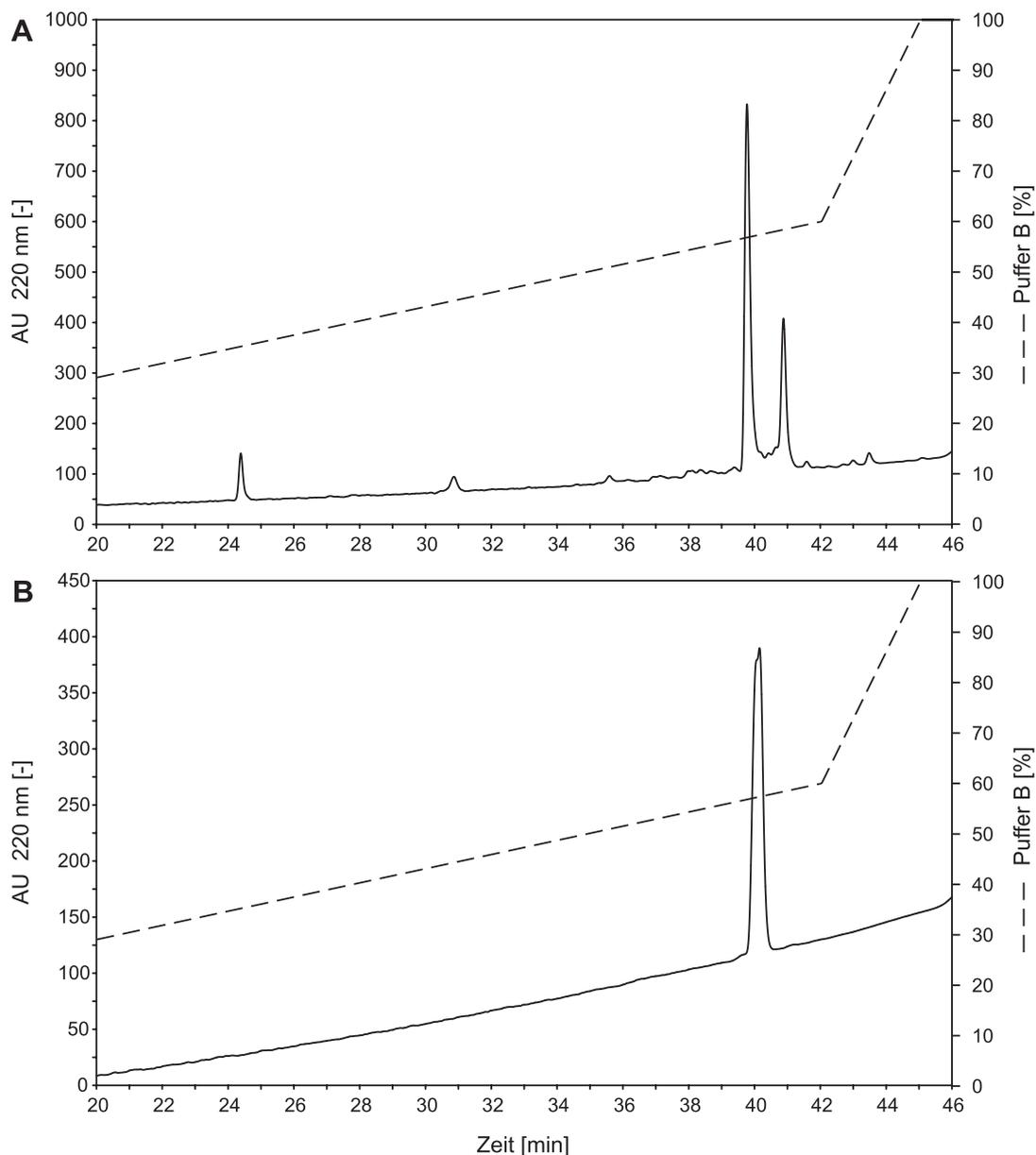


Abbildung 3.13: Vergleich der analytischen HPLC des Fmoc-geschützten Peptids vor (A) und nach (B) der HPLC-Reinigung. Säule: VydacTM 300 C18 (218TPB), 5 μm , 250 x 4 mm; Puffer A: 95 % dest. H₂O, 5 % Acetonitril, 0,1 % TFA; Puffer B: 5 % dest. H₂O, 95 % Acetonitril, 0,1 % TFA

geschützten Peptids vor (A) und nach (B) der Reinigung einander gegenüber. Die Chromatogramme lassen erkennen, daß das rohe Spaltprodukt noch einige Verunreinigungen enthielt, die jedoch durch die HPLC-Reinigung erfolgreich beseitigt werden konnten. Bei den zwei kleineren Peaks, die nach etwa 24,5 bzw. 31 Minuten erscheinen, handelt es sich möglicherweise um Peptide, bei denen die

Fmoc-Schutzgruppen ganz oder teilweise fehlten. Sie wären infolgedessen wesentlich hydrophiler und würden bereits unter entsprechend polarerer Bedingungen eluieren. Ohne weitere Analysen kann jedoch nur spekuliert werden, ob die Synthese in diesen Fällen unvollständig verlief oder es lediglich zu einem vorzeitigen Verlust der basenlabilen Fmoc-Gruppen kam.

Während die beiden ersten Fehlsequenzen nur einen geringen Anteil an der Gesamtausbeute ausmachten, handelte es sich bei dem Peak, der nach etwa 41 Minuten von der Säule eluierte, um ein bedeutend gravierenderes Nebenprodukt. Abbildung 3.14 zeigt einen Vergleich der massenspektrometrischen Analysen (MALDI-ToF-MS) des rohen Spaltprodukts (A) und der aufgereinigten Sequenz (B).

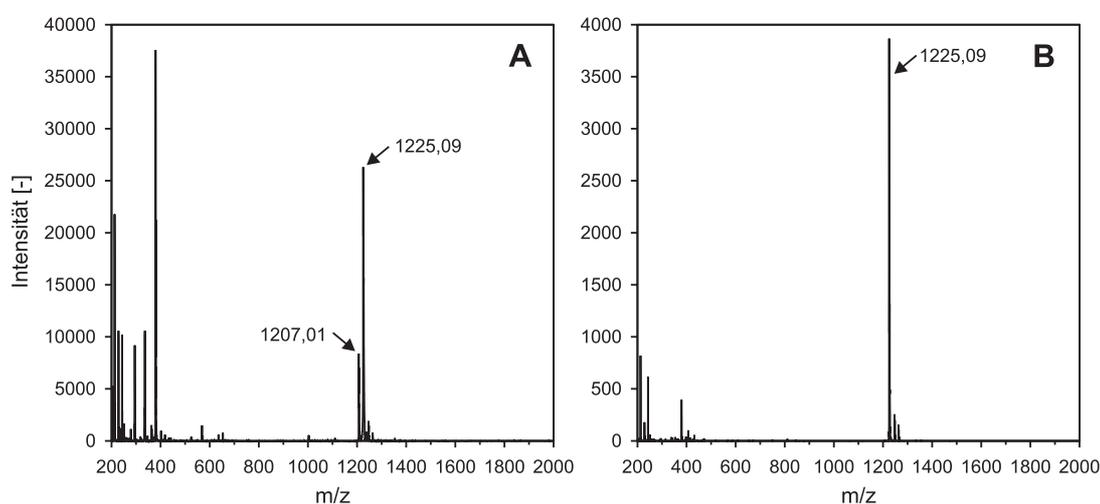


Abbildung 3.14: Vergleich der MALDI-ToF-MS-Analysen des Fmoc-geschützten Peptids vor (A) und nach (B) der HPLC-Reinigung.

Aus theoretischen Berechnungen und der MALDI-ToF-MS-Analyse des fraktionierten Endprodukts (Daten nicht dargestellt) ging hervor, daß es sich bei dem m/z-Signal 1225 um die protonierte Zielsequenz Fmoc-K(Fmoc)EDFDK handelte. Entsprechende Untersuchungen des ebenfalls separat gesammelten Hauptnebenprodukts ergaben in der Massenspektrometrie einen um etwa 18 Einheiten kleineren Wert, der sich in Graphik 3.14 A in dem m/z-Signal 1207 widerspiegelt. Es ist anzunehmen, daß es sich dabei um eine häufig bei Aspartat-haltigen Peptiden zu beobachtende dehydratisierte Form des eigentlichen Produkts handelt, bei der unter einem säure- oder basenkatalysierten Ringschluß der sauren Seitenkette ein Aspartimid gebildet wird [QUIBELL ET AL., 1994]. Für eine genaue Aufklärung wären weitere Analysen notwendig gewesen, die den Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch überschritten hätten. Es bleibt festzuhalten, daß der Anteil dieses Nebenprodukts bei verschiedenen Synthesen immer unterschiedlich hoch war. Es

ist davon auszugehen, daß auch bei der Spot-Synthese, die nach den gleichen Reaktionsprinzipien verlief, ähnliche Effekte aufgetreten sind.

Mit den verfügbaren Mitteln war während der Peptidkupplung an das Chromatographiematerial keine Reaktionskontrolle möglich. Ein Vergleich der Kupplungslösung vor und nach der Inkubation mittels analytischer HPLC zeigte eine deutliche Abnahme der Peptidkonzentration (Daten nicht dargestellt), die auf eine erfolgreiche Bindung an die NHS-aktivierte SepharoseTM hinwies, jedoch nicht genau quantifiziert werden konnte. Eine nachträgliche Aminosäureanalyse, die in der Abteilung Molekulare Erkennung an der GBF durchgeführt wurde, ergab eine Beladung 6,0 μmol Peptid/g Trockengel. Auf das Säulenvolumen von 1 ml bezogen (1 ml \equiv ca. 72 mg Trockenmasse) entspräche dies lediglich einer gesamten Ligandenausstattung von 0,4 μmol , so daß nur ein Bruchteil der eingesetzten Menge von 5,4 μmol an der Matrix fixiert worden wäre. Quantifizierungen dieser Art sind jedoch mit einem hohen Fehlerpotential behaftet, zumal nur Einfachbestimmungen vorgenommen wurden, und die eingesetzten Testaliquote sehr klein waren. Zudem erfolgten die Analysen erst nach einigen Chromatographie- und Regenerationszyklen, so daß die Belastung mit verbliebenen Kontaminationen die Ergebnisse zusätzlich verfälschte.

Der Vorteil der hier beschriebenen Methode bestand in der Möglichkeit, synthesebedingte Fehlsequenzen vor der Kupplung an das Chromatographiematerial abzureichern. Zudem kann die resultierende Verknüpfung zwischen den Liganden und der Matrix über eine Amidbindung als äußerst stabil eingestuft werden. Nachteilig waren allerdings die hohen Verluste, die durch die schlechte Löslichkeit der Fmoc-Verbindungen entstanden. Dies betraf einerseits die Ausbeute bei der Spaltung vom Syntheseharz, die selbst nach mehreren Spaltschritten und Spülvorgängen nicht annähernd der Quantität einer Referenzsynthese entsprach, bei der die abschließende Kupplung des doppelt Fmoc-geschützten Lysins weggelassen wurde (Daten nicht dargestellt). Andererseits stellte die starke Hydrophobizität des modifizierten Peptids ein zusätzliches Problem bei der Resolubilisierung in dem wäßrigen Kupplungspuffer dar. Selbst in Methanol oder anderen Löslichkeitsvermittlern ließ sich das Lyophilisat nur unvollständig lösen, zumal nur Flüssigkeiten eingesetzt werden konnten, die nach Verdünnung mit dem Kupplungspuffer verfahrenskompatible Bedingungen gewährleisteten. Desweiteren deuteten die durchgeführten Analysen auf eine eher geringe Kupplungsausbeute bei der Verknüpfung mit dem Chromatographiematerial hin, so daß für eine eventuelle Maßstabvergrößerung sehr hohe Ausgangsmengen der gereinigten Ligandensequenz notwendig wären.

3.2.2 Peptidkupplung über einen Disulfid-Austausch

Die Entwicklung einer weiteren Methode zur Herstellung der Affinitätsmatrix basierte auf einer Vorschrift zur Liganden-Immobilisierung an BIAcoreTM Chips [AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1991]. In diesem Fall wurde die Peptidsequenz über eine Thiol-Disulfid Austauschreaktion an das HiTrapTM Material gekuppelt. Voraussetzung dafür war eine spezielle Modifikation der NHS-aktivierten SepharoseTM und des Liganden durch die Funktionalisierung mit Thiolgruppen. Die Kupplungsstrategie ist in Abbildung 3.15 dargestellt. Die detaillierte Versuchsdurchführung ist in Abschnitt 2.1.2.3 des Material- und Methodenkapitels beschrieben.

Die Einführung der SH-Gruppe an der NHS-aktivierten Basalmatrix erfolgte durch Reaktion mit Cystamin, das anschließend mit DTE reduziert wurde. Seitens des Peptidliganden wurde die notwendige Thiolfunktion durch den Einbau eines Cysteins realisiert. Die Modifikation fand wie bei der in Abschnitt 3.2.1 entwickelten Methode durch den Austausch der für die Zielproteinbindung vermutlich irrelevanten C-terminalen Aminosäure statt. Bei der eingesetzten Sequenz handelte es sich somit um das Peptid KEDFDC. Auf diese Weise konnte in dem Kupplungsprozess wieder die gewünschte Ausrichtung des Liganden an der Chromatographiematrix erzielt werden.

Symmetrische Disulfidbindungen können oxidativ gebildet werden, während für die Synthese unsymmetrischer Disulfide die Aktivierung einer der beiden Thiolgruppen beispielsweise über eine Thiopyridylgruppe nötig ist, um die unerwünschte Bildung symmetrischer Dimere zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde die SH-Funktion der Peptidsequenz nach der HPLC-Reinigung mit einer Thiopyridylgruppe verknüpft. Die Reaktion mit dem reduzierten Cystamin erfolgte bei einem pH-Wert unterhalb des isoelektrischen Punkts der Sequenz, der theoretisch mit 3,9 bestimmt wurde (s. Abschnitt 3.1.5). Aus diesem Grund wurde das methanolisch gelöste Lyophilisat vor der Kupplung in einem Verhältnis von 1:3 mit einem Citratpuffer, pH 3,0 versetzt. Obwohl aufgrund der Aktivierung bei der Ligandenkupplung von einer hohen Reaktionsausbeute ausgegangen werden konnte, wurde die Matrix zur Absättigung überschüssiger SH-Gruppen vor dem Einsatz in der Chromatographie noch mit der thiolreaktiven Substanz PDEA inkubiert.

Die Herstellung und Aktivierung der Peptidsequenz erfolgten in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Norbert Sewald. Nach Lyophilisierung standen etwa 15 mg (13 μ mol) des modifizierten Liganden zur Verfügung. Zur Kontrolle des Kupplungserfolgs wurde die Peptidlösung vor und nach der Inkubation mit dem Chromatographiematerial mittels analytischer HPLC untersucht. Abbildung 3.16 auf Seite 109 stellt die Ergebnisse der Probenauffrennung einander gegenüber.

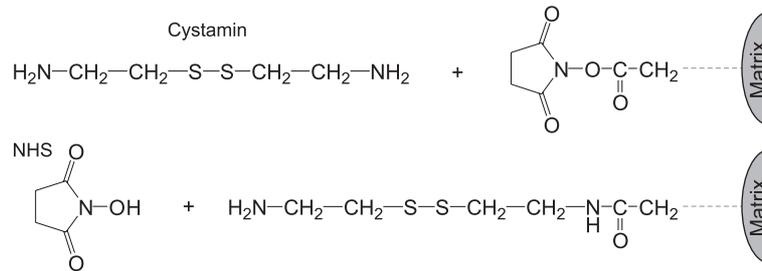
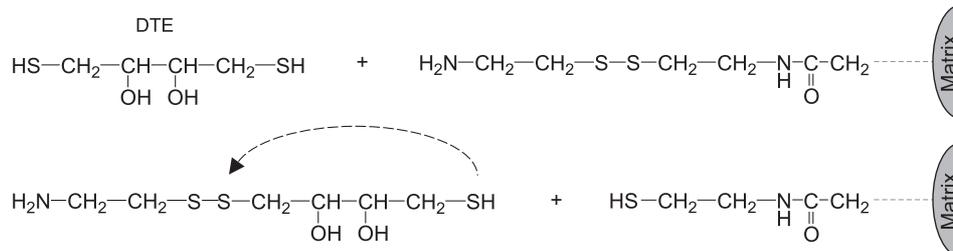
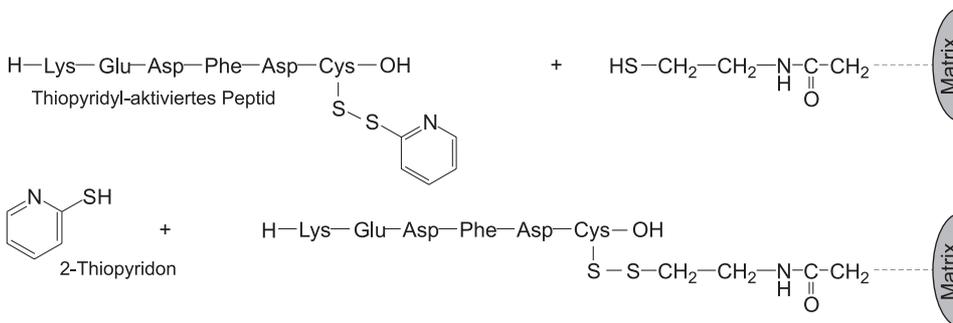
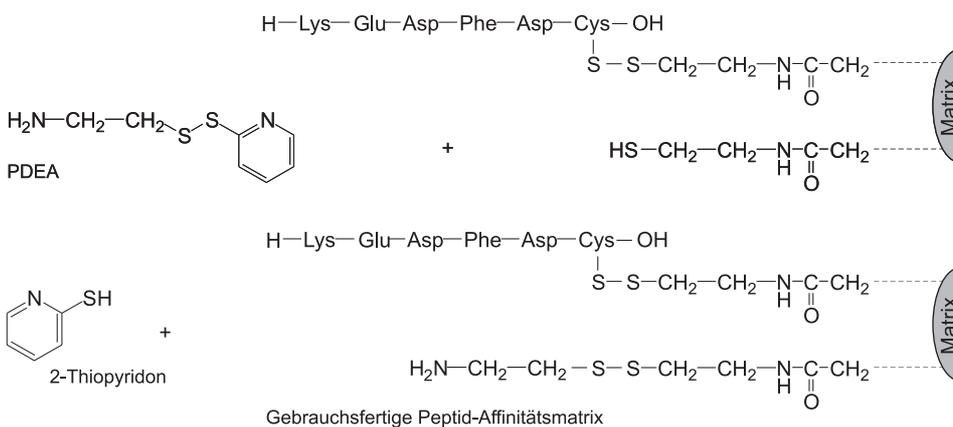
1. Cystamin-Kopplung bei pH 8.32. Reduktion des Disulfids mit DTE3. Kupplung des aktivierten Peptidliganden bei pH 3,0 (pH < pI)4. Deaktivierung überschüssiger Thiole mit PDEA bei pH 4.3

Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der Kupplung Pyridyl-aktivierter Peptidliganden an NHS-SepharoseTM und anschließende Überführung in eine gebrauchsfertige Affinitätsmatrix

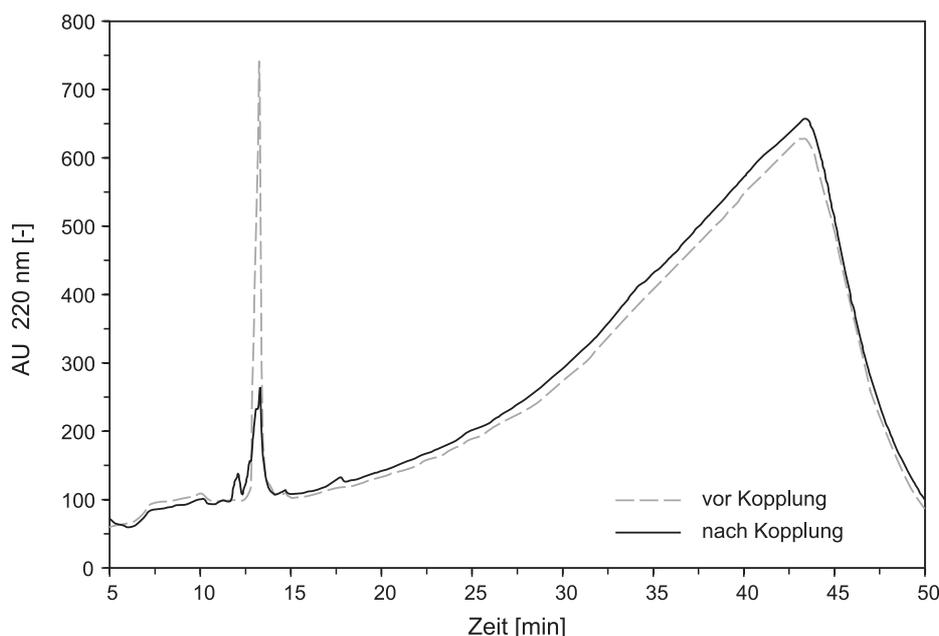


Abbildung 3.16: Reaktionskontrolle zur Kupplung aktivierter Peptidliganden an NHS-SepharoseTM. Analytische HPLC der Peptidlösung vor und nach der Kupplung. Säule: VydacTM 300 C18 (218TPB), 5 μ m, 250x4 mm; Puffer A: 95 % dest. H₂O, 5 % Acetonitril, 0,1 % TFA; Puffer B: 5 % dest. H₂O, 95 % Acetonitril, 0,1 % TFA

Im Chromatogramm der Ausgangslösung sind keinerlei Peaks erkennbar, die auf eine Verunreinigung oder einen vorzeitigen Zerfall der aktivierten Ligandensequenz hindeuten. Desweiteren zeigt der Vergleich mit dem Lauf nach der Kupplungsreaktion, daß ein Großteil der Peptide an der Matrix zurückgehalten wurde. Eine genaue Quantifizierung war auch in diesem Fall nicht möglich. Zudem liegen für diese Säule keine Daten aus der Sequenz- oder Aminosäureanalytik vor, so daß über die quantitative Ligandenausstattung keine Aussage gemacht werden kann.

Der Vorteil der Kupplung vorgefertigter aktivierter Liganden lag wie bei den Fmoc-geschützten Peptiden in der Möglichkeit, das Syntheseendprodukt vor der Verknüpfung mit der Chromatographiematrix zu reinigen und Fehlsequenzen abzureichern. Desweiteren ließ sich das Lyophilisat aufgrund seiner wesentlich geringeren Hydrophobizität deutlich besser verarbeiten als die Fmoc-Verbindungen. Nachteilig war allerdings der hohe Arbeitsaufwand für die vorausgehende Aktivierung der Sequenz, die bei der Maßstabvergrößerung für die Herstellung der EBA-Prototypmatrix den limitierenden Faktor darstellte. Zudem kann die Ligandenverknüpfung über eine Disulfidbindung im Vergleich zu der resultierenden Amidbindung aus der vorherigen Methode aufgrund der Empfindlichkeit gegenüber Redoxprozessen nur als bedingt stabil eingestuft werden.

3.2.3 Direkte Synthese an NHS-SepharoseTM

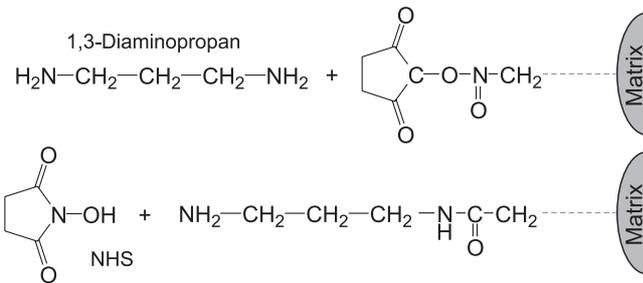
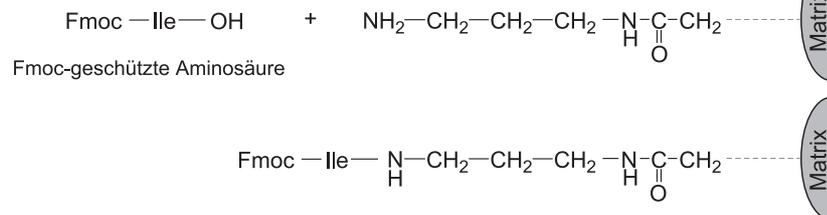
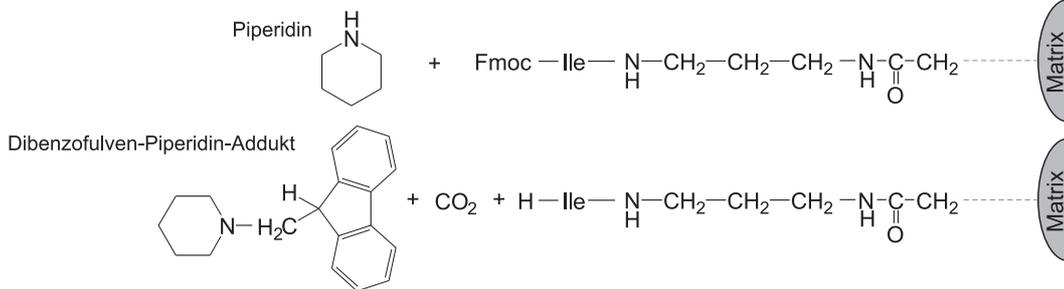
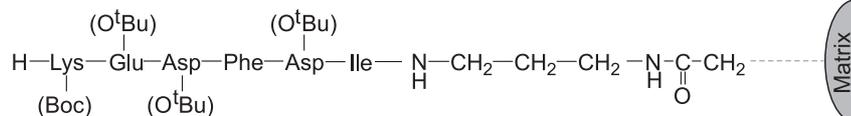
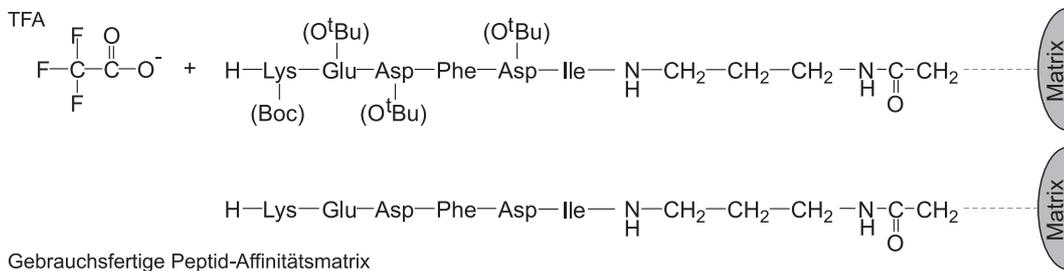
Im dritten Herstellungsverfahren für die Affinitätsmatrix wurde der Peptidligand nach dem Prinzip der MERRIFIELD'schen Festphasensynthese direkt an dem Chromatographiematerial synthetisiert. Da der schrittweise Aufbau der Sequenz nach dieser Methode bereits eine C-terminale Verknüpfung an der Matrix bedingt, mußte lediglich die NHS-SepharoseTM vorab durch die Einführung einer geeigneten Ankergruppierung modifiziert werden. Abbildung 3.17 veranschaulicht das Konzept, das in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Werner Tegge (GBF, Braunschweig) entwickelt und im wesentlichen aus einer von ihm beschriebenen Methode abgeleitet wurde [TEGGE, 1997].

Durch die Kupplung mit 1,3-Diaminopropan wurde die Matrix zunächst mit Aminofunktionen ausgestattet, die dann als Startpunkte für den sukzessiven Peptidaufbau fungierten. Die Synthese erfolgte nach Fmoc/^tBu-Strategie, in der die N α -Funktionen durch eine Fmoc-Gruppe und die Seitenketten trifunktioneller Aminosäuren durch säurelabile Gruppen auf tert.-Butylbasis geschützt wurden. Die Kettenverlängerung verlief in Reaktionszyklen, die sich aus der Kupplung der einzelnen Aminosäuren und ihrer anschließenden Deblockierung mit Piperidin zusammensetzten.

Auf eine in der Festphasensynthese häufig durchgeführte Absättigung nicht-reagierter Aminofunktionen sowie einem *Capping*-Schritt nach Beendigung der Synthese durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid wurde verzichtet. Nach abschließender acidolytischer Spaltung der semipermanenten Schutzgruppen konnte die Peptidmatrix direkt in der Chromatographie eingesetzt werden.

Mit der hier beschriebenen Methode wurden zwei verschiedene HiTrapTM Säulen und die Fließbettmatrix angefertigt. Das Verfahren erforderte keine spezielle Aminosäurebelegung, so daß die Ligandensequenz frei ausgewählt werden konnte. Für die 1 ml Fertigsäulen handelte es sich dabei einerseits um den ursprünglichen Peptidkandidaten KEDFDI und andererseits um die Sequenz KEDFDC, die als Referenzmatrix für die mittels Disulfid-Austausch Reaktion hergestellte Säule dienen sollte und eine direkte Gegenüberstellung beider Fertigungsverfahren im chromatographischen Vergleich ermöglichte. Die Ligandenausstattung der EBA-Prototypmatrix wurde nach Auswertung der chromatographischen Versuche mit den unterschiedlichen HiTrapTM Säulen auf die Sequenz KEDFDI festgelegt.

Während der Synthese wurden die Kupplungsschritte anhand zweier unterschiedlicher Methoden kontrolliert und quantifiziert. Der Nachweis freier Aminofunktionen mittels Bromphenolblau BPB gab dabei Aufschluß über die anfängliche Beladungsmenge mit 1,3-Diaminopropan und konnte Auskunft über den Grad der

1. Einführung von Aminofunktionen2. Kupplung einer Fmoc-geschützten Aminosäure mit TBTU / DIPEA3. Fmoc-Abspaltung mit 20 % Piperidin4. Zyklische Kopplung der restlichen Aminosäuren (siehe 2./3.)5. Abspaltung der Seitenschutzgruppen mit TFAAbbildung 3.17: Schema der direkten Synthese des Peptidliganden an NHS-SepharoseTM

Absättigung nach der Kupplung der geschützten Aminosäuren geben. Zudem war mit diesem Nachweis im Anschluß an einen Deblockierungsschritt eine indirekte Quantifizierung der gebundenen Aminosäuren über die dann am N-Terminus freigewordenen NH₂-Funktionen möglich. Aufgrund des hohen Lösungsmittelverbrauchs wurde bei zwei der drei Synthesen jedoch weitestgehend auf die BPB-Analysen verzichtet und die Aminosäurekupplung statt dessen über die photometrische Bestimmung des bei der Fmoc-Abspaltung entstehenden Dibenzofulven-Piperidin-Addukts quantifiziert. Tabelle 3.2 faßt die Analyseergebnisse für die drei Matrices zusammen.

Tabelle 3.2: Quantifizierung der Kupplung mittels Fmoc- und BPB-Bestimmung ¹

	KEDFDI		KEDFDC		EBA-KEDFDI
	[$\mu\text{mol/ml}$]		[$\mu\text{mol/ml}$]		[$\mu\text{mol/ml}$]
NH₂ ²	<u>9,5</u>		<u>10,5</u>		<u>3,4</u>
Ile, Cys	15,3	(<u>1,1</u>)	<u>3,9</u>	(<u>1,7</u>)	64,1
Asp-1	20,2	(<u>0,7</u>)	<u>16,1</u>	(<u>0,9</u>)	69,6
Phe	29,1	(<u>0,4</u>)	<u>20,6</u>	(<u>0,3</u>)	76,7
Asp-2	39,6		<u>18,4</u>	(<u>0,2</u>)	77,2
Glu	38,1 ³		<u>24,9</u>	(<u>0,1</u>)	73,2
Lys	37,2		<u>24,5</u>	(<u>0,9</u>)	77,4

¹unterstrichene Werte: BPB; Werte in Klammern: vor der Fmoc-Abspaltung

²NH₂-Bestimmung nach der Kupplung von 1,3-Diaminopropan

³Referenzwert mit Bromphenolblau: 15,1

Die Aminofunktionalisierung mit Diaminopropan lieferte für die beiden HiTrapTM Säulen in guter Näherung den Erwartungswert von 10 $\mu\text{mol/ml}$ Gel, was der vom Hersteller angegebenen Menge an vorhandenen NHS-Bindungsstellen entsprach. Demgegenüber wurde das EBA-Prototypmaterial laut BPB-Analyse nur mit 3,4 $\mu\text{mol/ml}$ substituiert, obwohl die Anzahl der aktivierten Bindungsstellen laut Hersteller 34 $\mu\text{mol/ml}$ betragen sollte. Das Ergebnis der BPB-Analyse muß allerdings angezweifelt werden, da die Matrix in dem betreffenden Test selbst nach einem Waschschritt mit fast 900 ml 1 %igem DIPEA noch eine sehr starke Blaufärbung aufwies, und somit davon ausgegangen werden kann, daß ein nicht unerheblicher Anteil des gebundenen BPBs nicht erfaßt wurde.

Eine mutmaßlich höhere Beladung der Fließbettmatrix bestätigt sich auch bei der Betrachtung der Folgeanalysen während der Peptidsynthese. Hier liegen die Wer-

te für die einzelnen Aminosäuren zwischen 64 und 77 $\mu\text{mol/ml}$ und somit sogar deutlich über denen der HiTrapTM Materialien. Für die ebenfalls mit dem Fmoc-Nachweisverfahren untersuchte KEDFDI Fertigsäule wurde lediglich eine Beladung von etwa 40 $\mu\text{mol/ml}$ ermittelt. Für das KEDFDC-Material sind die Werte mit maximal 25 $\mu\text{mol/ml}$ noch niedriger, wobei der direkte Vergleich aufgrund des unterschiedlichen Testsystems hier allerdings nur bedingt möglich ist. Die starken Abweichungen zwischen der BPB- und der Fmoc-Methode werden am Beispiel der Referenzbestimmung für das Glutamat der KEDFDI-Säule deutlich, bei der die Differenz mit 15,1 respektive 38,1 $\mu\text{mol/ml}$ mehr als 100 % betrug.

Obwohl mit den unkomplizierten Testsystemen keine zuverlässige quantitative Erfassung des Syntheseverlaufs möglich war, können einige grundlegende Aussagen getroffen werden. Dazu zählen die übereinstimmenden Ergebnisse für die Untersuchungen vor der Deblockierung der Aminosäuren, die in nahezu allen Fällen eine Anzahl von weniger als 1 $\mu\text{mol/ml}$ nicht abgesättigter NH_2 -Funktionen ergab, was für eine sehr gute und konstante Kupplungsausbeute spricht. Des Weiteren weisen alle drei Synthesen in den ersten Zyklen im Vergleich zu den darauffolgenden geringere Mengen an gebundenen Aminosäuren auf. Dies gilt insbesondere für das Cystein der KEDFDC-Säule und hängt möglicherweise mit den ungünstigen sterischen Bedingungen an den Verknüpfungspunkten mit der Basalmatrix zusammen, deren Relevanz dann mit zunehmender Kettenlänge abnimmt. Für zukünftige Optimierungen könnten die ersten Kupplungsschritte verlängert oder im doppelten Reaktionsansatz durchgeführt werden.

Für das KEDFDC- und das EBA-KEDFDI Material wurde eine nachträgliche Aminosäureanalyse nach Totalhydrolyse eines Gelaliquots durchgeführt (GBF, Braunschweig). Demnach betrug die Peptidbeladung der HiTrapTM Säule etwa 300 und die der Fließbettadsorbens ca. 150 $\mu\text{mol/g}$ Trockengel. Unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Gewichts der Materialien von 72 bzw. 200 mg Trockenmasse/ml Gel entspricht dies einer Ligandenausstattung von 21,6 respektive 30,0 $\mu\text{mol/ml}$ Matrix, wodurch die Peptidbeladung insgesamt wesentlich höher ausfiel als beispielsweise bei der mit dem Fmoc(Fmoc)-geschützten Peptid hergestellten Säule (0,4 $\mu\text{mol/ml}$).

Da die Matrixproben für die Aminosäureanalytik direkt nach Beendigung der Synthese entnommen wurden und keine Kontaminationen durch Chromatographierückstände enthielten, ermöglichten die Untersuchungen neben einer zuverlässigen quantitativen Auswertung auch eine qualitative Abschätzung der Synthesen. Abbildung 3.18 gibt die HPLC-Chromatogramme wieder. Die für die Aliquote ermittelten Aminosäuremengen sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Das Cystein kann methodisch bedingt nicht nachgewiesen werden.

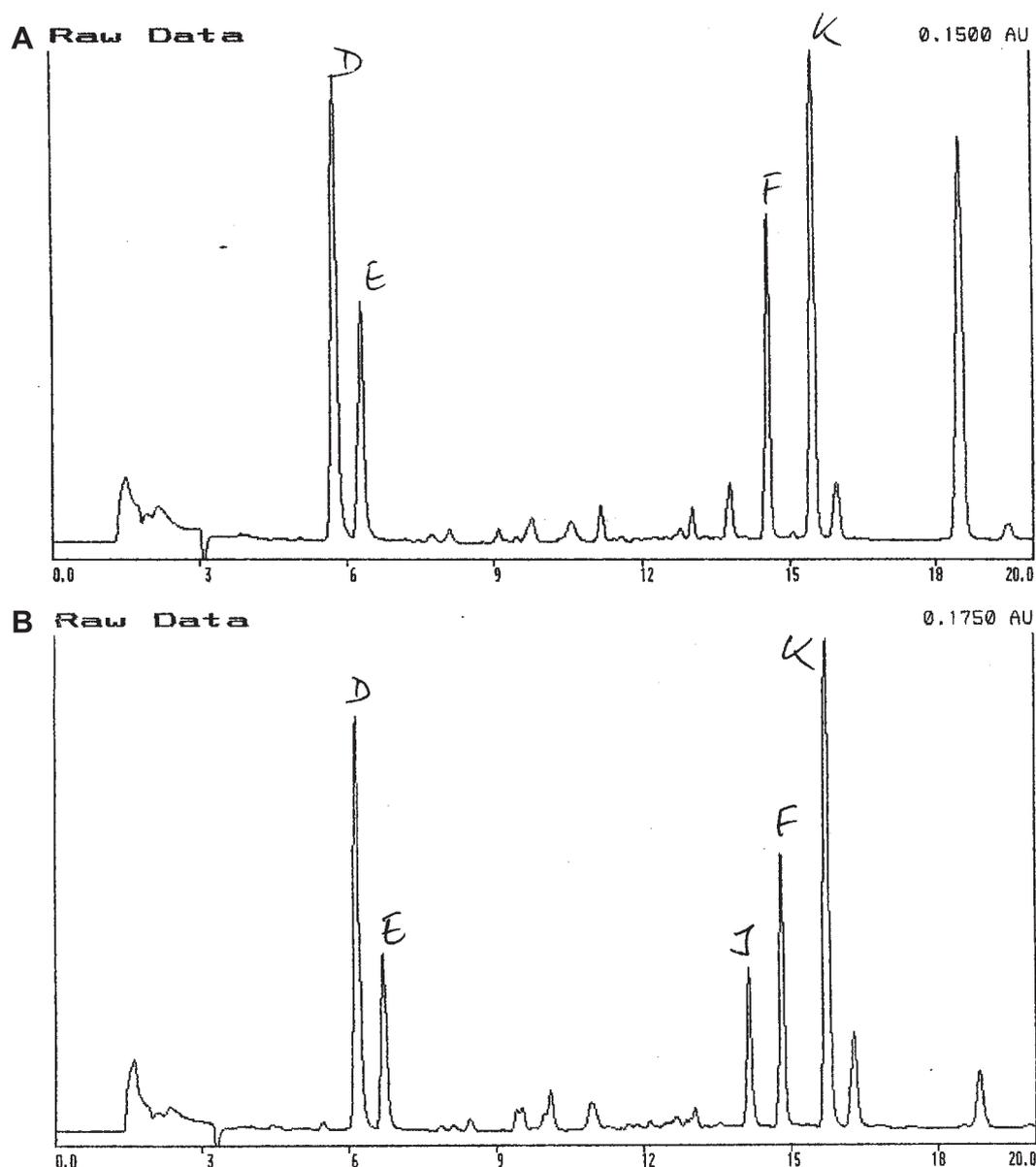


Abbildung 3.18: HPLC-Aminosäureanalytik der synthetisierten Liganden nach Totalhydrolyse. A: HiTrapTM KEDFDC; B: EBA-KEDFDI

Die Chromatogramme zeigen, daß weder das HiTrapTM- noch das EBA-Hydrolysat nennenswerte Verunreinigungen durch ligandenfremde Aminosäuren aufweisen. Bei den beiden Peaks, die nach etwa 16 bzw. 18,5 Minuten auftreten, handelt es sich um einen bei jeder Untersuchung dieser Art beobachtbaren Artefakt. Ansonsten sind in beiden Analysen nur geringfügige Fehlsignale erkennbar.

Die Quantifizierungen aus Tabelle 3.3 deuten auf eine sehr gleichmäßige Synthese hin. Die Aminosäuren treten in den erwarteten gleichen Anteilen auf, so daß die An-

Tabelle 3.3: AS-Gehalt der Matrixproben und prozentualer Anteil an der Gesamtmenge

	HiTrap TM KEDFDC		EBA-KEDFDI	
	[pmol]	[%]	[pmol]	[%]
Cys, Ile	n. d.	n. d.	536	11,1
Asp	1601	36,2	1706	35,3
Phe	997	22,5	886	18,4
Glu	903	20,4	851	17,6
Lys	926	20,9	849	17,6

zahl von Fehlsequenzen innerhalb der gesamten Ligandenausstattung als äußerst gering eingestuft werden kann. Einzige Ausnahme bildet das C-terminale Isoleucin der Fließbettmatrix, deren Gesamtmenge nach der Hydrolyse um etwa ein Drittel geringer ist als bei den anderen Aminosäuren. Abweichungen dieser Art spiegeln sich bereits in den BPB- und Fmoc-Analysen aus Tabelle 3.2 auf Seite 112 wider und hängen wie bereits erwähnt vermutlich mit den sterischen Bedingungen in der Nähe der Matrixverknüpfungspunkte zusammen. Es ist anzunehmen, daß ein Teil der Liganden infolgedessen nur aus fünf Aminosäurebausteinen besteht, und der Peptidaufbau in diesen Fällen erst mit dem Aspartat begonnen hat.

Das hier beschriebene Verfahren hat den Nachteil, unerwünschte Syntheseprodukte nicht eliminieren zu können. Jedoch bewies die Aminosäureanalytik, daß der Reinheitsgrad der Ligandensequenz verhältnismäßig hoch war. Von Vorteil waren dabei die Strukturmerkmale des Peptidkandidaten, der durch die geringe Anzahl der Aminosäurebausteine und seinen linearen Aufbau nur ein geringes Risiko für eine fehlerhafte Synthese barg.

Die Entscheidung, die Fließbettmatrix durch direkte Synthese des Liganden an das Chromatographiematerial herzustellen, fiel aufgrund der Zuverlässigkeit der Methode und des gut zu kalkulierenden Zeit- und Materialaufwands. Voraussetzung dafür war jedoch zunächst die Überprüfung der chromatographischen Leistung, die anhand der 1 ml Säulen getestet und mit den anderen Matrices verglichen wurde (Kapitel 3.3). Entscheidend war dabei, ob die vermeindlich höhere Ligandenausstattung aber auch die Sequenzunterschiede in der C-terminalen Position einen Einfluß auf das Bindungsvermögen der Säulen haben.

3.2.4 N-terminale Kupplung an NHS-SepharoseTM

Um herauszufinden, ob die Ausrichtung des Liganden an der Chromatographiematrix tatsächlich einen Einfluß auf die Bindung des Zielproteins hat, wurde eine weitere HiTrapTM Säule hergestellt, bei der das vorgefertigte Peptid ohne spezielle Modifikationen oder Schutzgruppenstrategien direkt nach der vom Hersteller vorgesehenen Prozedur an die NHS-SepharoseTM gekuppelt wurde. Die Wahl der Ligandensequenz fiel dabei auf den ursprünglichen Peptidkandidaten KEDFDI. Die Kupplungschemie der NHS-aktivierten SepharoseTM sieht ausschließlich die Molekülverknüpfung über frei zugängliche NH₂-Funktionen einer Ligandenstruktur vor. Da die KEDFDI-Sequenz ohne weitere Modifikationen nur an dem N-terminalen Lysin Aminogruppen aufwies, resultierte daraus eine im Vergleich zu den anderen Säulen genau entgegengesetzte Ausrichtung am Basalmaterial. Obwohl die Verknüpfung aufgrund der Bifunktionalität des endständigen Lysins sowohl über die α - als auch über die ϵ -Aminogruppe in der Seitenkette erfolgen konnte, lag in jedem Fall eine Kupplung über die N-terminale Aminosäure vor, so daß es sich tatsächlich um eine reverse Peptidmatrix (KEDFDI-Revers) handelte.

Die Herstellung der KEDFDI-Sequenz erfolgte automatisiert nach den üblichen Modalitäten der in der Einleitung unter Abschnitt 1.3.2.2 beschriebenen Festphasensynthese nach MERRIFIELD. Zum Einsatz kam ein Wang-Harz, an dem die erste Aminosäure Isoleucin bereits gekuppelt vorlag. Die Arbeitsschritte der Synthese sowie der semipräparativen HPLC-Reinigung (Säule: VydacTM 218 TP 1022 Efficiency, Protein/Peptide C18, 2,2 x 25 cm, Phenomenex) wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Norbert Sewald durchgeführt. Für die Kupplung an das Chromatographiematerial standen nach Lyophilisierung 6,1 mg (7,9 μ mol) der Sequenz zur Verfügung. Abbildung 3.19 gibt das Chromatogramm aus der analytischen HPLC des gereinigten Peptids wieder.

Trotz der erzielten Reinheit des Peptidliganden macht der in Abbildung 3.20 dargestellte Vergleich der MALDI-ToF-MS-Analysen des Spaltprodukts vor (A) und nach (B) der HPLC-Reinigung deutlich, daß auch in diesem Fall wie bereits bei der Herstellung des Fmoc(Fmoc)-geschützten Peptids die Syntheseausbeute durch die Bildung eines um 18 Dalten kleineren Nebenprodukts verringert wurde. Es ist anzunehmen, daß sich hier ebenfalls Aspartimid formierte.

Für den Kupplungsprozeß an das HiTrapTM Material fand keine Reaktionskontrolle statt. Eine nachträgliche Aminosäureanalytik ergab jedoch eine Beladung mit etwa 12 μ mol/g Trockengel, was bei der 1 ml Fertigsäule einer Gesamtausstattung von ca. 0,9 μ mol entsprach. Dieser Wert liegt im Rahmen der Meßdaten für die Matrix, die mit dem Fmoc(Fmoc)-geschützten Peptid substituiert wurde

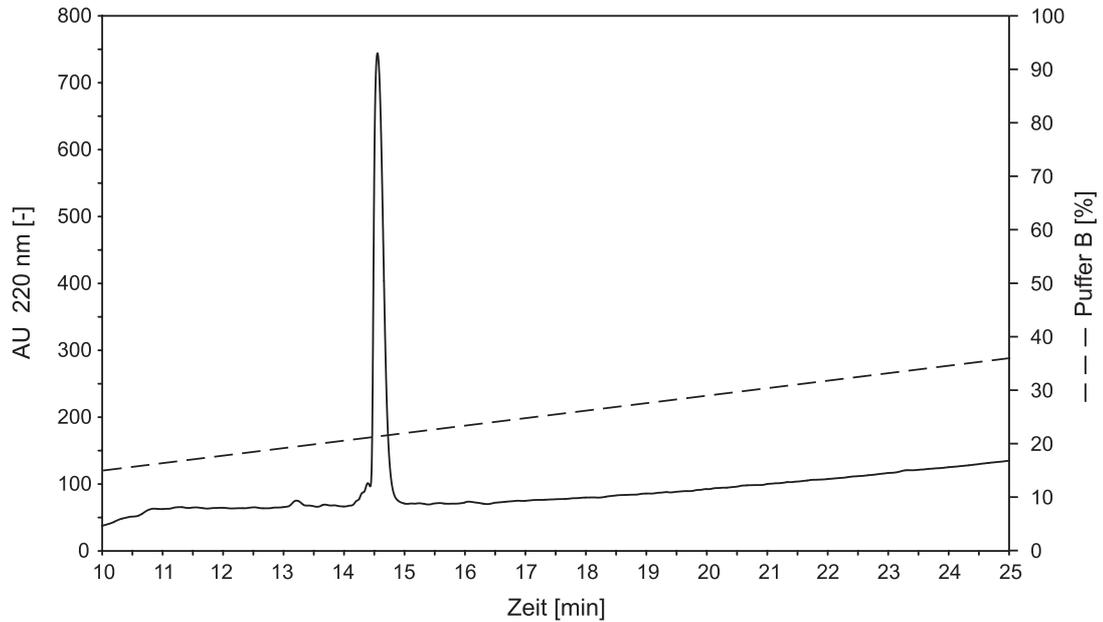


Abbildung 3.19: Analytische HPLC des gereinigten KEDFDI-Peptids. Säule: VydacTM 300 C18 (218TPB), 5 μm , 250 x 4 mm; Puffer A: 95 % dest. H₂O, 5 % Acetonitril, 0,1 % TFA; Puffer B: 5 % dest. H₂O, 95 % Acetonitril, 0,1 % TFA

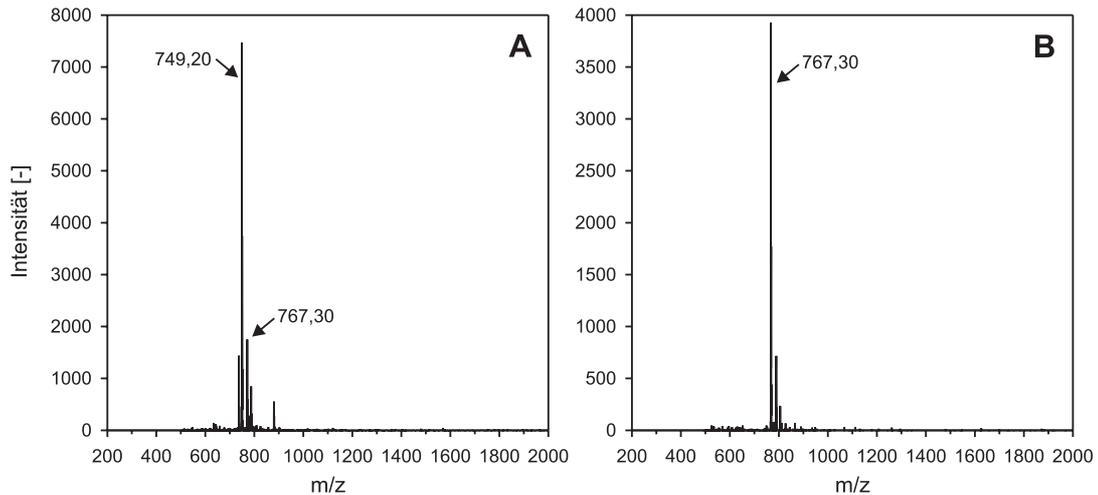


Abbildung 3.20: Vergleich der MALDI-ToF-MS-Analysen des Syntheseprodukts der KEDFDI-Synthese vor (A) und nach (B) der HPLC-Reinigung

(0,4 $\mu\text{mol}/\text{ml}$) und fällt ebenfalls vergleichsweise niedrig aus. Allerdings wurde das Gelaliquot für die Analyse auch in diesem Fall erst nach dem ersten Chromatographiegebrauch entnommen, so daß das Ergebnis durch verbliebene Kontaminationen verfälscht worden sein könnte.

3.2.5 Zusammenfassung

Mit der Entwicklung unterschiedlicher Strategien für die Kupplung des Liganden an das NHS-aktivierte Chromatographiematerial gelang es, die Peptidsequenzen trotz der vorgesehenen Reaktion mit Aminogruppen über den C-Terminus an der Matrix zu fixieren. Mit dieser der Spot-Synthese analogen Ausrichtung sollten ähnliche Bindungseigenschaften gegenüber dem monoklonalen Antikörper wie in den zugrundeliegenden Wechselwirkungsstudien mit den Cellulosemembranen realisiert werden. Als Referenzsäule wurde zusätzlich eine N-terminal verknüpfte Peptidmatrix hergestellt.

Die vielfältigen Überlegungen resultierten in der Anfertigung von sechs verschiedenen Chromatographiegelen, die für eine bessere Unterscheidung bei der Vorstellung der Aufarbeitungsergebnisse in den restlichen Kapiteln dieser Arbeit wie folgt benannt wurden:

- KEDFDK-Fmoc
Kupplung des vorgefertigten geschützten Fmoc(Fmoc)-Peptids
- KEDFDC-Disulfid
Kupplung des Pyridyl-aktivierten Peptids durch Thiol-Disulfid Austausch
- KEDFDC-Amid
Direkte Festphasensynthese des Peptids an die HiTrapTM Säule
- KEDFDI-Amid
Direkte Festphasensynthese des Peptids an die HiTrapTM Säule
- KEDFDI-Revers
N-terminale Kupplung des vorgefertigten ungeschützten Peptids
- KEDFDI-EBA
Direkte Festphasensynthese des Peptids an das EBA-Prototypmaterial

Die einzelnen Kupplungsmethoden basierten mit Ausnahme der direkten Synthese an das Chromatographiematerial auf dem Einsatz vorgefertigter Peptide, die für die Gewährleistung einer C-terminalen Verknüpfung durch eine spezielle Schutzgruppen- oder Aktivierungsstrategie modifiziert werden mußten. Ähnliches galt für die NHS-aktivierten Basalmatrices, ohne deren vorausgehende Funktionalisierung die entsprechenden Kupplungs- bzw. Synthesemechanismen nicht möglich gewesen wären.

Die C-terminale Position des ursprünglichen Peptidkandidaten KEDFDI mußte methodisch bedingt teilweise durch eine andere Aminosäure ausgetauscht werden.

Daß diese Veränderung der Ligandensequenz einen Einfluß auf die Zielproteinbindung hatte, schien aufgrund der in Abschnitt 3.1.4 (S. 92, ff) zusammengefaßten Mutationsanalysen als unwahrscheinlich. Eine endgültige Klärung sollte jedoch durch die im folgenden Kapitel diskutierten chromatographischen Experimente erfolgen, in denen die aus den unterschiedlichen Kupplungsverfahren hervorgegangenen Peptidsäulen miteinander verglichen und beurteilt wurden.

3.3 Festbettchromatographie

Einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildeten die Untersuchungen der chromatographischen Eigenschaften der Peptid-Affinitätsmatrices im Festbett, mit denen die substituierten NHS-Säulen charakterisiert und miteinander verglichen werden konnten. Im Vordergrund der Studien stand die Ermittlung der Produktausbeute, die Abreicherung von Fremdproteinen und Zellinhaltsstoffen sowie Analysen zur Selektivität der Bindung und Kapazität der Matrices. Des Weiteren wurde anhand der 1 ml Fertigsäulen eine CIP-Strategie entwickelt, die in leicht modifizierter Durchführung auch in der Fließbettchromatographie zur Anwendung kam. In Verbindung mit den Optimierungsversuchen zur Regeneration fanden Belastungstests statt, die eine Abschätzung der Stabilität des Peptidliganden und der Standzeit der Matrices ermöglichten.

Sämtliche Experimente zur Festbettchromatographie erfolgten mit einem mikropräparativen SMARTTM System. Um die verschiedenen Kupplungsmethoden und die daraus hervorgegangenen Matrices miteinander vergleichen zu können, wurde eine Vielzahl der Untersuchungen parallel für alle Säulen durchgeführt.

Die folgenden Abschnitte fassen sowohl die Versuche mit den HiTrapTM Fertigsäulen zusammen als auch die Ergebnisse und Besonderheiten der Prototypmatrix. Dabei wird letztere in diesem Kapitel jedoch nur anhand von festbettchromatographischen Experimenten charakterisiert, die mit einer 1 ml befüllten HR5/5 Säule durchgeführt wurden. Die Resultate aus der Fließbettchromatographie werden in einem separaten Ergebnisteil (Kapitel 3.4) diskutiert.

3.3.1 Aufarbeitung von Kulturüberstand

Eine essentielle Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz der Peptid-Affinitätsmatrices zur Aufarbeitung des monoklonalen Antikörpers war die Überprüfung des Bindungsvermögens unter chromatographischen Strömungsbedingungen. Dabei ging es im Vergleich zu den Bindungstests mit den Spotmembranen in erster Linie um die Frage, ob die verkürzte Kontaktzeit und die veränderte Zugänglichkeit der Liganden ausreichend starke Wechselwirkungen für die Rückhaltung des Produkts gewährleisten konnten.

Die Überprüfung des Bindungsvermögens erfolgte anhand der chromatographischen Aufarbeitung von partikelfreiem Kulturüberstand. Die Versuchsreihen umfaßten jeweils fünf Läufe und wurden für alle drei Ligandensequenzen unter Einsatz der KEDFDI-Amid, der KEDFDC-Disulfid und der KEDFDK-Fmoc Säule wiederholt. Der Verbleib des Antikörpers ließ sich durch anschließende ELISA-Bestimmung des Anti-FVIII Gehalts in den einzelnen Fraktionen quantifizieren.

In Anlehnung an die Pufferzusammensetzung in den Selektionszyklen wurde für den Equilibrierungs- und Waschschrift ein auf pH 7,0 eingestellter PBS-Puffer eingesetzt. Die Elution fand mit 2 %iger Essigsäure statt. Vor der Applikation des Kulturüberstands erfolgte eine pH-Wert Kontrolle und gegebenenfalls eine Korrektur auf pH 7,0. In den Chromatographieläufen wurden jeweils 50 ml Probe mit einem IgG-Gehalt zwischen 1,5 und 3 mg verarbeitet. Die Fließgeschwindigkeit betrug 300 cm/h (1924 $\mu\text{l}/\text{min}$) und wurde zur Vermeidung von Peak-Verbreiterungen für die Elution auf 100 cm/h (641 $\mu\text{l}/\text{min}$) herabgesetzt.

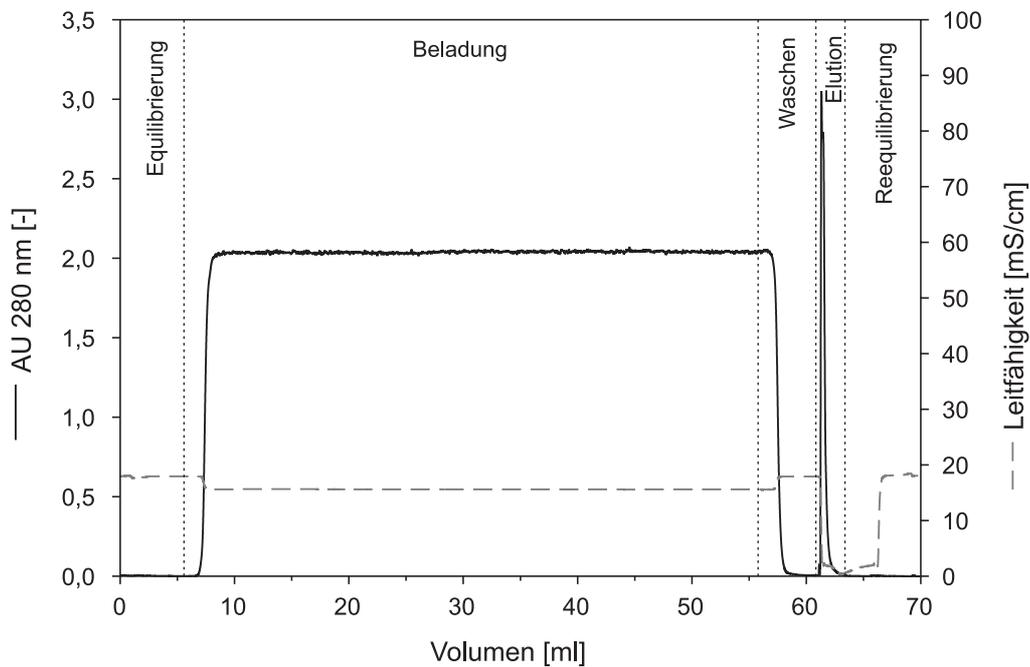


Abbildung 3.21: Chromatogramm der Anti-FVIII Aufreinigung im Festbett

Abbildung 3.21 gibt ein typisches Chromatogramm am Beispiel einer Aufarbeitung mit der KEDFDI-Amid Säule wieder. Dargestellt sind die Leitfähigkeit und der Verlauf des UV-Signals bei 280 nm. Die Aufzeichnungen der einzelnen Läufe wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Nach dem Probenauftrag konnten die verbliebenen ungebundenen Substanzen in einem kurzen Waschschrift ausgespült werden, so daß das UV-Signal schon nach wenigen Millilitern wieder die Basislinie erreichte. Die Desorption der zurückgehaltenen Komponenten erfolgte in einem schmalen Elutionspeak.

Aus dem Chromatogramm geht die Fraktionierung des Durchlaufs während der Aufreinigung hervor. Die Bilanzierung des Produkts ergab laut ELISA-Auswertungen die in Tabelle 3.4 aufgeführten Ergebnisse. Die Auflistung beschränkt sich für alle Versuchsreihen auf jeweils den ersten und den letzten der fünf Läufe. Die

Tabelle 3.4: Bilanzierung der Chromatographieläufe im Festbett.

		Bindung	Wiederfindung	Ausbeute
<i>KEDFDI-Amid</i>	1	99,5 %	100,0 %	99,5 %
	5	99,6 %	97,8 %	97,3 %
<i>KEDFDC-Disulfid</i>	1	98,9 %	100,0 %	98,9 %
	5	99,9 %	98,1 %	97,1 %
<i>KEDFDK-Fmoc</i>	1	97,8 %	98,6 %	96,4 %
	5	99,3 %	100,0 %	99,3 %

Resultate sind jedoch repräsentativ für alle übrigen Aufarbeitungen.

Unter den gegebenen Bedingungen konnte das Produkt in idealer Weise ohne wesentliche Verluste aufgearbeitet werden. Die Bindungs- und Wiederfindungsrate lag in allen Fällen zwischen 97 und 100 %, so daß die Anti-FVIII Ausbeute jeweils mehr als 96 % betrug. Trotz der Strömungsverhältnisse in der Chromatographie und der relativ kurzen Kontaktzeiten war die Affinität zwischen den Liganden und dem Produkt ausreichend hoch, um eine effektive Bindung zu gewährleisten. Damit war die grundsätzliche Voraussetzung für die erfolgreiche Nutzung der Peptid-Affinitätsmatrices gegeben.

Ein Vergleich der Ergebnisse, die mit den unterschiedlichen Säulen erzielt wurden, zeigt, daß das Bindungsverhalten unabhängig von der Belegung der C-terminalen Position des Peptidliganden war und daß alle Kupplungsstrategien für die Ligandenverknüpfung prinzipiell zur Herstellung einer funktionstüchtigen Affinitätsmatrix geeignet waren.

Die hohen Wiederfindungsraten sprechen zudem für eine ideale Wahl des Elutionsmittels, das aus 2 %iger Essigsäure mit einem pH-Wert von etwa 2,7 bestand. Versuche, in denen andere Pufferzusammensetzungen mit höheren Salzkonzentrationen oder weniger saurem pH-Wert eingesetzt wurden, resultierten in bis zu 50 % verminderten Ausbeuten (Daten nicht dargestellt). Aus diesem Grund konnte auf eine Optimierung der Elutionsbedingungen für die weiteren Experimente verzichtet werden.

Die fünf Läufe der Versuchsreihen wurden jeweils direkt aufeinanderfolgend ohne dazwischenliegende Regeneration der Säulen durchgeführt. Da die Ergebnisse während des gesamten Zeitraums keine grundlegenden Abweichungen aufwiesen, läßt sich die Aufarbeitung mit den Peptid-Affinitätsmatrices als ein Prozeß mit hoher Reproduzierbarkeit einstufen.

Um in den folgenden Experimenten auf jegliche Konditionierung der Kulturüberstände verzichten zu können, wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt, die die Überprüfung der Abhängigkeit des Bindungsverhaltens vom pH-Wert zum Ziel hatte. Dies schien insbesondere im Hinblick auf die geplanten Fließbettversuche sinnvoll, da jeder zusätzliche Eingriff zu unerwünschten Zellschädigungen führen konnte.

Die Studien verliefen unter ähnlichen Bedingungen wie in den ersten Bindungstests. Abweichend davon wurde der pH-Wert des Equilibrierungspuffers und des Kulturüberstands in jedem Lauf schrittweise um 0,5 Einheiten verändert. Die Einstellung erfolgte mit verdünnter Phosphorsäure bzw. Natronlauge. Die Untersuchungen fanden in einem pH-Bereich von 6,0 bis 8,0 statt, so daß sie selbst in extremen Ausnahmefällen das komplette pH-Spektrum von Zellkulturernten abdeckten. Die Versuche wurden wie zuvor mittels ELISA ausgewertet. Abbildung 3.22 stellt die Ergebnisse in Form eines Säulendiagramms dar, in dem die berechneten Bindungs- und Wiederfindungsraten sowie die Produktausbeuten der einzelnen Läufe einander gegenübergestellt sind.

Die Bindungsrate lag in allen Fällen über 98 %. Das bedeutet, daß die Wechselwirkungen zwischen den Liganden und dem Anti-FVIII im untersuchten Bereich unabhängig vom pH-Wert sind. Demnach war eine vorausgehende pH-Konditionie-

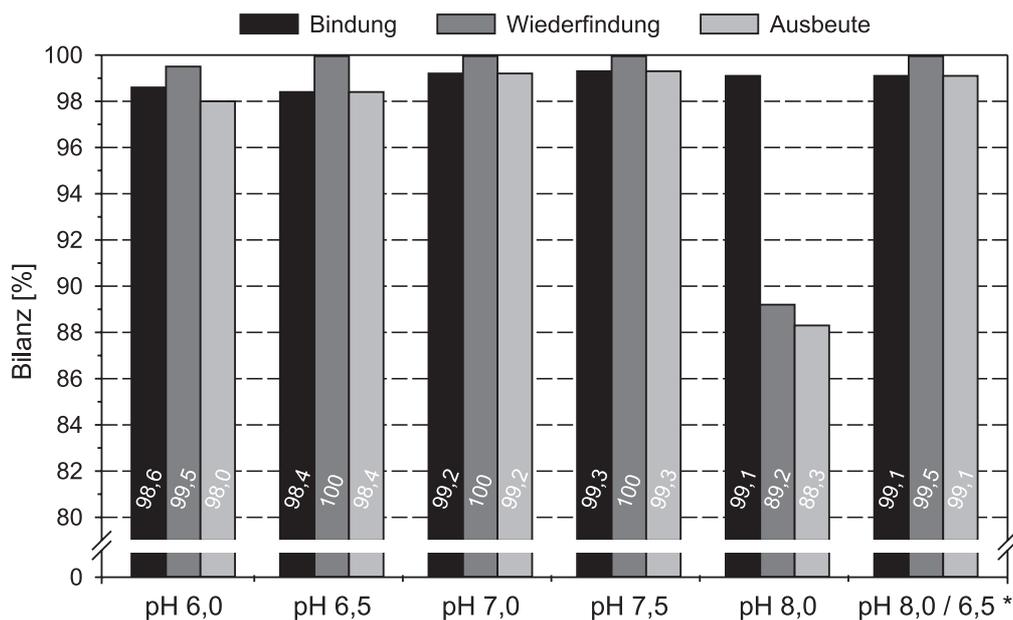


Abbildung 3.22: Abhängigkeit des Bindungsverhaltens vom pH-Wert. Bindungs- und Wiederfindungsraten sowie Ausbeuten von Chromatographieläufen mit pH-Werten zwischen 6,0 und 8,0. Säule: KEDFDI-Amid; Probe: 38 ml Kulturüberstand. *) Die Equilibrierung und Beladung fand in diesem Versuch bei pH 8,0 und der Waschschritt bei pH 6,5 statt.

rung der Ausgangslösungen zur Optimierung der Produktrückhaltung nicht notwendig. Gleiches galt für die Gewährleistung einer hohen Ausbeute. Sie betrug bei pH-Werten bis 7,5 ebenfalls immer mehr als 98 %. Die einzige Ausnahme bildete der Lauf bei pH 8,0. Infolge einer niedrigen Wiederfindungsrate lag die Ausbeute hier nur bei 88 %. Wiederholungen des Versuchs führten zu ähnlichen, teilweise noch gravierenderen Ergebnissen (Daten nicht dargestellt). Es ist anzunehmen, daß die Verluste durch den drastischen Wechsel des pH-Werts von 8,0 auf 2,7 zu Beginn der Elution entstanden sind, der möglicherweise zu einer Ausfällung des gebundenen Proteins geführt hat. Der in der letzten Säulengruppierung des Diagramms dokumentierte Lauf bestätigt diese Theorie. In diesem Fall wurde nach der Equilibrierung und Beladung bei pH 8,0 für den Waschschrift ein auf pH 6,5 eingestellter Puffer verwendet. Durch die resultierende Verringerung der pH-Differenz zum Elutionsmittel ließen sich die Produkteinbußen verhindern und die Wiederfindungsrate sowie Ausbeute wieder auf 100 respektive 99 % erhöhen. Da in der ursprünglichen Versuchsdurchführung ein Equilibrierungs- und Waschschrift bei pH 7,0 vorgesehen war und unter diesen Bedingungen nachweislich keine Verluste auftraten, brauchte dem Resultat des ersten Versuchs bei pH 8,0 somit keine weitere Bedeutung zugemessen zu werden. Zudem sind derart alkalische pH-Werte für Zellkulturen in der Praxis ohnehin nicht existent.

Eine Zusammenfassung der bisherigen Experimente zur Aufarbeitung von Kulturüberständen zeigt, daß alle verwendeten Peptidmatrices prinzipiell für die Aufarbeitung des monoklonalen Antikörpers geeignet waren und zu reproduzierbaren Ergebnissen führten. Ferner war nun gewährleistet, daß bei der Verarbeitung der Kulturproben auch ohne eine exakte pH-Wert Einstellung keine Verluste in der Produktausbeute zu erwarten waren.

3.3.2 Abreicherung von Fremdproteinen

Ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung des Reinigungserfolgs von chromatographischen Prozessen ist die Abreicherung von Fremdproteinen. Diese wurde für die Aufreinigung mit den Peptid-Affinitätsmatrices zunächst anhand von Untersuchungen mit Reinsubstanzlösungen der Hauptkontaminationsproteine aus dem Nährmedium analysiert. Dabei handelte es sich um bovines Serumalbumin BSA, humanes Transferrin HTR und Rinderinsulin BI, die als Supplemente in Konzentrationen von 500 bzw. jeweils 10 mg/L den Zellkulturen zugesetzt worden waren. Die Durchführung der Studien erfolgte in Form von standardisierten Chromatographieläufen analog den unter Abschnitt 3.3.1 dokumentierten Aufarbeitungsexperimenten. Eingesetzt wurden jeweils 15 ml der auf PBS-Basis hergestellten Reinsub-

stanzlösungen, deren Proteingehalt 500 (BSA) bzw. 250 mg/L (HTF, BI) betrug. Die Untersuchungen fanden mit der KEDFDI-Amid Säule statt. Nach Abschluß der Läufe wurden die einzelnen Fraktionen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

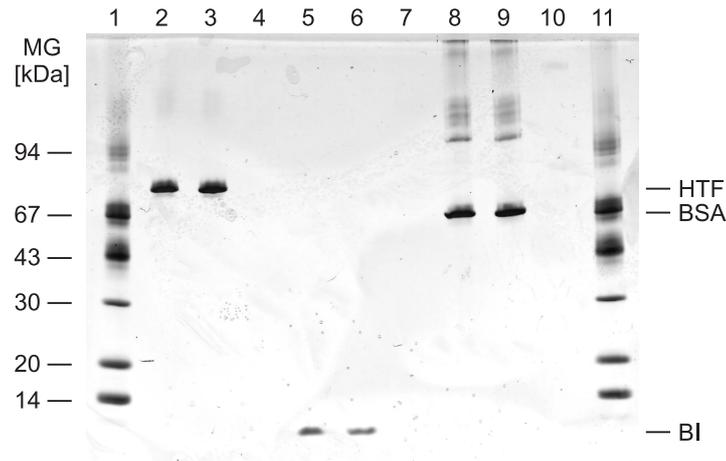


Abbildung 3.23: Bindungsverhalten der Peptid-Affinitätsmatrix gegenüber Fremdproteinen. SDS-PAGE Analyse zur chromatographischen Aufarbeitung von Fremdproteinen aus Reinstanzlösungen (PhastGelTM Gradient 8-25, nicht-reduzierende Bedingungen, Silberfärbung). Spuren: 1,11: LMW Marker 14-96 kDa, reduziert; 2-4: humanes Transferrin HTF (1:3); 5-7: bovines Insulin BI (1:3); 8-10: bovines Serumalbumin BSA (1:5); jeweils Probe, Durchlauf, Eluat.

Abbildung 3.23 zeigt die digitalisierte Aufnahme eines Gels, in dem Proben aus der Ausgangslösung, dem Durchlauf und dem Eluat der Chromatographieläufe aufgetrennt wurden. Die Anfärbung der Banden erfolgte mit einer sensitiven Silberfärbung.

Sowohl Transferrin (Spuren 2-4) als auch Insulin (Spuren 5-7) und Albumin (Spuren 8-10) gingen keine nachweisbare Bindung mit den Peptidliganden der Affinitätsmatrix ein. Die eingesetzten Proteinmengen waren nahezu quantitativ in den Durchlauf fraktionen wiederzufinden, so daß die Eluate keinerlei Kontaminationen enthielten. Die Ergebnisse fallen sehr eindeutig aus und weisen darauf hin, daß seitens der drei untersuchten Mediumkomponenten keine Kochromatographie bei der Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers zu erwarten war.

Zur Überprüfung des Reinigungserfolgs bei der Anti-FVIII Aufarbeitung mit den verschiedenen Peptid-Affinitätssäulen wurde eine zusätzliche SDS-PAGE Analyse der Chromatographiefraktionen aus den in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Experimenten durchgeführt. Abbildung 3.24 zeigt die separierten Proben aus der Ausgangslösung, dem Durchlauf und dem Eluat der Aufreinigung mit den Peptidmatrices KEDFDI-Amid (Spuren 2-4), KEDFDC-Disulfid (Spuren 5-7) und

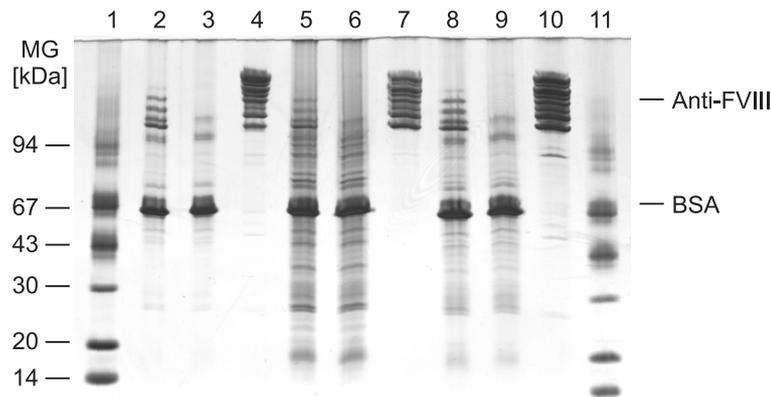


Abbildung 3.24: Abreicherung von Fremdproteinen. SDS-PAGE Analyse der Anti-FVIII Aufreinigung mit den Peptidmatrices KEDFDI, KEDFDC und KEDFDK (PhastGelTM Gradient 8-25, nicht-reduzierende Bedingungen, Silberfärbung). Spuren: 1,11: LMW Marker 14-96 kDa, reduziert (1:15); 2-4: KEDFDI-Amid; 5-7: KEDFDC-Disulfid; 8-10: KEDFDK-Fmoc; jeweils Probe 1:3, Durchlauf 1:3, Eluat 1:10

KEDFDK-Fmoc (Spuren 8-10). Wie aus den Untersuchungen mit Reinsubstanzen zu erwarten war, konnten sämtliche Fremdproteine erfolgreich abgereichert werden, so daß in den Eluaten nur noch der hochkonzentrierte Antikörper vorlag. Dies galt gleichermaßen für alle drei Säulen und bewies die hohe Selektivität der verwendeten Liganden, die eine unspezifische Bindung anderer Proteine verhinderte. Die Ergebnisse aus der SDS-PAGE gaben keinen Anlaß, die Nutzung einer der Peptidmatrices zu favorisieren, um eine bessere Abreicherung proteinogener Kontaminationen zu erreichen.

3.3.3 Abreicherung von DNA

Bei der Endproduktkontrolle von biotechnisch hergestellten Proteinen gelten insbesondere für die therapeutische Nutzung strenge Vorschriften hinsichtlich der zugelassenen Höchstmenge an DNA. Aus diesem Grund spielt die Abreicherung der aus den Wirtszellen freigesetzten DNA eine entscheidende Rolle bei der Beurteilung einer Chromatographiemethode.

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA-Analytik über Fluoreszenz-Messungen mit dem interkalierenden Farbstoff PicoGreenTM durchgeführt. Die Quantifizierung der Konzentration in den Proben erfolgte indirekt über die im Material- und Methodenteil in Abbildung 2.10 auf Seite 77 dargestellte Standardgerade, die anhand definierter Lösungen von Kalbsthymus-DNA erstellt wurde.

Die Bestimmung der DNA-Abreicherung fand für sämtliche Chromatographieläufe

Tabelle 3.5: DNA-Abreicherung in der Festbettchromatographie

	DNA [$\mu\text{g}/\text{ml}$]			Abreicherung	
	Probe	Durchlauf	Eluat	[%]	
<i>KEDFDI-Amid</i>	5,38	5,62	$\leq 0,01$	$\geq 99,8$	
<i>KEDFDC-Disulfid</i>	12,74	12,81	$\leq 0,01$	$\geq 99,9$	
<i>KEDFDK-Fmoc</i>	6,11	5,92	$\leq 0,01$	$\geq 99,8$	
<i>KEDFDI-EBA</i>	3,70	3,72	$\leq 0,01$	$\geq 99,7$	

	DNA [μg]			Abreicherung	
	Probe	Durchlauf	Eluat	[%]	$[\log_{10}]$
<i>KEDFDI-Amid</i>	269	281	$\leq 0,012$	$\geq 99,996$	$\geq 4,4$
<i>KEDFDC-Disulfid</i>	637	641	$\leq 0,012$	$\geq 99,998$	$\geq 4,7$
<i>KEDFDK-Fmoc</i>	306	296	$\leq 0,012$	$\geq 99,996$	$\geq 4,4$
<i>KEDFDI-EBA</i>	185	186	$\leq 0,012$	$\geq 99,994$	$\geq 4,22$

statt, in denen Kulturüberstand verarbeitet wurde. Tabelle 3.5 faßt die repräsentativen Ergebnisse exemplarisch anhand von Einzelversuchen mit den verschiedenen Peptid-Affinitätsmatrices zusammen. Berücksichtigung findet auch ein Experiment mit der gepackten 1 ml HR5/5 Säule des Prototypmaterials. Obwohl die Arbeit mit der Fließbettmatrix erst nach Abschluß der gesamten Studien mit den HiTrapTM Säulen durchgeführt wurde, soll bereits an dieser Stelle die übereinstimmende Qualität der DNA-Abreicherung betont werden.

Sämtliche Eluate wiesen keine DNA-Kontaminationen auf. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Ausgangskonzentration und des Detektionslimits von 10 ng/ml konnte die DNA-Konzentration somit in allen Fällen um über 99,7 % verringert werden, was einer Gesamtabreicherung von mehr als 99,994 % bzw. 4,22 log-Stufen entsprach. Vergleichsexperimente, in denen die pH-Bedingungen während der Elution anhand einer Standardlösung simuliert wurden, ergaben jedoch, daß bereits nach einer kurzzeitigen Ansäuerung von wenigen Minuten kein DNA-Nachweis mehr möglich war. Die Erfahrungen aus den Versuchen mit einem Ionenaustauscher legten nahe, daß die DNA unter diesen Umständen trotz direkter Gegendotation auf einen neutralen pH-Wert vollständig denaturiert wurde [PRIESNER, 1998]. Somit ließ sich mit der gewählten Testmethode anhand der Eluat-Analysen keine eindeutige Aussage über den Verbleib der DNA machen. Da sich die Konzentration in

den Ausgangslösungen und Durchlaufaktionen jedoch abgesehen von geringfügigen Meßungenauigkeiten nicht voneinander unterschieden, konnte eine signifikante DNA-Bindung während des Probenauftrags und folglich die Gefahr der Verunreinigung des Produkts während der Elution ausgeschlossen werden.

3.3.4 Abreicherung niedermolekularer Substanzen

Die Untersuchung der Abreicherung niedermolekularer Substanzen beschränkte sich auf zwei analytische Methoden. Die Auftrennung der Proben aus der Peptid-Affinitätschromatographie mit einer Gelfiltrationssäule ermöglichte als erstes eine allgemeine quantitative Einschätzung der Kontaminationslast in den einzelnen Fraktionen. Als zweites wurde anhand einer detaillierten HPLC-Analytik der Gehalt an freien Aminosäuren bestimmt. Hierbei handelte es sich um die einzige Untersuchung, in der die Abreicherung einer niedermolekularen Substanz spezifisch nachgewiesen wurde.

Die analytische Gelfiltration erfolgte mit einem SMARTTM System und einer SuperdexTM 200 PC 3.2/30 Säule. Dieser Matrixtyp ist eigentlich auf die Separation von Proteinen in einem Bereich von 10 bis 600 kDa ausgelegt. Trotzdem ermöglicht sie unterhalb der vom Hersteller angegebenen Ausschlußgrenze von 1.300 Da noch eine grobe Abschätzung der Belastung mit kleineren Molekülen. Dabei muß berücksichtigt werden, daß nur die Substanzen erfaßt wurden, die bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren. Eine Auftrennung und nähere Charakterisierung der Bestandteile erfolgte nicht.

Die Untersuchungen fanden für jeweils eine Anti-FVIII Aufreinigung mit den drei unterschiedlichen Matrices KEDFDI-Amid, KEDFDC-Disulfid und KEDFDK-Fmoc statt. Abbildung 3.25 gibt eine Gegenüberstellung der aufgetrennten Proben aus dem Kulturüberstand und dem Eluat wieder. Das Ergebnis wurde mit der KEDFDI-Amid Matrix erzielt, ist jedoch repräsentativ für alle übrigen Läufe.

In der Ausgangslösung sind im regulären Trennbereich der Säule zwei dicht aufeinanderfolgende Peaks zu erkennen, die in Übereinstimmung mit Reinsubstanzläufen dem monoklonalen Antikörper und der Mediumkomponente Albumin zugeordnet werden können. Wie aus den SDS-PAGE Analysen bereits hervorging, konnten mit den Peptidmatrices sämtliche Fremdproteine erfolgreich abgereichert werden, so daß an gleicher Stelle im Chromatogramm der Eluatprobe nur noch der Peak des hochkonzentrierten Antikörpers erscheint.

Vergleicht man nun die Abschnitte oberhalb eines Retentionsvolumens von etwa 2 ml, so wird deutlich, daß auch die niedermolekularen Substanzen vollständig entfernt wurden. Während die Probe aus dem Kulturüberstand eine Anzahl hoher

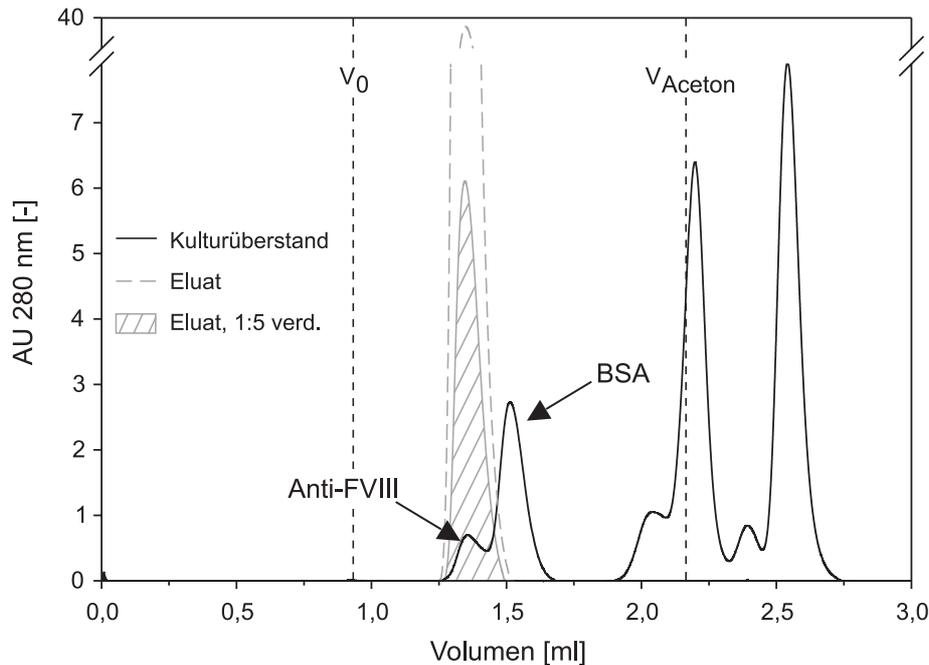


Abbildung 3.25: Analytische Gelfiltration der Chromatographieproben. Gegenüberstellung der aufgetrennten Proben aus Kulturüberstand und Eluat einer Anti-FVIII Aufreinigung mit der KEDFDI-Amid Matrix (SMARTTM System; SuperdexTM 200 PC 3.2/30; Fluß: 40 μ l/min; Probenvolumen: 10 μ l; Puffer: PBS, pH 7,0; Meßbereich: V_0 - V_{Aceton} , V_0 : Totvolumen, 4 mg/ml Dextranblau, V_{Aceton} : 10 % Aceton).

Peaks aufweist, verbleibt das UV-Signal des aufgetrennten Eluats auf der Basislinie. Somit kann davon ausgegangen werden, daß zumindest keine der bei 280 nm optisch aktiven Substanzen mit der Peptid-Affinitätsmatrix interagiert und zu einer Verunreinigung des Produkts führt.

Bei den nachgewiesenen niedermolekularen Komponenten im Kulturüberstand handelt es sich vermutlich in erster Linie um den zugesetzten pH-Indikator Phenolrot, kleinere zelluläre Peptide sowie die supplementierten Aminosäuren. Letztere wurden durch eine HPLC-Analytik spezifisch erfaßt und quantifiziert.

Die HPLC-Aminosäureanalytik erfolgte durch Umkehrphasenchromatographie mit einer C₁₈-Säule. Wie in der Gelfiltration wurden die Untersuchungen für jeweils einen Aufarbeitungslauf mit den drei Peptidmatrices durchgeführt. Abbildung 3.26 stellt die absoluten Mengen in dem Kulturüberstand, dem Durchlauf, der Waschfraktion und dem Eluat einander gegenüber. Dargestellt sind die Ergebnisse aus dem Lauf, der bereits als Beispiel für die analytische Gelfiltration in Abbildung 3.25 dokumentiert wurde.

Wie auch in allen übrigen Aufarbeitungsexperimenten lassen sich sämtliche freie Aminosäuren aus der Ausgangsprobe nahezu quantitativ im Durchlauf wiederfin-

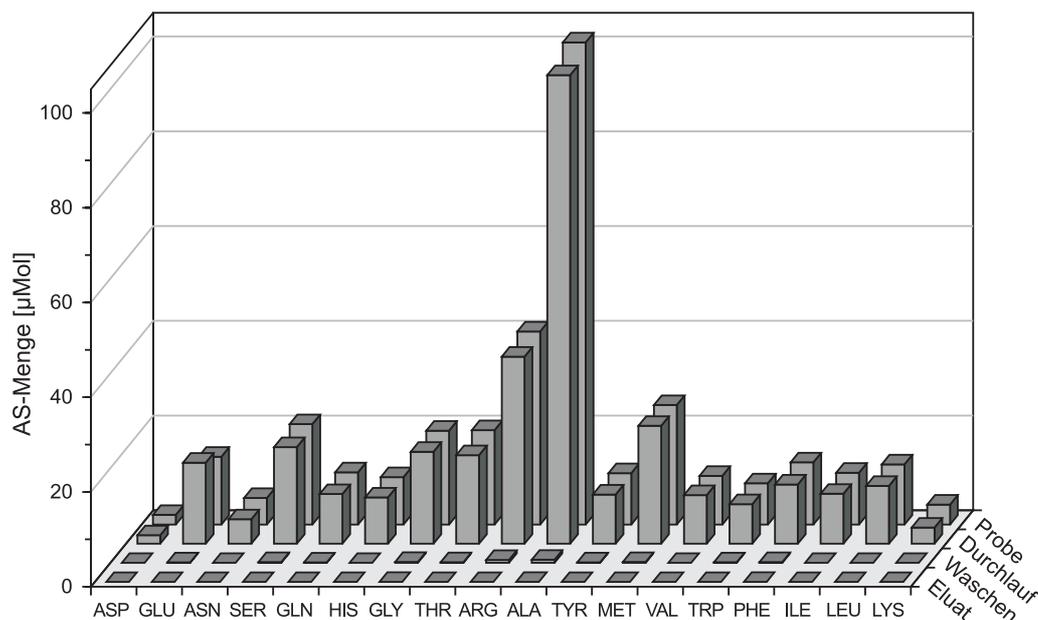


Abbildung 3.26: Abreicherung von Aminosäuren in der Peptid-Affinitätschromatographie. Gegenüberstellung der absoluten Mengen aus Kulturüberstand (50 ml), Durchlauf (50 ml), Waschfraktion (4,2 ml) und Eluat (1,2 ml) einer Aufreinigung. (Säule: KEDFDI-Amid)

den. Somit kann eine Rückhaltung an der Peptid-Affinitätsmatrix ausgeschlossen werden. Geringfügige Reste wurden im Waschschrift ausgespült, so daß das Eluat frei von Kontaminationen war. In den Fällen, in denen sich auch im Eluat Aminosäuren nachweisen ließen, lag die Konzentration unter $20 \mu\text{mol/L}$. Da zudem immer andere Aminosäuren betroffen waren, ist davon auszugehen, daß es sich hierbei um kein reproduzierbares charakteristisches Auftreten sondern um Meßungenauigkeiten in der HPLC-Analytik handelte.

Die Ergebnisse aus der analytischen Gelfiltration stimmten bezüglich der Abreicherung niedermolekularer Substanzen mit denen aus der Aufarbeitung mit rProtein A und dem Ionenaustauscher überein (Daten nicht dargestellt). Gleiches galt für die Resultate aus der Quantifizierung freier Aminosäuren. Aus diesem Grund sind alle drei Matrixtypen hinsichtlich der untersuchten Kriterien als gleichwertig einzustufen. Eine umfangreichere Überprüfung des Verbleibs weiterer Fremdmoleküle war mangels geeigneter Analysemethoden nicht möglich.

3.3.5 Untersuchung der Bindungsspezifität

Für die Ermittlung der Spezifität der Peptid-Affinitätsmatrix gegenüber dem Produkt wurden Bindungsstudien mit Referenzantikörpern unternommen. Dabei sollte

herausgefunden werden, ob und in welchem Ausmaß auch andere strukturverwandte Moleküle mit dem Chromatographiematerial interagierten oder es sich tatsächlich um eine monospezifische Bindung des Anti-FVIII handelte.

Die Untersuchungen verliefen analog zu den in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Aufarbeitungsexperimenten mit dem Produktantikörper. Nach Equilibrierung der Peptidmatrix mit PBS wurde die jeweilige IgG-Lösung aufgetragen und im Anschluß an einen Waschschrift mit 2 %iger Essigsäure eluiert. Zum Einsatz kamen insgesamt vier verschiedene Referenzantikörper. Sie lagen vorgereinigt als Eluate aus der Ionenaustausch- oder Affinitätschromatographie bzw. als Ultrafiltrationskonzentrat vor. Vor der Applikation wurden die Lösungen in Abhängigkeit von ihrem IgG-Gehalt in einem Verhältnis zwischen 1:3 und 1:10 mit PBS verdünnt und auf pH 7,0 eingestellt. Die Auftragsmenge betrug jeweils 15 ml. Weitere Angaben zu den verwendeten Antikörpern sind Tabelle 3.6 zu entnehmen.

Tabelle 3.6: Spezifität und Applikationsform der verwendeten Referenzantikörper

	IgG-Klasse	Spezifität	Vorbehandlung	Menge
<i>mAK-1</i>	Ratte IgG ₁	κ -Kette, Maus-IgG	Ultrafiltration, 10 kDa	2,8 mg
<i>mAK-2</i>	Maus IgG ₁	k. A.	IEX-Chromatographie	1,3 mg
<i>mAK-3</i>	Maus IgG ₁	Vinculin	Affinitätschromatographie	n. d.
<i>mAK-4</i>	Maus IgG ₃	Gangliosid GD ₃	Affinitätschromatographie	n. d.

Die Versuche fanden mit allen HiTrapTM Säulen statt und lieferten identische Ergebnisse. Die Auswertung erfolgte durch SDS-PAGE Analysen der einzelnen Chromatographiefraktionen. Abbildung 3.27 stellt am Beispiel der Experimente mit der KEDFDI-Amid Matrix die aufgetrennten Proben aus den Ausgangslösungen, den Durchläufen und den Eluaten der Fremdanikörperaufarbeitung einander gegenüber. Für die Elektrophorese wurde ein 12-zähliger Applikationskamm eingesetzt. Der in Spur 1 dargestellte LMW-Marker stammt aus einem parallel hergestellten Referenzgel.

Die Immunglobuline mAK-1 (Spuren 2-4) und mAK-2 (Spuren 5-7), die durch Ultrafiltration bzw. mit einem Ionenaustauscher vorbehandelt worden sind, enthielten noch zahlreiche Verunreinigungen durch Fremdproteine. Deutlich zu erkennen sind dabei verhältnismäßig hohe Konzentrationen an Albumin, dessen Bande bei 68 kDa erscheint. Demgegenüber handelte es sich bei den affinitätschromatographisch gereinigten mAK-3 (Spuren 8-10) und mAK-4 (Spuren 11-13) um Reinslösungen des jeweiligen Antikörpers.

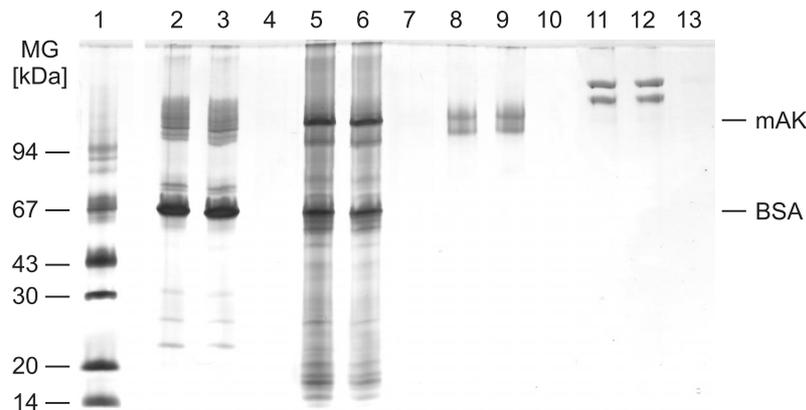


Abbildung 3.27: Bindungselektivität der Peptid-Affinitätsmatrix gegenüber strukturverwandten Antikörpern. SDS-PAGE Analyse zur Aufarbeitung produktfremder mAK (PhastGelTM Gradient 8-25, nicht-reduzierende Bedingungen, Silberfärbung). Spuren: 1: LMW Marker 14-96 kDa, reduziert; 2-4: mAK-1 Ratte IgG₁; 5-7: mAK-2 Maus IgG₁; 8-10: mAK-3 Maus IgG₁; 11-13: mAK-4 Maus IgG₃; jeweils Probe, Durchlauf, Eluat (1:3).

Unabhängig von der Zusammensetzung der Ausgangsproben waren sämtliche Proteine quantitativ im Durchlauf wiederzufinden. Die in den Spuren 4, 7, 10 und 13 aufgetrennten Eluate weisen keinerlei Banden auf und können als proteinfrei angesehen werden. Das bedeutet, daß neben den proteinogenen Kontaminationen auch keiner der vier Referenzantikörper mit der Peptid-Affinitätsmatrix interagierten. Dieses Ergebnis beweist, daß die Bindungsstelle des Peptidliganden nicht in der für alle murinen Immunglobuline der Klasse IgG konstanten F_c-Region liegt sondern in der variablen F_{ab}-Einheit. Da diese für jeden Antikörper charakteristisch ist, kann davon ausgegangen werden, daß der Peptidligand sehr spezifisch auf eine ausschließlich im Anti-FVIII vorkommende Domäne abgestimmt ist und außer den vier untersuchten auch keine weiteren produktfremden Immunglobuline bindet. Das Resultat stützt die Theorie aus Abschnitt 3.1.3, in dem die Analogie des Liganden mit einer Sequenz im Antigen des monoklonalen Antikörpers beschrieben wurde. Demnach stellt das Peptid ein Teilstück oder sogar die komplette Struktur der antigenen Domäne dar, gegen die der Anti-FVIII gerichtet ist. Die Bindungsstelle befände sich somit innerhalb der hypervariablen Region, die für jeden Antikörper einzigartig ist und nur sehr spezifische Wechselwirkungen mit einem zweiten Molekül zuläßt.

3.3.6 Untersuchung der Bindungskapazität

Die Ermittlung von Durchbruchprofilen für den Anti-FVIII stellte einen Schwerpunkt der Untersuchungen zur Charakterisierung der Peptid-Affinitätsmatrixes

dar. Die dynamische Bindungskapazität ist ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit von Chromatographiematerialien. Da sämtliche bisherigen Ergebnisse keinen signifikanten Unterschied im Aufarbeitungserfolg mit den verschiedenen Matrices erkennen ließen, sollte der Vergleich des Durchbruchverhaltens den entscheidenden Hinweis auf die eventuelle Favorisierung einer der verwendeten Ligandenstrukturen oder Kupplungsmethoden für die Herstellung der Fließbettmatrix liefern. Des Weiteren wurde die Abhängigkeit der Kapazität von der Beschaffenheit der Ausgangslösung und von der Fließgeschwindigkeit untersucht. Letztere kann durch ihren Einfluß auf die Kontaktzeit zwischen dem Produkt und den Liganden gerade in affinitätschromatographischen Prozessen häufig einen limitierenden Faktor für die Rückhaltung auf der Säule darstellen. In einer dritten Studie stand die Auswirkung der Orientierung des Peptids an der Basalmatrix im Vordergrund. Sie sollte Aufschluß über die Notwendigkeit der Einhaltung der Kupplungsbedingungen aus der Spot-Synthese geben. Weitere Untersuchungen der Bindungskapazität erfolgten im Zusammenhang mit Stabilitätstests.

Die dynamische Bindungskapazität wurde durch frontale Adsorptionsanalysen ermittelt. Dabei wird eine produktthaltige Lösung fortlaufend auf eine Säule aufgetragen und der Durchbruch des Zielmoleküls im Durchlauf verfolgt. Per Definition beträgt der Wert der dynamischen Bindungskapazität der Produktmenge, die bei einem Durchbruch von 10 % der Ausgangskonzentration auf einen Milliliter Gel aufgetragen wurde. Die Untersuchungen fanden mit Kulturüberstand oder einem affinitätschromatographisch über rProtein A gereinigten, pH-konditionierten Konzentrat statt. Letzteres hatte den Vorteil, daß der Produktdurchbruch direkt am Verlauf des UV-Signals bei 280 nm abgelesen werden konnte. Trotzdem wurde in den meisten Fällen wie auch generell bei der Verwendung Fremdprotein-haltiger Lösungen dem Durchlauf regelmäßig eine Probe entnommen und der Anti-FVIII Gehalt im ELISA bestimmt.

Als erstes erfolgte der Vergleich des Durchbruchverhaltens der beiden Säulen, die auf unterschiedliche Weise hergestellt jedoch mit der selben Peptidsequenz ausgestattet wurden. Es handelte sich dabei um die zwei KEDFDC-Matrices, deren Liganden einerseits durch direkte Synthese (KEDFDC-Amid) und andererseits durch eine Disulfid-Austauschreaktion (KEDFDC-Disulfid) an das Chromatographiematerial gekuppelt worden sind.

Abbildung 3.28 stellt die Durchbruchkurven einander gegenüber. Die Adsorptionsanalysen erfolgten mit dem rProtein A Eluat (640 mg mAK/L) bei einer Fließgeschwindigkeit von 300 cm/h. Die resultierenden Bindungsprofile liegen nahezu deckungsgleich übereinander. Zudem weisen beide Kurven einen annähernd idea-

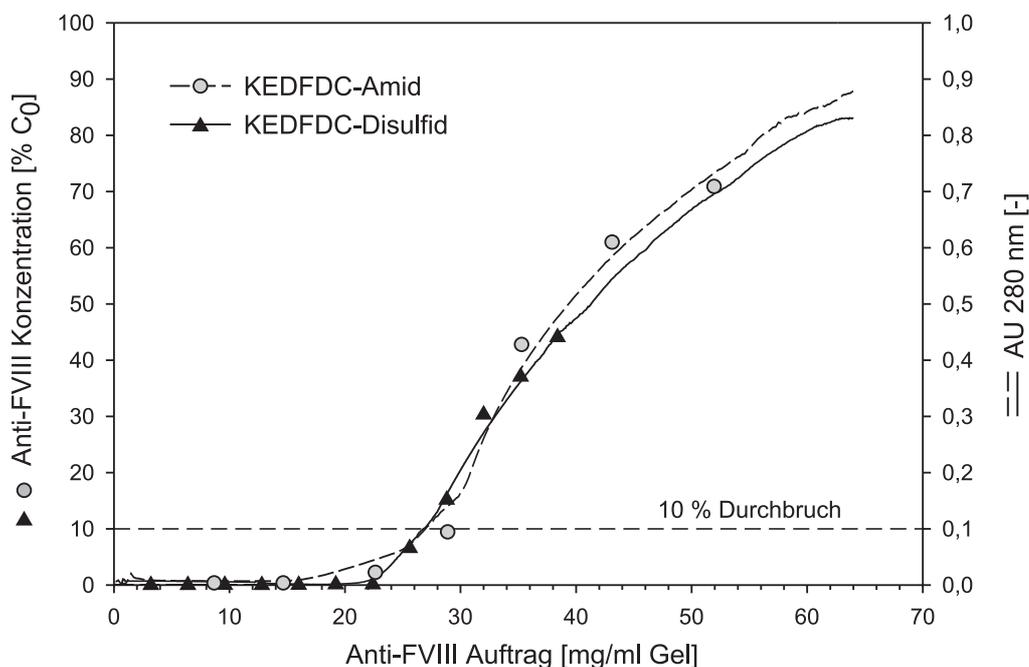


Abbildung 3.28: Vergleich der Durchbruchkurven der unterschiedlich hergestellten KEDFDC-Säulen. KEDFDC-Amid: Direkte Synthese; KEDFDC-Disulfid: Kupplung über Disulfid-Austauschreaktion. (Probe: Anti-FVIII Konzentrat 640 mg/L; Fluß: 300 cm/h)

len Verlauf auf. Während das UV-Signal bis zu einem Produktauftrag von etwa 22 mg/ml Gel entlang der Basislinie verläuft, steigt es dann steil an und nähert sich bei 60 mg/ml dem Wert der Ausgangslösung. Die aus den ELISA-Daten ermittelten Durchbrüche stimmen mit den Adsorptionsmessungen bei 280 nm überein und bestätigen das Ergebnis. Aus der Graphik lassen sich die dynamischen Bindungskapazitäten der beiden Säulen ablesen, die etwa 27 mg/ml Gel betragen, und kennzeichnen die Peptidmatrices als äußerst hochkapazitive Chromatographiemedien im Vergleich zu vielen kommerziell erhältlichen Affinitätsgelen. Ein Beispiel sind die Protein A und Protein G Materialien der Firma Amersham Pharmacia Biotech, deren Kapazitäten mit 20 bis 40 mg/ml Trockengel angegeben werden, was bei einem durchschnittlichen Quellfaktor von 3,5 lediglich 5,7 bis 11,4 mg/ml Gel entspricht. Die exakten Werte sowie eine Gegenüberstellung mit den Kapazitäten der anderen HiTrapTM Säulen und weiterer Referenzmessungen sind Tabelle 3.7 auf Seite 142 zu entnehmen.

Das Resultat der ersten Kapazitätsstudie zeigt, daß sich sowohl die direkte Synthese des Peptidliganden an das Basalmaterial als auch die Kupplung durch eine Disulfid-Austauschreaktion in gleicher Weise für die Herstellung der Affinitätsmatrix eignete.

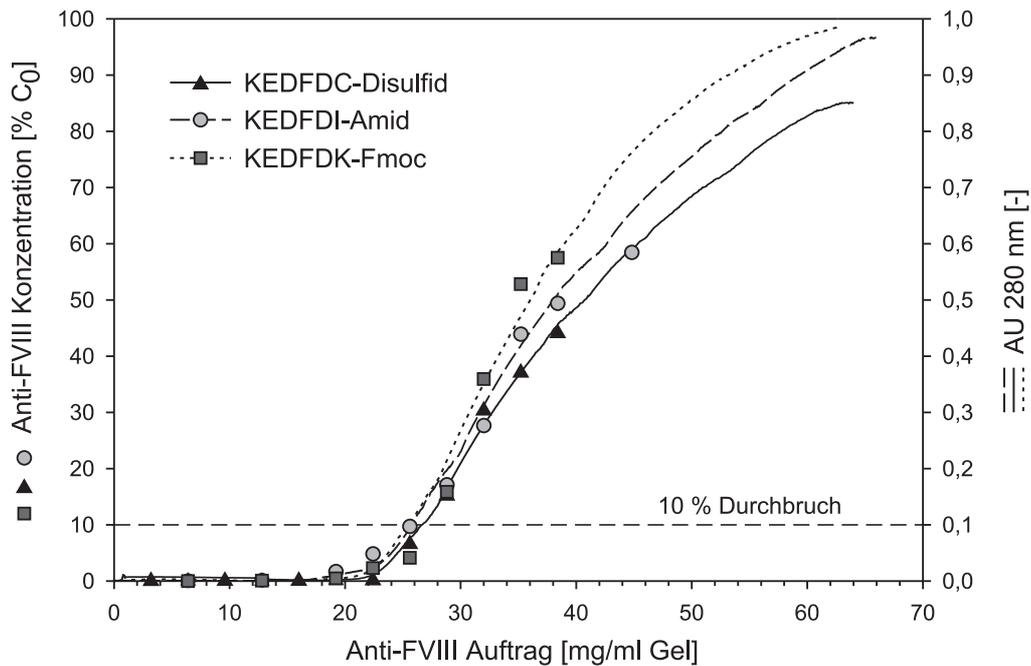


Abbildung 3.29: Durchbruchverhalten der verschiedenen HiTrapTM-Säulen. Vergleich der Durchbruchkurven der KEDFDI-Amid, KEDFDC-Disulfid und KEDFDK-Fmoc Säule. (Probe: Anti-FVIII Konzentrat, 640 mg/L; Fluß: 300 cm/h)

In einer zweiten Versuchsreihe wurde das Durchbruchverhalten der übrigen Peptidmatrices ermittelt. Dabei sollte in erster Linie festgestellt werden, ob die Verwendung der unterschiedlichen Aminosäuresequenzen für den Peptidliganden einen Einfluß auf die Kapazität der Säulen hat. Ferner konnten anhand der Ergebnisse auch in diesem Fall die verschiedenen Kupplungsmethoden miteinander verglichen und beurteilt werden.

Abbildung 3.29 stellt die bereits in Graphik 3.28 dokumentierte Durchbruchkurve der KEDFDC-Disulfid Säule mit den Peptidmatrices KEDFDI-Amid und KEDFDK-Fmoc einander gegenüber. Diese wurden durch direkte Synthese bzw. die orientierte Kupplung eines Fmoc-geschützten Peptids hergestellt.

Die Untersuchungen fanden ebenfalls mit dem Anti-FVIII Konzentrat bei einer Fließgeschwindigkeit von 300 cm/h statt. Bis zu einer Auftragsmenge von etwa 30 mg/ml verlaufen alle drei Kurven wieder nahezu deckungsgleich. Danach weichen die ELISA-Werte und auch die UV-Signale etwas voneinander ab. Da jedoch lediglich der Bereich bis zur Überschreitung der dynamischen Bindungskapazität für die chromatographische Aufarbeitung des Produkts von Interesse ist, können die Matrices als gleichwertig eingestuft werden. Auch in diesen Experimenten lag die dynamische Bindungskapazität für alle Säulen zwischen 26 und 27 mg/ml Gel.

Die frontalen Adsorptionsanalysen bewiesen, daß sich alle drei Peptidstrukturen unabhängig von der C-terminalen Aminosäurebelegung durch eine gleich hohe Kapazität für den Anti-FVIII auszeichneten. Ferner konnte anhand der Resultate keine der ausgearbeiteten Methoden für die Herstellung der Peptid-Affinitätsmatrix als ungeeignet eingestuft werden. Sowohl die direkte Synthese des Liganden an das Chromatographiematerial als auch die Fixierung über einen Disulfid-Austausch und die Kupplung von Fmoc-geschützten Peptiden schienen die Ligandenausstattung in optimaler Weise zu gewährleisten. Selbst Fehlsequenzen, die bei der direkten Synthese nicht vollständig ausgeschlossen werden können, oder die vermeintlich geringere Ligandenbeladung der KEDFDK-Fmoc Säule hatten keinen negativen Einfluß auf die Kapazität der Matrices.

Eine weitere Studie beschäftigte sich mit der Auswirkung der Fließgeschwindigkeit auf das Bindungsvermögen der Peptid-Affinitätsäulen. Die umfangreichsten Untersuchungen wurden dazu am Beispiel der KEDFDK-Disulfid Matrix durchgeführt. Auch in diesem Fall diente das affinitätschromatographische Konzentrat als Ausgangslösung. Die Adsorptionsanalysen wurden bei 300, 150 und 75 cm/h durchgeführt, was einem Volumenstrom von 1924, 962 bzw. 481 $\mu\text{l}/\text{min}$ entsprach. Die resultierenden Durchbruchkurven sind in Abbildung 3.30 dargestellt.

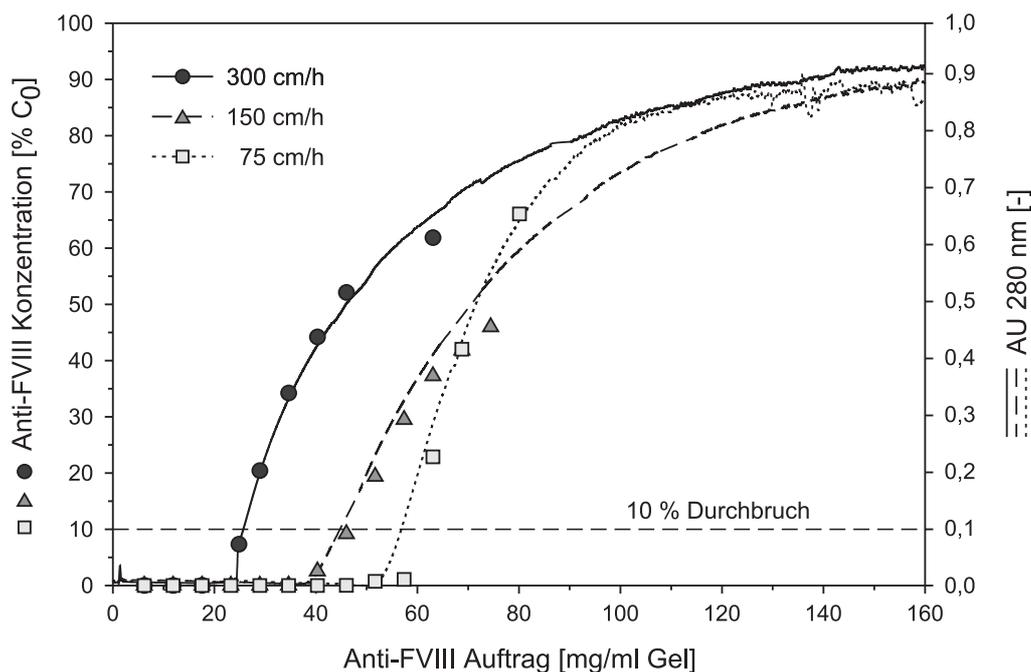


Abbildung 3.30: Abhängigkeit des Durchbruchverhaltens von der Fließgeschwindigkeit. (Säule: KEDFDK-Disulfid, Probe: Anti-FVIII Konzentrat, 640 mg/L)

Die Daten aus der ELISA-Auswertung und der Verlauf der UV-Signale zeichnen sich durch präzise Übereinstimmung aus. Aus allen drei Kurven läßt sich ein nahezu optimales Durchbruchverhalten erkennen. Einen besonders idealen Verlauf weist der Versuch bei der langsamsten Fließgeschwindigkeit von 75 cm/h auf. Die Kurve nimmt in diesem Fall einen steilen sigmoiden Charakter an, der einen plötzlichen, schnell auf das Maximum ansteigenden Durchbruch des Produkts widerspiegelt. Deutlich zu erkennen ist, daß sich die Kapazität für den monoklonalen Antikörper mit abnehmender Fließgeschwindigkeit stark erhöht. Während die dynamische Bindungskapazität bei 300 cm/h noch 27,0 mg/ml Gel beträgt, steigt sie bei 150 cm/h auf 45,4 und bei 75 cm/h sogar auf einen mehr als doppelt so hohen Wert von 56,8 mg/ml an (s. auch Tab. 3.7, S. 142).

Die Ergebnisse zeigen, daß das Bindungsvermögen der Peptid-Affinitätsmatrix stark von der Verweilzeit des Produkts in der Säule abhängig ist. Trotzdem waren die Kapazität und das gesamte Durchbruchverhalten auch bei 300 cm/h bereits so akzeptabel, daß eine Verringerung der Fließgeschwindigkeit für die Aufarbeitung des Anti-FVIII überflüssig war.

Parallel zu den Versuchen mit dem affinitätschromatographisch gereinigten Anti-FVIII Konzentrat wurde eine Vergleichsstudie mit Kulturüberstand durchgeführt. Diese diente dazu, eventuelle Einflüsse der Produktkonzentration oder sonstiger Bestandteile in der Ausgangslösung auf das Bindungsverhalten festzustellen. Das Resultat sollte ferner für eine präzise Abschätzung der maximalen Auftragsmenge bei der Aufarbeitung des Antikörpers aus der Zellkulturernte genutzt werden.

Der Vergleichslauf mit dem Kulturüberstand erfolgte mit der KEDFDC-Disulfid Säule. Der Versuch fand bei einer Fließgeschwindigkeit von 300 cm/h statt. Insgesamt wurde ein Volumen von 1000 ml aufgetragen. Durch regelmäßige Probenentnahme aus dem Durchlauf und anschließende Auswertung im ELISA ließ sich die resultierende Durchbruchskurve ermitteln. Die Ausgangskonzentration des Antikörpers betrug 50 mg/L. Abbildung 3.31 gibt das Bindungsprofil wieder und vergleicht es mit einem entsprechenden Lauf, in dem unter gleichen Bedingungen das Produktkonzentrat verarbeitet wurde.

Während der Anti-FVIII Gehalt im Durchlauf mit dem Konzentrat bereits nach einer Auftragsmenge von 27,0 mg/ml Gel den Wert von 10 % der Ausgangskonzentration überschreitet, wird die dynamische Kapazität mit dem Kulturüberstand erst nach etwa der 1,5-fachen Menge bei 36,5 mg/ml erreicht. Statt des hyperbolischen Verlaufs deutet sich aus dem Profil mit dem Überstand eher eine steile sigmoide Kurve an, die bereits in der in Abbildung 3.30 dokumentierten Adsorptionsanalyse bei 75 cm/h das Idealbild einer Durchbruchskurve repräsentierte.

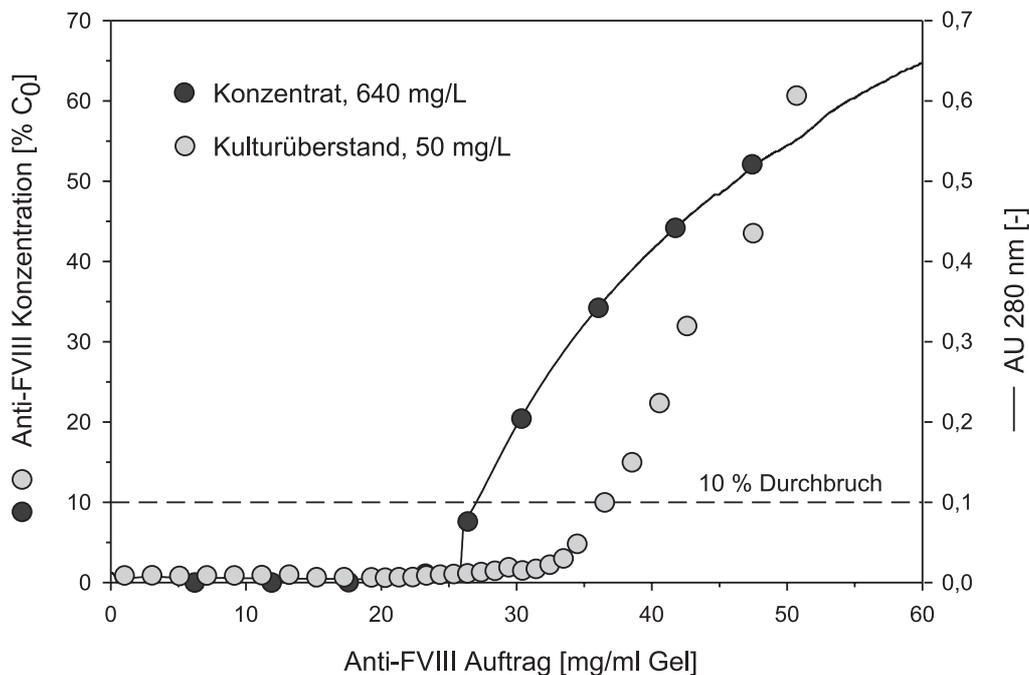


Abbildung 3.31: Vergleich des Durchbruchverhaltens von verschiedenen Produktlösungen. (Säule: KEDFDC-Disulfid, Fluß: 300 cm/h)

Aus der ermittelten dynamischen Kapazität läßt sich die maximale Auftragsmenge bestimmen. Demnach können mit der 1 ml HiTrapTM Säule bis zu 700 ml Kulturüberstand ohne einen signifikanten Produktverlust aufgearbeitet werden. Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß das Bindungsverhalten der Peptid-Affinitätsmatrix in erheblicher Weise von der Zusammensetzung der Ausgangslösung abhängt.

Für die nähere Betrachtung der Ursachen wird an dieser Stelle eine weitere Vergleichsstudie mit der KEDFDI-EBA Matrix herangezogen, in der ausschließlich der Einfluß der Produktkonzentration auf die Kapazität untersucht worden ist. Um mögliche Effekte anderer Komponenten aus dem Kulturmedium auszuschließen, wurden für die entsprechenden Adsorptionsanalysen unterschiedliche Verdünnungen des rProtein A Eluats eingesetzt. Die Herstellung erfolgte auf der Basis des Equilibrierungspuffers PBS.

Eine Gegenüberstellung der Durchbruchkurven ist in Abbildung 3.32 wiedergegeben. Als Referenz diente ein entsprechender Lauf mit Kulturüberstand. Obwohl die Versuche nur für die 1 ml HR5/5-Säule mit der fließbettchromatographischen Prototypmatrix durchgeführt wurden, lassen die Ergebnisse eine eindeutige Aussage über die Konzentrationsabhängigkeit des Bindungsvermögens zu, die bedingt auch auf die HiTrapTM Materialien übertragen werden kann.

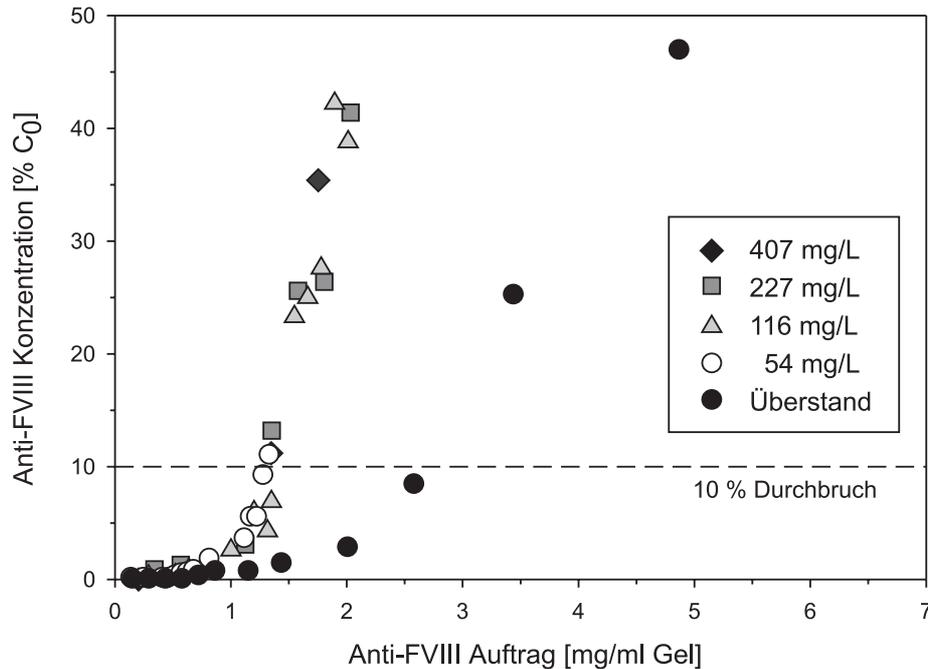


Abbildung 3.32: Abhängigkeit des Durchbruchverhaltens von der Produktkonzentration. (Säule: KEDFDI-EBA, Fluß: 300 cm/h)

Auffällig ist zunächst, daß die Kapazität der Prototypmatrix erheblich geringer ist als die der HiTrapTM Säule. Die möglichen Gründe dafür werden jedoch nicht an dieser Stelle sondern erst in Kapitel 3.3.7 anhand von ausführlichen Untersuchungen zum Verweilzeitverhalten diskutiert.

Obwohl sich die Konzentrationen des Antikörpers in den verdünnten Eluaten mit Werten zwischen 407 und 54 mg/L erheblich voneinander unterscheiden, ergaben die ELISA-Werte sämtlicher Läufe einen identischen Kurvenverlauf ohne signifikante Abweichungen. Das bedeutet, daß das Durchbruchverhalten der Peptidmatrix in keiner Weise von der Produktkonzentration abhängig ist. Allerdings lag auch in dieser Studie die dynamische Bindungskapazität in dem Versuch mit Kulturüberstand wesentlich höher als bei der Verarbeitung der Konzentratlösungen. Im Fall der Prototypmatrix konnte sogar etwa die doppelte Produktmenge aufgetragen werden, ohne daß der Antikörpergehalt im Durchlauf 10 % des Ausgangswerts überschritt. Da die Konzentration des Anti-FVIII mit 50 mg/L in etwa der Konzentration des am stärksten verdünnten Eluats entsprach, ist somit definitiv bewiesen, daß nicht der Produkttiter sondern die generell andere Zusammensetzung des Überstands einen positiven Einfluß auf die Kapazität der Säule hatte. Welcher der Bestandteile dafür verantwortlich war, konnte jedoch aufgrund der Komplexität des Kulturmediums in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

In einem letzten Vergleichsexperiment wurde die Kapazität der Säule mit revers gekuppelten Peptidliganden untersucht. Als Ziel des Versuchs sollte der Einfluß der Kupplungsorientierung auf das Bindungsvermögen überprüft werden.

Die Herstellung der bisher untersuchten Matrices erfolgte ausnahmslos durch eine mit verschiedenen Methoden realisierte C-terminale Verknüpfung der Peptide an das Basalmaterial. Um herauszufinden, ob diese aus der Spot-Synthese vorgegebene Orientierung für eine erfolgreiche Bindung des Produkts zwingend notwendig war, wurden Kapazitätsuntersuchungen mit der in umgekehrter Ligandenausrichtung ausgestatteten KEDFDI-Revers Säule durchgeführt. Sollte die Bindungskapazität von der Orientierung des Peptidliganden unbeeinflusst sein, so hätten die teilweise komplizierten und materialaufwendigen C-terminalen Kupplungsstrategien durch das vom Matrixhersteller vorgesehene einfache Verknüpfungskonzept sinnvoll ersetzt werden können.

Abbildung 3.33 dokumentiert eine Durchbruchskurve mit der N-terminal gekuppelten KEDFDI-Revers Säule. Der Versuch fand mit dem affinitätschromatographisch gereinigten Anti-FVIII Konzentrat bei einer Fließgeschwindigkeit von 300 cm/h statt. Als Referenz dient eine unter den gleichen Bedingungen durchgeführte Adsorptionsanalyse mit der C-terminal gekuppelten KEDFDI-Amid Matrix. Die Dar-

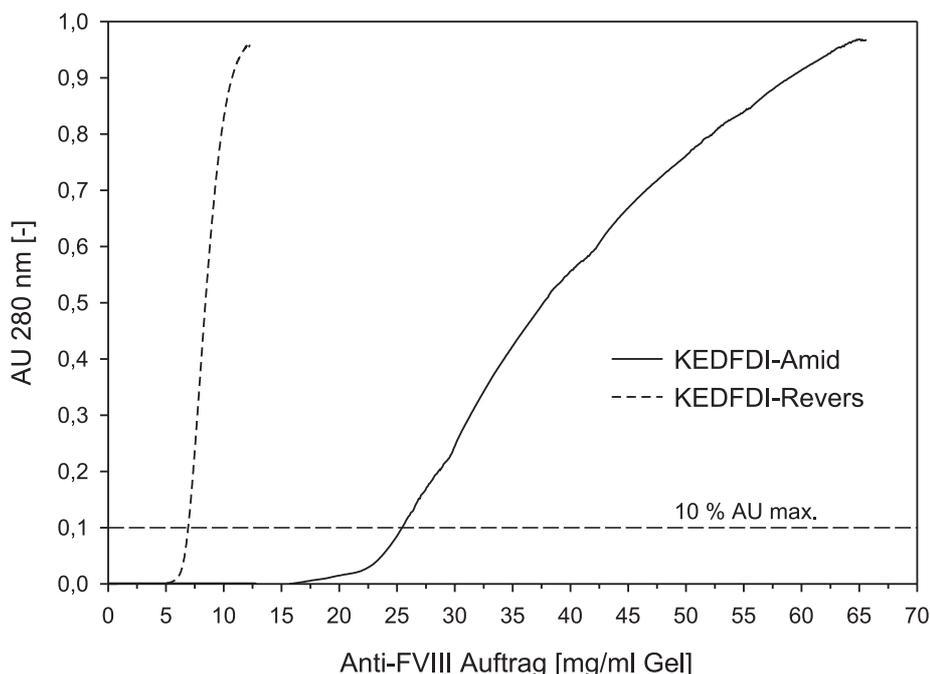


Abbildung 3.33: Durchbruchverhalten der revers gekuppelten Peptid-Matrix. Vergleich der Durchbruchkurven der N-terminal gekuppelten KEDFDI-Revers mit der C-terminal gekuppelten KEDFDI-Amid Säule. (Probe: Anti-FVIII Konzentrat 640 mg/L; Fluß: 300 cm/h)

stellung beschränkt sich auf die Gegenüberstellung der UV-Signale. Die jeweilige Auftragsmenge des monoklonalen Antikörpers wurde über die Produktkonzentration in der Ausgangslösung bestimmt.

Die Durchbruchskurve der KEDFDI-Revers Säule weist einen sehr steilen muster-gültigen Verlauf auf. Jedoch liegt die dynamische Bindungskapazität für den Anti-FVIII mit 6,9 mg/ml Gel weit unter der der Referenzmatrix. Die UV-Adsorption erreicht bereits nach etwa einem Viertel der Auftragsmenge 10 % des Ausgangswerts der Konzentratlösung. Das bedeutet, daß die Ausrichtung der Liganden einen starken Einfluß auf die Leistungsfähigkeit der Peptid-Affinitätsmatrix hat. Um eine maximale Effizienz des Prozesses zu gewährleisten, mußte somit die C-terminale Verknüpfung aus der Spot-Synthese bei der Anfertigung der Chromatographiesäulen eingehalten werden. Demnach bot die Kupplung ungeschützter Peptide keine Alternative zur Herstellung der großvolumigeren Fließbettmatrix.

Tabelle 3.7 faßt abschließend die in den verschiedenen Versuchen ermittelten Bindungskapazitäten zusammen. Die Ergebnisse zeigen, daß alle C-terminalen Kupplungsstrategien in gleicher Weise für die Herstellung einer leistungsfähigen Affinitätsmatrix geeignet waren. Außerdem bestätigte sich das Resultat aus den in Abschnitt 3.1.4 dokumentierten Mutationsanalysen, wonach die Belegung der letzten Aminosäureposition in der Peptidsequenz keinen relevanten Einfluß auf das Bindungsvermögen hatte. Einbußen ergaben sich ausschließlich für den Versuch mit der revers gekuppelten Peptidmatrix. Mit einer dynamischen Bindungskapazität von lediglich 6,9 statt durchschnittlich etwa 26,5 mg/ml Gel in den unter gleichen Bedingungen durchgeführten Vergleichsexperimenten schied dieses Verfahren für die Bestückung weiterer Matrices aus und bewies die eindeutigen Vorteile der C-terminalen Kupplungsstrategien. Da letztere untereinander keine Unterschiede bezüglich der Kapazität aufwiesen, konnte anhand der Experimente keine der Herstellungsmethoden eindeutig favorisiert werden. Bei der Fertigung des fließbettchromatographischen Prototypen wurde jedoch aufgrund der Zuverlässigkeit und der verhältnismäßig unproblematischen Handhabung die direkte Synthese des Liganden an das Basalmaterial gewählt.

Aus den Ergebnissen läßt sich eine signifikante Abhängigkeit der Kapazität von der Fließgeschwindigkeit ablesen. Während die dynamische Bindungskapazität bei 300 cm/h für alle HiTrapTM Säulen noch bei durchschnittlich etwa 26,5 mg/ml Gel lag, konnte sie durch sukzessive Verringerung auf 75 cm/h mit einem Wert von fast 57 mg/ml Gel auf mehr als das Doppelte gesteigert werden.

Weitere Auffälligkeiten bestanden im Vergleich der Adsorptionsanalysen mit verschiedenen Ausgangslösungen. Bei der Verwendung von Kulturüberstand lag die

Tabelle 3.7: Dynamische Bindungskapazität der Peptid-Affinitätsmatrices

Säule	Fluß	Probe	Bindungskapazität
<i>KEDFDC-Amid</i>	300 cm/h	Konzentrat ¹	27,0 mg/ml
	150 cm/h	Konzentrat	44,2 mg/ml
<i>KEDFDC-Disulfid</i>	300 cm/h	Konzentrat	27,0 mg/ml
	150 cm/h	Konzentrat	45,4 mg/ml
	75 cm/h	Konzentrat	56,8 mg/ml
	300 cm/h	Überstand ²	36,5 mg/ml
<i>KEDFDI-Amid</i>	300 cm/h	Konzentrat	25,9 mg/ml
<i>KEDFDK-Fmoc</i>	300 cm/h	Konzentrat	25,8 mg/ml
<i>KEDFDI-Revers</i>	300 cm/h	Konzentrat	6,9 mg/ml
<i>KEDFDI-EBA</i>	300 cm/h	Konz. 407 mg/L	1,0 mg/ml
	300 cm/h	Konz. 227 mg/L	1,3 mg/ml
	300 cm/h	Konz. 116 mg/L	1,3 mg/ml
	300 cm/h	Konz. 54 mg/L	1,3 mg/ml
	300 cm/h	Überstand	2,6 mg/ml
<i>rProtein A</i> ³	300 cm/h	Konzentrat	3,4 mg/ml
<i>SP_XL</i>	300 cm/h	Überstand	7,0 mg/ml

¹rProtein A Konzentrat: 640 mg mAK/L

²Kulturüberstand: ca. 50 mg mAK/L

³Daten aus der Fließbettchromatographie

Bindungskapazität für die HiTrapTM Säule um das 1,5-fache und im Fall der Prototypmatrix sogar um das Doppelte höher als für das affinitätschromatographisch gereinigte Anti-FVIII Konzentrat. Die genauen Ursachen für dieses Phänomen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Jedoch wurde ein Zusammenhang mit dem unterschiedlichen Produktgehalt in den Ausgangsproben durch eine Referenzstudie mit verdünnten Konzentratlösungen ausgeschlossen.

Insgesamt kennzeichneten die hohen Bindungskapazitäten die HiTrapTM Peptidmatrices im Vergleich zu vielen kommerziell erhältlichen Affinitätsgelelen als äußerst leistungsstarke Chromatographiemedien. Die Kapazität der Protein A und Protein G Materialien der Firma Amersham Pharmacia Biotech wird demgegenüber beispielsweise mit 20 bis 40 mg IgG/ml Trockengel angegeben, was bei einem angenommenen Quellfaktor von durchschnittlichen 3,5 lediglich 5,7 bis 11,4 mg/ml

gequollenem Gel entspricht [AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1993].

Die dynamische Kapazität des Prototypmaterials lag insgesamt weit unter der der HiTrapTM Säulen. Selbst bei der Verarbeitung von Kulturüberstand betrug sie nur 2,6 mg/ml. Unter der Annahme eines maximalen Produkttiters von 90 mg/L konnten in den geplanten fließbettchromatographischen Versuchen mit 70 ml Gel somit etwa 1000 bis 2000 ml Kulturernte ohne größere Verluste aufgereinigt werden. Die möglichen Gründe für die starke Abweichung zwischen den Kapazitäten der beiden Matrixtypen werden in Kapitel 3.3.7 diskutiert. An dieser Stelle bleibt lediglich festzuhalten, daß auch die Referenzwerte mit den StreamlineTM Matrices SP_XL und rProtein A mit 7,0 bzw. 1,3 bis 3,4 mg/ml Gel verhältnismäßig niedrig sind. Bei diesem Vergleich muß jedoch berücksichtigt werden, daß das Experiment mit dem Ionenaustauscher unter nicht optimaler Salzkonzentration im physiologischen Bereich und die Adsorptionsanalysen für die Affinitätschromatographie im Fließbett stattgefunden haben.

3.3.7 Untersuchung des Verweilzeitverhaltens

Aus dem vorigen Kapitel ging bereits hervor, daß die Bindungskapazität des Prototypmaterials für den monoklonalen Antikörper wesentlich geringer war als die der HiTrapTM Säulen. Da die Ligandenbeladung der Fließbettadsorbens laut Aminosäureanalytik noch höher war als bei den auf gleiche Weise hergestellten Fertigsäulen (s. Abschnitt 3.2.4), ist anzunehmen, daß die wesentlichen Ursachen in den strukturellen Unterschieden der Basalmatrices liegen.

Aus der mikroskopischen Darstellung in Abbildung 2.3 auf Seite 45 treten die ersten Gegensätze deutlich hervor. Der Partikeldurchmesser der HiTrapTM SepharoseTM weist einen verhältnismäßig homogenen Charakter auf, während sich die Größenverteilung des Prototypen über ein weites Spektrum erstreckt. Da die Gelkugeln der Fertigsäulen zudem im Durchschnitt fast 10 mal kleiner sind, ist davon auszugehen, daß ihre Packungsstruktur im Festbett wesentlich geordneter ist. Abgesehen davon entfällt bei der Prototypmatrix ein gewisser Raumanteil, der vom Hersteller nicht näher definiert wird, auf die eingestreuten Quarzkerne, wodurch das Strömungsprofil lokal gestört werden könnte. Ein weiterer struktureller Unterschied besteht in der Zusammensetzung des SepharoseTM Materials, das bei den HiTrapTM Säulen einerseits auf 4 %iger und bei der Prototypmatrix andererseits auf 6 %iger quervernetzter Agarose basiert.

Alle Faktoren können in unterschiedlichem Ausmaß die Strömungsbedingungen innerhalb der Festphase beeinflussen. Da die ermittelten Bindungskapazitäten so

massiv voneinander abwichen, schien eine vergleichende Untersuchung des Verweilzeitverhaltens der Matrixtypen sinnvoll, um gegebenenfalls eine Korrelation mit den Kapazitätsdifferenzen herstellen zu können.

Die Charakterisierung des Verweilzeitverhaltens erfolgte in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit. Die Studien wurden anhand von Spurstoffexperimenten auf der Basis von PBS-Puffer mit jeweils 10 μl einer 5 %igen Acetonlösung durchgeführt. Abbildung 3.34 gibt die Antwortfunktionen auf den Dirac-Impuls wieder. Die Graphik vergleicht die Ergebnisse aus den Versuchen der mit einem Milliliter Prototypmatrix befüllten HR5/5-Säule mit denen einer HiTrapTM Säule.

Deutlich erkennbar ist, daß die Spurstoffexperimente mit dem EBA-Prototypen zu einer wesentlich größeren Peakverbreiterung führten als bei der anderen Matrix. Besonders signifikant fallen die Unterschiede dabei für die Versuche mit hohen Fließgeschwindigkeiten aus. Bei 300 cm/h ist das Gesamtvolumen der Spurstoffverteilung beispielsweise nahezu doppelt so hoch wie in dem Referenzlauf mit der HiTrapTM Säule. Erst in den Versuchen ab einem Fluß kleiner 50 cm/h gleichen sich die Antwortfunktionen der beiden Matrixtypen aneinander an. Auffällig ist dabei, daß die Kurven mit der HiTrapTM Säule deutlich geringer voneinander abweichen.

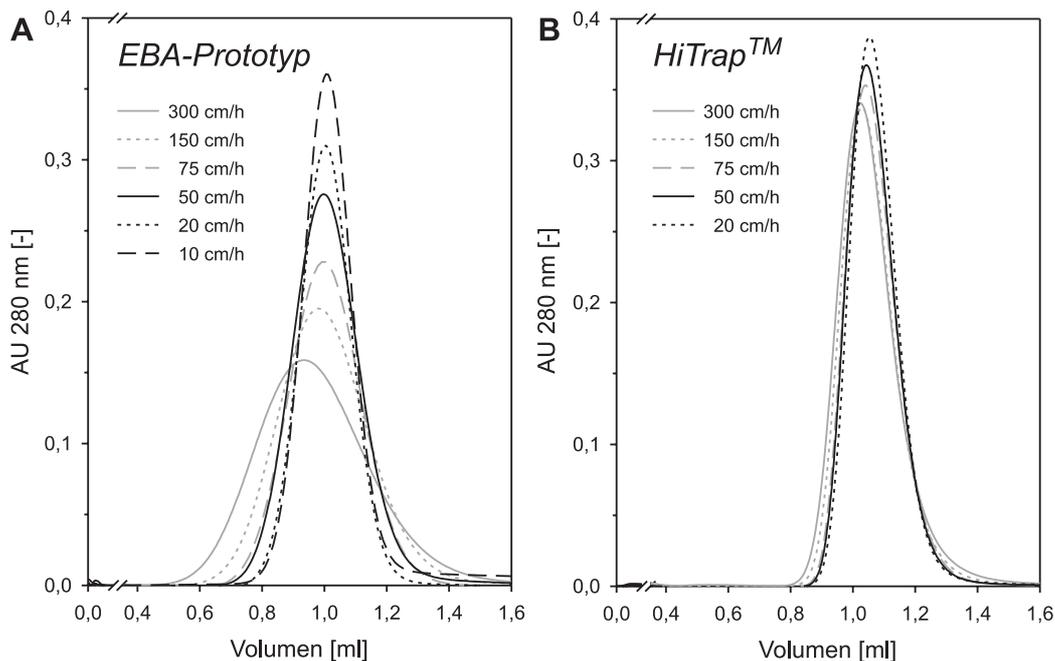


Abbildung 3.34: Analyse des Verweilzeitverhaltens durch Spurstoffexperimente. Vergleich der Antwortfunktionen der EBA-Prototypmatrix (1 ml HR5/5, A) mit einer HiTrapTM Säule (B) in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit. (Dirac-Impuls: 5 % Aceton, 10 μl)

Die Ergebnisse zeigen, daß die Verweilzeitverteilung bei der Prototypmatrix wesentlich stärker von der jeweiligen Fließgeschwindigkeit abhängt. Die Ursachen dafür liegen in den bereits beschriebenen Unterschieden der Basalmaterialien. Dabei kann nicht geklärt werden, welcher der genannten Faktoren das Strömungsverhalten maßgeblich beeinflusst. Offensichtlich ist jedoch, daß die Strömungsbedingungen erst bei niedrigen Fließgeschwindigkeiten mit denen der HiTrapTM Säule vergleichbar werden.

Um die Unterschiede der Verweilzeitverteilungen detaillierter diskutieren zu können, wurden die Antwortfunktionen durch Umrechnung auf Basis der Zeit modifiziert und mit einem von Herrn Dr. Udo Hunecke geschriebenen Computerprogramm analysiert. Die ermittelten Charakteristika sind in Tabelle 3.8 zusammengefaßt. Abbildungen 3.35 und 3.36 stellen die Ergebnisse graphisch dar.

Die Auswertung der Spurstoffexperimente sowohl nach dem Dispersions- als auch nach dem Zellenmodell ergaben ähnliche Resultate, die sich mit den bereits beschriebenen Schlußfolgerungen aus der reinen Betrachtung der Antwortfunktionen decken. Das Strömungsverhalten der HiTrapTM Säule zeichnet sich im Bereich

Tabelle 3.8: Charakteristika der Verweilzeitverteilung der Basalmatrices

	Fluß [cm·h ⁻¹]	\bar{t} [min]	$\sigma_{\bar{t}}^2$ [-]	Bo [-]	D _{ax} [m ² ·s ⁻¹]	N [-]	HETP [mm]
EBA-Prototyp L _S =50,9 mm	300	1,00	4,04×10 ⁻²	48	9,01×10 ⁻⁷	25	2,04
	200	1,56	3,53×10 ⁻²	56	4,95×10 ⁻⁷	28	1,82
	150	2,05	2,53×10 ⁻²	78	2,70×10 ⁻⁷	40	1,27
	100	3,12	2,29×10 ⁻²	86	1,61×10 ⁻⁷	44	1,16
	75	4,12	1,92×10 ⁻²	103	1,02×10 ⁻⁷	52	0,98
	50	6,20	1,61×10 ⁻²	124	5,62×10 ⁻⁸	62	0,82
	40	7,71	1,25×10 ⁻²	159	3,53×10 ⁻⁸	80	0,64
	25	12,44	1,07×10 ⁻²	187	1,86×10 ⁻⁸	94	0,54
	20	15,41	8,08×10 ⁻³	247	1,14×10 ⁻⁸	124	0,41
	12,5	25,13	7,10×10 ⁻³	281	6,12×10 ⁻⁹	141	0,36
10	31,06	5,32×10 ⁻³	375	3,71×10 ⁻⁹	188	0,27	
HiTrapTM L _S =26,0 mm	300	0,55	9,82×10 ⁻³	208	9,83×10 ⁻⁸	105	0,25
	150	1,10	7,48×10 ⁻³	267	3,83×10 ⁻⁸	134	0,19
	75	2,22	6,42×10 ⁻³	310	1,63×10 ⁻⁸	156	0,17
	50	3,33	6,15×10 ⁻³	324	1,04×10 ⁻⁸	163	0,16
	40	4,18	5,79×10 ⁻³	344	7,82×10 ⁻⁹	173	0,15
	20	8,34	5,16×10 ⁻³	386	3,49×10 ⁻⁹	194	0,13

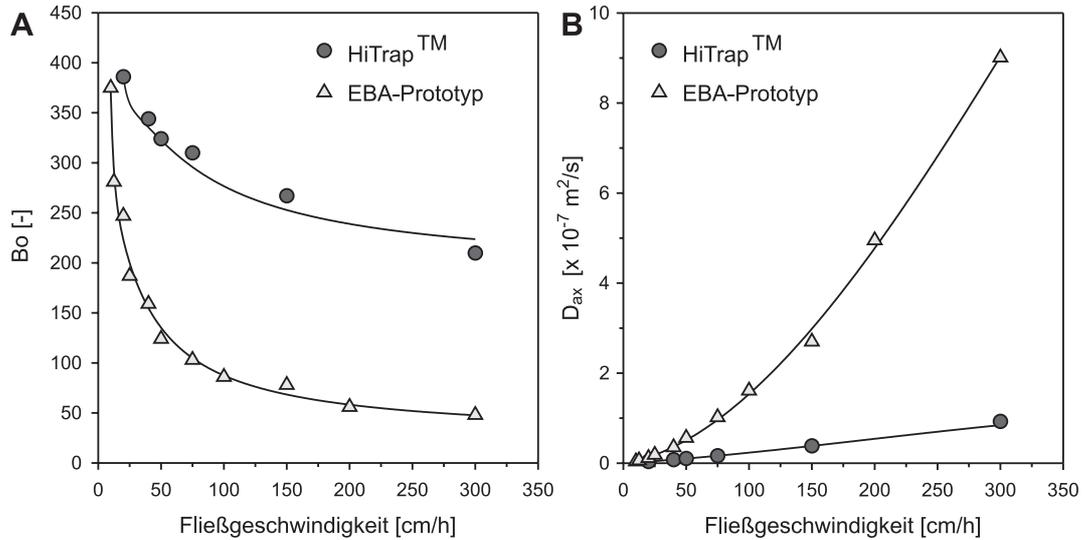


Abbildung 3.35: Auswertung der Spurstoffexperimente nach dem Dispersionsmodell. Abhängigkeit der Bodensteinzahl Bo (A) und des axialen Dispersionskoeffizienten D_{ax} (B) von der Fließgeschwindigkeit. (EBA-Prototyp (1 ml HR5/5) vs HiTrapTM)

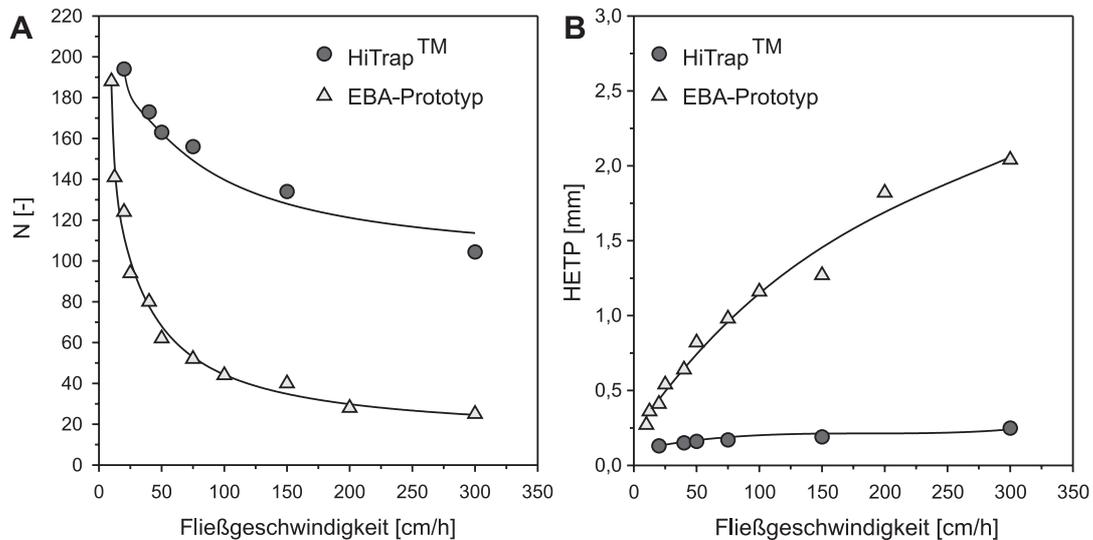


Abbildung 3.36: Auswertung der Spurstoffexperimente nach dem Zellenmodell. Abhängigkeit der theoretischen Bodenzahl N (A) und der Höhe der Einzelböden HETP (B) von der Fließgeschwindigkeit. (EBA-Prototyp (1 ml HR5/5) vs HiTrapTM)

hoher Fließgeschwindigkeiten insgesamt durch etwa drei bis fünf mal höhere Bodensteinzahlen Bo bzw. theoretische Bodenzahlen N aus. Bei niedrigerem Fluß gleichen sich die Kennzahlen beider Matrices allmählich aneinander an, so daß hier zunehmend von einer identischen Strömungscharakteristik ausgegangen werden kann.

Die dimensionslose Kenngröße Bo gibt das Verhältnis zwischen konvektivem und dispersivem Stofftransport wieder. Aus diesem Grund muß davon ausgegangen werden, daß die mobile Phase während der Passage der Prototypmatrix insbesondere bei hohen Fließgeschwindigkeiten wesentlich stärker von Wirbelbildungen, Totzonen und Strömungskanälen beeinflusst wird als bei dem HiTrapTM Material. Noch prägnanter fallen die Ergebnisse für die Berechnung des axialen Dispersionskoeffizienten D_{ax} und der Höhe der theoretischen Böden HETP aus. Beide Größen sind von den verschiedenen Säulenlängen unabhängig und lassen einen direkten Vergleich der Matrices zu. Wie aus den Graphiken 3.35B und 3.36B hervorgeht, bleiben sowohl die axiale Dispersion (D_{ax}) als auch die Höhe der fiktiven Einzelkompartimente (HETP), in denen von einer totalen Rückvermischung ausgegangen wird, für die HiTrapTM Säule bei allen Fließgeschwindigkeiten nahezu konstant. Demgegenüber steigt bei der Prototypmatrix innerhalb des untersuchten Bereichs D_{ax} auf den 9-fachen und HETP etwa auf den 8-fachen Wert an, was für eine starke Zunahme von Dispersions- bzw. Rückvermischungseffekten spricht.

Durch weiterführende Untersuchungen zum Durchbruchverhalten der EBA-Prototypmatrix sollte herausgefunden werden, ob und in welcher Weise die Kapazität der Säule tatsächlich durch die unterschiedlichen Strömungsbedingungen beeinflusst wird.

Die Studien erfolgten anhand von Adsorptionsanalysen mit dem affinitätschromatographisch gereinigten Anti-FVIII Konzentrat. Die Strömungscharakteristik wurde indirekt durch Variation der Fließgeschwindigkeit verändert und schrittweise den Verhältnissen der HiTrapTM Säule bei 300 cm/h angepaßt. Aus der Tabelle 3.8 auf Seite 145 sowie den Abbildungen 3.35A und 3.36A auf Seite 146 geht hervor, daß die säulenspezifischen Kenngrößen Bo und N für die Prototypmatrix erst zwischen 25 und 20 cm/h entsprechend hohe Werte erreichen. Sollte das Bindungsvermögen ausschließlich vom Verweilzeitverhalten abhängig sein, so müßte die Kapazität bei dieser Fließgeschwindigkeit ähnlich hoch sein wie bei der HiTrapTM Säule bei 300 cm/h.

Abbildung 3.37 stellt die einzelnen Durchbruchkurven einander gegenüber. Die resultierenden dynamischen Bindungskapazitäten sind zusammen mit den dazugehörigen Werten für die Kenngrößen Bo und N in Tabelle 3.9 zusammengefaßt. Für den direkten Vergleich werden die entsprechenden Versuchsergebnisse mit der HiTrapTM Säule ebenfalls berücksichtigt.

Graphik 3.37 zeigt deutlich, daß das Bindungsverhalten der EBA-Prototypmatrix wie bei den HiTrapTM Säulen von der Fließgeschwindigkeit abhängig ist. Die Durchbruchkurven unterscheiden sich im wesentlichen durch eine Parallelverschie-

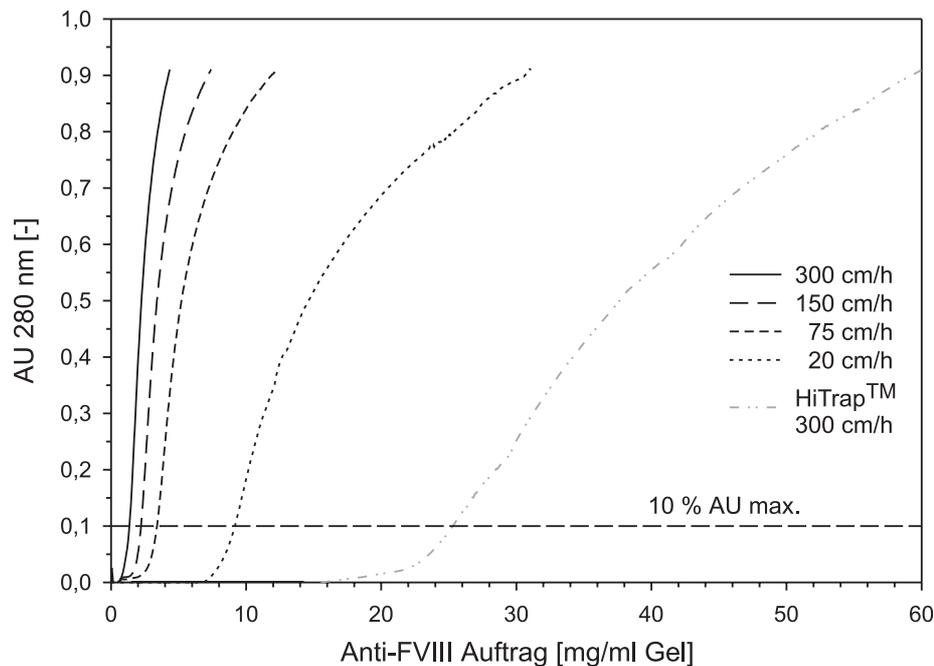


Abbildung 3.37: Abhängigkeit des Durchbruchverhaltens der EBA-Prototypmatrix von der Fließgeschwindigkeit. (Probe: Anti-FVIII Konzentrat 640 mg/L; Referenzsäule: KEDFDI-Amid)

bung voneinander, wobei die Steigung zunehmend etwas flacher verläuft und sich der des Referenzlaufs mit der HiTrapTM Säule annähert.

Die Abhängigkeit der Bindungskapazität und der Kenngrößen der Verweilzeitverteilung von der Fließgeschwindigkeit sind für den Prototypen in Abbildung 3.38 wiedergegeben. Für die Vergleichssäule entsteht bei analoger Darstellung ein ähnliches Resultat (Daten nicht dokumentiert). Demnach verläuft der zunehmende

Tabelle 3.9: Gegenüberstellung der Kenngrößen Bo und N mit der dynamischen Kapazität

	Fluß	Bo	N	Dyn. Kapazität
EBA-Prototyp	300 cm/h	48	25	1,3 mg/ml
	150 cm/h	78	40	2,2 mg/ml
	75 cm/h	103	52	3,4 mg/ml
	20 cm/h	247	124	9,2 mg/ml
HiTrapTM	75 cm/h	310	156	56,8 mg/ml
	150 cm/h	267	134	45,4 mg/ml
	300 cm/h	208	105	27,0 mg/ml

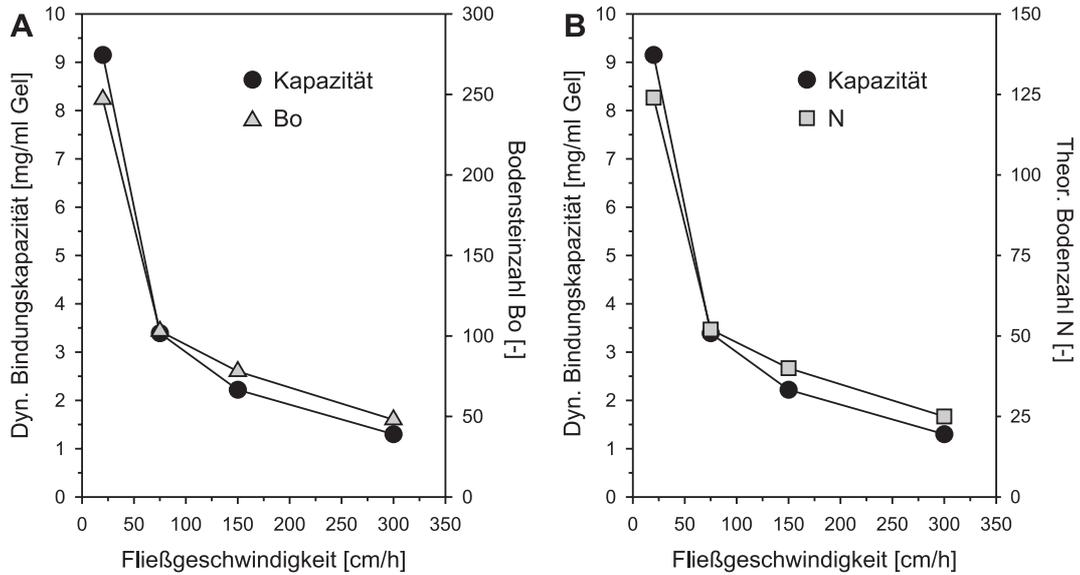


Abbildung 3.38: EBA-Prototypmatrix: Abhängigkeit der Bindungskapazität und der Kenngrößen der Verweilzeitverteilung von der Fließgeschwindigkeit. A: Bindungskapazität vs Bodensteinzahl Bo; B: Bindungskapazität vs theoretischen Bodenzahl N

Verlust der Bindungskapazität in Bezug auf die Fließgeschwindigkeit nahezu direkt proportional zur Abnahme der strömungscharakterisierenden Kenngrößen Bo und N. Abbildung 3.39 läßt das Ergebnis noch eindeutiger erscheinen. Dargestellt

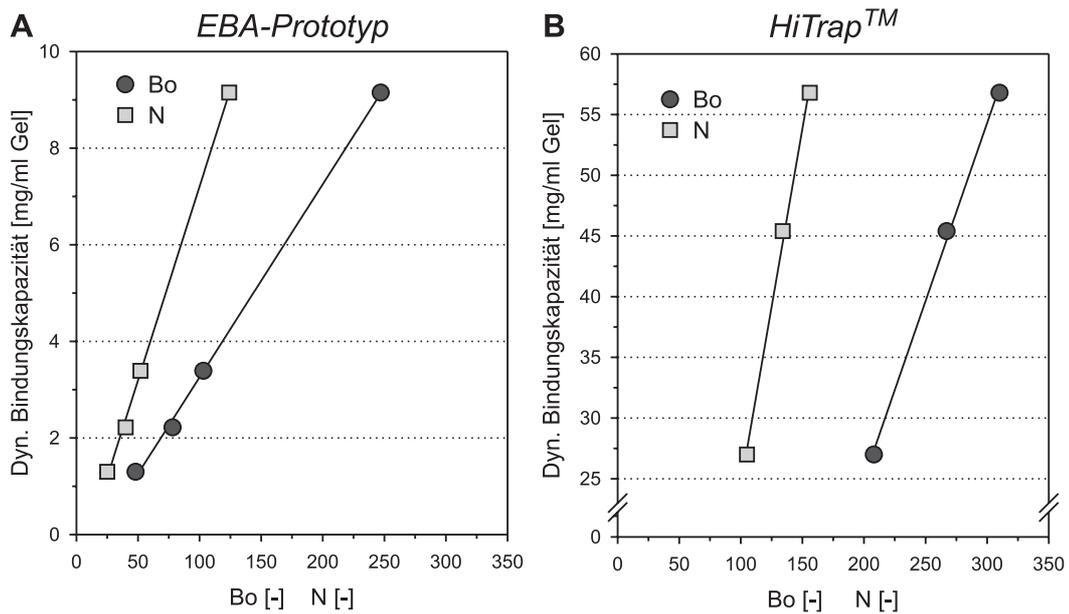


Abbildung 3.39: Korrelation zwischen der Bindungskapazität und den Kenngrößen der Verweilzeitverteilung Bo und N. A: EBA-Prototypmatrix; B: HiTrap™ Säule

ist die Korrelation zwischen der dynamischen Bindungskapazität und den Kenngrößen der Verweilzeitverteilung. Der lineare Zusammenhang der Meßwerte beweist für beide Matrixtypen die direkte Abhängigkeit des Bindungsvermögens von der Bodensteinzahl B_0 und der Anzahl theoretischer Böden N . Jedoch verlaufen die Regressionsgeraden für die HiTrapTM Säule (B) insbesondere unter Berücksichtigung der unterschiedlichen y-Achsen Skalierung wesentlich steiler als für den Prototypen (A). Das bedeutet, daß die EBA-Matrix bei einer gleichwertigen Verbesserung der Strömungsbedingungen immer einen deutlich geringeren Anstieg der Bindungskapazität aufweist.

Die vergleichende Betrachtung der Durchbruchprofile in Abbildung 3.37 und Tabelle 3.9 auf Seite 148 bestätigt dieses Ergebnis. Obwohl die Kenngrößen B_0 und N für die Prototypmatrix bei einer Fließgeschwindigkeit von 20 cm/h in etwa mit denen der HiTrapTM Säule bei 300 cm/h übereinstimmen, erreicht die dynamische Bindungskapazität mit 9,2 mg/ml Gel nur rund ein Drittel des Vergleichswerts.

Die Resultate deuten darauf hin, daß das schlechte Strömungsverhalten zwar ein wesentlicher Hauptgrund für das vergleichsweise geringe Bindungsvermögen der Prototypmatrix war, jedoch zusätzlich noch andere Faktoren einen negativen Einfluß auf die Kapazität haben mußten.

Über die möglichen Ursachen kann nur spekuliert werden, da weiterführende Untersuchungen zu diesem Themengebiet den Rahmen der vorliegenden Arbeit überschritten hätten. Ein Gesichtspunkt wäre beispielsweise die unterschiedliche Bedeutung der Randeffekte, die aufgrund des schmaleren Durchmessers der HR5/5 Säule bei dem Prototypen eventuell einen stärkeren Einfluß auf die vollständige Ausnutzung der Bindungsstellen hatten. Zudem können die Wechselwirkungen der Peptide mit dem monoklonalen Antikörper durch die nachweislich höhere Liganbeladung der fließbettchromatographischen Matrix (siehe Kapitel 3.2.4) sterisch behindert worden sein, was die Kapazität ebenfalls einschränken würde.

3.3.8 Optimierung der Regeneration

Für die Regeneration der Säulen wurden zwei verschiedene CIP-Prozeduren getestet. Die erste lehnte sich an eine für Affinitätsmatrices mit empfindlichen Proteinliganden gebräuchliche Methode an, in der in einem dreischrittigen Prozeß unter schonenden Bedingungen zunächst ionisch wechselwirkende Kontaminationen, dann proteinogene Rückstände und abschließend Lipide von dem Chromatographiegel entfernt wurden. Demgegenüber verlief die zweite Methode unter wesentlich drastischeren Bedingungen, die sonst nur für die Behandlung chemisch äußerst stabiler Matrices wie beispielsweise Ionenaustauscher angewendet werden können.

Tabelle 3.10: Alternativmethoden zur Regeneration der Peptid-Affinitätsmatrices

CIP I: Guanidin-HCl			
1.	2 M NaCl, pH 8,0	100 cm/h	15 min
2.	6 M Guanidin-HCl	50 cm/h	60 min
3.	70 % Ethanol	50 cm/h	60 min
4.	Reequilibrierung: PBS, pH 7,0	300 cm/h	10 min
CIP II: Natronlauge			
1.	0,5 M NaOH	50 cm/h	120 min
2.	Reequilibrierung: PBS, pH 7,0	300 cm/h	20 min

Tabelle 3.10 listet die Arbeitsschritte der CIP-Regenerationen auf. In CIP I wurde einleitend mit einem leicht basischen Puffer mit hoher Salzkonzentration gespült. Die Entfernung von Protein- und Lipidresten fand dann sukzessive durch die Behandlung mit Guanidin-Hydrochlorid und einer hochkonzentrierten alkoholischen Lösung statt. Die CIP II erfolgte mit 0,5 M Natronlauge, die bei niedriger Fließgeschwindigkeit für eine Kontaktzeit von 120 Minuten über die Säule gepumpt wurde. Außer der Beseitigung proteinogener Rückstände stellte dieser Prozeß eine vollständige Inaktivierung von Viren, Bakterien und Pilzsporen sicher. Nach der Regeneration wurden die Matrices für den nächsten Chromatographielauf reequilibriert oder in 20 % Ethanol gelagert.

Um die Regenerationsleistung beider Prozesse beurteilen zu können, wurden die Matrices nach der Säuberung auf Proteinrückstände hin untersucht. Als Kontrolle diente ein Ratte-Antikörper (HB58), der spezifisch an die κ -leichte Kette von Maus-Antikörpern bindet. Durch Chromatographie des HB58 konnte ermittelt werden, ob nach der Regeneration noch Überreste des murinen Anti-FVIII auf der Matrix vorhanden waren. Dazu wurde ein Konzentrat des HB58 direkt vor und nach der CIP-Prozedur analog zur in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Produktaufarbeitung auf die Säule aufgetragen und mit 2 %iger Essigsäure eluiert. Durch die anschließende Western-Blot Analyse der Chromatographiefraktionen konnte der HB58 spezifisch erfaßt werden und Aufschluß über verbleibende Anti-FVIII Rückstände auf der Matrix geben, die eine Abschätzung des Regenerationserfolgs ermöglichten.

Um in dem Western Blot eine zweifelsfreie Unterscheidung zwischen dem HB58 und eventuell vorhandenen Resten des Produktantikörpers zu erreichen und eine Verfälschung der Ergebnisse durch Kreuzreaktionen des Testantikörpers mit dem

Anti-FVIII zu verhindern, wurde dieser selbst unter Ausnutzung der gegen alle Maus-Antikörper gerichteten Spezifität des HB58 für den Nachweis eingesetzt. Eine vorausgehende Biotinylierung des Anti-FVIII ermöglichte die Reaktion mit einem an Streptavidin gekuppelten Enzym, das das Substrat (NBT-BCIP) in ein farbiges Produkt überführte und die Anwesenheit des HB58 indirekt anzeigte. Zur letzten Kontrolle des Testsystems wurde ein Konzentrat des Anti-FVIII mit auf die SDS-Gele aufgetragen.

Die CIP-Experimente wurden für alle 1 ml Fertigsäulen durchgeführt. Da die Ergebnisse in allen Fällen übereinstimmten, werden sie im folgenden nur exemplarisch anhand der KEDKDI-Amid Säule vorgestellt. Abbildung 3.40 gibt eine digitale Aufnahme der entsprechenden SDS-PAGE (A) und Western Blot Analyse (B) wieder. Aufgetragen wurden jeweils Proben aus der Ausgangslösung, dem Durchlauf und dem Eluat der HB58 Chromatographie nach einer Anti-FVIII Aufreinigung (Spuren 3-5) sowie nach der CIP I (Spuren 6-8) und der CIP II (Spuren 9-11). Zwischen den Regenerationszyklen fand eine weitere Produktaufarbeitung statt, so daß für beide Prozesse annähernd die gleichen Ausgangsbedingungen vorlagen.

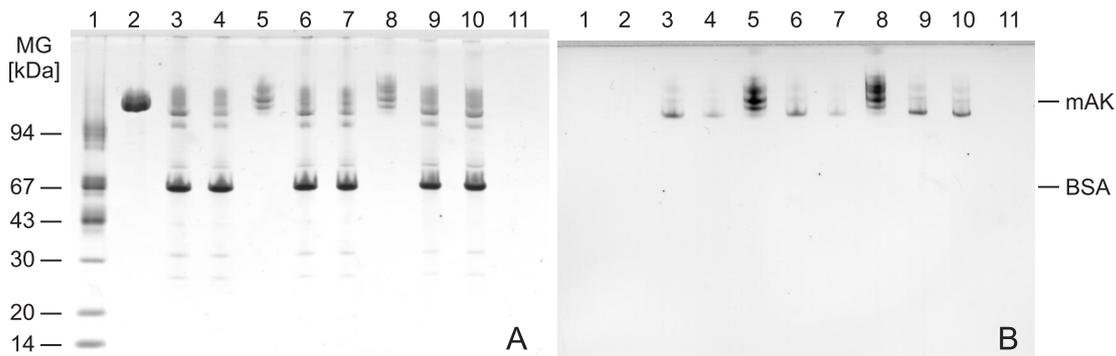


Abbildung 3.40: Überprüfung der Regeneration der Peptid-Affinitätsmatrix durch Guanidin-HCl und NaOH. SDS-PAGE (A) und Western Blot Analyse (B) der Chromatographie eines Ratte-Anti-Maus IgG zum Nachweis von Produktrückständen. (A: PhastGelTM Gradient 8-25, nicht-reduzierende Bedingungen, Silberfärbung; B: Diffusionsblot auf Nitrocellulose, NBT-BCIP Substrat). Spuren: 1: LMW Marker 14-96 kDa, reduziert; 2: Anti-FVIII Konzentrat; 3-5: vor CIP I; 6-8: nach CIP I; 9-11: nach CIP II; jeweils Probe, Durchlauf, Eluat (1:3).

Die ausgebliebene Blot-Anfärbung der Anti-FVIII Bande (Spur 2) sowie der LMW Markerproteine (Spur 1) beweist eine hohe Selektivität des ausgearbeiteten Western Blots. Das dargestellte Resultat läßt eine eindeutige Aussage in Bezug auf die Regenerationsleistungen erkennen. Während die Eluate der Chromatographie nach der Produktaufarbeitung (Spur 5) und im direkten Anschluß an die CIP I (Spur 8) in etwa die gleiche Menge des HB58 aufweisen, wird das Bindungsvermögen gegen-

über dem Ratte-Antikörper erst durch die Regeneration mit der CIP II Prozedur bis unter die Nachweisgrenze reduziert. In diesem Fall läßt sich das Nachweisprotein quantitativ im Durchlauf (Spur 10) wiederfinden, so daß im aufgetrennten Eluat (Spur 11) keine Banden mehr auftreten. Das bedeutet, daß nur durch die Behandlung mit 0,5 M Natronlauge die Matrix vollständig regeneriert und sämtliche Produktrückstände entfernt werden konnten. Dabei bleibt fragwürdig, ob der Mißerfolg der CIP I auf die besonders starke Bindung zwischen den Peptidliganden und dem Anti-FVIII zurückzuführen ist, oder die Regenerationsleistung der sonst für andere Affinitätsmatrices gebräuchlichen Methode generell angezweifelt werden muß. Vergleichsexperimente mit den StreamlineTM Medien rProtein A und SP_XL waren aufgrund deren immanenten Bindungsvermögens gegenüber dem Testantikörper HB58 jedoch nicht möglich.

Aus der Zusammenfassung der Ergebnisse wird deutlich, daß die Regeneration in Bezug auf die Beseitigung proteinogener Rückstände durch den in CIP II angewendeten Prozeß am besten realisiert werden konnte. Voraussetzung für einen standardisierten Einsatz dieser Prozedur war allerdings die Beständigkeit der Peptidliganden gegenüber 0,5 molarer Natronlauge. Diese wurde anhand von Stabilitätstests überprüft, die im nächsten Abschnitt dokumentiert werden.

3.3.9 Stabilitätstest

Als Kriterium für die Gewährleistung der Stabilität der Peptidliganden in dem CIP-Prozeß diente die vergleichende Untersuchung der Bindungskapazität vor und nach der Regeneration mit 0,5 M Natronlauge. Um ein längerfristiges Standzeitverhalten der Matrices zu simulieren, wurde die Behandlung mit NaOH in einem weiteren Experiment auf eine 24-stündige Inkubationszeit ausgeweitet.

Die Analysen des Durchbruchverhaltens erfolgten mit dem affinitätschromatographisch gereinigten Konzentrat des Produktantikörpers, das bereits für einige der in Abschnitt 3.3.6 beschriebenen Versuche genutzt wurde.

Abbildung 3.41 gibt die Ergebnisse wieder. Dargestellt sind die Durchbruchkurven unmittelbar vor und nach der 2-stündigen CIP-Regeneration. Der Vergleich bezieht sich auf die KEDFDC-Disulfid und KEDFDC-Amid Säule, wodurch alle chemischen Verbindungen berücksichtigt wurden, die bei der Kupplung der Peptidliganden an das Chromatographiematerial eine Rolle spielten. Im Voraus wurden die Matrices ohne eine anschließende Säuberung für Aufarbeitungsexperimente mit dem Anti-FVIII genutzt und befanden sich demnach in einem nicht-regenerierten Zustand.

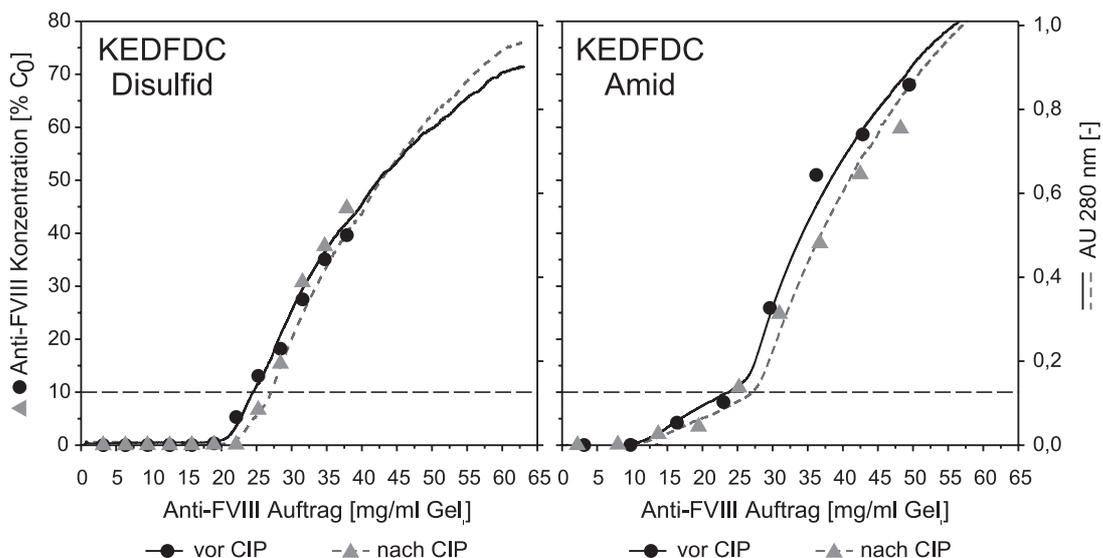


Abbildung 3.41: Vergleich der Anti-FVIII Durchbruchkurven vor und nach der CIP-Regeneration. A: KEDFDC-Disulfid Säule; B: KEDFDC-Amid Säule. (CIP: 0,5 M NaOH, 120 min Inkubation; Probe: Anti-FVIII Konzentrat (640 mg/L); Fließgeschwindigkeit: 300 cm/h)

Die Durchbruchprofile vor und nach der CIP-Prozedur verlaufen nahezu deckungsgleich übereinander, so daß eine Schädigung der Peptidliganden ausgeschlossen werden kann. Bei näherer Betrachtung kann man sogar erkennen, daß die Kurven nach der Regeneration zu etwas höheren Werten hin verschoben liegen. Die ermittelten dynamischen Bindungskapazitäten sind in Tabelle 3.11 zusammengefaßt und den Ergebnissen aus den 24-stündigen Stabilitätstests gegenübergestellt.

Tabelle 3.11: Einfluß der NaOH-Behandlung auf die Bindungskapazität

	Dynamische Bindungskapazität			
	Start	vor CIP	nach CIP	nach 24 h Test
KEDFDC-Disulfid	27,0 mg/ml	24,4 mg/ml	26,9 mg/ml	27,2 mg/ml
KEDFDC-Amid	27,0 mg/ml	23,3 mg/ml	27,1 mg/ml	26,8 mg/ml

Die Daten zeigen deutlich, daß die CIP-Prozedur mit 0,5 molarer Natronlauge ihren Zweck erfüllte. Die durch den Gebrauch der Matrices entstandenen Kapazitätsverluste von bis zu 15 % wurden durch die Regeneration wieder vollständig ausgeglichen. Außerdem konnte bewiesen werden, daß auch die Langzeitbehandlung keinen Einfluß auf das Bindungsvermögen der Matrices hatte. Die dynamischen Kapazitäten entsprechen mit jeweils nur geringen Abweichungen den Startwerten

von 27 mg/ml Gel, die bei der erstmaligen Benutzung der Säulen erzielt wurden. Die in Tabelle 3.10 auf Seite 151 beschriebene CIP-Prozedur mit 0,5 molarer Natronlauge bewies somit eine hohe Regenerationsleistung. Zudem verhielten sich beide Kupplungsverbindungen und auch die Peptidbindungen innerhalb der Ligandensequenz in dem alkalischen Milieu stabil. Auch für die nicht untersuchten Peptidmatrices konnte eine ähnlich hohe Beständigkeit angenommen werden. Diese unterschieden sich in ihrer Struktur nur in der C-terminalen Position voneinander, die jedoch nicht durch die besonders basenempfindlichen Aminosäuren Asparagin und Glutamin belegt war, was die Stabilität durch Deamidierungsprozesse gefährdet hätte. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurde der CIP-Prozeß mit 0,5 M Natronlauge als Standardmethode für die Regeneration der Matrices eingesetzt.

Um die Regenerationszeit bei gleichwertiger Leistung gegebenenfalls verkürzen zu können, wurde in einer weiteren Studie die Stabilität der Liganden gegenüber einer höher konzentrierten NaOH-Lösung untersucht. Da eine Beschädigung der Peptide unter diesen Bedingungen nicht ausgeschlossen werden konnte, fanden die Experimente mit einer zweiten revers gekuppelten HiTrapTM Matrix 2-KEDFDI-Revers statt, die für keine weiteren Versuche verwendet werden sollte.

Die Studie setzte sich aus zwei 12-stündigen Inkubationsschritten zusammen, in denen die Säule bei einer langsamen Fließgeschwindigkeit mit jeweils 20 ml 1 M Natronlauge überströmt wurde. Die Beurteilung der Ligandenstabilität erfolgte anhand von Durchbruchkurven, die im direkten Anschluß an die NaOH-Behandlungen aufgezeichnet wurden. Als Referenz diente ein zuvor mit der unbenutzten Säule erstelltes Kapazitätsprofil. Die Untersuchung des Bindungsverhaltens fand unter den gleichen Versuchsbedingungen wie bei den oben beschriebenen Stabilitätstests statt. Abbildung 3.42 stellt die drei resultierenden Durchbruchkurven einander gegenüber.

Der Vergleich läßt eine deutliche stufenweise Abnahme des Bindungsvermögens der Matrix erkennen. Während die dynamische Kapazität für den Referenzlauf noch bei etwa 4,4 mg/ml Gel liegt, sinkt sie nach der ersten Inkubation mit Natronlauge bereits auf 2,9 und nach der zweiten sogar auf 1,7 mg/ml ab. Somit beträgt das Bindungsvermögen nach der insgesamt 24-stündigen Behandlung mit 1 M NaOH nur noch ca. 40 % des Ausgangswerts. In der letzten Kurve tritt zudem ein frühzeitiger Durchbruch des monoklonalen Antikörpers auf, der sich in Form eines Peaks widerspiegelt. Auch dieses Phänomen läßt sich als ein weiteres Indiz für das stark gestörte Bindungsverhalten interpretieren.

Die Ergebnisse weisen auf eine massive Schädigung der Affinitätsmatrix hin. Es ist davon auszugehen, daß die Peptidliganden unter den stark basischen Bedingungen

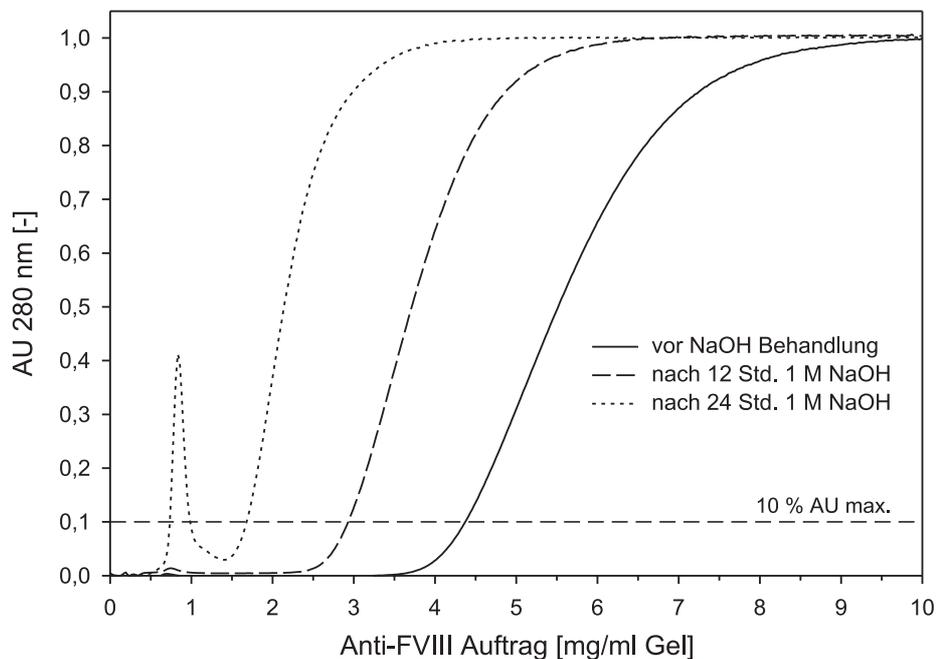


Abbildung 3.42: Überprüfung der NaOH-Stabilität der Peptid-Matrix. Durchbruchskurven des Anti-FVIII vor und nach einer 12- bzw. 24-stündigen Behandlung mit 1 M Natronlauge. (Säule: 2-KEDFDI-Revers; Probe: Anti-FVIII Konzentrat, 640 mg/L; Fluß: 300 cm/h)

zunehmend durch alkalische Hydrolyse zerstört wurden. Demnach konnte die 0,5 molare Natronlauge aus dem Regenerationsprozeß nicht durch eine höher konzentrierte Lösung ersetzt werden.

3.3.10 Zusammenfassung

Die Studien zur Festbettchromatographie zeigten, daß sich alle entwickelten C-terminalen Kupplungsstrategien einschließlich der daraus resultierenden Sequenzvariationen in der letzten Aminosäureposition zur Herstellung einer funktionstüchtigen Peptid-Affinitätsmatrix eigneten. Die verschiedenen HiTrapTM Säulen wiesen keinerlei Unterschiede in ihrer chromatographischen Leistung auf.

In sämtlichen Aufarbeitungsläufen lagen die Bindungs- und Wiederfindungsraten für den monoklonalen Antikörper zwischen 97 und 100 %, so daß die Produktausbeute immer über 96 % betrug. Das Zielprotein konnte trotz der in Relation zu den Bindungstests mit den Cellulosemembranen stark verkürzten Kontaktzeiten auch in der Chromatographie erfolgreich an den Peptidliganden zurückgehalten werden. Zudem lieferte die mehrfache Wiederholung der Aufreinigungszyklen eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Der Prozeß erwies sich in einem Bereich zwischen pH 6,0 und 7,5 als pH-unabhängig, so daß auf eine vorausgehende Konditionierung der Kulturüberstände verzichtet werden konnte. Diese Tatsache ist insbesondere in Hinblick auf die Arbeit in der biomasseintegrativen Fließbettadsorption als positiv zu bewerten, da jeder zusätzliche Eingriff das Risiko einer unerwünschten Zellschädigung birgt.

Durch SDS-PAGE Analysen der Aufarbeitungsläufe und Bindungsstudien mit hochkonzentrierten Reinsubstanzlösungen konnte eine sehr gute Abreicherung von Fremdproteinen nachgewiesen werden. Sie beweist eine für affinitätschromatographische Prozesse charakteristische Selektivität der Peptidmatrices und führte zu einem entsprechend hohen Reinheitsgrad des Produkteluats.

Des weiteren wurde eine fast vollständige DNA-Abreicherung erzielt, die unter Berücksichtigung des Detektionslimits des eingesetzten Testverfahrens von 10 ng/ml in jedem Fall auf die Gesamtmenge bezogen mehr als 99,994 % ausmachte. Gleiches galt für die Reduktion niedermolekularer Substanzen, die allerdings nur unspezifisch bzw. anhand der freien Aminosäuren untersucht wurden.

Ein Experiment mit vier produktfremden Antikörpern zeigte, daß der Peptidligand eine ausschließliche Bindungsspezifität gegenüber dem Anti-FVIII Immunglobulin aufwies. Da die meisten Referenzantikörper ebenfalls murinen Ursprungs waren, lag die Bindungsstelle demnach nicht in der für die gesamte IgG-Klasse konstanten F_c -Region sondern in der variablen F_{ab} -Einheit, die für jeden Antikörper charakteristisch ist.

In Regenerations- und Standzeittests zeichneten sich die Peptidmatrices durch eine äußerst hohe Stabilität aus, die mit der von Chromatographiematerialien vergleichbar ist, die lediglich mit kleinen funktionellen Gruppen substituiert sind wie beispielsweise den Ionenaustauschern. Dadurch ließen sich die Säulen in einem einfachen CIP-Prozeß mit 0,5 molarer Natronlauge regenerieren, was für herkömmliche Affinitätsmedien aufgrund der Denaturierungsgefahr der üblicherweise eingesetzten Proteinliganden undenkbar wäre.

Den letzten zweifelsfreien Beweis für die absolute Gleichwertigkeit der auf unterschiedliche Weise hergestellten Peptid-Affinitätsmatrices lieferten umfangreiche Untersuchungen und Vergleiche der dynamischen Bindungskapazitäten. Sie lagen bei einer Fließgeschwindigkeit von 300 cm/h für alle C-terminal gekuppelten HiTrapTM Materialien mit nur äußerst geringen Abweichungen zwischen 25,8 und 27,0 mg/ml Gel. Zudem ließ sich die dynamische Bindungskapazität durch Verringerung der Fließgeschwindigkeit auf 75 cm/h noch einmal auf mehr als das Doppelte (56,8 mg/ml) erhöhen.

In weiteren Kapazitätsstudien stellte sich heraus, daß das Bindungsvermögen unabhängig von der Produktkonzentration war, jedoch signifikante Abweichungen bei

der Verarbeitung von Lösungen anderer Basalzusammensetzungen bestanden. So wurde der Durchbruch bei der Verwendung von Kulturüberstand statt eines vorgereinigten Produktkonzentrats unter den gleichen Prozeßbedingungen erst nach einer etwa 1,5-fachen Auftragsmenge erreicht. Die Ursachen für dieses Phänomen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Weitere bedeutende Ergebnisse gingen aus einer Referenzstudie mit der revers gekuppelten Peptidmatrix (KEDFDI-Revers) hervor. Da die Bindungskapazität hier mit 6,9 mg/ml Gel um etwa 75 % niedriger lag als bei der entsprechenden Referenzsäule, konnte bewiesen werden, daß die Kupplungsausrichtung tatsächlich einen entscheidenden Einfluß auf das Bindungsvermögen hatte, demzufolge die C-terminalen Strategien als wesentlich erfolgreicher eingestuft werden mußten. Die genaue Übereinstimmung der übrigen Versuchsergebnisse ließ jedoch ansonsten keine Favorisierung eines der Herstellungsverfahren für die Anfertigung der großvolumigeren Fließbettmatrix zu.

Aufgrund der guten Kalkulierbarkeit des Material- und Zeitaufwands fiel die Entscheidung auf die direkte Synthese des Peptidliganden an das Chromatographiematerial. In den Untersuchungen zum Durchbruchverhalten einer gepackten 1 ml Testsäule stellte sich jedoch heraus, daß die Kapazität der EBA-Matrix mit maximal 2,6 mg/ml Gel für die Verarbeitung von Kulturüberstand bei 300 cm/h nur etwa einem Zehntel des Bindungsvermögens der HiTrapTM Säulen entsprach. Die Ursachen wurden in einen Zusammenhang mit dem wesentlich schlechteren Verweilzeitverhalten des Prototypmaterials gebracht. Obwohl dies nicht der einzige Grund für die signifikanten Abweichungen sein konnte, ließen sich über weitere Einflüsse wie eine sterisch bedingte Kapazitätslimitierung durch eine eventuelle Ligandenüberladung nur spekulative Aussagen machen.

3.4 Fließbettchromatographie

Der folgende Ergebnisteil faßt die Versuche zur Aufarbeitung des monoklonalen Antikörpers in der Fließbettchromatographie zusammen. Neben der Überprüfung des Reinigungserfolgs und der Übertragbarkeit der Ergebnisse aus der Festbettchromatographie stand die Untersuchung der Partikelanreicherung und eventuell auftretender Interaktionen zwischen der Biomasse und der Peptid-Affinitätsmatrix im Vordergrund. Einen wesentlichen Schwerpunkt bildete in diesem Zusammenhang die Quantifizierung der prozeßbedingten Zellschädigung, die zum Schutz des Produkts vor zellulären Enzymen vermieden werden mußte.

An geeigneter Stelle erfolgt eine Gegenüberstellung mit den StreamlineTM Matrices SP_XL und rProtein A, die innerhalb des Forschungsprojekts ebenfalls für die Reinigung des Anti-FVIII benutzt wurden. Der Vergleich ermöglichte eine Abschätzung der Leistungsfähigkeit der Peptid-Affinitätsmatrix sowie eine abschließende Beurteilung ihrer Eignung für den alternativen Einsatz in der Fließbettchromatographie. Darüber hinaus ließen sich die Chancen der entwickelten Methodik in Bezug auf die Anwendung auch für andere biotechnologisch gewonnenen Produkte abschätzen.

3.4.1 Festlegung der Betriebsparameter

Die fließbettchromatographische Aufreinigung des Anti-FVIII fand mit einer StreamlineTM 25 Säule statt, die mit 70 ml der substituierten Prototypmatrix befüllt war und in einem GradiFracTM System betrieben wurde. Das einsetzbare Probenvolumen wurde aus den in Tabelle 3.7 auf Seite 142 aufgelisteten Ergebnissen zur dynamischen Bindungskapazität abgeschätzt. Demnach betrug die Menge antikörperhaltiger Zellsuspension, die ohne signifikante Produktverluste aufgetragen werden konnte, ungefähr ein bis zwei Liter. Die Bereitstellung des Ausgangsmaterials erfolgte mit einem SuperSpinner, so daß im satzweisen Betrieb etwa alle drei Tage ausreichend produktthaltige Zellsuspension für ein Aufarbeitungsexperiment erzeugt werden konnte.

Die Festlegung der Fließgeschwindigkeit erfolgte anhand eines Expansionsprofils. Dazu wurde die Höhe des fluidisierten Gels in Relation zu der Ausgangshöhe des Sediments gegen die Anströmgeschwindigkeit aufgezeichnet. Aus dem Bereich linearer Abhängigkeit ließen sich die optimalen Arbeitsbedingungen ablesen. Dabei wurden makroskopisch erkennbare Unregelmäßigkeiten des Fluidisierungsverhaltens ebenfalls berücksichtigt.

Abbildung 3.43 gibt das Expansionsprofil der Peptid-Affinitätsmatrix wieder. Die Berechnung der Regressionsgeraden erfolgte aus dem Meßbereich zwischen 50 und

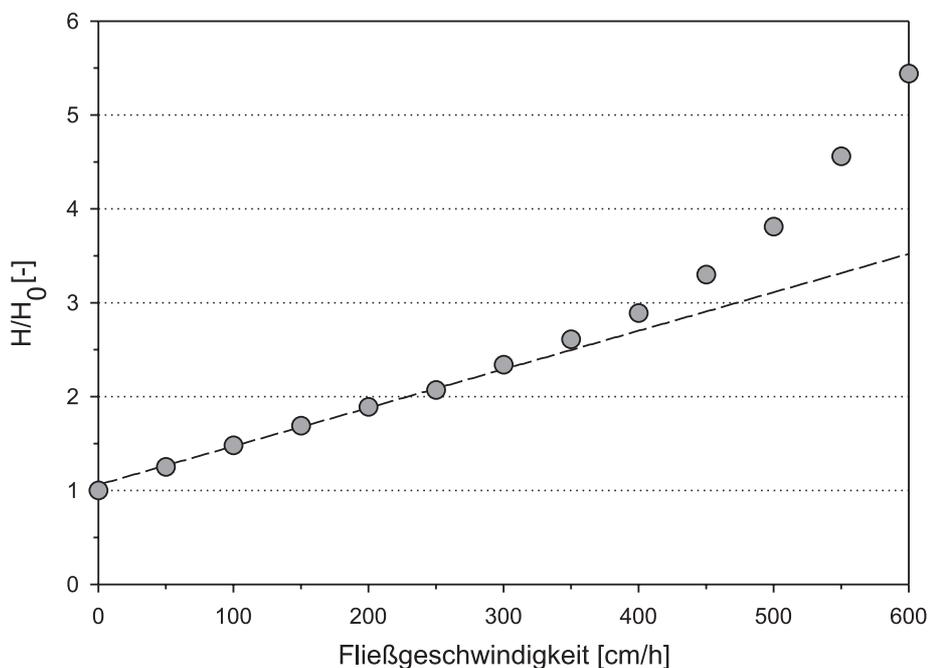


Abbildung 3.43: Expansionsprofil der EBA-Prototypmatrix. Säule: StreamlineTM 25; Matrixvolumen: 70 ml; $H_0 = 14,3$ cm; Adapterhöhe: 93 cm; Puffer: PBS, pH 7,0; Regression: Meßdaten 50-200 cm/h.

200 cm/h, in dem die Fluidisierung eine äußerst hohe Stabilität aufwies. Das Profil verläuft bis zu einer Fließgeschwindigkeit von etwa 350 cm/h nahezu linear. Innerhalb dieses Bereichs konnten die Höhe der fluidisierten Matrix präzise abgelesen und keine Kanalbildung festgestellt werden. Bei weiterer Vergrößerung der Anströmgeschwindigkeit stieg die Expansionshöhe überproportional an. Durch die zunehmende Ausdünnung der Gelpartikel im oberen Säulenabschnitt konnte die Fluidisierungsgrenze nur noch ungenau bestimmt werden. Zudem wurde eine verstärkte Neigung zu Turbulenzbildungen festgestellt, die die Expansion des Chromatographiematerials instabil erscheinen ließen.

Die Beobachtungen deckten sich mit den Versuchsergebnissen zum Fluidisierungsverhalten der StreamlineTM Matrices rProtein A und SP_XL (Daten nicht dargestellt). Beide wiesen bei gegebener Fließgeschwindigkeit einen ähnlich hohen Expansionsgrad auf. Demnach hatte die chemische Prozedur der Ligandensynthese trotz teilweise auch hoher mechanischer Belastungen keine auffälligen strukturellen Veränderungen der Basalmatrix hervorgerufen, die einen meßbaren Einfluß auf die Expansionscharakteristik gehabt hätten.

Aus den Daten zur Expansion der Peptidmatrix wurde das in Abbildung 3.44 dargestellte Richardson-Zaki Diagramm erstellt, aus dem der Expansionskoeffizient n

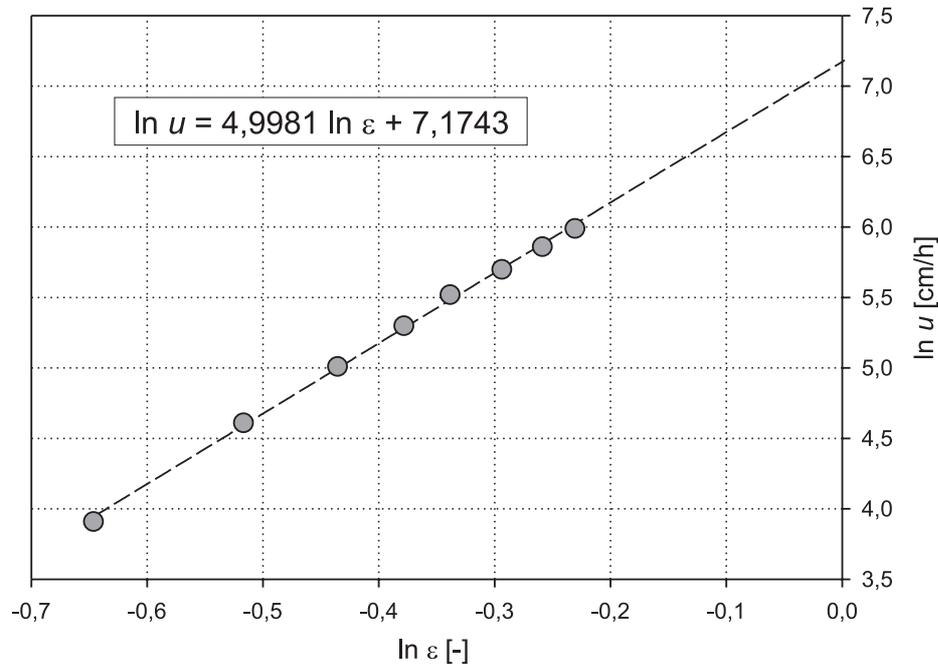


Abbildung 3.44: Richardson-Zaki Diagramm für das Expansionsverhalten der Peptidmatrix

und die terminale Fallgeschwindigkeit u_t der Gelpartikel mit 5,0 und 1305 cm/h bestimmt werden konnten. Demnach hätte die Matrix mit über 1000 cm/h angeströmt werden können, worauf jedoch aufgrund der beobachteten Instabilitäten oberhalb von 400 cm/h verzichtet wurde. Zudem erreichte die Expansion der kleineren Matrixpartikel im Realsystem bereits ab einer Fließgeschwindigkeit von etwa 700 cm/h den oberen Säulenadapter, so daß ein Betrieb unter diesen Bedingungen aufgrund des Verblockungsrisikos ausgeschlossen war.

Auch die Erstellung des Richardson-Zaki Diagramms erfolgte nur auf Basis der Meßwerte zwischen 50 und 400 cm/h, da sich bei höheren Fließgeschwindigkeiten eine Verfälschung durch Ablesefehler kaum vermeiden ließ. Außerdem mußte davon ausgegangen werden, daß sich das Strömungsprofil aus dem laminaren zunehmend in den turbulenten Bereich verschob, so daß die in der Einleitung beschriebenen physikalischen Zusammenhänge keine Gültigkeit mehr gehabt hätten.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse und in Anlehnung an die Experimente im Festbettmodus wurde die Fließgeschwindigkeit für die fließbettchromatographische Aufreinigung des Anti-FVIII auf 300 cm/h festgelegt, was einem Volumenstrom von 24,5 ml/min entsprach. Unter diesen Voraussetzungen konnten fluidisierungsbedingte Komplikationen weitgehend ausgeschlossen werden. Weitere Parameter-einstellungen sind Tabelle 3.12 zu entnehmen.

Tabelle 3.12: Betriebsparameter in der Fließbettchromatographie

Betriebsparameter		
<i>Gelvolumen</i>		70 ml
<i>Fluß</i>	<i>Beladung</i>	↑ 300 cm/h
	<i>Elution</i>	↓ 100 cm/h
<i>Expansionshöhe</i>	<i>300 cm/h</i>	35 cm
<i>Sedimentationshöhe</i>	H_0	14,3 cm
<i>Adapterhöhe</i>	<i>Beladung</i>	40 cm
	<i>Elution</i>	14,3 cm
<i>Probenvolumen</i>		ca. 1000 ml

Bei 300 cm/h betrug die Expansionshöhe etwa 35 cm. Da bei der Verarbeitung von Zellsuspensionen aufgrund der höheren Viskosität jedoch mit einem leichten Anstieg gerechnet werden mußte, wurde der Säulenadapter trotz des größeren Totvolumens bei einer Abmessung von 40 cm arretiert.

Für eine optimale Ankonzentrierung des Produkts wurde die Fließgeschwindigkeit für die Elution auf 100 cm/h (8,2 ml/min) herabgesetzt. Sie sollte im Festbett stattfinden, was allerdings eine vorausgehende Überprüfung eventuell auftretender Biomasse/Matrix Interaktionen erforderte.

3.4.2 Aufreinigung aus Kultursuspensionen

Zur Überprüfung der Übertragbarkeit der Ergebnisse aus der Festbettchromatographie und der Reproduzierbarkeit der Antikörperaufreinigung in der Fließbettadsorption wurden insgesamt sieben Aufarbeitungsläufe mit zellhaltiger Kultursuspension durchgeführt. Da in den einzelnen Experimenten unterschiedliche Untersuchungskriterien im Mittelpunkt standen, beschränkte sich die Auswertung der meisten Läufe nur auf begrenzte Teilaspekte. Die folgenden Abschnitte fassen zunächst die Versuche zur Beurteilung des Reinigungserfolgs zusammen. Weitere fließbettcharakteristische Untersuchungen, wie beispielsweise die Abreicherung der Biomasse oder die Analyse von Zellschädigungen und Biomasse/Matrix Interaktionen, werden in gesonderten Kapiteln dokumentiert.

Die Aufarbeitung des Antikörpers erfolgte unter den in Tabelle 3.12 zusammengefaßten Bedingungen. Das Puffersystem wurde im Vergleich zu den Festbettexperimenten nicht verändert. Die Equilibrierung und der Waschschrift fanden mit einem

PBS-Puffer bei pH 7,0 statt und die Elution mit 2 %iger Essigsäure. Auch in diesem Fall wurde zur Neutralisierung des Produktkonzentrats eine 1 M Tris-Lösung mit pH 9,0 vorgelegt. Nach jedem Lauf wurde die Matrix wie in Tabelle 2.8 auf Seite 61 beschrieben durch eine etwa 2-stündige CIP-Prozedur mit 0,5 M NaOH gründlich gesäubert und regeneriert.

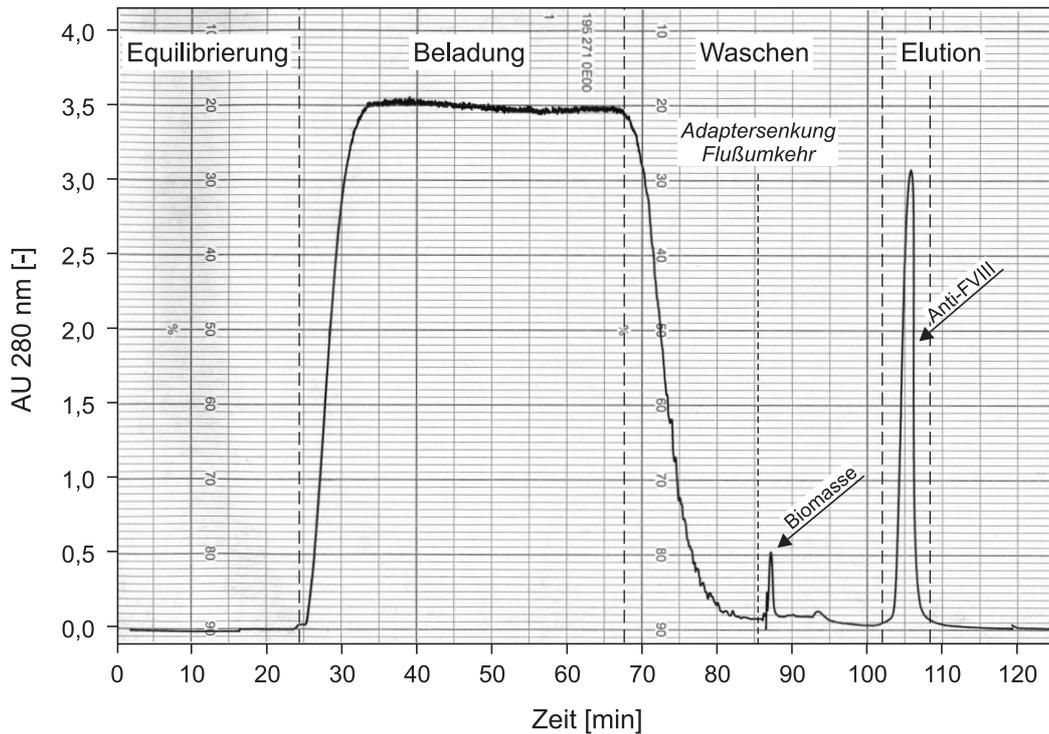


Abbildung 3.45: Chromatogramm der Anti-FVIII Aufreinigung im Fließbett

Abbildung 3.45 gibt ein typisches Chromatogramm der Anti-FVIII Aufreinigung im Fließbett wieder. Im Vergleich zur Festbettchromatographie (Abb. 3.21, S. 121) war der EBA-Prozeß durch stärkere Rückvermischungseffekte geprägt. Dies wird an dem flacheren Anstieg bzw. Abfall des UV-Signals beim Wechsel der Flüssigphase deutlich und beruht in erster Linie auf dem größeren Hohlraumanteil in der StreamlineTM Säule. Die Zeitpunkte der Fraktionierung sind im Chromatogramm eingezeichnet.

Eine weitere verfahrensbedingte Besonderheit lag für den Waschschriff vor. Kurz nach der Adaptersenkung und Flußumkehr trat ein kleiner Peak auf, der jedoch nicht proteinogenen Ursprungs war. Unter Berücksichtigung der zeitlichen Verzögerung und des Totvolumens der angeschlossenen Schläuche mußte es sich dabei um Biomassepartikel handeln, die während des Probenauftrags am unteren Säulenadapter zurückgehalten und durch den Wechsel der Strömungsrichtung wieder

gelöst wurden. Diese Annahme konnte durch Kontrolluntersuchungen mit einem CASY-System bestätigt werden.

3.4.2.1 Produktbilanzierung

Für die Auswertung der Chromatographieläufe wurden der Anti-FVIII Gehalt sämtlicher Fraktionen mittels ELISA bestimmt und die charakteristischen Bewertungskriterien berechnet. Tabelle 3.13 faßt die Ergebnisse von vier Fließbettexperimenten mit der Peptid-Affinitätsmatrix zusammen und gibt eine Gegenüberstellung mit den StreamlineTM Medien rProtein A und SP_XL.

Tabelle 3.13: Bilanzierung der Anti-FVIII Aufreinigung im Fließbett.

	V_P [ml]	IgG [mg]	BR [%]	WFR [%]	AB [%]	Konz.-Faktor IgG Vol.	
Pep-EBA I ¹	910	29	97,1	93,7	90,7	4,1	4,6
Pep-EBA II	1800	36	96,5	100,0	96,5	14,9	15,0
Pep-EBA III	810	44	98,2	100,0	98,2	10,3	9,0
Pep-EBA IV	870	29	98,0	100,0	98,0	7,7	7,3
rPA-EBA I	1010	90	97,0	95,0	92,1	11,2	12,3
rPA-EBA II	1050	94	97,0	100,0	97,0	13,9	15,0
rPA-EBA III	1060	95	97,1	90,6	88,0	12,6	15,1
rPA-EBA IV	1050	94	97,0	99,1	96,1	13,7	15,0
SP_XL-EBA I ²	112×10 ³	4086	94,0	61,8	58,1	4,2	7,3
SP_XL-EBA II ²	105×10 ³	5215	95,6	69,0	65,9	4,2	6,9

¹Elution im Fließbettmodus

²Pilotmaßstab: StreamlineTM200 Säule; 7,5 bzw. 5,0 L Matrix; Elution im Fließbett

In den Versuchen mit der EBA-Prototypmatrix wurden jeweils zwischen 810 und 1800 ml Zellsuspension aufgearbeitet. Da die Auftragsmenge nie über 44 mg IgG lag, wurde die im Festbettmodus ermittelte dynamische Bindungskapazität von 2,6 mg/ml Gel in keinem der Läufe überschritten. Die regelmäßige Probenentnahme aus dem Durchlauf und anschließende Bestimmung im ELISA ließ keinen sukzessiv ansteigenden Produktdurchbruch erkennen (Daten nicht dargestellt), der die Bilanzierung der chromatographischen Aufarbeitung verfälscht hätte.

Die Versuchsergebnisse spiegeln für die gewählten Betriebsparameter eine sehr gu-

te Reproduzierbarkeit wider. Die Bindungsraten BR lagen mit Werten zwischen 96,5 und 98,2 % ähnlich hoch wie in der Festbettchromatographie (s. Tab. 3.4, S. 122). Wiederfindungsraten WFR von 100 % gewährleisteten eine der Bindung entsprechend hohe Ausbeute AB.

Einzige Ausnahme bildete der Lauf Pep-EBA I, in dem die Produktausbeute nur rund 91 % betrug. Im Unterschied zu den anderen Versuchen wurde die Elution hier im expandierten Modus durchgeführt. Mögliche Ursache für die verhältnismäßig hohen Verluste könnte eine schlechte Durchströmung der einzelnen Matrixpartikel gewesen sein, infolge deren die im Inneren gebundenen Moleküle nicht vollständig von dem Elutionsmittel erfaßt werden konnten. Dagegen spielt dieser Effekt im Festbett aufgrund des Druckaufbaus und der eingeschränkten Möglichkeit, die Gelpartikel zu umströmen, eine geringere Rolle, so daß in den entsprechenden Versuchen keine Produktverluste auftraten. Unterstützt wurde diese These durch das Auftreten einer relativ starken Peakverbreiterung bei der Elution im Fließbett. Dabei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß diese teilweise auch durch einfache Rückvermischungsvorgänge verursacht worden ist.

Die hohe Peakverbreiterung führte im ersten Lauf zu einem verhältnismäßig großen Elutionsvolumen, wodurch der erzielte Konzentrierungsfaktor nur 4,1 für das Produkt respektive 4,6 bezüglich der Volumenreduktion betrug. In den übrigen Versuchen ließ sich der Antikörper auf das bis zu 15-fache ankonzentrieren, was mit den Werten aus herkömmlichen primären Konzentrierungsverfahren wie der Ultrafiltration vergleichbar ist [TEBBE, 1997]. Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß das Elutionsvolumen hinsichtlich der Fraktionsbegrenzung und der Tris-Vorlage zur Vermeidung von Produktverlusten nicht optimiert wurde.

Aus der Gegenüberstellung mit den beiden anderen StreamlineTM Medien läßt sich eine deutliche Übereinstimmung der Ergebnisse mit denen der rProtein A Matrix erkennen. Im Hinblick auf die Wiederfindungsrate und Ausbeute schneidet der peptid-affinitätschromatographische Prozeß sogar etwas besser ab und beweist eine höhere Reproduzierbarkeit. Das Gegenteil gilt allerdings für die Konzentrierungsfaktoren, die jedoch wie bereits erwähnt nicht optimiert wurden.

Die Ergebnisse der Anti-FVIII Aufreinigung mit dem Kationenaustauscher SP_XL fielen deutlich schlechter aus. Im Unterschied zu den anderen Läufen fanden die dargestellten Versuche mit der SP_XL Matrix im Pilotmaßstab statt [AMESKAMP, 1999]. Jedoch zeichneten sich für den Labormaßstab ähnliche Resultate ab, die allerdings aufgrund einer Überschreitung der Bindungskapazität für die Gegenüberstellung der Aufreinigungsbilanzen ungeeignet waren.

Während die Bindungsraten von 94,0 bzw. 95,6 % noch mit denen aus der Affinitätschromatographie vergleichbar waren, lag die Produktausbeute nur zwischen

58 und 66 %. Grund dafür waren die niedrigen Wiederfindungsraten, die vermutlich durch die intensiven Zell/Matrix Interaktionen entstanden sind. Obwohl alle Prozeßschritte im Fließbettmodus stattfanden, wurden die Gelpartikel durch die zurückgehaltene Biomasse miteinander verklebt, so daß es bei der Elution zu ausgeprägten Kanalbildungen kam. Es ist anzunehmen, daß die Matrixbereiche mit besonders starken Verklumpungen bei der Durchströmung ausgespart blieben, und der gebundene Antikörper von dem Elutionsmittel nicht erfaßt wurde. Gleichzeitig traten große Peakverbreiterungen auf, die zu verhältnismäßig geringen Konzentrierungsfaktoren von 4,2 für das Produkt und durchschnittlich 7,1 für das Endvolumen führten.

Die Zusammenfassung der in Tabelle 3.13 dargestellten Ergebnisse zeigt, daß mit 70 ml der Peptidmatrix eine effiziente fließbettchromatographische Aufarbeitung von ein bis zwei Litern Kultursuspension bewerkstelligt werden konnte. Dabei war der Reinigungserfolg mit dem der Affinitätsmatrix rProtein A vergleichbar. Desweiteren gewährleisteten die StreamlineTM25 Säule und der Betrieb im GradiFracTM System eine optimal auf den Maßstab angepaßte Prozeßführung. Nur bei einem der sieben Aufarbeitungsläufe mußte der Versuch in Folge einer Verblockung der Säulenadapter abgebrochen werden. Diese resultierte aus einer unzureichenden Reequilibrierung der Matrix nach der CIP-Regeneration, wodurch der pH-Wert zum Zeitpunkt der Beladung mit Kultursuspension noch im basischen Bereich lag und große Zellaggregate entstanden, die die dünnporigen Netze und Strömungsverteiler blockierten. In allen anderen Läufen konnte das Produkt innerhalb einer Zeitspanne von etwa 90 bis 120 Minuten erfolgreich prozessiert werden.

3.4.2.2 Abreicherung von Fremdproteinen

Zur Überprüfung der Abreicherung von Fremdproteinen wurden die Chromatographiefraktionen aus der Antikörperaufreinigung im Fließbett mittels Gelelektrophorese und analytischer Gelfiltration untersucht.

Abbildung 3.46 zeigt die Aufnahme eines SDS-Polyacrylamidgels, in dem die Proben aus dem Lauf Pep-EBA II sowie die Medienbestandteile Albumin BSA, Transferrin HTR und Insulin BI als Reinsubstanzlösungen aufgetragen wurden. Deutlich erkennbar ist, daß sämtliche proteinogenen Kontaminationen, die nach der Silberfärbung in der Zellkulturernte (Spur 2) nachzuweisen sind, nahezu quantitativ im Durchlauf (Spur 3) erscheinen und letzte verbleibende Reste im Waschschrift (Spur 4) ausgespült wurden. Das Eluat (Spur 5-6) weist demnach in Übereinstimmung mit den in Kapitel 3.3.2 ab Seite 124 beschriebenen Ergebnissen aus der Festbettchromatographie nur noch das hochkonzentrierte Produkt auf.

Das Bandenmuster der aufgetrennten Durchlaufprobe läßt eine relativ hohe Kon-

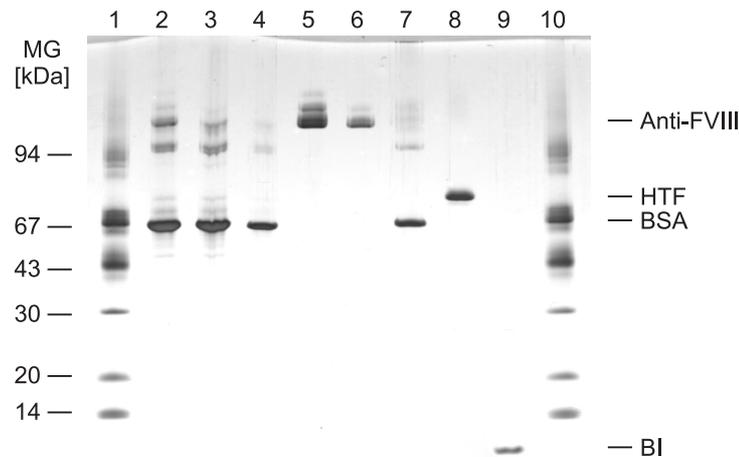


Abbildung 3.46: Abreicherung von Fremdproteinen in der Fließbettchromatographie. SDS-PAGE Analyse zur Überprüfung des Reinigungserfolgs in der fließbettchromatographischen Aufreinigung des Anti-FVIII mit der Peptid-Affinitätsmatrix (PhastGelTM Gradient 8-25, nicht-reduzierende Bedingungen, Silberfärbung). Spuren: 1,10: LMW Marker 14-96 kDa, reduziert (1:15); 2: Probe (1:3); 3: Durchlauf (1:3); 4: Waschfraktion (1:3); 5,6: Eluat (1:3, 1:20); 7: BSA (500 mg/L, 1:5); 8: HTF (250 mg/L, 1:3); 9: BI (250 mg/L, 1:3)

zentration an ungebundenem Antikörper vermuten. Entsprechende Produktverluste konnten jedoch in den ELISA-Tests nicht bestätigt werden. Da in der Albuminprobe (Spur 7) auf der Höhe des Anti-FVIII ebenfalls eine Anzahl von schwachen Banden erkennbar ist, handelt es sich wahrscheinlich um ein BSA-Aggregat.

Um den Reinigungserfolg der Peptid-Affinitätsmatrix besser beurteilen zu können, wurden die Resultate mit den StreamlineTM Medien SP_XL und rProtein A verglichen. Abbildung 3.47 stellt ein SDS-Polyacrylamidgel dar, in dem die aufgetrennten Fraktionen der Chromatographieläufe mit den drei verschiedenen Matrices einander gegenübergestellt sind.

Die Aufreinigung mit dem Ionentauscher resultierte in einem Eluat (Spur 4), in dem neben dem eigentlichen Produkt noch zahlreiche weitere Proteine ankonzentriert oder wie im Fall von Albumin nur unvollständig abgereichert wurden. Dieses Ergebnis spiegelt das typische Problem bei der Nutzung von ladungs- oder gruppenspezifischen Liganden wider. In der Ionenaustausch-Chromatographie werden Proteine nach ihrer Ladung voneinander getrennt. Die Bindung ist abhängig vom pH-Wert, der bei der Aufarbeitung des Anti-FVIII ($pI = 6,3$) für eine optimale Produktausbeute auf pH 4,6 eingestellt werden mußte. Somit wurden sämtliche Proteine mit einem isoelektrischen Punkt oberhalb dieses pH-Werts ebenfalls an der Matrix zurückgehalten. Eine Trennung kann im allgemeinen nur über eine

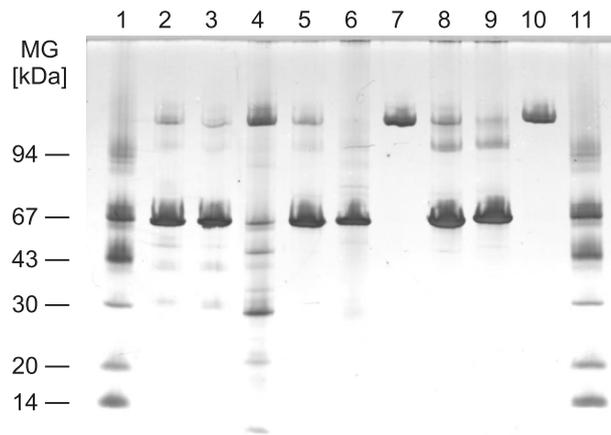


Abbildung 3.47: Vergleich der Fremdprotein-Abreicherung mit verschiedenen Fließbettmatrices. SDS-PAGE Analyse der Anti-FVIII Aufreinigung mit StreamlineTM SP_XL, rProtein A und der Peptid-Affinitätsmatrix (PhastGelTM Gradient 8-25, nicht-reduzierende Bedingungen, Silberfärbung). Spuren: 1,11: LMW Marker 14-96 kDa, reduziert (1:15); 2-4: SP_XL; 5-7: rProtein A; 8-10: Peptid-Affinitätsmatrix; jeweils Probe 1:3, Durchlauf 1:3, Eluat 1:10

präzise abgestimmte Gradientenelution erfolgen. Solche ist jedoch in Fließbettprozessen nur schwer zu realisieren und in diesem Fall nicht durchgeführt worden.

Im Gegensatz zu dem Kationenaustauscher weist das Eluat aus dem rProtein A Experiment (Spur 7) keinerlei proteinogene Kontaminationen mehr auf. Protein A ist ein Zellwandprotein, das von dem Gram-positiven Bakterium *Staphylococcus aureus* auf der Zelloberfläche exponiert wird und eine hohe Affinität zu der F_c-Region von Immunglobulinen vom Typ IgG aufweist. Bei dem Liganden handelt es sich um ein rekombinantes Protein A, dessen Albumin-Bindungsstelle durch gezielte Mutation inaktiviert wurde. Auf diese Weise verhält sich das Molekül hochselektiv, so daß sich mit der rProtein A Matrix eine Vielzahl verschiedener Antikörper selbst aus komplexen Lösungen mit einem hohen Reinheitsgrad isolieren lassen.

Aus dem in Abbildung 3.47 dargestellten Vergleich der verschiedenen Chromatographiemethoden geht deutlich hervor, daß der erzielte Reinigungserfolg mit der Peptidmatrix (Spuren 8-10) mit dem der rProtein A Säule vergleichbar ist. Da das Eluat (Spur 10) ebenfalls keine verunreinigenden Fremdproteine aufweist, kann das Material in demselben Maße als hochselektive Affinitätsmatrix eingestuft werden.

3.4.2.3 Abreicherung von DNA

Die Bestimmung der DNA-Abreicherung fand für sämtliche fließbettchromatographischen Aufreinigungen des Anti-FVIII statt. Tabelle 3.14 faßt die Ergebnisse zusammen und vergleicht sie mit Experimenten aus der Aufarbeitung mit der

Tabelle 3.14: DNA-Abreicherung in der Fließbettchromatographie

	DNA [$\mu\text{g}/\text{ml}$]			Abreicherung	
	Probe	Durchlauf	Eluat	[%]	
<i>Pep-EBA I</i>	2,44	2,27	$\leq 0,01$	$\geq 99,6$	
<i>Pep-EBA II</i>	1,74	1,95	$\leq 0,01$	$\geq 99,4$	
<i>Pep-EBA III</i>	9,57	9,72	$\leq 0,01$	$\geq 99,9$	
<i>Pep-EBA IV</i>	8,23	9,52	$\leq 0,01$	$\geq 99,9$	
<i>Pep-EBA V</i>	3,09	3,35	$\leq 0,01$	$\geq 99,7$	
<i>Pep-EBA VI</i>	8,73	9,39	$\leq 0,01$	$\geq 99,9$	
<i>rPA-EBA I</i>	1,93	2,09	$\leq 0,01$	$\geq 99,5$	
<i>rPA-EBA II</i>	2,00	2,12	$\leq 0,01$	$\geq 99,5$	
<i>rPA-EBA III</i>	0,99	0,98	$\leq 0,01$	$\geq 99,0$	
<i>rPA-EBA IV</i>	2,23	2,20	$\leq 0,01$	$\geq 99,6$	
	DNA [μg]			Abreicherung	
Probe	Durchlauf	Eluat	[%]		[\log_{10}]
<i>Pep-EBA I</i>	2220	2066	$\leq 2,0$	$\geq 99,91$	$\geq 3,05$
<i>Pep-EBA II</i>	3132	3510	$\leq 1,2$	$\geq 99,96$	$\geq 3,4$
<i>Pep-EBA III</i>	7752	7873	$\leq 0,9$	$\geq 99,99$	$\geq 4,0$
<i>Pep-EBA IV</i>	7160	8282	$\leq 1,2$	$\geq 99,98$	$\geq 3,7$
<i>Pep-EBA V</i>	2920	3166	$\leq 0,7$	$\geq 99,98$	$\geq 3,7$
<i>Pep-EBA VI</i>	8206	8827	$\leq 0,7$	$\geq 99,99$	$\geq 4,0$
<i>rPA-EBA I</i>	1949	2111	$\leq 0,8$	$\geq 99,96$	$\geq 3,4$
<i>rPA-EBA II</i>	2100	2226	$\leq 0,7$	$\geq 99,97$	$\geq 3,52$
<i>rPA-EBA III</i>	1049	1039	$\leq 0,7$	$\geq 99,93$	$\geq 3,15$
<i>rPA-EBA IV</i>	2342	2310	$\leq 0,7$	$\geq 99,97$	$\geq 3,52$

Affinitätsmatrix rProtein A. Die Messungen erfolgten wie in der Festbettchromatographie mit dem interkalierenden Farbstoff PicoGreenTM.

Eine entsprechende Auswertung der Versuche mit dem Ionenaustauscher SP_XL war aufgrund starker Meßwertschwankungen nicht möglich. Es ist anzunehmen, daß die DNA unter den gegebenen pH-Bedingungen ganz oder teilweise denaturiert bzw. ausgefällt wurde und von dem Test nicht mehr korrekt erfaßt werden kann-

te. Detailliertere Untersuchungen zur Auswirkung der Ansäuerung DNA-haltiger Lösungen sind der Diplomarbeit von Herrn Dipl.-Biol. Christoph Priesner zu entnehmen [PRIESNER, 1998].

Wie aus den in Abschnitt 3.3.3 zusammengefaßten Ergebnissen mit den 1 ml Festbettsäulen zu erwarten war, geben auch die in Tabelle 3.14 dargestellten Resultate aus der Fließbettchromatographie keinen Hinweis auf eine Interaktion zwischen der Peptidmatrix und der DNA. In sämtlichen Eluaten lag die DNA-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze der Testmethode von 10 ng/ml, so daß sie sich in Abhängigkeit von der jeweiligen Ausgangsmenge in allen Fällen um über 99,4 % verringerte. Die Gesamtabreicherung betrug bis zu 99,99 % bzw. 4,0 log-Stufen. Auch an dieser Stelle muß jedoch auf den denaturierenden Effekt durch die kurzzeitige Ansäuerung während der Elution hingewiesen werden. Demnach kann eine erfolgte DNA-Rückhaltung an der Matrix und die Möglichkeit zur Kontamination des Produkts nur indirekt über den Vergleich der Ausgangsproben mit den Durchläufen abgeschätzt werden. Die Meßwerte weisen jedoch keine signifikanten Unterschiede auf und lassen statt der zu erwartenden Abnahme sogar eher einen geringfügigen Anstieg erkennen, der wiederum auf eine leichte Schädigung der Zellen während der Säulenpassage hinweist.

Die Ergebnisse zeigen eine weitgehende Übereinstimmung mit denen aus der fließbettchromatographischen Aufreinigung mit der rProtein A Säule. Auch dort lag die DNA-Gesamtabreicherung in allen untersuchten Fällen über 99,93 %. Somit bewies die Peptidmatrix erneut ihre selektiven Bindungseigenschaften, die mit der herkömmlicher Affinitätsmaterialien vergleichbar ist.

3.4.3 Abreicherung der Biomasse

Neben den herkömmlichen Kriterien zur Bewertung chromatographischer Prozesse stellt sich in der Fließbettadsorption die zusätzliche Frage nach dem Klärungserfolg der Methode.

Die Abreicherung der Biomasse wurde für sämtliche Aufarbeitungsläufe bestimmt. Die Quantifizierung des Biomassegehalts in den einzelnen Fraktionen erfolgte mit einem Casy-System (Schärfe). Mit Hilfe der ermittelten Partikelgrößenverteilungen ließ sich der Feststoffanteil durch die nach Glauner definierte Klassierung in Debris ($\leq 6 \mu\text{m}$), tote ($6 - 10 \mu\text{m}$) und lebende Zellen bzw. Aggregate ($10 - 50 \mu\text{m}$) unterteilen.

Abbildung 3.48 gibt die Ergebnisse wieder. Graphik A vergleicht die Partikelgrößenverteilungen in der Zellkulturernte und dem Eluat. Die dargestellten Analysen beziehen sich auf den ersten Aufarbeitungslauf (Pep-EBA I), in dem die Elution

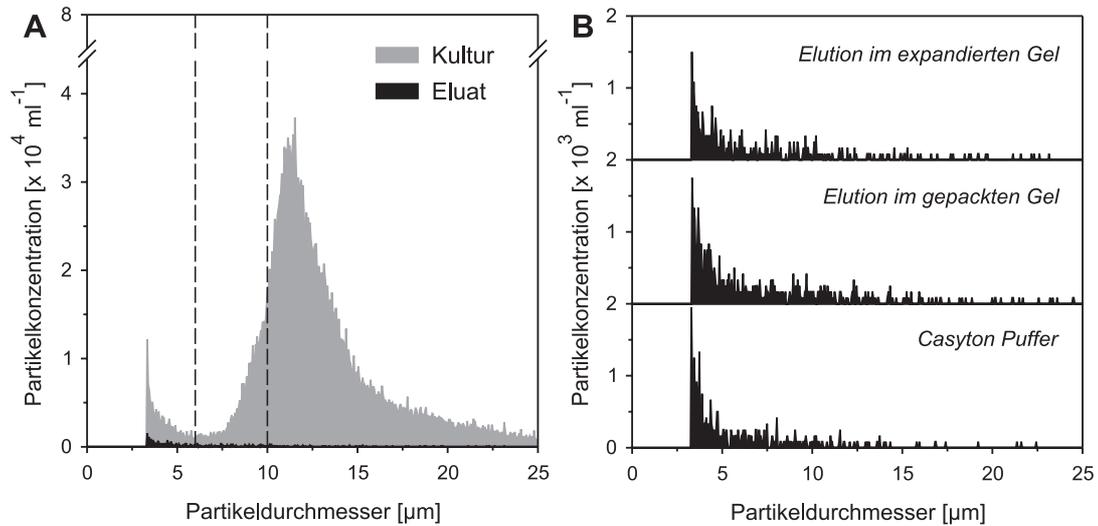


Abbildung 3.48: Abreicherung der Biomasse in der Peptid-Affinitätschromatographie. Analyse der Partikelgrößenverteilung mit dem Casy-System. A: Vergleich von Proben aus der Zellkultur-ernte und dem Eluat. B: Gegenüberstellung der Proben aus der Elution im expandierten und im gepackten Gelbett mit der Blindwertmessung des Casyton Puffers. (Probenverdünnung: 1:100; Meßvolumen: $3 \times 400 \mu\text{l}$)

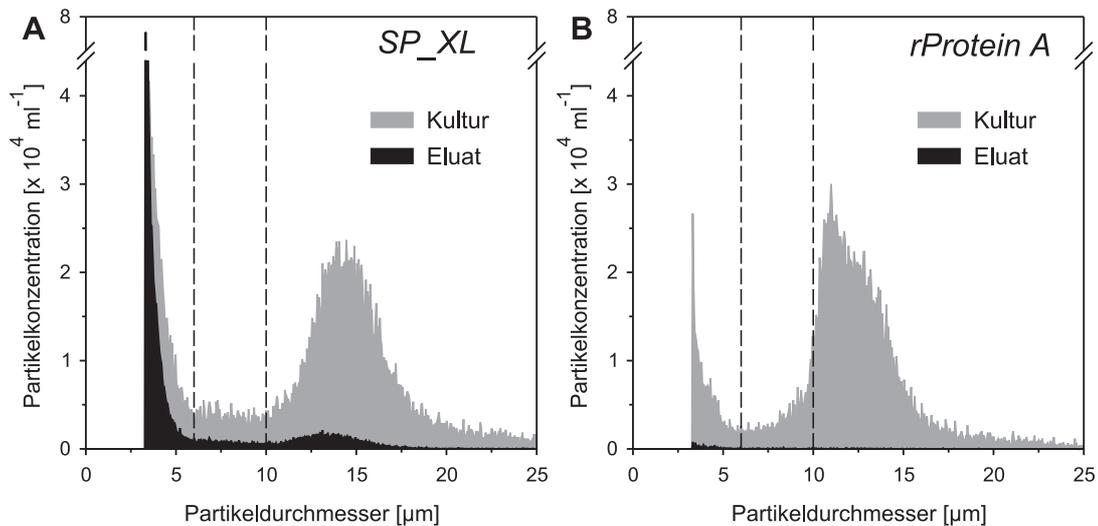


Abbildung 3.49: Abreicherung der Biomasse mit herkömmlichen Fließbettmatrices. Analyse der Partikelgrößenverteilung mit dem Casy-System. A: StreamlineTM SP_XL. B: StreamlineTM rProtein A. (Probenverdünnung: 1:100; Meßvolumen: $3 \times 400 \mu\text{l}$)

im Fließbett durchgeführt wurde, und somit keine verfälschenden Filtrationseffekte seitens der durchströmten Matrixschüttung vorlagen. Im Graphikteil B wird die Elution im expandierten Modus dann mit der im gepackten Gelbett und einem Blindwert verglichen, der auf der Basis von $0,2 \mu\text{m}$ -filtriertem Casyton-Puffer oh-

ne Probenzusatz erstellt wurde. Abschließend ermöglichen die in Abbildung 3.49 dargestellten Analysen einen Vergleich mit den StreamlineTM Medien SP_XL und rProtein A. Die detaillierten Berechnungen zur Biomasseanreicherung sind in Tabelle 3.15 auf Seite 173 zusammengefaßt.

Die Überlagerung der Partikelgrößenverteilungen aus der Kultursuspension und dem Eluat in Graphik 3.48 A zeigt deutlich, daß ein großer Anteil der vorhandenen Biomasse in der Fließbettchromatographie mit der Peptid-Affinitätsmatrix erfolgreich angereichert werden konnte. Wie aus 3.48 B hervorgeht, ist die Menge und Zusammensetzung der im Produktkonzentrat verbleibenden Reste vom Elutionsmodus unabhängig. Es handelt sich dabei in erster Linie um Partikel mit einem Durchmesser kleiner als 6 μm . Da die Blindwertmessung eine ähnliche Verteilung aufweist, können die nachgewiesenen Partikel jedoch in erster Linie auf einen Artefakt in der Casy-Messung zurückgeführt und die Produktkonzentrate als nahezu partikelfrei betrachtet werden.

Die in Tabelle 3.15 dokumentierten Berechnungen basieren auf Blindwert-korrigierten Daten und spiegeln das tatsächliche Bild wider. Demnach beträgt die Partikelanreicherung im Bereich toter und lebender Zellen in den meisten Läufen über 99 %. Im Gegensatz dazu treten in der Größenklasse unterhalb von 6 μm mit Werten zwischen 89,7 und 99,6 % etwas stärkere Schwankungen auf. Diese können mit den hohen Meßgenauigkeiten des Casy-Systems begründet werden, die selbst in den Blindwertbestimmungen zu hohen Abweichungen in diesem Bereich führten (Daten nicht dargestellt). Des weiteren muß darauf hingewiesen werden, daß die Puffer für die Fließbettchromatographie nicht filtriert wurden, so daß ungelöste Komponenten oder sonstige partikuläre Kontaminationen in den Vorlagegefäßen die Ergebnisse verfälscht haben könnten.

Zum Zeitpunkt der Ernte betrug die Lebendzellzahl durchschnittlich $2,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Laut Casy-Messungen lag der Biomasseanteil in den Ausgangssuspensionen zwischen 4200 und 6700 nl/ml. Nach der Prozessierung betrug das Feststoffvolumen in den Eluaten nur noch 5,2 bis 17,9 nl/ml, wodurch in allen Versuchen eine über 99,6 %ige Partikelanreicherung erzielt wurde.

Aus der Gegenüberstellung der Abbildungen 3.48 A und 3.49 B wird ersichtlich, daß der Klärungserfolg der Peptid-Affinitätschromatographie mit den Resultaten aus der Aufarbeitung mit der kommerziell erhältlichen rProtein A Matrix vergleichbar ist. Die Partikelanreicherung betrug in dem dargestellten repräsentativen Beispiel-experiment für alle drei Größenklassen etwa 99 %. Mit einem Wert von 8,6 nl/ml lag der Biomasseanteil im Eluat in der gleichen Größenordnung wie in den Versuchen mit der Peptidmatrix.

Tabelle 3.15: Abreicherung der Biomasse in der Fließbettchromatographie

	Partikelabreicherung [%] ¹		
	3,4-6,0 μm	6,0-10,0 μm	10,0-50,0 μm
<i>Pep-EBA I</i>	99,1	99,4	99,7
<i>Pep-EBA II</i>	98,8	99,4	99,8
<i>Pep-EBA III</i>	89,7	98,4	99,1
<i>Pep-EBA IV</i>	97,7	96,7	99,9
<i>Pep-EBA V</i>	95,5	98,0	99,6
<i>Pep-EBA VI</i>	99,6	99,5	99,9
<i>rProtein A</i>	98,8	99,7	99,7
<i>SP_XL</i>	35,3	79,7	93,8
	Biomassevolumen ¹		
	Probe [nl/ml]	Eluat [nl/ml]	Abreicherung [%]
<i>Pep-EBA I</i>	5403,2	15,5	99,7
<i>Pep-EBA II</i>	5803,7	8,3	99,9
<i>Pep-EBA III</i>	5667,1	17,9	99,7
<i>Pep-EBA IV</i>	6696,6	5,6	99,9
<i>Pep-EBA V</i>	4307,7	15,2	99,6
<i>Pep-EBA VI</i>	4263,1	5,2	99,9
<i>rProtein A</i>	3400,4	8,6	99,7
<i>SP_XL</i>	5851,8	268,4	95,4

¹Werte um den Casyton-Blindwert korrigiert

Dahingegen wurden mit dem Kationenaustauscher SP_XL deutlich schlechtere Ergebnisse erzielt. Schon aus der Partikelgrößenverteilung in Abbildung 3.49 A läßt sich im Eluat noch eine hohe Debris- und Totzellkonzentration erkennen, und selbst lebende Zellen wurden nur unvollständig abgereichert. Das Ergebnis spiegelt sich in den tabellarisch zusammengefaßten Daten wider und weist signifikante Unterschiede zu den beiden Affinitätsmatrices auf. Die Biomassereduktion beträgt in dem Bereich toter und lebender Zellen lediglich rund 80 bzw. 94 %, wobei der Gehalt an Zellbruchstücken mit einem Durchmesser unterhalb von 6 μm sogar nur um 35 % vermindert werden konnte. Der dürftige Klärungserfolg, der zu einem etwa

25fach höheren Feststoffvolumen im Eluat führte, hängt ursächlich mit den unspezifischen Bindungseigenschaften des Ionenaustauschermaterials zusammen. Während des Probenauftrags wurde die Biomasse an der Matrix zurückgehalten und unter Elutionsbedingungen wieder abgelöst, so daß die Kontamination des Produktkonzentrats selbst bei Verlängerung des Waschschriffs nicht verhindert werden konnte.

Die Versuchsergebnisse beweisen, daß die Peptidmatrix auch hinsichtlich der Biomasseabreicherung der Qualität hochselektiver Affinitätsmaterialien entspricht. Der Feststoffgehalt ließ sich auf das Niveau von Überständen reduzieren, die durch zweistufige Zentrifugation gewonnen wurden. Herr Dr. Hermann Tebbe führte ausführliche Untersuchungen zu dieser Klärungsmethode durch [TEBBE, 1996]. Er bewies, daß sich Lösungen mit einem Partikelgehalt zwischen 2,4 und 19,1 nl/ml problemlos zur Aufarbeitung in Filtrationsverfahren wie der Ultrafiltration oder Membranadsorption einsetzen lassen, so daß auch für die Weiterverarbeitung der Eluate aus der Peptid-Affinitätschromatographie keine weiteren Klärungsschritte notwendig sind.

3.4.4 Zellschädigung

In Aufarbeitungsprozessen für extrazelluläre Proteine sollte die Zellschädigung bei der Biomasseabtrennung zur Vermeidung von Kontaminationen mit Zellinhaltsstoffen und Enzymen, die die Produktstabilität gefährden könnten, möglichst gering gehalten werden. Dies gilt gleichermaßen für herkömmliche Zentrifugations- und Mikrofiltrationsverfahren wie auch für die neuartige Methode der integrativen Fließbettadsorption. Im Fall der Peptid-Affinitätschromatographie wurde das Ausmaß der prozeßbedingten Zellschädigung anhand verschiedener Analysen untersucht, deren Ergebnisse im folgenden diskutiert werden.

Mit einem Casy-System können Viabilitätsverluste in Zellkultursuspensionen durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Biomasse ermittelt werden. Abbildung 3.50 vergleicht die Messungen von Fraktionsproben eines repräsentativen Laufs. Graphik A gibt die Partikelgrößenverteilungen in der Ausgangssuspension zum Zeitpunkt der Kulturernte (P-0) und nach einem Auftragsvolumen von 500 ml (P-500) wieder, wodurch eventuelle zellschädigende Auswirkungen der Rührvorrichtung im Vorlagegefäß erfaßt werden. In Graphik B wird das P-500 Resultat mit einer zum gleichen Zeitpunkt entnommenen Durchlaufprobe (D-500) verglichen, um den Einfluß der System- und Fließbettpassage auf die Zellviabilität zu überprüfen.

Alle drei Fraktionsproben weisen nur geringfügige Unterschiede auf. Aus der Überlagerung der Partikelgrößenverteilungen in P-0 und P-500 läßt sich in dem Bereich

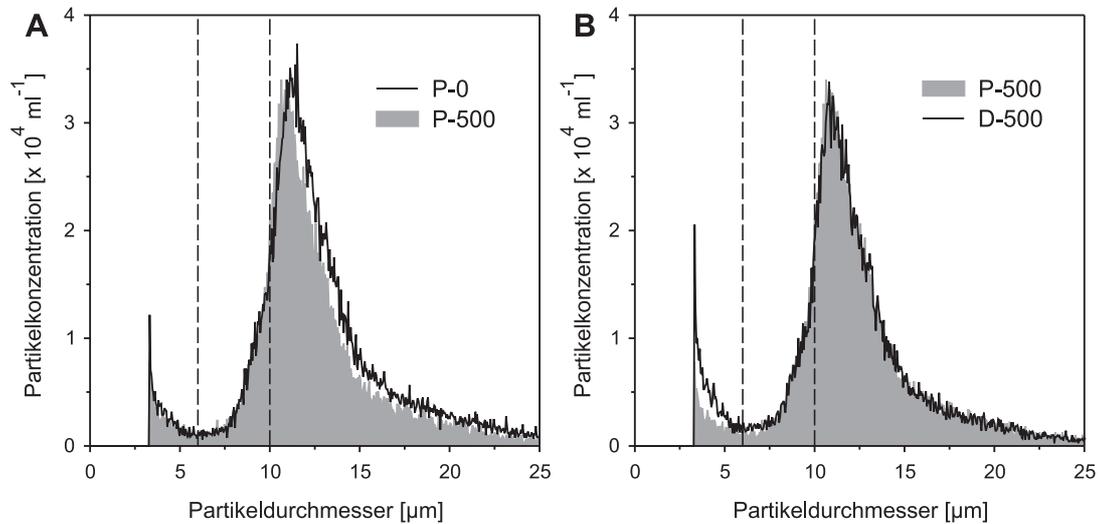


Abbildung 3.50: Einfluß der fließbettchromatographischen Aufarbeitung auf die Biomasse. Vergleich der Partikelgrößenverteilung in den Proben. A: Zellkulturerte (P-0) vs Ausgangssuspension nach 500 ml Auftragsvolumen (P-500). B: P-500 vs Durchlaufprobe nach 500 ml (D-500). (Casy-Analysen; Probenverdünnung: 1: 100; Meßvolumen: 3 x 400 μ l)

zwischen 10 und 50 μ m eine leichte Verschiebung des Spektrums zu kleineren Durchmessern erkennen. Obwohl dieser Effekt in allen Aufarbeitungsexperimenten zu beobachten war, hatte er nur einen unwesentlichen Einfluß auf die berechneten Viabilitäten, die in Abbildung 3.51 dargestellt sind. Da weder der Debris- noch der Totzellanteil anstieg, ist von keiner signifikanten Zellschädigung im Vorlagegefäß auszugehen. Es bleibt zu vermuten, daß die Verschiebung in der Lebendzellklasse auf der Zerteilung von Zellaggregaten seitens der Rührvorrichtung oder auf Sedimentationsvorgängen beruht.

Aus dem Vergleich der Ausgangsprobe P-500 mit dem Durchlauf D-500 in Graphik 3.50 B lassen sich ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede in den Konzentrationen der lebenden und toten Zellen erkennen. Die Partikelgrößenverteilungen liegen in den entsprechenden Abschnitten nahezu deckungsgleich übereinander und deuten auf keine Zellschädigung während der Passage der Chromatographieanlage hin. Auffallend ist demgegenüber jedoch der signifikante Debrisanstieg im Durchlauf, der in sämtlichen Aufarbeitungsexperimenten auftrat und unabhängig von der ursprünglichen Konzentration bzw. Viabilität der Kultur zwischen 50 und 140 % schwankte. Der erhöhte Debrisanteil läßt sich auf die im Schlauch- und Ventilsystem sowie in der expandierten Matrix entstehenden Scherkräfte zurückführen. Da die Lebend- und Totzellzahlen jedoch wie bereits erwähnt nahezu unverändert blieben, kann nur eine äußerst geringe Anzahl von Zellen von der Schädigung betroffen gewesen sein. Es ist davon auszugehen, daß in erster Linie wenige größere

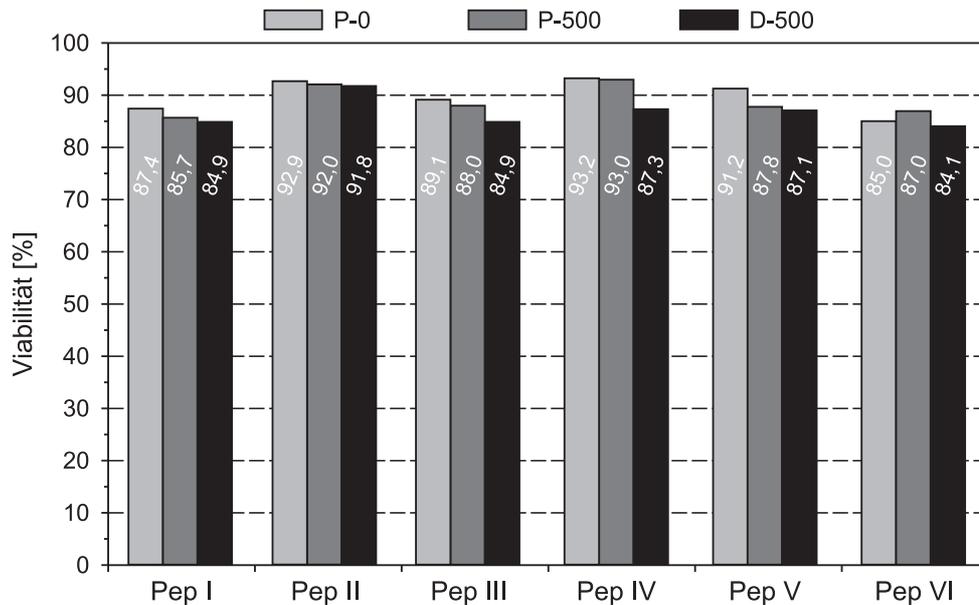


Abbildung 3.51: Einfluß der fließbettchromatographischen Aufarbeitung auf die Zellviabilität. Vergleich der Viabilität in der Zellkulturernte (P-0), im Vorlagegefäß nach einem Auftragsvolumen von 500 ml (P-500) und im Durchlauf (D-500). (Berechnungen aus Casy-Analysen; Probenverdünnung: 1: 100; Meßvolumen: 3 x 400 μ l)

Partikel in zahlreiche kleinere Bruchstücke zerteilt worden sind, die sich dann in einer stark erhöhten Gesamtanzahl niederschlagen.

Ein ähnliches Bild ergibt sich auch aus den auf Basis der Casy-Messungen berechneten Viabilitäten, die in Abbildung 3.51 dargestellt sind. Der Anteil lebender Zellen an der Gesamtzellzahl nahm zwar in allen Fällen im Laufe der Prozessierung ab, jedoch betrug der Viabilitätsverlust niemals mehr als 6,3 %.

In zwei weiteren Analysen wurde das Ausmaß der Zellschädigung indirekt über den Konzentrationsanstieg von Zellinhaltsstoffen in der Kultursuspension bestimmt. Als Marker dienten das zytosolische Enzym LDH, das bereits bei einer geringen Verletzung der Zellmembran ins Medium gelangt, und die erst nach massiver Zerstörung der Zellen einschließlich der Kernmembranen freiwerdende DNA.

Die Lactatdehydrogenase wurde über ihre katalytische Aktivität nachgewiesen. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff PicoGreenTM. Da die Einzelexperimente zur Fließbettchromatographie für jeweils unterschiedliche Untersuchungsschwerpunkte genutzt wurden, und sich die LDH-Aktivität nur aus frischen Proben ermitteln läßt, erfolgte die entsprechende Analytik lediglich für drei der sechs Aufarbeitungsläufe. Demgegenüber konnte der DNA-Gehalt auch nachträglich anhand von eingefrorenen Aliquoten bestimmt werden, so daß eine vollständige Auswertung sämtlicher Versuche

vorliegt. Die Ergebnisse sind in Abbildungen 3.52 und 3.53 dargestellt, in denen wie in Graphik 3.51 die jeweiligen Kulturernten (P-0) mit den Ausgangssuspensionen (P-500) und Durchläufen (D-500) nach einem Auftragsvolumen von 500 ml verglichen werden. Ihnen gegenübergestellt sind die Durchschnittswerte aus Referenzmessungen, die anhand von Ultraschall behandelten P-0 Proben vorgenommen wurden und die Bedingungen nach völliger Zerstörung der Zellen widerspiegeln. Da die Zellkonzentrationen zum Zeitpunkt der Ernte fast identisch waren, wichen die Einzelmessungen der Ultraschallproben nur um bis zu 2 % von dem Durchschnittswert ab, so daß dieser zu Vergleichszwecken in guter Näherung für alle Versuche herangezogen werden konnte.

Wie aufgrund der Casy-Messungen bereits zu erwarten war, lassen auch die LDH- und DNA-Analysen keine signifikante Zellschädigung während der Prozessierung erkennen. Obwohl sich die Enzymaktivität ausgehend von der P-0 Probe in den Durchläufen mit bis zu 405 nkat/L um etwa 45 % und der Gehalt an freier DNA mit bis zu 1,37 $\mu\text{g}/\text{ml}$ um ca. 17 % erhöhte, waren die Unterschiede im Vergleich zu den Referenzmessungen bei maximaler Zellschädigung (LDH: 14.715 nkat/L, DNA: 37,57 $\mu\text{g}/\text{ml}$) nur geringfügig.

Tabelle 3.16 faßt das Ausmaß der in den drei Untersuchungsreihen nachgewiesenen Zellschädigung für die Einzelexperimente zusammen. Die Berechnungen erfolgten durch Relation der Meßdifferenzen in den Proben auf die bei maximaler Zerstörung der Zellen gegebenen Werte. Zur Ermittlung des prozentualen Viabilitätsverlusts wurde die Abnahme der Viabilität um die jeweilige Bezugsgröße P-0 bzw. P-500 als 100 %ige Zellschädigung definiert. Für die LDH- und DNA-Zunahme diente die P-0 Ultraschall Probe nach Abzug des jeweiligen P-0 Werts als Bezugsgröße, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch die bereits in der Kulturernte vorliegenden Markerkonzentrationen zu verhindern. Sämtliche Ergebnisse basieren auf Stichprobenmessungen, die durch Pipettier- und Zentrifugationsvorgänge sowie unterschiedlich lange Fristen zwischen der Aliquotentnahme und den Analysen beeinflusst worden sein könnten. Aus diesem Grund läßt die Auswertung nur eine Abschätzung der Zellschädigung zu. Negative Werte, die einen Viabilitätsanstieg während der Prozessierung anzeigen, werden in der folgenden Diskussion nicht berücksichtigt.

Obwohl die drei analytischen Meßreihen für die Einzelexperimente aus besagten Gründen keine exakt übereinstimmenden Werte liefern, läßt sich anhand der in Tabelle 3.16 zusammengefaßten Ergebnisse in keinem Versuch eine signifikante Zerstörung der Zellen erkennen. Der aus den Casy-Daten hervorgehende Viabilitätsverlust liegt über den gesamten Prozeß betrachtet zwischen 1,1 und 6,3 %.

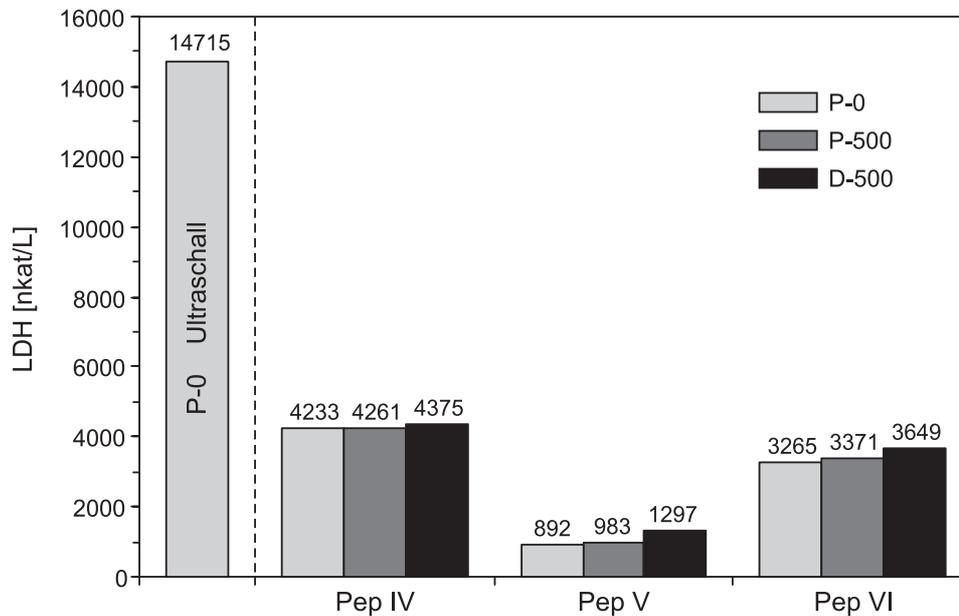


Abbildung 3.52: Abschätzung der Zellschädigung anhand des LDH-Anstiegs. Vergleich der Ausgangsproben P-0 und P-500 mit den Durchläufen D-500. P-0 Ultraschall: Durchschnittswert der P-0 Proben nach Ultraschallbehandlung.

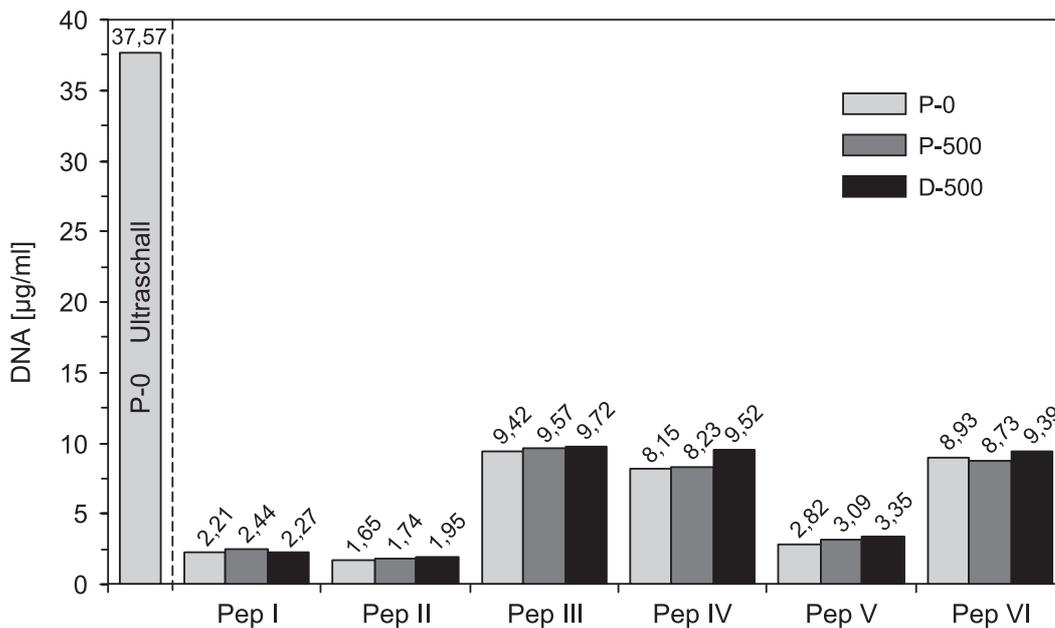


Abbildung 3.53: Abschätzung der Zellschädigung anhand des DNA-Anstiegs. Vergleich der Ausgangsproben P-0 und P-500 mit den Durchläufen D-500. P-0 Ultraschall: Durchschnittswert der P-0 Proben nach Ultraschallbehandlung.

Tabelle 3.16: Abschätzung der Zellschädigung in der Fließbettchromatographie

	Pep-EBA	I	II	III	IV	V	VI
Viabilitätsverlust [%] ¹	P-0 vs P-500	1,9	1,0	1,2	0,2	3,7	-2,4
	P-500 vs D-500	0,9	0,2	3,5	6,1	0,8	3,3
	P-0 vs D-500	2,9	1,2	4,7	6,3	4,5	1,1
LDH-Zunahme [%] ²	P-0 vs P-500	n. d.	n. d.	n. d.	0,3	0,7	0,9
	P-500 vs D-500	n. d.	n. d.	n. d.	1,1	2,3	2,5
	P-0 vs D-500	n. d.	n. d.	n. d.	1,4	2,9	3,4
DNA-Zunahme [%] ²	P-0 vs P-500	0,7	0,3	0,5	0,3	0,8	-0,7
	P-500 vs D-500	-0,5	0,6	0,5	4,4	0,8	2,3
	P-0 vs D-500	0,2	0,8	1,1	4,7	1,5	1,6

¹100 % Zellschädigung \equiv Abnahme um P-0 bzw. P-500

²100 % Zellschädigung \equiv P-0 Ultraschall - P-0

Nach Abschätzung aus den LDH- und DNA-Messungen beträgt die Zellschädigung zwischen 1,4 und 3,4 % bzw. 0,2 und 4,7 %. Vergleicht man die Ergebnisse aus der P-0 vs P-500 mit denen aus der P-500 vs D-500 Gegenüberstellung, so läßt sich allerdings anhand aller drei Bewertungskriterien tendenziell eine leicht höhere Beeinträchtigung der Zellviabilität durch die Systempassage als durch die Rührvorrichtung im Vorlagegefäß erkennen. Das Ausmaß der Zellschädigung ist jedoch mit Durchschnittswerten von 2,5 bzw. 1,6 % in beiden Fällen so gering, daß weder die Passage des GradiFracTM Systems und der StreamlineTM25 Säule noch der zur Homogenisierung frei im Vorlagegefäß an der Ansaugvorrichtung aufgehängte Magnetrührer eine signifikante Gefährdung der Stabilität des Fließbettprozesses darstellt. Aus diesem Grund kann die gesamte Apparatur prinzipiell als geeignet für eine zellschonende Aufarbeitung eingestuft werden.

Vergleichsanalysen mit den StreamlineTM Matrices SP_XL und rProtein A lieferten in den meisten Fällen ähnliche Ergebnisse, die in den jeweiligen projektassoziierten Diplomarbeiten nachgeschlagen werden können [PRIESNER, 1998; AMESKAMP, 1997]. Der Vorteil der Peptid-Affinitätschromatographie besteht allerdings darin, daß die Bindungsbedingungen bereits bei der Ligandensuche auf die späteren Gegebenheiten bei der Aufarbeitung von Zellsuspensionen abgestimmt werden können, so daß keine pH-Einstellung oder sonstige Konditionierungen der Kulturernte für

die erfolgreiche Bindung des Produkts notwendig sind. Demgegenüber stellte insbesondere die Einstellung des pH-Werts auf 4,5 für den Ionentauscher und 8,0 für das rProtein A Material ein Risiko für die stabile Prozeßführung dar. Trotz der Verwendung von stark verdünnter Säure oder Lauge wurde die Viabilität der Zellsuspension sowohl durch die Titration als auch durch die Verweilzeit unter den unphysiologischen Bedingungen teilweise stark beeinflusst. Beispielsweise neigten die Zellen bei unvorsichtiger Alkalisierung häufig zur Aggregatbildung, infolgeder die Verteilerplatten der Säule und die Ventile des GradiFracTM Systems verblockten, so daß der Probenauftrag in einigen Versuchen frühzeitig abgebrochen werden mußte. Ähnliches galt für die Ansäuerung auf pH 4,5, die zudem zu massiven Problemen durch Interaktionen der Biomasse mit der Matrix führten, die im nächsten Abschnitt detaillierter diskutiert werden. Des weiteren stieg die Anzahl toter Zellen im Vorlagegefäß für beide Aufarbeitungsmethoden infolge des unphysiologischen pH-Werts teilweise relativ stark an, was auf keines der Experimente zur Peptid-Affinitätschromatographie zutraf.

Der allgemeine Vorteil der Fließbettchromatographie gegenüber herkömmlichen Klärungsverfahren wie der Zentrifugation oder der Mikrofiltration ist, daß die Biomasseabreicherung und Isolation des Produkts in einem einschrittigen Prozeß erfolgen, und keine längeren Lagerzeiten oder dazwischenliegende Aufarbeitungsschritte wie die Ankonzentrierung durch Ultrafiltration bestehen. Aufgrund der sofortigen Trennung von freiwerdenden Zellinhaltsstoffen und sonstigen Kontaminationen im Medium kann davon ausgegangen werden, daß die Produktstabilität selbst im Fall von massiveren Zellschädigungen nicht gefährdet wird.

3.4.5 Biomasse/Matrix Interaktionen

Mit der Entwicklung der Peptid-Affinitätsmatrix für den Einsatz in der Fließbettchromatographie wurden insgesamt drei Ziele verfolgt. Neben einer für Affinitätsmaterialien charakteristischen Produktselektivität und einer gleichzeitig wesentlich höheren Ligandenstabilität sollte das neuartige Adsorbergel keine Interaktionen mit der Biomasse eingehen, wodurch nachhaltige Probleme bei der Prozeßführung entstehen hätten können.

Die Rückhaltung der Biomasse tritt insbesondere bei der Verwendung von gruppenspezifisch bindenden Liganden wie den Ionenaustauschern auf und führt häufig zu massiven Leistungseinbußen hinsichtlich der Partikelabreicherung und der Produktausbeute. Je nach Zielmolekül müssen die Bindungsparameter teilweise auf sehr unphysiologische Bedingungen eingestellt werden, wodurch auch die physikochemischen Eigenschaften der Biomasse hinsichtlich ihrer Nettoladung und ihres

Adhäsionsverhaltens beeinflusst werden. In ungünstigen Fällen hat dies eine mehr oder minder ausgeprägte Rückhaltung von Zellen und Zelldebris an der Matrix zur Folge, die das Fluidisierungsverhalten verändert und die Stabilität der Expansion sowie des gesamten Aufarbeitungslaufs gefährdet.

Wie bereits aus den in Abschnitt 3.4.5 zusammengefaßten Ergebnissen zur Biomasseanreicherung deutlich wird, konnte mit dem Kationenaustauscher SP_XL keine zufriedenstellende Klärung erzielt werden. Neben kleineren Partikeln wies das Produktkonzentrat sogar noch vollständig intakte Zellen auf, was auf eine Rückhaltung der Biomasse während der Probenapplikation und eine nachfolgende Ablösung in der Elution schließen läßt. Wenn selbst im Waschschrift nicht alle Partikel aus der Säule ausgespült werden können, muß die Elution aufgrund des Verblockungsrisikos zudem im expandierten Modus erfolgen, wodurch das Elutionsvolumen auf Kosten der Ankonzentrierung des Zielproteins erhöht wird. Dahingegen konnte sowohl mit dem rProtein A Adsorbens als auch mit der Peptidmatrix im gepackten Gelbett eluiert und ein akzeptabler Klärungserfolg erreicht werden.

Das Auftreten von Biomasseadsorptionen läßt sich anhand verschiedener Kriterien feststellen und beurteilen. Neben der makroskopischen Beobachtung von Kanalbildungen und Veränderungen der Matrixfluidisierung wurde die Retention in der vorliegenden Arbeit durch gezielte Untersuchungen des Partikeldurchbruchs während des Probenauftrags sowie durch den Vergleich der Expansionsprofile vor und nach einem EBA-Lauf erfaßt. Tabelle 3.17 faßt zunächst die äußerlich erkennbaren Auswirkungen der Biomassebelastung auf das Fluidisierungsverhalten der drei

Tabelle 3.17: Makroskopische Beobachtungen des Fluidisierungsverhaltens

	SP_XL	rProtein A	Peptid
<i>Kanalbildung</i> ^{1,2}	+ (++)	- (-)	- (-)
<i>Matrixaggregation</i> ^{1,2}	+ (++)	- (-)	- (-)
H_0	15,4 cm	15,3 cm	14,3 cm
<i>H Equilibrierung</i>	38,5 cm	40,0 cm	35,8 cm
<i>H Probenauftrag</i>	↗ 62 - 70 cm	41,3 cm	37,2 cm
<i>H/H₀ Equilibrierung</i>	2,5	2,6	2,5
<i>H/H₀ Probenauftrag</i>	↗ 4 - 4,5	2,7	2,6

¹während des Probenauftrags; in Klammern: während der Elution

²Skala: -, +, ++: keine, geringfügig, stark

verwendeten Fließbettmatrices zusammen. Alle berücksichtigten Versuche fanden unter vergleichbaren Betriebsparametern mit einer Matrixschüttung zwischen 70 und 75 ml statt. Die Fließgeschwindigkeit betrug 300 cm/h und wurde für die Elution, die in allen Fällen im expandierten Modus erfolgte, auf 100 cm/h herabgesetzt. Der Säulenadapter wurde jeweils auf einer Höhe von etwa 2 cm oberhalb der fluidisierten Matrix arretiert.

Während die Expansion der rProtein A und der Peptidmatrix durch den Auftrag der Zellsuspension kaum beeinflusst wurde, traten bei der Aufarbeitung mit dem Ionenaustauscher deutliche Veränderungen auf. Bereits zu Beginn der Probenapplikation ließen sich häufig leichte Kanalbildungen und Matrixaggregationen erkennen, die sich im weiteren Verlauf leicht verstärkten und auch im Waschschrift nicht wieder auflösten. Gleichzeitig stieg die Expansionshöhe während der Beladung von ursprünglich 38,5 cm auf bis zu 70 cm an, so daß sich der Expansionsgrad nahezu verdoppelte, und die Adapterhöhe immer wieder neu angepaßt werden mußte.

Vergleichbare Phänomene traten bei den anderen beiden Matrices nicht auf. Hier nahm die Höhe des fluidisierten Gels mit dem Wechsel auf die Kultursuspension lediglich um etwa 1,5 cm zu und blieb dann konstant. Dieser leichte Anstieg des Expansionsgrads läßt sich allerdings nicht auf eine etwaige Biomassebindung zurückführen, sondern vielmehr mit dem Dichteunterschied der Flüssigphasen erklären. Kanalbildungen und Matrixaggregationen waren bei den Affinitätsadsorbentien selbst zum Zeitpunkt der Elution nicht erkennbar, obwohl durch die verwendeten Puffer sehr unphysiologische Bedingungen entstanden. Es ist davon auszugehen, daß die Anwesenheit von zellulären Rückständen unter diesen Voraussetzungen zumindest im Fall der Peptidmatrix (pH 2,7, kein Salzzusatz) deutlich sichtbare Effekte im Fluidisierungsverhalten hervorgerufen hätte.

Demgegenüber hatte bei dem Ionenaustauscher SP_XL der Wechsel auf das Elutionsmittel (20 mM Acetat, 1 M NaCl, pH 4,5) noch gravierendere Auswirkungen als die Beladung mit der Kultursuspension. Einerseits löste sich ein Teil der zurückgehaltenen Biomasse wieder von der Matrix, was zu den in Kapitel 3.4.5 diskutierten Kontaminationen des Produktkonzentrats führte. Andererseits trat teilweise eine so starke Matrixverklebung auf, daß das Gel an einigen Stellen gar nicht mehr durchströmt wurde, und die Zugänglichkeit der gebundenen Zielmoleküle für den Elutionspuffer stark eingeschränkt war. Infolgedessen kam es in den meisten Versuchen zu relativ hohen Produktverlusten, die sich bei der Bilanzierung in entsprechend niedrigen Wiederfindungsraten und Ausbeuten niederschlugen (s. Abschnitt 3.4.2.1).

Bei der Biomasserückhaltung am SP_XL Material handelt es sich vermutlich um einen Absättigungsprozeß. Diese Annahme beruht auf der Tatsache, daß die Expansionshöhe während der Beladung zwar stark anstieg, sich jedoch nach einiger Zeit an einen gewissen Wert annäherte und dann nahezu stagnierte. Nach der Biomasseadsorption scheint sich innerhalb der expandierten Matrix ein neues Gleichgewicht der abgesättigten Gelpartikel einzustellen, die durch die anhaftenden Zellen und Zellbruchstücke ein geringeres spezifisches Gewicht haben und entsprechend höher aufgeschwemmt werden. In den zugrundeliegenden Versuchen erreichte die Expansion nach einem Probenauftrag von etwa 1000 bis 1200 ml Kultursuspension wieder einen stabilen Gleichgewichtszustand.

Die Annahme, daß es sich bei der Biomasserückhaltung um eine kontinuierliche Absättigung des SP_XL Materials handelte, konnte durch die Untersuchung des Partikeldurchbruchs während der Beladung bestätigt werden. Abbildung 3.54 gibt das Durchbruchverhalten anhand der Casy-Messungen von regelmäßig entnommenen Durchlaufproben wieder und vergleicht das Ergebnis mit den entsprechenden Resultaten aus der Peptid-Affinitätschromatographie. Aufgrund der besseren Übersichtlichkeit wurden die Originaldaten der Casy-Analysen durch eine überlappende Mittelwertbildung über jeweils zehn aufeinanderfolgende Meßkanäle geglättet.

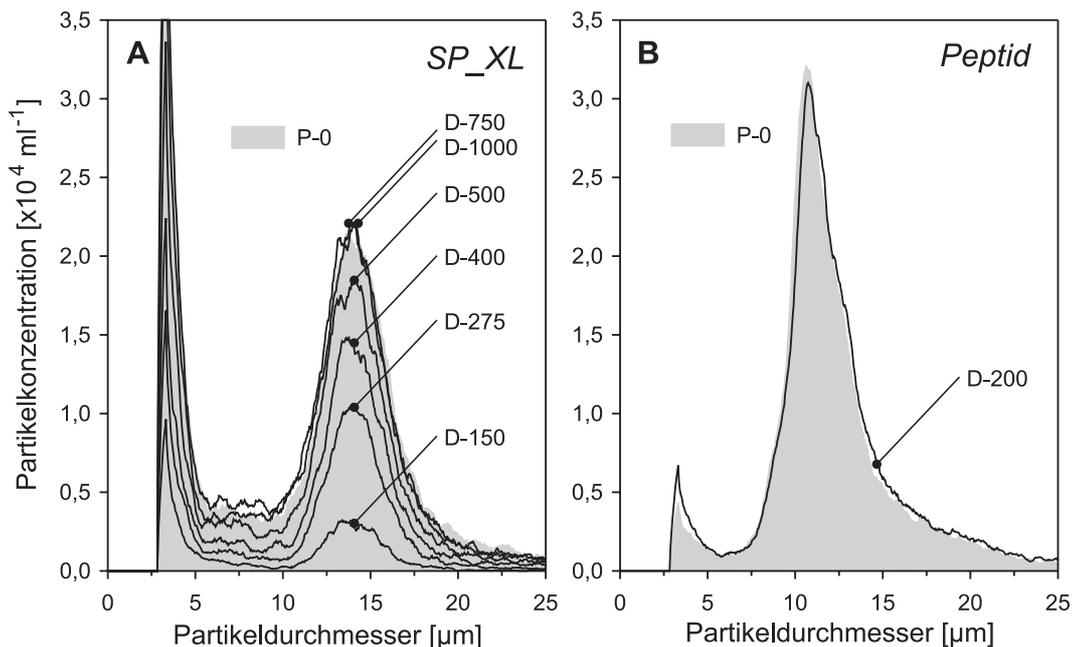


Abbildung 3.54: Partikelrückhaltung während der Biomassepassage. Durchbruch der Biomasse in Abhängigkeit vom Auftragsvolumen. A: SP_XL; B: Peptidmatrix.

In dem Versuch mit dem Kationenaustauscher (A) steigt die Partikelkonzentration im Durchlauf nur langsam an und erreicht erst nach 750 ml die Werte der Ausgangssuspension, die sich dann im weiteren Verlauf nicht mehr wesentlich verändern. Unter Berücksichtigung der Größenklassierung nach Glauner sind sowohl die Zellbruchstücke als auch die Zellkerne und lebenden Zellen von der Rückhaltung im gleichen Ausmaß betroffen. Das bedeutet, daß jegliche Form der Biomasse mit der Matrix interagiert und die Fluidisierung beeinflusst. Demgegenüber liegt für die Peptidmatrix (B) bereits nach einem Auftragsvolumen von 200 ml ein vollständiger Durchbruch der Biomasse vor. Dies entsprach in etwa dem Zeitpunkt, an dem auch das durch die Proteine und den Phenolrot-Zusatz im Medium hervorgerufene UV-Signal bei 280 nm sein Maximum erreichte, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Biomasse die Säule ungehindert und ohne Wechselwirkungen mit dem Chromatographiematerial passiert hat. Da die Experimente mit rProtein A zu den gleichen Resultaten führten (Daten nicht dargestellt), läßt sich auch in Bezug auf die Biomasse/Matrix-Interaktionen eine große Ähnlichkeit der Peptidmatrix mit der herkömmlichen Affinitätsadsorbens feststellen.

Abschließend wurden die Auswirkungen der Biomassepassage auf das Expansionsverhalten der EBA-Matrices anhand der Aufnahme von Expansionsprofilen charakterisiert. Abbildung 3.55 stellt die Profile vor und nach einem Aufarbeitungslauf sowie nach der Regeneration der Materialien einander gegenüber. Tabelle 3.18 gibt die aus den in Abschnitt 1.3.1.4 beschriebenen Zusammenhängen ermittelten Expansionskoeffizienten n und terminalen Fallgeschwindigkeiten u_t der Matrices wieder. Auf eine Abbildung der dazugehörigen Richardson-Zaki Diagramme wird in diesem Fall verzichtet.

Die Versuchsreihen wurden mit einer konstanten Adaptereinstellung von 90 cm durchgeführt, so daß die Druckverhältnisse und Strömungsbedingungen in der Säule etwas vom Realsystem in den Aufarbeitungsexperimenten abwichen, und sich leichte Unterschiede im Expansionsgrad H/H_0 erklären lassen. Die CIP-Prozeduren und verwendeten Regenerationslösungen sind in Tabelle 3.19 auf Seite 187 zusammengefaßt.

Aus der Graphik wird sichtbar, daß das SP_XL Material nach Beendigung des Aufarbeitungslaufs ein stark verändertes Expansionsprofil aufweist, während die Fluidisierungscharakteristik der rProtein A und der Peptidmatrix durch die Passage der Zellsuspension kaum beeinflusst wurde. Das bedeutet, daß der Kationenaustauscher trotz der bereits in der Elution abgelösten Partikel nach wie vor durch zurückgehaltene Biomasse belastet sein mußte. Erst nach der Regeneration war die Expansion des gebrauchten Gels wieder mit der im Ausgangszustand vergleichbar.

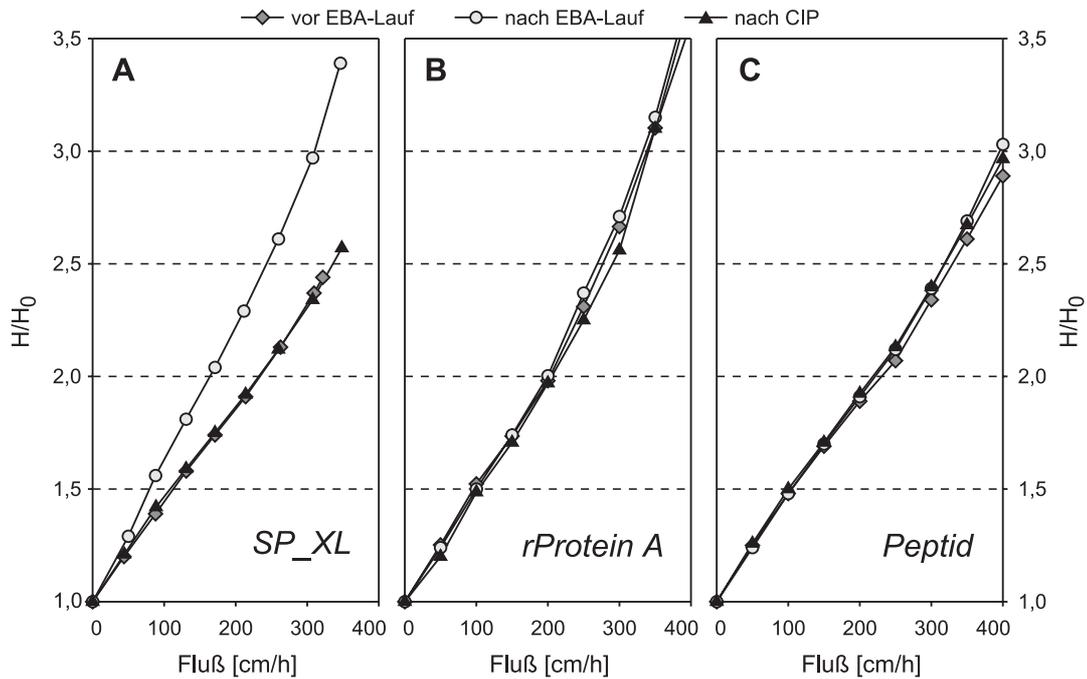


Abbildung 3.55: Einfluß der Biomassepassage auf das Expansionsverhalten der EBA-Matrizes. Abhängigkeit des Expansionsgrads H/H_0 von der Fließgeschwindigkeit. Vergleich der Expansionsprofile vor und nach einem EBA-Lauf sowie nach der Regeneration der Matrizes. A: SP_XL; B: rProtein A; C: Peptidmatrix (Adapterhöhe: 90 cm)

Ähnliche Ergebnisse liefern die in Tabelle 3.18 zusammengefaßten Berechnungen der Richardson-Zaki-Parameter n und u_t . Der Einfluß der Biomassepassage auf das Fluidisierungsverhalten wird durch die Gegenüberstellung der terminalen Fallgeschwindigkeiten u_t der Matrixpartikel besonders deutlich. Während die Abweichung von u_t nach dem EBA-Lauf und nach der CIP-Prozedur im Vergleich zu den Ausgangswerten für das rProtein A und die Peptidmatrix in allen Fällen unter 10 % liegt, zeigt sich bei dem Ionenaustauscher eine signifikante Abnahme um 34,5 % von ursprünglich 1318 auf 863 cm/h. Erst nach der Regeneration erreichte die terminale Fallgeschwindigkeit mit 1384 cm/h wieder in etwa den Wert des unbenutzten Gels.

Die Abweichungen von bis zu 10 % bei den Affinitätsmatrices lassen sich weitgehend mit Meßgenauigkeiten begründen. Jedoch können auch hier nach einem EBA-Lauf tendenziell eher verringerte als erhöhte u_t -Werte festgestellt werden. Dieser Effekt hängt vermutlich mit den Proteinrückständen zusammen, die während oder nach der Elution auf der Matrix denaturiert oder ausgefallen sein könnten und somit einen gewissen Einfluß auf das Expansionsverhalten der Partikel hat-

Tabelle 3.18: Experimentell aus den Richardson-Zaki-Diagrammen ermittelte Werte der Expansionsindices n und terminalen Fallgeschwindigkeiten u_t der Fließbettmatrices

		n [-]	u_t [cm/h]	Δu_t [%] ¹
SP_XL	<i>vor EBA-Lauf</i>	5,12	1318	
	<i>nach EBA-Lauf</i>	4,79	863	34,5
	<i>nach CIP</i>	5,29	1384	5,0
rProtein A	<i>vor EBA-Lauf</i>	4,81	943	
	<i>nach EBA-Lauf</i>	4,66	893	5,3
	<i>nach CIP</i>	4,52	900	4,6
Peptid	<i>vor EBA-Lauf</i>	5,00	1305	
	<i>nach EBA-Lauf</i>	4,82	1188	9,0
	<i>nach CIP</i>	4,89	1243	4,8

¹Prozentuale Abweichung von dem Wert vor dem EBA-Lauf

ten. Außerdem weist die rProtein A Matrix mit einem Ausgangswert von 943 cm/h insgesamt eine niedrigere terminale Fallgeschwindigkeit auf. Dies läßt sich jedoch auf die unterschiedlichen Eigenschaften der Basalmaterialien zurückführen, die für die beiden anderen Matrices wiederum identisch waren.

Wie aus Tabelle 3.19 ersichtlich ist, gestaltete sich die CIP-Prozedur für den Ionenaustauscher aufgrund der massiven Kontaminationen als äußerst langwierig und kompliziert. Die im Laufe der Elution und zu Beginn des ersten Regenerationschritts gebildeten Aggregate aus Biomasse und Matrixpartikeln lösten sich nur sehr langsam auf. Somit war der Vorteil von Ionentauschern, die sich aufgrund ihrer kleinen, stabilen Liganden im allgemeinen durch eine einfache und schnelle Regenerierbarkeit mit konzentrierten Salzlösungen und Natronlauge auszeichnen, für den Einsatz in der Fließbettchromatographie nicht gegeben.

Während das SP_XL Material zur Aufrechterhaltung reproduzierbarer Bedingungen nach jedem Aufarbeitungslauf gereinigt werden mußte, hätten die Affinitätsmatrices auch direkt im Anschluß an die Elution reequilibriert und erneut benutzt werden können. Zum Schutz vor einem mikrobiellen Befall und zur vollständigen Beseitigung von Proteinrückständen oder sonstigen mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht nachweisbaren Kontaminationen wurde auf eine dazwischengeschaltete CIP-Prozedur jedoch in den meisten Fällen nicht verzichtet. Wie aus Tabelle 3.19 hervorgeht, war die rProtein A Regeneration dabei mit einem we-

Tabelle 3.19: Regeneration der Fließbettmatrices

Matrix	Lösung	Fluß	Kontaktzeit
SP_XL	1. 0,5 M NaOH, 1M NaCl	30 cm/h	240 min
	2. Milli-Q Reinstwasser	100 cm/h	90 min
	3. 30 % Isopropanol	100 cm/h	60 min
	4. 25 % Essigsäure	100 cm/h	60 min
	5. Equilibrierungspuffer	300 cm/h	30 min
rProtein A	1. 20 % Ethanol, 2 M NaCl, 1 mM NaOH	100 cm/h	120 min
	2. 20 mM Na-Phosphat, pH 7, 0,1 M NaCl, 20 mM EDTA, 5 % Sarcosyl ¹	100 cm/h	90 min ²
	3. 20 % Ethanol, 50 mM Acetat	300 cm/h	20 min
	4. Equilibrierungspuffer	300 cm/h	30 min
Peptid	1. 0,5 M NaOH	50 cm/h	120 min
	2. Equilibrierungspuffer	300 cm/h	20 min

¹schwach anionisches Detergens

²Spülen mit 3fachem Gelvolumen, 90 min einwirken lassen

sentlich höheren Aufwand verbunden, da die Sensibilität der Proteinliganden gegenüber Denaturierungsprozessen die Auswahl der verwendbaren Lösungen stark einschränkte [HALE ET AL., 1994].

Die Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt, daß mit der Entwicklung des Peptidliganden ein Chromatographiematerial geschaffen wurde, das wie herkömmliche Affinitätsmatrices nicht mit der Biomasse interagiert. Das Gel zeichnet sich zudem durch seine unkomplizierte Regenerierbarkeit aus, die es aufgrund der hohen Ligandenstabilität einerseits und der hochselektiven Adhäsionseigenschaften andererseits sowohl gegenüber dem rProtein A als auch dem Ionenaustauscher zur vorteilhaftesten Fließbettmatrix für die Aufreinigung des Anti-FVIII Antikörpers machen.

3.4.6 Zusammenfassung

In den Experimenten zur Fließbettadsorption bewies die EBA-Peptidmatrix eine für die Affinitätschromatographie charakteristische Prozeßleistung. In insgesamt sieben Aufarbeitungsläufen wurden jeweils 810 bis 1800 ml Kultursuspension in-

nerhalb von 90 bis 120 Minuten erfolgreich prozessiert. Mit einer hohen Reproduzierbarkeit und ausgezeichneten Bindungs- und Wiederfindungsraten konnten in allen Versuchen Produktausbeuten von 96 bis 98 % erreicht werden. Die einzige Ausnahme bildete eine Aufreinigung, bei der die Elution im Fließbettmodus stattfand, was prinzipiell jedoch nicht erforderlich war.

Bezüglich der Fremdproteinanreicherung wies die Peptidmatrix die gleichen selektiven Bindungseigenschaften auf wie das kommerziell erhältliche rProtein A Gel. Im Gegensatz zu dem Kationenaustauscher SP_XL ließen sich in den Eluat der Affinitätsmedien mittels SDS-PAGE Analysen keine verbliebenen Kontaminationen nachweisen. Gleiches galt, wie aus der Festbettchromatographie zu erwarten war, für die Gesamtabreicherung der DNA, die in Abhängigkeit von der jeweiligen Ausgangsmenge mit dem gewählten Nachweissystem zwischen 99,91 und 99,99 % lag.

Die Untersuchungen zum Klärungserfolg der Methode zeigten ebenfalls eine hervorragende Übereinstimmung mit den Resultaten aus Referenzläufen mit der rProtein A Matrix. In den meisten Fällen konnte eine Abreicherung der Zellbestandteile von mehr als 99 % erreicht werden. Bei den im Eluat nachgewiesenen Partikeln handelte es sich in erster Linie um Debris, dessen Durchmesser kleiner als 6 μm war. Bezogen auf das vorhandene Biomassevolumen lag die Gesamtabreicherung mit einem Anteil von weniger als 18 nl/ml im Produktkonzentrat in allen Läufen bei mehr als 99,6 %. Somit hätten die Eluate problemlos ohne einen weiteren Klärungsschritt auf gepackte Chromatographiematrices mittlerer Korngröße wie die SepharoseTM FF (d = 100 μm) aufgetragen werden können.

Wie bereits frühere Versuche mit den StreamlineTM Medien SP_XL und rProtein A vermuten ließen, traten auch in der Fließbettadsorption mit der Peptidmatrix keine signifikanten prozeß- und apparaturbedingten Zellschädigungen auf [LÜTKEMEYER ET AL., 1999]. Der Anstieg des Totzelliters wurde in Abhängigkeit von der analytischen Methode mit maximal 6,3 % beziffert. Der Vorteil der Peptidmatrix gegenüber den beiden anderen Materialien bestand jedoch darin, daß aufgrund der Möglichkeit, die Prozeßparameter bereits in den Bindungsstudien mit den Peptidbibliotheken auf die späteren Aufarbeitungsbedingungen abzustimmen, keine vorausgehende Konditionierung der Ausgangssuspensionen notwendig war. Die unphysiologischen pH-Werte führten dort häufig zu massiven Einbußen der Kulturviabilität sowie zu Zellaggregationen, die aufgrund von Verblockungsercheinungen einen frühzeitigen Abbruch des Probenauftrags erforderlich machten. In der Fließbettadsorption mit der Peptidmatrix konnten wie bei dem rProtein A Gel keine Biomasse/Matrix Interaktionen nachgewiesen werden, die die Prozeßführung wie im Fall des Ionenaustauschers erheblich erschwert hätten. Somit ließ

sich die Elution im Festbettmodus durchführen, wodurch unter anderem erheblich höhere Konzentrierungsfaktoren erreicht wurden. Zudem bereitete die Regeneration keine Probleme durch verbliebene Biomasse, die sich bei dem SP_XL Material nur durch eine sehr material- und zeitaufwendige CIP-Prozedur entfernen ließen. Da die Peptidmatrix keinerlei Zelladhäsionseigenschaften aufwies und sich gleichzeitig durch eine hohe Stabilität auszeichnete, konnte sie in einem kostengünstigen und schnellen Verfahren mit 0,5 molarer Natronlauge gereinigt werden. Dadurch hatte sie selbst gegenüber dem rProtein A Gel einen Vorteil, da dessen Regeneration aufgrund der Sensibilität der Liganden gegenüber Denaturierungsprozessen mit physiologischeren Lösungen erfolgen mußte, und die CIP-Methode sich infolgedessen wesentlich komplizierter gestaltete.

Kapitel 4

Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Verfahren zur Herstellung einer spezifischen Peptid-Affinitätsmatrix für die fließbettchromatographische Aufreinigung eines extrazellulären Proteins aus Säugetierzellkulturen entwickelt. Durch die Auswahl universell einsetzbarer Techniken gelang es, eine auf beliebige Produkte der Zellkulturtechnik übertragbare Vorgehensweise zu etablieren.

Mit dem geschaffenen Chromatographiematerial konnte ein erfolgreicher Fließbettprozeß verwirklicht werden, der sich durch eine hervorragende Reproduzierbarkeit und eine minimale Störanfälligkeit auszeichnete. Die Peptidliganden erwiesen sich als äußerst stabil, so daß die Regeneration keine Schwierigkeiten bereitete, und mit langen Standzeiten zu rechnen war. Gleichzeitig sicherte die hohe Bindungsselektivität und -spezifität einen hervorragende Reinigungs- und Klärungserfolg.

Die Ausarbeitung der einzelnen Methoden erfolgte exemplarisch anhand eines Modellproteins, bei dem es sich um einen aus Maus/Maus Hybridomkulturen gewonnenen monoklonalen Antikörper (Anti-FVIII) handelte. Die zugrundeliegenden Studien gliederten sich in vier aufeinander aufbauende Einzelschritte.

Als erstes wurde mit einem geeigneten Verfahren eine hochaffine Peptidsequenz für die Bindung des Zielmoleküls ermittelt. Danach erfolgte die Entwicklung einer optimalen Strategie für die Ligandenfixierung an das Chromatographiematerial. Dazu wurden kleine 1 ml Festbettsäulen vom Typ HiTrapTM eingesetzt, anhand derer im dritten Arbeitsschritt die verschiedenen Kupplungsmethoden und die daraus hervorgegangenen Peptidmatrices miteinander verglichen und charakterisiert werden konnten. Abschließend wurde das erfolgreichste Verfahren für die Anfertigung einer Fließbettmatrix übernommen, deren Leistung dann durch ausführliche Untersuchungen und durch den Vergleich mit den kommerziell erhältlichen Fließbettmedien StreamlineTM SP_XL und rProtein A getestet und beurteilt wurde.

Die Selektionierung des Peptidliganden erfolgte mit kombinatorischen gerasterten Teilbibliotheken aus linearen Hexapeptiden, die mittels Spot-Synthese auf Cellulosemembranen hergestellt wurden. Durch den Einsatz einer dualen Suchstrategie (XX12XX; X1CD2X; 1BCDE2) mit X-Positionen, die sich aus allen proteinogenen Aminosäuren zusammensetzten, gelang es, in nur drei Selektionszyklen eine hochaffine Sequenz für die Bindung des monoklonalen Antikörpers zu ermitteln. Die Strategie war prinzipiell für jedes beliebige Zielprotein einsetzbar und berücksichtigte alle 64 Mio. Hexapeptidvarianten.

Nach der Ermittlung des Affinitätsliganden wurden drei verschiedene Kupplungsmethoden für dessen Fixierung an das Chromatographiematerial entwickelt. Durch spezielle Modifikationen der Basalträger und der Peptidsequenz konnte der Ligand in der gleichen Ausrichtung wie auf den Spotmembranen an der NHS-aktivierten SepharoseTM verknüpft werden, was eine optimale Zugänglichkeit in der Chromatographie gewährleistete. Die unterschiedlichen Methoden gaben einen Einblick in die vielfältigen Möglichkeiten, durch gezielte Schutzgruppenstrategien und Aktivierungsmechanismen für jede Peptidsequenz ein geeignetes Verfahren für eine orientierte Kupplung an einem festen Träger zu realisieren. Dadurch war die Übertragbarkeit auf andere Zielproteine bzw. deren spezifische Liganden auch für den eigentlichen Anfertigungsprozeß gesichert. Eine besonders universell einsetzbare Methode stellte die direkte Synthese des Peptids an das Chromatographiematerial dar, da Fehlkupplungen hier gänzlich ausgeschlossen werden konnten, und eine vorausgehende Reinigung aufgrund der durch die Kürze und den einfachen linearen Aufbau der Sequenz nur geringen Anzahl an fehlerhaften Syntheseprodukten nicht erforderlich war.

Die nachfolgenden Studien in der Festbettchromatographie zeigten, daß sich alle entwickelten C-terminalen Kupplungsstrategien einschließlich der daraus resultierenden Sequenzvarianten zur Herstellung einer funktionstüchtigen Peptid-Affinitätsmatrix eigneten. Die verschiedenen 1 ml HiTrapTM Säulen wiesen keine signifikanten Unterschiede in ihrer chromatographischen Leistung auf, so daß zur Herstellung der Fließbettmatrix die universell einsetzbare und bezüglich des Zeit- und Materialaufwands gut zu kalkulierende direkte Synthese des Peptids an das Chromatographiematerial gewählt wurde.

In sämtlichen Aufarbeitungsläufen in der Festbettchromatographie lagen die Bindungs- und Wiederfindungsraten für den monoklonalen Antikörper zwischen 97 und 100 % und die Produktausbeuten bei über 96 %. Somit war die wichtigste Voraussetzung gegeben, daß das Zielprotein trotz der in Relation zu den Bindungstests mit den Cellulosemembranen stark verkürzten Kontaktzeiten auch in

der Chromatographie erfolgreich an den Peptidliganden zurückgehalten wurde. Die Peptidmatrices bewiesen eine für affinitätschromatographische Prozesse charakteristische Selektivität, was zu einem entsprechend hohen Reinheitsgrad der Produkteluatete führte. In SDS-PAGE Analysen konnten keine kontaminierenden Fremdproteine nachgewiesen werden. Das gleiche galt für die Abreicherung der DNA, die unter Berücksichtigung des Detektionslimits des eingesetzten Testverfahrens von 10 ng/ml in allen Fällen mehr als 99,994 % betrug.

Experimente mit vier produktfremden Antikörpern zeigten, daß der Peptidligand eine ausschließliche Bindungsspezifität gegenüber dem Anti-FVIII Immunglobulin aufwies, und die Bindungsstelle demnach nicht in der für die gesamte IgG-Klasse konstanten F_c -Region sondern in der variablen F_{ab} -Einheit des Zielantikörpers liegen mußte.

In Regenerations- und Standzeittests zeichneten sich die Peptidmatrices durch eine äußerst hohe Stabilität aus, die mit der gruppenspezifischer Chromatographiematerialien wie den Ionenaustauschern vergleichbar war. Daher konnten die Säulen in einem einfachen CIP-Prozeß mit 0,5 molarer Natronlauge regeneriert werden.

Die dynamische Bindungskapazität betrug für alle C-terminal gekuppelten Materialien bei 300 cm/h durchschnittlich etwa 26,5 mg/ml Gel und ließ sich durch Verringerung der Fließgeschwindigkeit noch weiter erhöhen. Eine Referenzstudie mit einer revers gekuppelten Peptidmatrix ergab, daß die Ligandenausrichtung einen entscheidenden Einfluß auf das Bindungsvermögen hatte, da die Bindungskapazität hier mit 6,9 mg/ml Gel um etwa 75 % niedriger lag als bei den C-terminal verknüpften Materialien.

In den Untersuchungen zum Durchbruchverhalten einer mit der Fließbettmatrix befüllten 1 ml Testsäule stellte sich jedoch heraus, daß die Kapazität der EBA-Matrix mit maximal 2,6 mg/ml Gel nur etwa einem Zehntel des Bindungsvermögens der HiTrapTM Säulen entsprach. Die Ursachen wurden in einen Zusammenhang mit dem wesentlich schlechteren Verweilzeitverhalten des grobkörnigen Prototypmaterials gebracht, womit sich die Signifikanz der Abweichungen jedoch nur teilweise erklären ließ.

Trotz der verhältnismäßig geringen Bindungskapazität konnten in den Experimenten zur Fließbettadsorption mit einer Matrixschüttung von 70 ml bis zu 1800 ml Kultursuspension innerhalb von 90 bis 120 Minuten erfolgreich prozessiert werden. Die EBA-Peptidmatrix bewies dabei eine für die Affinitätschromatographie charakteristische Prozeßleistung. In allen Versuchen lag die Produktausbeute mit einer hohen Reproduzierbarkeit zwischen 96 und 98 %.

Der Vergleich mit den herkömmlichen Fließbettmedien zeigte, daß die Peptid-

Affinitätsmatrix sowohl bezüglich der Abreicherung von Kontaminationen wie DNA und Fremdproteinen als auch hinsichtlich der Biomasse/Matrix Interaktionen die gleichen selektiven Bindungseigenschaften wie das kommerziell erhältliche rProtein A Gel aufwies. In allen Fällen konnte mit einem Biomasseanteil von weniger als 18 ng/ml im Produktkonzentrat ein Klärungserfolg von mehr als 99,6 % erreicht werden.

In der Fließbettadsorption mit der Peptidmatrix traten keine signifikanten prozeß- und apparaturbedingten Zellschädigungen auf. Der Anstieg des Totzelltiters betrug in Abhängigkeit von der analytischen Methode lediglich maximal 6,3 %. Der Vorteil bestand darin, daß für die Arbeit mit der Peptidmatrix keine vorausgehende Konditionierung der Ausgangssuspensionen notwendig war, die bei dem Ionenaustauscher und dem rProtein A Gel in einigen Fällen zu massiven Einbußen der Kulturviabilität sowie zu Zellaggregationen führte, die aufgrund von Verblockungserscheinungen einen frühzeitigen Abbruch des Probenauftrags erforderlich machten.

Da mit der Peptidmatrix keine Biomasse/Matrix Interaktionen auftraten, die die Prozeßführung wie im Fall des Ionenaustauschers erheblich erschwert hätten, und die Peptidliganden zudem eine sehr hohe Stabilität aufwiesen, konnte die Säule in einem kostengünstigen und schnellen Verfahren mit 0,5 molarer Natronlauge gereinigt werden. Aus diesem Grund hatte sie selbst gegenüber dem rProtein A Gel einen Vorteil, da sich dessen Regeneration aufgrund der Sensibilität der Liganden gegenüber Denaturierungsprozessen wesentlich komplizierter gestaltete.

In der abschließenden Beurteilung kann der Einsatz der Peptid-Affinitätsmatrix für die Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers in der Fließbettadsorption als eine ausgezeichnete Alternative für die herkömmlichen Matrices eingestuft werden. Das angestrebte Ziel der Arbeit, ein Chromatographiematerial zu entwickeln, in dem sich die hochselektiven Bindungseigenschaften eines Affinitätsgels mit der hohen Stabilität der gruppenspezifischen Materialien vereinen lassen, wurde erreicht. Darüber hinaus ist es durch eine optimale Auswahl und Kombination der Techniken gelungen, den Entwicklungsprozeß auf beliebige biotechnologisch gewonnene Produkte übertragbar zu machen. Dies betraf insbesondere das Selektionierungsverfahren und die Kupplungsmethoden.

Mit angepaßten Nachweissystemen wie einer radioaktiven Markierung sind die Bindungsstudien mit den Spotmembranen unter methodischen Gesichtspunkten betrachtet für jedes denkbare Zielprotein durchführbar, wenn sich sicherlich auch nicht für alle Biomoleküle ein derart einfacher und kurzer Affinitätspartner auffinden läßt wie für das hier gewählte Modellprotein.

Erfolgversprechend ist die Methode für Zielproteine, deren Struktur und biologische Funktion von Natur aus eine Bindung oder starke Wechselwirkung mit anderen Molekülen vorsieht wie Enzyme, Rezeptoren oder die gesamte Gruppe der Immunglobuline. Für weniger reaktive Produkte bietet die Vielseitigkeit der konzeptionellen Möglichkeiten der kombinatorischen Peptidsynthese jedoch die Möglichkeit, die Suche nach einem geeigneten Affinitätsliganden auf längere oder zyklische Sequenzen auszuweiten oder nicht proteinogene Aminosäuren bzw. andere Modifikationen miteinzubeziehen. In dieser Arbeit konnte ansatzweise verdeutlicht werden, daß auch die Möglichkeiten in der Kupplungschemie eine große Vielfalt aufweisen, so daß für jeden Kandidaten eine geeignete Methode zur Realisierung der gewünschten Orientierung an der Matrix denkbar ist. In dieser Arbeit hat sich der Einsatz von Peptid-Affinitätsliganden als eine wertvolle Alternative für die Ausstattung fließbettchromatographischer Matrices erwiesen. Zukünftige Studien mit anderen Zielproteinen werden zeigen, für welche Produkte die Entwicklung solcher Liganden geeignet ist, und in wie weit sich diese neuartige Chromatographiemethode durchsetzen kann.

Anhang A

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Sonstige Abkürzungen:

AB	Ausbeute
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6))
AG	Arbeitsgruppe
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ATCC	American Tissue Culture Collection (engl.)
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat
BI	Bovine Insulin (engl.)
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
BOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium Hexafluorophosphat
BPB	3',3'',5',5''-Tetrabromphenolsulfophtalein (Bromphenolblau)
BR	Bindungsrate
BSA	Bovine Serum Albumin (engl.)
^t Bu	<i>tertiär</i> -Butyl
Bzl	Benzyl
CASY	Counter and Analyser System (engl.)
CBS	Citrat Buffered Saline (engl.)
CD	Compact Disk (engl.)
CIP	Cleaning-In-Place (engl.)
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleic acid (engl.)
DTE	Dithioerythrit
DVB	Divinylbenzol
EBA	Expanded Bed Adsorption (engl.)
Ed.	Editor (engl.)
EDV	elektronische Datenverarbeitung
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (engl.)
et al.	et alias (lat.)
EtOH	Ethanol
F _{ab}	Fraction Antigen Binding (engl.)
F _c	Fraction Crystallizing (engl.)

FCS	Fetal Calf Serum (engl.)
Fmoc	Fluorenyl-9-methoxycarbonyl
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography (engl.)
HAc	Essigsäure
HBTU	1-[Bis(dimethylamino)methyliumyl]-1H-1,2,3-triazolo [4,5- <i>b</i>]pyridin-3-oxid Hexafluorophosphat
HIC	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (engl.)
Hrsg.	Herausgeber
HSA	Human Serum Albumin (engl.)
HT	Human Transferrin (engl.)
IgG	Immunglobulin
k. a.	keine Angaben
LDH	Lactatdehydrogenase
LMW	Low Molecular Weight (engl.)
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (engl.)
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
MTT	(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)
MW	Molecular Weight (engl.)
MWCO	Molecular Weight Cut Off (engl.)
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduziert)
NBT	Nitroblue Tetrazolium Salt (engl.)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OPA	<i>ortho</i> -Phthaldialdehyd
PAM	Phenylacetamidomethyl
PBS	Phosphate Buffered Saline (engl.)
PCR	Polymerase Chain Reaction (engl.)
PDEA	2-(2-Pyridinyldithio)ethanamin
ppm	parts per million (engl.)
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(pyrrolidino)phosphonium Hexafluorophosphat
RP	Reversed Phase (engl.)
RT	Raumtemperatur

S.	Seite
SA	Streptavidin
SASRIN	Super Acid Sensitive Resin (engl.)
SDS	Sodium-Dodecylsulfate
SG	Schutzgruppe
sp	semipermanent
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis (engl.)
SV	Säulenvolumen
t	temporär
T-	Tween TM 20
Tab.	Tabelle
TBS	Tris Buffered Saline (engl.)
TBTU	O-Benzotriazolyl-N,N,N',N'-tetra(methyluronium) tetrafluorborat
<i>tert.</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
ToF	Time of Flight (engl.)
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
WFR	Wiederfindungsrate
Xaa	beliebige Aminosäure

Anhang B

Literaturverzeichnis

Abu-Reesh I. & Kargi F. (1989): Biological Responses of Hybridoma Cells to Defined Hydrodynamic Shear Stress; *J. Biotechnology* 9: 167-178

Agosto M., Wang N.-H.L. & Wankat P. C. (1993): Amino Acid Separation in a Multistage Fluidized Ion Exchanger Bed; *Ind. Eng. Chem. Res.* 32: 2058-2064

Alberts B., Bray D., Lewis J., Roberts K. & Watson J. D. (1990): Molekularbiologie der Zelle; 2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim

Al-Dibouni M. R. & Garside J. (1997): *Trans. I. Chem. E.* 57: 94

Amatschek K., Necina R., Hahn R., Schallaun E., Schwinn H., Josic D. & Jungbauer A. (2000): Affinity Chromatography of Human Blood Coagulation Factor VIII on Monoliths with Peptides from a Combinatorial Library; *High Res. Chrom.* 23: 47-58

Ameskamp N. (1997): Aufarbeitung monoklonaler Antikörper aus Hybridomkulturen mittels Fließbettchromatographie und Membranadsorbern bis in den Pilotmaßstab; *Diplomarbeit, Universität Bielefeld*

Ameskamp N., Lütkemeyer D., Tebbe H. & Lehmann J. (1997): Downstream Processing im Pilotmaßstab: Direkte affinitätschromatographische Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Hybridomkulturen im stabilen Fließbett; *Bioscope* 5: 14-22

Ameskamp N., Priesner C., Lehmann J., Lütkemeyer D. (1999): Pilot Scale Recovery of Monoclonal Antibodies by Expanded Bed Ion Exchange Adsorption; *Bioseparation 8 (1-5): 169-188, 1999*

Amersham Pharmacia Biotech (1993): Affinity Chromatography - Principles and Methods; 18-1022-29, *Amersham Pharmacia Biotech*

Amersham Pharmacia Biotech (1991): Ligand Immobilization for Real-Time BIA Using Thiol-Disulphide Exchange; *Application Note 601*

Amersham Pharmacia Biotech (2000): Instructions: HiTrapTM Affinity Columns; I 71-7006-00 Edition A0 2000, *Amersham Pharmacia Biotech*

Anspach F.B., Petsch D. & Deckwer W.D. (1996): Purification of Murine IgG₁ on Group Specific Affinity Sorbents; *Bioseparation 6: 165-184*

Arshady R. (1991): Beaded Polymer Supports and Gels: I. Manufacturing Techniques; II. Physico-Chemical Criteria and Functionalization; *Journal of Chromatography 586: 181-219*

Atherton E. & Sheppard R.C. (1989): Solid-Phase Synthesis - A Practical Approach; *Oxford University Press, Oxford 1989*

Barany G. & Merrifield R.B. in: The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology; Vol. 2, Chapter 1, Academic Press, New York 1975-1987

Barthels C.R. Kleinmann G., Korzon N.J. & Irish D.B. (1958): A Novel Ion-Exchange Method for the Isolation of Streptomycin; *Chem. Eng. Prog. 54: 49-52*

Batt B.C., Yabannavar V.M. & Singh V. (1995): Expanded Bed Adsorption Process for Protein Recovery from Whole Mammalian Cell Culture Broth; *Bioseparation 5: 41-52*

Belter P.A., Cunningham F.L. & Chen J.W. (1973): Development of a Recovery Process for Novobiocin; *Biotechnol. Bioeng. 15: 533-549*

Berthold W. & Walter J. (1994): Protein Purification: Aspects of Processes for Pharmaceutical Products; *Biologicals 22: 135-155*

Bouma B. N. (1998): Factor VIII and von Willebrand Factor; *Thrombosis and Haemostasis 79(3): 456-462*

Breuker E. & Drees U. (1984): Pilotfermenter in der Industrie: Kriterien und Konzeptionierung eines praxisnahen Systems; *Form Mikrobiologie 7: 12-18*

Brummelhuis H. G. J. (1980): Methods of Plasma Protein Fractionation; *Academic Press: London, UK: 117-128*

Brunk C. F., Jones K. C. & James T. W. (1979): Assay for Nanogram Quantities of DNA in Cellular Homogenates; *Analytical Biochemistry 92: 497-500*

Buddecke E. (1989): Grundriß der Biochemie; 8. Auflage, *Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York*

Büntemeyer H. (1988): Entwicklung eines Perfusionssystems zur kontinuierlichen Kultivierung von Zellen in Suspension; *Dissertation, Universität Hannover*

Büntemeyer H., Lütkemeyer D., Lehmann J. (1991): Optimization of Serum-Free Fermentation Processes for Antibody Production; *Cytotechnol. 5(1): 57-67*

Buijs A. & Wesselingh J. A. (1980): Batch Fluidized Ion-Exchange Column for Streams Containing Suspended Particles; *J. Chromatogr. 201: 319-327*

Burgoyne R. F., Priest M. C., Roche K. L., Vella G. (1993): Systematic Development and Validation of Sanitization Protocols for a Chromatographic System Designed for Biotherapeutics Purification; *J. Pharm. Biomed. Anal. 11(11-12): 1317-1325*

Burns M. A. & Graves D. J. (1985): Continuous Affinity Chromatography Using a Magnetically Stabilized Fluidized Bed; *Biotechnol. Prog. 1: 95-103*

Cesareni G., Castagnoli L. & Cestra G. (1999): Phage Displayed Peptide Libraries; *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening 2: 1-17*

Chang Y. K. & Chase H. A. (1996): Development of Operating Conditions for Protein Purification Using Expanded Bed Techniques: The Influence of the Degree of Bed Expansion on Adsorption Performance; *Biotechnol. Bioeng.* 49: 512-526

Chase H. A. & Draeger M. N. (1992): Affinity Purification of Proteins Using Expanded Beds; *J. Chromatogr.* 597: 129-145

Chase H. A. & Draeger M. N. (1992a): Expanded Bed Adsorption of Proteins Using Ion-Exchangers; *Separation Sci. Technol.* 27: 2021-2039

Chase H. A. (1994): Purification of Proteins by Adsorption Chromatography in Expanded Beds; *Tibtech* 12: 296-303

Chmiel H. (Hrsg.) (1991): Bioprozeßtechnik Bd. 1 u. 2; *Gustaf Fischer Verlag, Stuttgart*

Choulier L., Laune D., Orfanoudakis G., Wlad H., Janson J.-C., Granier C. & Altschuh D. (2001): Delineation of a Linear Epitope by Multiple Peptide Synthesis and Phage Display; *J. Immunol. Meth.* 249: 253-264

Crick F. H. C. (1966): The Genetic Code: III; *Scientific American* 215: 55-62

Datar R. V., Cartwright T., Rosen C.-G. (1993): Process Economics of Animal Cell and Bacterial Fermentations: A Case Study Analysis of Tissue Plasminogen Activator; *Bio/Technology* 11: 349-357

Deisenhofer J. (1981): Crystallographic Refinement and Atomic Models of a Human F_c Fragment and its Complex with Fragment B of Protein A from *Staphylococcus Aureus* at 2.9- and 2.8- Å Resolution; *Biochemistry* 20(9): 2361-70

De Luca L., Hellenbroich D., Titchener-Hooker N. J., Chase H. A. (1994): A Study of the Expansion Characteristics and Transient Behaviour of Expanded Beds of Adsorbent Particles Suitable for Bioseparations; *Bioseparation* 4: 311-318

di Felice R. (1995): Hydrodynamics of Liquid Fluidization; *Chem. Eng. Sci.* 50: 1213-1245

Draeger M. N. & Chase H. A. (1990): Liquid Fluidized Beds for Protein Purification; *I. Chem. Eng. Symp. Ser. No. 118:12.1-12.12*

Draeger N. M. & Chase H. A. (1991): Liquid Fluidized Bed Adsorption of Protein in the Presence of Cells; *Bioseparation 2: 67-80*

Fahrner R. L., Blank G. S. & Zapata G. A. (1999): Expanded Bed Protein A Affinity Chromatography of a Recombinant Humanized Monoclonal Antibody: Process Development, Operation, and Comparison with a Packed Bed Method; *J. Biotechnol. 75(2-3): 273-280*

Fernández-Lahore H. M., Kleef R., Kula M.-R. & Thömmes J. (1999): The Influence of Complex Biological Feedstock on the Fluidization and Bed Stability in Expanded Bed Adsorption; *Biotechnol. Bioeng. 64: 484-496*

Ferris R., Missbichler A., Hartter E., Mann-Buxbaum E., Schalkhammer T., Urban G. & Pittner F. (1992): Construction and Use of Two α -Human Atrial Natriuretic Peptide-Fragment Affinity Chromatography Columns in the Isolation of C- and N-Terminal Epitope-Specific Antibodies for Use in a Prototype α -hANP Biosensor; *J. Chromatography 577: 251-265*

Feuser J., Halfar M., Lütkemeyer D., Ameskamp N., Kula M. R. & Thömmes J. (1998): Interaction of Mammalian Cell Culture Broth with Adsorbents in Expanded Bed Adsorption of Monoclonal Antibodies; *Process Biochemistry 34 (2): 159-165, 1999*

Feuser J., Walter J., Kula M. R., Thommes J. (1999): Cell/Adsorbent Interactions in Expanded Bed Adsorption of Proteins; *Bioseparation 8(1-5): 99-109*

Fields G. B. & Noble R. L. (1989): Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids; *J. Peptide Protein Res. 35:161-214*

Fischer B. E., Mitterer A., Schlokot U., Grillberger L., Reiter M., Mundt W., Dorner F. & Eibl J. (1996): Immobilized Hirudin and Hirudin-Based Peptides Used for the Purification of Recombinant Human Thrombin Prepared from Recombinant Human Prothrombin; *Protein Expression and Purification 8: 167-174*

Fitzer E. & Fritz W. (1982): Technische Chemie: Eine Einführung in die chemische Verfahrenstechnik; *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York*

Frank R. (1992): Spot-Synthesis: An Easy Technique for the Positionally Addressable, Parallel Chemical Synthesis on a Membrane Support; *Tetrahedron* 48: 9217-9232

Frank R. (1994): Spot-Synthesis: An Easy and Flexible Tool to Study Molecular Recognition; *in: Epton R. (Ed.), Solid Phase Synthesis, Intercept, Andover: 509-512*

Frank R. (1995): Simultaneous and Combinatorial Chemical Synthesis Techniques for the Generation and Screening of Molecular Diversity; *J. Biotechnol.* 41: 259-272

Fuglistaller P. (1989): Comparison of Immunoglobulin Binding Capacities and Ligand Leakage Using Eight Different Protein A Affinity Chromatography Matrices; *J. Immunol. Methods* 124(2): 171-177

Gailliot F. P., Gleason C., Wilson J. J. & Zwarick J. (1990): Fluidized Bed Adsorption for Whole Broth Extraction; *Biotechnol. Prog.* 6: 370-375

Gaskin D. J. H., Starck K., Turner N. A. & Vulfson E. N. (2001): Phage Display Combinatorial Libraries of Short Peptides: Ligand Selection for Protein Purification; *Enz. Microbial Technol.* 28: 766-772

Geysen H. M., Meloen R. H. & Barteling S. J. (1984): Use of Peptide Synthesis to Probe Viral Antigens for Epitopes to a Resolution of a Single Amino Acid; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3998-4002

Gilchrist G. R., Burns M. T. & Lyddiatt A. (1994): Solid Phases for Protein Adsorption in Liquid Fluidized Beds; *in: Separations for Biotechnology 3, The Royal Society of Chemistry, London, 186*

Girot P., Moroux Y., Duteil X. P., Nguyen C., Boschetti E. (1990): Composite Affinity Sorbents and their Cleaning In Place. *J. Chromatography* 510: 213-223

Glauner B. (1991): Vitalitätskontrolle in der Zellkulturtechnik; *BioTec* 3(5): 58-61

Gölker C.F. (1994): Aufarbeitung in der Biotechnologie; *in: Präve P., Faust U., Sittig W. & Sukatsch D. A. (Hrsg.) Handbuch der Biotechnologie, Oldenbourg Verlag München, Wien*

Görg A. & Westermeier R. (1998): Elektrophoretische Verfahren; *in: Bioanalytik, Hrsg. Lottspeich F. & Zorbas H.; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin*

Gordon E. M., Barret R. W., Dower W. J., Fodor S. P. A. & Gallop M. A. (1994): Applications of Combinatorial Technologies to drug Discovery. 2. Combinatorial Organic Synthesis, Library Screening Strategies and Future Directions; *J. Med. Chem.* 37: 1385-1401

Hale G., Drumm A., Harrison P., Phillips J. (1994): Repeated Cleaning of Protein A Affinity Column with Sodium Hydroxide; *J. Immunol. Methods* 171(1): 15-21

Hammond D. J. (1998): Identification of Affinity Ligands from Peptid Libraries and their Applications; *Chromatographia* 47: 475-476

Hansson M., Stahl S., Hjorth R., Uhlén M. & Moks T. (1994): Single Step Recovery of a Secreted Recombinant Protein by Expanded Bed Adsorption; *Bio/Technology* 12: 285-288

Harrison R. G. (1994): Protein Purification Process Engineering; *Marcel Dekker, Inc., New York*

Heidemann R., Riese U., Lütkemeyer D., Büntemeyer H. & Lehmann J. (1994): The SuperSpinner: A Low Cost Animal Cell Culture Bioreactor for the CO₂ Incubator; *Cytotechnology* 14: 1-9

Heukeshoven J. & Dernick R. (1988): Improved Silver Staining Procedure for Staining in PhastSystemTM Development Unit. I. Staining of Sodium Dodecyl Sulfate Gels; *Electrophoresis* 9: 28-33

Hjorth R. (1997): Expanded Bed Adsorption in Industrial Bioprocessing: Recent Developments; *Trends Biotechnol.* 15(6): 230-235

Hoogenboom H. R., deBruine A. P., Hufton S. E., Hoet R. M., Arends J. W. & Roovers R. C. (1998): Antibody Phage Display Technology and Its Applications; *Immunotechnol.* 4:1-20

Houghten R. A. (1985): General Method for Rapid Solid-Phase Synthesis of Large Numbers of Peptides: Specificity of Antigen-Antibody Interaction at the Level of Individual Amino Acids; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5131-5135

Houghten R. A., Pinilla C., Blondelle S. E., Appel J. R., Dooley C. T. & Cuervo J. H. (1991): Generation and Use of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries for Basic Research and Drug Discovery; *Nature* 354: 84-86

Huang P. Y., Baumbach G. A., Dadd C. A., Buettner J. A., Masecar B. L., Hentsch M., Hammond D. J. & Carbonell R. G. (1996): Affinity Purification of von Willebrand Factor Using Ligands Derived from Peptide Libraries; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Vol.* 4(5): 699-708

Huang P. Y. & Carbonell R. G. (1999): Affinity Chromatographic Screening of Soluble Combinatorial Peptide Libraries; *Biotechnology and Bioengineering* 63: 633-641

Huneke F. U. (1995): Biokatalyse im Flüssig-Flüssig-Fest-Dreiphasen-Bioreaktor: Reaktionstechnische Untersuchungen des Reaktorverhaltens; *Dissertation, Universität Bielefeld*

Jäger V., Lehmann J. & Friedel P. (1988): Serum-free Growth Medium for the Cultivation of a Wide Spectrum of Mammalian Cells in Stirred Bioreactors; *Cytotechnology* 1: 319-329

Jefferies D. (1998): Selection of Novel Ligands from Phage Display Libraries: An Alternative Approach to Drug and Vaccine Discovery?; *Parasitology Today* 14(5): 202-206

Jones K. A. (1991): A Review of Biotechnology, and Large-Scale Affinity Chromatography; *Chromatographia* 32: 469-480

Jung G. & Beck-Sickinger A. G. (1992): Methoden der multiplen Peptidsynthese und ihre Anwendungen; *Angew. Chem.* 104: 375-391

Kapuscinski J. & Skoczylas B. (1977): Simple and Rapid Fluorimetric Method for DNA Microassay; *Analytical Biochemistry* 83: 252-257

Karau A., Benken C., Thömmes J. & Kula M. R. (1997): The Influence of Particle Size Distribution and Operating Conditions on the Performance in Fluidized Beds; *Biotechnology and Bioengineering* 55: 54-64

Kenan D. J., Tsai D. E. & Keene J. D. (1994): Exploring Molecular Diversity with Combinatorial Shape Libraries; *Trends Biochem. Sci.* 19: 57-64

Köhler G. & Milstein C. (1975): Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity; *Nature* 256: 495-497

Labrou N. & Clonis Y. D. (1994): The Affinity Technology in Downstream Processing; *J. Biotechnology* 36: 95-119

Lehmann J., Piehl G. W. & Schulz R. (1987): Bubble-free Cell Culture Aeration with Porous Moving Membranes; *Dev. Biol. Standard.* 66: 227-240

Lehmann J., Heidemann R., Riese U., Lütkemeyer D. & Büntemeyer H. (1992): Der SuperSpinner: Ein Brutschrankfermenter für die Massenkultur tierischer Zellen; *BioEngineering 5 u. 6:* 36-38

Levenspiel O. (1972): Chemical Reaction Engineering; *John Wiley & Sons, New York*

Lind W., Lietz M., Jäger V. & Wagner R. (1991): Proteolytic Activities in Serum-free Supernatants of Mammalian Cell Lines; *in: Sasaki R. & Ikura K. (Hrsg.): Animal Cell Culture and Production of Biologicals, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*

Lindl T. (2000): Zell- und Gewebekultur; 3. Auflage, *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart*

Liu D. T.-Y. (1992): Glycoprotein Pharmaceuticals: Scientific and Regulatory Considerations, and the US Orphan Drug Act; *Tibtech* 10: 114-120

López-Fandiño R., Gill I. & Vulfson E. N. (1993): Protease-Catalyzed Synthesis of Oligopeptides in Heterogenous Substrate Mixtures; *Biotechnology and Bioengineering* 43: 1024-1030

Lowe C. R., Burton S. J., Burton N. P., Alderton W. K., Pitts J. M. & Thomas J. A. (1992): Designer Dyes - Biomimetic Ligands for the Purification of Pharmaceutical Proteins by Affinity Chromatography; *Trends Biotech.* 10: 442-448

Lowman H. B. (1997): Bacteriophage Display and Discovery of Peptide leads for Drug Development; *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26: 401-424

Lütkemeyer D., Ameskamp N., Tebbe H., Wittler J., Lehmann J. (1999): Estimation of Cell Damage in Bench- and Pilot-Scale Affinity Expanded-Bed Chromatography for the Purification of Monoclonal Antibodies. *Biotech. Bioeng.* 65(1): 114-119

MacKenzie M. R., Warner N. L., Mitchell G. F. (1978): The Binding of Murine Immunoglobulins to Staphylococcal Protein A. *J. Immunol.* 120(5): 1493-1496

Makriyannis T. & Clonis Y. D. (1997): Design and Study of Peptide-ligand Affinity Chromatography Adsorbents: Application to the Case of Trypsin from Bovine Pancreas; *Biotechnology and Bioengineering* 53: 49-57

Maniatis T., Fritsch E. F. & Sambrook J. (1982): Molecular Cloning; *Cold Springs, Harbor Laboratory*

Marglin A. & Merrifield R. B. (1966): The Synthesis of Bovine Insulin by the Solid Phase Method; *J. Am. Chem. Soc.* 88(21): 5051-5052

Marks T. & Sharp R. (2000): Bacteriophages and Biotechnology: A Review; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75: 6-17

Martin B. L. A., Kolar Z. & Wesselingh J. A. (1981): *Trans. I. Chem. E.* 59: 100

Mazurier C. (2001): The Interaction between von Willebrand Factor and Factor VIII; *Hematologie* 7(2): 128-135

McGregor D. (1996): Selection of Proteins and Peptides from Libraries Displayed on Filamentous Bacteriophage; *Molecular Biotechnol.* 6: 155-162

Merrifield R. B. & Stewart J. M. (1965): Automated Peptide Synthesis; *Nature* 207(996): 522-523

Merrifield R. B. (1969): Solid-Phase Peptide Synthesis; *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 32: 221-296

Miller R. A. & Levy R. (1981): Response of Cutaneous T-Cell Lymphoma to Therapy with Hybridoma Monoclonal Antibody; *Lancet* 2: 226-230

Müller R. (1983): Grundzüge der Verfahrenstechnik, Bd. I; *Otto Salle Verlag, Frankfurt am Main*

Munzert E., Müthing J., Büntemeyer H. & Lehmann J. (1995): Sialidase Activity in Cell Culture Fluid of Chinese Hamster Ovary Cells During Batch Culture and It's Effect on Recombinant Glycoprotein Integrity; *in: Bewery E. C. Griffiths J. B. & Zeijlemaker (Hrsg.) Animal cell technology: Developments towards the 21th century; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*

Muttzall K. (1993): Einführung in die Fermentationstechnik; *Behr's Verlag, Hamburg*

Narayanan S. R. (1994): Preparative Affinity Chromatography of Proteins; *J. Chromatography* 658: 237-258

Naveh D. & Siegel R. C. (1991): Large Scale Downstream Processing of Monoclonal Antibodies; *Bioseparation* 1: 351-366

Necina R., Amatschek K., Schallaun E., Schwinn H., Josic D. & Jungbauer A. (1998): Peptide Affinity Chromatography of Human Clotting Factor

VIII - Screening of the vWF-Binding Domain; *J. Chromatography* 715: 191-201

Needham D., Ting-Beall H. P. & Tran-Son-Tray R. (1991): A Physical Characterization of GAP A3 Hybridoma Cells: Morphology, Geometry and Mechanical Properties; *Biotechnology and Bioengineering* 38: 838-852

Nixon L., Koval C. A., Xu L., Noble R. D. & Slaff G. S. (1991): The Effects of Magnetic Stabilization on the Structure and Performance of Liquid Fluidized Beds; *Bioseparation* 2: 217-230

Nord K., Gunneriusson E., Uhlén M. & Nygren P.-Å. (2000): Ligands Selected from Combinatorial Libraries of Protein A for Use in Affinity Capture of Apolipoprotein A-1_M and *Taq* DNA Polymerase; *J. Biotechnology* 80: 45-54

Nowinski R. C., Tam M. R., Goldstein L. C., Stong L., Kuo C. C., Corey L., Stamm W. E., Handsfield H. H., Knapp J. S. & Holmes K. K. (1983): Monoclonal Antibodies for Diagnosis of Infectious Diseases in Humans; *Science* 219(4585): 637-644

Olsson L. & Kaplan H. S. (1980): Human-Human Hybridomas Producing Monoclonal Antibodies of Predefined Antigenic Specificity; *Proceedings of the National Academy of Science USA* 77: 5429-5431

Patwardhan A. V., Goud G. N., Koepsel R. R. & Ataii M. M. (1997): Selection of Optimum Affinity Tags from a Phage-Displayed Peptide Library - Application to Immobilized Copper(II) Affinity Chromatography; *J. Chromatography* 787: 91-100

Pavia M. R., Sawyer T. K. & Moos W. H. (1993): The Generation of Molecular Diversity; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3: 387-396

Peters J. H. & Baumgarten H. (1990): Monoklonale Antikörper - Herstellung und Charakterisierung; *Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2. Auflage*

Petricciani J. C. (1985): Standardization and Control of Biologicals Produced by Recombinant DNA Technology; *Developments in Biological Standardization* 59: 149-153

Priesner C. (1998): Ionenaustauschchromatographie im stabilen Fließbett: Aufarbeitung monoklonaler Antikörper aus Hybridomkulturen bis in den Pilotmaßstab; *Diplomarbeit, Universität Bielefeld*

Pullen K. F., Johnson M. D., Phillips A. W., Ball G. D. & Finter N. B. (1985): Very Large Scale Cultures of Mammalian Cells; *Developments in Biological Standardization 60: 175-177*

Quibell M., Owen D., Packman L. C. & Johnson T. (1994): Suppression of Piperidine-mediated Side Product Formation for Asp(OBu^t)-containing Peptides by the use of N-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl) (Hmb) Backbone Amide Protection; *J. Chem. Soc., Chem. Commun. 4/04995K: 2343-2345*

Richardson J. F. & Meikle R. A. (1961): Sedimentation and Fluidization Part III: The Sedimentation of Uniform Particles and of Two-component Mixtures of Solids; *Trans. Instn. Chem. Engrs. 39: 348-356*

Richardson J. F. & Zaki W. N. (1954): Sedimentation and Fluidization, Part 1; *Trans. Inst. Chem. Eng. 32: 35-53*

Robertson E. R., & Kennedy J. F. (1996): Glycoproteins: A Consideration of the Potential Problems and their Solutions with Respect to Purification and Characterization; *Bioseparation 6: 1-15*

Sadana A. & Beelaram A. M. (1994): Efficiency and Economics of Bioseparation: Some Case Studies; *Bioseparation 4: 221-235*

Schärfe J. (1988): Impulsflächenanalyse; *LaborPraxis 10: 1096-1103*

Scopes R. K. (1996): Protein Purification in the Nineties; *Biotechnol. Appl. Biochem. 23: 197-204*

Scott S. L., Chen W. J., Bakac A. & Espenson J. H. (1993): Spectroscopic Parameters, Electrode-potentials, Acid Ionization-constants, and Electron-exchange Rates of the 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) Radicals and Ions. *J. Phys. Chem. 97: 6710-6714*

Somers W. K., Van't Reit, Rozie H., Rombouts F. M. & Visser J. (1989): Isolation and Purification of Endopolygalactorunase by Affinity Chromatography in a Fluidized Bed Reactor; *The Chem. Eng. Journal* 40: 7-19

Swann P. G., Casanova R. A., Desai A., Frauenhoff, M. M., Urbancic M., Slomczynska U., Hopfinger A. J., Le Breton G. C. & Venton D. L. (1996): Nonspecific Protease-Catalyzed Hydrolysis/Synthesis of a Mixture of Peptides: Product Diversity and Ligand Amplification by Molecular Trap; *Inc. Biopoly* 40: 617-625

Tebbe H., Lütkemeyer D., Gudermann F., Heidemann R. & Lehmann J. (1996): Lysis-free Separation of Hybridoma Cells by Continuous Disc Stack Centrifugation; *Cytotechnology* 22: 119-127

Tegge W. & Frank R. (1997): Peptide Synthesis on SepharoseTM Beads; *J. Peptide Res.* 49: 355-362

Thömmes J. (1997): Fluidized Bed Adsorption as a Primary Recovery Step in Protein Purification; *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol. 58: 185-230*

Thömmes J., Halfar M., Gieren H., Curvers S., Takors R., Brunschier R., Kula M. - R. (2001): Human Chymotrypsinogen B Production from *Pichia Pastoris* by Integrated Development of Fermentation and Downstream Processing; Part 2. Protein recovery; *Biotechnol. Prog.* 17(3): 503-512

Trinh L., Noronha S. B., Fannon M., Shiloach J. (2000): Recovery of Mouse Endostatin Produced by *Pichia Pastoris* Using Expanded Bed Adsorption; *Bioseparation* 9(4): 223-230

Wagner A., Marc A. & Engasser J. M. (1992): The Use of Lactate Dehydrogenase (LDH) Release Kinetics for the Evaluation of Death and Growth of Mammalian Cells in Perfusion Reactors; *Biotechnology and Bioengineering* 39: 320-326

Watson J. D. & Crick F. H. C. (1953): Molecular Structure of Nucleic Acid. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid; *Nature* 171: 737-738

Werner R. G. (1990): Cultivation of Mammalian Cells from the View Point of the Industry; *Proceedings of the German-Japanese workshop on animal cell culture technology; Dec. 1990, Hamburg*

Werner R. G. & Hoffmann H. (1989): Biotechnische Produktion einer neuen Generation von Arzneimitteln: Therapie mit körpereigenen Wirkstoffen; *Praxis der Naturwissenschaften Chemie, Heft 5/38 Sonderdruck: 3-12*

Wheelwright S. M. (1989): The Design of Downstream Processes for Large-Scale Protein Purification; *J. Biotechnology 11: 89-102*

Wilson D. R. & Finlay B. B. (1998): Phage Display: Applications, Innovations, and Issues in Phage and Host Biology; *Can. J. Microbiol. 44: 313-329*

Wittler J. (1996): Entwicklung einer fluorimetrischen Methode zur quantitativen Bestimmung von DNA in Zellkulturüberständen; *Diplomarbeit, Universität Bielefeld*

Yelton D. E., Desaymard C. & Scharff M. D. (1981): Use of Monoclonal Anti-Mouse Immunoglobulin to Detect Mouse Antibodies; *Hybridoma 1: 5-11*

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nicole Melanie Ameskamp
Adresse: Rathausstr. 9, 33602 Bielefeld
Geburtsdatum: 19. Januar 1972
Geburtsort: Bielefeld
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

08/1978 – 07/1982 Städtische Grundschule Brake, Bielefeld
08/1982 – 06/1991 Marienschule der Ursulinen, Bielefeld
06/1991 Abschluß: Abitur

Studium

10/1991 – 09/1997 Diplomstudiengang Biologie, Universität Bielefeld
09/1997 Abschluß der Diplomarbeit
Lehrstuhl für Zellkulturtechnik, Technische Fakultät, Universität Bielefeld (Aufarbeitung monoklonaler Antikörper aus Hybridomkulturen mittels Fließbettchromatographie und Membranadsorbern bis in den Pilotmaßstab)

Promotion

10/1997 – 12/2001 Promotionsstudium
Lehrstuhl für Zellkulturtechnik, Technische Fakultät, Universität Bielefeld (Entwicklung und Einsatz eines spezifischen Peptid-Affinitätsliganden für die fließbettchromatographische Aufreinigung eines Proteins aus Säugetierzellkulturen)