

# **Untersuchungen zum Stofftransport von Proteinen in chromatographischen Medien mittels konfokaler Laser Raster Mikroskopie**

Von der technischen Fakultät  
der Universität Bielefeld  
zur Erlangung des Grades  
Doktor-Ingenieur  
(Dr.-Ing.)

genehmigte  
**Dissertation**

von  
**Dipl.-Biotech.**  
**Magnus Schröder**  
aus Bielefeld

*für Tamara und meine Eltern*

**1. Gutachter**

Prof. Dr.-Ing. Jürgen Lehmann  
Institut für Zellkulturtechnik  
Technische Fakultät  
Universität Bielefeld

**2. Gutachter**

Prof. Dr. Christian Wandrey  
Institut für Biotechnologie 2  
Forschungszentrum Jülich GmbH  
Universität Bonn

## Vorbemerkung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Januar 2003 bis Dezember 2005 im Institut für Biotechnologie am Forschungszentrum Jülich unter der Leitung von Prof. Dr. Christian Wandrey angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.-Ing. Jürgen Lehmann für die Übernahme des Erstgutachtens und für die Unterstützung während meiner wissenschaftlichen Laufbahn.

Herrn Prof. Dr. Christian Wandrey danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit in seinem Institut durchführen zu können und für die exzellenten Arbeitsbedingungen.

Mein Dank gilt Frau Prof. Maria-Regina Kula, Herrn Prof. Christian Wandrey und Dr. Jürgen Hubbuch für die Möglichkeit, dieses Projekt durchführen zu können.

Ich danke Herrn Dr. Jürgen Hubbuch und Herrn Dr.-Ing. Eric von Lieres für die Betreuung der Arbeit und für ihre konstruktive Diskussionsbereitschaft sowie der Möglichkeit, Teile der Doktorarbeit auf wissenschaftlichen Tagungen und Zeitschriften zu präsentieren bzw. zu veröffentlichen.

Besonders möchte ich Herrn Dr.-Ing. Eric von Lieres danken für die Entwicklung zahlreicher Simulationswerkzeuge für die Analyse der in dieser Arbeit generierten Daten.

Mein ganz besonderer Dank gilt der Werkstatt im IBT für die Konstruktion der Mikrosäulen und anderer Prototypen.

Prof. Steven M. Cramer und Dr. Asif Ladiwala vom Rensselaer Polytechnic Institute danke ich für die Einführung in die Bestimmung von SMA Isothermenparameter.

Ich danke Herrn Dr. Ingo Gregor vom Institut für Informationsverarbeitung für die Messung der freien Diffusionskoeffizienten mittels FCS.

Herrn Thomas Rosenbaum möchte ich für die Konstruktion der langen Mikrosäule danken.

Für die Durchführung von Validierungsstudien danke ich Herrn Andrey Kislyannikov.

Ich danke Herrn Dr. Christopher A. Teske für die Erstellung eines Makros zur Verarbeitung von konfokalen Daten.

Allen Mitarbeitern des IBT's danke ich für das freundliche Arbeitsklima.



---

## Veröffentlichungen

Ergebnisse dieser Arbeit sind wie folgt veröffentlicht worden:

### Artikel

Direct Quantification of Intraparticle Protein Diffusion in Chromatographic Media. (2006).  
Schröder, M., von Lieres, E., Hubbuch, J.  
J Phys Chem B 110: 1429-1436.

### Poster und Präsentationen

Schröder, M. (2005).  
Intraparticle Diffusion Measurement of Proteins in Process Chromatographic Media.  
Präsentiert auf der ECB 12, Kopenhagen, Dänemark.

Schröder, M. (2005).  
Quantitative Confocal Analysis of Column Dynamics of Single Protein Systems.  
Präsentiert auf der ISPPP 2005, Saint Petersburg, FL, USA.

von Lieres, E., Schröder, M., Teske, C., Wiechert, W., Hubbuch, J. (2004).  
Quantitative Modeling of Protein Transport in Porous Particles used for Chromatographic  
Separation Processes.  
Präsentiert auf Transport Phenomena in Micro and Nanodevices, Kona Coast, Hawaii, USA.

### Weitere Veröffentlichungen im Rahmen dieser Dissertation

Herrmann, T. & Schröder, M., Hubbuch, J.J. (2006).  
Generation of Equally Sized Particle Plaques using Solid-Liquid Suspensions.  
Biotechnol Prog 22: 914-918.

Teske, C.A., von Lieres, E., Schröder, M., Ladiwala, A., Cramer, S.M., Hubbuch, J.J. (2006).  
Competitive Adsorption of Labeled and Native Protein in Confocal Laser Scanning Microscopy.  
Biotechnol Bioeng 95: 58-66.

Teske, C.A., Schröder, M., Simon, R., Hubbuch, J.J. (2005).  
Protein-Labeling Effects in Confocal Laser Scanning Microscopy.  
J Phys Chem B 109: 13811-13817.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig erarbeitet habe und keine anderen, als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden.

---

Magnus Schröder

## Inhaltsverzeichnis

Vorbemerkung.....	iii
Veröffentlichungen.....	iv
Erklärung.....	v
Inhaltsverzeichnis.....	vi
Abkürzungsverzeichnis.....	x
Formelzeichen.....	xii
<b>1 Zielsetzung.....</b>	<b>xv</b>
<b>2 Einleitung und Theorie.....</b>	<b>1</b>
2.1 Biokonjugation von Fluoreszenzfarbstoffen an Proteine.....	1
2.1.1 Grundlagen der Fluoreszenz.....	1
2.1.2 Fluoreszenzfarbstoffe.....	4
2.1.3 Biokonjugation.....	6
2.2 Mikroskopie.....	9
2.2.1 Konfokale Laser Raster Mikroskopie.....	9
2.2.2 Einsatz von CLSM in der Chromatographie.....	13
2.3 Stofftransport und Adsorption in chromatographischen Materialien.....	14
2.4 Gleichgewichtsverteilungskoeffizient.....	16
2.4.1 Modellierung der Gleichgewichtsverteilung von Makromolekülen in porösen Medien.....	17
2.4.2 Elektrostatische Einflüsse auf den Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten.....	18
2.5 Diffusion in chromatographischen Materialien.....	19
2.5.1 Modellierung der Diffusion in chromatographischen Materialien.....	20
2.5.2 Einfluß der Proteinkonzentration auf den intrapartikulären Diffusionskoeffizienten.....	21
2.6 Größenausschlusschromatographie.....	22
2.7 Ionenaustauschchromatographie von Proteinen.....	23
2.7.1 Eigenschaften von Ionenaustauschern für die Proteinchromatographie.....	26
2.7.2 Adsorptionsisothermen.....	28
2.7.3 Bestimmung der SMA Parameter.....	31
2.7.4 Transportmodelle in der Ionenaustauschchromatographie.....	33
2.7.5 Allgemeines Geschwindigkeitsmodell.....	34
2.7.5.1 Stoffbilanz für die Bulkphase.....	35
2.7.5.2 Stoffbilanz für die Partikelphase.....	37
2.7.5.3 Simulation chromatographischer Trennungen über GRM.....	39
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>40</b>
3.1 Materialien.....	40
3.1.1 Chemikalien.....	40
3.1.2 Fluoreszenzfarbstoffe.....	40
3.1.3 Proteine.....	41

---

3.1.4 Festphasen .....	41
3.1.5 Geräte .....	41
3.1.6 Shimadzu HPLC System .....	42
3.2 Methoden.....	42
3.2.1 Puffer .....	42
3.2.2 UV-VIS Spektroskopie.....	43
3.2.3 Biokonjugation .....	44
3.2.4 Parameterbestimmung von chromatographischen Systemen und gepackten Säulen .....	46
3.2.5 Analytische Größenausschlusschromatographie .....	48
3.2.6 Chromatographische Bestimmung des Verteilungskoeffizienten $K_{av}$ .....	48
3.2.7 Parameterbestimmung für SMA Isothermen .....	49
3.2.8 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopische Bestimmung von Diffusionskoeffizienten .....	50
3.3 Mikrosäulen.....	51
3.3.1 Aufbau der Mikrosäulen.....	51
3.3.2 Packen der Mikrosäulen .....	52
3.3.3 Betrieb der Mikrosäulen .....	53
3.4 Versuche mit konfokaler Laser Raster Mikroskopie.....	54
3.4.1 Parameter und Einstellungen für Messungen mit einem konfokalen Laser Raster Mikroskop .....	54
3.4.2 Verarbeitung konfokaler Rohdaten .....	56
3.4.3 Konfokale Messung von Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten .....	59
3.4.4 Messung des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten.....	60
3.4.5 Konfokale Messung von Durchbruchkurven .....	62
3.4.6 Konfokale Messung von Elutionen .....	62
3.4.7 Konfokale Messung der Größenausschlusschromatographie.....	63
3.5 Modellierung und Simulation.....	64
3.5.1 Bestimmung des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten.....	64
3.5.2 Modellierung größenausschlusschromatographischer Trennungen in einem gepackten Bett .....	66
3.5.3 Modellierung der kompetitiven Proteinadsorption in einem Partikel .....	67
<b>4 Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>70</b>
4.1 Verteilung und Diffusion von Proteinen in chromatographischen Festphasen – Validierungsexperimente.....	70
4.1.1 Reinheit der Fluoreszenzfarbstoffe.....	71
4.1.2 Chromatographisches Verhalten von Biokonjugaten unter nicht bindenden Bedingungen ..	72
4.1.3 Diskussion .....	78
4.2 Verteilung und Diffusion von Proteinen in chromatographischen Festphasen – Gleichgewichtsverteilungskoeffizient .....	83
4.2.1 Systemeigenschaften .....	83
4.2.2 Messung des Verteilungskoeffizienten mittels CSLM und Vergleich mit chromatographischen Bestimmungen .....	84
4.2.3 Einfluss der Proteingröße und Stationärphase auf den Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten .....	87
4.2.4 Modellierung der Verteilung von Proteinen in Stationärphasen .....	90
4.2.5 Elektrostatische Einflüsse auf den Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten .....	92

---

4.2.6 Diskussion .....	95
4.3 Verteilung und Diffusion von Proteinen in chromatographischen Festphasen – Diffusion .....	102
4.3.1 Messung des freien Diffusionskoeffizienten von Proteinen mittels FCS .....	102
4.3.2 Bestimmung des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten in chromatographischen Medien über CLSM Messungen.....	103
4.3.3 Einfluß der Proteingröße und der Festphase auf den intrapartikulären Diffusionskoeffizienten .....	106
4.3.4 Modellierung behinderter Diffusion von Proteinen in chromatographischen Medien .....	108
4.3.5 Einfluß des pH-Wertes und der Ionenstärke auf den intrapartikulären Diffusionskoeffizienten .....	110
4.3.6 Einfluß der Proteinkonzentration auf den intrapartikulären Diffusionskoeffizienten .....	111
4.3.7 Einfluß der Fließgeschwindigkeit auf den intrapartikulären Diffusionskoeffizienten .....	113
4.3.8 Einfluß von adsorbiertem Protein auf den intrapartikulären Diffusionskoeffizienten .....	113
4.3.9 Diskussion .....	115
4.4 Verteilung und Diffusion von Proteinen in chromatographischen Festphasen – Größenausschlusschromatographie .....	119
4.4.1 Trennung von $\alpha$ -Chymotrypsinogen A und $\gamma$ -Globulin auf Superdex 200 prep grade .....	119
4.4.2 Simulation der Trennung von $\alpha$ -Chymotrypsinogen A und $\gamma$ -Globulin auf Superdex 200 prep grade .....	122
4.4.3 Diskussion .....	124
4.5 Adsorption von nativen Proteinen und Biokonjugaten auf Kationentauschern – SMA Isothermen .....	128
4.5.1 SMA Parameterbestimmung .....	128
4.5.2 SMA Isothermenparameter .....	133
4.5.3 Diskussion .....	135
4.6 Adsorption von nativen Proteinen und Biokonjugaten auf Kationentauschern – Durchbruchkurven .....	140
4.6.1 Durchbruchkurven der nativen Proteine .....	141
4.6.2 Durchbruchkurven der Biokonjugate.....	144
4.6.2.1 Durchbruchkurven der CTG Biokonjugate auf SP Sepharose FF .....	144
4.6.2.2 Durchbruchkurven der CTG Biokonjugate auf SP Sepharose XL .....	146
4.6.2.3 Durchbruchkurven der OVT Biokonjugate auf SP Sepharose FF .....	147
4.6.2.4 Durchbruchkurven der OVT Biokonjugate auf SP Sepharose XL .....	148
4.6.3 Diskussion .....	149
4.7 Adsorption von nativen Proteinen und Biokonjugaten auf Kationentauschern – Konfokale Messung auf Einzelpartikelniveau.....	154
4.7.1 Vergleich der Bulkchromatogramme der Biokonjugate am Partikel mit Chromatogrammen des Säuleneffluents.....	155
4.7.2 Intrapartikuläre Profile der Biokonjugate.....	157
4.7.2.1 Intrapartikuläre Profile der CTG Biokonjugate auf SP Sepharose FF .....	157
4.7.2.2 Intrapartikuläre Profile der CTG Biokonjugate auf SP Sepharose XL.....	161
4.7.2.3 Intrapartikuläre Profile der OVT Biokonjugate auf SP Sepharose FF .....	163
4.7.2.4 Intrapartikuläre Profile der OVT Biokonjugate auf SP Sepharose XL .....	166
4.7.3 Diskussion .....	168
4.8 Adsorption von nativen Proteinen und Biokonjugaten auf Kationentauschern – Modellierung und Simulation.....	176

---

4.8.1 Übersicht der Simulationsparameter .....	176
4.8.2 Modellierung der Bulkchromatogramme am Partikel für das native Protein.....	177
4.8.3 Modellierung und Simulation der intrapartikulären Profile .....	178
4.8.3.1 Simulation der Adsorption von CTG auf SP Sepharose FF bei 20 mM.....	178
4.8.3.2 Simulation der Adsorption von CTG auf SP Sepharose FF bei 50 mM.....	183
4.8.3.3 Simulation der Adsorption von CTG auf SP Sepharose FF bei 100 mM.....	187
4.8.4 Vergleich der Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten der Simulationen.....	191
4.8.5 Diskussion .....	192
4.9 Stofftransport unter Elutionsbedingungen .....	196
4.9.1 Einfluß des Biokonjugates auf Stofftransportvorgänge bei einer Stufenelution .....	196
4.9.2 Stofftransportvorgänge bei einer Stufenelution.....	201
4.9.3 Diskussion .....	203
<b>5 Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>206</b>
5.1 Zusammenfassung .....	206
5.1.1 Validierung .....	206
5.1.2 Gleichgewichtsverteilungskoeffizient .....	206
5.1.3 Intrapartikulärer Diffusionskoeffizient.....	207
5.1.4 Größenausschlusschromatographie .....	207
5.1.5 SMA Parameter .....	207
5.1.6 Durchbruchskurven .....	208
5.1.7 Intrapartikuläre Profile .....	209
5.1.8 Modellierung und Simulation.....	209
5.1.9 Elution .....	210
5.2 Ausblick .....	211
5.2.1 Gleichgewichtsverteilungskoeffizient .....	211
5.2.2 Intrapartikulärer Diffusionskoeffizient.....	211
5.2.3 Größenausschlusschromatographie .....	211
5.2.4 Adsorptionsmessungen auf dem Einzelpartikelniveau.....	212
5.2.5 Modellierung und Simulation.....	212
5.2.6 Elution .....	213
<b>6 Literatur .....</b>	<b>I</b>
6.1 Bücher .....	I
6.2 Artikel.....	I
<b>7 Anhang .....</b>	<b>A-1</b>
7.1 Material und Methoden .....	A-1
7.2 Validierungsstudien.....	A-6
7.3 Chromatogramme der Gradientenversuche für die Bestimmung der linearen SMA Parameter .....	A-7
7.4 Bestimmung der linearen SMA Parameter.....	A-12
7.5 Vergleich der Bulkchromatogramme am Partikel und am Säuleneffluent für das Biokonjugat .....	A-21

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BODIPY	4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene
BLG	bovines $\beta$ -Lactoglobulin
BSA	bovines Serumalbumin
ca.	circa
CE	Kapillarelektrophorese (engl. <i>capillary electrophoresis</i> )
CLSM	konfokale Laser Raster Mikroskopie (engl. <i>confocal laser scanning microscopy</i> )
CTG	bovines $\alpha$ -Chymotrypsinogen A
cv	Säulenvolumen (engl. <i>column volume</i> )
Da	Dalton
DAD	engl. <i>diode array detector</i>
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOL	Substituierungsgrad (engl. <i>degree of labeling</i> )
D/P	Farbstoff-zu-Protein Verhältnis (engl. <i>dye to protein ratio</i> )
EMG	exponentiell modifizierte Gaussfunktion
evtl.	eventuell
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (engl. <i>fluorescence correlation spectroscopy</i> )
FF	Fast Flow
FRAP	engl. <i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
GGB	porcines $\gamma$ -Globulin
Gl.	Gleichung
GRM	allgemeines Geschwindigkeitsmodell (engl. <i>general rate model</i> )
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HeNe	Helium-Neon
HFT	Hauptfarbteiler
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
i.d.R.	in der Regel
IEF	isoelektrische Fokussierung
kDa	Kilo Dalton
KNO <sub>3</sub>	Kaliumnitrat
LYS	ovines Lysozym
M	mol pro Liter
MALDI-TOF	engl. <i>matrix assisted laser desorption ionization time of flight</i>
$\mu$ m	Mikrometer
min	Minuten
NA	numerische Apertur
N/A	nicht verfügbar
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
MDBS	Hauptfarbteiler (engl. <i>main dichroic beam splitter</i> )
NFT	Nebenfärbteiler

---

NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>
nm	Nanometer
OVA	ovines Ovalbumin
OVT	ovines Ovotransferrin
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PH1	pinhole 1
PH3	pinhole 3
pI	isoelektrischer Punkt
pK <sub>a</sub>	negativ dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PMT	Photonenvervielfacher (engl. <i>photomultiplier</i> )
PSF	Punktspreizfunktion (engl. <i>point spread function</i> )
Q	quarternäres Amin
R <sub>a</sub>	axiale Auflösung
R <sub>l</sub>	laterale Auflösung
s	Sekunden
S0	Singulettzustand 0
S1	Singulettzustand 1
S2	Singulettzustand 2
SDM	stöchiometrisches Verdrängungsmodell (engl. <i>stoichiometric displacement model</i> )
SDS-PAGE	Natriumdodecyl-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SEC	Größenausschlusschromatographie (engl. <i>size exclusion chromatography</i> )
SMA	sterische Massenwirkung (engl. <i>steric mass action</i> )
SNR	Signal-zu-Rauschen Verhältnis (engl. <i>signal to noise ratio</i> )
s.o.	siehe oben
SP	Sulphopropyl
s.u.	siehe unten
T1	Triplettzustand 1
Tab.	Tabelle
u.U.	unter Umständen
UV-VIS	Ultraviolett-sichtbares Licht
vgl.	vergleiche
XL	Extreme Load
z.B.	zum Beispiel



## Formelzeichen

A	Querschnittsfläche
A <sub>1</sub>	Koeffizient der Poisson-Boltzman Gleichung
A <sub>2</sub>	Koeffizient der Poisson-Boltzman Gleichung
A <sub>3</sub>	Koeffizient der Poisson-Boltzman Gleichung
A <sub>Farbstoff</sub>	Absorption Fluoreszenzfarbstoff
A <sub>Protein</sub>	Absorption Protein
B	Durchbruchskurve
β	Phasenverhältnis
b <sub>φ</sub>	Bulkkonzentration am äußersten Rand eines Partikels
c	Konzentration
c <sub>a</sub>	Salzkonzentration
c <sub>a,f</sub>	Salzkonzentration am Gradientenende
c <sub>a,i</sub>	Salzkonzentration am Gradientenanfang
c <sub>B</sub>	Bulkkonzentration
c <sub>bulk</sub>	Konzentration im Bulk
c <sub>Farbstoff</sub>	Konzentration Fluoreszenzfarbstoff
c <sub>konj</sub>	Biokonjugatkonzentration
c <sub>ges</sub>	Gesamtproteinkonzentration
c <sub>NaOH</sub>	Konzentration NaOH
c <sub>nativ</sub>	Konzentration natives Protein
c <sub>p</sub>	nicht-adsorbierte Proteinkonzentration
c <sub>P</sub>	Proteinkonzentration
c <sub>Partikel</sub>	Konzentration im Partikel
c <sub>p,f</sub>	Proteinkonzentration in der Auftragungslösung
c <sub>Protein</sub>	Proteinkonzentration
d	Schichtdicke
D	Diffusionskoeffizient
D <sub>0</sub>	Diffusionskoeffizient in Lösung
Δc	Konzentrationsdifferenz
D <sub>ip</sub>	intrapartikulärer Diffusionskoeffizient
dV	differentielles Volumen
dz	differentielle Länge
E	Dispersionskoeffizient
ε	Porosität
ε <sub>b</sub>	Bulkporosität
ε <sub>e</sub>	externe Porosität
ε <sub>Farbstoff</sub>	molarer Extinktionskoeffizient Fluoreszenzfarbstoff
ε <sub>i</sub>	Partikelporosität
ε <sub>p</sub>	Partikelporosität
ε <sub>Protein</sub>	molarer Extinktionskoeffizient Protein
ε <sub>t</sub>	Säulenporosität
f	Funktion von
Φ	Gleichgewichtsverteilungskoeffizient
f <sub>Dimer</sub>	Anteil Dimer

---

$\Phi_{\text{Dimer}}$	Gleichgewichtsverteilungskoeffizient Proteindimer
$FF(n)$	Formfaktoren (n)
$f_{\text{Farbstoff}}$	Anteil Fluoreszenzfarbstoff
$f_{\text{Farbstoff}}$	Verdünnungsfaktor Fluoreszenzfarbstoff
$\Phi_{\text{Farbstoff}}$	Gleichgewichtsverteilungskoeffizient Fluoreszenzfarbstoff
$f_{\text{Protein}}$	Anteil Protein
$f_{\text{Protein}}$	Verdünnungsfaktor Protein
$\Phi_{\text{Protein}}$	Gleichgewichtsverteilungskoeffizient Protein
$h\nu_a$	absorbierte Lichtenergie
$h\nu_f$	Lichtenergie Fluoreszenz
$h\nu_p$	Lichtenergie Phosphoreszenz
$I_p$	Intensität in Partikelphase
$I_b$	Intensität in Bulkphase
$J$	Flux
$j_c$	konvektiver Flux
$j_d$	diffusiver Flux
$j_e$	dispersiver Flux
$j_f$	filmdiffusiver Flux
$k$	Boltzmannkonstante
$k'$	Retentionsfaktor
$k_a$	Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante
$K_{av}$	Gleichgewichtsverteilungskoeffizient
$k_d$	Desorptionsgeschwindigkeitskonstante
$K_D$	Gleichgewichtsverteilungskoeffizient
$k_f$	Filmdiffusionskoeffizient
$k_{\text{Farbstoff}}$	Korrekturfaktor Farbstoff
$K_p$	Gleichgewichtskonstante SMA
$l$	Länge
$L$	Säulenlänge
$\Lambda$	totale ionische Kapazität
$v_p$	charakteristische Ladung SMA
$p$	Druck
$\Pi$	Variable
$q$	adsorbiertes Protein
$q_p$	adsorbiertes Protein
$Q_a$	adsorbierte austauschbare Salzkonzentration
$Q_a'$	adsorbierte sterisch behinderte Salzkonzentration
$Q_{a,\text{total}}$	adsorbierte totale Salzkonzentration
$Q_p$	adsorbierte Proteinkonzentration
$r$	Radius
$R$	Partikelradius
$r_f$	Faserradius
$r_p$	Porenradius
$r_s$	Molekülradius
$\sigma_p$	Oberflächenladungsdichte Porenwand
$\sigma_p$	sterischer Faktor SMA
$\sigma_s$	Oberflächenladungsdichte Molekül

---

$t$	Zeit
$T$	Temperatur
$t_0$	Totzeit
$t_1$	Retentionszeit Peak 1
$t_2$	Retentionszeit Peak 2
$t_r$	Retentionszeit
$v$	interpartikuläre Fließgeschwindigkeit
$V$	Fließgeschwindigkeit
$V_0$	Totvolumen
$V_{ad}$	Partikelvolumen
$V_B$	Durchbruchsvolumen
$V_{blueDex}$	Elutionsvolumen Blue Dextran
$V_c$	Säulenvolumen
$V_d$	Säulentotvolumen
$V_G$	Gradientenvolumen
$V_{ges}$	Volumen Gesamtproteinlösung
$V_{konj}$	Volumen Biokonjugatlösung
$V_{NaOH}$	Volumen NaOH
$V_{nativ}$	Volumen natives Protein
$V_{pore}$	Porenvolumen
$V_s$	Festphasenvolumen
$V_{Puffer}$	Puffervolumen
$V_t$	Säulenvolumen
$\omega$	Oberfläche-zu-Volumen Verhältnis
$w_{0,5,1}$	Peakbreite auf halber Peakhöhe von Peak 1
$w_{0,5,2}$	Peakbreite auf halber Peakhöhe von Peak 2
$\psi_e$	elektrostatische potentielle Energie
$z$	Ortsachse
$z$	Länge

## 1 Zielsetzung

Chromatographische Trennverfahren sind die Grundlage für die Aufreinigung von Proteinen und basieren auf komplexen Adsorptions- und Stofftransportvorgängen in porösen Festphasen. Die Ionenaustauschchromatographie ist das am häufigsten eingesetzte chromatographische Verfahren für die initiale Produktgewinnung und Feinreinigung von Proteinen. Die Größenausschlusschromatographie trennt Proteine auf Grund ihre Größe und wird häufig für die finale Reinigung eines Proteins angewendet.

Für beide chromatographische Trennverfahren können optimale Prozeßbedingungen nicht *a priori* aus den Protein- und Festphaseneigenschaften abgeleitet werden und müssen über Experimente ermittelt werden.

Für ein weitergehendes Verständnis der Vorgänge während einer chromatographischen Trennung und der Entwicklung von geeigneten Modellen zur Beschreibung und Optimierung der Prozesse werden detaillierte Stofftransport- und Adsorptionsmessungen benötigt. Klassischen Methoden basieren auf der Untersuchung des Säuleneffluents aus gepackten Betten unter linearen (analytische Trennungen) und nicht linearen Bedingungen (Durchbruchskurven). Dabei können die Beiträge der einzelnen Faktoren, die am Stofftransport und der Adsorption beteiligt sind, nicht unabhängig voneinander betrachtet werden. Die eigentliche Trennung findet innerhalb der porösen Festphasen statt, die mit den klassischen Methoden nicht direkt untersucht werden können.

Die konfokale Laser Raster Mikroskopie wurde als neue Meßmethode vorgestellt, Stofftransport- und Adsorptionsvorgänge in der Chromatographie auf dem Einzelpartikelniveau zu untersuchen (Linden, 2001). Das Ziel dieser Arbeit ist, quantitative Analysen von Stofftransport- und Adsorptionsvorgängen mit der konfokale Laser Raster Mikroskopie in der Chromatographie zu etablieren und die Meßmethode auf Parameterbestimmungen, Untersuchungen in gepackten Betten und auf Elutionsprozesse auszuweiten.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile: im ersten Teil werden Verteilungs- und Stofftransportphänomene unter nicht bindenden Bedingungen untersucht. Im zweiten Teil wird die Adsorption und der Stofftransport unter nicht-linearen Bedingungen, sowie Vorgänge bei einer Stufenelution untersucht. Die einzelnen Schwerpunkte dieser Arbeit werden im Folgenden dargestellt.

Der Gleichgewichtsverteilungskoeffizient eines Proteins für eine Festphase beschreibt die sterische Interaktionen des Proteins mit der Festphase und ist der entscheidende Faktor für

---

größenausschlußchromatographische Trennungen. Er wird klassisch mit säulenchromatographischen Methoden gemessen. In dieser Arbeit wird zum ersten Mal der Gleichgewichtsverteilungskoeffizient direkt auf dem Einzelpartikelniveau für eine Auswahl an unterschiedlichen Festphasen bestimmt.

Der intrapartikuläre Diffusionskoeffizient ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Proteinchromatographie und wird für die Simulation chromatographischer Trennungen benötigt. Die konfokale Messung auf Einzelpartikelniveau wird in dieser Arbeit auf die dynamische Messung des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten ausgeweitet. Die Abhängigkeit der Proteingröße und der Festphase wird mit der neu entwickelten Methode untersucht und mit Literaturdaten verglichen.

Als Kombination der Effekte des Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten und des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten wird eine größenausschlusschromatographische Trennung in einem gepackten Bett über die Säulenlänge verfolgt. Dies stellt eine Erweiterung der Meßtechnik mittels konfokaler Laser Raster Mikroskopie auf dynamische Prozesse innerhalb eines gepackten Bettes an unterschiedlichen Positionen dar. Die Ergebnisse werden mit Simulationsdaten aus einem allgemeinen Geschwindigkeitsmodell verglichen.

Die Adsorption unter nicht-linearen Bedingungen für ein Einzelkomponentensystem wird über Durchbruchkurven auf unterschiedlichen Adsorbentien bei verschiedenen Salzkonzentrationen für die Modellproteine  $\alpha$ -Chymotrypsinogen A und Ovotransferrin auf dem Einzelpartikelniveau in einer gepackten Säule untersucht. Die Partikeldaten werden mit den Daten aus dem Säuleneffluents in Beziehung gesetzt, um eine umfassende Beschreibung der Stofftransport- und Adsorptionsvorgänge zu liefern. Für die hochauflösende Messung der Proteinverteilung müssen die Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert werden. Bei der Messung des Proteintransports mittels konfokaler Laser Raster Mikroskopie wurde in der Doktorarbeit von Linden (2001) und Dziennik (2003) davon ausgegangen, daß sich das Biokonjugat und das native Protein identisch verhalten. Damit kann das gemessene Signal direkt mit dem Verhalten des Proteins gleichgesetzt werden. Das chromatographische Verhalten von Biokonjugaten unter adsorptiven Bedingungen unterscheidet sich vom nativen Protein für die gewählten Proteine und Fluoreszenzfarbstoffe in dieser Studie. Als Konsequenz können die gemessenen intrapartikulären Profile nicht direkt mit dem Verhalten des nativen Proteins gleichgesetzt werden, sondern müssen modellgestützt berechnet werden. In dieser Arbeit wird der Ansatz verfolgt, für jedes Experiment drei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe zu verwenden, die das Adsorptionsverhalten der

Proteine aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen unterschiedlich stark ändern. Die drei unterschiedlichen Profile entstehen durch das, in jedem Fall, identische Profil des nativen Proteins, welches nicht direkt gemessen werden kann. Unter Zuhilfenahme von Adsorptionsisothermen für sowohl das native Protein, als auch der jeweiligen Biokonjugate, und einem allgemeinen Geschwindigkeitsmodell werden die intrapartikulären Konzentrationsprofile des nativen Proteins und der Biokonjugate simuliert und mit den experimentellen Daten verglichen. Im Gegensatz zu allen vorangegangenen Arbeiten wird in dieser Studie die Gleichheit zwischen Biokonjugat und nativem Protein unter adsorptiven Bedingungen widerlegt und eine Strategie für die modellgestützte Rekonstruktion des Adsorptionsprofils des nativen Proteins vorgestellt.

Der Vorgang der Elution ist, ebenso wie die Adsorption, an der Produktivität chromatographischer Trennungen beteiligt. Im Gegensatz zur Adsorption wurde die Elution in der Literatur wenig untersucht und es fehlt eine Vorstellung der Stofftransportvorgänge auf dem Einzelpartikelniveau. Stofftransportvorgänge während einer Stufenelution werden zum ersten Mal auf dem Einzelpartikelniveau in dieser Studie gemessen und beschrieben, womit die Grundlage für die Modellierung dieser Prozesse gelegt wird.

## **2 Einleitung und Theorie**

In dieser Studie werden fluoreszenzfarbstoffmarkierte Proteine verwendet, um mittels konfokaler Laser Raster Mikroskopie (engl. confocal laser scanning microscopy, CLSM) die Verteilung, Diffusion und Adsorption von Proteinen in chromatographischen Festphasen zu untersuchen.

Die folgenden Kapitel geben eine Übersicht über die Verfahren zur Herstellung von Biokonjugaten, der konfokalen Meßtechnik sowie der Stofftransport- und Adsorptionsphänomene in der Proteinchromatographie mit Schwerpunkt auf der Ionenaustauschchromatographie.

### **2.1 Biokonjugation von Fluoreszenzfarbstoffen an Proteine**

Die kovalente Konjugation von Fluoreszenzfarbstoffen an Proteine bildet die Grundlage für die Untersuchungen mittels konfokaler Laser Raster Mikroskopie in dieser Studie. Die physikochemischen Eigenschaften der Fluoreszenz und der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe werden vorgestellt. Zudem werden Strategien zur Biokonjugation und die Auswirkungen auf die Eigenschaften der Proteine dargestellt.

#### **2.1.1 Grundlagen der Fluoreszenz**

Allgemein wird die Emission von Licht einer Substanz aus einem elektronisch angeregten Zustand heraus als Lumineszenz bezeichnet. Von Fluoreszenz spricht man, wenn die Emission eines Lichtquants aus dem angeregten Singlett Zustand in den Grundzustand erfolgt (Lakowicz, 1997). Das Elektron im Singlett Zustand des angeregten Orbitals ist gepaart mit dem zweiten Elektron im Grundzustand. Die Rückkehr zum Grundzustand ist daher erlaubt und erfolgt durch Emission eines Photons. Im Singlett Zustand besitzen die Elektronen in einem Molekülorbital einen antiparallelen Spin (Atkins, 1996). Der Triplet Zustand entspricht dem parallelen Spin zweier Elektronen. Nach dem Pauli Prinzip darf ein beliebiges Orbital nie mehr als zwei Elektronen besitzen und wenn zwei Elektronen das gleiche Orbital besetzen, müssen sie gepaarte Spins besitzen (Atkins, 1996). Elektronenübergänge, die nach dem Pauli Prinzip erfolgen bezeichnet man als erlaubte Übergänge; solche die dagegen verstoßen als verboten (Atkins, 1996). Die Spektren verschiedener Substanzen variieren stark und sind primär abhängig von der chemischen Struktur einer Substanz und einer Reihe von

physikochemischen Eigenschaften der Umgebung der Substanz (s.u.). Die Prozesse, die während der Absorption und Emission von Licht ablaufen, werden häufig in Form eines Jablonski Diagramms dargestellt (Abb. 2.1). Die Grund-, Singlett- und angeregten Zustände sind mit  $S_0$ ,  $S_1$  bzw.  $S_2$  gekennzeichnet. Auf jedem dieser energetischen Zustände kann die fluoreszierende Substanz in einer Reihe von Schwingungsenergieniveaus existieren, die mit 0, 1 oder 2 gekennzeichnet sind.

Die Übergänge zwischen den einzelnen Zuständen sind als vertikale Linien dargestellt. Bei Raumtemperatur ist die Wärmeenergie zu niedrig, um angeregte Schwingungszustände zu besetzen (Lakowicz, 1997). Absorption erfolgt daher in der Regel aus dem niedrigsten Schwingungszustand (2.1-A). Nach der Lichtabsorption gibt es eine Reihe von Prozessen, die ablaufen können. Eine fluoreszierende Substanz wird in der Regel in ein höheres Schwingungsniveau von  $S_1$  oder  $S_2$  angeregt, welche typischerweise in das niedrigste Schwingungsniveau von  $S_1$  relaxiert. Dieser Prozeß verläuft meist schneller als  $10^{-12}$  s und wird als interne Umwandlung bezeichnet (2.1-B). Weil Fluoreszenzlebensdauern oft im Bereich von  $10^{-8}$  s liegen, ist der Prozeß der internen Umwandlung vor der Emission abgeschlossen. Die Fluoreszenzemission findet in der Regel vom niedrigsten Schwingungszustand von  $S_1$  statt (2.1-C). Die Rückkehr zum Grundzustand  $S_0$  verläuft typischerweise über ein höheres, energetisches Schwingungsniveau von  $S_0$ , welches schnell ( $10^{-12}$  s) das thermische Gleichgewicht erreicht (2.1-D) (Lakowicz, 1997).

Als Konsequenz der Emission zu einem höheren Schwingungsgrundzustand ist das Emissionsspektrum oft das Spiegelbild des Absorptionsspektrums für die  $S_0 \rightarrow S_1$  Transition. Moleküle können auch über eine Spinumwandlung in den ersten Tripletzustand  $T_1$  gelangen. Umwandlung von  $S_1$  in  $T_1$  wird als „intersystem crossing“ bezeichnet (2.1-E), und Emission von  $T_1$  nach  $S_0$  wird Phosphoreszenz genannt (2.1-F) (Lakowicz, 1997).

Die Energie der Emission ist typischerweise niedriger als die der Absorption. Eine Substanz emittiert bei einer längeren Wellenlänge als die Absorptionswellenlänge. Dieses Phänomen wird als Stokessche Verschiebung (engl. „Stokes' shift“) bezeichnet und kann durch den schnellen Abfall zum niedrigsten Schwingungszustand von  $S_1$ , durch thermischen Verlust der zusätzlichen Schwingungsenergie bis in den  $S_0$  Zustand und ganz allgemein durch Lösungsmiteleinflüsse, Reaktionen im angeregten Zustand, Komplexbildung und Energietransfers erklärt werden (Lakowicz, 1997). Eine weitere Eigenschaft der Emission ist ein gleichbleibendes Emissionsspektrum unabhängig von der Anregungswellenlänge.



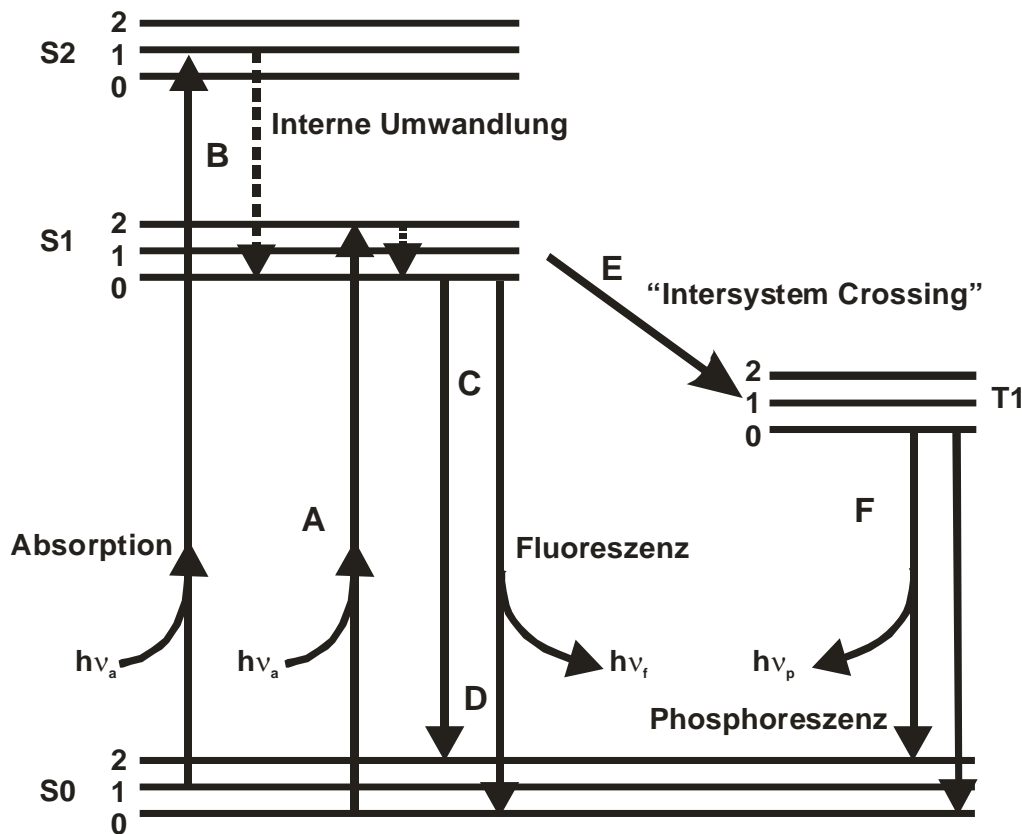


Abbildung 2.1. Vereinfachtes Jablonski Diagramm für Absorptions-, Fluoreszenz- und Phosphoreszenzprozesse.

Die zwei wichtigsten Parameter für eine fluoreszierende Substanz ist ihre Quantenausbeute und die Fluoreszenzlebensdauer. Die Quantenausbeute ist definiert als Verhältnis emittierter zu absorbierten Photonen. Die Fluoreszenzlebensdauer ist definiert als die durchschnittliche Zeit, die eine Substanz im angeregten Zustand verbringt und liegt durchschnittlich bei 10 ns (Lakowicz, 1997). Lösungsmitelegenschaften können die oben genannten Prozesse beeinflussen. Die wichtigsten Lösungsmittelparameter sind pH-Wert, Temperatur, Viskosität, Polarität und Ionenstärke. Der pH-Wert hat einen großen Einfluß auf die Fluoreszenz eines Moleküls durch die Säure-Base Titration von funktionellen Gruppen. Viele Fluoreszenzfarbstoffe, die in einem biologischen Kontext verwendet werden, sind i.d.R. so konzipiert, daß sie im physiologischen pH-Bereich von 4 bis 10 keine nennenswerte pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz zeigen. Temperatur, Viskosität, Polarität und Ionenstärke zeigen verwandte Effekte, in dem sie die Effizienz der Energierelaxation nach Anregung durch Licht und zwischenmolekulare Prozesse beeinflussen.

Es existieren Prozesse, die die Fluoreszenzintensität einer Substanz verringern: beim dynamischen Quenching verliert ein Fluorophor im angeregten Zustand einen Teil seiner Energie durch Kollisionen mit anderen Molekülen. Diese Energie steht nicht mehr für die Emission von Photonen zur Verfügung. Die Moleküle, mit denen der angeregte Fluorophor

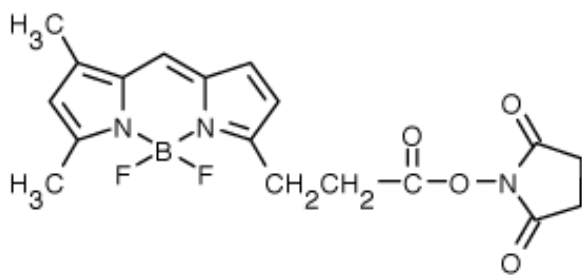
zusammenstößt, werden als Quencher bezeichnet. Eine Reihe von Substanzen können als dynamische Quencher agieren wie z.B. Sauerstoff, Halogene oder Amine (Lakowicz, 1997). Der innere Filtereffekt ist ein wichtiger Faktor, der bei der Messung von Fluoreszenzintensitäten bedacht werden muß. Beim inneren Filtereffekt absorbiert eine Lösung bis zum Meßpunkt einen Teil der durch sie durchtretenden Lichtenergie. Am eigentlichen Anregungspunkt steht nicht mehr 100% der Lichtintensität zur Verfügung und die emmitierte Lichtintensität ist geringer. Dabei ist es egal, ob die Absorption des anregenden Lichts durch die fluoreszierende Substanz selbst oder durch andere absorbierende Substanzen hervorgerufen wird. Dies betrifft auch die Reabsorption von emittierten Licht durch entweder den Fluoreszenzfarbstoff (bei niedriger Stokes'scher Verschiebung) oder anderen Substanzen. Die integrale Wirkung dieser beiden Effekte ist, daß die gemessene Fluoreszenzintensität und die Substanzkonzentration nicht mehr linear proportional zueinander sind und damit die Quantifizierung erschwert wird. Fluoreszenzmessungen sollten daher nur in klaren Lösungen bis zu einer maximalen optischen Dichte von 0.05 erfolgen. Neben den oben genannten Effekten auf das gemessene Fluoreszenzsignal kann auch die zeitliche Einwirkung des anregenden Lichts zu einer Verringerung der Fluoreszenzemission führen, welches als Photobleaching bezeichnet wird. Beim derzeitigen Verständnis des Photobleachings kommt es zu photochemischen Reaktionen zwischen der fluoreszierenden Substanz im angeregten Zustand und einem Reaktanden wie z.B. Sauerstoff, der zu einem nicht-fluoreszierenden Produkt führt (Lakowicz, 1997). Der Prozeß wird i.A. als irreversibel angesehen, obwohl die Möglichkeit von reversiblen Photobleaching demonstriert wurde (Sinnecker *et al.*, 2005).

### 2.1.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Nachdem die Grundlagen der Fluoreszenz im vorgehenden Kapitel erläutert wurden, soll nun eine Übersicht der Eigenschaften von Fluoreszenzfarbstoffen gegeben werden, die für die vorliegende Studie Verwendung finden. Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe müssen bestimmte Eigenschaften ausweisen: erstens werden die Farbstoffe für Untersuchungen mit einem konfokalen Laser Raster Mikroskop eingesetzt, welches zur Anregung drei verschiedene Laser mit insgesamt sechs diskreten Wellenlängen besitzt. Die Farbstoffe sollten auf die Anregungswellenlängen der Laser abgestimmt sein, um optimale Anregungsbedingungen zu erhalten. Zweitens sollten die Farbstoffe im wässrigen Milieu löslich sein. Drittens sollte der pH-Wert im Bereich zwischen 4 und 10 und die

Ionenstärke zwischen 0 bis 2 M keinen signifikanten Einfluß auf die Fluoreszenzemission besitzen. Änderungen der spektralen Eigenschaften nach Konjugation an Proteine sollten idealerweise nicht vorhanden sein. Generell sollten die Farbstoffe robust gegen Photobleaching und Quenching sein und keine Strukturänderung der Proteine nach Konjugation hervorrufen. Es existieren eine Reihe von kommerziell erhältlichen Fluoreszenzfarbstoffen, die näherungsweise die oben genannten Bedingungen erfüllen, und die im Folgenden näher beschrieben werden.

Eine wichtige Gruppe stellen die BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, Abb. 2.2) Farbstoffe dar (Karolin *et al.*, 1994). BODIPY Farbstoffe haben sehr enge Emissionsbandbreiten und sehr kleine Stoke'sche Verschiebungen, weswegen sie meist suboptimal angeregt werden müssen, um eine geeignete Detektierbarkeit zu gewährleisten. Aufgrund der Abwesenheit einer Ladung zeigen BODIPY Farbstoffe keine Abhängigkeit der Fluoreszenz vom pH-Wert, aber die Löslichkeit in wässrigen System ist z.T. gering.



**BODIPY FL NHS Ester  
(Molecular Probes)**

MW: 776 g/mol

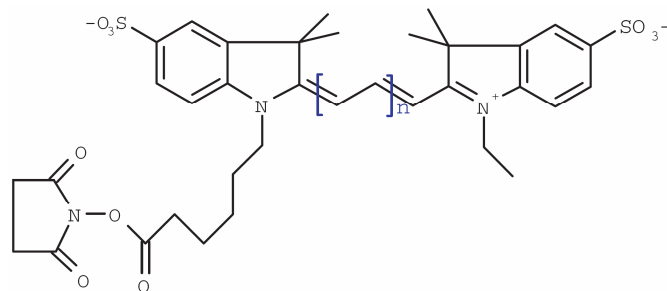
$Ex_{max}$ : 504 nm

$Em_{max}$ : 513 nm

$\epsilon_{max}$ : 68000 (M·cm)<sup>-1</sup>

**Abbildung 2.2. Strukturformel und spektrale Eigenschaften von BODIPY FL.**

Zur Gruppe der Sulfoindocyanine gehören die Farbstoffe Cy3 und Cy5 (Abb. 2.3). Die Basisstruktur der Indoleninfarbstoffe wird zur Erhöhung der Löslichkeit mit Sulfonsäuregruppen substituiert (Mujumdar *et al.*, 1993). Die Cyaninfarbstoffe besitzen sehr hohe Extinktionskoeffizienten und Photostabilität.



**Cy3 / Cy5 NHS Ester  
(GE Healthcare)**

n=1 für Cy3

MW: 776 g/mol

$Ex_{max}$ : 550 nm

$Em_{max}$ : 570 nm

$\epsilon_{max}$ : 150000 (M·cm)<sup>-1</sup>

n=2 für Cy5

MW: 792 g/mol

$Ex_{max}$ : 649 nm

$Em_{max}$ : 670 nm

$\epsilon_{max}$ : 250000 (M·cm)<sup>-1</sup>

**Abbildung 2.3. Strukturformel und spektrale Eigenschaften von Cy Farbstoffen.**

Der Farbstoff Atto635 basiert auf einem Carbopyronin Grundgerüst und ist stabil bis pH 8.5 (Abb. 2.4). Die Atto-Farbstoffe besitzen eine starre Struktur, was zu einer erhöhten Photostabilität führt (Buschmann *et al.*, 2003).

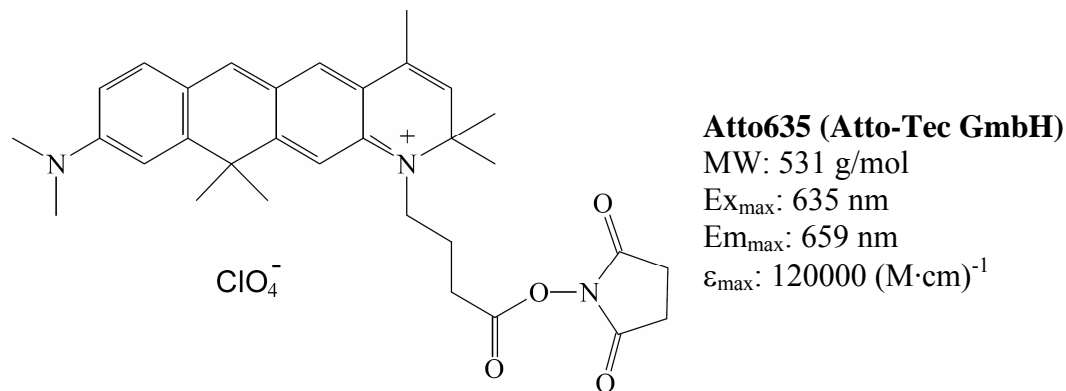
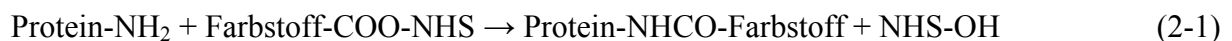


Abbildung 2.4. Strukturformel und spektrale Eigenschaften von Atto635.

### 2.1.3 Biokonjugation

Das Ziel einer Biokonjugation, im Rahmen dieser Arbeit, ist die stabile, kovalente Verknüpfung eines Fluoreszenzfarbstoffes an ein Protein. Hierbei sollte möglichst die Integrität – Struktur und Eigenschaft – des jeweiligen Proteins nicht verändert werden.

Die verwendete Strategie für die Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an Proteine ist die Vernüpfung der Farbstoffe über Amingruppen via Reaktivester. Die typische Reaktivgruppe ist N-Hydroxysuccinimid (NHS), welches in Form eines Reaktivesters an kommerziell erhältliche Farbstoffe gekoppelt ist. Die Reaktion mit den aktivierten Farbstoffen erfolgt über die nucleophile Gruppe des aliphatischen ε-Amins des Lysins und der freien Amingruppe der α-Aminosäure eines Proteins unter Ausbildung einer stabilen Amidbindung nach folgendem Reaktionsschema (Brinkley, 1992):



Der optimale pH-Wert für diese Reaktion liegt zwischen 8.0-9.0 (Brinkley, 1992; Hermanson, 1997), wobei mit steigendem pH-Wert die Konkurrenzreaktion der Hydrolyse des Reaktivesters beschleunigt wird und sich damit die Ausbeute an Biokonjugat verringert.

Die Konjugationsreaktion ist eine nucleophile Substitution zweiter Ordnung, wohingegen die Hydrolyse eine pseudo-erste Ordnung besitzt. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Konjugation ist hoch und der Markierungsgrad wird durch das Verhältnis von Protein zu Reaktivfarbstoff und nicht durch die Reaktionsdauer bestimmt (Brinkley, 1992). Aus thermodynamischen

Gründen erhöht eine Absenkung der Temperatur die Selektivität (Brinkley, 1992) Die Temperatur kann auch eine Veränderung der Zugänglichkeit von Amingruppen durch partielle Entfaltung der Proteine bewirken (Pinto *et al.*, 2003).

Eine Steigerung der Ionenstärke von 0.01 auf 0.1 M bei konstantem pH kann eine Beschleunigung der Reaktion bewirken (Jing *et al.*, 2002), ändert aber nicht die Ausbeute. Eine potentiell Erklärung für diesen Effekt könnte in der Abschirmung von Ladungen durch die höhere Ionenstärke liegen, die eine weitere Addition von (geladenen) Farbstoffen begünstigt (Anderson *et al.*, 2002).

Die Reaktion über NHS Ester erfolgt nur an der protonierten Form der Amingruppen, sodaß es u.U. möglich ist, die Selektivität dadurch zu erhöhen, daß der pH-Wert auf 7.0 gesenkt wird, um gezielter die  $\alpha$ -Aminosäure zu derivatisieren.

Aus der Sicht der Erstellung eines Biokonjugates für die Untersuchung von chromatographischen Trennprozessen ist es sinnvoll, ein Protein mit nur einem einzigen Farbstoffmolekül pro Protein an einer exakt bestimmten Position zu erstellen.

Verschiedene Methoden stehen zur Verfügung, um einen Fluoreszenzfarbstoff an eine definierte Stelle zu konjugieren (Kapanidis und Weiss, 2002), wie die molekularbiologische Mutation der Lysinaminosäuren (Parola *et al.*, 1997), Konjugation über Hexahistidengruppen an rekombinante Proteine (Kapanidis *et al.*, 2001), Thioesterkonjugation an N-terminale Cysteine (Gentle *et al.*, 2004; Schuler und Pannell, 2002), Intein-vermittelte Ligation (Wood *et al.*, 2004) oder über Transaminierung des N-Terminus und anschließender Reaktion mit Hydrazino-aktiviertem Fluoreszenzfarbstoff (Dong *et al.*, 2005). Keine der genannten Methoden ist generell in der Lage, Proteine selektiv zu Markieren, sondern verlangt i.d.R. eine molekularbiologische oder chemische Veränderung des Proteins, sodaß nicht mehr das native Protein markiert wird, sondern eine evtl. unterschiedliche Mutante.

Anstatt eine spezielle Reaktivgruppe zu verwenden oder chemisch-molekularbiologische Änderungen am Protein durchzuführen, wurde auch die Derivatisierung über NHS Ester an Feststoff-gebunden Proteine demonstriert (Attiya *et al.*, 2002; Houen *et al.*, 2003). Auf diese Weise können wichtige Bindungsstellen, wie z.B. eine Antikörperbindestelle, vor der Derivatisierung geschützt werden.

Eine sehr aufwendige Methode zur Erstellung eines definierten Biokonjugats ist die unspezifische Konjugation mit anschließender Aufreinigung zu einem homogenen Produkt (Shimura und Karger, 1994; Lebreton und Lyddiatt, 2000). Die Aufreinigungsstrategie beinhaltet mehrere orthogonale Separationsmethoden mit hochauflösenden Materialien. Die

Ausbeute ist dabei gering und i.d.R. muß für jedes Protein eine eigene Aufreinigungsstrategie entwickelt werden.

Letztlich besteht auch die Möglichkeit der vollständigen Derivatisierung aller möglichen Bindungsstellen mit Fluoreszenzfarbstoffen (Liu *et al.*, 2001), die durch einen Überschuß an Reaktivfarbstoff erhalten wird. Obwohl hiermit homogene Derivate erzeugt werden können, besitzt ein vollständig mit Farbstoff substituiertes Protein aller Wahrscheinlichkeit nach völlig andere chromatographische Eigenschaften, wie das native Protein. Als weitere Nachteile können Löslichkeitsprobleme der Derivate und Quenching der Fluoreszenzfarbstoffe auftreten.

Demnach bleibt die Konjugation an Amine über NHS Ester im Allgemeinen die Methode der Wahl für die Erzeugung von Biokonjugaten. Die Biokonjugation via NHS Ester erzeugt generell keine homogen-derivatisierten Proteine, sondern der Farbstoff kann an eine Vielzahl von möglichen Konjugationsstellen binden. Theoretisch können bei  $n$  potentiellen Bindestellen  $2^n - 1$  Produkte entstehen (Craig und Dovichi, 1998).

Der Verlauf der Reaktion zwischen NHS Ester aktivierten Molekülen wie Fluoreszenzfarbstoffen und Proteinen wurde mit hochauflösenden analytischen Methoden wie Kapillarelektrophorese (engl. capillary electrophoresis, CE) (Banks und Paquette, 1995; Jing *et al.*, 2002; Craig und Dovichi, 1998; Pinto *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2002; Richards *et al.*, 1999; Stoyanov *et al.*, 2002), isoelektrischer Fokussierung (IEF) und SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Bingaman *et al.*, 2003; Stoyanov *et al.*, 2002), hoch auflösender Flüssigchromatographie (engl. high performance liquid chromatography, HPLC) (Liu *et al.*, 2001) und Massenspektrometrie (engl. matrix assisted laser desorption ionization – time of flight, MALDI-TOF) (Lu und Zenobi, 1999; Lu und Zenobi, 2000; Grunwaldt *et al.*, 2002) verfolgt. In jedem Fall wurde die Heterogenität der Produkte dokumentiert.

Eine Veränderung der Nettoladung mit zunehmendem Substitutionsgrad wurde mit CE nach Modifikation mit NHS aktivierter Essigsäure bestimmt (Anderson *et al.*, 2002; Gao und Whitesides, 1997). Dabei konnten die unterschiedlich stark substituierten Proteine eindeutig voneinander getrennt werden. Mit einigen Vereinfachungen (z.B. gleiche Reaktivität potentieller Bindestellen, gleiche Ladungszugänglichkeit nach Derivatisierung etc.) können die Ergebnisse über die Änderung der Nettoladung des Proteins erklärt werden: Durch die Derivatisierung des N-Terminus oder der Lysine eines Proteins mit NHS-Essigsäure werden positiv geladene Gruppen durch negativ geladene ersetzt. Dies führt zu einer Verringerung der Nettoladung des Proteins, welches mit geeigneten hochauflösenden Methoden detektiert werden kann. Daher ist durch die Derivatisierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen

immer mit einer Änderung der Nettoladung zu rechnen, wobei die Stärke der Änderung mit dem Substituierungsgrad korreliert.

Neben der Änderung der Ladung eines Proteins in Abhängigkeit der Anzahl der gebundenen Farbstoffe (engl. degree of labeling, DOL), kann der Substituierungsgrad auch die Signalstärke des Biokonjugats beeinflussen. Empirische Studien zeigen einen optimalen Substituierungsgrad hinsichtlich der Signalstärke eines Biokonjugates (Berlier *et al.*, 2003; Brinkley, 1992; Gruber *et al.*, 2000; Cox *et al.*, 2004). Mit zunehmenden DOL über das Optimum hinaus sinkt die Signalstärke wieder. Als Gründe für diese Effekte werden intermolekulares Quenching der Farbstoffmoleküle und Dimerisierungen der Fluoreszenzfarbstoffe genannt. Im Allgemeinen ist die Signalstärke, in Bezug auf das DOL eine Funktion des Proteins und des Farbstoffes, sodaß jedes Biokonjugat neu optimiert werden muß.

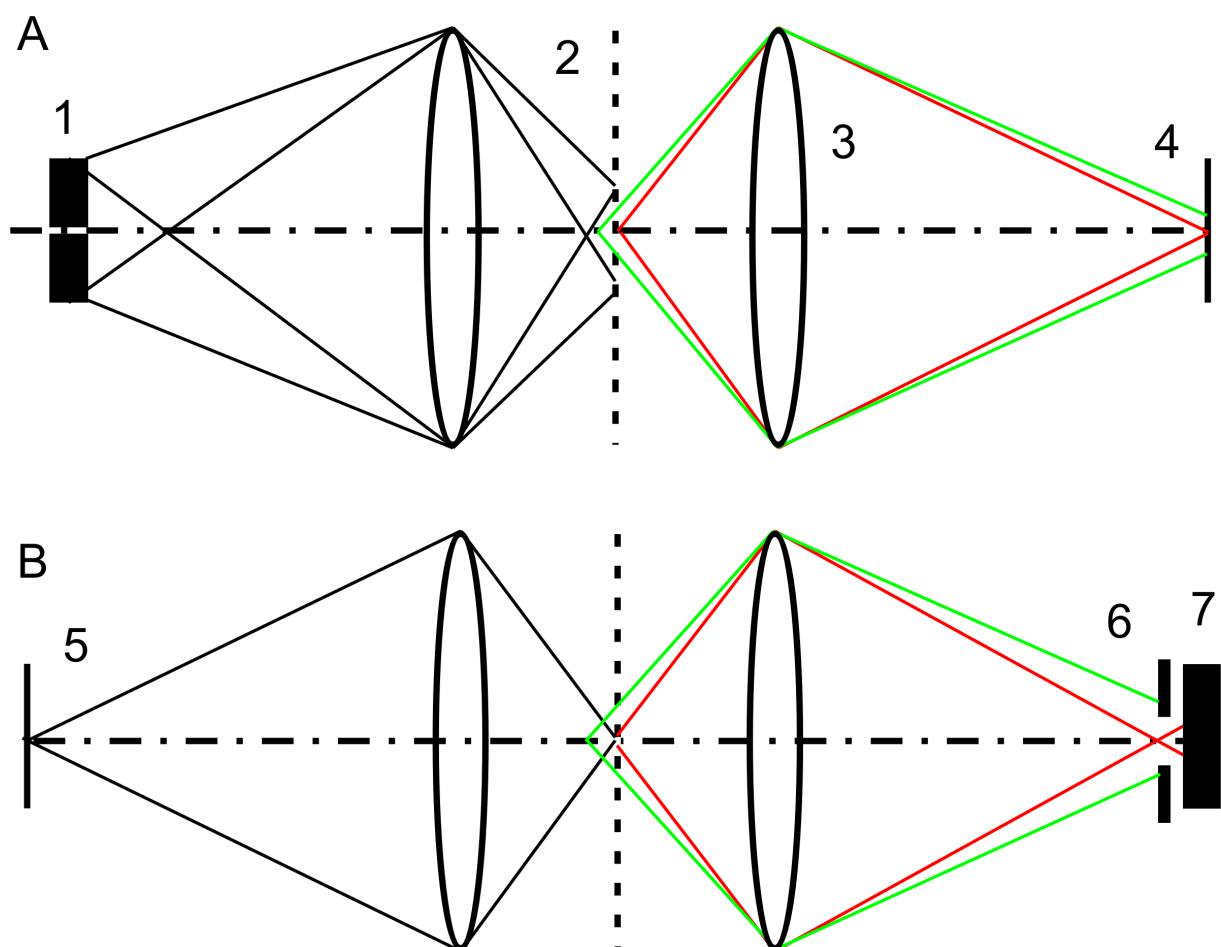
## **2.2 Mikroskopie**

Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über theoretische Aspekte der konfokalen Laser Raster Mikroskopie (CLSM) und deren technischen Realisierung sowie den Einsatz von CLSM in der Chromatographie.

### **2.2.1 Konfokale Laser Raster Mikroskopie**

Die konfokale Laser Raster Mikroskopie kann vereinfacht als bildgebendes Verfahren beschrieben werden, bei der Strukturen innerhalb von Objekten bis zu einer Eindringtiefe von ca. 100 µm abgebildet werden können. Die Fähigkeit der zerstörungsfreien Analyse von dreidimensionalen Objekten wird als „optisches Schneiden“ bezeichnet und ist ein Hauptgrund für die Popularität dieses bildgebenden Verfahrens in der Biologie und Materialwissenschaft. Neben der Fähigkeit, optische Schnitte zu erzeugen, besitzt ein CLSM auch eine höhere Auflösung sowohl in axialer als auch lateraler Richtung, die theoretisch dem beugungslimitierten Maximum mit sichtbarem Licht entspricht. Nahezu alle CLSM arbeiten als Fluoreszenzmikroskope. Typischerweise werden komplexe biologische Proben mit fluoreszenzmarkierten Molekülen konjugiert, um einen genügend hohen Kontrast und Informationsgehalt zu ermöglichen. Die Verwendung von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die simultane Messung zweier oder mehr orts aufgelöster Signale mittels CLSM.

Die Eigenschaften eines CLSM werden am deutlichsten, wenn sie verglichen werden mit herkömmlichen optischen (Fluoreszenz-) Mikroskopen. Beim konventionellen Lichtmikroskop (Abb. 2.5-A) wird das Lampenlicht (1) durch eine Kondensorlinse (2) auf das Objekt (gestrichelte Linie) fokussiert, und das vom Objekt ausgehende Licht wird durch die Objektivlinse (3) in die Zwischenbildebene (4) fokussiert. Das so entstehende Bild wird durch die Okularlinse betrachtet. Nicht nur Licht aus der Brennebene des Objektivs (rot), sondern auch unfokussiertes Licht aus Bereichen außerhalb der Brennebene (grün) erreicht bei diesem Mikroskop das Auge. Durch die Überlagerung von fokussiertem und unfokussiertem Licht ist die räumliche Auflösung des konventionellen Mikroskops eingeschränkt.



**Abbildung 2.5.** (A) Strahlengang eines konventionellen Weitfeldmikroskops. (B) Strahlengang eines konfokalen Laser Raster Mikroskops. 1 Lichtquelle (z.B. Halogen), 2 Kondensorlinse, 3 Objektiv, 4 Zwischenbildebene, 5 Punktlichtquelle (z.B. Laser), 6 Lochblende, 7 Lichtdetektor (z.B. Photovervielfacher).

Beim konfokalen Mikroskop (Abb. 2.5-B) wird Licht, das nicht aus der Brennebene des Objektivs kommt, ausgeblendet. Die Kondensorlinse wird durch eine Linse ersetzt, die mit der Objektivlinse identisch ist. Die Ausleuchtung des Objekts wird durch eine Punktlichtquelle realisiert (5), die auf dem Objekt scharf abgebildet wird. Eine Lochblende (6) beschränkt das Sichtfeld auf einen Punkt. Durch den symmetrischen Aufbau dieses



Systems sind die Lochblende und ein Punkt des Objekts in der Brennebene der Linsen konfokal. Der Durchmesser der Blenden wird so klein gewählt, daß Licht aus Bereichen des Objekts, die nicht in der Brennebene liegen (grün), nicht in die Apertur der Blende fallen und damit ausgeblendet werden. In die Photovervielfacher (PMT, 7) gelangt deshalb nur Licht aus der Brennebene des Objekts. Im Unterschied zum konventionellen Mikroskop erzeugt das konfokale Mikroskop also zunächst nur einen Bildpunkt, der genau einem Punkt aus der Brennebene des Objektivs entspricht. Um ein vollständiges Bild des Objekts zu erhalten, muß das Objekt Punkt für Punkt gerastert werden. Die dabei gesammelten Bildpunkte werden von einem Rechner zu einem vollständigen Bild zusammengesetzt.

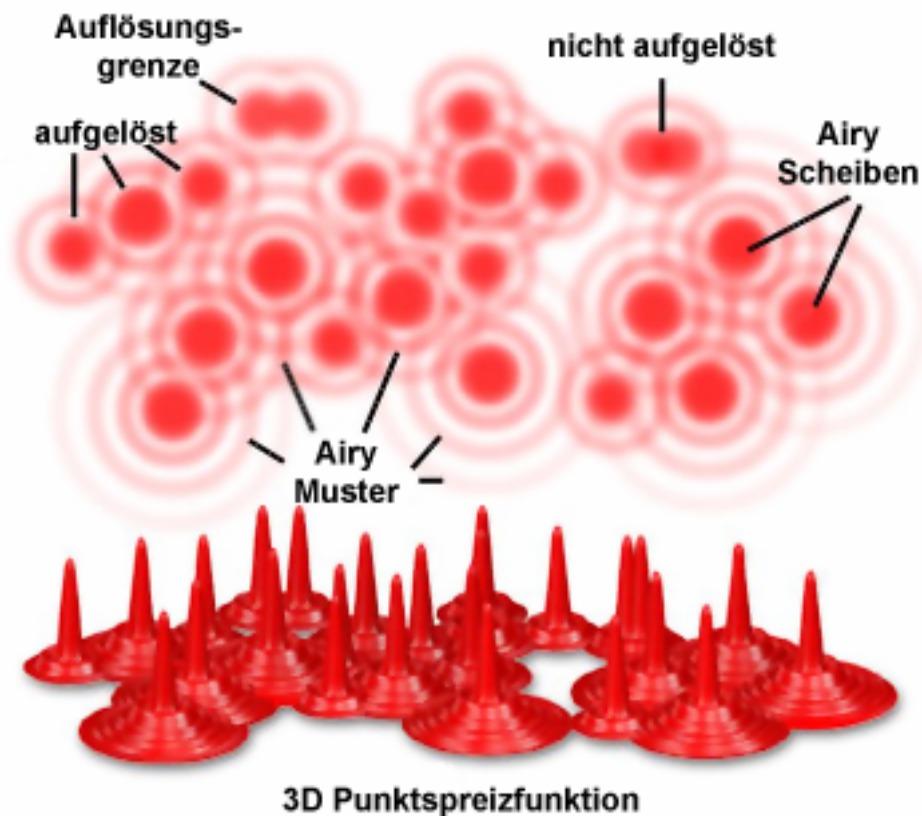
Die zwei Komponenten der Bildqualität sind Auflösung und Kontrast. Auflösung ist ein Maßstab für die Fähigkeit, nahestehende Punkte oder Linien als separate Objekte zu unterscheiden. Im Vergleich zu herkömmlicher Mikroskopie, verwendet CLSM Einzelpunktanregung, d.h. nur ein Punkt im Fokus wird angeregt und nur Licht aus dem fokalen Punkt wird detektiert. Dies bewirkt eine Erhöhung der theoretischen lateralen Auflösung ( $R_l$ ) bei CLSM um 30%, die definiert ist als (Pawley, 1995):

$$R_l = \frac{0.46 \cdot \lambda}{NA} \quad (2-2)$$

mit NA numerische Apertur des Objektivs und  $\lambda$  die Wellenlänge des Lichts. Die theoretische axiale Auflösung  $R_a$  in der CLSM ist gegeben als (Pawley, 1995):

$$R_a = \frac{8.5 \cdot \lambda}{8\pi \cdot n \cdot \sin^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)} \quad (2-3)$$

mit n als Brechungsindex und der Hälfte des Öffnungswinkel  $\alpha$  des anregenden Lichtkegels. Die bildgebenden Eigenschaften einer Linse können ganz allgemein in Form ihrer 3D Punktspreizfunktion (engl. point spread function, PSF) beschrieben werden (Abb. 2.6).



**Abbildung 2.6.** Airy Muster und Punktspreads zufällig angeordneter Punktobjekte. Verändert aus: [www.microscopyu.com](http://www.microscopyu.com).

Eine PSF ist das Intensitätsmuster bei Anregung oder Detektion idealer Punktobjekte in der fokalen Ebene eines Objektivs. Sie gibt die beugungsbedingten oder durch Abberationen hervorgerufen Änderungen in der Abbildung der Punkte an, deren Form als Airy Scheiben und Muster bezeichnet werden (siehe Abb. 2.6). Die PSF ist ein Maß für die Auflösung, weil zwei Punkte nur dann als aufgelöst wahrgenommen werden, wenn ihre PSFs hinreichend unterschiedlich sind. Das Rayleigh Kriterium besagt, daß zwei Punkte als aufgelöst gelten, wenn das erste Minimum der Airy Scheibe des ersten Punktes am zentralen Maximum der Airy Scheibe des zweiten Punktes ausgerichtet ist.

Die tatsächliche Auflösungsfähigkeit hängt sehr stark vom Kontrast und vom Meßrauschen ab (Hintergrundrauschen, Signalrauschen), sodaß die tatsächliche Auflösung meist durch das Signal-zu-Rauschen Verhältnis (engl. signal to noise ratio, SNR) limitiert ist. Die Stärke des CLSM ist, neben der höheren theoretischen Auflösung, die optimierte PSF durch das Vorhandensein der konfokalen Lochblende, die Hintergrundsignale unterbindet und den Kontrast erhöht.

In Abb. 2.7 ist der schematische Aufbau des Zeiss LSM 510 Mikroskops dargestellt. Das LSM 510 ist ein typischer Vertreter eines Einstrahl CLSM und wurde in dieser Arbeit

verwendet. Das LSM 510 basiert auf einem konventionellen optischen Mikroskop des Typs Axiovert 200. Es besteht aus Laserlichtquellen, die über ein intermediäres optisches System an ein Objektiv gekoppelt sind (Laser Module VIS). Als Lichtquellen kommen ein Argon Laser (Anregung bei 458, 477, 488 und 514 nm) und zwei Helium-Neon Laser (Anregung bei 543 und 633 nm) zum Einsatz. Das ausgestrahlte Licht wird im Lasermodul expandiert (nicht dargestellt), um das nachgeschaltete Objektiv vollständig mit Licht zu füllen, welches für die Erreichung der optimalen Auflösung nötig ist. Das expandierte Laserlicht wird durch eine Glasfaser in das Rastermodul auf den Hauptfarbteiler (engl. main dichroic beam splitter, MDBS) projiziert, von dem das Laserlicht reflektiert wird. Über eine galvanometrische Spiegel xy-Rastereinheit gelangt das Licht durch den Tubus auf das Objektiv. Dort wird das Laserlicht zur Fluoreszenzanregung auf das Objekt fokussiert. Das LSM 510 ist ein Epifluoreszenzmikroskop, d.h. das Objektiv wird sowohl für die Fokussierung des Anregungslichts als auch für die Sammlung des emittierten Lichts verwendet. Das emittierte Licht passiert den MDBS und evtl. vorhandene weitere Farbteiler oder Filter und wird auf die konfokale Lochblende fokussiert. Hinter den Lochblenden sind die PMT's angeordnet, die das Licht in ein elektrisches Signal umwandeln.

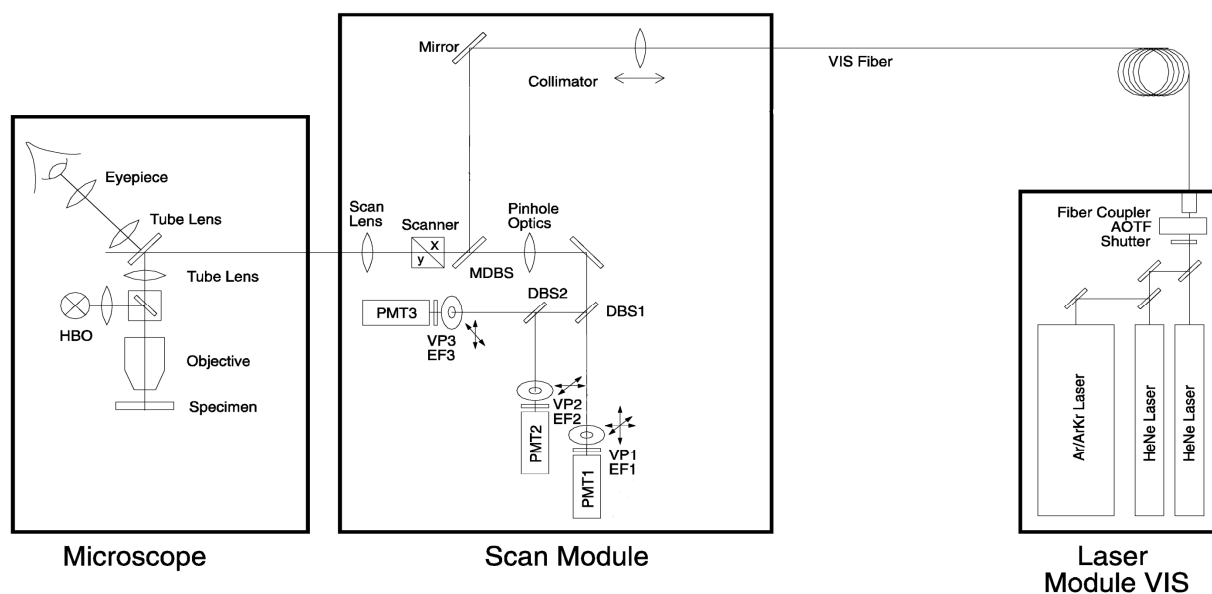


Abbildung 2.7. Schematischer technischer Aufbau des Zeiss LSM 510 mit drei Lasern und PMT.

### 2.2.2 Einsatz von CLSM in der Chromatographie

Der Einsatz von CLSM Untersuchungen im Bereich der Chromatographie konzentrierte sich anfänglich auf die Messung der intrapartikulären Proteinverteilung in Einkomponentensystemen unter adsorptiven Bedingungen mit Batch Versuchen (Ljunglöf und Hjorth, 1996; Ljunglöf und Thömmes, 1998; Linden *et al.*, 2002).

Desweiteren wurde auch die Verteilung von immobilisierten Enzymen oder Liganden in (Agarose-) Materialien (Larsson *et al.*, 2003; Larsson *et al.*, 2002; Malmsten *et al.*, 1999; Ljunglöf *et al.*, 2000), der intrapartikuläre pH-Wert (Heinemann *et al.*, 2003) sowie die Adsorption von DNA auf chromatographischen Trägern (Ljunglöf *et al.*, 1999) mittels CLSM untersucht. Die Technik der CLSM in der Proteinchromatographie wurde auch auf Zweikomponentensysteme ausgeweitet (Linden *et al.*, 1999). Eine Erweiterung der statischen Einzelpartikelanalytik in der Chromatographie stellen die Untersuchungen zu Proteintransport- und Adsorptionsprozessen in gepackten Betten dar (Hubbuch *et al.*, 2002; Hubbuch *et al.*, 2003). Durch die Verwendung von Mikrosäulen, die für den Einsatz auf CLSM Trägertischen geeignet sind, können chromatographische Partikel an bestimmten Positionen innerhalb der Säule untersucht werden. Diese Technik erlaubt es, über einen längeren Zeitraum hinaus einen bestimmten Partikel zu scannen und kann damit typische chromatographische Operationen wie Gelfiltration oder Durchbruchkurven abbilden. Ergebnisse der dynamischen Untersuchungen wurden zur Entwicklung von neuen Proteintransportmodellen herangezogen (Dzienniek *et al.*, 2003; Liapis *et al.*, 2001). Erste Untersuchungen wurden auch zur Charakterisierung von Membranen und zum Transport von Fluoreszenzfarbstoffen in Proteinkristallen durchgeführt (Dai und Barbari, 2000; Charcosset und Bernengo, 2000; Reichert *et al.*, 2002; Cvetkovic *et al.*, 2005; Cvetkovic *et al.*, 2005; Cvetkovic *et al.*, 2004; Cvetkovic *et al.*, 2004).

### **2.3 Stofftransport und Adsorption in chromatographischen Materialien**

Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über die Stofftransport- und Adsorptionsphänomene in der Proteinchromatographie und zeigt die Verknüpfungen der einzelnen Untersuchungsmethoden, die in dieser Studie mittels CLSM etabliert wurden, mit den Vorgängen in der Chromatographie auf.

Chromatographische Materialien sind i.d.R. sphärische, poröse Partikel mit einem Durchmesser von ca. 2 bis 200  $\mu\text{m}$ . In der Proteinchromatographie bestehen die Medien häufig aus hydrophilen Grundbausteinen, wie z.B. Agarose, und werden wegen ihres großen Anteils an Wasser als Hydrogele bezeichnet. In Abbildung 2.8 sind schematisch die, für den jeweiligen Maßstab, relevanten Stofftransport- und Adsorptionsprozesse für Proteine in der Chromatographie dargestellt.

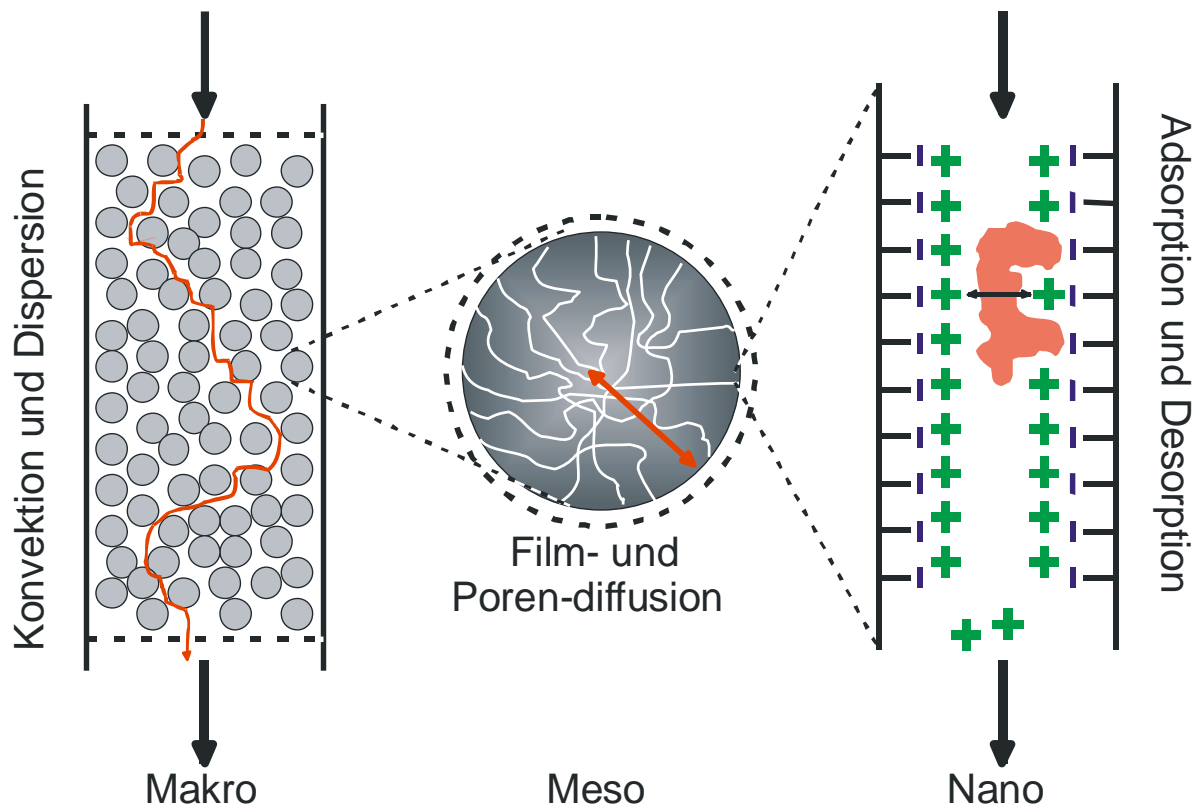


Abbildung 2.8. Schematische Übersicht der Stofftransportvorgänge in der (Ionenaustausch-) Chromatographie.

Im Makromaßstab betrachtet man die gesamte gepackte Säule, die aus Partikeln und Partikelzwischenraum besteht. Die mobile Phase mit gelöstem Protein wird mittels einer Pumpe durch das gepackte Bett gefördert. Die relevanten Stofftransportvorgänge im Makromaßstab sind die Konvektion und die Dispersion (siehe Kapitel 2.7.4). Der Einfluß der Diffusion in axialer und radialer Richtung ist i.d.R. vernachlässigbar (Lin und Guiochon, 2003).

Betrachtet man die Nahumgebung um einen Partikel im gepackten Bett (Mesomaßstab), spielen Verteilungseffekte und die Film- und Porendiffusion für Proteine eine dominierende Rolle. Die Filmdiffusion ist der Stoffübergang von der Bulkphase in den äußersten Rand des Partikels. Dabei umgibt das Partikel modellhaft ein Film, in der sich die mobile Phase nicht bewegt und durch die ein rein diffusiver Stoffübergang erfolgt. Die Dicke des Films wird durch die Hydrodynamik bestimmt (Lin und Guiochon, 2003). Nach dem Übergang von der Bulkphase durch den Film an den Partikelrand befindet sich das Protein in einer porösen Matrix. Unter nicht-bindenden Bedingungen bestimmt der Gleichgewichtsverteilungskoeffizient die Verteilung des Proteins innerhalb der porösen Matrix (siehe Kapitel 2.4). Vereinfacht können solche porösen, chromatographischen Matrices als Ansammlung von zylindrischen Poren unterschiedlicher Größe angesehen werden, durch die das Protein diffundieren muß, weswegen man beim Stofftransport in

chromatographischen Materialien von Porendiffusion spricht (Lin und Guiochon, 2003; Cussler, 1997). Die Porendurchmesser sind für nahezu alle Materialien so klein, daß keine Konvektion zum Stofftransport beiträgt (Potschka, 1993; Lin und Guiochon, 2003; Cussler, 1997). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in chromatographischen Prozessen mit Proteinen ist nahezu immer die langsame Porendiffusion, d.h. die Leistung einer chromatographischen Trennung wird maßgeblich durch die Stofftransporteigenschaften der porösen Phase bestimmt (Lin und Guiochon, 2003; siehe Kapitel 2.5). Die Größenausschlußchromatographie trennt Moleküle aufgrund ihres unterschiedlichen Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten innerhalb eines gepackten Bettes. Dabei spielen adsorptive Wechselwirkungen (idealerweise) keine Rolle und die Trennleistung wird durch den intrapartikulären Transport und die Verteilungseigenschaften bestimmt (siehe Kapitel 2.6).

Die Adsorption und Desorption sind die relevanten Ereignisse im Nanomaßstab. Unter bindenden Bedingungen findet eine Anlagerung von Proteinen an Liganden an der Oberfläche der Porenwände statt. Bei der Ionenaustauschchromatographie unterscheidet man je nach Ladung der Liganden zwischen Kationen- oder Anionentauschern (siehe Kapitel 2.7.1). Die Gleichgewichtseinstellung der Bindung wird durch die Adsorptionsisotherme beschrieben (siehe Kapitel 2.7.2) und aus dem Zusammenspiel zwischen Adsorption und Stofftransport kann die Beladung der Partikel über geeignete Modelle beschrieben werden (siehe Kapitel 2.7.4). Bei Änderung der Eigenschaften der mobilen Phase, wie z.B. einem Anstieg der Salzkonzentration oder durch Verdrängungsprozesse durch andere Proteine, wird die Bindung eines Proteins wieder gelöst und es desorbiert (siehe 4.9).

## 2.4 Gleichgewichtsverteilungskoeffizient

Die Gleichgewichtsverteilung eines Makromoleküls zwischen einer Lösung und einem porösen oder fibrösen Raum wird durch den Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten  $\Phi$  beschrieben:

$$\Phi = \frac{c_{\text{Partikel}}}{c_{\text{bulk}}} \quad (2-4)$$

mit der Konzentration  $c_{\text{bulk}}$  des Makromoleküls in Lösung und  $c_{\text{Partikel}}$  im porösen Raum. In polymeren Gelen oder fibrösen Materialien entspricht  $c_{\text{Partikel}}$  der volumengemittelten

Konzentration, die das Materialvolumen mit einschließt (Lazzara *et al.*, 2000). Der Verteilungskoeffizient  $K_{av}$  ist definiert als Verhältnis der Gleichgewichtskonzentration  $c_{Partikel}$  und  $c_{bulk}$  und entspricht der oben genannten Definition von  $\Phi$ . Teilweise wird  $c_{Partikel}$  als Proteinkonzentration im Porenraum definiert und das Verhältnis zwischen  $c_{bulk}$  und  $c_{Partikel}$  als  $K_D$  bezeichnet. Demnach strebt  $K_D$  für unendlich kleine Substanzen gegen 1, wohingegen  $K_{av}$  bzw.  $\Phi$  gegen die Partikelporosität  $\varepsilon_p$  strebt (vgl. Williams *et al.*, 1998). Bei stationären Bedingungen in Abwesenheit von Triebkräften außer einem Konzentrationsgradienten und bei niedrigen Makromolekülkonzentrationen gilt für den diffusiven Flux  $J$  durch einen porösen Körper:

$$J = \frac{\Phi \varepsilon D}{l} \Delta c \quad (2-5)$$

mit Porosität  $\varepsilon$ , Porendiffusionskoeffizienten  $D$ , Porenlänge  $l$  und Konzentrationsdifferenz  $\Delta c$  (Biesheuvel *et al.*, 2004). Der Flux, bei gegebenen Materialeigenschaften  $\varepsilon$  und  $l$  und dem Konzentrationsgradienten, hängt demnach nur von  $D$  und  $\Phi$  ab.  $\Phi$  spielt eine entscheidende Rolle für die Leistung von Membransystemen und chromatographischen Trennungen, insbesondere der Größenausschlusschromatographie (engl. size exclusion chromatography, SEC) (Burns und Zydney, 2001; Pujar und Zydney, 1997; Pujar und Zydney, 1998) (siehe auch Kapitel 2.6).

#### 2.4.1 Modellierung der Gleichgewichtsverteilung von Makromolekülen in porösen Medien

Gleichgewichtsmodelle bilden die Basis für die Beschreibung des Verhältnisses zwischen Makromolekülgröße und -form sowie Festphaseneigenschaften wie Porosität, Porenradius und Porengrößenverteilung. Die Theorie von Renkin basiert auf simplen, geometrischen Überlegungen zur Verteilung von sphärischen Molekülen in zylindrischen Poren, und bringt den Molekülradius  $r_s$  mit dem Porenradius  $r_p$  in Verbindung (Pappenheimer *et al.*, 1951):

$$\Phi = \varepsilon_p \left( 1 - \frac{r_s}{r_p} \right)^2 \quad (2-6)$$

mit  $\varepsilon_p$  als Partikelporosität. Diese Korrelation gilt nur für  $(r_s/r_p) < 0.6$  und der Exponent nur für zylindrische Poren.

Die Theorie von Ogston beschreibt die Eigenschaften von Gelen als ein zufällig angeordnetes Netzwerk von langen, harten Stäben (Ogston, 1958). Der Verteilungskoeffizient eines Makromoleküls mit Radius  $r_s$  in einer Matrix von langen, zylindrischen Fasern mit Radius  $r_f$  wird nach Ogston beschrieben mit:

$$\Phi = \exp\left[-(1 - \varepsilon_p)\left(1 + \frac{r_s}{r_f}\right)^2\right] \quad (2-7)$$

Abweichungen vom idealen, sterischen Verhalten wurden in der Literatur beschrieben (Hussain *et al.*, 1991; Lee und Whitaker, 2004; Dubin *et al.*, 1993; Potschka, 1991; Guo *et al.*, 2003). Als Gründe für die Abweichungen wurden adsorptive oder abstoßende Interaktionen zwischen den Makromolekülen und der stationären Phase genannt. Auch wenn Moleküle, die für eine Kalibrierung verwendet werden, nicht zu einer homologen Serie gehören, können die Molekülradien, auf die sich alle Theorien beziehen, fehlinterpretiert werden.

Die meisten chromatographischen Materialien besitzen eine Porengrößenverteilung, was für die Anwendung von Gleichung 2-6 und 2-7 bedeutet, daß gefundene Porenradien Mittelwerte der Porengrößenverteilung darstellen (Hagel *et al.*, 1996).

#### 2.4.2 Elektrostatische Einflüsse auf den Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten

Elektrostatische Interaktionen führen bei  $\Phi$  zu einer Abweichung vom idealen sterischen Verhalten, welches in der Literatur dokumentiert wurde (Potschka, 1991; Zhu *et al.*, 2001; Johnson und Deen, 1996; Pujar und Zydney, 1998; Tarvers und Church, 1985). Elektrostatische Kräfte beeinflussen die Verteilung von geladenen Makromolekülen durch anziehende und abstoßende Kräfte entweder zwischen den Molekülen selbst oder den Porenwänden (Smith und Deen, 1980). Die Ionenstärke und der pH haben einen großen Einfluß auf die Interaktionen von geladenen Makromolekülen mit einer geladenen Porenwand. Die Abnahme des Verteilungskoeffizienten, wenn repulsive Ladungsinteraktionen dominieren, wurde mit einer Abnahme des apparenten Porendurchmessers oder dem Anstieg des effektiven Molekülradius beschrieben (Potschka, 1991; Potschka, 1993; Guo *et al.*, 2003). Eine allgemeine Erweiterung von Gleichung 2-6, die elektrostatische Interaktionen mit einschließt ist:



$$\Phi = \left(1 - \frac{r_s}{r_p}\right)^2 \exp\left(-\frac{\psi_e}{kT}\right) \quad (2-8)$$

mit der elektrostatischen potentiellen Energie  $\psi_e$  und den sterischen Einflüssen analog zu Gleichung 2-6 vor dem exponentiellen Term (Pujar und Zydney, 1998). Smith und Deen haben die elektrostatische potentielle Energie eines sphärischen Moleküls in einer zylindrischen Pore ausgewertet, in dem die linearisierte Poisson-Boltzmann Gleichung gelöst wurde. Einflussgrößen auf  $\psi_e$  wurden beschrieben als:

$$\psi_e = A_1 \sigma_s^2 + A_2 \sigma_p^2 + A_3 \sigma_s \sigma_p \quad (2-9)$$

mit  $\sigma_s$  und  $\sigma_p$  als Oberflächenladungsdichten des Moleküls und der Porenwand und den Koeffizienten  $A_1$  bis  $A_3$ , die von der Ionenstärke und vom Poren- und Molekülradius abhängen. Die drei Terme in Gleichung 2-9 stehen für die drei unabhängigen Beiträge zur elektrostatischen potentiellen Energie: der Verformung der elektrischen Doppelschicht um das Molekül durch die Pore, die Verzerrung der elektrischen Doppelschicht an der Porengrenzschicht durch das Molekül und Ladungsinteraktionen zwischen Molekül und Porenwand.

## 2.5 Diffusion in chromatographischen Materialien

Im Unterschied zur Diffusion von Makromolekülen in einer homogenen Lösung spricht man bei der Diffusion in räumlich beschränkten Medien von behinderter Diffusion (Amsden, 1998; Cussler, 1997).

Der Prozeß der Diffusion ist verantwortlich für die Bewegung von Materie von einem Teil eines Systems in ein anderes aufgrund von zufälligen, molekularen Bewegungen. In Gasen ist die Diffusion schnell (10 cm/min), wohingegen sie in Flüssigkeiten (0.05 cm/min) oder Feststoffen (0.00001 cm/min) viel langsamer ist (Cussler, 1997). Es existieren hinreichend genaue Theorien zur Beschreibung der Diffusion in Gasen und Flüssigkeiten. Die Theorie der Diffusion in Feststoffen ist hingegen noch nicht zufriedenstellend entwickelt. Diffusion in polymeren Phasen nimmt eine Stellung zwischen Feststoffen und Flüssigkeiten ein. Aufgrund der Komplexität von porösen Körpern ist es immer noch eine Herausforderung theoretische

Vorhersagen über diffusive Eigenschaften von Makromolekülen in polymeren Phasen zu treffen (Cussler, 1997; Amsden, 1998). Im Folgenden werden Modelle für die Beschreibung des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten vorgestellt.

### 2.5.1 Modellierung der Diffusion in chromatographischen Materialien

Es existierten Modelle und Theorien zur Beschreibung des Diffusionskoeffizienten von Makromolekülen in porösen Medien (Tyn und Gusek, 1990; He und Niemeyer, 2003; Amsden, 1998; Masaru und Zhu, 1999). Generell wird bei allen Modellen versucht, eine Beziehung zwischen dem Quotienten  $D/D_0$ , zusammengesetzt aus dem Verhältnis von behinderter Diffusion  $D$  und freier Diffusion  $D_0$ , und der Molekülgröße herzustellen (Amsden, 1998). Neben phänomenologischen Erklärungsversuchen wird auch versucht, die Absenkung der Diffusion als Funktion diskreter Festphaseneigenschaften zu formulieren. Im Moment ist kein Modell generell in der Lage verlässliche Aussagen über die behinderte Diffusion in porösen Medien für eine Reihe von Molekülen und Geltypen zu treffen. Die physikalische Bedeutung der benötigten Anpassungsparameter ist dabei teilweise unklar, was für den empirischen Charakter der Modelle spricht (Amsden, 1998).

Das Renkin Modell (Pappenheimer *et al.*, 1951; Renkin, 1954) ist ein empirisches Modell, basierend auf dem Verhältnis zwischen dem Radius der Polymerfaser  $r_f$  und des Molekülradius  $r_s$ :

$$\frac{D}{D_0} = 1 - 2.10444 \frac{r_s}{r_f} + 2.08877 \left( \frac{r_s}{r_f} \right)^3 - 0.94813 \left( \frac{r_s}{r_f} \right)^5 - 1.372 \left( \frac{r_s}{r_f} \right)^6 + 3.87 \left( \frac{r_s}{r_f} \right)^8 - 4.19 \left( \frac{r_s}{r_f} \right)^9 \quad (2-10)$$

wobei analog zum Verteilungskoeffizient (Kapitel 2.4), die Gleichung nur für  $r_s/r_f \leq 0.6$  gilt.

Einen phänomenologischen Ansatz verfolgt das Ogston Modell (Ogston *et al.*, 1974), bei dem die Diffusion eines Makromoleküls durch ein poröses Medium aus einer Folge von zufälligen Einheitsschritten besteht. Ein Schritt kann nicht stattfinden, wenn das Molekül eine Polymerkette erreicht. Das quervernetzte Polymergerüst wird als zufälliges Netzwerk gerader, langer Fasern mit vernachlässigbarer Breite angenommen. Das Molekül ist eine harte Kugel. Der Einheitsschritt ist der mittlere quadratische Durchmesser der kugelförmigen Räume zwischen dem Fasernetzwerk. Das Verhältnis von freiem zu behindertem Diffusionskoeffizient nach Ogston stellt sich wie folgt dar:

$$\frac{D}{D_0} = \exp\left(-\frac{(r_s + r_f)}{r_f} \sqrt{\phi}\right) \quad (2-11)$$

mit der Partikelporosität  $\phi$ .

### **2.5.2 Einfluß der Proteinkonzentration auf den intrapartikulären Diffusionskoeffizienten**

Die oben genannten Ausführungen zur Diffusion von Makromolekülen in porösen Medien beziehen sich auf verdünnte Lösungen, d.h. Lösungen, bei denen Einflüsse von Protein-Protein Wechselwirkungen auf den Stofftransport vernachlässigbar sind. In konzentrierteren Lösungen weicht das Diffusionsverhalten, ab einer kritischen Konzentration, von dem aus verdünnten Lösungen ab. Der Einfluß der Proteinkonzentration auf den intrapartikulären Diffusionskoeffizienten ist, ähnlich wie die Diffusion in porösen Körpern selbst, theoretisch noch wenig verstanden. In der Literatur wurde die Abhängigkeit der Diffusion von Proteinen in porösen Medien von der Proteinkonzentration wenig untersucht. Es zeigte sich sowohl ein Anstieg des Diffusionskoeffizienten, bezogen auf eine verdünnte Lösung (Buck *et al.*, 1999) als auch ein Abfall (Coffman *et al.*, 1997). In einem ähnlichen Versuch zur Untersuchung der behinderten Diffusion von Natriumpolystyrensulfonat in Anwesenheit von höhermolekularen Polystyrensulfonaten wurde ebenfalls ein Abfall von  $D_{ip}$  dokumentiert, der anfänglich stark und bei höheren Konzentrationen weniger stark fällt (Cong *et al.*, 2005). Ein mechanistischer Ansatz zur Beschreibung der Konzentrationsabhängigkeit stammt von Buck *et al.* (1999). Darin wird beschrieben, daß die Anwesenheit der Polymerfasern die effektive Proteinkonzentration, und damit die thermodynamische Triebkraft, erhöht, sowie der hydrodynamische Widerstand durch Protein-Protein Wechselwirkungen verringert wird. Als Nettoeffekt ist eine Erhöhung des Diffusionskoeffizienten mit steigender Proteinkonzentration zu beobachten. Entgegenzusetzen ist die intuitivere Erkenntnis, daß sich mit steigender Proteinkonzentration die Nettobehinderung durch andere Proteine erhöht und es somit zu einer Verringerung der Diffusion kommt.

## 2.6 Größenausschlusschromatographie

Größenausschlusschromatographie (engl. size exclusion chromatography, SEC) trennt Moleküle aufgrund ihrer Größe. Im Gegensatz zu adsorptiven Methoden wie der Ionenaustauschchromatographie binden Moleküle (idealerweise) nicht an die verwendeten chromatographischen Festphasen. Die verwendeten Stationärphasen bestehen aus einer porösen Matrix, die hinsichtlich ihrer chemischen und physikalischen Stabilität und ihrer Inertheit ausgewählt werden (Janson und Ryden, 1998; Ladish, 2001). Bei einer gepackten SEC Säule unterscheidet man zwischen dem totalen Säulenvolumen  $V_t$  und dem Totvolumen  $V_0$ . Das totale Säulenvolumen beinhaltet das Zwischenkornvolumen und das Partikelvolumen, wohingegen das Totvolumen dem Zwischenkornvolumen entspricht. Moleküle, die aufgrund ihrer Größe nicht in die poröse Matrix eindringen können, eluieren im Totvolumen der Säule. Kleinere Moleküle verteilen sich, in Abhängigkeit ihrer Größe (vgl. Kapitel 2.4), zwischen dem Zwischenkornvolumen und dem Porenraum der Partikel, sodaß sie später eluieren. Sehr kleine Moleküle wie Salze oder Fluoreszenzfarbstoffe besitzen einen Verteilungskoeffizienten von näherungsweise eins, d.h. sie dringen vollständig in den Porenraum ein, und eluieren daher kurz vor dem gesamten Säulenvolumen. Die Trennung in der SEC beruht auf der wiederholten Gleichgewichtseinstellung zwischen mobiler Phase und poröser Matrix (Ladish, 2001). Die Auflösung in der SEC wird durch das Verhältnis von Proben- zu Säulenvolumen, Säulenabmessungen, Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung, Packungsdichte, Porengröße der Partikel, Fließgeschwindigkeit und der Viskosität der Probe beeinflusst (Janson und Ryden, 1998; Ladish, 2001). Die Bandbreite der Molekulargröße, die ein bestimmtes Medium trennen kann, wird durch die Selektivitätskurve beschrieben (Janson und Ryden, 1998; Ladish, 2001). Die Auflösung wird sowohl von der Selektivität des Mediums als auch von der Effizienz des Mediums bestimmt (Janson und Ryden, 1998; Ladish, 2001). Das Injektionsvolumen für analytische Trennungen sollte 2% des totalen Bettvolumens nicht übersteigen, wohingegen für Gruppentrennungen (z.B. Salz von Makromolekülen) bis zu 30% des Bettvolumens verwendet werden kann (Janson und Ryden, 1998). Die Viskosität einer Probe kann ab einem bestimmten Wert zu Flußinhomogenitäten führen (Homsy, 1987). Es existieren eine Reihe von Gelfiltrationsmedien, die für bestimmte Trennbereiche optimiert wurden. Die Auswahl des geeigneten Mediums erfolgt über die Selektivitätskurve der Stationärphase, die eine Auftragung von  $K_{av}$  gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes ist (Janson und Ryden, 1998; Ladish, 2001). Die Selektivität wird, wie schon in Kapitel 2.4 dargestellt, durch die Porengröße bzw. Porengrößenverteilung bestimmt, wenn man nicht-

ideale Interaktionen zwischen der zu trennenden Probe und der Matrix ausschließt. Der Fraktionierungsbereich ist der lineare Bereich der Selektivitätskurve. Die Ausschlußgrenze stellt die Molekulargröße dar, die keinen Zugang zur porösen Matrix der Festphase besitzt und nur im Zwischenkornvolumen transportiert wird. Die Auflösung in der SEC wird von der Packungs- und Injektionsqualität sowie Flußhomogenität beeinflusst, weil die Trennung nur über ein Säulenvolumen stattfinden kann und damit der Einfluß der Peakdispersion auf die Trennung stark ist.

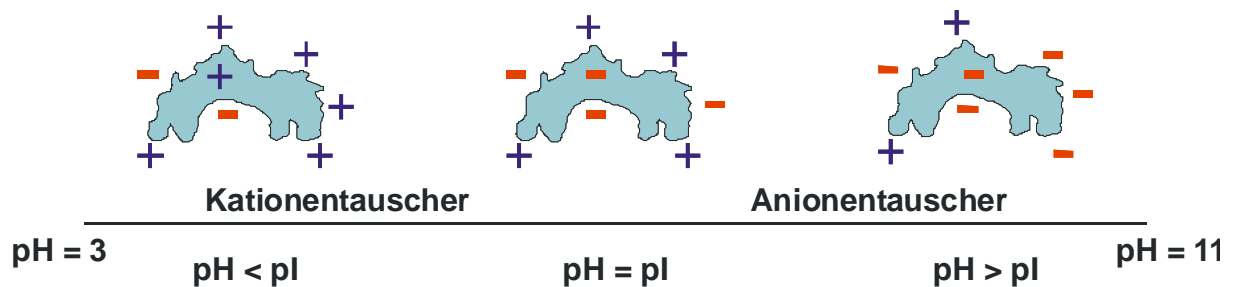
Die Modellierung von SEC Trennungen benötigt Informationen über die Konvektion, axiale Dispersion, Filmdiffusion, den intrapartikulären Diffusionskoeffizienten und den Verteilungskoeffizienten (Li *et al.*, 1998). Es stellt insofern eine Vereinfachung der Modelle dar, die ausführlich in Kapitel 2.7.4 dargestellt werden, weil keine Adsorption der Proteine an die Matrix stattfindet.

Es existieren eine Reihe von spezialisierten Medien für die SEC Trennung von Proteinen, die auf quervernetztem Dextran (Sephadex) oder Agarose (Sepharose und Superose) basieren. In dieser Studie wurde das Gelfiltrationsmaterial Superdex 200 prep grade für eine Untersuchung der Transportvorgänge während einer SEC Trennung verwendet. Superdex ist ein Kompositmedium, das auf einer hoch-quervernetzten Agarosematrix mit kovalent verknüpften Dextranketten basiert (Drevin *et al.*, 1990; Drevin *et al.*, 1991; Kagedal *et al.*, 1991; Hellberg *et al.*, 1996). Die mechanische Stabilität wird durch die Agarosematrix bestimmt, wohingegen die Selektivität maßgeblich durch die Dextranketten beeinflusst wird. Der Partikeldurchmesser des prep grade Mediums beträgt 34 µm und ist konzipiert für die Trennung von Proteinen im Bereich zwischen 10 und 600 kDa (Drevin *et al.*, 1991; Kagedal *et al.*, 1991). Der Porenradius wird mit 13 nm angegeben (Hagel *et al.*, 1996).

## **2.7 Ionenaustauschchromatographie von Proteinen**

Die Ionenaustauschchromatographie wird häufig in der Aufreinigung von Proteinen in der biotechnologischen Industrie angewendet. Nahezu jede Aufreinigungsstrategie für industrielle und pharmazeutische Proteine enthält mindestens einen Ionentauscherschritt (Janson und Ryden, 1998; Ladish, 2001). Ionenaustauschchromatographie ist charakterisiert durch relativ milde Bindungs- und Elutionsbedingungen, was sie attraktiv für die Proteinaufarbeitung macht. Im Gegensatz zu affinitätschromatographischen Materialien, die i.d.R. eine höhere Selektivität besitzen, sind Ionenaustauschmaterialien ca. um den Faktor 100 günstiger (Ladish, 2001). Die wichtigen Einflussgrößen auf eine Trennung sind der pH-Wert und die

Ionenstärke, durch die die Selektivität beeinflusst wird (Janson und Ryden, 1998; Ladish, 2001; Yamamoto, 1988). Die Basis für einen Ionenaustauschprozess ist die Konkurrenz des Proteins und eines Salzes um Bindungsstellen auf der Oberfläche eines Ionentauschers. Die Bindungsstärke ist proportional zur Ladung auf dem Protein, die entgegengesetzt zur Ladung der Liganden auf dem Ionentauscher ist. Ein einfaches Konzept zur Abschätzung der Bindungsstärke für Proteine auf Ionentauschern ist das Nettoladungsmodell (Kopaciewicz *et al.*, 1983) (siehe Abb. 2.9):

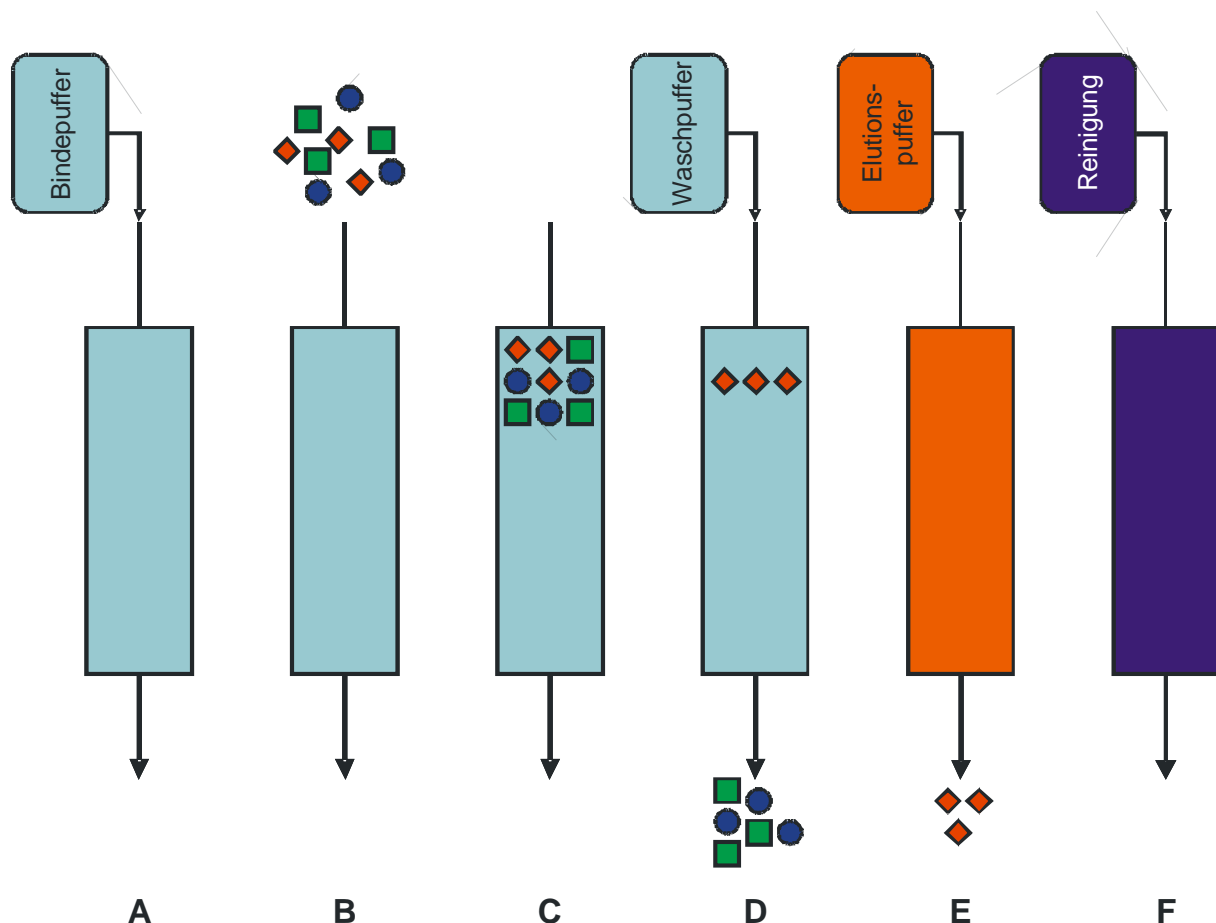


**Abbildung 2.9. Nettoladungsmodell in der Ionenaustauschchromatographie. Die Nettoladung des Proteins ändert sich in Abhängigkeit des pH-Wertes. Geeignete Ionentauscher in Abhängigkeit der Nettoladung werden aufgezeigt.**

Proteine sind amphotere Makromoleküle. D.h. sowohl negativ als auch positiv geladene Aminosäuren sind im Molekül vereint. Aminosäuren besitzen  $pK_a$ -Werte im Bereich von 4.5 bis 12, deren exakter Wert durch die Anwesenheit benachbarter Aminosäuren in der komplexen, dreidimensionalen Struktur des Proteins moduliert werden (Tanford und Kirwood, 1957; Tanford, 1961). Je nach pH-Wert ändert sich die Nettoladung des Proteins durch das Säure-Base Gleichgewicht der Aminosäuren des Proteins. An einem bestimmten pH-Wert gleicht sich die Summe aller negativen und positiven Ladungen aus, sodass das Protein eine Nettoladung von 0 besitzt. Dies ist der isoelektrische Punkt des Proteins. Das Nettoladungsmodell für die Ionenaustauschchromatographie besagt, daß ein Protein bei einem pH-Wert unterhalb des isoelektrischen Punkts an einen Kationentauscher bindet, und entsprechend oberhalb des  $pI$ 's an einen Anionentauscher. Die Bindung am  $pI$  ist minimal (Janson und Ryden, 1998; Ladish, 2001; Yamamoto, 1988). Das Nettoladungsmodell ist ein stark vereinfachtes Konzept zur Beschreibung des Einflusses des pH-Werts auf die Bindung in der Ionenaustauschchromatographie. Die Bindung an einen Ionentauscher korreliert nur bedingt mit der Nettoladung, sondern vielmehr mit der diskreten Ladungsverteilung und – zugänglichkeit auf der Proteinoberfläche (Kopaciewicz *et al.*, 1983). Es existieren Beispiele, in denen Proteine an ihrem  $pI$ , als auch bei einem pH-Wert über dem  $pI$  an einen Kationentauscher und entsprechend umgekehrt an einen Anionentauscher binden (Kopaciewicz *et al.*, 1983). Aufgrund der Komplexität der Struktur von Proteinen und der damit verbundenen Schwierigkeiten, Ladungsverteilungen und -zugänglichkeiten zu

berechnen, ist das Nettoladungsmodell dennoch ein guter Startpunkt für die Auswahl eines geeigneten pH-Wertes (Kopaciewicz *et al.*, 1983). Wegen der Bedeutung des pH-Wertes für die Proteinadsorption, werden Proteintrennungen mit Ionentauschern nahezu ausschliesslich mit gepufferten Lösungen durchgeführt (Ladish, 2001). Die Ionenstärke beeinflusst die Bindungsstärke durch die Adsorptionskonkurrenz mit den geladenen Liganden. Der Einfluss eines Salzes auf die Bindungsstärke eines Proteins an einen Ionentauscher ist individuell verschiedenen, aber generell sinkt die Adsorptionskapazität für ein Protein mit steigender Ionenstärke (Yamamoto, 1988). Der Einfluss der Salzkonzentration auf die Proteinadsorption wird detailliert im sterischen Massenwirkungsmodell (Kapitel 2.7.2) berücksichtigt.

Das Arbeitsprinzip der (Elutions-)Ionenaustauschchromatographie, wie sie in präparativen Trennungen eingesetzt wird, ist schematisch in Abb. 2.10 dargestellt.



**Abbildung 2.10.** Schematischer Ablauf einer chromatographischen Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie. (A) Equilibrierung mit Bindepuffer. (B) Beladung mit komplexen Gemisch. (C) Bindung des Gemisches am Säulenkopf. (D) Waschen der Säule mit Waschpuffer. (E) Elution der gebundenen Substanzen mit einem Elutionspuffer. (F) Regenerierung der Säule mit Regenerationspuffer.

Eine gepackte Säule wird mit einem Bindepuffer equilibriert (Abb. 2.10-A). Im Anschluss wird ein zu trennendes Gemisch (idealerweise gelöst im Bindepuffer) auf die Säule

aufgetragen (Abb. 2.10-B). Nach Adsorption des Gemisches (Abb. 2.10-C) wird die Säule mit Waschpuffer (häufig der Bindepuffer) durchströmt, um schwach gebundene Proteine aus der Säule zu entfernen (Abb. 2.10-D). Die Produktgewinnung erfolgt durch Elution mit einem geeigneten Puffer, der häufig eine höhere Salzkonzentration, oder seltener einen anderen pH-Wert besitzt (Abb. 2.10-E), sodaß die Bindungsstärke des Proteins sinkt und es desorbiert. Je nach Anwendung wird der Elutionspuffer stufenweise oder in Form eines (linearen) Gradienten kontinuierlich erhöht.

### 2.7.1 Eigenschaften von Ionenaustauschern für die Proteinchromatographie

Liganden für die Ionenaustauschchromatographie werden eingeteilt in Kationen- und Anionentauscher. In beiden Fällen gibt es starke und schwache funktionale Gruppen. Starke Ionentauschergruppen liegen über den gesamten pH-Bereich, der für Proteine relevant ist (3 bis 10), als geladene Gruppen vor, wohingegen bei schwachen Gruppen der  $pK_a$ -Wert im oben genannten pH-Bereich liegt. Die geladenen Gruppen sind entweder direkt, über Spacergruppen oder Polymere, wie Acrylamid oder Dextran, kovalent mit der Basismatrix verbunden. Die typischen Liganden und ihre Charakterisierung sind in Tabelle 2.1 aufgelistet:

**Tabelle 2.1. Liganden in der Ionenaustauschchromatographie.**

<b>Ligand (Abkürzung)</b>	<b>Typ</b>
Sulfopropyl (SP)	starker Kationentauscher
Sulfoisobutyl	starker Kationentauscher
Carboxyethyl	schwacher Kationentauscher
Carboxymethyl	schwacher Kationentauscher
Quarternäres Amin (Q)	starker Anionentauscher
Trimethylammoniumethyl	starker Anionentauscher
Dimethylaminoethyl	schwacher Anionentauscher
Diethylaminoethyl	schwacher Anionentauscher
Diethylaminopropyl	schwacher Anionentauscher

Die Basismaterialien für die Immobilisierung der oben genannten Liganden können in verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Janson und Ryden, 1998; Ladish, 2001; Leonard, 1997; Boschetti, 1994; Arshady, 1991; Arshady, 1991), die in Tabelle 2.2 zusammengefasst sind. Die wichtigen Eigenschaften für Basismaterialien im Hinblick auf die Verwendung als Ionentauscher für Proteine sind:

- geringe nicht-spezifische Adsorption
- hohe Porosität



- großer Porendurchmesser
- mechanische Stabilität
- chemische Kompatibilität mit extremen pH-Werten, oxidativen Agenzien und Temperatur

**Tabelle 2.2. Basismaterialien in der Proteinionenaustauschchromatographie.**

<b>Typ</b>	<b>Basismaterial</b>	<b>Kommerzielle Produkte</b>
Polysaccharide	Cellulose	Sephacel (GE Healthcare)
	Dextran	Sephadex (GE Healthcare)
	Agarose	Sepharose (GE Healthcare)
Synthetisch-organische Polymere		Bio-Gel (Bio-Rad)
	Polyacrylamid	Fractogel (Merck KGaA)
	Polymethacrylat	Toyopearl (Tosoh)
	Polyvinyl	Fractoprep (Merck KGaA)
	Styrol-Divinylbenzol	POROS (Applied Biosystems) SOURCE (GE Healthcare)
Anorganische Polymere	Silica	Matrex (Millipore)
	Hydroxyapatit	CHT (Bio-Rad)
Komposit Materialien		Sepharose XL (GE Healthcare)
	Agarose-Dextran	Capto (GE Healthcare)
	Polyacrylamid-Agarose	Ultrogel AcA (Pall)
	Silica-Dextran	Spherodex (Pall)
	Silica-Polyacrylamid	HyperD (Pall)

Nicht spezifische Adsorption bezieht sich auf Wechselwirkungen mit dem Basismaterial, Quervernetzern oder Spacergruppen, die sich nicht auf die immobilisierten Liganden zurückführen lassen. Die drei Parameter Porosität, Porendurchmesser und mechanische Stabilität sind miteinander gekoppelt: ein hoher Porendurchmesser verringert die Porosität und die spezifische Oberfläche. Gleichzeitig bewirkt eine hohe Porosität eine geringere mechanische Stabilität. Als ein Kompromiss besitzen nahezu alle Prozeßmaterialien ein Maximum an Porosität, bei der das Polymergerüst eine noch zufriedenstellende mechanische Stabilität gewährleistet. Gleichzeitig erfordert die Größe der Proteine für einen akzeptablen intrapartikulären Stofftransport Porendurchmesser von 30 bis 100 nm (Neue, 1997). Die mechanische Stabilität der Medien auf Polysaccharid Basis ist gering und wird durch Quervernetzung der Polymerfasern (z.B. mit Epichlorhydrin) verbessert.

Die physikalischen Eigenschaften der Adsorber müssen im Zusammenhang mit ihrer chemischen Stabilität gesehen werden: die Adsorber müssen in einer pharmazeutischen Produktionsumgebung einer regelmäßigen Reinigung durch aggressive Agenzien, wie Natriumhydroxid, Essigsäure, Natriumhypochlorid oder Heisswasser standhalten, die zur Reinigung, Sterilisation und Depyrogenisierung verwendet werden. Dabei sollten die Basismaterialien, wie auch die Liganden idealerweise intakt bleiben und es zu keinen Ablösungen kommen. Die oben genannten Materialien tolerieren größtenteils den

periodischen Einsatz der aufgeführten Agenzien. Eine wichtige Ausnahme bildet die Baseninstabilität von Silicamedien, die sich bei  $\text{pH} > 8$  zunehmend auflösen (Neue, 1997).

### 2.7.2 Adsorptionsisothermen

Adsorptionsisothermen, zusammen mit der Beschreibung des Stofftransports und der Hydrodynamik, bilden die Grundlage für die Modellierung und Auslegung chromatographischer Prozesse (Lin und Guiochon, 2003).

Eine Adsorptionsisotherme gibt das Gleichgewicht zwischen adsorbierter Phase  $Q_P$  und mobiler Phase  $c_P$  für ein Protein auf einer Festphase bei konstanter Temperatur  $T$  und konstantem Druck  $p$  wieder (Lin und Guiochon, 2003):

$$Q_P = f(c_P) \Big|_{T, p = \text{const.}} \quad (2-12)$$

Typische Adsorptionsisothermen von Proteinen auf chromatographischen Festphasen zeigen über größere Konzentrationsbereiche eine nicht-lineare, konvexe Form (Yamamoto, 1988).

Die klassische Sichtweise der Proteinretention in Ionentauschersäulen beinhaltet den stöchiometrischen Austausch von Proteinen und Mobilphasengegenionen (Boardman und Partridge, 1955). In der Literatur wird dies als das stöchiometrische Verdrängungsmodell (engl. stoichiometric displacement model, SDM) bezeichnet (Drager und Regnier, 1986; Rounds und Regnier, 1984). Die Erweiterung des multivalenten Ionenaustauschmodells stellt das sterische Massenwirkungsmodell (engl. steric mass action, SMA) dar (Brooks und Cramer, 1992). Das SMA Modell geht von folgenden Annahmen aus:

- Die Adsorption großer Makromoleküle bewirkt eine sterische Behinderung der gebundenen Salzgegenionen. Diese Salzgegenionen sind danach nicht für einen Ionenaustausch verfügbar.
- Der Effekt der Koionen kann im Ionenaustauschprozeß vernachlässigt werden
- Die Lösung und die adsorbierte Phase sind thermodynamisch ideal. D.h. es können Konzentrationen anstelle von Aktivitäten verwendet werden.
- Gleichgewichtsparameter des SMA Modells sind konstant und unabhängig von Protein- und Salzkonzentration. Nicht-ideale Effekte wie Aggregation oder Änderungen der tertiären Struktur werden daher nicht berücksichtigt.

Im Falle von Makromolekülen ist zu erwarten, daß sterische und laterale Interaktionen eine wichtige Rolle bei der Adsorption spielen (Li und Pinto, 1994). Brooks und Cramer führten daher einen sterischen Faktor  $\sigma_p$  ein, mit der Hypothese, daß die sterische Behinderung proportional zur adsorbierten Konzentration des Proteins ist (Brooks und Cramer, 1992).

Der stöchiometrische Austausch von Proteinen und austauschbaren Salzionen kann dargestellt werden als:

$$c_p + \nu_p Q_a \Leftrightarrow Q_p + \nu_p c_a \quad (2-13)$$

mit der Konzentration an Protein und Salzionen in der mobilen Phase  $c_p$  und  $c_a$ , der charakteristischen Ladung  $\nu_p$  und der gebundenen Konzentration an Protein und Salzionen  $Q_p$  und  $Q_a$ .

Die Gleichgewichtskonstante  $K_p$  für diesen Prozeß ist definiert als:

$$K_p = \left( \frac{Q_p}{c_p} \right) \left( \frac{c_a}{Q_a} \right)^{\nu_p} \quad (2-14)$$

Die totale Konzentration an sterisch behinderten Salzionen  $Q_a'$ , die nicht für einen Ionenaustausch verfügbar sind, ist:

$$Q_a' = \sigma_p Q_p \quad (2-15)$$

mit dem sterischen Faktor  $\sigma_p$ .

Nach Adsorption des Proteins ist die totale Konzentration an gebundenen Salzgegenionen gegeben als:

$$Q_{a,total} = Q_a + \sigma_p Q_p \quad (2-16)$$

Die Einhaltung der Elektroneutralität auf der Stationärphase bedingt:

$$\Lambda = Q_a + (\nu_p + \sigma_p) Q_p \quad (2-17)$$

mit der totalen ionischen Kapazität  $\Lambda$ .

Substituiert man Gleichung 2-17 in 2-14 und formt nach  $c_p$  um folgt:

$$c_p = \left( \frac{Q_p}{K_p} \right) \left( \frac{c_a}{\Lambda - (v_p + \sigma_p)Q_p} \right)^{v_p} \quad (2-18)$$

Bei bekannter Mobilphasenkonzentration und totaler ionischen Kapazität wird die Gleichgewichtskonzentration an adsorbiertem Protein implizit durch Gleichung 2-18 definiert. Das SMA Modell kann als einfache Expansion der Gleichungen 2-13 – 2-18 für Multikomponentensysteme angepasst werden. Für ein System mit N Proteinen und einem Salzgenion kann der stöchiometrische Austausch eines jeden Proteins mit dem Salz beschrieben werden als:

$$c_{p,1} + v_{p,1}Q_a \Leftrightarrow Q_{p,1} + v_{p,1}c_a \quad \text{für } P,1 \text{ bis } P,N \quad (2-19)$$

mit den Gleichgewichtskonstanten:

$$K_{p,1} = \frac{Q_{p,1}c_a^{v_{p,1}}}{c_{p,1}Q_a^{v_{p,1}}} \quad \text{für } P,1 \text{ bis } P,N \quad (2-20)$$

Die Elektroneutralitätsbedingung für N+1 Komponenten im SMA Modell liefert:

$$\Lambda = Q_a + \sum_{P=2}^{N+1} (v_{P,N} + \sigma_{P,N}) Q_{P,N} \quad (2-21)$$

2-20 und 2-21 bilden N+1 Gleichungen, die implizit ein Multikomponentengleichgewicht für N Proteine und ein Salzgenion definieren.

Zusammenfassend gibt Abb. 2.11 einen schematischen Überblick des SMA Modells:

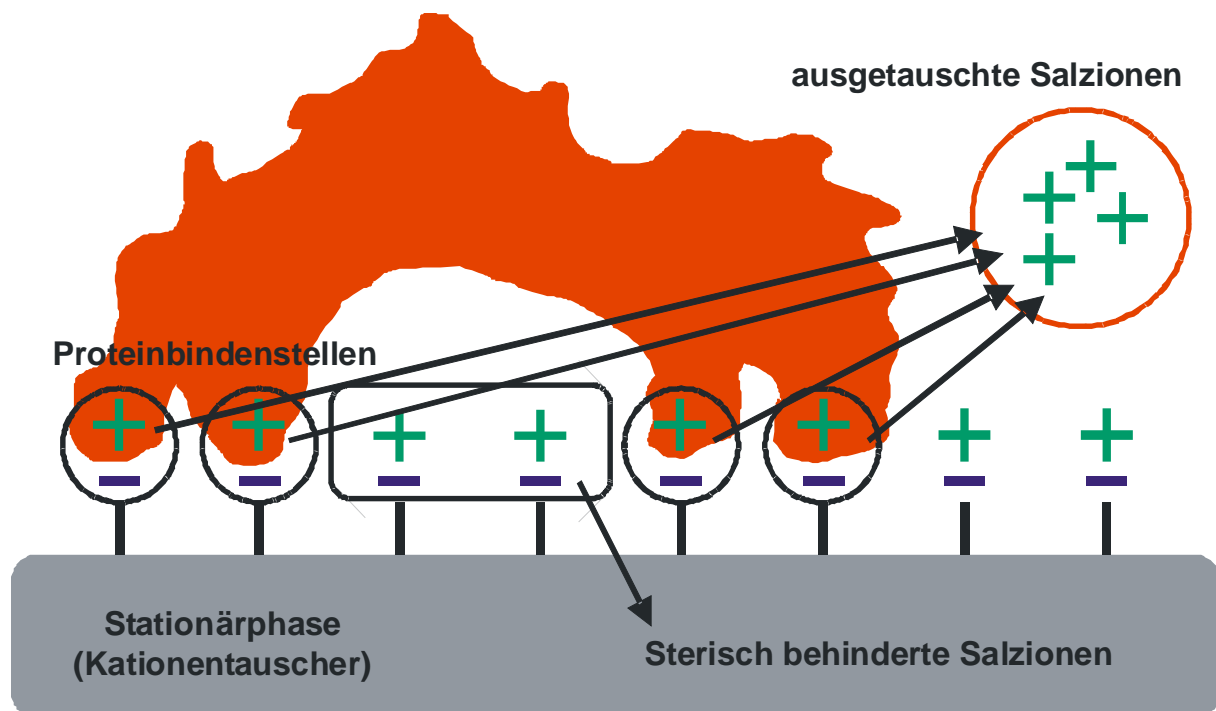


Abbildung 2.11. Schematische Darstellung der Proteinadsorption auf einem Ionentauscher nach dem SMA Modell.

Die charakteristische Ladung  $\nu$  stellt die durchschnittliche Anzahl an Bindestellen mit der Stationärphase dar. Der Gleichgewichtsparameter  $K$  ist ein Maß für die Bindungsaffinität des Proteins auf der Stationärphase und der sterische Faktor  $\sigma$  ist eine Kennzahl für den Grad der sterischen Behinderung der gebundenen Gegenionen durch das Protein.

### 2.7.3 Bestimmung der SMA Parameter

Für die Bestimmung einer SMA Isotherme werden die Salzkonzentration und totale ionische Kapazität  $\Lambda$  sowie die drei Parameter  $K$ ,  $\nu$  und  $\sigma$  für jedes Protein benötigt. Ein Satz von SMA Parametern beschreibt die Adsorptionsisotherme bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen für einen pH-Wert. Eine Änderung des pH-Wertes bedeutet einen neuen SMA Parametersatz. Die SMA Parameter werden eingeteilt in die linearen Parameter  $\nu$  und  $K$ , sowie den nicht-linearen Parameter  $\sigma$ . Für eine einzige Komponente unter linearen Bedingungen ist der Kapazitätsfaktor  $k'$  definiert als (Wankat, 1994):

$$k' = \beta \left( \frac{Q_P}{c_P} \right) = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2-22)$$

mit dem Phasenverhältnis  $\beta$ , der Retentionszeit  $t_R$  und der Retentionszeit eines nicht-bindenden Moleküls  $t_0$ . Unter linearen Bedingungen kann der Kapazitätsfaktor geschrieben werden als:

$$k' = \beta K \left( \frac{\Lambda}{c_A} \right)^\nu \quad (2-23)$$

Nimmt man den Logarithmus auf beiden Seiten von Gl. 2-23 ergibt sich:

$$\log k' = \log(\beta K \Lambda^\nu) - \nu \log c_a \quad (2-24)$$

Bei Auftragung von  $k'$  gegen  $\log(c_A)$  ist die Steigung  $-\nu$  und der y-Achsenabschnitt  $\log(\beta K \Lambda^\nu)$ . Die linearen Parameter können demnach durch isokratische Elutionen bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen bestimmt werden (Brooks und Cramer, 1992).

Neben der isokratischen Methode können die linearen SMA Parameter, in Abwandlung der Methode von Parente und Wetlaufer (Parente und Wetlaufer, 1986), aus Gradientenexperimenten bestimmt werden. Das Retentionsvolumen  $V_R$  wird in Gleichung 2-25 mit der initialen und finalen Salzkonzentration des Gradienten ( $c_{a,i}$ ,  $c_{a,f}$ ), dem Gradientenvolumen ( $V_G$ ), dem Säulentotvolumen ( $V_d$ ) und den linearen SMA Parametern ( $\nu$  und  $K$ ) in Verbindung gebracht:

$$V_R = \left[ \left( c_{a,i}^{\nu+1} + \frac{V_d K \varepsilon \Lambda^\nu (\nu+1) (c_{a,f} - c_{a,i})}{V_G} \right)^{\left( \frac{1}{\nu+1} \right)} - c_{a,i} \right] \frac{V_G}{(c_{a,f} - c_{a,i})} \quad (2-25)$$

mit der Säulenporosität  $\varepsilon$ .  $V_R$  wird dabei um die Gradientenverzögerung korrigiert. Gleichung 2-25 kann für mindestens zwei verschiedene Gradienten nach  $\nu$  und  $K$  gelöst werden (Shukla *et al.*, 1998).

Der sterische Faktor  $\sigma$  kann nur unter nicht-linearen Bedingungen bestimmt werden, nachdem die linearen Parameter gemessen wurden (Brooks und Cramer, 1992). I.d.R. wird eine Durchbruchskurve zur Bestimmung von  $\sigma$  durchgeführt. Das Durchbruchvolumen  $V_B$  eines Proteins kann mit der adsorbierten und mobilen Konzentration in Verbindung gesetzt werden (Wankat, 1994):

$$V_B = V_0 \left( 1 + \beta \frac{Q_P}{c_{P,f}} \right) \quad (2-26)$$

wobei  $V_0$  das Durchbruchsvolumen einer nichtretadierten Species und  $c_{P,f}$  die Proteinkonzentration in der Ausgangslösung ist. Formt man Gleichung 2-18 nach  $K$  um und substituiert Gl. 2-26 in Gl. 2-18 erhält man:

$$K = \frac{1}{\beta} \left( \frac{V_B}{V_0} - 1 \right) \left( \frac{c_a}{\Lambda - (\nu + \sigma) \frac{c_{P,f}}{\beta} \left( \frac{V_B}{V_0} - 1 \right)} \right)^\nu \quad (2-27)$$

Löst man Gl. 2-27 nach  $\sigma$  folgt:

$$\sigma = \frac{\beta}{c_{P,f} \Pi} \left( \Lambda - c_a \left( \frac{\Pi}{\beta K} \right)^{\frac{1}{\nu}} \right) - \nu \quad (2-28)$$

mit

$$\Pi = \left( \frac{V_B}{V_0} - 1 \right) \quad (2-29)$$

Mit Gleichung 2-28 und 2-29 kann  $\sigma$  über das experimentell bestimmte Durchbruchsvolumen berechnet werden.

## 2.7.4 Transportmodelle in der Ionenaustauschchromatographie

In Abbildung 2.12 sind die verschiedenen Stofftransportphänomene in der Chromatographie dargestellt. In einem chromatographischen System kann man drei Zonen der mobilen Phase unterscheiden: der interpartikuläre Bereich, durch den die mobile Phase konvektiv fließen kann, eine ruhende Schicht um die Partikel und der intrapartikuläre Raum. In nicht-perfusiven Partikeln bewegt sich die intrapartikuläre mobile Phase nicht konvektiv. Im interpartikulären Raum kommt es durch Eddy Diffusion, axialer Diffusion und einer nicht-idealen

Pfropfenströmung zur Bandenverbreiterung (Abb. 2.12-E) (Guiochon und Lin, 2003). Diese Effekte werden in einem axialen Dispersionskoeffizienten zusammengefasst. Filmdiffusion (Abb. 2.12-D) wird durch einen Filmtransportwiderstandskoeffizienten repräsentiert. Im intrapartikulären Raum ist die langsame Porendiffusion (Abb. 2.12-A), evtl. vorhandene Oberflächendiffusion (Abb. 2.12-B) und langsame Ad- und Desorptionskinetik (Abb. 2.12-C) für die Bandenverbreiterung verantwortlich (Guiochon und Lin, 2003). Diese Stofftransportphänomene, zusammen mit den Effekten der Adsorptionsisotherme, führen zu Peakverbreiterungen und –asymmetrien. Letztendlich führen diese Effekte zu einer Verringerung der Effizienz, Ausbeute, Reinheit und Produktivität (Guiochon und Lin, 2003; Ladish, 2001).

Eine Beschreibung dieser Faktoren in Form eines Modells ermöglicht die Simulation chromatographischer Trennungen und eröffnet die Möglichkeit, basierend auf physikalischen Parametern, Trennungen zu simulieren und zu optimieren. Dieses Vorgehen reduziert die Anzahl der notwendigen Versuche und die Entwicklungszeit für eine präparative Trennung und gibt quantitative Einblicke in die Einflußgrößen chromatographischer Verfahren.

Neben den Einflüssen der Nichtlinearität von Adsorptionsisothermen stellen die komplexen Stofftransportvorgänge den Hauptgrund für Schwierigkeiten im Scale-Up chromatographischer Trennprozesse dar (Guiochon und Lin, 2003; Ladish, 2001).

### **2.7.5 Allgemeines Geschwindigkeitsmodell**

Es existieren Modelle zur Beschreibung der Stofftransportphänomene in der (Ionenaustausch-) chromatographie. Die allgemeinen Geschwindigkeitsmodelle (engl. general rate models, GRM) berücksichtigen alle Stofftransporteinflüsse, d.h. Dispersion, Filmdiffusion und intrapartikulären Stofftransport separat und stellen die vollständigsten Beschreibungen chromatographischer Trennungen dar. Je nach Bedeutung für den jeweiligen Prozeß, kann der intrapartikuläre Stofftransport in Form der Porendiffusion, Oberflächendiffusion oder Kombinationen von beiden Arten formuliert werden. Häufig wird für Proteine nur die Porendiffusion in das GRM eingeschlossen.



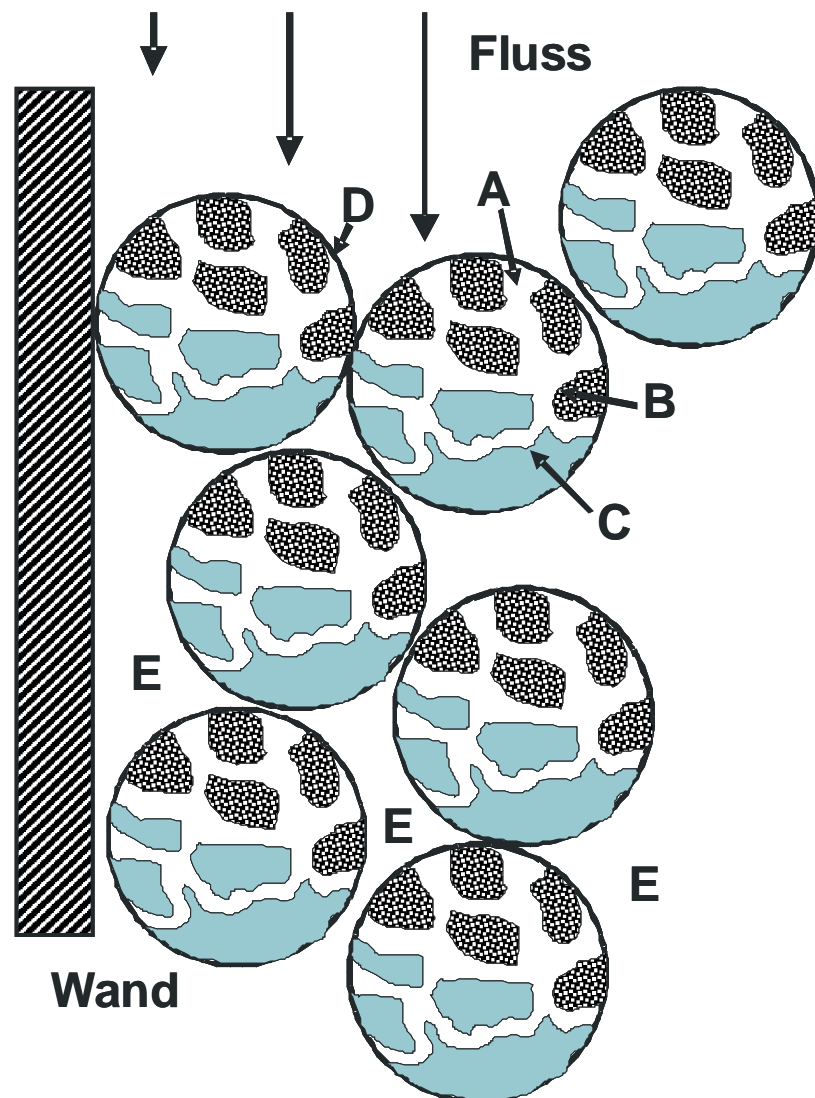


Abbildung 2.12. Schematischer Teilausschnitt einer gepackten Säule mit porösen Partikeln. Darstellung der Stofftransportvorgänge und Haupteinflussgrößen der Bandenverbreiterung in gepackten Säulen. A Porendiffusion. B Oberflächendiffusion. C Sorptionskinetik. D. Filmdiffusion. E Eddy und axiale Diffusion.

### 2.7.5.1 Stoffbilanz für die Bulkphase

In Abb. 2.13 ist ein differentielles Volumenelement der Bulkphase mit axialer Länge  $dz$  abgebildet. Konvektive und dispersive Fluxe ( $j_c$  und  $j_e$ ) treten dem Element in  $z$  bei und verlassen es bei  $z+dz$ . Zusätzlich findet Filmtransfer zwischen der Bulkphase und der Porenflüssigkeit am Partikelrand in Form des Fluxes  $j_f$  statt.

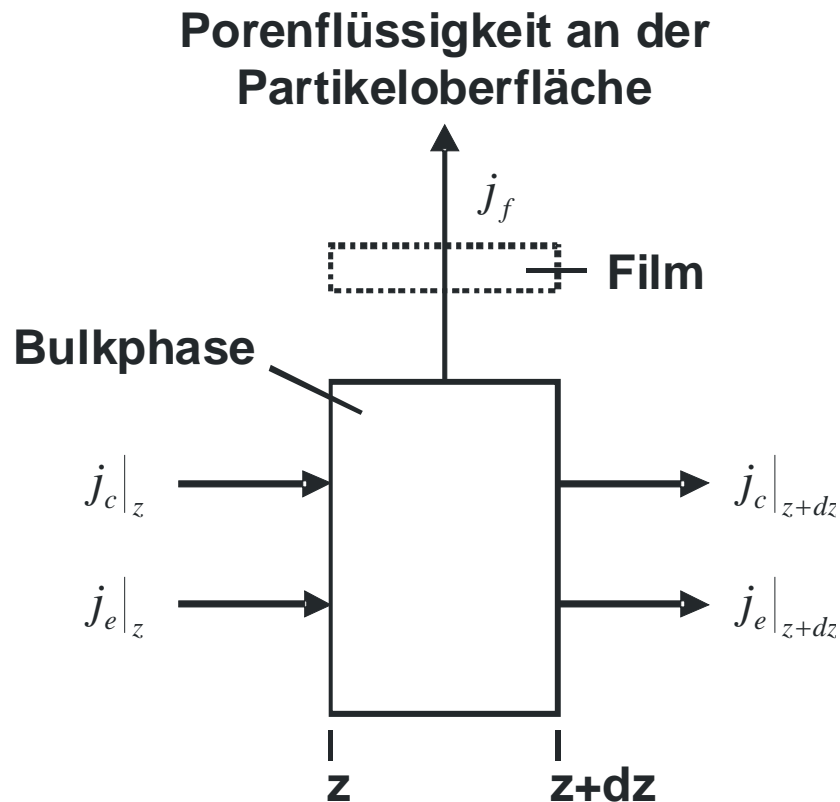


Abbildung 2.13. Schematische Darstellung eines differentiellen Volumenelements in der Bulkphase mit konvektivem Flux  $j_c$ , dispersivem Flux  $j_e$  und Filmdiffusionsflux in ein Partikel  $j_f$ . Verändert aus: Subramanian (1998).

Eine Stoffbilanz im differentiellen Volumen für eine Komponente mit Bulkkonzentration  $c_B$  liefert:

$$\underbrace{\varepsilon_e A dz \frac{\partial c_B}{\partial t}}_{\text{Akkumulation}} = \underbrace{\varepsilon_e A (j_c|_z - j_c|_{z+dz})}_{\text{Konvektion}} + \underbrace{\varepsilon_e A (j_e|_z - j_e|_{z+dz})}_{\text{Dispersion}} - \underbrace{\omega A dz j_f}_{\text{Filmtransport}} \quad (2-30)$$

mit der Säulenquerschnittsfläche  $A$ , dem Partikeloberflächen-zu-Volumen Verhältnisses  $\omega$  und der externen Porosität  $\varepsilon_e$ .

Die Flüssigphase tritt in die Säule mit einer volumetrischen Fließgeschwindigkeit ein. Die effektive, interpartikuläre Fließgeschwindigkeit  $v$  ist definiert als:

$$v = \frac{\dot{V}}{A \varepsilon_e} \quad (2-31)$$

mit der volumetrischen Fließgeschwindigkeit  $\dot{V}$ .

Der konvektive Flux wird dann beschrieben durch:

$$j_c = v c_B \quad (2-32)$$

Dispersion ist eine Funktion der Geschwindigkeit der Bulkphase und der Reynoldszahl. Im Gegensatz zu diffusiven Effekten, wirkt Dispersion auf alle Komponenten gleich (Cussler, 1997). Der Dispersionskoeffizient  $E$  ist daher identisch für jede Komponente. Die Struktur des Dispersionsflux ist identisch mit dem Fick'schen Gesetz (vgl. Kapitel 2.5):

$$j_e = -E \frac{\partial c_B}{\partial z} \quad (2-33)$$

Der diffusive Flux durch den statischen Film um die Partikel wird als quasi-stationär angenommen. D.h. die Massenspeicherfunktion des Films wird ignoriert. Der Flux durch den Film wird durch den Stofftransportwiderstandskoeffizient  $k_f$  und der Konzentrationsdifferenz zwischen Bulkphase  $c_B$  und Porenflüssigkeit  $c_P$  am Partikelrand bestimmt:

$$j_f(z, t) = k_f (c_B - c_P|_R) \quad (2-34)$$

### 2.7.5.2 Stoffbilanz für die Partikelphase

In Abb. 2.14 ist ein differentielles Volumenelement der Partikelphase in Form einer kugelförmigen Schale abgebildet.

Das Volumen  $dV$  ist gegeben als:

$$dV = \frac{4}{3} \pi ((r + dr)^3 - r^3) \quad (2-35)$$

und die Oberflächen  $A|_r$  und  $A|_{r+dr}$  sind definiert als:

$$A|_r = 4\pi r^2 \quad (2-36)$$

$$A|_{r+dr} = 4\pi (r + dr)^2 \quad (2-37)$$

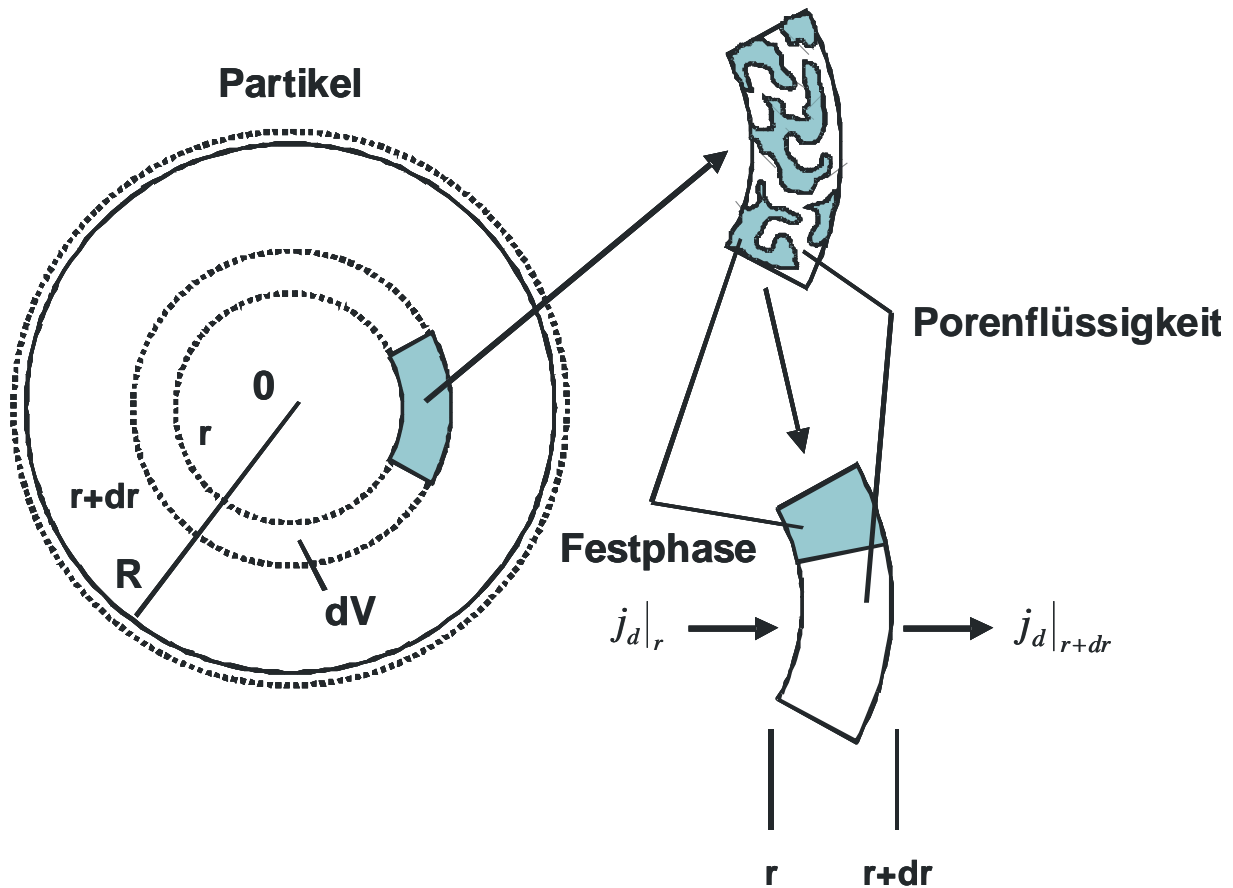


Abbildung 2.14. Schematische Darstellung eines differentiellen Volumenelements an Position  $r$  bis  $r+dr$  in der Partikelphase mit diffusivem Flux  $j_d$ . Mit Volumen  $dV$  der kugelförmigen Schale und Partikelradius  $R$ . Die Vergrößerung (rechts oben) stellt einen Teil der porösen Matrix innerhalb der kugelförmigen Schale dar. Darunter (rechts unten) eine Ersatzschaltung der porösen Matrix mit pseudo-homogener Fest- und Porenphase. Verändert aus: Subramanian (1998).

In Abb. 2.14 ist ein Teil des Volumenelements vergrößert dargestellt. Die Porenflüssigkeit und die Festphase können jeweils als homogene Phase angesehen werden. Der diffusive Flux ist  $j_d$ . Eine Stoffbilanz mit der Porenkonzentration  $c_p$  und der adsorbierten Konzentration  $q_p$  im differentiellen Volumenelement liefert:

$$\underbrace{dV \left( \varepsilon_i \frac{\partial c_p}{\partial t} + (1 - \varepsilon_i) \frac{\partial q_p}{\partial t} \right)}_{\text{Akkumulation}} = \underbrace{-\varepsilon_i (A|_{r+dr} j_d|_{r+dr} - A|_r j_d|_r)}_{\text{Diffusion}} \quad (2-38)$$

mit der internen Porosität  $\varepsilon_i$ .

Da die Porenflüssigkeit über die Adsorptionsisotherme mit der adsorbierten Phase gekoppelt ist, kann sie als quasi-homogene Phase angesehen werden. Die Form des diffusiven Flux stellt sich wie folgt dar:

$$j_d = -D \frac{\partial c_p}{\partial z} \quad (2-39)$$

### 2.7.5.3 Simulation chromatographischer Trennungen über GRM

Für die Berechnung der komplexen, nicht-linearen Differentialgleichungssysteme eines GRM stehen keine analytischen Lösungen zur Verfügung, sodaß generell numerische Verfahren Verwendung finden, um allgemeine Geschwindigkeitsmodelle zu lösen (Guiochon und Lin, 2003).

In dieser Studie werden Simulationen unter adsorptiven Wechselwirkungen nur auf dem Einzelpartikelniveau durchgeführt (basierend auf dem SMA Modell), sodaß die Effekte der Dispersion und Konvektion nicht berücksichtigt werden müssen. Als Startbedingungen wird die Salzkonzentration innerhalb des Partikels auf die Puffersalzbedingungen gesetzt (Partikel ist equilibriert) und der Partikel ist frei von Proteinen (Beladung hat noch nicht stattgefunden). Als Parameter werden der Filmdiffusionskoeffizient, der intrapartikuläre Diffusionskoeffizient, die Partikelporosität und totale ionische Kapazität sowie die SMA Parameter der jeweiligen Proteine benötigt. Zusätzlich wird auch die Ad- und Desorptionsgeschwindigkeit der Proteine berücksichtigt. Das Lösen der Differentialgleichungssysteme für ein 2-Komponentengemisch mit hinreichender Orts- und Zeitauflösung über die gesamte Säulenlänge ist in der derzeitigen Implementierung des Säulenmodells auf herkömmlichen Personal Computern nur mit erheblichem zeitlichen Aufwand lösbar, sodaß nur Prozesse auf dem Einzelpartikelniveau modelliert werden.

Für die Simulation von SEC Trennungen wurden die intrapartikulären Transportprofile nicht diskret modelliert, sondern nur die Proteinverteilung zwischen der mobilen und der Festphase über die Säulenlänge. Die Startbedingungen sind hierbei, daß die Säule frei von Protein ist. Bei der Simulation muß der Verteilungskoeffizient (über die Porositäten), der intrapartikuläre Diffusionskoeffizient, die Dispersion und Konvektion berücksichtigt werden. Aufgrund der fehlenden Adsorption und der vereinfachten Berücksichtigung der intrapartikulären Diffusionsvorgänge benötigt die Lösung der Transportgleichungen weniger Rechenressourcen und kann auf herkömmlichen Personal Computern für die Simulation der gesamten Säulenlänge durchgeführt werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Chemikalien

Die folgenden Chemikalien wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Alle Lösungen, die Wasser enthalten, wurden mit entsalztem, gereinigtem und gefiltertem Wasser aus einer Milli-Q Academic Anlage (Millipore) angesetzt. Entsalztes Wasser wurde nur zur Oberflächenreinigung von Geräten verwendet.

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	KMF Laborchemie
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA
Ethanol absolut	KMF Laborchemie
Essigsäure	KMF Laborchemie
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA
Natriumacetat	Merck KGaA
Natriumchlorid (NaCl)	KMF Laborchemie
Natriumphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA
Natriumphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck KGaA
TRIS	Merck KGaA
Phosphorsäure	Merck KGaA
Kaliumnitrat (KNO <sub>3</sub> )	Merck KGaA
Methanol	Merck KGaA
Blue Dextran (BlueDex)	Sigma-Aldrich
Isopropanol HPLC grade	Riedel-de-Haen
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA
Phenolphthalein	Merck KGaA

#### 3.1.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Die folgenden Fluoreszenzfarbstoffe wurden in dieser Arbeit verwendet:

Name (Abkürzung)	Hersteller	Typ	Artikelnummer
Alexa 488 Fluor (A488)	Molecular Probes	NHS Ester	A20100
BODIPY FL SE (BODIPY)	Molecular Probes	NHS Ester	D2184
Cy3	GE Healthcare	NHS Ester	PA13104
Cy5	GE Healthcare	NHS Ester	PA15104
Atto635	Atto-Tec GmbH	NHS Ester	AD 635-35
Fluorescein (FL)	Sigma-Aldrich	Carboxylgruppe	46955

### 3.1.3 Proteine

Name (Abkürzung)	Hersteller	Artikelnummer
bovines $\alpha$ -Chymotrypsinogen A (CTG)	Worthington Biochemicals	LS005623
porcines $\gamma$ -Globulin (GGB)	Sigma-Aldrich	G2512
ovines Lysozym (LYS)	Merck KGaA	105281
bovines $\beta$ -Lactoglobulin (BLG)	Sigma-Aldrich	L3908
Ovalbumin (OVA)	Sigma-Aldrich	A5503
Ovotransferrin (OVT)	Sigma-Aldrich	C0755
bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich	A6003

Alle Proteine lagen als Lyophilisat vor und wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet.

### 3.1.4 Festphasen

Name	Hersteller	Artikelnummer
SP Sepharose FF	GE Healthcare	17-0729-01
SP Sepharose XL	GE Healthcare	17-5073-01
Q Sepharose FF	GE Healthcare	17-0510-01
Q Sepharose XL	GE Healthcare	17-5072-01
Capto Q	GE Healthcare	17-5316-10
Sepharose 6 FF	GE Healthcare	17-0159-01
Superose 12 prep grade	GE Healthcare	17-0536-01
Superdex 200 prep grade	GE Healthcare	17-1043-10
Sephadex G-25 superfine	GE Healthcare	17-0031-01
Sephadex G-15	GE Healthcare	17-0020-01

### 3.1.5 Geräte

Typ	Bezeichnung	Hersteller
pH-Meter	pH520	WTW
pH-Elektrode	Inlab 408	Mettler-Toledo
Laborwaage	Laboratory LC 6200D	Sartorius
Tischzentrifuge	Microcentrifuge MC-13	Millipore
Kühlzentrifuge	5180R	Eppendorf
Vakuumpumpe	MPC 101 Z	Ilmvac
Mikrofilter	Super 200 0.2 $\mu$ m 47 mm	Pall
Glasfilterfritte	Porosität 4	Robu
Magnetrührer	MR 3000	Heidolph
Vortexer	VF2	IKA Labortechnik VF2
Vakuumfilter	Reusable Bottle Top Filter Unit	Nalgene
Probeninjektor	7725i	Rheodyne
Deckgläser	Superior Deckgläser No.1	Marienfeld
Mikrotiterplatten	Glass Bottom 7706-1365	Whatman
Mikrotiterplatten	F96 Microwell 236105	Nunc
Mikroskop	Axiovert 200M	Zeiss
Konfokales System	LSM 510	Zeiss
Chromatographiesystem	Äkta Basic 10	GE Healthcare
Superloop	10 ml (18-1113-81)	GE Healthcare
Superloop	50 ml (18-1113-82)	GE Healthcare
Microvials	PP; 0.3 ml mit Schnapping	VWR
Elektronischer Dispenser	Multipette Pro	Eppendorf
Pipetten für Multipette	Combitips pro	Eppendorf

Zentrifugenultrafilter	Omega UF 10 kDa	Pall
Zentrifugenultrafilter	Omega UF 30 kDa	Pall
Zentrifugenultrafilter	Vivaspin 4 PES 50 kDa	Vivascience
Spritzenvorsatzfilter	Acrodisc oder Millex GP (0.22 µm)	Pall oder Millipore
Photometer	Cary 50 Bio UV-VIS	Varian
Fluoreszenzspektrophotometer	Cary Eclipse	Varian

### 3.1.6 Shimadzu HPLC System

Typ	Bezeichnung
Fluoreszenzdetektor	RF-10AXL
HPLC Systemcontroller	SCL-10Avp
Leitfähigkeitsdetektor	CDD-10Avp
Säulenofen	CTO-10ACvp
Diodenarraydetektor	SPD-M10Avp
Autoinjektor	SIL-10ADvp
HPLC Pumpen	LC-10ADvp

Soweit nicht anders erwähnt wurden alle Mikroreaktionsgefäße, Pipetten und Pipettenspitzen von Eppendorf bezogen. Alle Glasflaschen und -becher waren von Schott, sowie Meßzylinder und Plastikbecher von VWR. Spritzen und Einmalkanülen wurden von Terumo und B.Braun verwendet und Einmalplastikgefäße („Falcon Tubes“) mit 15 oder 50 ml Inhalt wurden von Greiner bezogen. HPLC Fittings und Schläuche wurden von GE Healthcare und Upchurch Scientific verwendet.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Puffer

Alle Puffer wurden mit entsalztem, gereinigtem und gefiltertem Wasser aus einer Milli-Q Academic Anlage (Millipore) angesetzt (siehe Tabelle 3.1). Ebenso wurden alle Pufferlösungen nach Solubilisierung der Puffersubstanzen und Einstellung des pH-Wertes mit einem 0.2 µm Mikrofilter (Pall), der in einer Vakuumfilteranlage (Nalgene) installiert war, gereinigt. Nach Gebrauch wurden Pufferlösungen bei 4°C im Dunkeln gelagert und vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht. Alle Pufferlösungen wurden vor jedem Einsatz unter Vakuum (Ismatec) im Ultraschallbad (Branson) entgast.

Die Puffer wurden u.a. mit unterschiedlichen Konzentrationen von NaCl angesetzt. Die Puffersubstanzen wurden als Feststoff in geeigneten Behältern vorgelegt und in 95% des totalen Volumens unter Rühren und pH-Kontrolle aufgelöst. Nach vollständiger Auflösung wurde der pH-Wert eingestellt. Zur pH-Titration wurde NaOH (2 oder 10 M) oder HCl



(10%ig v/v) verwendet. Nach pH-Korrektur wurde das finale Volumen in einem Meßzylinder eingestellt und der Puffer in geeignete Glasbehälter aliquotiert.

**Tabelle 3.1. Zusammensetzung der verwendeten Puffer.**

Typ	pH	Säure	c [mol/l]	Base	c [mol/l]	Ion
Phosphat (20 mM)	7.0	H <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.0048	HPO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0.0076	Na <sup>+</sup>
Phosphat (50 mM)	7.0	H <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.0121	HPO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0.0189	Na <sup>+</sup>
Phosphat (100 mM)	7.0	H <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.0242	HPO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0.0379	Na <sup>+</sup>
Phosphat (10 mM)	6.0	H <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.0078	HPO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0.0011	Na <sup>+</sup>
Phosphat (20 mM)	6.0	H <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.0156	HPO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0.0022	Na <sup>+</sup>
Phosphat (50 mM)	6.0	H <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.0390	HPO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0.0055	Na <sup>+</sup>
Phosphat (50 mM)	12.0	HPO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0.0052	PO <sub>3</sub> <sup>3-</sup>	0.0057	Na <sup>+</sup>
Acetat (50 mM)	4.0	CH <sub>3</sub> COOH	0.3155	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	0.05	Na <sup>+</sup>
Acetat (20 mM)	5.0	CH <sub>3</sub> COOH	0.0126	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	0.0200	Na <sup>+</sup>
TRIS (20 mM)	7.5	TRIS-HCl	0.0200	TRIS base	0.0048	Cl <sup>-</sup>

### 3.2.2 UV-VIS Spektroskopie

UV-VIS Spektroskopie wurde zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen auf einem Cary 50 System (Varian) eingesetzt. Alle Untersuchungen wurden in Einmalhalbmikroküvetten (Brand), die für Analysen im UV-Bereich geeignet sind, durchgeführt. Das totale Volumen in der Küvette betrug mindestens 450 µl aufgrund der Strahlengeometrie des Systems. Die Schichtdicke betrug immer 1 cm. Alle Lösungen wurden bei Raumtemperatur gemessen. Für jede Wellenlänge wurde ein Nullabgleich mit der reinen Pufferlösung, in dem die Probe gelöst war, durchgeführt. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt. Der lineare Arbeitsbereich eines Spektrophotometers ist gerätespezifisch und muß vor einer Konzentrationsmessung bekannt sein. Abb. Anhang 7-1 zeigt eine Auftragung der Absorption bei 280 nm gegen die Proteinkonzentration für CTG in Einmalplastikküvetten im Cary 50 Spektrophotometer. Der lineare Bereich erstreckt sich bis zur gemessenen Konzentration von 1 mg/ml bei einer Absorption von 1.65. In dieser Studie wurden Proben ab einer gemessenen Absorption von 0.8 verdünnt, sodaß immer im linearen Arbeitsbereich gearbeitet wurde. Die Berechnung der Konzentrationen für die jeweiligen Substanzen erfolgte anhand der Extinktionskoeffizienten, die in Tabelle 3.2 aufgeführt sind. Lösungen, die Proteine und Fluoreszenzfarbstoffe enthielten, wurden bei 280 nm und dem jeweiligen Absorptionsmaximum des Farbstoffes gemessen. Für die Konzentrationsbestimmung der Biokonjugatlösungen über die Absorption bei 280 nm wurde die Absorption des Farbstoffes bei der gleichen Wellenlänge über einen Korrekturfaktor berücksichtigt (Tabelle 3.2). Für die Konzentrationsbestimmung wurde angenommen, daß sich die Pufferzusammensetzung und Biokonjugation nicht auf die Extinktionskoeffizienten oder Absorptionsmaxima der Proteine oder Farbstoffe auswirken

**Tabelle 3.2. Spektroskopische Eigenschaften der verwendeten Proteine und Fluoreszenzfarbstoffe.**

Substanz	Extinktionskoeffizient [l/(mol cm)]	Korrekturfaktor	Quelle
LYS	37681	-	Handbook of Biochemistry
CTG	51000	-	Worthington Biochemicals
BLG	14638	-	Handbook of Biochemistry
OVA	24360	-	Handbook of Biochemistry
BSA	43890	-	Handbook of Biochemistry
OVT	83411	-	Handbook of Biochemistry
GGB	224000	-	Handbook of Biochemistry
A488	71000	0.11	Molecular Probes
Atto635	120000	0.10	Atto-Tec GmbH
Cy3	150000	0.08	GE Healthcare
Cy5	250000	0.05	GE Healthcare
BODIPY	68000	0.04	Molecular Probes

### 3.2.3 Biokonjugation

Vor der eigentlichen Biokonjugation wurden die Fluoreszenzfarbstoffe, die als Feststoff vorlagen, in wasserfreiem DMSO gelöst (20 mg/ml), zu je 10 µl Portionen in 1.5 oder 2 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert und bis zum Einsatz bei -20°C im Dunkeln gelagert. Die Biokonjugation erfolgte mit NHS Ester aktivierten Fluoreszenzfarbstoffen in einem Phosphatpuffer (50 mM) bei pH 7.0 für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Konjugationsreaktion wurde durch Mischen des Farbstoffaliquots (10 µl) mit der Proteinlösung (1200 µl) gestartet. Die Durchmischung wurde durch mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes sichergestellt. Die eingestellte Proteinkonzentration richtete sich nach Art des Proteins und des gewünschten Substitutionsgrad. In Tabelle 3.3 sind die typisch verwendeten Konzentrationen aufgelistet.

**Tabelle 3.3. Eingesetzte Proteinkonzentration während der Biokonjugation und typisches erzielt DOL.**

Protein	Konzentration [mg/ml]	typisches DOL
LYS	10	0.23
CTG	25	0.20
BLG	18	0.13
OVA	47	0.08
BSA	68	0.14
OVT	50	0.24
GGB	50	0.51

Im Anschluß an die Reaktion wurde die Proteinlösung (1 ml) über einen größen ausschluß chromatographischen Schritt vom unkonjugierten Farbstoff getrennt. Die präparative Trennung erfolgte mit Sephadex G-25 Superfine oder G-15 in einer selbstgepackten XK16/20 Säule (GE Healthcare) auf einem Äkta Basic 10 oder Shimadzu HPLC System. Die Eigenschaften der Festphase gewährleistet einen Ausschluss der Proteine, Biokonjugate und generell Molekülen mit einem Molekulargewicht >5 kDa (G-25) oder 1.5

kDa (G-15) vom intrapartikulären Raum. Das Biokonjugat eluiert im Totvolumen der Säule und die Farbstoffe eluieren zu einem späteren Zeitpunkt. Die Trennung ist visuell sichtbar durch die Entstehung zweier gefärbter Banden innerhalb der gepackten Säule mit unterschiedlicher Migrationsgeschwindigkeit. Die Fraktionierung erfolgte manuell anhand des aufgenommenen Chromatogramms mit Detektion bei 280 nm und der Wellenlänge im Absorptionsmaximum des jeweiligen Farbstoffs. Die einzelnen Verfahrensschritte sind in Tabelle 3.4 ausführlich dargestellt:

**Tabelle 3.4. Programm zur Aufreinigung von Biokonjugaten mittels Größenausschlußchromatographie.**

Schritt	Modus	Fließgeschwindigkeit	Dauer / Volumen	mobile Phase
Equilibrierung	isokratisch	90 – 149 cm/h	2 cv	finaler Puffer (variabel)
Probeninjektion	Loop (1 ml)	90 – 149 cm/h	5 ml	finaler Puffer
Elution	isokratisch	90 – 149 cm/h	1.5 cv	finaler Puffer
Fraktionierung	manuell mit Detektion bei 280 nm und Farbstoffwellenlänge	90 – 149 cm/h	5 – 7 ml	finaler Puffer
Regeneration	Stufengradient (0% -> 100%)	90 – 149 cm/h	2 bis 10 cv	0.1 M NaOH

Die Konzentration des Farbstoffes  $c_{\text{Farbstoff}}$  wird berechnet nach Gleichung 3-1:

$$c_{\text{Farbstoff}} = \frac{(A_{\lambda_{\text{max}}}^{\text{Farbstoff}} \cdot f_{\text{Farbstoff}})}{\varepsilon_{\lambda_{\text{max}}}^{\text{Farbstoff}} \cdot d} \quad (3-1)$$

mit Verdünnungsfaktor  $f$ , Absorption  $A$  (am Absorptionsmaximum), molarer Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  (am Absorptionsmaximum) und Schichtdicke  $d$

Die Proteinkonzentration  $c_{\text{Protein}}$  wird nach Gleichung 3-2 berechnet:

$$c_{\text{Protein}} = \frac{(A_{280}^{\text{Protein}} \cdot f_{\text{Protein}}) - k_{\text{Farbstoff}} (A_{280}^{\text{Farbstoff}} \cdot f_{\text{Farbstoff}})}{\varepsilon_{280}^{\text{Protein}} \cdot d} \quad (3-2)$$

mit dem Korrekturfaktor  $k_{\text{Farbstoff}}$  für die Absorption des Fluoreszenzfarbstoffes bei 280 nm. Das DOL berechnet sich entsprechend (Gleichung 3-3):

$$DOL = \frac{c_{\text{Farbstoff}}}{c_{\text{Protein}}} \quad (3-3)$$

Die Anwendung von Gleichung 3-1 bis 3-3 gilt nur im linearen Arbeitsbereich des Spektrophotometers und bei Abwesenheit von unkonjugierten Farbstoffmolekülen.

Proteinlösungen mit einem definierten D/P-Verhältnis wurden durch Mischung der nativen Protein-, der Biokonjugat- und Pufferlösung hergestellt. Die Volumina berechnen sich nach Gleichung 3-4 bis 3-6:

$$V_{konj} = \frac{(c_{ges} V_{ges}) \cdot D / P}{c_{konj} \cdot DOL} \quad (3-4)$$

$$V_{nativ} = \frac{(c_{ges} V_{ges}) - (c_{konj} V_{konj})}{c_{nativ}} \quad (3-5)$$

$$V_{Puffer} = V_{ges} - V_{konj} - V_{nativ} \quad (3-6)$$

mit dem Volumen der Biokonjugatlösung  $V_{konj}$ , der Gesamtlösung  $V_{ges}$ , dem nativem Protein  $V_{nativ}$  und dem Puffervolumen  $V_{Puffer}$ , sowie der Konzentrationen des Biokonjugats  $c_{konj}$ , der Gesamtproteinkonzentration  $c_{ges}$  und des nativen Proteins  $c_{nativ}$ .

### 3.2.4 Parameterbestimmung von chromatographischen Systemen und gepackten Säulen

Das Systemvolumen chromatographischer Anlagen wurde über Retentionsversuche analysiert. Die Bestimmung erfolgte durch Injektion von 10  $\mu$ l einer 10 %igen (v/v) Acetonlösung oder einer 1 M  $KNO_3$  Lösung durch die chromatographische Anlage ohne Säule mit anschließender Detektion bei 280 nm. Die Totzeit wurde über die Retentionszeit des Peaks bestimmt. Die Gradientenverzögerung der Shimadzu HPLC Anlage wurde durch einen Stufengradienten von 100 % Puffer auf 50 % Nitratlösung (s.o.) ermittelt.

Die Totzeit vom Superloop bis zum Säulenkopf wurde durch Injektion von Fluorescein Lösung in Puffer ( $1 \cdot 10^{-6}$  M in Phosphat, 50 mM, pH 7.0) mit gleichzeitiger Fluoreszenzmessung mittels CLSM am Säulenkopf direkt im Bett bestimmt. Dabei wurde der Fokus des CLSM auf die Bulkphase des gepackten Bettes eingestellt (vgl. 3.4.1) und im Abstand von 1 s konfokale Aufnahmen mit Einstellungen für Fluorescein (vgl. Tabelle 3.8) durchgeführt.

Das totale Säulenvolumen  $V_{Total}$  wurde bei bekanntem Säulenradius  $r$  (Herstellerangaben) durch die Messung der Länge des gepackten Bettes  $L$  nach Gleichung 3-7 bestimmt:

$$V_{Total} = Lr^2\pi \quad (3-7)$$

Das Bettvolumen der Tricorn 5/50 Säule mit SP Sepharose FF ist 1.15 ml und mit SP Sepharose XL 1.1 ml sowie 0.48 ml für die Tricorn 5/20 Säule mit SP Sepharose FF und SP Sepharose XL.

Die Bestimmung der Porositäten erfolgte durch Retentionszeitmessungen mit Aceton bzw.  $KNO_3$  (s.o.) und Blue Dextran (2 mg/ml) auf Tricorn 5/50 oder 5/20 Säulen. Die chromatographische Bestimmung erfolgte durch Injektion von 10  $\mu$ l Testlösung bei 76 cm/h und Detektion bei 280 oder 635 nm. Nach Korrektur der Retentionszeiten mit den Totvolumina des Systems ergeben sich die Porositäten folgendermaßen:

$$\begin{aligned}
 V_{Pore} &= V_0 - V_e; V_e = V_{BlueDex}; V_s = V_{Total} - V_{Pore} - V_e; V_{Ad} = V_{Pore} + V_s \\
 \varepsilon_t &= \frac{V_{Pore} + V_e}{V_{Total}} \\
 \varepsilon_i &= \frac{V_{Pore}}{V_{Ad}} \\
 \varepsilon_e &= \frac{V_e}{V_{Total}}
 \end{aligned} \quad (3-8)$$

mit der totalen Porosität  $\varepsilon_t$ , der internen Porosität  $\varepsilon_i$  (Partikelporosität) und der externen Porosität  $\varepsilon_e$  (Bulkporosität) sowie der folgenden Volumina:

$V_{Pore}$	Porenvolumen	$V_0$	Totvolumen
$V_{BlueDex}$	Elutionsvolumen Blue Dextran	$V_e$	Zwischenkornvolumen
$V_{Total}$	Säulenvolumen	$V_s$	Festphasenvolumen
$V_{Ad}$	Partikelvolumen		

Die Bestimmung der totalen ionischen Kapazität  $\Lambda$  erfolgte mittels frontalchromatographischer Titration in einem chromatographischen System. Die gepackte Säule wurde bei 76 cm/h mit gefiltertem Milli-Q Wasser für 30 cv gespült bis die Leitfähigkeit einen Gleichgewichtszustand erreicht hatte (ca. 0 mS/cm im Äkta Basic 10 System). Im Anschluß wurde ein Stufengradient mit verdünnter Essigsäure in Milli-Q Wasser (pH 3.0) für 30 cv auf die Säule aufgetragen, bis ebenfalls die Leitfähigkeit einen Gleichgewichtszustand erreicht hatte. Die nicht-gebundene Essigsäure in der Säule und den Schläuchen wurde durch 10 cv gereinigtem Milli-Q Wasser entfernt. Im Anschluß wurde die

Säule mit einer 1 M  $\text{KNO}_3$  Lösung (pH 7.0) für 20 cv durchströmt und das Säuleneluat aufgefangen. Dem Eluat wurden 10  $\mu\text{l}$  einer Phenolphthalein Lösung (10 mg/ml in Ethanol) zugefügt. Die Titration mit 0.01 M NaOH erfolgte unter Rühren mit einer Multipipette (Eppendorf) und das verbrauchte Volumen der NaOH Lösung ( $V_{\text{NaOH}}$ ) wurde notiert. Die totale ionische Kapazität berechnet sich nach:

$$\Lambda = \frac{c_{\text{NaOH}} V_{\text{NaOH}}}{V_c (1 - \varepsilon_t)} \quad (3-9)$$

mit der Konzentration der NaOH Lösung  $c_{\text{NaOH}}$  und dem Säulenvolumen  $V_c$ .

### 3.2.5 Analytische Größenausschlusschromatographie

Analytische Trennungen von Biokonjugatlösungen bzw. reinem Farbstoff wurden auf zwei verschiedenen Säulen mit dem Shimadzu HPLC System durchgeführt: eine selbstgepackte Tricorn 5/200 Säule mit Sepharose 6 FF und eine Superose 12 HR 10/30 Säule. Die Trennungen auf der Tricorn 5/200 Säule wurden bei einer Fließgeschwindigkeit von 153 cm/h durchgeführt und die Trennungen auf der HR 10/30 Säule bei 38 cm/h. Vor der Probeninjektion wurde die Festphase mit dem Laufpuffer (Phosphatpuffer, 50 mM, pH 7.0, 200 mM NaCl) für 2 cv equilibriert. Im Anschluß wurden 20  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden Proben injiziert und isokratisch eluiert. Das Programm ist in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Die Absorption des Säuleneffluents wurde bei 280 nm und dem Absorptionsmaximum des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes analysiert.

**Tabelle 3.5. Programm zur analytischen Größenausschlusschromatographie**

Schritt	Modus	Fließgeschwindigkeit	Volumen	mobile Phase
Equilibrierung	isokratisch	153 cm/h (Superose	2 cv	Phosphat (50 mM,
Probeninjektion	Autoinjektor	5/200); 38 cm/h (HR	20 $\mu\text{l}$	pH 7.0, 200 mM
Elution	isokratisch	10/30)	1.5 cv	NaCl)

### 3.2.6 Chromatographische Bestimmung des Verteilungskoeffizienten $K_{av}$

Die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten  $K_{av}$  erfolgte analog der Methode in 3.2.5. Die Totvolumina wurden analog zu 3.2.4 für beide Säulen bestimmt. Neben den Biokonjugatproben wurden analog zu 3.2.4 Blue Dextran und  $\text{KNO}_3$  Lösungen mit denselben Einstellungen wie in 3.2.5 isokratisch eluiert. Der Verteilungskoeffizient  $K_{av}$  ist definiert als:

$$K_{av} = \frac{V_R - V_0}{V_{Total} - V_0} \quad (3-10)$$

mit dem Retentionsvolumen  $V_R$ .

### 3.2.7 Parameterbestimmung für SMA Isothermen

Die linearen SMA Parameter wurden durch Gradientenelutionen ermittelt und  $\sigma$  mittels Durchbruchskurve. Die Untersuchungen zu den linearen Parametern wurden mit Biokonjugaten und die Durchbruchskurven mit nativem Protein durchgeführt. Für alle Versuche zu den linearen Faktoren wurden selbstgepackte Tricorn 5/50 Säulen mit den jeweiligen Festphasen verwendet. Die Gradientenelutionen wurden nach folgendem Schema durchgeführt (siehe Tabelle 3.6):

**Tabelle 3.6. Programm zur chromatographischen Bestimmung der linearen SMA Parameter.**

Schritt	Modus	Fließgeschwindigkeit	Dauer / Volumen	mobile Phase
Equilibrierung	isokratisch	153 cm/h	2 cv	Bindepuffer
Probeninjektion	Autoinjektor	153 cm/h	10 $\mu$ l	Bindepuffer
Elution	linearer Gradient	153 cm/h	30, 60, 120, 180 oder 240 cv	Bindepuffer auf Hochsalzpuffer

Es wurden für jedes Protein/Festphasen Paar fünf verschiedene Gradientenlängen verwendet. Die Detektion erfolgte über 280 nm und der charakteristischen Wellenlänge des verwendeten Farbstoffes. Die Retentionszeiten wurden um die Totzeit und Gradientenverzögerung korrigiert (vgl. 2.7.3).

Für die SMA Parameter des nativen Proteins wurde die Retentionszeit des größten Peaks im 280 nm Signal verwendet. Für die SMA Parameter der Biokonjugate wurden die entsprechenden Peaks aus dem Farbstoffwellenlängensignal bestimmt. Die Einstellung der Integrationsparameter erfolgte in der Class-VP Software (Shimadzu) unter visueller Kontrolle der integrierten Chromatogramme. In Tabelle 3.7 sind die jeweiligen Untersuchungsbedingungen aufgeführt. Mit Ausnahme von OVT wurden alle Versuche bei einer Startsalzkonzentration von 50 mM durchgeführt. Aufgrund der geringen Retention bei dieser Salzkonzentration wurde bei OVT mit SP Sepharose FF eine Startsalzkonzentration von 20 mM und bei SP Sepharose XL eine von 10 mM verwendet. Die Gradienten wurden alle bis zu einer Salzkonzentration von 500 mM gefahren.

**Tabelle 3.7. Experimentelle Bedingungen bei der Bestimmung der linearen SMA Parameter.**

<b>Protein</b>	<b>Festphase</b>	<b>pH-Wert</b>	<b>Salzkonzentration [mM]</b>
CTG	SP Sepharose FF	7.0	50
CTG	SP Sepharose XL	7.0	50
OVT	SP Sepharose FF	6.0	20
OVT	SP Sepharose XL	6.0	10

Nach Ermittlung der korrigierten Retentionszeiten wurden die Parameter  $v$  und  $K$  an das in Kapitel 2.7.3 vorgestellte Modell mittels nicht-linearer Regression angepasst. Die Anpassung erfolgte mit einem Matlab Programm, das den Algorithmus ‚fminsearch‘ implementierte.

Für die Ermittlung des sterischen Faktors wurde eine Durchbruchkurve mit dem nativen Protein aufgenommen. Die Durchbrüche wurden auf einer selbstgepackten Tricorn 5/20 Säule mit SP Sepharose FF oder SP Sepharose XL bei 76 cm/h durchgeführt. Die Proteinlösungen wurden über einen 10 oder 30 ml Superloop auf die Säule gepumpt. Im Falle von CTG wurde eine Proteinkonzentration von 0.2 mM verwendet bei einer Salzkonzentration von 50 mM. Bei OVT wurde eine Proteinkonzentration von 0.12 mM verwendet bei einer Salzkonzentration von 20 mM. Das Durchbruchvolumen wurde bei 10% des Signals der Ausgangslösung bestimmt. Für die Bestimmung des Durchbruchvolumen wurde ein anfänglicher Vordurchbruch, der auf nicht-bindende Komponenten in der Proteinlösung zurückzuführen ist, von der Durchbruchkurve abgezogen. Der sterische Faktor wurde, wie in Kapitel 2.7.3 beschrieben, unter Verwendung der vorher ermittelten linearen Parameter  $v$  und  $K$ , berechnet.

### **3.2.8 Fluoreszenzkorrelationspektroskopische Bestimmung von Diffusionskoeffizienten**

Die Messung des freien Diffusionskoeffizienten von Cy5-gefärbten Proteinen wurde mittels FCS auf einem CLSM System nach der Methode von Böhmer *et al.* (2001) mit einer Gesamtproteinkonzentration von  $3.5 \cdot 10^{-5}$  M in einem Phosphatpuffer (pH 7.0, 25 mM, 200 mM NaCl) und einer Cy5 Konzentration von  $\sim 1$  nM gemessen. Mit der FCS Methode können nur relative Diffusionskoeffizienten bestimmt werden, weswegen für absolute Werte der Diffusionskoeffizient von BSA aus der Literatur (Sober, 1970) als Referenzwert für alle anderen Proteine verwendet wurde.



### 3.3 Mikrosäulen

#### 3.3.1 Aufbau der Mikrosäulen

In dieser Studie wurden zwei verschiedene Mikrosäulen verwendet mit sichtbaren Säulenlängen von 2 oder 47 mm. Ein Schema der Mikrosäule ist in Abb. 3.1 dargestellt.

Bis auf die Säulenlänge waren beide Mikrosäulen identisch aufgebaut. Die Kanäle des eingeklebten M6-zu-10-32 Fittings der 2 mm und 47 mm Säule wurden aufgebohrt. Die Kapillaren von der HPLC zur Mikrosäule und von der Mikrosäule zum Detektor wurden über die 10-32-zu-M6 Adapter mit 10-32 Fittings für 1/16'' Kapillaren angeschlossen. Im Gewinde des langen M6-zu-10-32 Adapters am Säulenende wurde eine Metallfritte eingelegt, gefolgt von zwei O-Ringen zur Abdichtung, abgeschlossen vom 10-32-zu-M6 Fitting, das für einen ausreichenden Anpressdruck sorgte, sodass keine Partikel aus dem gepackten Bett entweichen konnten. Am Säulenanfang wurde die gleiche Konstruktion mit zwei O-Ringen ohne Metallfritte eingesetzt.

Die Kanäle der Mikrosäulen mussten vor Gebrauch mit Deckgläsern beklebt werden. Vor dem Kleben wurde die Oberfläche unterhalb der Mikrosäule von Schmutz und Fett gereinigt und mit Schmiergelpapier aufgeraut. Es wurde ein Zweikomponentenkleber auf Epoxidbasis (UHU plus Endfest 300) nach Gebrauchsanleitung verwendet. Der Kleber wurde dünn auf die Deckgläser aufgetragen und die Gläser zentriert über dem Kanal positioniert und leicht angedrückt. Es wurde darauf geachtet, daß zwischen Kanal und Kleberand ein Abstand blieb, damit nach der Wärmebehandlung kein Klebstoff im Kanal vorliegt. Die Mikrosäule wurde für 45 Minuten in einem Wärmeschrank bei 70°C zur Aushärtung des Klebers gestellt.

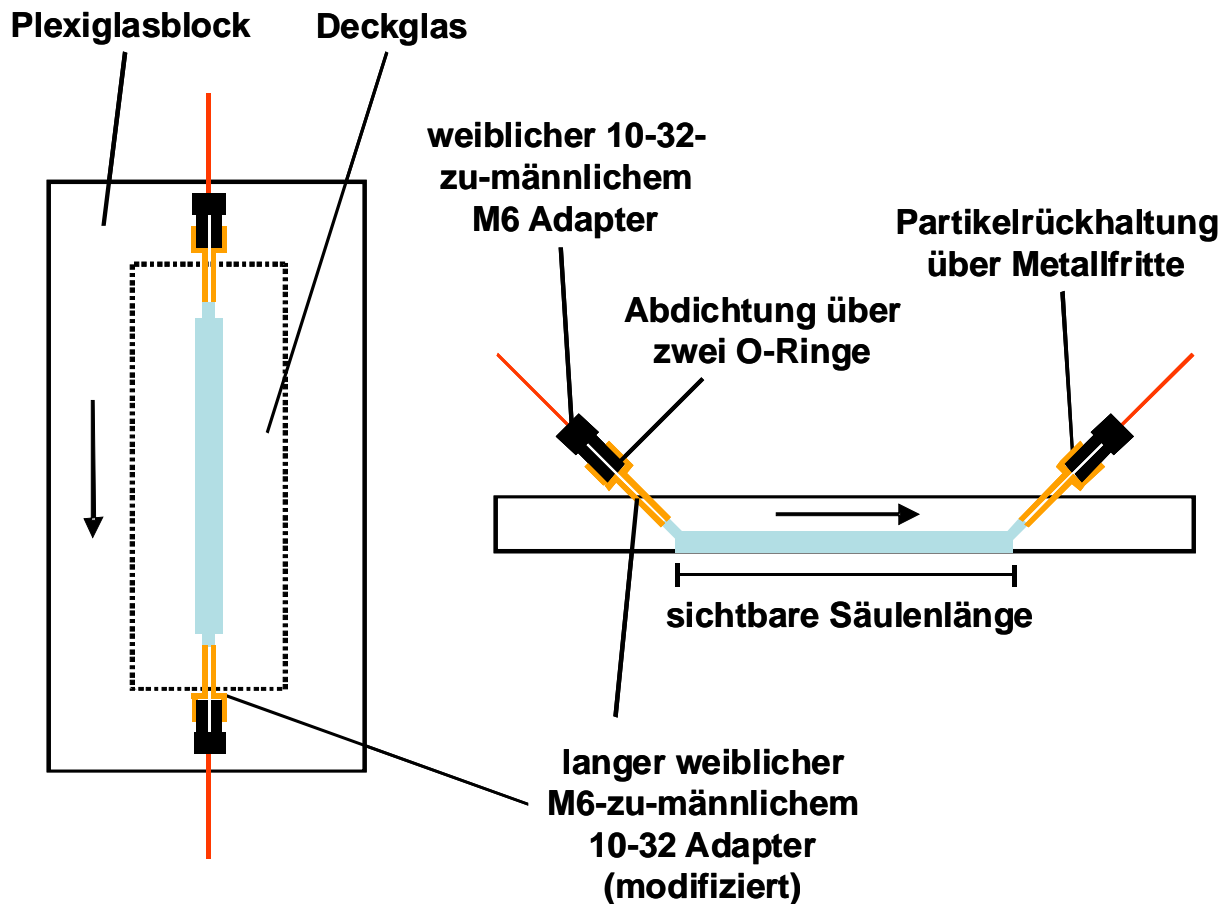


Abbildung 3.1. Schematischer Aufbau der verwendeten Mikrosäulen. Links Aufsicht, rechts seitliche Ansicht. Grundmaterial aus Plexiglas. Deckglas von Marienfeld. Weiblicher 10-32-zu-männlichem M6 Adapter von GE Healthcare. Langer weiblicher M6-zu-männlichem-10-32 Adapter von Upchurch Scientific.

### 3.3.2 Packen der Mikrosäulen

Die Mikrosäulen wurden mit Adsorbersuspension über 5 ml Spritzen gepackt. Vor dem Packen wurde die Mikrosäule mit der Fritte nach unten senkrecht fixiert und mit einer 5 ml Spritze von unten mit Puffer durchströmt. Eine 10 %ige Festphasensuspension wurde in 1 M NaCl angesetzt und mit einer 5 ml Spritze aufgezogen. Die Spritze wurde luftblasenfrei am oberen Eingang der Mikrosäule angeschlossen, während die Pufferspritze noch am unteren Teil der Mikrosäule angeschlossen war. Die Suspension wurde in die Mikrosäule injiziert und das Aufbau des gepackten Betts beobachtet. Beim Auftreten von Luftblasen wurde der Packvorgang abgebrochen, die Festphase entfernt und die Prozedur wiederholt.

Für die Diffusionsversuche (3.4.4) und die Durchbruchs- und Elutionsstudien (3.4.5 und 3.4.6) wurde die 2 mm Mikrosäule mit Sepharose 6 FF bzw. SP Sepharose FF oder SP Sepharose XL verwendet. Die 47 mm Mikrosäule wurde für die

größenausschlusschromatographische Trennung mit Superdex 200 prep grade verwendet (3.4.7).

### 3.3.3 Betrieb der Mikrosäulen

Im Anschluß an den Packvorgang wurde entweder die Mikrosäule an das Shimadzu HPLC System angeschlossen oder zur Lagerung die Anschlüsse mit Blindstopfen verschlossen. Vor jedem Anschließen wurden die Kapillaren ohne Säule mit einer 1 M NaCl Lösung bei 1 ml/min gespült um evtl. vorhandene Luftblasen zu entfernen. Die Säule wurde dann bei einer Fließgeschwindigkeit von 150 cm/h an das HPLC System angeschlossen bei gleichzeitiger Vermeidung von Luftblaseneintrag. Aufgrund der geringen Drucktoleranz der Mikrosäulen konnte am Säulenende kein Restriktionsventil zur Stabilisierung der Basislinie und Vermeidung von Luftblasen installiert werden. Im Laufe einiger Durchbruchexperimente kam es zum Auftreten von Luftblasen im DAD Detektor (sichtbar im Chromatogramm), die durch Entkoppeln der Kapillare am Detektor und Durchspülen der Messzelle mit wässriger Methanollösung (50% (v/v)) entfernt wurden.

Der experimentelle Aufbau besteht aus Hochleistungspumpen, die mit Puffern oder Reinigungslösung (0.1 M NaOH) gefüllt waren, die über einen Mischer mit einem Injektionsventil verbunden waren. Die Mikrosäule war auf dem CLSM Motortisch positioniert. Für die Diffusions- und Durchbruchsversuche (3.4.4-3.4.6) war ein Superloop (10 ml) über ein Injektionsventil in das System eingebunden. Für die größenausschlusschromatographischen Trennungen (3.4.7) war statt des Injektionsventils ein Autoinjektor vor der Mikrosäule angeschlossen. Vom Injektionsventil bzw. Autoinjektor führte eine Kapillare zum Eingang der Mikrosäule und eine Kapillare am Mikrosäulenende führte zum DAD Detektor. Die weitere Betriebsweise wird in den folgenden Unterkapiteln näher erläutert. Das gepackte Bett in der 2 mm Mikrosäule wurde jeweils vor dem ersten Versuchslauf mit Puffer bei 300 cm/h für 20 cv equilibriert, um die Packung zu stabilisieren. Das Totvolumen vom Superloop bis zum Säulenkopf betrug 73  $\mu$ l; vom Superloop bis zum DAD Detektor (ohne Mikrosäule) 191  $\mu$ l und vom Autoinjektor bis zum DAD Detektor (ohne Mikrosäule) 109  $\mu$ l.

### 3.4 Versuche mit konfokaler Laser Raster Mikroskopie

#### 3.4.1 Parameter und Einstellungen für Messungen mit einem konfokalen Laser Raster Mikroskop

Die Messung erfolgte an einem invertierten Zeiss LSM 510 CLSM mit einem Wasserimmersionsobjektiv 63x / NA 1.2 C-Apochromat. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur mit einem Zoomfaktor von 1, einem Verstärkeroffset von 0 und einer Verstärkung von 1 unternommen. Der Lochblendendurchmesser wurde bei allen Versuchen auf eine Airy Einheit gesetzt. Als Immersionsmedium auf dem Objektiv wurde Milli-Q Wasser verwendet.

Vor den Diffusionsversuchen (siehe 3.4.4) wurde durch einen Probelauf mit LYS-Cy5 eine Detektorspannung und Laserintensität gewählt, die im Gleichgewichtszustand ein hohes Signal von ca. 250 gewährleistet, bei niedrigem Rauschen. Für die Durchbruchversuche (siehe 3.4.5) wurde für jeden Farbstoff jeweils ein Probelauf mit CTG auf SP Sepharose FF bei 20 mM durchgeführt, um die Detektorspannung und Laserintensität zu justieren, sodaß ein Signal von ca. 250 im Sättigungszustand bzw. beim Maximum eines Konzentrationsringes erreicht wurde. Die Einstellungen für die anderen Versuche wurden, ausgehend von den Probeläufen, geschätzt. Für die größenausschlußchromatographischen Trennungen (3.4.7) wurden Probeläufe gefahren und während der Proteinmigration im gepackten Bett manuell Detektorspannung und Laserintensität gewählt, sodaß während der Sättigung des Partikels ein Signal von ca. 250 für jede Farbstoffkomponente erreicht wurde. Die konfokalen Messungen wurde überwacht und ggf. die Detektorspannung und Laserintensität geändert, um ein Übersteuern des Signals zu vermeiden.

Zur Anregung wurde je nach verwendetem Farbstoff ein Argonlaser (488 nm) oder ein HeNe Laser (543 nm bzw. 633 nm) benutzt. Bei den Untersuchungen zur Größenausschlußchromatographie (3.4.7) wurde gleichzeitig der Argonlaser und der HeNe (633 nm) Laser verwendet. Der Argonlaser wurde vor Gebrauch eine Stunde im Stand-by Modus vorgewärmt. In Tabelle 3.8 sind die Kanaleinstellungen für die jeweiligen Farbstoffe aufgeführt.

Alle Aufnahmen wurden als 8-bit Bild mit einer Auflösung von 512 x 512 Pixel gespeichert. Bei der Messung des Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten wurden vier gemittelte Bilder gespeichert, sonst wurde ein einziges Bild pro Zeiteinheit erstellt. Für Zeitserienaufnahmen wurden Bildabstände von 1, 5, 8 oder 20 s eingestellt.

Die intrapartikulären Messungen mittels CLSM wurden im Mittelpunkt eines geeigneten Partikels durchgeführt (vgl. 3.4.2). Um den Fokus auf den Mittelpunkt eines geeigneten Partikels zu setzen wurde der Reflexionsmodus des Mikroskops (HeNe Laser (543 nm); HFT: 80/20; keine Filter) verwendet. Bei gleichzeitigem Scannen wurde der Fokus des Mikroskops manuell verändert, bis der Durchmesser des im Reflexionsmodus sichtbaren Partikels maximal war.

Wurden in einem Versuch mehrere Positionen innerhalb der Säule untersucht (3.4.7), wurden die Positionen in der Mikroskopsoftware (Version 3.2 SP2) abgespeichert und konnten automatisch vom Motortisch angefahren werden.

**Tabelle 3.8. Übersicht der Einstellungen am LSM 510 zur Detektion von Fluoreszenzfarbstoffen.**

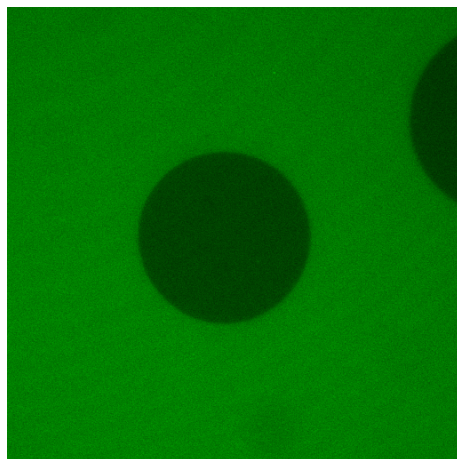
<b>Farbstoff</b>	<b>Laserlinie</b>	<b>HFT</b>	<b>NFT</b>	<b>Filter PH1</b>	<b>Filter PH3</b>
Atto635	633 nm	UV/488/543/633	-	LP 650	-
BODIPY / Fluorescein	488 nm	UV/488/543/633	-	LP 505	-
Cy3	543 nm	UV/488/543/633	-	LP 550	-
Cy5	633 nm	UV/488/543/633	-	LP 650	-
Cy5+Alexa488	633 nm + 488 nm	UV/488/543/633	635 VIS	LP 650	LP 560

**HFT: Hauptfarbteiler. NFT: Nebenfarbteiler. PH1: Pinhole 1. PH3: Pinhole 3. Detektion von Cy5 und Alexa488 gleichzeitig.**

Der Einfluß der Detektoreinstellungen auf das gemessene Signal wurde mit BSA-Cy3 beladener SP Sepharose FF in Abhängigkeit unterschiedlicher Detektoreinstellungen untersucht. Dabei wurde nur die jeweilige Detektoreinstellung variiert und andere Einstellungen konstant gehalten. Es wurde sowohl die Detektorspannung (Abb. Anhang 7.2-A), die Laserintensität (Abb. Anhang 7.2-B), die Signalverstärkung (engl. amplifier gain, Abb. Anhang 7.2-C) und der Verstärker Offset (engl. amplifier offset, Abb. Anhang 7.2-D) für unterschiedliche Cy3-Konzentrationen variiert. Die Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Detektorspannung wird über eine Exponentialfunktion beschrieben. Die Signalintensität variiert linear mit der Laserintensität. In diesem Fall wurden unterschiedliche Cy3-Konzentrationen verwendet und die Detektorspannung so gewählt, daß vergleichbare Signalintensitäten für jede Laserintensität erzielt werden. Sowohl die Signalverstärkung als auch der Verstärkeroffset wirken sich linear auf die Signalintensität aus.

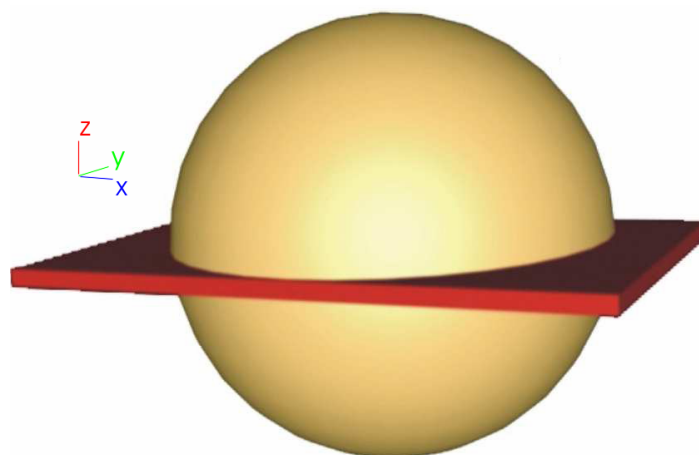
### 3.4.2 Verarbeitung konfokaler Rohdaten

Ein typisches konfokales Bild zeigt Abb. 3.2. Darin ist ein Schnitt durch einen Partikel zu erkennen, der die Bulkphase im Hintergrund und Teile eines anderen Partikels (Fokus nicht zwingend durch den Mittelpunkt) beinhaltet.



**Abbildung 3.2.** Typisches konfokales Bild eines chromatographischen Partikels in Kontakt mit einem Biokonjugat.

Es wird bei allen untersuchten Partikeln davon ausgegangen, daß der Fokus des CLSM durch den Mittelpunkt des Partikels verläuft, was schematisch in Abb. 3.3 dargestellt ist. Die Bilder stellen, zusammen mit Metainformationen zum Versuch und zur Detektion (Detektoreinstellungen, zeitlicher Bildabstand etc.), die elementaren Rohdaten für alle konfokalen Experimente in dieser Studie dar. Die örtliche Signalintensität ist in Form von Graustufenpixelintensitäten dargestellt und gespeichert.



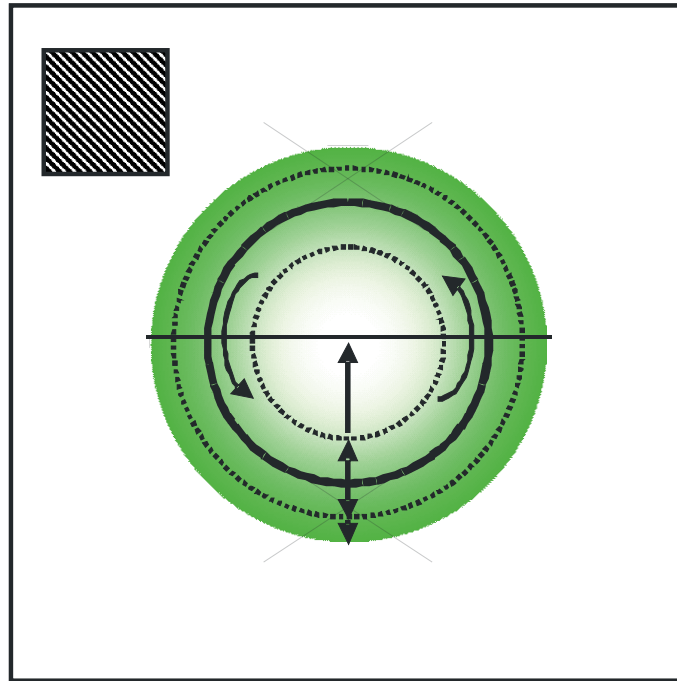
**Abbildung 3.3.** Schematische dreidimensionale Darstellung eines chromatographischen Partikels mit Fokusebene (rot) des CLSM durch den Mittelpunkt des Partikels.

Die Linearität zwischen Fluoreszenzsignal und Farbstoffkonzentration unter nicht bindenden Bedingungen wurde über eine Konzentrationsreihe von Biokonjugaten unter Verwendung von Sepharose 6 FF bis 0.025 mM demonstriert (siehe Abb. Anhang 7.3). Bei Linden (2001) wurde ein linearer Zusammenhang zwischen dem Fluoreszenzsignal und der Farbstoffkonzentration unter bindenden Bedingungen bis zu einer Konzentration von 0.2 mM im Adsorber für Cy5 ermittelt. Die größte Kapazität aller untersuchten Systeme in dieser Studie stellt der Versuch von CTG bei pH 7.0 und 20 mM auf SP Sepharose FF mit ca. 9 mM für das native Protein dar. Das D/P Verhältnis wurde bei allen Versuchen unter bindenden Bedingungen auf 0.01 eingestellt, sodaß im besten Fall eine Konzentration im Partikel von 0.09 mM angenommen werden kann. Weil das Biokonjugat 100-fach verdünnt vorliegt und unter dynamischen Bedingungen gearbeitet wird, ist die tatsächliche Kapazität in jedem Fall geringer, aufgrund der Isothermenform und der kompetitiven Bindung. D.h. selbst im „worst case“ von 0.09 mM ist die hier vorliegende Fluoreszenzfarbstoffkonzentration unterhalb der ermittelten Linearitätsgrenze von Linden (2001) und somit wird auch unter bindenden Bedingungen die Linearität zwischen Fluoreszenzsignal und Farbstoffkonzentration angenommen. Für alle anderen Versuche liegt die Farbstoffkonzentration in jedem Fall unter 0.09 mM.

Die Rohdatenverarbeitung erfolgte mit dem Program ImageJ (ImageJ 1.35i, NIH, USA). Für die Weiterverarbeitung der Bulkphaseninformation wurde das arithmetische Mittel der Pixelintensitäten verwendet (siehe Abb. 3.4). Der Bereich der Mittelwertbildung im Bild wurde manuell als Polygon definiert. Ggf. zeigten die gescannten Aufnahmen, vor allem in gepackten Betten, Unregelmäßigkeiten der Hintergrundintensität, die durch Beeinflussung des Meßsignals durch benachbarte Partikel, Unebenheiten der Mikrosäule bzw. des Deckglases und durch optische Verzerrungen an den Partikelrändern hervorgerufen wurden (siehe Abb. Anhang 7.4 und 7.5), die bei der manuellen Auswahl des Polygons von der Analyse ausgeschlossen wurden. Bei der Auswertung der Versuche zum Verteilungskoeffizienten (siehe 3.4.3) wurde zusätzlich die durchschnittliche Intensität der Partikelphase  $I_p$  über ein Polygon berechnet. Für die Analyse wurden die Randregionen oder Defekte (z.B. Luftblasen) im Partikel ignoriert.

Aufgrund der radialen Symmetrie des Partikelquerschnittes kann das intrapartikuläre Konzentrationsprofil des Partikels durch die gemittelte Intensitätsverteilung über den Radius wiedergegeben werden. Die experimentellen Rohdaten wurden durch eine radiale Signalverarbeitung gemittelt (siehe Abb. 3.4; Anhang 7.6; Schröder *et al.*, 2006). In Abb. Anhang 7.7-A und Anhang 7.7-B sind typische, radial gemittelte Intensitätsprofile eines

konfokalen Diffusionsversuches abgebildet. Die Rohdaten wurden auf einer Linie zum Kreismittelpunkt (A) oder einer bestimmten radialen Position über den gesamten Kreisumfang (B) mit den gemittelten Werten verglichen. Jeder Datenpunkt der gemittelten Kurve in Abb. Anhang 7.7-A stellt den Durchschnittswert aller Datenpunkte mit dem jeweiligen radialen Abstand dar, wie es in Abb. Anhang 7.7-B für einen konkreten Abstand zu sehen ist.



**Abbildung 3.4.** Schematische Darstellung der Bildverarbeitung konfokaler Aufnahmen von chromatographischen Partikeln. Polygon in linker oberer Ecke: Arithmetische Mittelwertbildung der Bulkkonzentration. Partikel im Zentrum: alle Pixel auf einem bestimmten Abstand vom Kreismittelpunkt (schwarzer Ring im Partikel) werden arithmetisch gemittelt (Schroeder *et al.*, 2006).

U.U. kann die Festphase eine Abschwächung des gemessenen intrapartikulären Signals verursachen. In Abb. Anhang 7.6-B ist das radial gemittelte Profil des in Anhang 7.6-A abgebildeten Partikels dargestellt, wobei der Radius der Mittelung Teile der Bulklösung miteinschließt. Der Sepharose 6 FF Partikel ist mit OVA-Cy5 Lösung ( $3.5 \cdot 10^{-5}$  M; D/P 0.1; pH 7.0; 50 mM Phosphat mit 200 mM NaCl) im Gleichgewicht unter nicht bindenden Bedingungen. Das intrapartikuläre Profil in Abb. Anhang 7.6-B ist flach ohne radiales Muster und näherungsweise konstant. Eine Korrektur des gemessenen Signals im CLSM in dieser Arbeit hinsichtlich der materialbedingten Lichtabschwächung ist nicht notwendig, weil das Profil keine materialbedingten Signalabschwächungen zeigt und diese Festphase repräsentativ für alle anderen Festphasen in dieser Studie ist.



Sowohl die Mittelung der Bulk- als auch der Partikelphase erfolgte für alle Bilder in einem Datensatz. Für einige konfokale Messungen ist ein schwaches Signal vor dem Versuchsstart zu beobachten, welches wahrscheinlich durch einen fehljustierten Filter verursacht wurde. Dieses ggf. vorhandene Meßartefakt wurde bei der Verwendung der gemessenen Daten berücksichtigt (siehe 3.5.1).

Um eine evtl. vorhandene Bewegung des Partikels über den gesamten Versuchsverlauf während der radialen Mittelung zu kompensieren, wurde der Mittelungskreis, falls nötig, manuell Bild für Bild korrigiert, sodaß der Mittelpunkt des Kreises mit dem Mittelpunkt des Partikels für jedes Bild übereinstimmt. Der Unterschied zwischen manuell korrigierten Daten und einer fehlenden Korrektur ist in Abb. Anhang 7.8 dargestellt. Durch die Partikelbewegung liegt das Zentrum des Mittelungsrings bei den unkorrigierten Daten nicht permanent im Partikelzentrum und schließt teilweise Bereiche des Bulks ein, sodaß die Randbereiche eine zu geringe und das Partikelzentrum eine zu hohe Signalintensität aufweisen.

Evtl. vorhandene Änderungen der Detektoreinstellungen während des Versuches wurden durch Angabe eines Schwellenwertes in den Matlab Programmen korrigiert.

Die experimentellen Daten besitzen ein gewisses Maß an Rauschen, welches sich negativ auf die Stabilität der Differentialgleichungslöser auswirkt (pers. Kommunikation von Lieres). Für die Modellierung der Diffusions- und Durchbruchdaten wurden in den Matlab Programmen die Daten geglättet.

### 3.4.3 Konfokale Messung von Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten

Der mittels CLSM gemessene Gleichgewichtsverteilungskoeffizient ist definiert als:

$$\Phi = \frac{I_p}{I_b} \quad (3-11)$$

mit der gemittelten Fluoreszenzintensität im Partikel  $I_p$  und in der Bulkphase  $I_b$ .

Der Partikelgleichgewichtsverteilungskoeffizient wurde im Batchansatz durch Mischen von Cy5-markierten Proteinen mit Stationärphase ermittelt. Entsprechend Gleichung 3-11 repräsentiert das Verhältnis der gemessenen Intensitäten in Partikel- und Bulkphase den Verteilungskoeffizienten. Für jedes Verteilungsexperiment wurden 10 µl einer 10 %igen Festphasensuspension mit 290 µl einer Proteinlösung (D/P von 0.1) in einer Mikrotiterplatte

mit 96 Vertiefungen und Glasboden gemischt. Alle Messungen wurden nach fünf Minuten durchgeführt, was ausreichend war für die Gleichgewichtseinstellung und die Sedimentation der Partikel.

Die Detektorspannung und Laserintensität wurde ggf. den Versuchsbedingungen angepasst, sodaß ein möglichst hohes, rauscharmes Signal erhalten wurde, welches nicht übersteuert war. Die absoluten Werte der Intensitäten sind nicht wichtig, weil der Verteilungskoeffizient aus dem Verhältnis zweier Intensitäten, die mit den selben Einstellungen gemessen wurden, bestimmt wird.

Die Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten von der z-Position wurde durch Aufnahme eines z-Stapels untersucht. In Abb. Anhang 7.9 ist der Verteilungskoeffizient für OVA-Cy5 für einen Q Sepharose FF (Durchmesser: 43 µm) Partikel für unterschiedliche Eindringtiefen dargestellt. Nach den ersten 10 µm wird ein nahezu konstanter Verteilungskoeffizient gemessen, der zum Partikelende wieder ansteigt. Die konfokale Messung des Verteilungskoeffizienten wird daher nicht durch unterschiedlich starke Lichtabschwächung im Partikel und der Bulkphase beeinflusst, solange im Partikelzentrum gemessen wird.

Bei Anwesenheit von Kontaminanten wie freier Fluoreszenzfarbstoff oder Dimeren muß das gemessene Signal korrigiert werden. Der gemessene Verteilungskoeffizient  $\Phi$  besteht aus dem Verteilungskoeffizient des zu untersuchenden Proteins  $\Phi_{\text{Protein}}$ , freien Farbstoffs  $\Phi_{\text{Farbstoff}}$  und von z.B. einem vorhandenen Dimer  $\Phi_{\text{Dimer}}$  mit den jeweiligen Anteilen  $f_{\text{Molekül}}$ . Bei bekannten Anteil  $f_{\text{Molekül}}$  der einzelnen Komponenten und unter Annahme von Verteilungskoeffizienten für die Kontaminanten kann der Einfluß der Kontaminanten auf den gemessenen Verteilungskoeffizient über Gleichung 3-12 korrigiert werden:

$$\frac{\Phi - f_{\text{Farbstoff}} \cdot \Phi_{\text{Farbstoff}} - f_{\text{Dimer}} \cdot \Phi_{\text{Dimer}}}{f_{\text{Protein}}} = \Phi_{\text{Protein}} \quad (3-12)$$

#### 3.4.4 Messung des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten

Der intrapartikuläre Diffusionskoeffizient in Adsorbentien wurde unter nicht-bindenden Bedingungen in einer gepackten Mikrosäule durch Frontalchromatographie mit CLSM Messung des Bulkkonzentrationsverlaufes an und der intrapartikulären Proteinverteilung in einem Partikel gemessen. Der experimentelle Aufbau ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

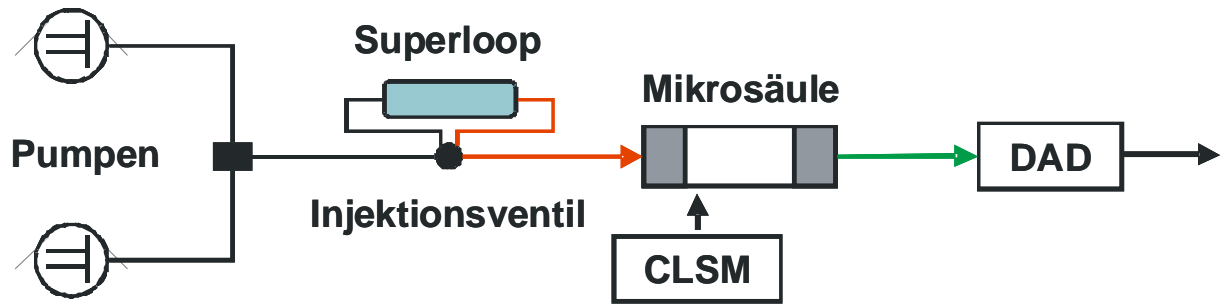


Abbildung 3.5. Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus von frontalchromatographischen Operationen. DAD: Diodenarraydetektor.

Vor den eigentlichen Versuchen wurde ein Partikel am Säulenbeginn manuell ausgesucht und der Fokus durch den Partikelmittelpunkt gelegt (siehe 3.4.2). Falls nicht anders erwähnt, wurde eine Fließgeschwindigkeit von 150 cm/h eingesetzt. Die Diffusionsmessung erfolgte durch Injektion von Proteinlösung auf die Mikrosäule über den Superloop. Mit Start der Injektion wurde die Aufnahme von Bildern mittels CLSM gestartet. Es wurden jeweils 400  $\mu\text{l}$  Proteinlösung injiziert. Die Proteinkonzentration betrug, soweit nicht anders erwähnt,  $3,5 \cdot 10^{-5}$  M bei einem D/P von 0.1. Alle Versuche wurden dreimal wiederholt. Die Messung beinhaltete sowohl die Diffusion in den Partikel als auch die Diffusion der Proteine aus dem Partikel nach Abschalten der Proteinversorgung über den Superloop. Insgesamt wurden ca. 400 Bilder pro Versuch aufgenommen. Nach dem Diffusionsversuch wurde das gepackte Bett mit 0.1 M NaOH für 20 cv regeneriert und im Anschluß für 20 cv mit Puffer equilibriert. Die Versuche wurden, soweit nicht anders erwähnt, bei pH 7.0 mit einem 25 mM Phosphatpuffer mit 200 mM NaCl für die Proteine LYS, CTG, BLG, OVA, BSA, OVT und GGB auf Sepharose 6 FF durchgeführt. In Tabelle 3.9 sind die einzelnen Versuchsserien der Diffusionsuntersuchungen aufgelistet mit den Abweichungen vom oben genannten Versuchsschema.

Tabelle 3.9. Übersicht der experimentellen Bedingungen während der Diffusionsversuche.

Proteine	Festphase	[Protein]	pH	[NaCl]	Fließgeschwindigkeit
alle	Sepharose 6 FF	$3,5 \cdot 10^{-5}$ M	7	200, 1000 mM	150 cm/h
alle	Capto Q	$3,5 \cdot 10^{-5}$ M	7	1000 mM	150 cm/h
BSA	Sepharose 6 FF	$3,5 \cdot 10^{-5}$ M	7	200 mM	300, 75 cm/h
BSA, GGB	Sepharose 6 FF	$2,2 - 5,3 \cdot 10^{-5}$ M	7	200 mM	150 cm/h
CTG	Sepharose 6 FF	$3,5 \cdot 10^{-5}$ M	7, 12	50, 200, 1000 mM	150 cm/h
LYS	Sepharose 6 FF	$3,5 \cdot 10^{-5}$ M	4, 7, 12	50, 200, 500, 1000 mM	150 cm/h

Neben den Einzelkomponentenstudien wurden auch Multikomponentenversuche und Versuche mit adsorbiertem Protein durchgeführt.

Die Multikomponentenversuche unterscheiden sich vom Ablauf nicht von den Einzelkomponentenversuchen, mit dem Unterschied, daß die Proteinlösung ein Gemisch aus

CTG und GGB war und nur Teile der CTG-Lösung als CTG-Cy5 Biokonjugat vorlagen. GGB wurde nur als natives Protein eingesetzt und nicht konfokal detektiert. Die CTG Konzentration wurde konstant bei  $3.5 \cdot 10^{-5}$  M mit einem D/P von 0.1 gehalten und unterschiedliche GGB Konzentrationen von  $3.5 \cdot 10^{-5}$ ,  $7 \cdot 10^{-5}$ ,  $1.4 \cdot 10^{-4}$ ,  $2.8 \cdot 10^{-4}$  und  $3.5 \cdot 10^{-4}$  M wurden untersucht.

Für Diffusionsversuche mit adsorbiertem Protein auf der Festphase wurde OVA-Cy5 mit einem D/P von 0.1 bei einer Gesamtkonzentration von  $3.5 \cdot 10^{-5}$  M verwendet. Als Puffer wurde ein Phosphatpuffer (pH 7.5, 20 mM) oder ein Acetatpuffer (pH 5.0, 20 mM) eingesetzt. Als Festphase wurde SP Sepharose FF verwendet und vor den Diffusionsversuchen mit OVA ein Durchbruch mit LYS (10 mg/ml) in jeweils einem der Puffersysteme bei 225 cm/h gefahren. Im Anschluß an den Durchbruch von LYS wurde ein Diffusionsversuch mit OVA bei 150 cm/h mit den oben genannten Bedingungen durchgeführt. Bei beiden pH-Werten zeigte OVA ein adsorptives Verhalten und statt eines reinen Diffusionsversuchs wurde ein Durchbruchsexperiment aufgenommen.

### 3.4.5 Konfokale Messung von Durchbruchskurven

Die konfokale Messung von Durchbruchskurven ist vom Ablauf identisch mit den Diffusionsversuchen (3.4.4) mit der Ausnahme, daß unter adsorptiven Bedingungen operiert und die Absorption im Säuleneffluent gemessen wird. Die Proteinlösung wurde in einem Superloop vorgelegt mit einem D/P von 0.01. Im Falle der Messungen von OVT auf SP Sepharose FF und XL für eine Salzkonzentration von 20 mM wurde ein D/P von 0.1 verwendet. Die HPLC wurde mit der Datenaufnahme gestartet bei einer Fließgeschwindigkeit von 96 cm/h. Nach einer Minute wurde der Durchbruch über den Superloop begonnen bei gleichzeitigem Start der CLSM Messungen mit einem Bildabstand von 5, 8 oder 20 Sekunden. Die Datenaufnahme wurde bis zum Durchbruch des nativen Proteins (gemessen über Absorption bei 280 nm) fortgeführt. Tabelle 3.10 gibt eine Übersicht über alle durchgeführten Durchbruchsexperimente.

### 3.4.6 Konfokale Messung von Elutionen

Messungen der intrapartikulären Proteinverteilung und der Bulkkonzentration mittels CLSM während einer Elution wurden nach den oben beschriebenen Durchbruchversuchen und darauf folgenden Waschschritten aufgenommen. Die Elution erfolgte bei 96 cm/h mit einem

Stufengradienten auf einen Phosphatpuffer mit 1 M NaCl. Der pH-Wert variierte je nach verwendetem Protein.

**Tabelle 3.10. Übersicht der Durchbruchversuche mit konfokaler Messung.**

Protein	Festphase	Salzkonzentration [mM]
CTG	SP Sepharose FF	20
		50
		100
CTG	SP Sepharose XL	20
		50
		100
OVT	SP Sepharose FF	10
		20
		50
OVT	SP Sepharose XL	10
		20
		50

### 3.4.7 Konfokale Messung der Größenausschlusschromatographie

Konfokale Messungen von größenausschlusschromatographischen Trennungen wurden in der 47 mm Mikrosäule mit Superdex 200 prep grade durchgeführt. Als Proteine wurden CTG und GGB eingesetzt. CTG wurde mit Cy5 und GGB mit Alexa488 markiert bei einer Konzentration von 0.71 g/l bzw. 6.5 g/l und DOL von 0.69 bzw. 1.6. Nach der Biokonjugation wurden die markierten Proteine über einen Zentrifugalultrafilter 1:10 ankonzentriert. Für CTG wurde ein 10 kDa (Vivascience) und für GGB ein 30 kDa (Pall) Ultrafilter nach Herstellerangaben eingesetzt. Der experimentelle Aufbau ist in Abb. 3.6 dargestellt. Die Versuche wurden bei einer Fließgeschwindigkeit von  $7 \cdot 10^{-4}$  m/s mit Phosphatpuffer (pH 7.0, 25 mM, 200 mM NaCl) durchgeführt. Es wurden 5  $\mu$ l eines 1:1 Gemisches von CTG und GGB auf die Säule injiziert. Vor Versuchsstart wurden sechs Positionen entlang der gepackten Säulen gespeichert und im Laufe der Trennung abgefahren (siehe Abb. 3.6). Die Analyse des Säuleneffluents erfolgte durch Absorptionmessung bei 280, 488 und 654 nm. Der Bildabstand an jeder Position betrug eine Sekunde.

Zur Verdeutlichung der Trennprozesse der beiden Komponenten wurden die Peaks an eine exponentiell modifizierte Gaussfunktion angepasst und die Auflösung R nach der Formel 3-13 berechnet (Guiochon und Lin, 2003; Giddings, 1991):

$$R = 1.18 \frac{(t_2 - t_1)}{w_{0.5,1} + w_{0.5,2}} \quad (3-13)$$

mit Retentionszeiten  $t$  und Peakbreite auf halber Peakhöhe  $w_{0.5}$ .

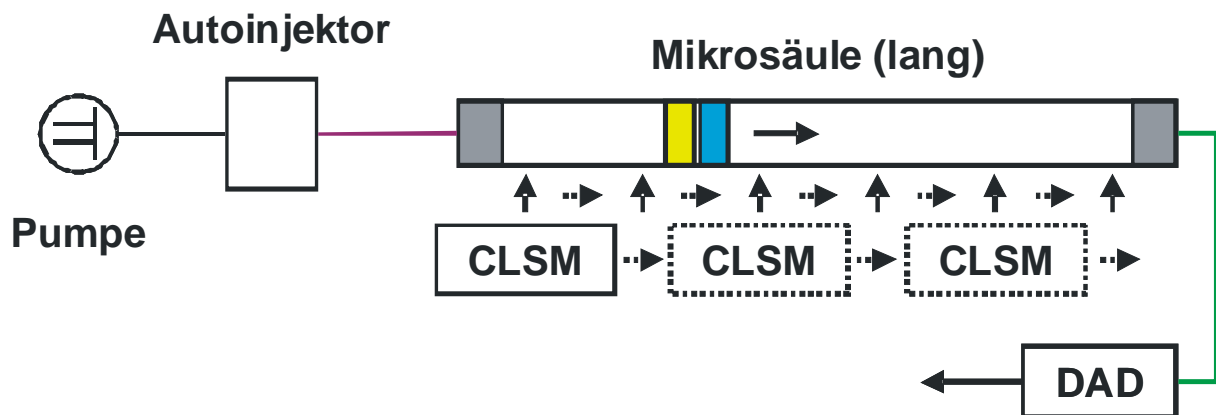


Abbildung 3.6. Schematische Übersicht des experimentellen Aufbaus zur Analyse von Größenausschlusschromatographischen Trennungen mit CLSM Detektion. Injektion von 5  $\mu\text{l}$  bei einer Fließgeschwindigkeit von  $7 \cdot 10^{-4}$  m/s. Verwendete Festphase: Superdex 200 prep grade. Nach Messung der Proteinmigration an einer Position Bewegung des Motortisches zu vorher abgespeicherten Positionen (0, 9.4 mm, 18.8 mm, 28.2 mm, 36.6 mm, 45 mm vom sichtbaren Säulenkopf entfernt) und weiterer konfokaler Messung.

### 3.5 Modellierung und Simulation

Die Bestimmung des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten (3.5.1) bzw. die Modellierung und Simulation der Größenausschlusschromatographie (3.5.2) oder Proteinadsorption in einem Partikel (3.5.3) erfolgte nach den Ausführungen in Kapitel 2.5.1 bzw. 2.7. Die Lösung der Differentialgleichungssysteme erfolgte mit Matlab Programmen, die von Herrn Dr.-Ing. Eric von Lieres (Forschungszentrum Jülich GmbH, Institut für Biotechnologie) erstellt wurden.

#### 3.5.1 Bestimmung des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten

Die erste mathematische Beschreibung der Diffusion wurde von Fick entwickelt. Für Diffusion in einer Dimension gilt das erste Fick'sche Gesetz:

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial z} \quad (3-14)$$

mit dem Flux  $J$ , dem Diffusionskoeffizienten  $D$  und dem Konzentrationsgradienten  $\partial c / \partial z$  entlang der Ortsachse  $z$ . Die entscheidende Größe für die Beschreibung des Stofftransports in Abhängigkeit der Festphasen- und Proteineigenschaften ist der Diffusionskoeffizient. Für einen kugelförmigen Körper lässt sich analog zu Gleichung 3-14

eine Differentialgleichung für den Transportprozess aufstellen, die die zeitliche und radiale Veränderung der Konzentration berücksichtigt:

$$\frac{\partial}{\partial t} c(r,t) = D_{ip} \left( \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 \frac{\partial}{\partial r} c(r,t) \right) \right) \quad (3-15)$$

Für die Lösung der Differentialgleichung werden die folgenden Randbedingungen benötigt:

$$c(r,0) = 0 \quad (3-16)$$

$$c(R,t) = b_{\Phi}(t) \quad (3-17)$$

Die Randbedingungen lauten, daß zum Zeitpunkt  $t=0$  kein Protein im chromatographischen Medium vorliegt (3-16) und die Proteinkonzentration am äußersten Partikelrand durch die Bulkproteinkonzentration, korrigiert um den Verteilungskoeffizienten  $\Phi$ ,  $b_{\Phi}$  vorgegeben ist (3-17). Für die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten wird nicht die Bulkproteinkonzentration verwendet, sondern die Proteinkonzentration in einer infinitesimal kleinen Schale der stationären Phase am Partikelradius  $R$ , bei der das Protein schon von der Bulkphase in die poröse Matrix übergegangen ist. Dabei wird automatisch der Verteilungskoeffizient berücksichtigt (Schröder *et al.*, 2006).

In Kapitel 3.4.2 wurden Lichtabschwächungseffekte, Signalrauschen und Signalinhomogenitäten innerhalb der Daten aufgezeigt. Um diese Effekte zu berücksichtigen, wurden die Daten zweifach korrigiert: Zum einem wurde angenommen, daß zum Zeitpunkt  $t=0$  kein Protein in der Festphase vorhanden war und zum zweiten, daß im Sättigungszustand das radiale Profil der Partikelphase konstant ist. Die intrapartikulären Profile wurden durch Subtraktion eines Polynoms zweiten Grades, welches an das Intensitätsprofil zum Zeitpunkt  $t=0$  angepasst wurde, normalisiert. Die Bulkphase wurde ebenfalls um einen konstanten Faktor normalisiert.

Die intrapartikulären Profile wurden ein zweites mal durch Division durch ein Polynom zweiten Grades normalisiert, welches an die Daten im Sättigungszustand angepasst wurde.

Eine Scheibe mit einem Radius von  $4.34 \mu\text{m}$  im Zentrum wurde von der Analyse ausgeschlossen, weil die Datendichte für die radiale Mittelung zu gering war. Genauso wurde ein Ring mit einem Radius von  $4.34 \mu\text{m}$  vom Partikelrand ausgeschlossen, weil die Signale am Partikelrand zu unregelmäßig für eine weitere Verwendung waren. Die normalisierten Daten wurden für die Abschätzung des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten verwendet.

Die partielle Differentialgleichung in Zeit und Raum kann mit der Linienmethode in ein System gewöhnlicher Differentialgleichungen transformiert werden: Die partiellen Ableitungen der Konzentration mit Bezug auf den Radius werden an äquidistanten Knoten diskretisiert. Das resultierende System gewöhnlicher Differentialgleichungen wurde mit Hilfe des Matlab Algorithmus ‚ode15s‘ integriert. Die Schätzung des Diffusionskoeffizienten ist ein iterativer Prozeß, welcher von einem anfänglichen Wert ausgehend, systematisch Diffusionskoeffizienten variiert und simulierte Ergebnisse für den gesamten Datensatz in Zeit und Raum mit den experimentellen Daten vergleicht, um die beste Anpassung zu finden. Die Anpassung wurde über das Residuum der besten Anpassung bewertet und eine Fehlerabschätzung erfolgte durch Anpassung an Wiederholungen des selben Experiments. Der Matlab Algorithmus ‚fminbnd‘ wurde für die Schätzung des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten verwendet und die Differenzen zwischen simulierten und experimentellen Daten durch Minimierung der Fehlerquadrate verkleinert. Es wurden zwei initiale Werte ausgesucht, die mehr als eine Größenordnung auseinander lagen, um alle möglichen Diffusionskoeffizienten einzuschließen, nach denen gesucht wurde.

Für einige Datensätze wurde keine Schätzung des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten durchgeführt, sondern manuell ein Parameterraum vorgegeben, und das Residuum für jede Simulation berechnet.

### **3.5.2 Modellierung größenausschlusschromatographischer Trennungen in einem gepackten Bett**

Die Modellierung von SEC Trennungen in einem gepackten Bett erfolgte über das in Kapitel 2.7 vorgestellte GRM ohne Beitrag der Adsorption. Das resultierende System gewöhnlicher Differentialgleichungen wurde mit Hilfe des Matlab Algorithmus ‚ode15s‘ integriert. Die Simulation verwendet die Daten an der Position am Säulenkopf als Startwerte für die Berechnung der Peakpositionen an den folgenden Positionen. Die Chromatogramme an jeder Säulenposition wurden für jedes Protein auf den Maximalwert des gemessenen Signals normiert. Im Gegensatz zur Simulation der Adsorption in einem Partikel (s.u.) wird bei der SEC Trennung die gesamte Säule simuliert und die Simulationsdaten mit den experimentellen Daten an den jeweiligen Positionen (siehe 3.4.7) verglichen. Der intrapartikuläre Transport wird nicht diskret an jeder radialen Position des Partikels modelliert, sondern nur der Transport in und aus dem Partikel. Die Simulationsparameter werden in Tabelle 3.11 zusammengefaßt.



**Tabelle 3.11. Übersicht der Parameter für das GRM zur Modellierung der SEC Trennungen aus CLSM Versuchen.**

Bedeutung	Quelle
Chromatogramme	normierte Daten aus Bulkbereich neben den Partikeln
Partikelradius	Herstellerangaben (hier 17 $\mu\text{m}$ )
Porosität $\varepsilon_b$	Umrechnung aus Gleichgewichtsverteilungskoeffizient (s.u.)
intrapartikulärer Diffusionskoeffizient $D_{ip}$	CLSM Messung in Sepharose 6 FF (vgl. 2.4)
Filmdiffusionskoeffizient $k_f$	auf $6 \cdot 10^{-6}$ m/s gesetzt (Schätzung)
Startwerte der Bulkkonzentration	Proteine: 0
Startwerte der Bulkkonzentration im Partikel	Proteine: 0
Zeitschrittweite der Daten	Vorgegeben durch CLSM Messung (1 s)
Dispersion	$3.5 \cdot 10^{-9}$ m/s (Schätzung)
Konvektion	$7 \cdot 10^{-4}$ m/s

Der Gleichgewichtsverteilungskoeffizient wird über die Bulkporosität  $\varepsilon_b$  wie folgt definiert:

$$\Phi = \frac{1 - \varepsilon_b}{\varepsilon_b} \quad (3-18)$$

Die Simulation wurde mit dem oben angegebenen Parameter für CTG oder GGB durchgeführt ohne Parameteroptimierung.

### 3.5.3 Modellierung der kompetitiven Proteinadsorption in einem Partikel

Die Modellierung der Proteinadsorption in einem Partikel während eines Durchbruchexperiment fand unter der Prämisse statt, daß fluoreszenzmarkierte Proteine andere chromatographische Eigenschaften besitzen, als das native Protein und daher ein Mehrkomponentensystem vorliegt, welches unter kompetitiven Bedingungen auf dem Partikel adsorbiert (vgl. Kapitel 2.1). Basierend auf den Ausführungen aus Kapitel 2.7 erfolgte die Modellierung über ein GRM, welches das SMA Modell (vgl. Kapitel 2.7.2) implementiert. Die benötigten Parameter und Daten für das GRM und die Quellen sind in Tabelle 3.12 aufgeführt.

Für die Mikrosäule wurden die gemittelten Partikelparameter  $\Lambda$  und  $\varepsilon_p$  aus den oben genannten Experimenten (3.2.4) mit einer herkömmlichen, gepackten Säule verwendet, da eine präzise Messung dieser Parameter in der Mikrosäule nicht erfolgreich war.

Der Verlauf der Bulkkonzentration für das Biokonjugat wurde aus dem direkt gemessenen Bulkchromatogramm neben dem Partikel entnommen und die Umrechnung des Signals in Konzentrationen wurde am Maximalwert während des Durchbruchs durchgeführt.

Die gemessenen intrapartikulären Signale entsprechen der Konzentration im Porenraum  $c$  und der adsorbierten Konzentration  $q$ . Die Umrechnung der Signalintensitäten der intrapartikulären Profile in Konzentrationen erfolgte am Maximalwert während eines

Durchbruchversuchs. Der numerische Wert für  $q+c$  ist nicht bekannt und mußte geschätzt werden als Vielfaches der tatsächlich eingesetzten Bulkkonzentration.

**Tabelle 3.12. Übersicht der Parameter für das GRM zur Modellierung der intrapartikulären Profile aus CLSM Versuchen.**

<b>Bedeutung</b>	<b>Quelle</b>
Bulkprofile aus Säuleneffluent	normierte HPLC Daten
intrapartikuläre Profile aus CLSM Messungen	radial gemittelte und bewegungskompensierte Intensitätsdaten
Bulkprofile aus CLSM Messungen	normierte Daten am Partikel
Partikelradius	individuelle Anpassung an den Datensatz
totale ionische Kapazität $\Lambda$	Frontalchromatographische Bestimmung in gepackten Betten (vgl. 3.2.4)
Partikelporosität $\varepsilon_p$	Chromatographische Bestimmung in gepackten Betten (vgl. 3.2.4)
intrapartikulärer Diffusionskoeffizient $D_{ip}$	Na <sup>+</sup> : Gallant (2003); Proteine: konfokale Messung (vgl. 3.4.4)
Filmdiffusionskoeffizient $k_f$	als nicht geschwindigkeitsbestimmend gesetzt (1 m/s)
Gleichgewichtskonstante $K$ (SMA)	Chromatographische Bestimmung in gepackten Betten (vgl. 3.2.7)
charakteristische Ladung $v$ (SMA)	Chromatographische Bestimmung in gepackten Betten (vgl. 3.2.7)
sterischer Faktor $\sigma$ (SMA)	Durchbruchkurven in gepackten Betten (vgl. 3.2.7)
Desorptionskonstante $k_d$ (SMA)	manuelle Anpassung
Adsorptionskonstante $k_a$ (SMA)	berechnet (s.u.)
Startwerte der Bulkkonzentration im Partikel	Na <sup>+</sup> : Pufferkonzentration; Proteine: 0
Startwerte der adsorbierten Proteinkonzentration im Partikel	Proteine: 0
Bulkkonzentration $c_b$	Startkonzentrationen (vgl. 3.4.5)
Zeitschrittweite der Daten	Vorgegeben durch CLSM Messung (5, 8 oder 20 s)
Schwellenwert für Signalkorrektur	individuelle manuelle Anpassung an den Datensatz
Formparameter für Durchbruchkurve FF(1) bis FF(4)	individuelle manuelle Anpassung an den Datensatz (s.u.)
Glättungsparameter	individuelle manuelle Anpassung an den Datensatz
Ortsschrittweite der Daten	Vorgegeben durch CLSM Messung (hier immer 0.29 $\mu\text{m}$ pro Pixel)
Simulationsdauer	Vorgegeben durch Messung (ca. 30 bis 150 min)

Der Verlauf der Bulkkonzentration des nativen Proteins am Partikel kann mit den zu Verfügung stehenden Methoden nicht gemessen werden und wurde aus dem Signal der Absorptionsmessung des Säuleneffluents (280 nm) abgeschätzt. Dafür wurde die Form der Durchbruchkurve über die Funktion in Gleichung 3-19 und 3-20 nachgebildet, die vier Formfaktoren (FF(n)) zur Beschreibung benötigt. Bedingt durch die Position des Partikels am Säulenkopf muß die Durchbruchkurve, die am Säulenende gemessen wurde, zu früheren Zeiten verschoben werden, um die Verzögerung durch die Adsorption im gepackten Bett zu berücksichtigen. Für Datensätze mit geringfügiger Adsorption (hohe Salzkonzentrationen) ist die Verzögerung vernachlässigbar und die Durchbruchkurven wurden nicht modifiziert. Für Datensätze mit stärkerer Adsorption wurde aus dem Vergleich der Chromatogramme des nativen Proteins und des Biokonjugates am Säulenende und dem Vergleich des Chromatogramms des Biokonjugates am Säulenende und am Partikel der Startzeitpunkt des Durchbruches abgeschätzt. Die Form der Durchbruchkurve wurde nicht verändert. Da für das native Protein ein Plateau am Ende des Durchbruches entsteht, wird  $c_b$  für das native Protein

am Maximalwert der Durchbruchskurve gleichgesetzt mit der experimentell eingesetzten Proteinkonzentration.

$$B = \frac{\exp\left(\frac{t - FF(1)}{FF(2)}\right)}{1 + \exp\left(\frac{t - FF(1)}{FF(2)}\right)} \cdot c_b \quad \text{für } FF(3) < 0 \quad (3-19)$$

$$B = \frac{\exp\left(\frac{t - FF(1)}{FF(2)}\right)}{1 + \exp\left(\frac{t - FF(1)}{FF(2)}\right)} \cdot \left( \frac{1 - \exp\left(\frac{-t}{FF(3)}\right)}{1 + FF(4)} \right) \cdot c_b \quad \text{für } FF(3) > 0 \quad (3-20)$$

Die Werte der Desorptionskonstanten sind nicht bekannt, sondern nur das Verhältnis der Ad- und Desorptionskonstanten, das gegeben ist durch die SMA Gleichgewichtskonstante K. Die Desorptionskonstante und damit automatisch auch die Adsorptionskonstante werden zur Anpassung der Daten verändert.

Das System gewöhnlicher Differentialgleichungen wurde mit Hilfe des Matlab Algorithmus ‚ode15s‘ integriert. Die Simulationsergebnisse wurden mit den experimentellen Daten verglichen und die Sorptionskonstanten manuell variiert, um eine verbesserte Anpassung zu erreichen.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Der Ergebnis- und Diskussionsteil besteht aus zwei Themenbereichen: im ersten Teil werden neue Methoden zur Bestimmung des Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten und des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten unter nicht bindenden Bedingungen mittels konfokaler Laser Raster Mikroskopie vorgestellt. Der Einfluß von konjugierten Fluoreszenzfarbstoffen auf die gemessenen Ergebnisse wird in Validierungsstudien untersucht. Die Erkenntnisse aus den Messungen des Gleichgewichtsverteilungs- und Diffusionskoeffizienten werden auf die Messung innerhalb des gepackten Bettes und die Simulation von Größenausschlusschromatographischen Trennungen angewendet.

Der zweite Teil der Arbeit konzentriert sich auf die Messung und Simulation von Adsorptionsvorgängen unter nicht-linearen Bedingungen in einem gepackten Bett auf dem Einzelpartikelniveau. Durch Bestimmung von SMA Isothermen sowohl der eingesetzten nativen Proteine, als auch von drei unterschiedlichen Biokonjugaten werden die Unterschiede zwischen den Proteinspecies dargestellt und Isothermenparameter für die Simulation bereitgestellt. Die Analyse der Durchbruchkurven erfolgt einerseits über die Daten aus dem Säuleneffluent und auf dem Einzelpartikelniveau mittels konfokaler Laser Raster Mikroskopie. Ein ausgewählter Datensatz bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen wird mit einem allgemeinen Geschwindigkeitsmodell simuliert. Schließlich werden Stofftransportphänomene während einer Stufenelution auf dem Einzelpartikelniveau gemessen. Die Folgen und Implikationen der Biokonjugation auf die gemessenen Profile werden dargestellt und Modelle und Daten aus der Literatur kritisch diskutiert.

### 4.1 Verteilung und Diffusion von Proteinen in chromatographischen Festphasen - Validierungsexperimente

Die Konjugation von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen kann aufgrund der Änderungen der Moleküleigenschaften zu meßbaren Unterschieden im chromatographischen Verhalten der Biokonjugate im Vergleich zu den nativen Proteinen führen (vgl. 2.1.3). Vor der Verwendung von Biokonjugaten zur Bestimmung von Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten (4.2), intrapartikulären Diffusionskoeffizienten (4.3) und der Untersuchung von Größenausschlusschromatographischen Trennungen mittels CLSM (4.4) muss daher überprüft werden, in wie weit die Konjugationsreaktion mit den jeweiligen Farbstoffen Einfluss auf das Verhalten unter nicht-bindenden Bedingungen hat.

Im Folgenden wird daher die Reinheit der Fluoreszenzfarbstoffe, sowie der Einfluss potentiell vorhandener nicht-spezifischer Interaktionen auf das Retentions- und Verteilungsverhalten der verschiedenen Biokonjugate für verschiedene chromatographische Materialien untersucht. Desweiteren wird das Vorhandensein von multimeren Formen und freiem Fluoreszenzfarbstoff in Biokonjugatlösungen überprüft.

Die Ergebnisse werden hinsichtlich der Eignung der untersuchten Biokonjugate bzw. der nativen Proteine für die oben genannten Versuchstypen und für Adsorptionsstudien diskutiert. Auf Unterschiede zwischen Biokonjugaten und nativen Proteinen unter bindenden Bedingungen wird ausführlich in den Kapiteln 4.5 bis 4.8 eingegangen.

#### **4.1.1 Reinheit der Fluoreszenzfarbstoffe**

Die Reinheit der Fluoreszenzfarbstoffe wurde über isokratische Trennungen auf einer Tricorn 5/200 Säule mit Sepharose 6 FF (Phosphatpuffer 50 mM, pH 7.0, 200 mM NaCl) bei einer Fließgeschwindigkeit von 153 cm/h mit den direkt im Puffer gelösten, reinen Farbstoffen überprüft. Zusätzlich zu der Absorption bei 280 nm und des jeweiligen Absorptionsmaximums des Fluoreszenzfarbstoffes wurde bei den Versuchen mit Fluoreszenzfarbstoffen die Fluoreszenz des Säuleneffluents gemessen. In Abb. 4.1.1 werden die resultierenden Chromatogramme für Nitrat (c: 1 M) und Blue Dextran (c: 2 mg/ml), sowie die Farbstoffe Atto635, BODIPY und Cy5 (c: 0.1 mg/ml) dargestellt. Im Gegensatz zu den Biokonjugationen mit BODIPY in Gegenwart von Proteinen, präzipitierte der in DMSO gelöste Farbstoff sofort nach dem Lösen im Phosphatpuffer und nur ein geringer Anteil an BODIPY befand sich in Lösung.

Die Chromatogramme der Farbstoffe zeigen Absorption sowohl bei 280 nm und der jeweiligen Absorptionswellenlänge des jeweiligen Farbstoffes bei einer Retentionszeit von 2 min und 4.3 min, was vor bzw. bei der Ausschlussgrenze von Sepharose 6 FF liegt (Blue Dextran: 4 min). Es wird kein Fluoreszenzsignal für diese Peaks detektiert. Die Identität dieser Substanzen konnte nicht eindeutig geklärt werden. Potentiell könnte es sich aber um Verunreinigungen in den kommerziellen Präparationen oder nicht-fluoreszierende Aggregate der Farbstoffe handeln, mit einem Molekulargewicht von ca. 2000 kDa und größer. Die Retentionszeiten von Cy5 (9.1 min) und Nitrat (8.9 min) sind vergleichbar, wohingegen Atto635 (15.3 min) und BODIPY (10.8 min) größere Retentionszeiten als Nitrat besitzen. Im Falle von Atto635 und BODIPY sind zwei Peaks zu erkennen. Das Fluoreszenzsignal für Atto635 und Cy5 entspricht den Peaks der Absorptionsmessung. Bei BODIPY ist das Signal übersteuert.

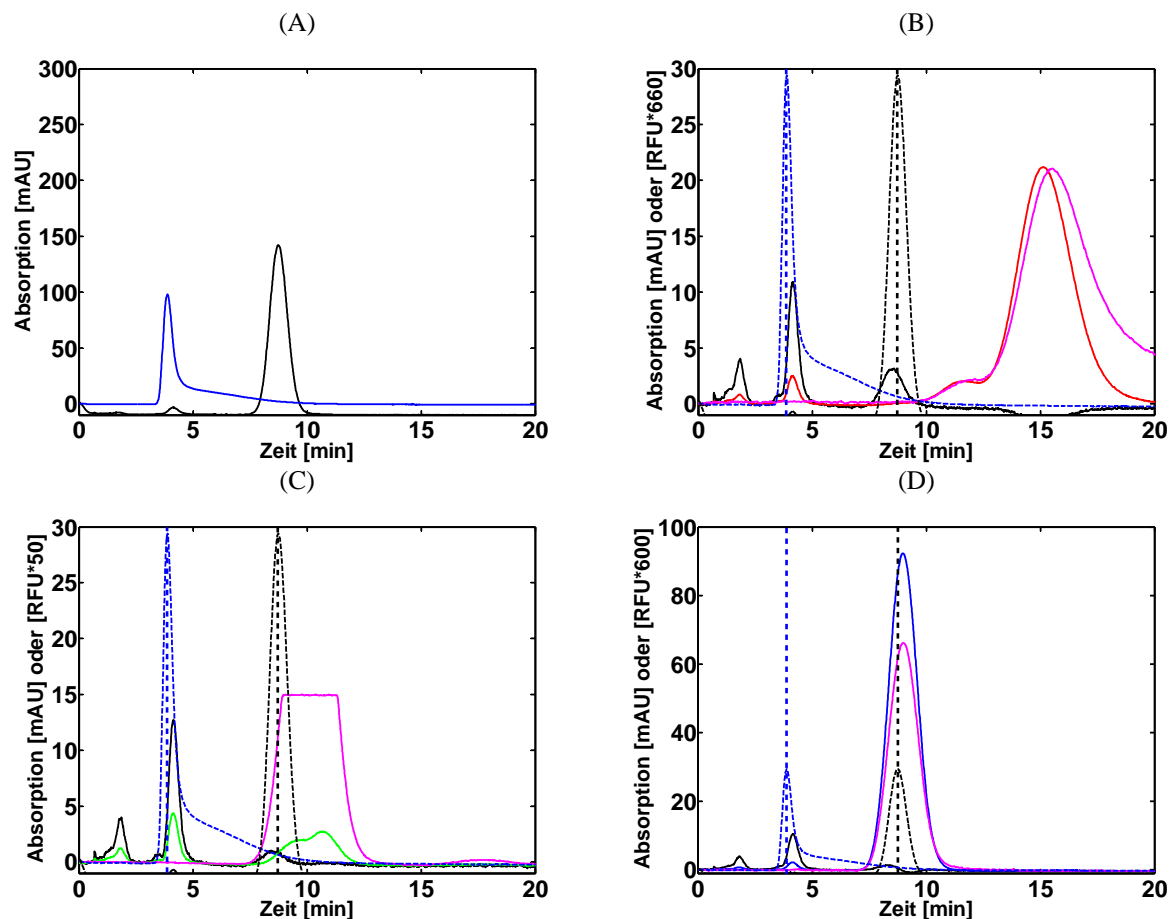


Abbildung 4.1.1. Isokratische Trennungen von (A) Nitrat und Blue Dextran, (B) Atto635, (C) BODIPY und (D) Cy5 auf Tricorn 5/200 Säule mit Sepharose 6 FF in Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 200 mM NaCl, 158 cm/h). Detektion bei (—) 280 nm, (—) 635 nm, (—) 504 nm und (—) 654 nm und (—) Fluoreszenzsignal für jeweiligen Farbstoff. Bei (B), (C) und (D) sind die normierten Chromatogramme aus (A) zum Vergleich gestrichelt dargestellt.

#### 4.1.2 Chromatographisches Verhalten von Biokonjugaten unter nicht bindenden Bedingungen

Bei den unter 4.1.1 gemachten Untersuchungen zeigt sich, dass Cy5 für die Messung von Stofftransporteigenschaften unter nicht-bindenden Bedingungen am ehesten geeignet ist, da für BODIPY und Atto635 starke nicht-spezifische Interaktionen mit Sepharose 6 FF angenommen werden müssen. Im Anschluß an die Untersuchungen mit den reinen Farbstoffen wurden daher Cy5 Biokonjugate auf einer Tricorn 5/200 mit Sepharose 6 FF (158 cm/h) und einer Superose 12 HR 10/30 Säule (jeweils Phosphatpuffer, 50 mM, pH 7.0, 200 mM NaCl, 38 cm/h) isokratisch getrennt. Die Biokonjugate wurden alle mit einer Gesamtproteinkonzentration von  $3.5 \cdot 10^{-5}$  M bei einem D/P von 0.1 eingesetzt.

In Abb. 4.1.2-A-G sind die Chromatogramme für Cy5-Biokonjugate von LYS, CTG, BLG, OVA, BSA, OVT und GGB auf Sepharose 6 FF dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit des Verhaltens der nativen Komponente (Absorption bei 280 nm) und des Biokonjugats

(Absorption bei 654 nm), wurden die Chromatogramme jeweils auf den maximalen Absorptionswert normiert.

Generell zeigen alle Chromatogramme eine gute Übereinstimmung zwischen dem Signal bei 280 nm und 654 nm. In allen Chromatogrammen sind die beiden Peaks bei 2 und 4.3 min zu erkennen, deren Retentionszeiten und Peakformen identisch mit den in Abb 4.1.1 beobachteten Kontaminanten sind. Für BLG, OVT und GGB zeigt das 654 nm Signal eine Schulter, deren Mittelpunkt mit dem Peak des freien Cy5-Farbstoffes in Abb. 4.1.1 übereinstimmt. Die Übereinstimmung der Peakposition und -breite für das native Protein und das Biokonjugat ist ein Beleg für ein identisches Verteilungs- und Transportverhalten des Biokonjugats, bezogen auf das jeweilige native Protein unter nicht-bindenden Bedingungen auf Sepharose 6 FF.

Zur höher auflösenden Analyse der Biokonjugatlösungen wurden isokratische Trennungen mit Superose 12 auf einer HR 10/30 Säule bei einer Fließgeschwindigkeit von 38 cm/h durchgeführt, bei ansonsten identischen Pufferbedingungen, Proteinkonzentrationen und D/P wie für Trennungen auf Sepharose 6 FF (s.o.). In Abb. 4.1.3 werden die Chromatogramme für Nitrat (1 M), Blue Dextran (2 mg/ml) und reinem Cy5 Farbstoff (0.1 mg/ml) dargestellt.

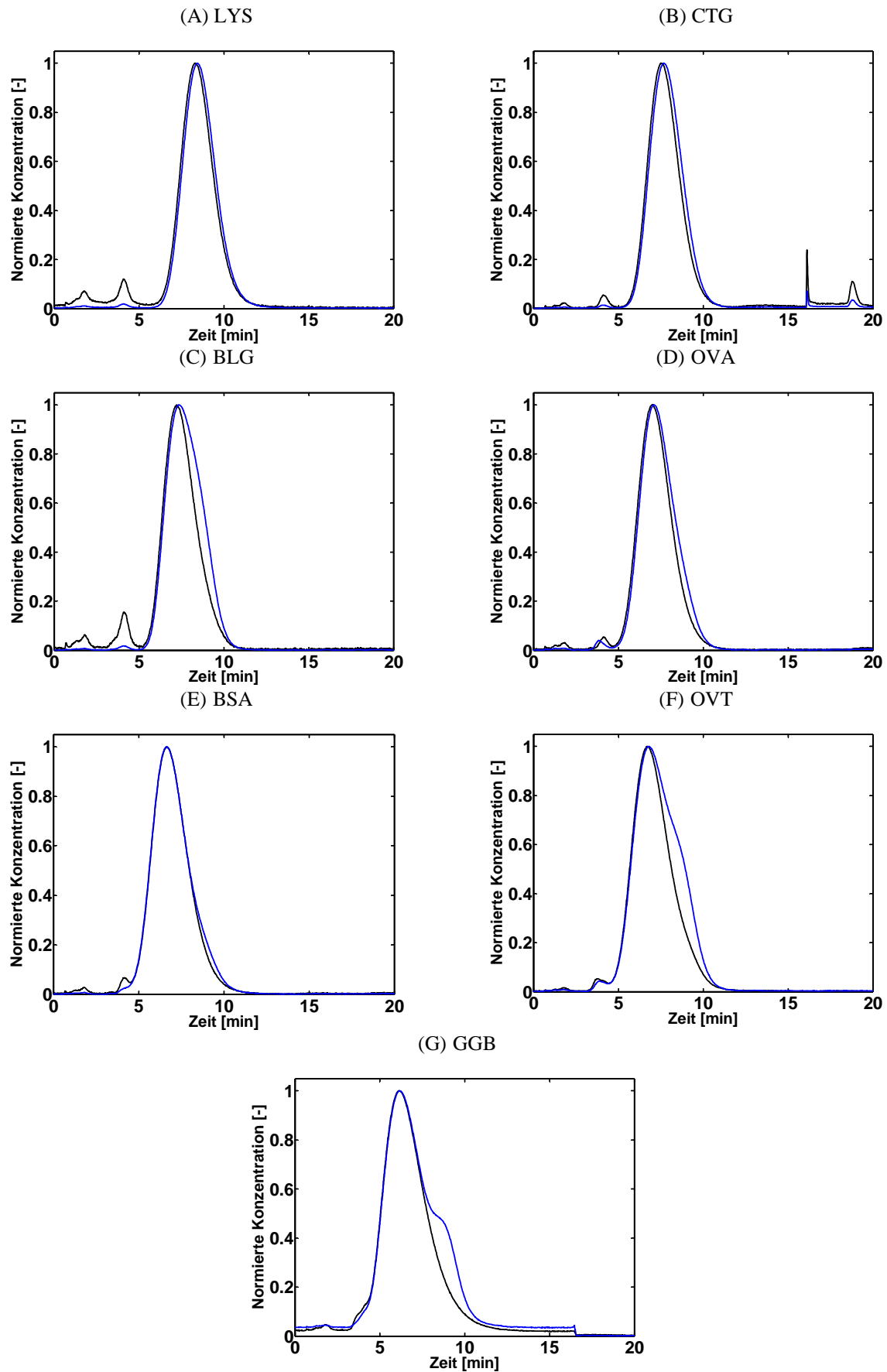


Abbildung 4.1.2. Isokratische Trennungen von (A) LYS-Cy5, (B) CTG-Cy5, (C) BLG-Cy5, (D) OVA-Cy5, (E) BSA-Cy5, (F) OVT-Cy5 und (G) GGB-Cy5 auf Sepharose 6 FF in Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 200 mM NaCl, 158 cm/h). Detektion bei (—) 280 nm und (—) 654 nm.



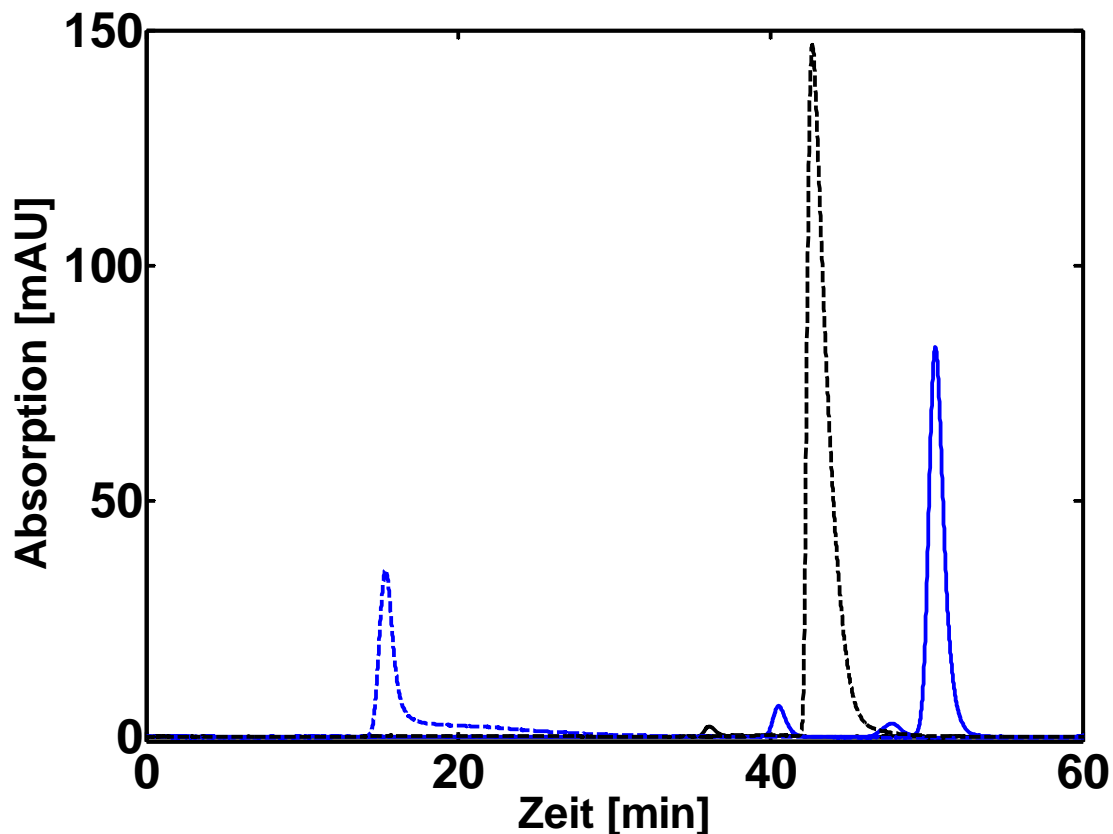


Abbildung 4.1.3. Isokratische Trennungen von Nitrat, Blue Dextran und Cy5 auf Superose 12 in Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 200 mM NaCl, 38 cm/h). Detektion bei (—) 280 nm und (—) 654 nm. Die Chromatogramme von Nitrat und Blue Dextran sind zum Vergleich gestrichelt dargestellt.

Die Retentionszeit des Cy5-Peaks ist mit 50.7 min um ca. 18 % höher, als die von Nitrat mit 42.8 min, was auf nicht-spezifische Interaktion von Cy5 mit Superose 12 hindeutet. In Abb. 4.1.4-A-G sind Chromatogramme der isokratischen Trennung für Cy5-Biokonjugate von LYS, CTG, BLG, OVA, BSA, OVT und GGB auf Superose 12 dargestellt. Mit einigen Ausnahmen (s.u.) ist auch auf Superose 12 eine gute Übereinstimmung der Peakpositionen und -formen der nativen Proteine (Absorption bei 280 nm) und der Cy5 Biokonjugate (Absorption bei 654 nm) zu sehen. Im Gegensatz zu den Chromatogrammen auf Sepharose 6 FF wird neben einem Hauptpeak bei CTG, OVA, BSA, OVT und GGB ein kleinerer Vorpeak beobachtet, der ebenfalls eine Absorption bei 654 nm besitzt, mit einer vergleichbaren Peakform, wie das entsprechende 280 nm Signal. Für LYS sind zwei Hauptkomponenten mit Retentionszeiten von 34.5 und 37.2 min sichtbar.

Mit den Ergebnissen aus den Trennungen für Nitrat und Blue Dextran wird der Verteilungskoeffizient  $K_{av}$  berechnet (siehe 3.2.6), gegen den dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts aufgetragen und an eine Gerade angepasst (Abb. 4.1.5), die für Superose 12 mindestens über einen Molekulargewichtsbereich von  $1 \cdot 10^3$  bis  $1 \cdot 10^6$  Da linear ist (GE

Healthcare). Für LYS und CTG ist eine positive Abweichung vom linearen Verhalten zu erkennen, weswegen beide Proteine von der Anpassung ausgeschlossen wurden.

Für die Vorpeaks in den Chromatogrammen von GGB, OVT, BSA, OVA und CTG wurde für die entsprechenden  $K_{av}$ 's ein Molekulargewicht angenommen, welches den Dimeren dieser Proteine entspricht, weil dies eine mögliche Erklärung für das Erscheinen dieser Vorpeaks sein könnte. Mit Ausnahme des angenommenen CTG Dimers, ergibt diese Annahme ein einheitliches Bild der gemessenen  $K_{av}$  Daten (Abb. 4.1.5) und kann als Hinweis gewertet werden, daß es sich bei den gemessenen Vorpeaks wirklich um Dimere der untersuchten Proteine handelt.

Die prozentualen Abweichungen der Retentionszeiten der Biokonjugatpeaks von den Peaks der nativen Proteine sind in Tabelle 4.1.1 aufgeführt. Diese liegen, mit Ausnahme von CTG-Cy5 auf Superose 12 (3.45 %) unter 3 % und sind damit gering. Der Anteil an freiem Farbstoff wurde aus dem Verhältnis des 654 nm Signals des Hauptpeaks der Biokonjugatkomponente und dem Signal des freien Farbstoffes bestimmt. Der Anteil an Dimeren wurde aus dem Verhältnis des 280 nm Signals des Haupt- und Vorpeaks nach Umrechnung in Konzentrationen berechnet, wobei für die Dimere ein doppelt so großer Extinktionskoeffizient angenommen wurde.

**Tabelle 4.1.1. Prozentuale Abweichung der Peakretentionszeit des Biokonjugats vom nativen Protein auf Sepharose 6 FF bzw. Superose 12. Prozentualer Anteil an freiem Farbstoff bezogen auf die Absorption bei 654 nm und prozentualer Anteil an Dimeren auf Superose 12.**

Festphase	Cy5 Biokonjugat	Abweichung Biokonjugat von nativem Protein [%]	Anteil freier Farbstoff [%]	Anteil Dimere [%]
Sepharose 6 FF	LYS	1.5	N/A	N/A
	CTG	2.0	N/A	N/A
	BLG	1.5	N/A	N/A
	OVA	1.5	N/A	N/A
	BSA	0.3	N/A	N/A
	OVT	1.2	N/A	N/A
	GGB	0.5	N/A	N/A
Superose 12	LYS	-0.7 <sup>a</sup> , 0.4 <sup>b</sup>	1.1 <sup>c</sup>	N/A
	CTG	3.6	1.3	0.9
	BLG	1.5	1.8	N/A
	OVA	1.0	2.3	5.4
	BSA	-0.1	2.1	5.3
	OVT	0.6	5.2	3.4
	GGB	0.5	11.5	4.0

(a) LYS erster Peak. (b) LYS zweiter Peak. (c) bezogen auf ersten Peak.

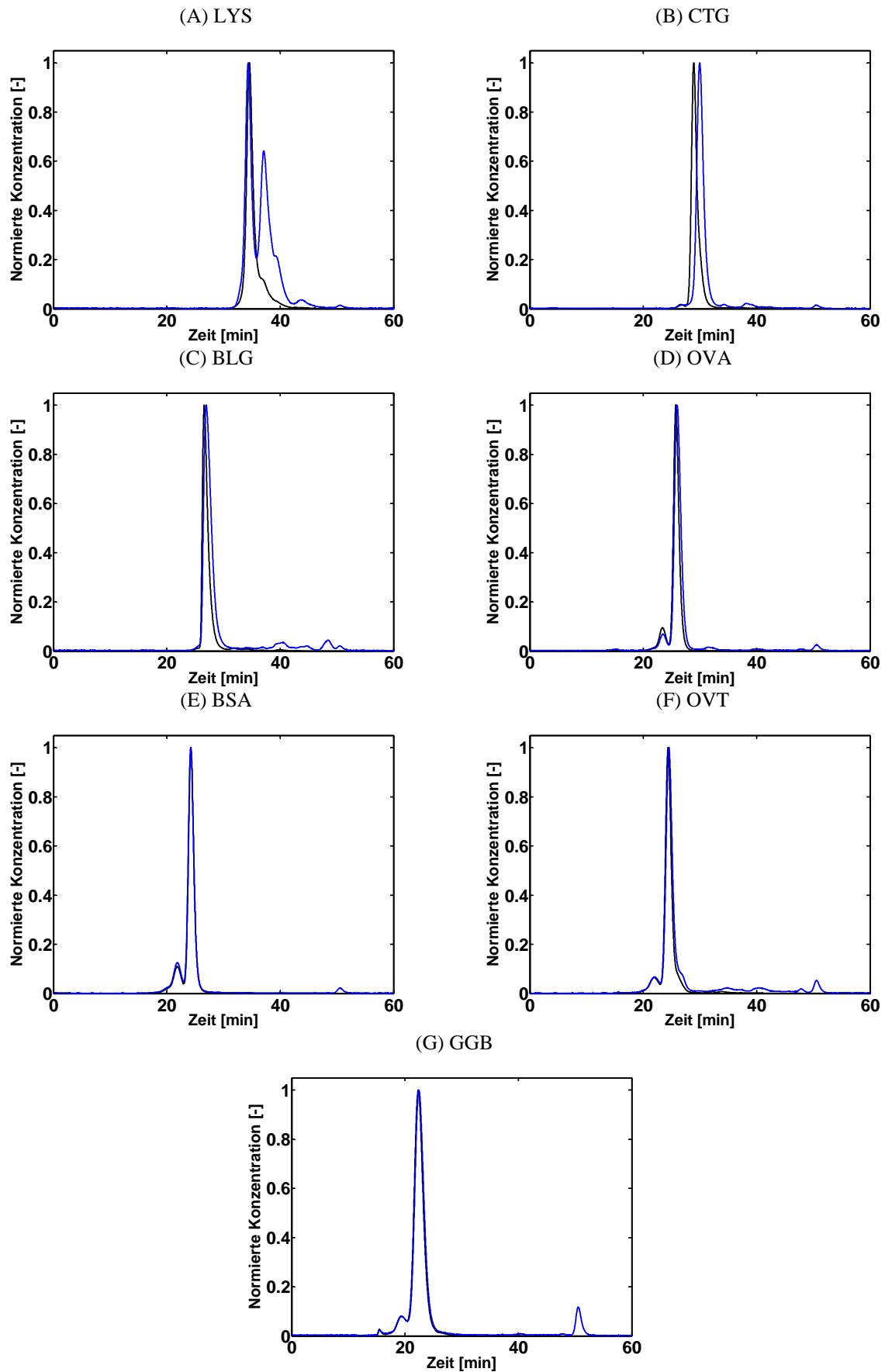


Abbildung 4.1.4. Isokratische Trennungen von (A) LYS-Cy5, (B) CTG-Cy5, (C) BLG-Cy5, (D) OVA-Cy5, (E) BSA-Cy5, (F) OVT-Cy5 und (G) GGB-Cy5 auf Superose 12 in Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 200 mM NaCl, 38 cm/h). Detektion bei (—) 280 nm und (—) 654 nm.

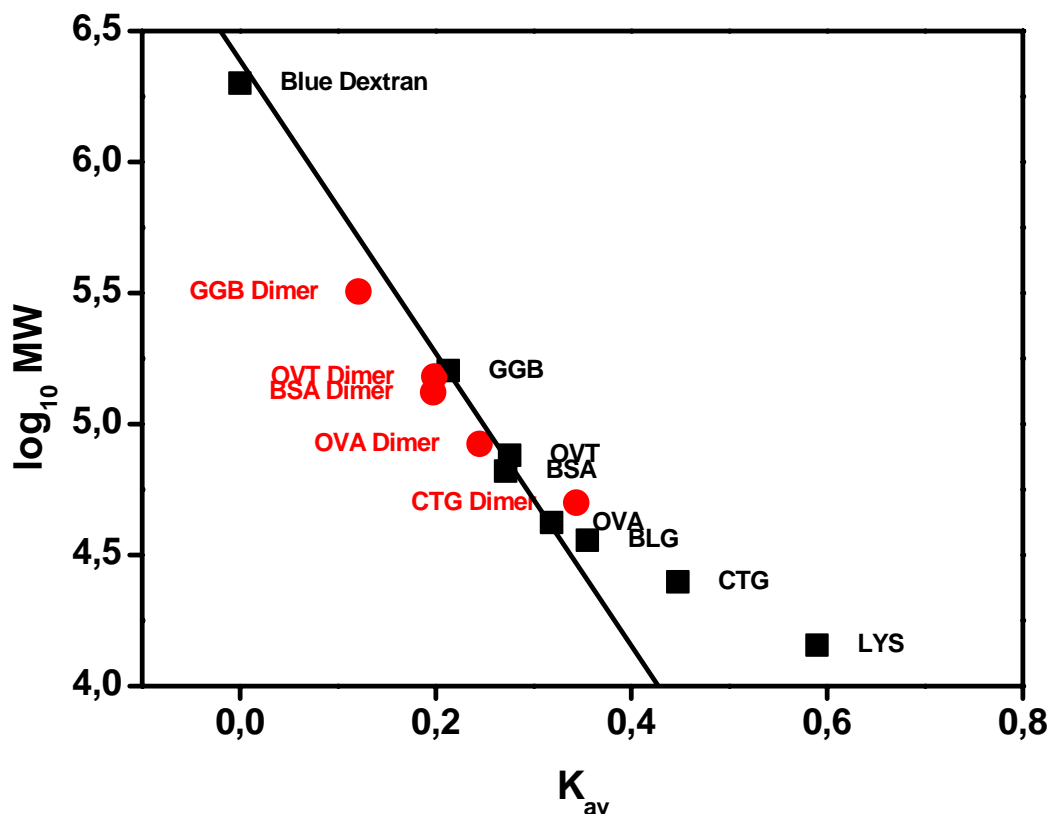


Abbildung 4.1.5. Auftragung des dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts der Proteine gegen den chromatographisch ermittelten  $K_{av}$  auf HR 10/30 Superose 12 Säule in Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 200 mM NaCl, 38 cm/h). LYS und CTG von der Anpassung ausgeschlossen.

#### 4.1.3 Diskussion

##### *Reinheit der Farbstoffe*

Alle Chromatogramme der Fluoreszenzfarbstoffe zeigen vor dem eigentlichen Signal des fluoreszierenden Farbstoffes Peaks, die eine Retentionszeit über oder um die Ausschlußgrenze von Sepharose 6 FF besitzen, abgeschätzt über die Retentionszeit von Blue Dextran. Diese zeigen keine Fluoreszenz bei den, für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff passenden, Anregungs- und Detektionswellenlängen. Die Retentionszeiten dieser Kontaminanten sind für alle drei Farbstoffe identisch. Eine mögliche Erklärung für diese Signale könnte in der Präsenz von nicht-fluoreszierenden Farbstoffaggregaten oder in hochmolekularen Verunreinigungen in den Farbstoffpräparationen liegen. Falls diese Peaks Aggregaten der Fluoreszenzfarbstoffe entsprechen, könnte die Konzentration dieser Kontaminanten durch die

Verwendung von reinen Farbstoffen überschätzt werden, da Farbstoff-Farbstoff Interaktionen unter diesen Umständen begünstigt sind.

Neben diesen hochmolekularen Kontaminanten werden für BODIPY und Atto635 zwei Peaks detektiert, die dem Fluoreszenzfarbstoff entsprechen könnten. Mögliche Ursachen für das Entstehen von Doppelpeaks können Dimere der Farbstoffe sein, deren Entstehen wiederum durch die Verwendung von reinem, hoch konzentriertem Farbstoff begünstigt sein könnten. Eine alternative Erklärung könnten das Vorhandensein des Reaktivfarbstoffes (mit NHS Gruppe) und des hydrolysierten Farbstoffes (ohne NHS Gruppe) sein, die ein unterschiedliches Retentionsverhalten besitzen.

In Abwesenheit von nicht-spezifischen Interaktionen der Fluoreszenzfarbstoffe mit Sepharose 6 FF sollten alle Farbstoffe eine Retentionszeit besitzen, die geringfügig niedriger ist, als Nitrat, weil die Farbstoffe ein ca. 10-fach höheres Molekulargewicht besitzen, aber viel kleiner als die eingesetzten Proteine sind. Atto635 und BODIPY, aber auch Cy5 besitzen alle eine höhere Retentionszeit als Nitrat, was nur durch nicht-spezifische Interaktionen der Fluoreszenzfarbstoffe mit Sepharose 6 FF erklärt werden kann. Sepharose besitzt einen geringen Restanteil an negativ geladenen Gruppen (Duckworth und Yaphe, 1970). Da Atto635 der einzige positiv geladene Farbstoff der drei untersuchten Moleküle ist, ist eine anziehende elektrostatische Wechselwirkung von Atto635 mit den negativen Restladungen eine mögliche Erklärung für die höhere Retentionszeit von Atto635 gegenüber Nitrat. Da Cy5 eine negative Nettoladung besitzt, würde dies die gute Übereinstimmung mit der Retentionszeit von Nitrat für Cy5 erklären. Die höhere Retentionszeit für Cy5 und BODIPY könnte durch eine hydrophobe Wechselwirkung der Farbstoffe mit Sepharose 6 FF erklärt werden, die durch die Anwesenheit von geladenen Gruppen bei Cy5 schwächer ist als für das neutrale BODIPY. Obwohl Sepharose Materialien durch die Anwesenheit von Hydroxylgruppen der Agarose als hydrophil eingestuft werden, sind durch die Anwesenheit der Quervernetzergruppen mögliche hydrophobe Bereiche vorhanden, die für eine attraktive Interaktion und damit höheren Retentionszeit von Cy5 und BODIPY verantwortlich sein könnten.

Für den Einsatz von Cy5 und gegen BODIPY und Atto635 bei Experimenten unter nicht-bindenden Bedingungen (Gleichgewichtsverteilungskoeffizient, 4.2; Diffusionskoeffizient, 4.3; Größenausschlußchromatographie, 4.4) spricht die geringe nicht-spezifische Interaktion von Cy5 mit Sepharose 6 FF und die Messung eines einzelnen Peaks.

Die Verwendung aller drei Farbstoffe unter adsorptiven Verhältnissen ist jedoch gerechtfertigt, da die nicht-spezifische Interaktion des Fluoreszenzfarbstoffes mit der

Festphase im Vergleich mit der adsorptiven Bindung an einen Ionentauscher weitestgehend zu vernachlässigen ist. Durch die Biokonjugation kommt es zwar zu Änderungen der Nettoladung und Ladungszugänglichkeit des gewählten Proteins, so dass unter adsorptiven Verhältnissen Unterschiede zwischen dem Biokonjugat und dem jeweiligen nativen Protein gemessen werden (vgl. 4.5), diese aber weitgehend unabhängig von den oben diskutierten nicht-spezifischen Wechselwirkungen sind.

### ***Chromatographisches Verhalten von Biokonjugaten unter nicht bindenden Bedingungen***

Generell konnte im vorigen Abschnitt gezeigt werden, dass der freie Farbstoff Cy5 die geringsten nicht-spezifischen Interaktionen mit dem verwendeten chromatographischen Grundmaterial aufweist. Die Chromatogramme der Biokonjugate auf Sepharose 6 FF und Superose 12 bestätigen im Wesentlichen die Erkenntnisse aus den Versuchen mit den Fluoreszenzfarbstoffen. Die Cy5 Biokonjugate besitzen eine vergleichbare Peakform und Retentionszeit wie das jeweilige native Protein. D.h. der Verteilungskoeffizient (entspricht der Retentionszeit) und der intrapartikuläre Diffusionskoeffizient (entspricht der Peakbreite) für die Cy5 Biokonjugate zeigen eine gute Übereinstimmung mit den nativen Proteinen.

Trotz Aufreinigung der Biokonjugate über eine G-25 oder G-15 Sephadex Säule nach der Reaktion mit den Fluoreszenzfarbstoffen, ist auf Sepharose 6 FF für BLG, OVT und GGB sowie für alle Proteine auf Superose 12 anhand des 654 nm Signal freier Farbstoff in den Biokonjugatlösungen zu erkennen, der insbesondere für OVT und GGB ca. 5.2 bzw. 11.5 % der gesamten Cy5 Konzentration ausmachen. Eine Erklärung für das Auftreten des freien Farbstoffes könnte die Ausbildung von metastabilen Konjugatprodukten und nicht-spezifischen Bindungen des Farbstoffes an das Protein sein. Die Ausbildung von metastabilen Imidazolbindungen mit Proteinen über NHS Reaktivfarbstoffe ist möglich (Zuk *et al.*, 1970).

Die Vorpeaks, die für die untersuchten Proteine auf Superose 12 gemessen werden, lassen sich gut über das Vorhandensein von Dimeren erklären. BLG liegt unter den gewählten Pufferbedingungen (Phosphat, 50 mM, pH 7.0, 200 mM NaCl) vollständig als Dimer vor (Brownlow *et al.*, 1997), sodaß kein zusätzlicher Monomerpeak zu erwarten ist. Aufgrund der geringeren Trennleistung des Sepharose 6 FF Materials gegenüber Superose 12, werden die Dimere bei den Trennungen auf Sepharose 6 FF nicht aufgelöst.

Eine Ausnahme bilden die Chromatogramme von LYS und CTG. CTG-Cy5 besitzt auf Superose 12 eine um 3.6 % höhere Retentionszeit verglichen mit dem nativen Protein, während die Retentionszeit von Cy5 auf Superose 12 um 18 % über der mit Nitrat

gemessenen Retentionszeit liegt. Während die postulierte schwache nicht-spezifische attraktive Wechselwirkung von Cy5 für die übrigen Biokonjugate sowohl auf Sepharose 6 FF als auch Superose 12 zu keiner auffälligen Retentionszeitverschiebung führt, ist es auffällig, dass die beiden kleinsten Proteine eine solche ausweisen. Superose 12 ist durch die stärkere Quervernetzung hydrophober als Sepharose 6 FF, wobei dieser Effekt zu Änderungen der Selektivitäten führen kann (GE Healthcare). Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass die hydrophoben Eigenschaften von CTG durch die Biokonjugation erhöht werden und diese Erhöhung, aufgrund des niedrigen Molekulargewichtes, einen deutlicheren Einfluss auf das Retentionsverhalten hat, als es bei den höhermolekularen Proteinen der Fall ist.

Für LYS ist bekannt, daß es im Bereich zwischen pH 4 und 9 in geringen Konzentrationen als Dimer vorliegt und die Assoziation reversibel ist (Pusey, 1991; Wilson *et al.*, 1993; Banerjee *et al.*, 1975). Unter der Annahme, daß es sich beim zweiten Peak um das LYS Dimer handelt und der Extinktionskoeffizient doppelt so groß, wie für das Monomer ist, würde dem Peak ein Markierungsgrad von ca. 1.2 entsprechen, was dafür spricht, daß es sich bei dem zweiten Peak um das reine monosubstituierte LYS Dimer Cy5 Biokonjugat handelt, welches aufgrund von stärkeren nicht-spezifischen Interaktionen mit der Festphase eine höhere Retentionszeit als das Monomer besitzt. Eine andere Erklärung für das Auftreten eines zweiten Peaks wäre ein LYS-Cy5 Biokonjugat, bei dem Cy5 an einer anderen Position gebunden vorliegt und die nicht-spezifische Interaktion zwischen Biokonjugat und Superose 12 stärker ist, als für das native Protein und dem alternativen Biokonjugat. Der berechnete Markierungsgrad ausgehend von einem Monomer läge bei 0.6. Dies spricht eindeutig gegen die Annahme eines Monomer Cy5 Biokonjugates, weil für ein stärker bindendes Monomer Biokonjugat ein DOL von  $\sim 1$  erwartet wird, da es sich nicht um eine Mischung aus Biokonjugat und nativem Protein handelt. Auf die Ursachen für den generell ungewöhnlich hohen  $K_{av}$  für LYS und CTG bzw. ihrer Dimere wird ausführlich in Kapitel 4.2 eingegangen.

Zusammenfassend sind folgende Eigenschaften der Biokonjugate festzustellen:

- die Übereinstimmung der Peakform der Cy5 Biokonjugate und der nativen Proteine ist gut
- mit Ausnahme von BLG sind bei allen Proteinen neben den Monomeren Dimere in Lösung vorhanden
- bei allen Biokonjugaten kann in geringen Mengen freier Cy5 Farbstoff detektiert werden

- sowohl Dimere als auch freier Farbstoff werden nur auf Superose 12 aufgelöst wohingegen auf Sepharose 6 FF diese entweder gar nicht oder als Schulter des Hauptpeaks detektiert werden
- LYS und CTG bzw. ihre Dimere besitzen eine höhere Retentionszeit als für ihre Molekülgröße erwartet wird

Für die geplanten Versuche mit den Biokonjugaten unter nicht-bindenden Bedingungen hat das zur Folge, daß die Eigenschaften der Biokonjugate der Hauptkomponente der jeweiligen Proteine gut mit dem der nativen Proteine übereinstimmen. Es wird erwartet, dass die jeweiligen Dimere einen niedrigeren Verteilungs- und Diffusionskoeffizienten als die Monomere besitzen. Für den freien Farbstoff kann ein Verteilungskoeffizient von  $\sim 1$  angenommen werden. Eine gegenseitige Beeinflussung von freiem Farbstoff und Konjugat kann ausgeschlossen werden (siehe Abb. Anhang 7.10).



## 4.2 Verteilung und Diffusion von Proteinen in chromatographischen Festphasen - Gleichgewichtsverteilungskoeffizient

Der Gleichgewichtsverteilungskoeffizient eines Proteins bestimmt, neben dem intrapartikulären Diffusionskoeffizienten, größenausschlusschromatographische Trennungen, die Trennleistung von Membransystemen und kann für die Charakterisierung der Porenzugänglichkeit von Makromolekülen in chromatographischen Festphasen verwendet werden. Im Folgenden wird die Messung des Verteilungskoeffizienten mittels CLSM als neue Methode vorgestellt, und mit der chromatographischen Messung verglichen. Zusammen mit der Messung des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten (4.3) bildet dies die Grundlage für die Simulation von größenausschlusschromatographischen Trennungen (siehe Kapitel 4.4). Weiterhin kann durch den Verteilungskoeffizienten eine Aussage über die Unterschiede der Stationärphasen hinsichtlich der sterischen Zugänglichkeit und dem Porennutzungsgrad getroffen werden, die auch unter adsorptiven Bedingungen (4.5-4.9) relevant ist. Zusätzlich wird der Einfluß elektrostatischer Interaktionen auf den Verteilungskoeffizienten untersucht

### 4.2.1 Systemeigenschaften

Für die Darstellung der Ergebnisse wird der Stokesradius der Proteine verwendet. Tabelle 4.2.1 führt die Stokesradien zusammen mit dem Molekulargewicht und dem isoelektrischen Punkt der verwendeten Proteine auf. Da alle Experimente bei einem pH von 7.0 durchgeführt werden, beinhaltet die Auswahl sowohl Proteine mit einer negativen (BLG, OVA, BSA und OVT), neutralen (GGB) oder positiven (LYS, CTG) Nettoladung.

**Tabelle 4.2.1. Eigenschaften der verwendeten Proteine.**

Protein	Stokesradius [nm] <sup>a</sup>	Molekulargewicht [Da] <sup>a</sup>	pI <sup>b</sup>
LYS	1.85	14300	11.0
CTG	2.30	25700	9.1
BLG	2.74	36500	5.2
OVA	2.93	42800	4.6
BSA	3.59	66400	4.8
OVT	3.79	75800	6.2
GGB	5.62	160000	7.0

(a) Sober (1970); [www.uniprot.com](http://www.uniprot.com). (b) Righetti und Caravaggio (1976).

In Tabelle 4.2.2 sind die Eigenschaften der verwendeten Stationärphasen aufgeführt. Die Festphasen können eingeteilt werden in inerte Strukturen, die für die Größenausschlusschromatographie verwendet werden und Adsorber mit geladenen Liganden, die entweder direkt über Verbindungsmoleküle an die Porenwand immobilisiert sind oder mit Dextransketten kovalent verknüpft im Porenraum vorliegen.

**Tabelle 4.2.2. Eigenschaften der verwendeten Festphasen.**

Stationärphase	Partikelgröße [µm]	Polymer	Funktion
Sepharose 6 FF	90	Agarose	SEC
SP Sepharose FF	90	Agarose	SCX
Q Sepharose FF	90	Agarose	SAX
SP Sepharose XL	90	Dextran-Agarose Komposit	SCX
Q Sepharose XL	90	Dextran-Agarose Komposit	SAX
Capto Q	90	Dextran-Agarose Komposit	SAX
Superdex 200 prep grade	34	Dextran-Agarose Komposit	SEC
Superose 12 prep grade	34	Agarose	SEC

#### 4.2.2 Messung des Verteilungskoeffizienten mittels CSLM und Vergleich mit chromatographischen Bestimmungen

Die Messung des Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten auf Einzelpartikelniveau mittels CLSM ist ein neuer experimenteller Ansatz. Die Bestimmung basiert auf der Messung sich im Gleichgewicht befindlicher extra- und intrapartikulärer Biokonjugatkonzentrationen. In Kapitel 3.4.3 wurde gezeigt, daß die Messung nicht von der Position der Fokusebene abhängt, solange im Partikelmittelpunkt gemessen wird.

Mittels Validierungsstudien zu dem Verhalten von Biokonjugatlösungen (4.1.1) konnte gezeigt werden, daß sich das Verteilungs- und Transportverhalten der Biokonjugate im Wesentlichen nicht von dem, der nativen Proteinen unterscheidet, aber ein Restanteil von freiem Fluoreszenzfarbstoff und Dimeren in den Biokonjugatlösungen vorhanden ist. Das Ergebnis der Messung des Verteilungskoeffizienten mittels CLSM unter Verwendung von Biokonjugaten wird durch die Anwesenheit von freiem Fluoreszenzfarbstoff und Dimeren beeinflusst: der Verteilungskoeffizient des freien Fluoreszenzfarbstoffes wird näherungsweise 1 betragen, weil durch die geringe Größe des Fluoreszenzfarbstoffes Cy5 (792 Da) keine sterische Behinderung durch die Festphase zu erwarten ist. Die Proteindimere besitzen einen niedrigeren Verteilungskoeffizienten als die Monomere. Vergleicht man die experimentellen Ergebnisse für das Retentionsverhalten ( $K_{av}$ ) aus Kapitel 4.1 für Proteine, die in etwa einem Monomer-Dimer Paar entsprechen (LYS-CTG, BLG-BSA, OVA-OVT, OVT-GGB), entspricht  $\Phi_{Dimer} \sim 0.75 \cdot \Phi_{Monomer}$ . Unter Verwendung der prozentualen Anteile, die für den freien Farbstoff und der Dimere (Kapitel 4.1) der verwendeten Biokonjugate bestimmt wurden, den oben aufgeführten Verteilungskoeffizienten für den freien Farbstoff und die Dimere, sowie der Korrektur der prozentualen Abweichung der Retentionszeit ( $K_{av}$ ) des Biokonjugats vom nativen Protein auf der jeweiligen Festphase, wurde der Verteilungskoeffizient für die Proteine nach Gleichung 3-12 aus Kapitel 3.4.3 korrigiert. Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Versuche bei einer Proteinkonzentration von  $1 \cdot 10^{-5}$  M und einem D/P von 0.1 bei gleichen Pufferbedingungen (Phosphat, 50 mM, pH 7.0, 200

mM NaCl) durchgeführt. In Abb. 4.2.1 wird der gemessene mit dem korrigierten Verteilungskoeffizienten für Sepharose 6 FF und Superose 12 verglichen. Für LYS auf Superose 12 wurde angenommen, daß die später eluierende Komponente (vgl. Kapitel 4.1) einen 1.1-fach höheren Verteilungskoeffizienten besitzt als LYS und 39 % des Gesamtsignals ausmacht.

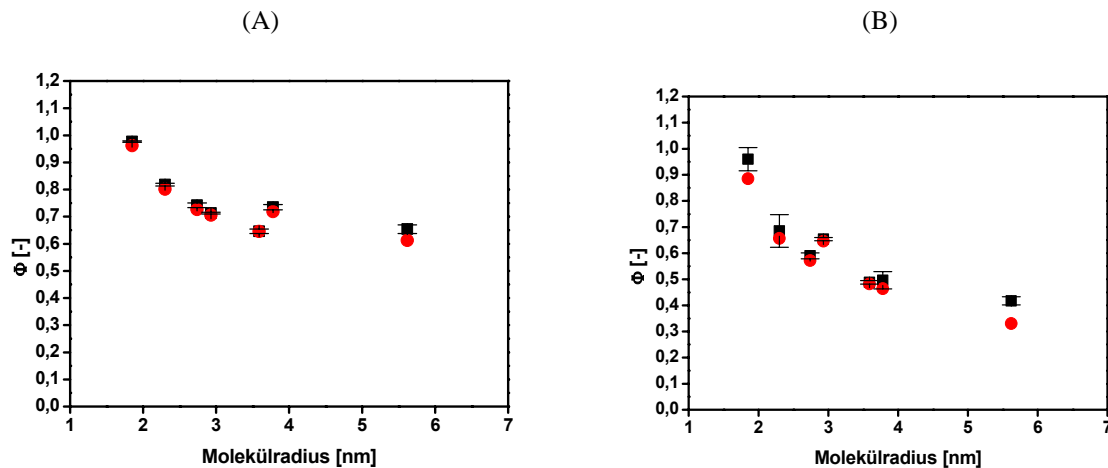


Abbildung 4.2.1. Vergleich von konfokal gemessenem (■) und korrigiertem (●)  $\Phi$  für (A) Sepharose 6 FF oder (B) Superose 12 prep grade. Standardabweichung für 5 Messungen.

Der Vergleich der gemessenen und korrigierten Verteilungskoeffizienten zeigt, daß die Änderung durch die Korrektur sich in der Größenordnung der Standardabweichung der Messung bewegt (siehe Fehlerbalken). Eine Ausnahme bilden GGB (Sepharose 6 FF und Superose 12) und LYS (Superose 12). Die größere Änderung für GGB ist durch den höheren gemessenen Anteil von freiem Farbstoff (11,5 %) in Verbindung mit dem – im Vergleich zu den anderen Proteinen – niedrigen Verteilungskoeffizienten zu erklären. Die signifikante Änderung für LYS auf Superose 12 ist durch die Anwesenheit der zweiten Komponente zu erklären, die, im Gegensatz zu den anderen Kontaminanten, einem deutlich höheren Anteil (39 %) am Gesamtsignal ausmacht und einen höheren Verteilungskoeffizienten als LYS besitzt. Die geringen Auswirkungen für die anderen Proteine können einerseits durch die geringen Anteile der Kontaminanten (freier Farbstoff und Dimer), sowie deren entgegengesetzte Wirkung auf  $\Phi$  erklärt werden. Auf Basis der Validierungsstudien aus Kapitel 4.1 und der gefundenen Auswirkungen auf die Verteilungskoeffizienten, speziell für LYS und GGB, wurden im Folgenden die Meßdaten nach oben dargestelltem Schema korrigiert und für die weitere Auswertung verwendet. Für die Festphasen auf Basis von Sepharose 6 FF wurden vergleichbare Eigenschaften angenommen, d.h. gleiche Retentionsunterschiede zwischen Biokonjugat und nativem Protein, sowie Abwesenheit der zweiten Komponente im LYS Biokonjugat.

Die Einzelpartikelmessungen von  $\Phi$  mittels CLSM können mit dem chromatographisch bestimmten Verteilungskoeffizienten  $K_{av}$  verglichen werden, um den CLSM Ansatz auf Plausibilität zu überprüfen, was in Abbildung 4.2.2 für Sepharose 6 FF, SP Sepharose FF und XL dargestellt ist.

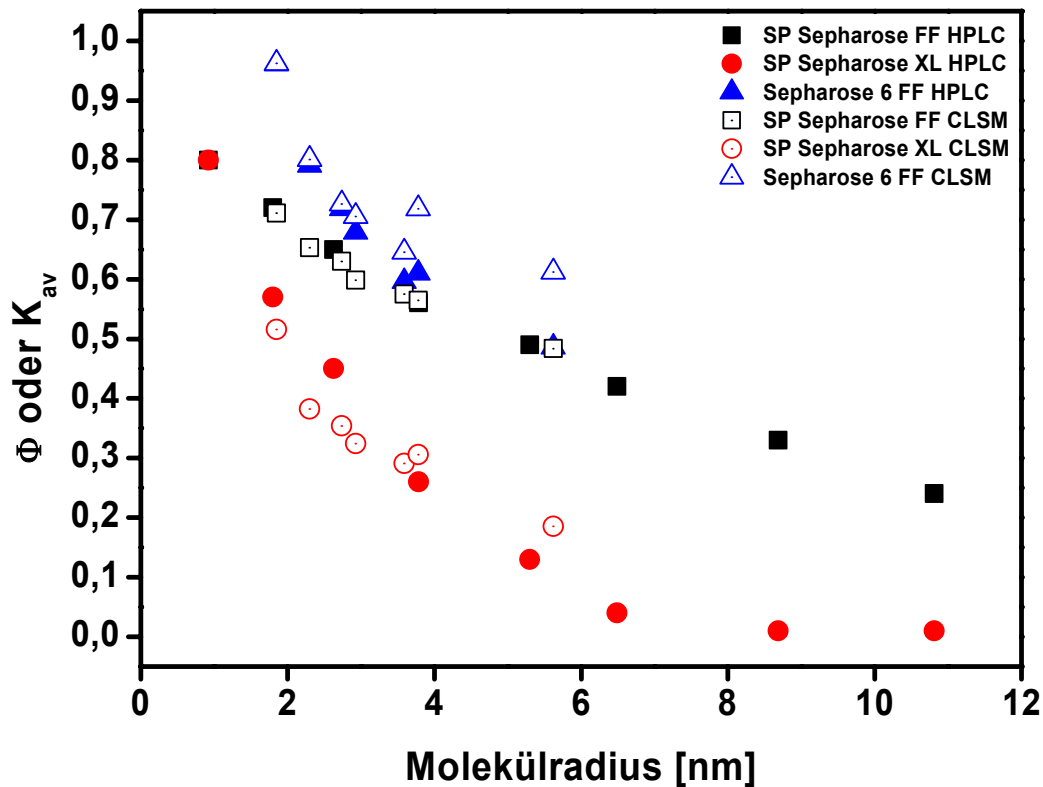


Abbildung 4.2.2. Vergleich von  $K_{av}$  mit  $\Phi$  für verschiedene Festphasen. Verwendung des Stokesradius für die verwendeten Proteine (Sepharose 6 FF) und Viskositätsradius für Dextranstandards (SP Sepharose FF und XL) aus Hubbuch *et al.* (2003).

Die  $K_{av}$  Daten für SP Sepharose FF und XL beziehen sich auf Dextranlösungen (Hubbuch *et al.*, 2003). Die Molekulargewichte der Dextranstandards wurden nach Hagel und Dubin (1988) in den Viskositätsradius umgerechnet, weil damit der Radius der stabförmigen Dextrane am Ehesten den Radien von äquivalenten, globulären Proteinen entspricht (Hagel und Dubin, 1988).

Generell zeigen beide Datensätze einen vergleichbaren Trend einer Senkung des Verteilungskoeffizienten mit steigender Molekülgröße. Die Übereinstimmung von  $K_{av}$  und  $\Phi$  ist sehr gut für SP Sepharose FF und zeigt im Verlauf eine gute Übereinstimmung mit Sepharose 6 FF und SP Sepharose XL. Für Sepharose 6 FF und SP Sepharose XL ist  $\Phi$  ab einem Stokesradius von ca. 3 nm größer als  $K_{av}$ , wohingegen für SP Sepharose XL  $\Phi$  für

kleinere Radien niedriger als  $K_{av}$  ist. Zusammenfassend stimmen die chromatographischen Messungen ( $K_{av}$ ) gut mit  $\Phi$  aus konfokalen Messungen überein, sodaß die Einzelpartikelmessung mittels CLSM eine geeignete Methode zur Messung des Verteilungskoeffizienten darstellt. Mögliche Ursachen für die Unterschiede zwischen den beiden Messungen werden in der Diskussion behandelt.

#### **4.2.3 Einfluss der Proteingröße und Stationärphase auf den Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten**

Sowohl die Proteingröße als auch die Eigenschaften der Festphase, wie der Festphasenanteil und Porengröße bestimmen den Verteilungskoeffizienten eines Proteins. Der Zusammenhang zwischen Proteingröße und Verteilungskoeffizienten kann im Allgemeinen nicht *a priori* berechnet werden und muß experimentell gemessen werden. Die Ergebnisse der Versuche zur Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten von der Proteingröße und von der verwendeten Festphasen werden im Folgenden dargestellt.

In den Abbildungen 4.2.3 bis 4.2.5 sind die korrigierten Verteilungskoeffizienten (s.o.) für verschiedene Festphasen bei konstanter Proteinkonzentration ( $1 \cdot 10^{-5}$  M) und Pufferzusammensetzung (pH 7.0,  $I = 1080$  mM) aufgeführt. Die höhere Ionenstärke wurde gewählt, um adsorptive Wechselwirkungen zwischen den Biokonjugaten und den Ionentauschern zu unterdrücken. Die Festphasen Sepharose 6 FF, SP Sepharose FF und Q Sepharose FF bildet eine Gruppe, die auf der selben Grundmatrix basieren (Sepharose 6 FF) und sich nur durch die Anwesenheit von Ionentauscherliganden unterscheiden. Ebenso basieren SP Sepharose XL und Q Sepharose XL auf der Sepharose 6 FF Matrix und Capto Q auf einer vergleichbaren Agarosematrix, die stärker quervernetzt ist. Diese Festphasen besitzen Dextranketten im Porenraum, auf denen die Ionentauscherliganden verankert sind. Superdex 200 prep grade und Superose 12 prep grade sind Materialien, die für die Größenausschlusschromatographie entwickelt wurden und bestehen aus einer Agarose-Dextran Matrix (Superdex 200), die auf der Sepharose HP Matrix basiert – vergleichbar mit Sepharose 6 FF – (Hellberg *et al.*, 1996), bzw. einer Agarosematrix (Superose 12), die stärker quervernetzt ist und als einziges Material nicht auf der 6 %igen Sepharose 6 FF Matrix basiert.

Die Ergebnisse der verschiedenen Stationärphasen zeigen im Allgemeinen den erwarteten Trend eines monoton sinkenden  $\Phi$ 's mit steigendem Proteinradius, mit einigen Ausnahmen. Auf den Anionentauschern Q Sepharose FF, Q Sepharose XL und Capto Q steigt  $\Phi$  für OVT

und GGB gegenüber BSA an, wobei GGB einen höheren  $\Phi$  als OVT besitzt. OVT besitzt ebenfalls einen unerwartet hohen  $\Phi$  gegenüber BSA auf Sepharose 6 FF, SP Sepharose XL und Superdex 200. Daneben besitzen OVA auf Q Sepharose XL, Capto Q und Superose 12, sowie BLG auf Capto Q einen höheren  $\Phi$  im Vergleich mit den jeweils kleineren Proteinen. Die Festphasen Sepharose 6 FF, SP Sepharose FF und Q Sepharose zeigen einen ähnlichen Verlauf mit steigender Molekülgröße, wobei SP Sepharose FF durchschnittlich einen 1.24-fach niedrigeren  $\Phi$  als Sepharose 6 FF und Q Sepharose FF besitzt und  $\Phi$  von LYS für Sepharose 6 FF gegenüber CTG stärker ansteigt als für SP Sepharose FF oder Q Sepharose FF.  $\Phi$  für SP Sepharose XL, Q Sepharose XL und Capto Q stimmen sehr gut überein und sind durchschnittlich 46 % niedriger als die jeweiligen  $\Phi$ 's für Sepharose 6 FF, was auf die sterische Behinderung durch die Dextransketten hindeutet. Superose 12 zeigt den stärksten Abfall von  $\Phi$  von LYS bis GGB (auf 37 %) für alle untersuchten Festphasen, was auf die Funktion als Größenausschlusschromatographiemedium hindeutet. Im Gegensatz dazu weist Superdex 200 prep grade einen unerwartet flachen Abfall von LYS auf GGB (auf 72 %) auf und besitzt einen durchschnittlich 1.36-fach höheren  $\Phi$  als Superose 12, obwohl Superdex 200 ebenfalls Dextransketten im Porenraum besitzt.

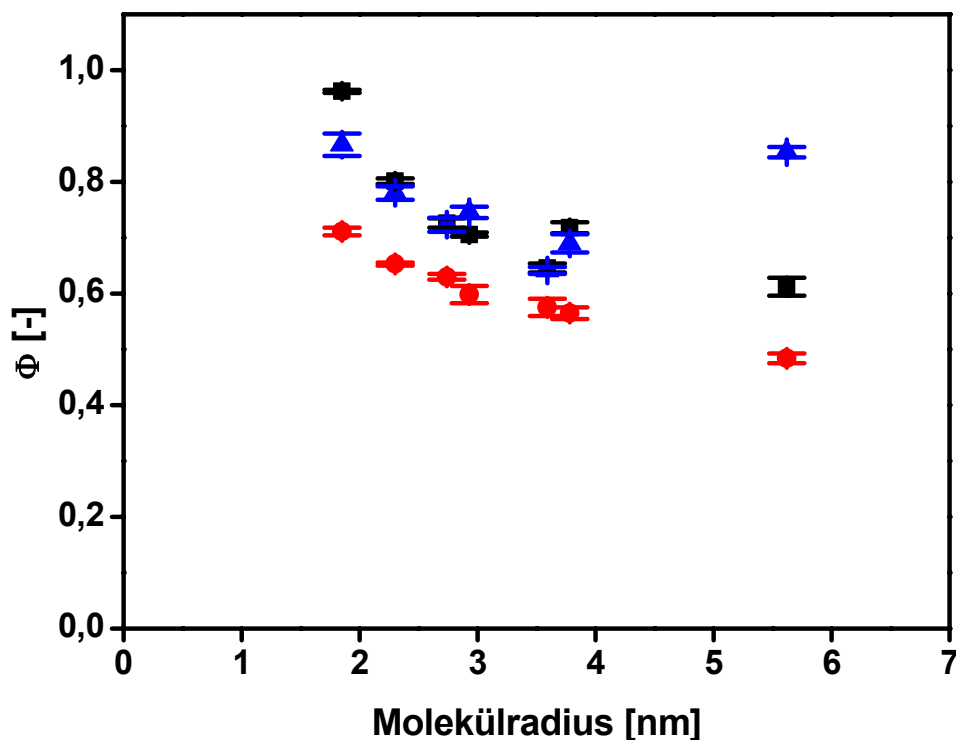


Abbildung 4.2.3. Auftragung von  $\Phi$  gegen Molekülradius (Phosphat, 50 mM, pH 7.0 und  $I = 1080$  mM bei  $c_{\text{Protein}} 1 \cdot 10^{-5}$  M und D/P von 0.1). (■): Sepharose 6 FF. (●): SP Sepharose FF. (▲): Q Sepharose FF. Standardabweichung für 5 Messungen.

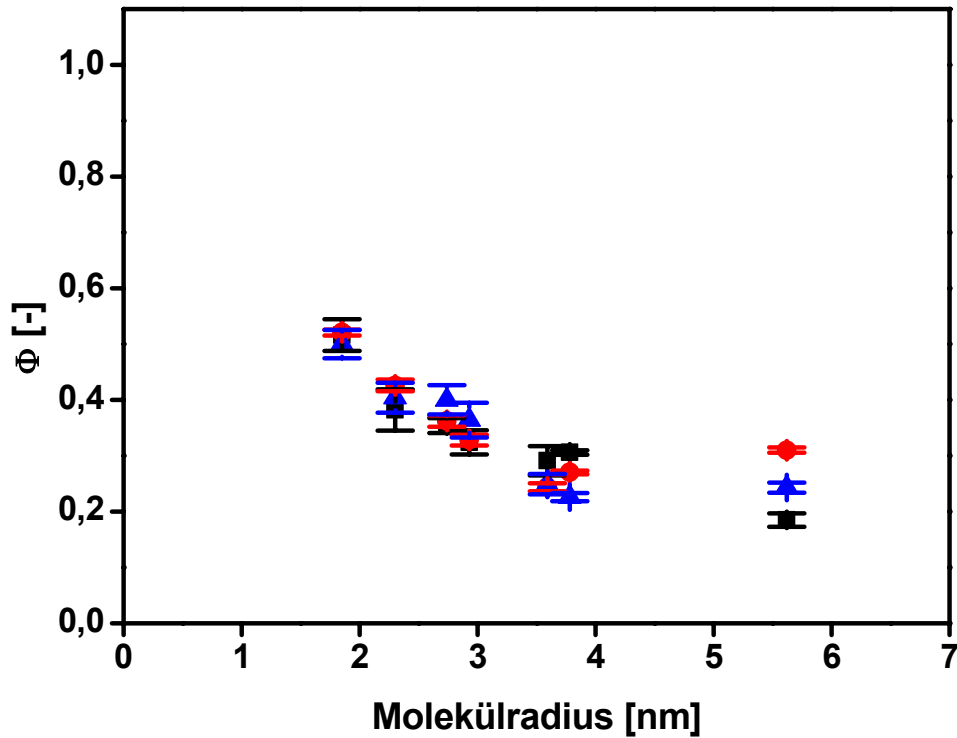


Abbildung 4.2.4. Auftragung von  $\Phi$  gegen Molekülradius (Phosphat, 50 mM, pH 7.0 und  $I = 1080$  mM bei  $c_{\text{Protein}} 1 \cdot 10^{-5}$  M und D/P von 0.1). (■): SP Sepharose XL. (●): Q Sepharose XL. (▲): Capto Q. Standardabweichung für 5 Messungen.

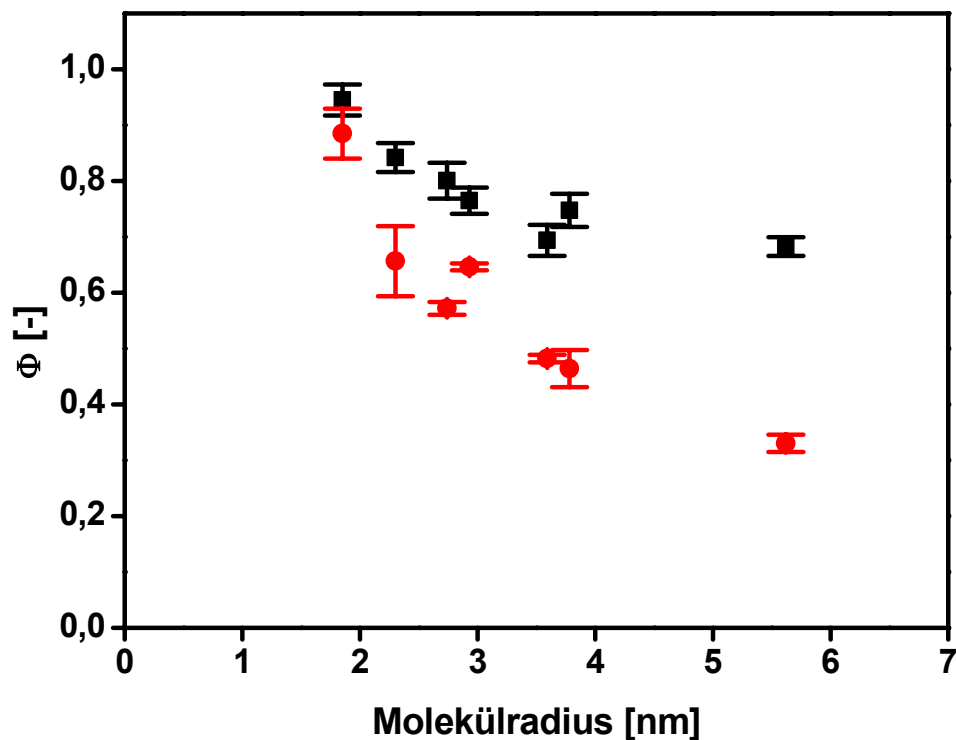


Abbildung 4.2.5. Auftragung von  $\Phi$  gegen Molekülradius (Phosphat, 50 mM, pH 7.0 und  $I = 1080$  mM bei  $c_{\text{Protein}} 1 \cdot 10^{-5}$  M und D/P von 0.1). (■) Superdex 200 prep grade. (●): Superose 12 prep grade. Standardabweichung für 5 Messungen.

Im Folgenden werden die mittels CLSM bestimmten  $\Phi$ 's mit Literaturdaten verglichen. Generell ist ein Vergleich der Meßdaten mit Literaturwerten schwierig, weil nicht für alle Festphasen Literaturdaten verfügbar sind. Für Sepharose 6 FF (Abb. 4.2.6-A) wurden von GE Healthcare veröffentlichte Materialdaten verwendet (Gel Filtration, 2002), sowie Literaturdaten für die Verteilung von Proteinen in Sepharose CL-6B (Boyer und Hsu, 1992; Moussaoui *et al.*, 1992), die eine weniger stark quervernetzte Agarosematrix darstellt, mit ansonsten vergleichbaren Eigenschaften wie Sepharose 6 FF. Vergleichsdaten für SP Sepharose FF stellen die Messung von  $\Phi$  über FRAP in SP Sepharose Big Beads (Johnson *et al.*, 1995) und die chromatographischen Messungen mit Dextranen auf SP Sepharose FF (DePhillips und Lenhoff, 2000) dar. Soweit nicht in den Veröffentlichungen angegeben, wurden die Proteinradien aus Sober (1970) entnommen und die angegebenen Molekulargewichte der Dextrane aus DePhillips und Lenhoff in die Viskositätsradien umgerechnet analog der Vorgehensweise in Hagel *et al.* (1988).

Die in Abb. 4.2.6 dargestellten Messungen von  $\Phi$  mittels CLSM für Sepharose 6 FF zeigen im Verlauf eine gute Übereinstimmung mit den veröffentlichten Daten, wobei der mittels CLSM gemessene  $\Phi$  höher ist. Im Vergleich fällt auf, daß sowohl CTG und LYS als auch GGB vom erwarteten Verlauf abweichen und speziell LYS einen auffällig hohen  $\Phi$  besitzt. Die Übereinstimmung zwischen  $\Phi$  aus CLSM Messungen und Literaturdaten für SP Sepharose FF ist über den gesamten Meßdatenbereich sehr gut, wobei die Daten von Johnson *et al.* (1995) höher sind, als sowohl die hier vorgestellten Daten, wie auch die Ergebnisse von DePhillips und Lenhoff (2000). Dabei zeigen die Daten von Johnson *et al.* (1995), vergleichbar mit den oben aufgezeigten Anomalien für z.B. OVT auf Sepharose 6 FF, einen höheren  $\Phi$  für BSA (3.59 nm) im Vergleich mit OVA (2.93 nm).

#### 4.2.4 Modellierung der Verteilung von Proteinen in Stationärphasen

Das Ziel der Modellierung der Verteilung von Proteinen in porösen Medien ist es, eine funktionale Abhängigkeit zwischen der Proteingröße und Festphaseneigenschaften herzustellen, mit der der Verteilungskoeffizient für andere Proteine vorhergesagt werden kann. Im Folgenden wird der Verteilungskoeffizient für die verschiedenen Proteine sowohl an das Renkin- als auch das Ogstonmodell angepasst. Das Renkinmodell (vgl. Kapitel 2.4.1) beschreibt die sterische Behinderung über einen charakteristischen Porenradius, wohingegen das Ogstonmodell die Festphase als zufällige Anordnung von Fasern mit einem charakteristischen Faserradius betrachtet (vgl. Kapitel 2.4.1). Die Anpassungen sind graphisch



in Abbildung 4.2.7 dargestellt und die Ergebnisse der Anpassungen für beide Modelle werden in Tabelle 4.2.3 zusammengefasst. Für die Porosität wurde für alle Festphasen mit Ausnahme von Superose 12 ein Wert von 0.94 angenommen, weil alle Festphasen auf einer 6 %igen Sepharose 6 FF Matrix (bzw. der 6 %igen Sepharose HP Matrix für Sephadex 200) basieren und somit die selbe Porosität besitzen sollten. Superose 12 basiert auf einer 12 %igen Agarosematrix. Die Einflüsse der Liganden oder des Dextrans schlägt sich im Porenradius (Renkin) oder Faserradius (Ogston) nieder. Die oben genannten Anomalien wurden von der Anpassung ausgeschlossen (siehe Abb. 4.2.7).

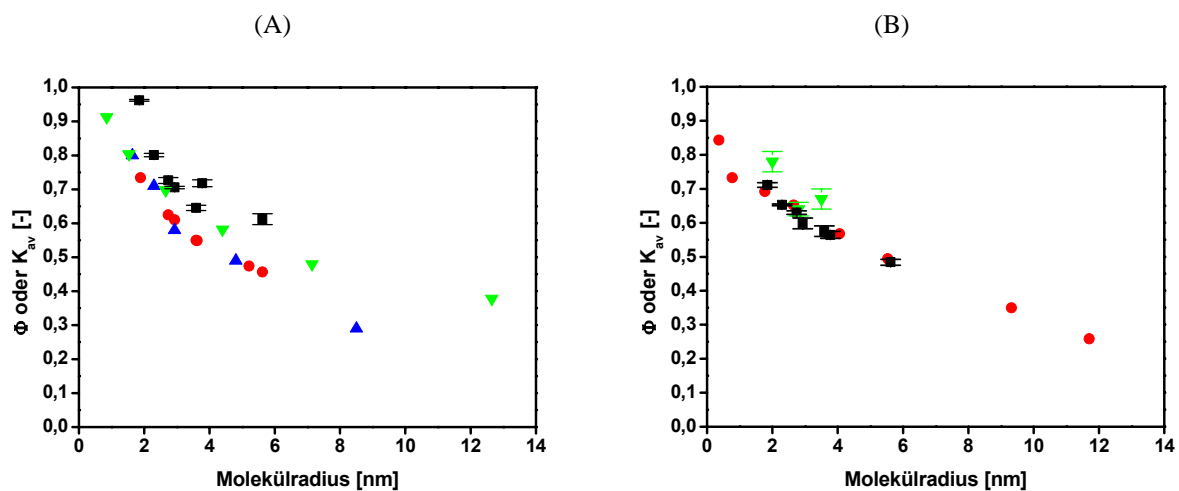


Abbildung 4.2.6. Vergleich von ( $\blacksquare$ ) konfokal gemessenem  $\Phi$  und Literaturdaten. (A) Sepharose 6 FF. Daten von ( $\bullet$ ) Boyer und Hsu (1992). ( $\blacktriangle$ ) Moussaoui *et al.* (1992). ( $\blacktriangledown$ ) GE Healthcare (2002). (B) SP Sepharose FF. Daten von ( $\bullet$ ) DePhillips und Lenhoff. (2000). ( $\blacktriangledown$ ) Johnson *et al.* (1995).

Generell ist der Verlauf der Kurven für das Renkin- oder Ogstonmodell im Meßdatenbereich vergleichbar, wobei das Ogstonmodell für Moleküle  $> 4$  nm einen niedrigeren  $\Phi$  als das Renkinmodell vorhersagt. Für die Festphasen Sepharose 6 FF, SP Sepharose FF und Q Sepharose FF können beide Modelle den Verlauf der experimentellen Daten nur näherungsweise wiedergeben. Insbesondere wird der  $\Phi$  von LYS, speziell auf Sepharose 6 FF, und von GGB von beiden Modellen unterschätzt. Beide Modelle können die Daten für SP Sepharose XL, Q Sepharose XL und Capto Q gut nachverfolgen, wobei das Modell einen stärkeren Abfall von  $\Phi$  für OVT und GGB auf SP Sepharose XL vorhersagt. Vergleichbar mit den Anpassungsergebnissen für Sepharose 6 FF, werden die  $\Phi$ 's auf Superdex 200 und Superose 12 nur näherungsweise von beiden Modellen beschrieben. Auch hier bildet LYS eine Ausnahme und besitzt einen deutlich höheren  $\Phi$ , als vom Modell vorhergesagt.

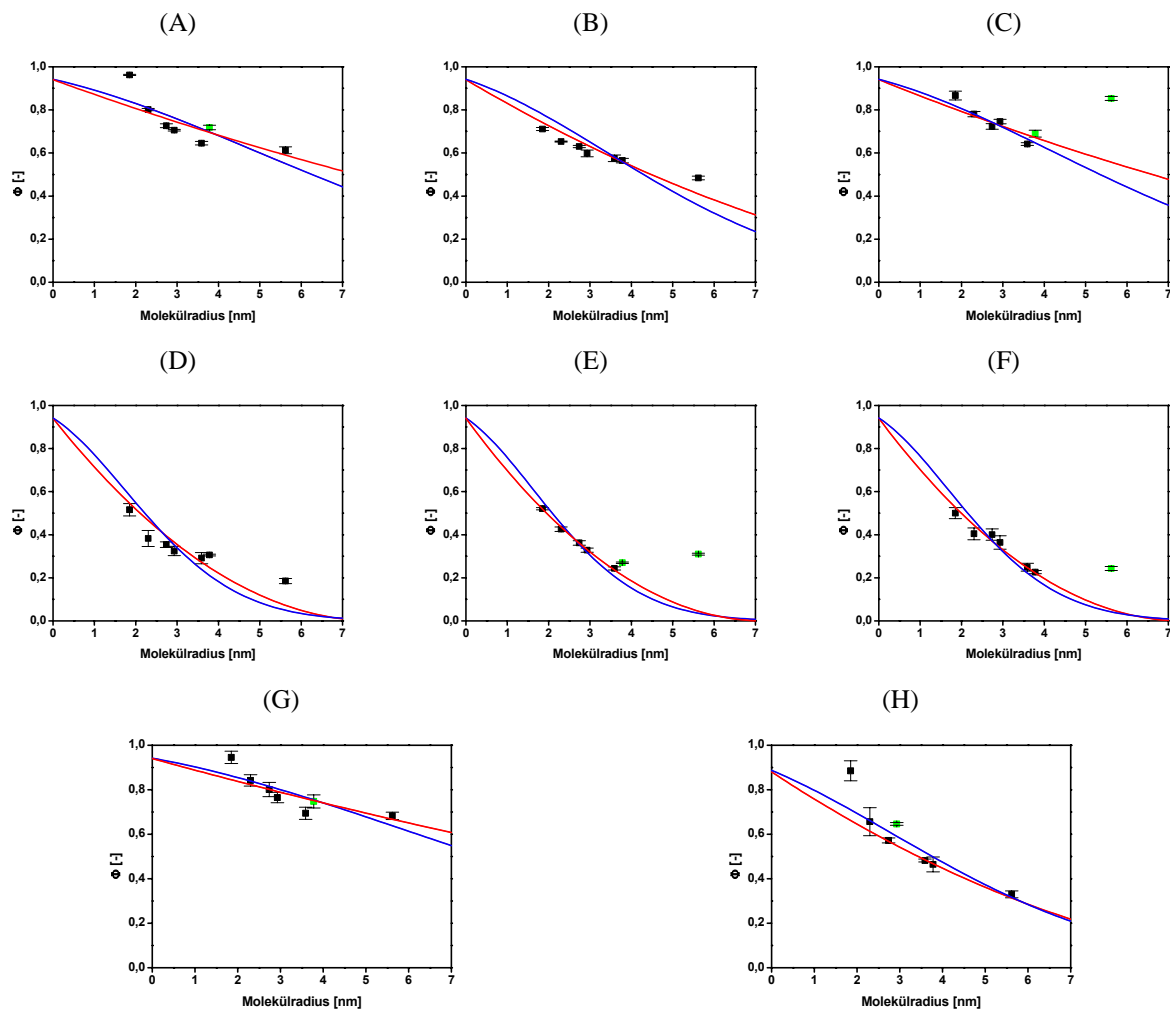


Abbildung 4.2.7. Anpassung der Daten aus Abb. 4.2.3 bis 4.2.5 an das (—) Renkin bzw. (—) Ogston Modell. (■) von der Anpassung ausgeschlossene Daten. (A): Sepharose 6 FF. (B): SP Sepharose FF. (C): Q Sepharose FF. (D): SP Sepharose XL. (E): Q Sepharose XL. (F): Capto Q. (G): Superdex 200 prep grade. (H): Superose 12 prep grade.

Tabelle 4.2.3. Parameter und Korrelationskoeffizienten der Anpassung an das Renkin oder Ogston Modell an Daten aus Abb. 4.2.7.

Stationärphase	$\varepsilon$	$R^2$ (Renkin)	$r_p$ [nm]	$R^2$ (Ogston)	$r_f$ [nm]
Sepharose 6 FF	0.94	0.64	27.0	0.63	2.6
SP Sepharose FF	0.94	0.67	16.5	-0.06	1.8
Q Sepharose FF	0.94	0.76	24.4	0.86	2.2
SP Sepharose XL	0.94	0.54	7.8	0.23	0.9
Q Sepharose XL	0.94	0.99	7.2	0.92	0.9
Capto Q	0.94	0.93	7.4	0.78	0.9
Superdex 200	0.94	0.67	25.7	0.67	3.2
Superose 12	0.88	0.72	13.9	0.81	2.7

#### 4.2.5 Elektrostatische Einflüsse auf den Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten

Die Größenausschlusschromatographie wird häufig für die Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen verwendet. Dabei gelten Agarosemedien, wie z.B. Sepharose, durch ihren hydrophilen Charakter, als inerte Festphasen, die Proteine ausschließlich aufgrund ihrer Größenunterschiede trennen. Wie in Kapitel 2.4.2 gezeigt, kann

die Ionenstärke, aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen der Proteine mit der Festphase, einen starken Einfluß auf den Verteilungskoeffizienten in augenscheinlich inerte chromatographische Festphasen besitzen. Um den Einfluss elektrostatischer Effekte auf den Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten zu untersuchen, wurde der Verteilungskoeffizient in Sepharose 6 FF bei konstantem pH-Wert (7.0) und Ionenstärken von 0.08 bis 1.08 M, bei ansonsten identischen Bedingungen ( $c_{\text{Protein}} 1 \cdot 10^{-5}$  M, D/P: 0.1) gemessen. Der Einfluß der Festphase auf den Verteilungskoeffizienten bei unterschiedlichen Ionenstärken wurde zusätzlich für SP Sepharose FF und SP Sepharose XL mit OVA untersucht.

Die Verteilungskoeffizienten in Abhängigkeit von der Ionenstärke für die verschiedenen Proteine sind in Abb. 4.2.8 dargestellt. Die Verteilungskoeffizienten der untersuchten Proteine zeigen eine starke Abhängigkeit von der Ionenstärke. Drei verschiedene Verhalten sind offensichtlich: LYS und CTG zeigen einen Anstieg von  $\Phi$  mit sinkender Ionenstärke, wobei für LYS eine Adsorption sichtbar ist, weil  $\Phi$  mit 6.14 bei 0.08 mM deutlich über 1 liegt. Für BLG, OVA, BSA und OVT ist eine Abnahme von  $\Phi$  mit sinkender Ionenstärke sichtbar. Für GGB ist kein signifikanter Einfluß der Ionenstärke auf  $\Phi$  zu erkennen. Für alle Proteine gilt, daß ab einer Ionenstärke von ca. 200 mM keine signifikante Änderung von  $\Phi$  gegenüber dem Wert bei 1.08 M zu erkennen ist.

Die abstoßende Interaktion kann durch Verwendung von Festphasen mit höherer Ladungsdichte als Sepharose 6 FF verstärkt werden (Abb. 4.2.9): der Grad der Abstoßung steigt für die Kationentauscher SP Sepharose FF und XL an. Die Abstoßung von OVA wird erst bei höheren Ionenstärken kompensiert.

In Abb. 4.2.10 werden die Meßdaten von OVA auf SP Sepharose FF und BSA auf Sepharose 6 FF mit den Ergebnissen von Johnson *et al.* (1995) verglichen, die  $\Phi$  von OVA und BSA bei einer Ionenstärke von 0.01, 0.11 sowie 1.11 M auf SP Sepharose Big Beads bestimmten. Für OVA ist eine gute Übereinstimmung im Verlauf von  $\Phi$  mit sinkender Ionenstärke gegeben. Erwartungsgemäß besitzt BSA auf Sepharose 6 FF bei niedrigeren Ionenstärken von 0.11 und 0.01 M einen höheren  $\Phi$ , als auf SP Sepharose Big Beads, da eine vergleichbare Situation wie bei OVA auf Sepharose 6 FF und SP Sepharose FF vorliegt.

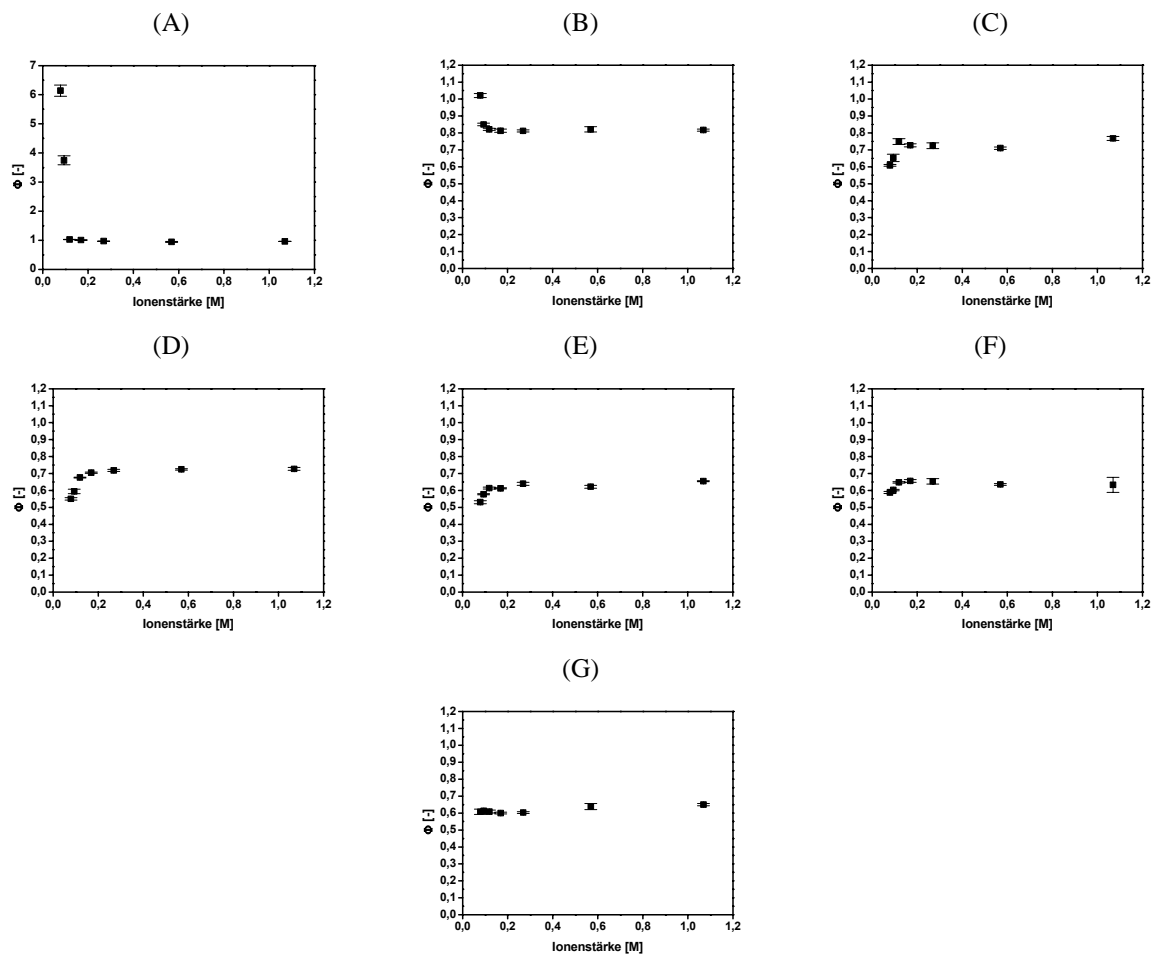


Abbildung 4.2.8. Abhängigkeit von  $\Phi$  von der Ionenstärke für verschiedene Proteine auf Sepharose 6 FF (Phosphat, 50 mM, pH 7.0 bei  $c_{\text{Protein}} 1 \cdot 10^{-5}$  M und D/P von 0.1). (A) LYS. (B) CTG. (C) BLG. (D) OVA. (E) BSA. (F) OVT. (G) GGB. Standardabweichung für 5 Messungen.

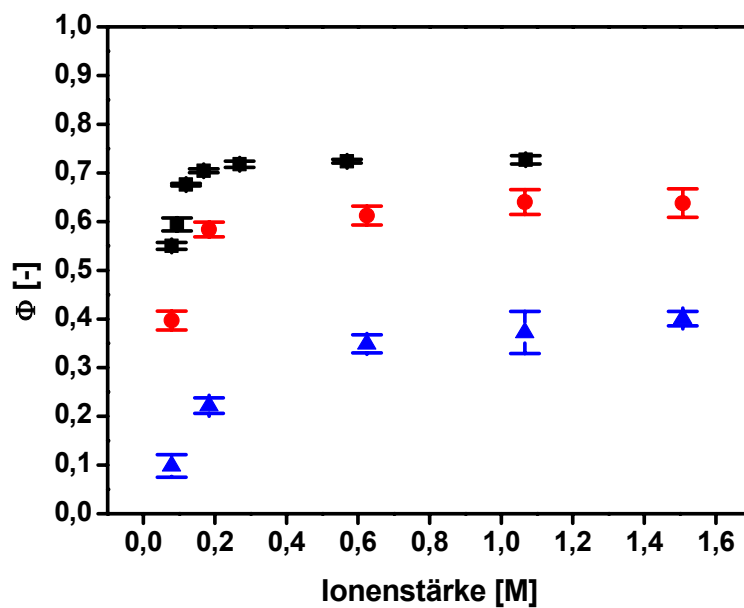


Abbildung 4.2.9. Abhängigkeit von  $\Phi$  von der Ionenstärke für OVA auf (■) Sepharose 6 FF, (●) SP Sepharose FF, (▲) SP Sepharose XL. Standardabweichung für 5 Messungen.

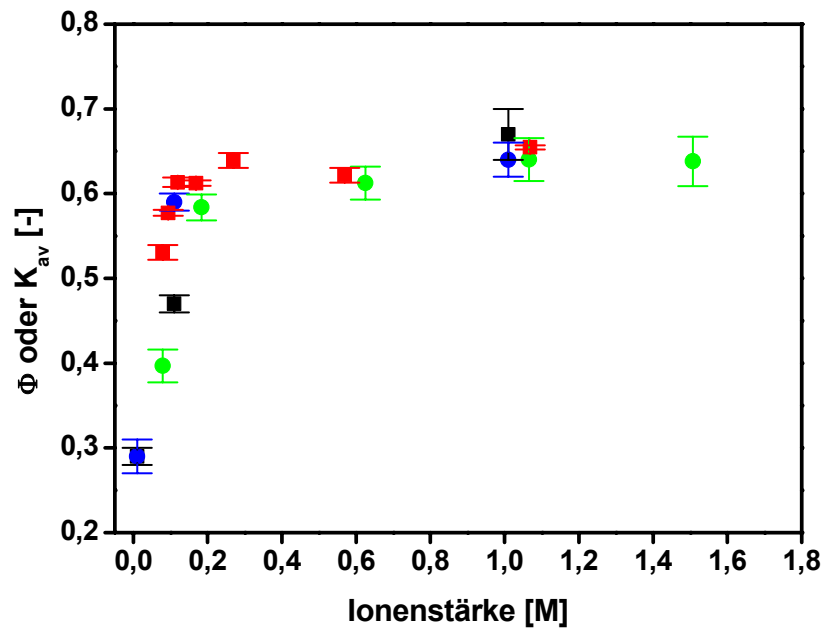


Abbildung 4.2.10. Vergleich von konfokal gemessenem  $\Phi$  von (●) OVA auf SP Sepharose FF bzw. (■) BSA auf Sepharose 6 FF mit Literaturdaten von Johnson *et al.* (1995) für (●) OVA bzw. (■) BSA auf SP Sepharose Big Beads.

#### 4.2.6 Diskussion

##### *Messung des Verteilungskoeffizienten mittels CSLM und Vergleich mit der chromatographischen Bestimmung*

Mit der hier vorgestellten Methode ist es möglich, den Verteilungskoeffizienten von Proteinen in chromatographischen Festphasen direkt über die gleichzeitige Messung der Proteinkonzentration in der Bulk- und Partikelphase zu bestimmen. Neben der eigentlichen Möglichkeit der Messung von  $\Phi$  ist noch erwähnenswert, daß alle experimentellen Daten ein homogenes Signal in der Partikelphase zeigen, welche sich nur im Verhältnis der Intensitäten in der Partikel- und Bulkphase, je nach verwendetem Protein, unterscheiden. D.h. die Partikelphase aller untersuchten Festphasen kann als homogen angesehen werden und der Verteilungskoeffizient unter nicht-bindenden Bedingungen ist an jeder Position im Partikel gleich.

Der Vergleich der Rohdaten und der korrigierten Daten (4.2.1) zeigt, daß Kontaminanten wie freier Fluoreszenzfarbstoff bzw. Dimere keinen signifikanten Einfluß auf die Bestimmung von  $\Phi$  mittels CLSM Messung hat, wenn die Konzentration der Kontaminanten nicht zu groß (> 10 %) ist. Die Auswirkungen der Korrektur auf die Daten von LYS auf Superose 12 und GGB verdeutlichen, daß vor der Verwendung von Biokonjugaten Validierungsstudien (4.1)

durchgeführt werden müssen, um nicht durch Kontaminanten oder nicht-spezifische Bindung der Biokonjugate Fehler in der Bestimmung von  $\Phi$  zu erhalten. Dies ist eine Schwäche der Methode, weil der Gleichgewichtszustand eines einzelnen Partikels untersucht wird und es zu keiner Trennung unterschiedlicher Komponenten kommen kann und sowohl das Protein als auch die Kontaminanten den gleichen Fluoreszenzfarbstoff tragen. Für weitere Bestimmungen sollten daher Makromoleküle verwendet werden, die eine einzige, stabile quartäre Struktur besitzen und entweder die Stabilität der Biokonjugate erhöht oder direkt vor einem Verteilungsexperiment nochmals eine Aufreinigung der Biokonjugate durchgeführt werden.

Der Vergleich der Messung von  $\Phi$  mittels CLSM und der chromatographischen Bestimmung von  $K_{av}$  zeigt eine gute Übereinstimmung der beiden Datensätze, wobei auf Basis der Einzelpartikelmessung ein leicht höherer Wert, speziell für Moleküle größer 3 nm, zu erkennen ist. Sowohl  $\Phi$  als auch  $K_{av}$  sind als Verhältnis extra- und intrapartikulärer Konzentration definiert, wobei bei beiden Werten der Festphasenanteil Teil der Partikelphase ist. D.h. für unendlich kleine Moleküle geht sowohl  $\Phi$  als auch  $K_{av}$  gegen  $\varepsilon_p$ , sodaß beide Werte direkt miteinander verglichen werden können. Eine Ursache für die gefunden Unterschiede zwischen konfokal bestimmtem  $\Phi$  und chromatographischem  $K_{av}$  könnte die Kompression der Stationärphase in der gepackten Säule sein, die zu einer Verkleinerung der Porosität der Partikel und damit zur Senkung des Verteilungskoeffizienten führt. Danilov *et al.* (1996) zeigten eine Senkung von  $K_{av}$  um 20 % bei einer Kompression von 20 % auf Sephadex G-25 SF, die bei einem Druck von ca. 2.7 bar erreicht wurde. Es ist möglich, daß, je nach verwendeter Festphase und Kompression,  $K_{av}$  für alle Molekülgrößen gleichermaßen sinkt oder z.B. größere Proteine stärker von der Kompression betroffen sind, wenn die Kompression zu einer selektiven Verkleinerung von Poren führt.

### ***Einfluss der Proteingröße und Stationärphase auf den Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten***

Die Ergebnisse der Messungen zum Einfluß der Proteingröße auf den Verteilungskoeffizienten zeigen allgemein den erwarteten Trend eines sinkenden  $\Phi$  mit steigender Proteingröße, was mit der Vorstellung, daß größere Proteine stärker von einer sterischen Behinderung betroffen sind, übereinstimmt. Die Festphasen Sepharose 6 FF, SP Sepharose FF und Q Sepharose FF besitzen einen, im Vergleich zu SP Sepharose XL, Q Sepharose XL und Cpto Q, höheren  $\Phi$ , was die stärkere, sterische Behinderung durch die immobilisierten Dextranketten verdeutlicht. Die Abnahme von  $\Phi$  in Dextran-Agarose

Kompositmedien gegenüber reinen Agarosemedien wurde auch von Kosto *et al.* (2004) gefunden. Desweiteren können auch die Liganden selbst eine Verringerung von  $\Phi$  bewirken, was am niedrigeren  $\Phi$  für alle Proteine auf SP Sepharose FF im Vergleich mit Sepharose 6 FF und Q Sepharose FF zu sehen ist.

Die Änderung von  $\Phi$  in Abhängigkeit des Molekülradius ist für alle Festphasen auf Basis von Sepharose 6 FF flacher als für Superose 12. Dies ist zu erwarten, weil Superose 12 ein SEC Medium ist, welches einen möglichst großen Unterschied von  $\Phi$  im Trennbereich des Mediums aufweisen sollte, wohingegen die Ionenstauscher auf Basis von Sepharose 6 FF keine ausgeprägte Änderung von  $\Phi$  mit steigender Molekülgröße besitzen müssen, weil sie auch für größere Proteine ( $\sim 160$  kDa) eine möglichst große Kapazität besitzen sollten. Der vergleichsweise hohe  $\Phi$  für alle Proteine auf Superdex 200 prep grade und der flache Verlauf von  $\Phi$  in Abhängigkeit vom Proteinradius ist aus zwei Gründen problematisch: einerseits besitzt Superdex 200 als Agarose-Dextran Komposit Medium vergleichbare  $\Phi$ 's wie Sepharose 6 FF und steht damit im Konflikt zu den Ergebnissen für die Agarose-Dextran Komposit Medien SP Sepharose XL, Q Sepharose XL und Capto Q. Andererseits ist der Verlauf von  $\Phi$  mit steigendem Proteinradius eher flach und vergleichbar mit den Sepharose 6 FF Medien, obwohl es ebenso ein SEC Material wie Superose 12 ist und eine ähnliche Selektivität im untersuchten Molekularbereich besitzen sollte. Es ist unklar, warum Superdex 200 dieses Verhalten zeigt und kann mit den anderen Datensätzen nicht in Beziehung gebracht werden.

Die auffällig hohen  $\Phi$ 's für OVT und GGB auf Q Sepharose FF (Abb. 4.2.3), Q Sepharose XL und Capto Q (beide Abb. 4.2.4) deuten auf eine adsorptive Wechselwirkung des freien Cy5 Farbstoffes mit den Anionentauschern hin, die selbst bei einer Salzkonzentration von 1 M nicht vollständig unterdrückt wird, sodaß ein  $\Phi$  über 1 für den freien Farbstoff zu erwarten ist. Die Konzentration an freiem Farbstoff ist für OVT und GGB, im Vergleich mit den anderen Proteinen, am Größten und, weil sie niedrigere  $\Phi$ 's als die anderen Proteine besitzen, wirkt sich der höhere  $\Phi$  von Cy5 stärker auf die gemessenen Signale aus.

Für Sepharose 6 FF fällt im Vergleich mit den Literaturdaten (vgl. Abb. 4.2.6) und der Porosität von Sepharose 6 FF von 0.94 auf, daß  $\Phi$  für LYS mit 0.96 zu hoch erscheint und auf nicht-spezifische Bindung von LYS mit der Agarosematrix hindeutet. Tendenziell ist dies auch für CTG zu erkennen. Der Effekt ist auch sichtbar auf Superdex 200 und Superose 12 und wurde auch bei der Bestimmung von  $K_{av}$  bei den Validierungsstudien der Biokonjugate auf der Superose 12 Säule für sowohl LYS als auch CTG dokumentiert (vgl. 4.1). Obwohl

Agarosemedien wie Sepharose 6 FF generell als inerte poröse Medien angesehen werden, existieren geringfügige Reste negativ geladener Gruppen wie Sulfonat und Pyruvat in kommerziell verfügbaren Agarosemedien für die Biochromatographie (Duckworth und Yaphe, 1971). Da LYS und CTG eine positive Nettoladung bei pH 7.0 besitzen, könnte eine attraktive, elektrostatische Wechselwirkung mit der Agarosematrix zu dem beobachteten, erhöhten Verteilungskoeffizienten führen. Wie in den Ergebnissen zum Einfluß der Ionenstärke auf  $\Phi$  für LYS und CTG zu sehen, adsorbiert LYS und CTG an Sepharose 6 FF, wenn die Ionenstärke sinkt ( $< 200$  mM). Allerdings ist  $\Phi$  auch bei Ionenstärken zwischen 0.2 und 1 M zu hoch, wo elektrostatische Wechselwirkungen von LYS und CTG mit der Agarosematrix unterbunden sein sollten. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit ist eine hydrophobe Wechselwirkung von LYS und CTG mit der Agarosematrix. LYS besitzt einen hydrophoben Bereich auf der Proteinoberfläche (Fausnaugh *et al.*, 1986), welcher bei höheren Ionenstärken adsorptiv mit Festphasen wechselwirken kann. Für LYS und CTG wurden außerdem ungewöhnlich hohe Retentionszeiten auf quervernetzten Agarosematerialien (Fernandez-Sousa und Rodriguez, 1977) sowie ein erhöhter  $K_{av}$  auf Diol-modifizierten Silicagelen (Schmidt *et al.*, 1980) und 12 %iger, quervernetzter Agarose (Hjerten *et al.*, 1984) gefunden. Insbesondere bei Schmidt *et al.* (1980) konnte explizit gezeigt werden, daß  $K_{av}$  für LYS und CTG mit steigender Ionenstärke anstieg und andere positiv geladene Proteine wie Cytochrom c oder Ribonuclease diesen Effekt nicht zeigen. Letzteres spricht für den hydrophoben Charakter von LYS und CTG und könnte daher für die ungewöhnlich hohen  $\Phi$ 's als Erklärung herangezogen werden. Die Kompensation dieses Effektes ist schwierig, weil LYS und CTG bei niedrigerer Ionenstärke an die Agarosematrix adsorbieren. Die hydrophobe Interaktion scheint direkt über die Agarosematrix oder den Quervernetzer zu verlaufen, da der Effekt des erhöhten  $\Phi$ 's speziell bei den ligandenfreien SEC Medien Sepharose 6 FF, Superdex 200 und Superose 12 auffällt, wohingegen bei den Ionentauschern kein ungewöhnlicher Anstieg zu erkennen ist. Evtl. unterdrücken die Liganden die hydrophobe Interaktion zwischen LYS bzw. CTG und der Agarosematrix, weil die Proteine aus sterischen Gründen nicht nahe genug an die Porenwand gelangen können.

### ***Modellierung der Verteilung von Proteinen in Stationärphasen***

Die Ergebnisse der Modellierung mit dem Renkin- oder Ogstonmodell zeigen eine moderate Übereinstimmung des Modells mit den gemessenen Daten und beide Modelle ähneln sich im Meßdatenbereich. Typischerweise unterschätzt das Modell die  $\Phi$ 's für LYS und CTG sowie



OVT und GGB, die zu den geringen Korrelationskoeffizienten der Anpassungen führen. Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, ist eine nicht-spezifische Adsorption von LYS und CTG an die Agarosematrix sehr wahrscheinlich, die von beiden Modellen nicht erfasst werden kann, weil sie keine nicht-spezifische Adsorption berücksichtigen. GGB und OVT haben ausgeprägte, asymmetrische Formen (Garke *et al.*, 1999; Yeh *et al.*, 1979). Die verwendeten Stokesradien für die beiden Proteine könnten daher ihr Verteilungsverhalten in porösen Medien unterschätzen. Die verwendeten Modelle approximieren Proteine mit Kugeln, sodass es für ellipsoide Proteine zu Fehlinterpretationen der relevanten Molekülgröße kommen kann.

Eine Abschätzung der Anpassungsqualität für die Modelle ist schwierig, weil keine veröffentlichten Daten für exakt diese Festphasen und Proteine zur Verfügung stehen. Für einige Festphasen wurden Porenradien bestimmt, die mit den Ergebnissen der Anpassung an das Renkinmodell verglichen werden können. Ein Vergleich der Porenradien, die nach dem Renkinmodell ermittelt wurden, mit veröffentlichten Daten zeigt, daß eine gute Übereinstimmung für Sepharose 6 FF (Literatur: 29 nm; hier: 27 nm) und Superose 12 (Literatur: 12 nm; hier: 13.9 nm) (Hagel *et al.*, 1996) erzielt wurde, wohingegen der Wert für SP Sepharose FF (Literatur: 24.4 nm; hier: 16.5 nm) (DePhillips und Lenhoff, 2000) deutlicher abweicht.

Als Vergleich für die Anpassung nach Ogston können die Ergebnisse von Johnson *et al.* (1995) herangezogen werden. In der Arbeit wurde SP Sepharose Big Beads als Festphase verwendet, die, mit Ausnahme des durchschnittlichen Partikeldurchmessers, identisch mit SP Sepharose FF ist. Der Faserradius wurde mit 1.9 nm beziffert, welches eine sehr gute Übereinstimmung mit dem hier angepassten Parameter von 1.8 nm darstellt. In Übereinstimmung mit Ergebnissen zu Dextran-Agarose Komposit Materialien (Kosta *et al.*, 2004) weisen SP Sepharose XL, Q Sepharose XL und Capto Q einen niedrigeren Faserradius auf im Vergleich mit Einzelkomponenten Materialien.

### ***Elektrostatistische Einflüsse auf den Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten***

Die Ergebnisse zum elektrostatischen Einfluß auf  $\Phi$  verdeutlichen, daß größenausschlusschromatographische Trennungen von Proteinen eine Funktion der Ionenstärke sind. Je nach Protein kann die Ionenstärke entgegengesetzte Effekte haben (Adsorption oder Abstoßung) und das Ausmaß der Effekte ist eine Funktion des Proteins und der Festphase.

Die beobachteten Effekte in den Untersuchungen zum elektrostatischen Einfluß auf  $\Phi$  können generell durch Überlegungen zur Nettoladung der Proteine bei pH 7.0 erklärt werden. Es ist bekannt, daß Größenausschlussmedien und Agarosemedien negativ geladenen Gruppen, wie Sulphonat- und Pyruvatgruppen, im Matrixgrundgerüst besitzen (Duckworth und Yaphe, 1971). Sowohl LYS als auch CTG besitzen eine positive Nettoladung bei einem pH-Wert von 7.0, die Werte für  $\Phi$  über eins für niedrige Ionenstärken durch adsorptive Wechselwirkungen erklären. Ab einer Ionenstärke von ca. 0.2 M wird ein Gleichgewichtszustand erreicht, bei dem sich  $\Phi$  nicht mehr signifikant mit der Ionenstärke ändert. GGB besitzt einen pI von 7.0 und hat damit eine Nettoladung von  $\sim 0$  unter den untersuchten Bedingungen. Bei einem pH-Wert um den pI eines Proteins sind elektrostatische Effekte auf den Verteilungskoeffizienten am schwächsten (Pujar und Zydney, 1998). Diese Überlegung passt zur experimentellen Beobachtung, daß  $\Phi$  für GGB mit sinkender Ionenstärke nahezu konstant bleibt und somit weder anziehende noch abstoßende Interaktionen dominieren. Die verbleibenden Proteine besitzen alle eine negative Nettoladung und zeigen eine abstoßende Interaktion mit sinkender Ionenstärke. Dieses Ausschlußverhalten wurden in der Literatur beschrieben (Lee und Whitaker, 2004; Dubin *et al.*, 1993; Tarvers und Church, 1985) und ist, neben adsorptiven Interaktionen, der Hauptgrund für nicht-ideales Größenausschlussverhalten. Qualitativ verhalten sich alle Proteine mit abstoßender Interaktion gleich:  $\Phi$  besitzt ein Minimum bei niedriger Ionenstärke und nähert sich sigmoidal einem Gleichgewichtswert für hohe Ionenstärken an. Das Ausmaß der Abstoßung, abgeschätzt über die Differenz zwischen  $\Phi$  bei einer Ionenstärke von 1.08 M und 0.08 M, ist OVA > BLG > BSA > OVT mit  $\Delta\Phi$  von 0.177, 0.158, 0.124 bzw. 0.045. Die Reihenfolge stimmt, bis auf BSA, gut mit dem Abstand des pI's der Proteine von pH 7.0 überein. Die Nettoladung ist nicht verantwortlich für das Ausmaß anziehender oder abstoßender Interaktionen bei der Verteilung innerhalb poröser Medien, sondern die Ladungsverteilung und -zugänglichkeit (Kopaciewicz *et al.*, 1983; Smith und Deen, 1980). Für ein weitergehendes Verständnis elektrostatischer Einflüsse auf den Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten müssten Simulationen zur Plazierung und Interaktion der Proteine innerhalb der porösen Matrix durchgeführt werden, die die Positionen der Ladungen auf dem Protein und der Festphase mit einschließen (Smith und Deen, 1980). Die zusätzlichen Untersuchungen für OVA auf SP Sepharose FF und XL verdeutlichen den Einfluss der Festphase auf die elektrostatische Abstoßung: Im Gegensatz zu Sepharose 6 FF (24 %) sinkt  $\Phi$  für SP Sepharose FF um 38 % bzw. für SP Sepharose XL um 76 %, bezogen auf die  $\Phi$ 's bei der höchsten und niedrigsten Ionenstärke. Die stärkere Abstoßung der Kationentauschermedien kann über die höhere Konzentration an geladenen Liganden erklärt

werden. Im Falle des Dextran-Komposit Mediums SP Sepharose XL bewirkt das Vorhandensein der Ladungen auf den Dextranketten eine stärkere Abstoßung, die erst bei einer höheren Ionenstärke von 1.08 M 93 % des Gleichgewichtswert bei 1.5 M erreicht. Dies ist ein Hinweis auf die postulierte, bessere Ladungserreichbarkeit von XL Medien (Hubbuch *et al.*, 2003) und könnte die stärkere Abstoßung bei höheren Ionenstärken im Vergleich zu den anderen Medien erklären, weil sich die Wirkung der Ladung durch die flexibleren Dextranketten zusätzlich erhöht. Zusätzlich zur Abstoßung des Proteins kann die Konformation der immobilisierten Dextrane eine Rolle bei der Entwicklung von  $\Phi$  mit sinkender Ionenstärke auf SP Sepharose XL spielen: bei niedrigen Ionenstärken ist die Abstoßung zwischen den gleichgeladenen Dextranketten stark ausgeprägt, sodaß die Dextrane relativ starr im Porenraum vorliegen und neben der elektrostatischen Abstoßung auch eine stärkere sterische Behinderung für OVA darstellen, die sich mit steigender Ionenstärke verringert, da die Abstoßung zwischen den Dextranketten geschwächt wird und die Dextrane ein flexibleres Netzwerk bilden, welches einen geringeren, sterischen Widerstand bietet. Für Dextrane bei 50 mM und 1 M NaCl Konzentration in SP Sepharose XL wurde ebenfalls bei 1 M NaCl ein höherer Verteilungskoeffizient gemessen (Hubbuch *et al.*, 2003), was das oben aufgestellte Szenario stützt.

### 4.3 Verteilung und Diffusion von Proteinen in chromatographischen Festphasen - Diffusion

Der intrapartikuläre Diffusionskoeffizient ist ein wichtiger Parameter für die Modellierung von größenausschlusschromatographischen (vgl. 4.4) und adsorptiven Trennungen (vgl. 4.6-4.9). Insbesondere die Abhängigkeit des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten von der Proteingröße ist von besonderer Bedeutung für die Modellierung. Im Folgenden wird eine Methode vorgestellt, die es erlaubt, mittels CLSM, den intrapartikulären Diffusionskoeffizienten in chromatographischen Festphasen zu bestimmen. Komplementär zu der Messung des Verteilungskoeffizienten (4.2) können Festphaseneigenschaften wie die Porengröße und Porosität bestimmt werden. Neben der Vorstellung der Meßmethode werden auch die Einflüsse des pH-Wertes, der Proteinkonzentration und der Fließgeschwindigkeit, sowie der Einfluß eines zweiten Proteins in Lösung bzw. als adsorbiertes Protein untersucht. Die konfokale Messtechnik besitzt, im Vergleich mit anderen Methoden, wie chromatographische Messungen (Bosma und Wessenlingh, 2000; Boyer und Hsu, 1991; Davies, 1989), Fluoreszenzwiederherstellung nach Photobleaching (FRAP, Berk *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1995; Moussaoui *et al.*, 1992; Pluen *et al.*, 1999) oder NMR (Gibbs *et al.*, 1991; Gibbs *et al.*, 1992), Vorteile bezüglich ihrer Präzision (Messung auf Einzelpartikelniveau) und der Messung unter realen, chromatographischen Bedingungen. Die Bestimmung von dynamischen Diffusionsprozessen in chromatographischen Partikeln kann i.M. von keiner anderen Methode mit einer vergleichbaren örtlichen und zeitlichen Auflösung realisiert werden.

#### 4.3.1 Messung des freien Diffusionskoeffizienten von Proteinen mittels FCS

Für die Modellierung der behinderten, intrapartikulären Diffusion (4.3.4) wird der Wert des freien Diffusionskoeffizienten benötigt. Da die Literaturwerte nicht exakt den experimentellen Bedingungen in dieser Studie entsprechen, wurden die freien Diffusionskoeffizienten bei den experimentellen Bedingungen (Phosphat, 50 mM, pH 7.0, 200 mM NaCl,  $c_{\text{Protein}}: 3.5 \cdot 10^{-5}$  M) mittels FCS gemessen. Die Diffusionskoeffizientenmessung über FCS kann keine absoluten Werte für die Proteine ermitteln. Die relativen Werte wurden auf den Literaturwert von BSA normiert, um absolute Diffusionskoeffizienten zu bestimmen. Der Literaturwert des Diffusionskoeffizienten für BSA ist sehr präzise mittels Lichtstreuung gemessen worden und

wird deswegen als Referenz verwendet. In Tabelle 4.3.1 werden die gemessenen Diffusionskoeffizienten mit Literaturwerten verglichen.

Die Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung zwischen Literaturwerten und Meßdaten.

**Tabelle 4.3.1. Diffusionskoeffizienten für verwendete Proteine gemessen mittels FCS und Vergleich mit Literaturdaten (Sober, 1970).**

Protein	$D_0$ (FCS) [ $\text{m}^2/\text{s}$ ]	$D_0$ (Literatur) [ $\text{m}^2/\text{s}$ ]
LYS	$1.15 \cdot 10^{-10}$	$1.12 \cdot 10^{-10}$
CTG	$9.43 \cdot 10^{-11}$	$9.48 \cdot 10^{-11}$
BLG	$8.84 \cdot 10^{-11}$	$8.20 \cdot 10^{-11}$
OVA	$8.32 \cdot 10^{-11}$	$7.76 \cdot 10^{-11}$
BSA	$6.15 \cdot 10^{-11}$	$6.15 \cdot 10^{-11}$
OVT	$5.81 \cdot 10^{-11}$	$5.25 \cdot 10^{-11}$
GGB	$4.42 \cdot 10^{-11}$	$4.00 \cdot 10^{-11}$

### 4.3.2 Bestimmung des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten in chromatographischen Medien über CLSM Messungen

Vor der Darstellung der Ergebnisse der CLSM Messungen von  $D_{ip}$  für verschiedene Proteine wird im Folgenden die eigentliche Meßmethode und Parameteranpassung vorgestellt.

Die CLSM Methode zur Bestimmung des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten basiert auf der Messung des intrapartikulären Konzentrationsprofils eines Partikels in einem gepackten Bett während der Be- und Entladung mit Protein. Durch die Messung in einem gepackten Bett ist der Partikel an einer Position fixiert. Im Gegensatz zu Versuchen im Batchansatz (vgl. 4.2) kann damit der dynamische Prozeß der Beladung des Partikels von Beginn an untersucht werden.

Die Messung startet in einem leeren Partikel, erfasst die Beladungsphase, in der der Partikel mit Protein bis ins Gleichgewicht gefüllt wird, und nach Abschalten der Proteinversorgung wird die Leerung des Partikels verfolgt. Zusammen mit der Messung der Bulkkonzentration neben dem Partikel werden alle Daten, für das in Kapitel 2.5.1 vorgestellte Diffusionsmodell, direkt am Partikel mittels CLSM gemessen.

Die Bestimmung des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten erfolgt über die Anpassung des Parameters  $D_{ip}$  an die konfokal gemessenen Daten in temporaler und spatialer Richtung (vgl. 2.5; Abb. 4.3.1 und 4.3.2, rote Kurven). Ausgehend von einem Startwert, werden die Daten an einen  $D_{ip}$  angepasst, das Residuum bestimmt und durch systematisches Variieren von  $D_{ip}$  eine optimale Anpassung im Sinne der Minimierung der Fehlerquadratsumme erzielt (Abb. 4.3.2-A und -B, blaue Kurven). Dieses Optimum entspricht dem jeweiligen  $D_{ip}$ . Die angepassten Ergebnisse für einen Beispieldatensatz (BSA auf Sepharose 6 FF, Phosphat, 50 mM, pH 7.0, 200 mM NaCl,  $3.5 \cdot 10^{-5}$  M, D/P: 0.1, 150 cm/h) sind in Abb. 4.3.2-A und -B dargestellt.

Das in Kapitel 2.5 vorgestellte Diffusionsmodell benötigt den Verlauf der Bulkproteinkonzentration als Randbedingung für die Modellierung der intrapartikulären Konzentrationsprofile. Der Vergleich der Anpassung unter Annahme eines idealen Stufenprofils (Abb. 4.3.1-B) oder Verwendung des gemessenen Bulkprofils (Abb. 4.3.1-A), führt beim idealen Profil zu einer fehlerhaften Anpassung und damit zur Ermittlung eines falschen  $D_{ip}$ 's. Die Verwendung des gemessenen Bulkprofils ist daher notwendig für die Anpassung des  $D_{ip}$ 's an die experimentellen Daten.

Der Optimierungsalgorithmus ‚fminbnd‘ bestimmt automatisch die Schrittweite für die nächste Anpassung mit einem Diffusionskoeffizienten. Idealerweise sollte das Proteinkonzentrationsprofil weiche Übergänge von niedriger Konzentration zu hoher Konzentration (Beladungsphase) und wieder zurück (Entladungsphase) aufweisen, damit die automatische Parameteranpassung das Minimum des Residuums findet.

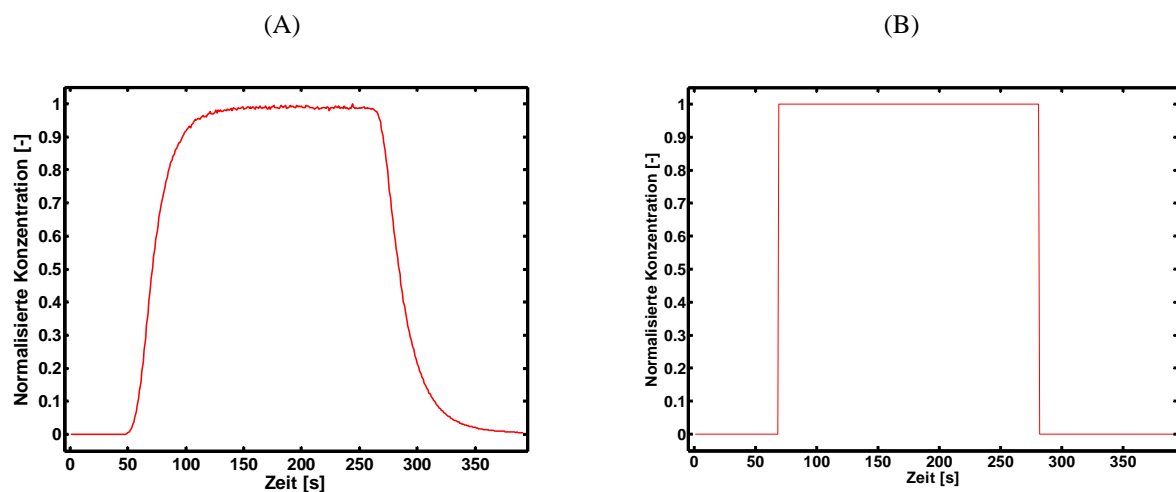


Abbildung 4.3.1. (A) Gemessenes Bulkprofil für BSA bei pH 7.0 und 200 mM NaCl auf Sepharose 6 FF. (B) Ideales Stufenprofil für BSA bei pH 7.0 und 200 mM NaCl auf Sepharose 6 FF.

Obwohl im zeitlichen Mittel die Proteinkonzentration stetig steigt (Beladung) bzw. sinkt (Entladung), kann sich über einen Zeitraum von Sekunden die Richtung der Konzentrationsänderung, aufgrund des Messrauschens in der Bulkphase und im Partikel, kurzfristig ändern. Dies führt zu Uneindeutigkeiten beim automatischen Anpassen von  $D_{ip}$  und dem damit verbundenen Risiko, anstelle des globalen Minimums der Fehlerquadratsumme ein lokales Minimum zu erreichen. Für solche Fälle wird anstelle der automatischen Anpassung ein Parameterbereich manuell ausgewertet. In Abb. 4.3.3 werden Parameteranpassungen für die verwendeten Proteine für Sepharose 6 FF sowohl mit der manuellen Methode als auch mit ‚fminbnd‘ gegenübergestellt. Der Unterschied der beiden Methoden wird deutlich unterhalb eines Molekulargewichtes von ca. 36 kDa (BLG), bei

denen die manuelle Methode Anpassungen mit niedrigerer Standardabweichung erzielt. Für Proteine ab einem Molekulargewicht von ca. 36 kDa erzielen beide Methoden vergleichbare Ergebnisse mit ähnlichen Standardabweichungen. Der Unterschied zwischen Datensätzen für große und kleine Proteine wird in der Auftragung der Residuen für CTG und BSA (Abb. 4.3.4) deutlich. Für CTG können über die automatische Methode u.U. als Ergebnis für  $D_{ip}$  einige der lokalen Minima ermittelt werden, wohingegen für BSA die Variation der Residuen unproblematisch ist für eine automatische Parameteranpassung.

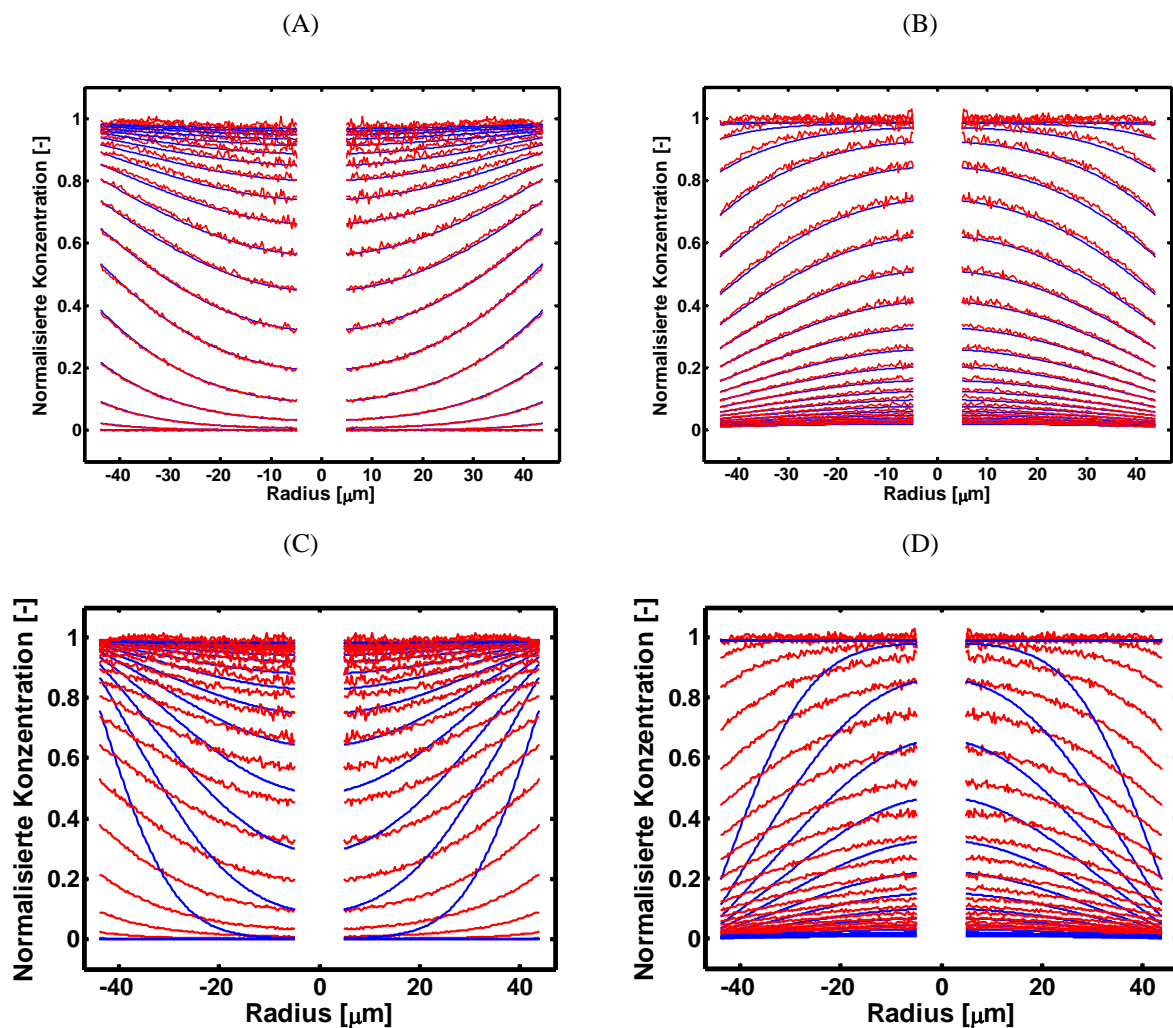


Abbildung 4.3.2. Vergleich der gemessenen intrapartikulären Profile (—) mit simulierten Daten (—) nach Anpassung der Daten an einen Diffusionskoeffizienten. Daten für BSA bei pH 7.0 und 200 mM NaCl auf Sepharose 6 FF. (A) Diffusion in und (B) aus dem Partikel für gemessenes Profil aus Abb. 4.3.1-A. (C) Diffusion in und (D) aus dem Partikel für ideales Profil aus Abb. 4.3.1-B.

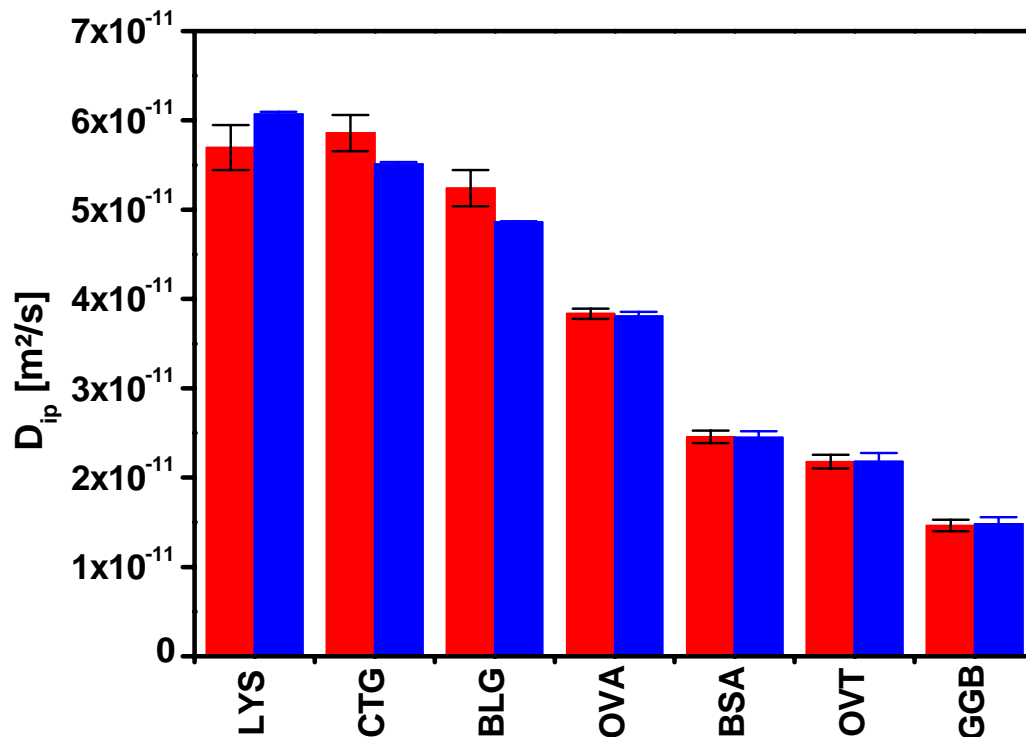


Abbildung 4.3.3. Vergleich der manuellen (■) und automatischen (■) Anpassung des Diffusionskoeffizienten aus konfokalen Messungen.

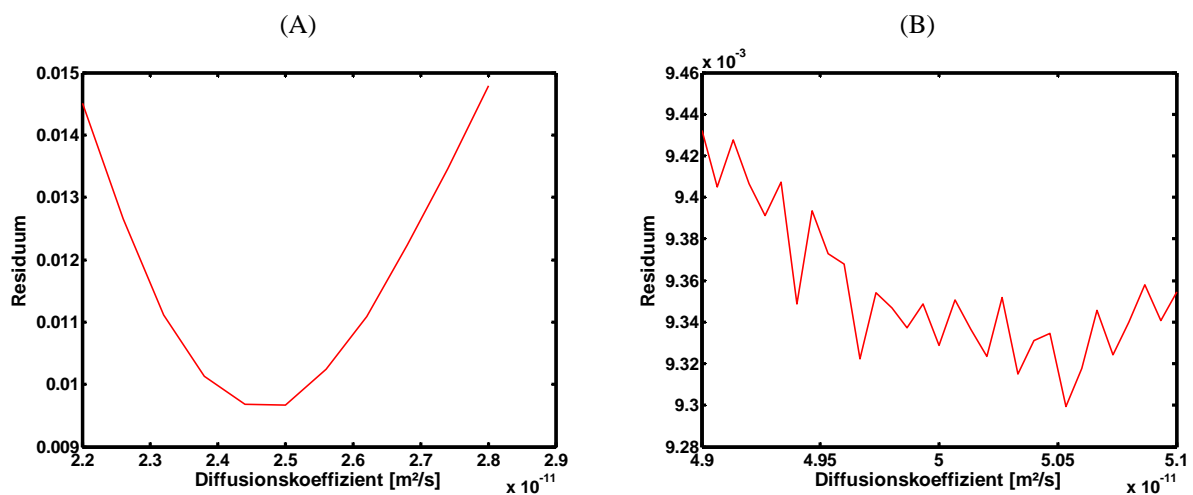


Abbildung 4.3.4 Auftragung des Residuums für (A) BSA und (B) CTG für manuell angepasste konfokale Diffusionsdaten über einen Bereich von Diffusionskoeffizienten.

### 4.3.3 Einfluß der Proteingröße und der Festphase auf den intrapartikulären Diffusionskoeffizienten

Sowohl die Proteingröße als auch Festphaseneigenschaften (Porengröße, Porosität) beeinflussen den intrapartikulären Diffusionskoeffizienten in porösen Körpern. Der Einfluß der Proteingröße wurde für eine Gruppe von unterschiedlich großen Proteinen untersucht, wohingegen der Einfluß der Festphase durch Experimente mit dem Agarose Basismaterial



Sepharose 6 FF und dem stärker quervernetztem Agarose-Dextran Komposit Material Capto Q betrachtet wurde.

In Abb. 4.3.5 sind die intrapartikulären Diffusionskoeffizienten für sieben Proteine zwischen 14.3 und 160 kDa für die Festphasen Sepharose 6 FF und Capto Q abgebildet. Alle Versuche wurden bei einer Proteinkonzentration von  $3.5 \cdot 10^{-5}$  M und einem D/P von 0.1 bei gleichen Pufferbedingungen (Phosphat, 50 mM, pH 7, 200 mM NaCl für Sepharose 6 FF, 1 M NaCl für Capto Q) und einer Fließgeschwindigkeit von 150 cm/h durchgeführt.

Generell ist zu erkennen, daß der intrapartikuläre Diffusionskoeffizient mit steigender Proteingröße sinkt.  $D_{ip}$ 's in Capto Q sind, im Vergleich zu Sepharose 6 FF, ca. 30 % niedriger. Bei Capto Q ist für OVT und GGB ein leichter Anstieg von  $D_{ip}$  bezogen auf das nächst kleinere Protein BSA zu sehen.

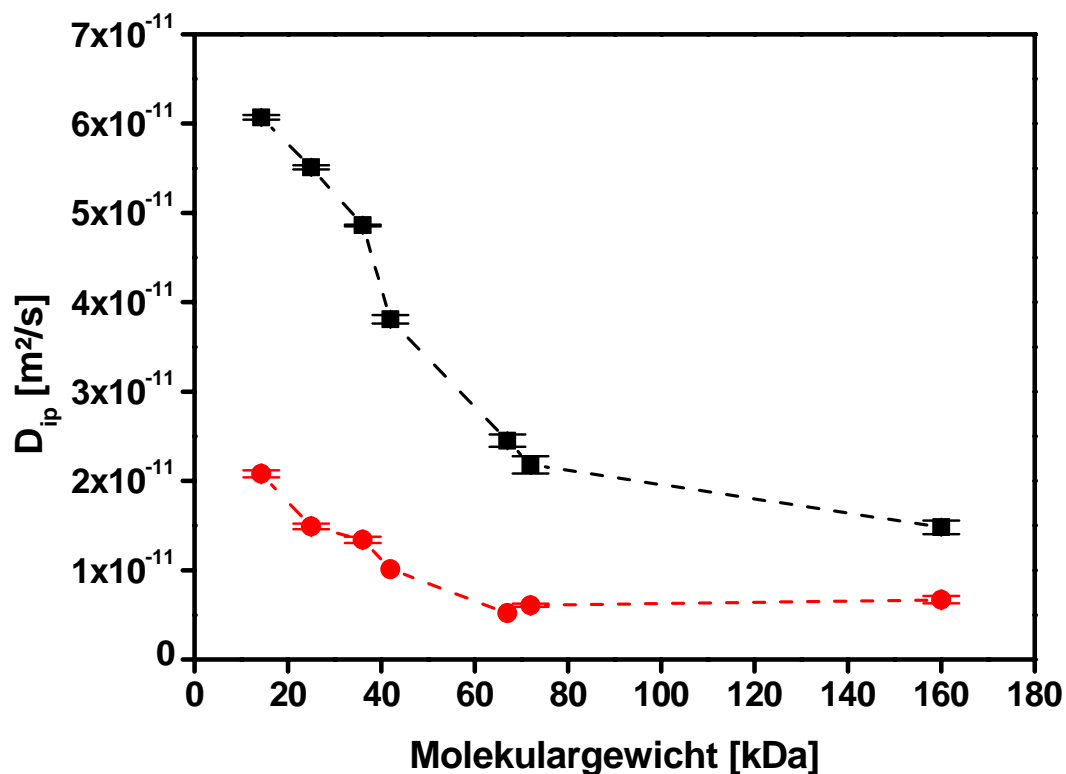


Abbildung 4.3.5. Intrapartikuläre Diffusionskoeffizienten für Proteine unterschiedlicher Größe für (—) Sepharose 6 FF bei pH 7.0 und 200 mM und (—) Capto Q bei pH 7.0 und 1 M NaCl. Standardabweichung für drei Messungen.

Im Gegensatz zur Messung des Verteilungskoeffizienten sollte die Anwesenheit von freiem Fluoreszenzfarbstoff sowie Dimeren, für den Konzentrationsbereich der in Kapitel 4.1 für diese Species angegeben wurde, keinen signifikanten Einfluß auf die Bestimmung von  $D_{ip}$  besitzen. Im Gegensatz zur Endpunktbestimmung des Verteilungskoeffizienten (4.2) erfolgt

die Anpassung an den Diffusionsdatensatz über den gesamten Zeitraum, sodaß eine anfänglich auftretende schnelle Komponente (freier Cy5 Farbstoff) bzw. eine langsamere Species (Dimer) mit jeweils geringem Signal (maximal 11.5 % für GGB, durchschnittlich 3.7 %) bei der Anpassung nicht berücksichtigt wird, weil die Parameterbestimmung im Wesentlichen über die Krümmung der intrapartikulären Konzentrationsprofile erfolgt, die durch die Hauptkomponente bestimmt wird. Wenn die Kontaminanten die Anpassung beeinflussen, würde keine adequate Anpassung (vgl. Abb. 4.3.2) über den gesamten Versuchsablauf möglich sein.

In Abb. 4.3.6 werden die  $D_{ip}$ 's aus dieser Studie mit Ergebnissen aus relevanten Literaturdaten verglichen. In keiner veröffentlichten Arbeit wurde als Festphase Sepharose 6 FF oder Capto Q verwendet, weswegen für den Vergleich ähnliche Agarose-haltige poröse Systeme herangezogen werden. Die Daten von Boyer und Hsu (1992) repräsentieren effektive Diffusionskoeffizienten. Um einen Vergleich der  $D_{ip}$ 's mit den Daten von Boyer und Hsu zu ermöglichen, wurden die effektiven Diffusionskoeffizienten durch die effektive Porosität geteilt, die ebenfalls von Boyer und Hsu angegeben wurde, und die  $D_{ip}$ 's über die Stokes-Einstein Gleichung (Schroeder *et al.*, 2006) von 4°C auf 20°C umgerechnet.

Die mittels CLSM ermittelten Daten liegen in der Größenordnung der anderen durchgeführten Untersuchungen und ähneln sich im Verlauf des  $D_{ip}$ 's in Abhängigkeit von der Proteingröße. Mögliche Gründe für Unterschiede der publizierten Daten mit den hier vorgestellten Ergebnissen werden in der Diskussion (s.u.) genannt.

#### **4.3.4 Modellierung behinderter Diffusion von Proteinen in chromatographischen Medien**

Für die Vorhersage von intrapartikulären Diffusionskoeffizienten in chromatographischen Festphasen werden Modelle benötigt, die die experimentellen Daten adequat beschreiben können. Durch die Modellierung werden Festphaseneigenschaften, wie die Porengröße und die Porosität der Adsorber prediktiv bestimmt. Im Folgenden soll die Anwendbarkeit der Modelle geprüft und ein Vergleich der Parameter mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.2 durchgeführt werden.

Für die Modellierung der behinderten Diffusion wird für jedes Protein der Quotient aus  $D_{ip}$  und  $D_0$  gebildet und gegen den Proteinradius aufgetragen. Analog zur Vorgehensweise in Kapitel 4.2 wird der Stokesradius verwendet (vgl. Tab. 4.2.1). In Abb. 4.3.7 ist  $D_{ip}/D_0$  gegen

den Proteinradius zusammen mit den Ergebnissen der Anpassung nach dem Renkin oder Ogston Modell aufgetragen. Die Anpassungsparameter sind in Tabelle 4.3.2 aufgeführt.

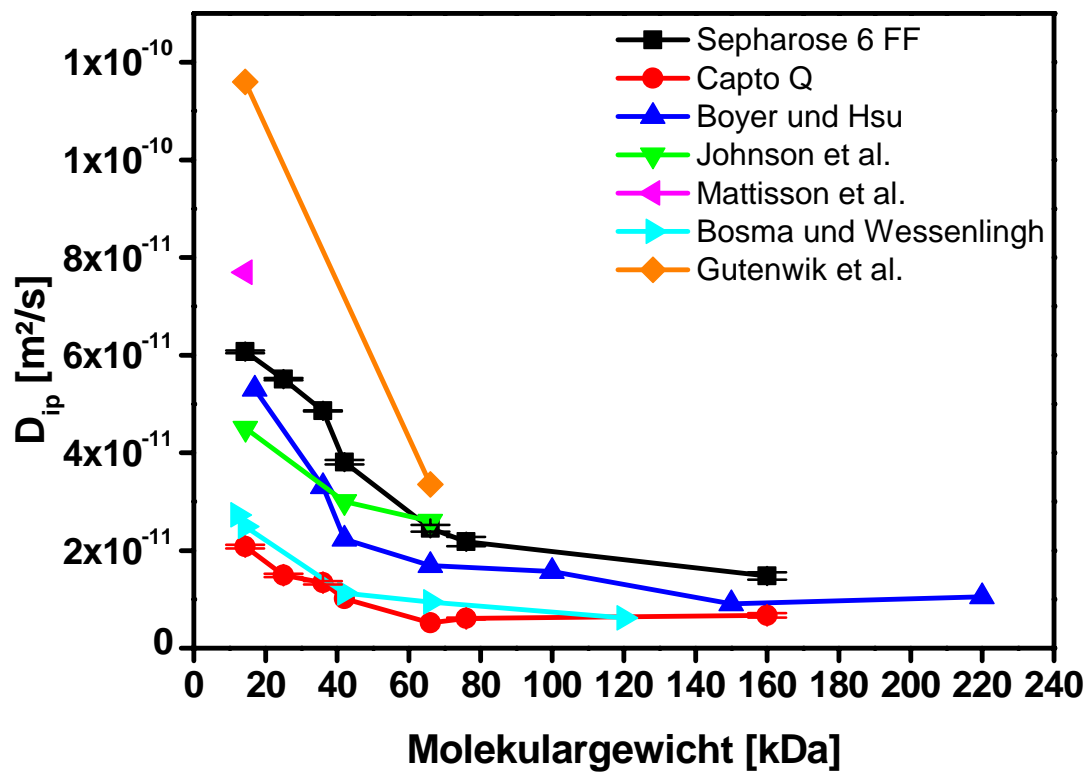


Abbildung 4.3.6. Vergleich intrapartikulärer Diffusionskoeffizienten von Proteinen unterschiedlicher Größe in verschiedenen porösen Medien mit den experimentell gemessenen Daten dieser Studie.

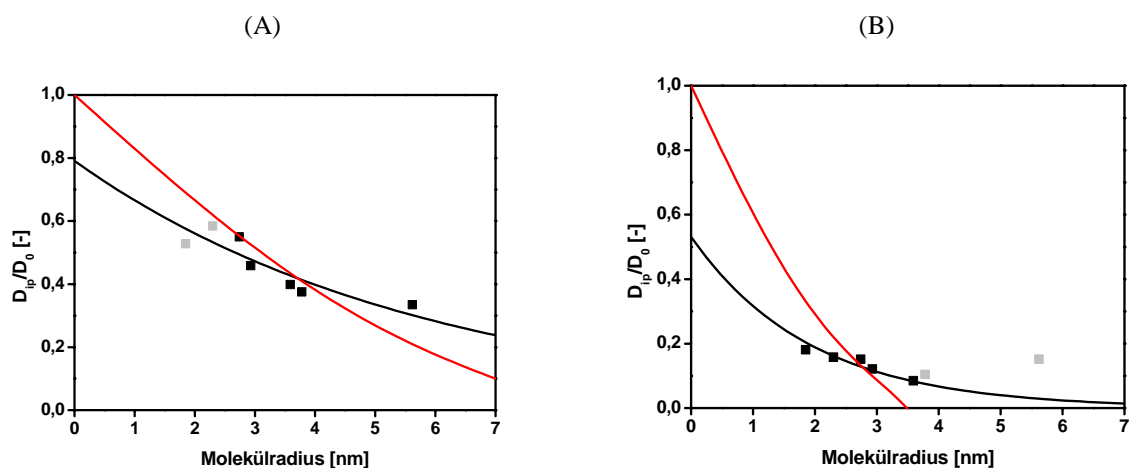


Abbildung 4.3.7. Anpassung der gemessenen Daten an das (—) Ogston oder (—) Renkin Modell. (A) Sepharose 6 FF. (B) Capto Q. Graue Datenpunkte wurden von der Anpassung ausgeschlossen.

Generell sinkt der Quotient  $D_{ip}/D_0$  mit steigendem Proteinradius. Entgegen der Vorstellung der behinderten Diffusion in porösen Festphasen sinkt der Quotient für LYS im Vergleich mit CTG auf Sepharose 6 FF und steigt für OVT und GGB im Vergleich mit BSA auf Capto Q an. Der Wert für CTG auf Sepharose 6 FF erscheint im Vergleich mit den anderen Daten

ebenfalls zu niedrig. Die Ergebnisse stimmen gut mit den Erkenntnissen der Validierungsstudien (4.1) und der Ergebnisse aus den Verteilungskoeffizientenversuchen (4.2) überein, wo ebenfalls für LYS und CTG auf Superose 12 bzw. Sepharose 6 FF ein zu niedriger  $K_{av}$  bzw.  $\Phi$  und für OVT und GGB ein zu hoher  $\Phi$  auf Capto Q gemessen wurde.

**Tabelle 4.3.2. Parameter und Korrelationskoeffizienten für Anpassungen der Daten aus Abb. 4.3.7 an das Renkin oder Ogston Modell.**

Stationärphase	R <sup>2</sup> (Renkin)	r <sub>p</sub> [nm]	R <sup>2</sup> (Ogston)	ε	r <sub>f</sub> [nm]
Sepharose 6 FF	0.18	12.3	0.75	0.94	1.37
Capto Q	-6.0	5.1	0.80	0.6	1.22

Die experimentellen Daten zeigen keine gute Übereinstimmung mit dem Renkin Modell und eine moderate Anpassung an das Ogston Modell. Speziell die Anpassung nach Renkin für den Capto Q Datensatz gibt die experimentellen Daten nicht wieder. Im Vergleich mit den Anpassungsergebnissen aus Kapitel 4.2 sind nach dem Renkinmodell die Porenradien für die Diffusionsdaten niedriger. Für Sepharose 6 FF ist r<sub>p</sub> ca. halb so groß, wie für die Anpassung an die Verteilungskoeffizientendaten (27 nm). Für das Ogstonmodell ist r<sub>f</sub> für Sepharose 6 FF nach den Diffusionsdaten ebenfalls ca. halb so groß, wie nach den Anpassungen aus Kapitel 4.2 (1.37 nm), während für Capto Q r<sub>f</sub> mit 1.22 nm höher ist, als aus den Daten für den Verteilungskoeffizienten (0.9 nm)

#### 4.3.5 Einfluß des pH-Wertes und der Ionenstärke auf den intrapartikulären Diffusionskoeffizienten

Die Transporteigenschaften von LYS und CTG zeigen Abweichungen vom erwarteten Verhalten für Proteine dieser Größe unter nicht-adsorbierenden Bedingungen in inerten, porösen Chromatographiematerialien, wie sie auch schon für die Verteilungskoeffizienten (4.2) beobachtet wurden. Mögliche Einflußgrößen auf das Transportverhalten sind der pH-Wert und die Ionenstärke, die für die beiden Proteine in weiteren Versuchen variiert wurden. Da beide Proteine einen hohen pI besitzen (LYS: 11.1, CTG: 9.1) wurden Versuche bei pH 12 durchgeführt, um mögliche attraktive Wechselwirkungen mit negativ geladenen Restladungen auf den Festphasen durch Änderung der Nettoladung der Proteine auszuschließen. Neben der pH-Wert Änderung wurde auch bei pH 7.0 die NaCl Konzentration von 200 mM auf 1 M erhöht, um elektrostatische Wechselwirkungen zu unterbinden. Um das Monomer-Dimer Gleichgewicht für LYS auf die Seite des Monomers zu legen, wurden auch Versuche bei pH 4.0 durchgeführt.

Abb. 4.3.8 zeigt einen Überblick der  $D_{ip}$ 's von CTG und LYS bei Variation der Ionenstärke oder des pH-Wertes. Für CTG ist sowohl bei Erhöhung der NaCl-Konzentration von 200 mM auf 1 M, als auch einem pH-Wert Anstieg von 7 auf 12 eine Verringerung des  $D_{ip}$ 's von  $5.51 \cdot 10^{-11}$  auf  $4.85 \cdot 10^{-11}$  bzw.  $4.90 \cdot 10^{-11}$   $m^2/s$  zu sehen. Für LYS ist bei pH-Wert Erhöhung von 7 auf 12 eine Erhöhung des  $D_{ip}$ 's von  $6.07 \cdot 10^{-11}$  auf  $6.25 \cdot 10^{-11}$   $m^2/s$  zu erkennen. Der  $D_{ip}$  verringert sich bei Änderung der Salzkonzentration von 200 mM auf 1 M NaCl um 18 %. Die Verringerung des pH-Wertes von 7 auf 4 (50 mM Acetat Puffer) bewirkt eine Adsorption von LYS auf Sepharose 6 FF (Daten nicht gezeigt). Die NaCl-Konzentration muss auf 500 mM erhöht werden, um keine deutliche Adsorption von LYS auf Sepharose 6 FF zu messen. Unter diesen Bedingungen ist der  $D_{ip}$  vergleichbar mit den Daten für pH 7 und 200 mM NaCl im Rahmen der Meßgenauigkeit.

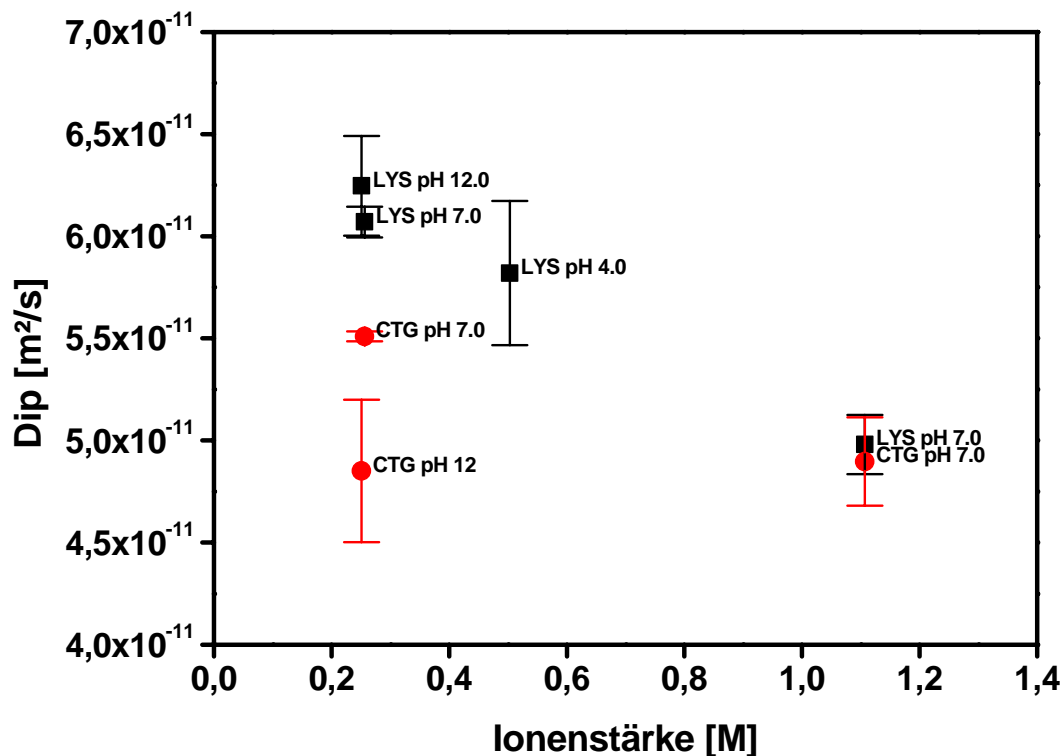


Abbildung 4.3.8. Vergleich der intrapartikulären Diffusionskoeffizienten für (■) LYS und (●) CTG auf Sepharose 6 FF bei unterschiedlichen pH-Werten und Ionenstärken.

#### 4.3.6 Einfluß der Proteinkonzentration auf den intrapartikulären Diffusionskoeffizienten

Während einer chromatographischen Trennung, speziell unter adsorptiven Bedingungen, kann die Proteinkonzentration innerhalb des Partikels variieren und höhere Werte annehmen, als in

den oben dargestellten Versuchen (alle  $3.5 \cdot 10^{-5}$  M) untersucht wurde. Bei realen chromatographischen Trennungen treten zudem auch Multikomponentensysteme auf, bei denen unterschiedlich große Proteine durch eine Festphase diffundieren. Der Einfluß der Proteinkonzentration auf  $D_{ip}$  wurde für Einzelkomponentensysteme (BSA und GGB) bzw. ein Zwei-Komponentensystem (CTG mit GGB) auf Sepharose 6 FF untersucht. Die experimentellen Bedingungen waren, mit Ausnahme der Proteinkonzentration, identisch mit den oben vorgestellten Versuchen (Phosphat, 50 mM, pH 7.0, 200 mM NaCl, D/P: 0.1, 150 cm/h).

In Abb. 4.3.9 ist der Einfluß der Proteinkonzentration auf den intrapartikulären Diffusionskoeffizienten für BSA bzw. GGB oder für CTG mit unterschiedlichen GGB Konzentrationen dargestellt.

Für BSA und GGB ist, im Rahmen der Meßgenauigkeit, kein eindeutiger Trend mit steigender Proteinkonzentration zu sehen. Für konstante CTG Konzentration und steigender GGB Konzentration im Zweikomponentensystem sinkt  $D_{ip}$  von CTG um 38 % von dem Wert ohne GGB Zugabe (CTG Einzelkomponentensystem) auf die höchste untersuchte GGB Konzentration von  $3.5 \cdot 10^{-4}$  M.

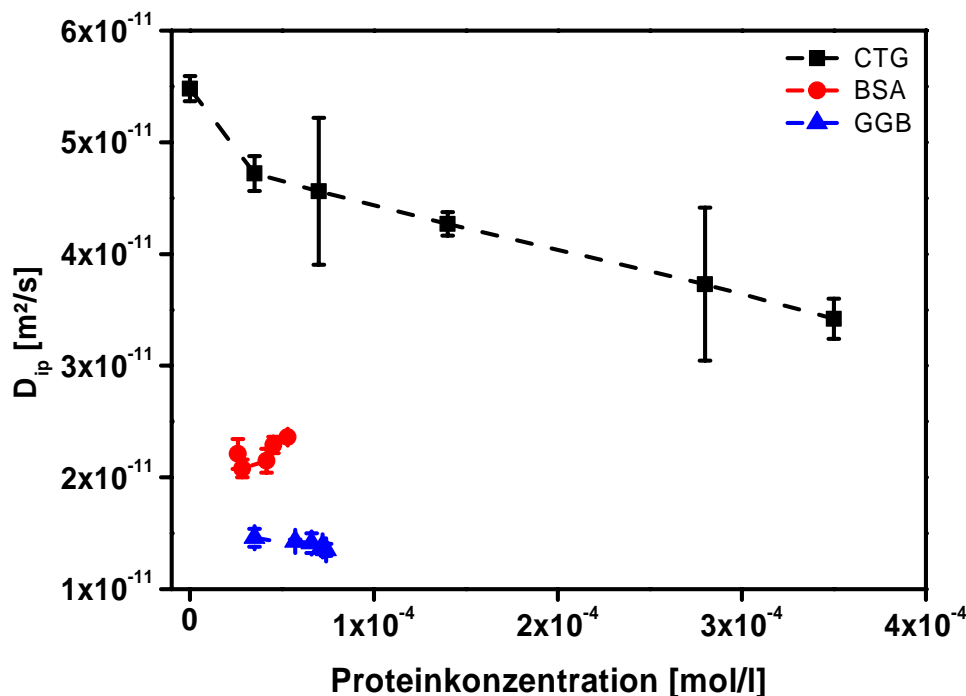


Abbildung 4.3.9. Vergleich der intrapartikulären Diffusionskoeffizienten auf Sepharose 6 FF bei pH 7.0 und 200 mM NaCl bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen. CTG mit unterschiedlichen GGB Konzentrationen.

#### 4.3.7 Einfluß der Fließgeschwindigkeit auf den intrapartikulären Diffusionskoeffizienten

Alle Versuche wurden bis jetzt bei einer Fließgeschwindigkeit von 150 cm/h durchgeführt. Evtl. beeinflusst die Fließgeschwindigkeit, durch Änderung des Filmdiffusionskoeffizienten oder der Partikelkompression, den  $D_{ip}$ .

In Abb. 4.3.10 ist der  $D_{ip}$  für BSA auf Sepharose 6 FF für drei verschiedene Fließgeschwindigkeiten dargestellt. Im Rahmen der Meßgenauigkeit ist kein eindeutiger Trend für den Einfluß der Fließgeschwindigkeit auf den  $D_{ip}$  zu erkennen und kann als näherungsweise konstant im untersuchten Bereich angesehen werden.

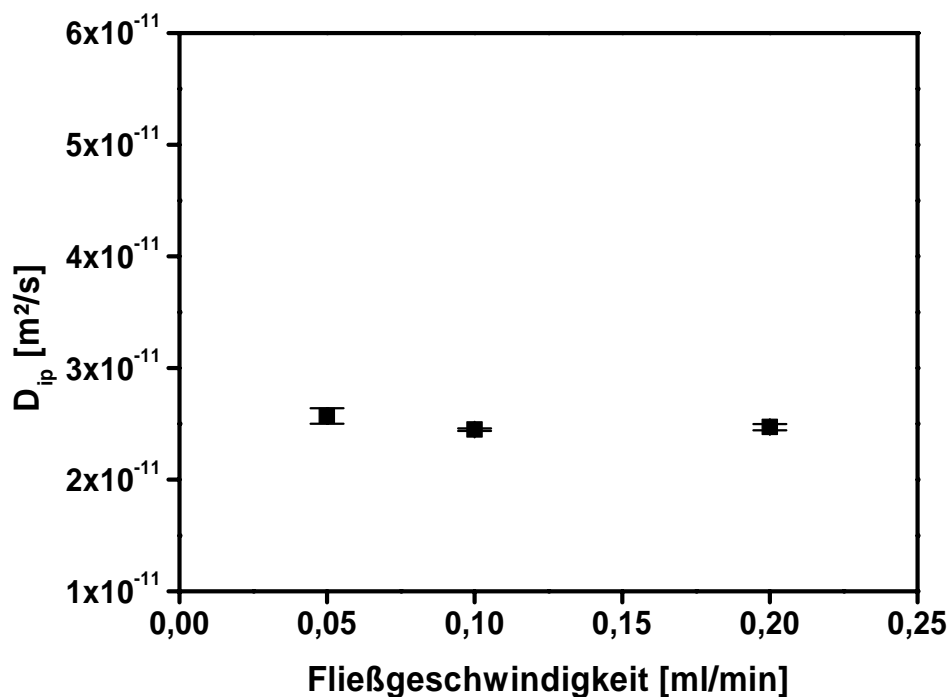


Abbildung 4.3.10. Einfluß der Fließgeschwindigkeit auf den intrapartikulären Diffusionskoeffizienten für BSA auf Sepharose 6 FF bei pH 7.0 und 200 mM NaCl.

#### 4.3.8 Einfluß von adsorbiertem Protein auf den intrapartikulären Diffusionskoeffizienten

Unter typischen Aufreinigungsbedingungen diffundieren Proteine durch poröse Materialien, auf denen schon Proteine gebunden sind. Die adsorbierten Proteine können einen Einfluß auf den diffusiven Transport der Proteine besitzen, weil der Porenradius sich durch das Vorhandensein von adsorbierten Proteinen verkleinert und es zu Protein-Protein Wechselwirkungen mit adsorbiertem Protein kommen kann. Die Messung des  $D_{ip}$ 's mit

adsorbierten Protein benötigt zwei unterschiedliche Proteinspecies: ein Protein, welches unter bestimmten Pufferbedingungen an die Festphase adsorbiert und ein zweites Protein, daß unter den gewählten Pufferbedingungen keine adsorptiven Wechselwirkungen mit der Festphase zeigt. Für diesen Versuch wurde LYS und OVA-Cy5 auf SP Sepharose FF bei einem pH-Wert von 5.0 (Acetat, 50 mM) bzw. 7.0 (Phosphat, 50 mM) verwendet. LYS adsorbiert bei beiden pH-Werten auf den Kationentauscher SP Sepharose FF, wohingegen OVA bei einem pH-Wert über dem pI (4.6) nicht binden sollte (Kopaciewicz *et al.*, 1983). Die Messung von  $D_{ip}$  erfolgt für OVA-Cy5 nach der oben vorgestellten Methode, mit dem Unterschied, daß vorher ein Durchbruch mit einer LYS Lösung auf der gepackten Mikrosäule durchgeführt wurde.

Wie in Abb. 4.3.11 zu sehen, zeigt OVA unter den gewählten Bedingungen ein adsorptives Verhalten, was an der Zeitachse und der Form der intrapartikulären Profile gut zu erkennen ist. Im Gegensatz zu den Diffusionsversuchen, bei denen nach ca. 200 s ein Gleichgewichtszustand innerhalb der Festphase erreicht wird (vgl. Abb. 4.3.2), ist selbst nach 136 min für OVA auf mit LYS gesättigter SP Sepharose FF bei pH 5.0 kein Gleichgewicht mit einem flachem Profil über den Partikelradius erreicht.

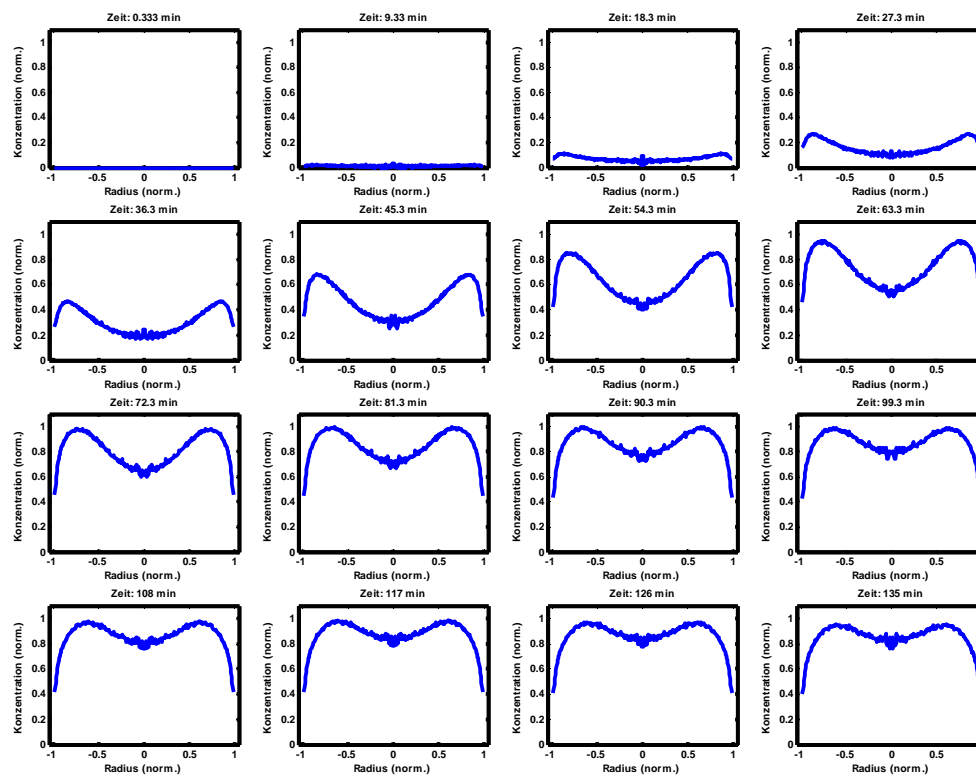


Abbildung 4.3.11. Intrapartikuläre Profile für OVA-Cy5 auf SP Sepharose FF nach Sättigung mit 10 mg/ml LYS bei pH 5.0.



### 4.3.9 Diskussion

#### *Eignung der konfokalen Meßmethode zur Bestimmung von intrapartikulären Diffusionskoeffizienten in chromatographischen Medien*

Die dynamische Methode mittels CLSM zur Bestimmung des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten arbeitet zuverlässig für Proteine >36 kDa. Der Diffusionskoeffizient manifestiert sich in der Krümmung des Profils während der Be- und Entladungsphase. Bei Proteinen <36 kDa ist diese Krümmung, aufgrund des höheren  $D_{ip}$ 's weniger stark ausgeprägt und kann für sehr kleine Moleküle die Form eines konstanten, flachen Profils über den Partikelradius einnehmen, das sich über die Zeit nur in der Konzentration ändert. Unter diesen Umständen würde mit der hier vorgestellten Methode keine vernünftige Parameterbestimmung möglich sein.

#### *Vergleich der experimentellen Daten mit Literaturdaten*

Nachdem in Abb. 4.3.6 die experimentell bestimmten  $D_{ip}$ 's mit Literaturdaten verglichen wurden und die Ergebnisse der CLSM Messung in der Größenordnung und im Verlauf in Abhängigkeit von der Proteingröße gut mit den Literaturdaten übereinstimmen, werden mögliche Gründe für Unterschiede zwischen den Datensätzen diskutiert.

Boyer und Hsu (1992) untersuchten die intrapartikuläre Diffusion von Myoglobin, BLG, OVA, Hexokinase, IgG und Catalase in Sepharose CL-6B bei 4°C mit einem 50 mM Phosphatpuffer bei pH 7.0 mit chromatographischen Pulsexperimenten. Die Daten in Abb. 4.3.6 wurden auf 20°C und um die effektive Porosität korrigiert. Die Daten zeigen eine gute Übereinstimmung für den Verlauf des  $D_{ip}$ 's in Abhängigkeit der Proteingröße, allerdings sind die Werte von Boyer und Hsu niedriger, was evtl. auf Fehler in der Berücksichtigung der Stofftransportvorgänge in der gepackten Säule (Dispersion, Filmdiffusion) oder des chromatographischen Systems (Totvolumina, Dispersion) zurückzuführen ist.

Bosma und Wessenlingh (2000) verwendeten ebenfalls chromatographische Pulsexperimente mit Q Sepharose FF. Die analysierten Proteine sind Cytochrom c, LYS, OVA, BSA und GGB in einem 1 M Acetatpuffer bei pH 4.4. Der konsistent niedrigere  $D_{ip}$  kann durch die Verwendung positiv geladener Partikel (Q Sepharose FF), einem 1 M Acetatpuffer und einem unterschiedlichen pH-Wert verursacht werden. Bosma und Wessenlingh mussten eine hohe Ionenstärke verwenden, um elektrostatische Interaktionen mit dem Anionentauscher zu unterbinden. Die Verwendung von hoher Acetatkonzentration bei pH 4.4 kann zu Änderungen

der Proteinstruktur führen, die wiederum eine Verlangsamung der Diffusion zur Folge haben. In der Arbeit von Doherty und Benedek (1974) wurde zudem eine Verringerung der Diffusivität mit steigender Ionenstärke gefunden. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit einer Erhöhung hydrophober Wechselwirkungen mit Teilen der Agarosegrundmatrix. Eine Änderung der Porengröße durch Anwesenheit der Q Liganden könnten den  $D_{ip}$  ebenfalls senken. Letztlich besteht bei der chromatographischen Methode die Möglichkeit einer systematischen Fehleinschätzung des Einflusses des Stofftransports in der Säule (Dispersion, Filmdiffusion) auf die Messung, sodaß sowohl bei Boyer und Hsu wie auch Bosma und Wessenlingh systematisch niedrigere Meßdaten erhalten wurden.

Gutenwik *et al.* (2004) und Mattisson *et al.* (2000) untersuchten auspolymerisierte Agarose, die z.B. in der Gelelektrophorese Verwendung findet. Für die Untersuchungen wurden LYS und BSA verwendet. Daten bei einem pH-Wert von 5.6 und 0.1 M NaCl wurden für den Vergleich herangezogen. Agarose besitzt aller Wahrscheinlichkeit nach niedrigere Tortuositäten als quervernetzte Agarose, was die höheren  $D_{ip}$ 's erklären kann. Johnson *et al.* (1995) untersuchten negativ geladene SP Sepharose FF mit der FRAP Methode für BSA, OVA und Lactalbumin bei einer Ionenstärke von 1 M und einem pH-Wert von 7.1. Ähnlich wie bei Q Sepharose FF, könnte die Anwesenheit der Sulphopropyliganden eine Änderung des Porenradius gegenüber Sepharose 6 FF bewirken.

Für die Festphase Capto Q sind keine direkten Vergleichsmöglichkeiten in der Literatur verfügbar, allerdings wurde die Senkung der Diffusivität von Proteinen für Agarose-Dextran Komposit Materialien in der Literatur dokumentiert (Kosto *et al.*, 2004) und passt mit der Vorstellung überein, daß die Anwesenheit von Dextranketten im Porenraum zu einer Verlangsamung des diffusiven Transportes führt.

### ***Modellierung und Vergleich mit Verteilungskoeffizient***

Während das Ogstonmodell sowohl für Sepharose 6 FF als auch Capto Q näherungsweise den Verlauf der experimentellen Daten nachvollzieht, ist das Renkinmodell nicht in der Lage, die Daten zufriedenstellend zu beschreiben. Das Renkinmodell geht von einer simplen, geometrischen Überlegung basierend auf einer zylindrischen Pore aus, die insbesondere für das Agarose-Dextran Komposit Material Capto Q keine gute Approximation der Festphaseneigenschaften darstellt.

### ***Einfluß von pH-Wert und Ionenstärke***

In Abb. 4.3.5 sind die reduzierten Diffusionskoeffizienten  $D_{ip}/D_0$  gegen den Proteinradius aufgetragen. Für CTG und LYS auf Sepharose 6 FF weist  $D_{ip}$ , im Vergleich zu den anderen Proteinen, einen zu geringen Wert auf. Wie schon in Kapitel 4.2 zu sehen ist, sind CTG und LYS die einzigen Proteine, die auch dort einen zu niedrigen Verteilungskoeffizienten zeigen. Auch bei der Bestimmung des  $D_{ip}$ 's ist eine attraktive hydrophobe Wechselwirkung von LYS und CTG mit der Agarose sehr wahrscheinlich verantwortlich für die zu niedrigen  $D_{ip}$ 's der beiden Proteine. Für eine hydrophobe Wechselwirkung spricht die Verringerung von  $D_{ip}$  der beiden Proteine mit steigender Ionenstärke.

### ***Einfluß der Proteinkonzentration***

Die Ergebnisse der Versuche zum Einfluß der Proteinkonzentration auf  $D_{ip}$  zeigen keine auffällige Änderung des  $D_{ip}$ 's für BSA und GGB in einem Einzelkomponentensystem und eine Senkung des  $D_{ip}$ 's für CTG in Anwesenheit von GGB.

In der Literatur wurde die Möglichkeit einer Änderung des Diffusionskoeffizienten mit Änderung des Beladungszustandes der Festphase aufgezeigt (Gutenwik *et al.*, 2004). Der Effekt der Verringerung von  $D_{ip}$  ist deutlich für das kleinere Protein CTG (25 kDa) in Anwesenheit des größeren Proteins GGB (160 kDa), wohingegen es in den Einzelkomponentenversuchen mit BSA und GGB zu keiner signifikanten Änderung kommt. Dies könnte durch eine sterische Behinderung von CTG beim Transport durch die poröse Matrix begründet werden, wobei die Behinderung für kleine Proteine in Anwesenheit größerer Makromoleküle stärker ausfällt und z.B. für BSA (66 kDa) und GGB (160 kDa) nicht zu einer Verringerung führt. Ein vergleichbarer Effekt wurde für geladene Polymere in Anwesenheit von höhermolekularen Polymeren gefunden (Cong *et al.*, 2005).

### ***Messung mit adsorbiertem Protein***

Nach Durchbruch von LYS (10 mg/ml) auf SP Sepharose FF bei entweder pH 5.0 (Acetat, 50 mM) oder pH 7.5 (Phosphat, 50 mM) zeigt die Messung des  $D_{ip}$ 's von OVA-Cy5 unter den selben Pufferbedingungen, daß OVA auf SP Sepharose FF adsorbiert und somit keine nicht-bindenden Bedingungen vorliegen.

Das Ziel der Messung war, LYS als inertes Protein einzusetzen, welches bei den gewählten Pufferbedingungen an SP Sepharose FF adsorbiert und, bedingt durch die hohe Proteinkonzentration von 10 mg/ml, zu einer merklichen Änderung der Porengröße führt. Im Anschluß sollte der  $D_{ip}$  von OVA unter den gleichen Pufferbedingungen gemessen werden. Die Adsorption von OVA lässt sich durch die Bindung von OVA an das gebundene LYS erklären: OVA bindet bei pH 5.0 und höher nicht mehr an Kationentauscher, aber adsorbiert an Anionentauscher (Kopaciewicz *et al.*, 1983). LYS besitzt sowohl bei pH 5.0 als auch pH 7.5 positive und negative Ladungen auf der Proteinoberfläche (Carlsson *et al.*, 2004) und könnte somit elektrostatisch mit OVA wechselwirken, was zur Adsorption von OVA führt.

#### **4.4 Verteilung und Diffusion von Proteinen in chromatographischen Festphasen - Größenausschlusschromatographie**

Größenausschlusschromatographie (engl. size exclusion chromatography, SEC) ist ein häufig verwendetes Aufreinigungsverfahren in der Herstellung von Biopharmazeutika. Unter idealen Bedingungen können SEC Trennungen über den Verteilungs- und Diffusionskoeffizienten der beteiligten Substanzen, zusammen mit einem geeigneten Modell für die beteiligten Stofftransportvorgänge in einer gepackten Säule, simuliert werden. Die Simulation von SEC Trennungen stellt eine Vorbereitung für die Beschreibung adsorptiver Trennungen, wie sie in Kapitel 4.5 bis 4.9 beschrieben werden, dar, weil die Stofftransportphänomene in einer gepackten Säule ohne die Adsorption beschrieben werden können. Für die Beschreibung größenausschlusschromatographischer Trennungen wird ein Verfahren zur direkten Messung der Trennung von einem 2-Komponenten Proteinsystem in einer gepackten Säule mittels CLSM vorgestellt und zusammen mit den in Kapitel 4.2 und 4.3 ermittelten Parametern simuliert. Konsequenzen aus der Miniaturisierung der gepackten Säule für die CLSM Messungen werden aufgezeigt und bei der Bewertung der Simulation berücksichtigt.

##### **4.4.1 Trennung von $\alpha$ -Chymotrypsinogen A und $\gamma$ -Globulin auf Superdex 200 prep grade**

Als Beispiel für eine SEC Trennung eines 2-Komponentengemisches wurde CTG und GGB auf Superdex 200 prep grade verwendet. Um eine längere Strecke für die Trennung der Komponenten zur Verfügung zu haben, wurden die Trennungen auf einer Mikrosäule mit einer sichtbaren Säulenlänge von 47 mm durchgeführt.

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen zum Verteilungskoeffizienten (4.2) bzw. Diffusionskoeffizienten (4.3) kann bei der Messung einer SEC Trennung keine Frontalchromatographie verwendet werden, sondern das Injektionsvolumen sollte 1 % des Säulenvolumens für eine analytische Trennung nicht überschreiten (Janson und Ryden, 1998). Dementsprechend ist das maximal zu erwartende Fluoreszenzsignal innerhalb der Säule signifikant niedriger als bei den oben genannten Versuchen und wird durch die Dispersion innerhalb der Säule noch verringert. Die Verwertung der intrapartikulären Profile ist daher schwierig, weil das SNR niedrig ist. Daher werden im Weiteren nur die gemittelten Bulkkonzentrationen an bestimmten Positionen innerhalb der Mikrosäule verwendet.

In Abb. 4.4.1 sind Chromatogramme für die Proteine CTG und GGB an verschiedenen Positionen innerhalb der Mikrosäule, sowie am Säulenende dargestellt.

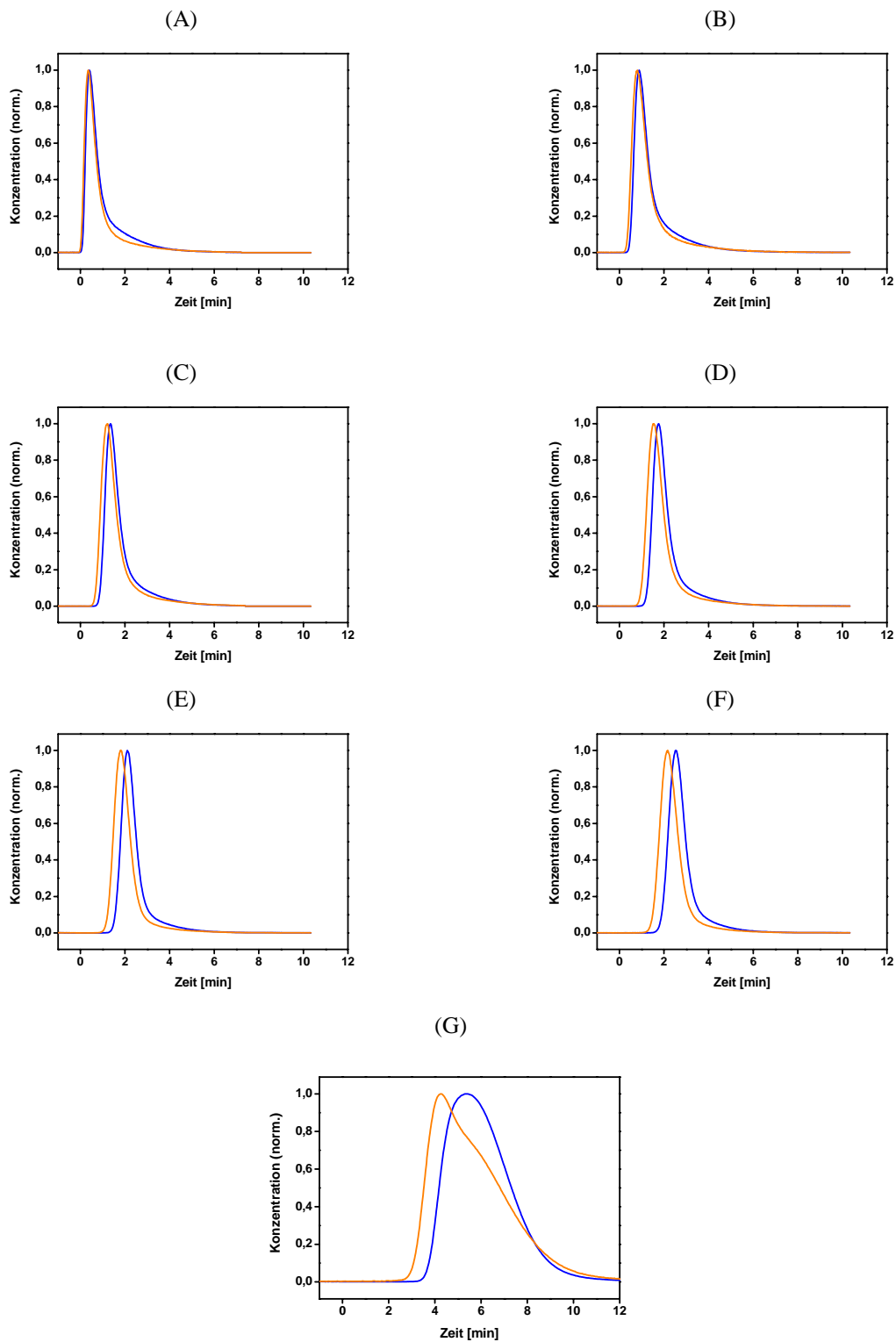
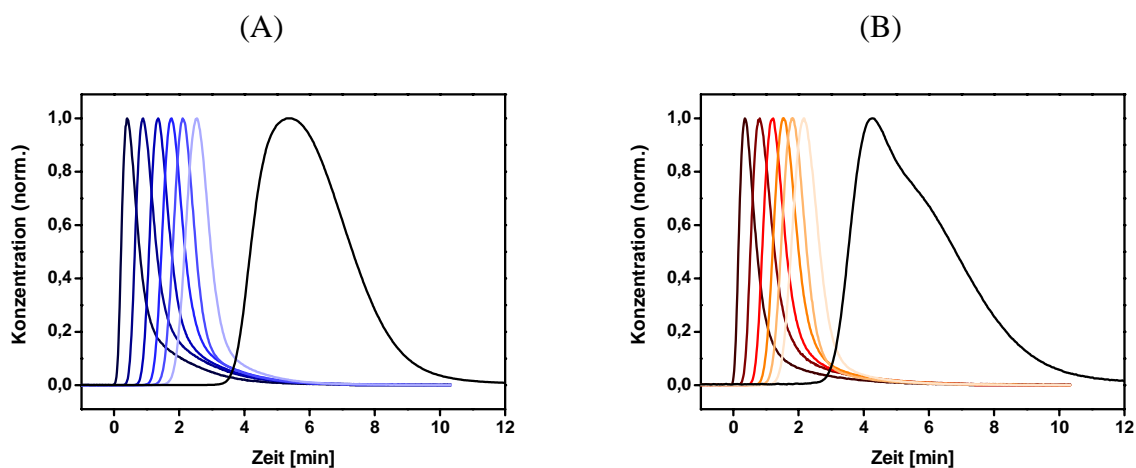


Abbildung 4.4.1. Normierte Chromatogramme für (—) CTG-Cy5 und (—) GGB-Alexa488 auf Superdex 200 prep grade für eine 5  $\mu$ l Injektion bei 0,064 ml/min an verschiedenen Positionen der Mikrosäule (A): sichtbarer Säulenkopf. (B): 9,4 mm. (C): 18,8 mm ( $\Delta$  9,4 mm). (D): 28,2 mm ( $\Delta$  9,4 mm). (E): 36,6 mm ( $\Delta$  8,4 mm). (F): 45 mm ( $\Delta$  8,4 mm). (G): Absorptionsmessung am Säulenende.

Die konfokalen Daten entsprechenden der Bulkkonzentration im extrapartikulären Raum. Eine Trennung der beiden Proteine über die Säulenlänge ist sichtbar. Die Chromatogramme für jedes einzelne Protein werden in Abb. 4.4.2 zusammen in einer Graphik dargestellt. Die einzelnen Chromatogramme innerhalb des gepackten Bettes ähneln sich hinsichtlich der Peakform und –breite. Alle Peaks zeigen ein ausgeprägtes Tailing.



**Abbildung 4.4.2. Vergleich der Chromatogramme für (A) CTG-Cy5 und (B) GGB-Alexa488 auf Superdex 200 prep grade für eine 5  $\mu$ l Injektion bei 0.064 ml/min an verschiedenen Positionen der Mikrosäule entsprechend der Daten aus Abb. 4.4.1.**

In der SEC sind Peaks in der Regel gaussförmig, allerdings lassen sich die hier gemessenen Verläufe nur durch eine exponentiell modifizierte Gaussfunktion (EMG) beschreiben. Die Breite der am Säulenende ermittelten Peaks ist 1.81 (GGB) bzw. 3.25 (CTG) mal größer als die letzten, im gepackten Bett, gemessenen Peaks. Das Chromatogram von GGB am Säulenende zeigt zudem eine Schulter, die innerhalb der Säule nicht zu beobachten ist. Die Auflösung steigt mit zunehmender Wegstrecke an (siehe Abb. 4.4.3), wobei keine Basislinientrennung erreicht wird.

Sowohl das Tailing der Peaks in der gepackten Säule, als auch die unterschiedlichen Peakbreiten und –formen außerhalb der Mikrosäule, im Vergleich zu den Daten innerhalb der Mikrosäule, legen nahe, daß es an den Verbindungsstücken der Mikrosäule mit der HPLC zu verstärkter Dispersion und Rückvermischung kommt, die das starke Tailing und die unterschiedlichen Peakformen innerhalb und außerhalb der Mikrosäule erklären können.

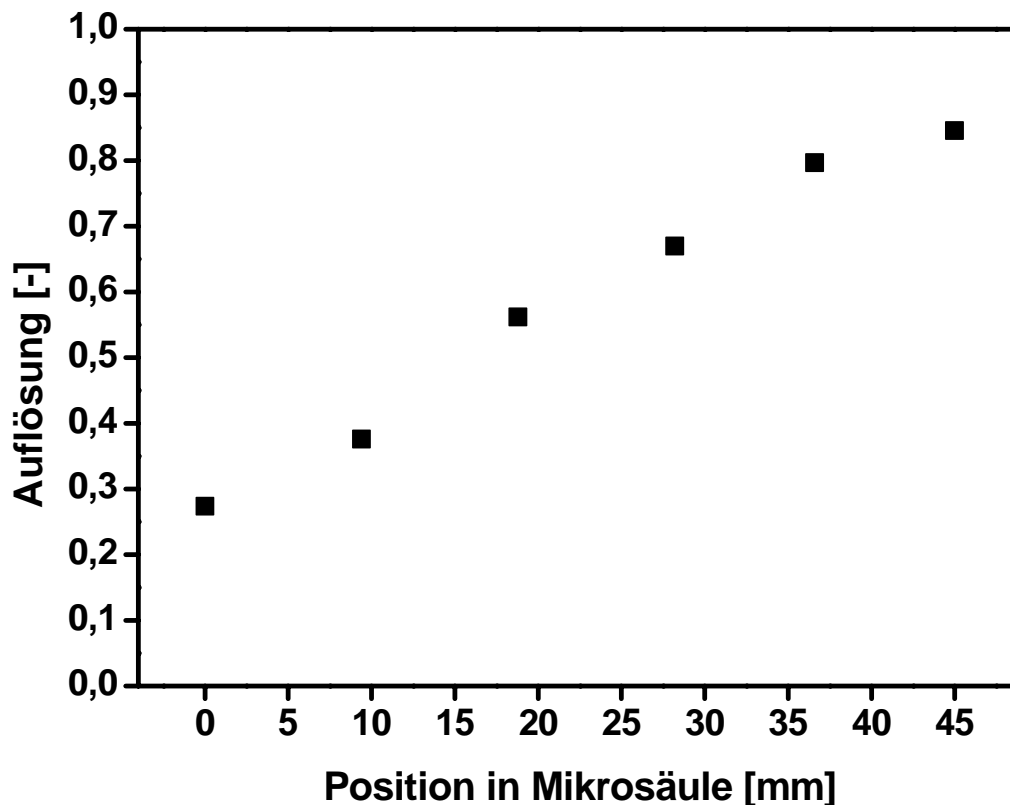


Abbildung 4.4.3. Auflösung zwischen CTG-Cy5 und GGB-Alexa488 auf Superdex 200 prep grade für eine 5  $\mu$ l Injektion bei 0.064 ml/min an verschiedenen Positionen der Mikrosäule.

#### 4.4.2 Simulation der Trennung von $\alpha$ -Chymotrypsinogen A und $\gamma$ -Globulin auf Superdex 200 prep grade

Die Messung der Bulkproteinkonzentration an verschiedenen Positionen innerhalb der Mikrosäule mittels CLSM ist eine geeignete Grundlage für die Simulation größenausschlusschromatographischer Trennungen in einem gepackten Bett. Unter Verwendung der in Kapitel 4.2 und 4.3 gewonnenen Erkenntnisse soll nun die Trennung von CTG und GGB auf Superdex 200 prep grade mit einem GRM simuliert werden, welches die Dispersion, Film- und intrapartikuläre Diffusion, sowie die Porosität implementiert (vgl. Kapitel 2.7.5). Dabei werden folgende Annahmen getroffen:



- die Dispersion vom Injektionspunkt bis zum ersten Meßpunkt in der Säule wird nicht modelliert und die Meßdaten am Säulenkopf werden als Startwerte verwendet
- die Dispersion am Säulenende bis zum Detektor ist so groß, daß keine Modellierung sinnvoll ist
- die Partikel besitzen einen Durchmesser von 34  $\mu\text{m}$
- die Säulenlänge beträgt 46 mm
- die lineare Fließgeschwindigkeit ist  $7 \cdot 10^{-4}$  m/s (entspricht 0.064 ml/min)
- die Diffusionskoeffizienten der beiden Proteine sind konstant und werden aus den Diffusionsversuchen für Sepharose 6 FF entnommen
- für die Partikelporosität werden die experimentellen  $\Phi$  aus Kapitel 4.2 verwendet

Aufgrund der Rückvermischungseinflüsse der Verbindungsstücke der Mikrosäule ist eine Simulation der Proteinmigration vom Injektionspunkt bis zum ersten Meßpunkt in der Mikrosäule, sowie die Strecke zwischen dem Säulenende bis zum DAD Detektor nicht sinnvoll, weil es sich um einen Effekt handelt, der in einer regulären Säule nicht auftreten würde.

Die verwendeten Parameter werden in Tabelle 4.4.1 zusammengefasst. Der Partikelradius, die Säulenlänge und die lineare Fließgeschwindigkeit sind durch die verwendeten Partikel und die Säule vorgegeben. Der Dispersionskoeffizient ist nicht speziell von Proteineigenschaften abhängig, sondern wird bestimmt durch die hydrodynamischen Eigenschaften in der gepackten Säule (Lin und Guiochon, 2003) und wird für beide Proteine gleich gesetzt. Der Filmdiffusionskoeffizient wird für beide Proteine ebenfalls gleichgesetzt, weil es nicht zu erwarten ist, daß die Filmdiffusion einen signifikanten Einfluß auf die Trennung der beiden Proteine besitzt, wie es häufig für chromatographische Trennungen der Fall ist (Lin und Guiochon, 2003; Ladish, 2001).

Die eigentliche Trennung wird maßgeblich durch den Verteilungskoeffizienten bestimmt, der aus den experimentellen Daten für die beiden Proteine für Superdex 200 prep grade aus Kapitel 4.2 entnommen wird. Für  $D_{ip}$  werden als Approximation die in Kapitel 4.3 bestimmten Werte für Sepharose 6 FF verwendet. Obwohl Superdex 200 prep grade ein Agarose-Dextran Komposit Material ist, wurden die  $D_{ip}$ 's von Sepharose 6 FF (Agarosematerial) verwendet, weil im Vergleich der Verteilungskoeffizienten (Kapitel 4.2) Superdex 200 prep grade größere Ähnlichkeit mit Sepharose 6 FF als mit Cpto Q besitzt.

**Tabelle 4.4.1. Übersicht der Parameter für die Simulation der SEC Trennung von CTG und GGB auf Superdex 200 prep grade.**

Parameter	CTG	GGB
Partikelradius	$17 \cdot 10^{-6}$ m	$17 \cdot 10^{-6}$ m
$D_{ip}$	$5.51 \cdot 10^{-11}$ m <sup>2</sup> /s	$1.48 \cdot 10^{-11}$ m <sup>2</sup> /s
Filmdiffusionskoeffizient	$8.5 \cdot 10^{-6}$ m/s	$8.5 \cdot 10^{-6}$ m/s
Säulenlänge	$46 \cdot 10^{-3}$ m	$46 \cdot 10^{-3}$ m
lineare Fließgeschwindigkeit	$7 \cdot 10^{-4}$ m/s	$7 \cdot 10^{-4}$ m/s
Dispersionskoeffizient	$3.5 \cdot 10^{-9}$ m <sup>2</sup> /s	$3.5 \cdot 10^{-9}$ m <sup>2</sup> /s
$\varepsilon_b (\Phi)$	0.543 (0.84)	0.595 (0.68)

Die simulierten Chromatogramme werden in Abb. 4.4.4 mit den experimentellen Daten verglichen.

Mit den in Tabelle 4.4.1 gewählten Parametern ist das Modell in der Lage, die experimentellen Daten ab dem Säulenkopf über die sichtbare Säulenlänge zu simulieren. Lediglich das Peaktailing ist in der Simulation ab der Position 29.2 mm ausgeprägter.

#### 4.4.3 Diskussion

##### *Trennung von $\alpha$ -Chymotrypsinogen A und $\gamma$ -Globulin auf Superdex 200 prep grade*

Mit der Messung der Proteinmigration innerhalb eines gepackten Bettes während einer SEC Trennung eines 2-Komponentensystems steht ein neues System zur Untersuchung von Stofftransportvorgängen in einem gepackten Bett zur Verfügung. Im Gegensatz zu der klassischen Analyse der Absorptionsmessung des Säuleneffluents (Li *et al.*, 1998) oder ähnlichen Ansätzen der Messung innerhalb des gepackten Bettes über NMR (Holland *et al.*, 2004), stellt die hier vorgestellte Methode einen neuen Ansatz dar, die mit hoher örtlicher und zeitlicher Auflösung die Proteinmigration von Multikomponentensystemen in Prozeßchromatographiematerialien messen kann. Zusammen mit den vorangegangenen Messungen des Verteilungskoeffizienten (4.2) und des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten (4.3) kann die Modellierung von SEC Trennungen verfeinert werden, weil Unsicherheiten in der Bestimmung der Extrasäulendispersion (Analyse des Säuleneffluents) oder geringe zeitliche und spatiale Auflösung (NMR Methoden) vermieden werden.

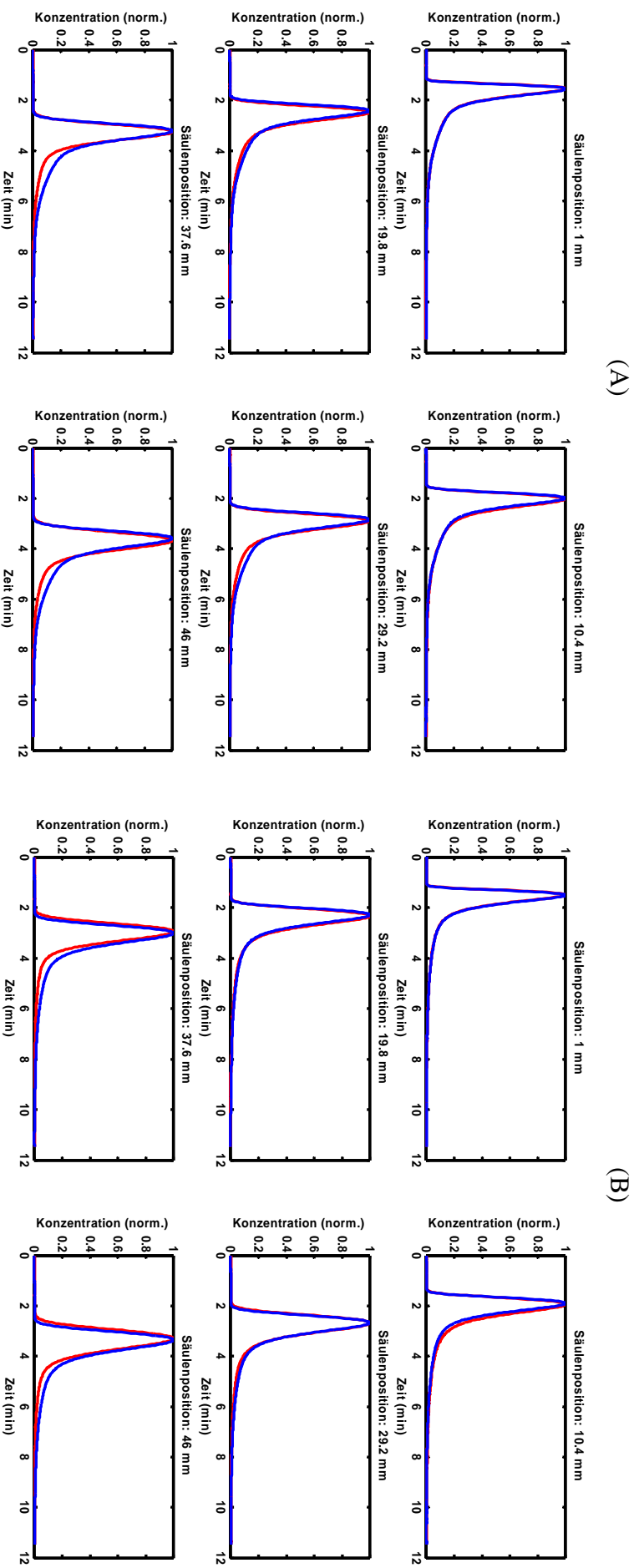


Abbildung 4.4.4. (→) Experimentelle Daten und (←) Simulationen der grüßenauschlusschromatographischen Trennung von CTG und GGB auf Superdex 200 prep grade in der Mikrosäule für (A) CTG und (B) GGB mit Parametern aus Tab. 4.4.1.

Die konfokale Meßmethode bedingt die Verwendung einer Mikrosäule, die auf dem Mikroskopisch plaziert werden kann, und mit einem Deckglas am Boden verschlossen ist, um die hochauflösende Mikroskopie zu ermöglichen. Die Mikrosäule ist eine Eigenanfertigung mit einem Anschluß, der um  $45^\circ$  angewinkelt ist und am Übergang zwischen dem Anschlußbereich und dem mikroskopierbaren Bereich eine Querschnittsänderung des Kanals besitzt (siehe Kapitel 3.3). Zusätzlich besteht bei der Packung der Mikrosäule keine Möglichkeit, daß Bett durch einen Stempel zu stabilisieren und das Volumen zwischen Injektionspunkt und Bettanfang zu minimieren. Zusammengenommen können diese konstruktionsbedingten Gegebenheiten zu einer Rückvermischung der injizierten Probe und einer stärkeren Dispersion führen, wie sie in Abb. 4.4.1 am starken Tailing und am Unterschied zwischen den Chromatogrammen innerhalb und außerhalb der Säule zu erkennen sind. Für SEC Trennungen wirken sich Rückvermischungs- und Dispersionseffekte sehr stark auf die Trennung aus, weil die Trennung der Substanzen nur über das Säulenvolumen verlaufen und es zu keiner Ankonzentrierung der Proteine kommen kann. Dementsprechend ist die Aufenthaltszeit der Proteine innerhalb der Säule in der Größenordnung der Peakverbreiterung durch die oben genannten Effekte. Für die Messung des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten waren die Einflüsse der Mikrosäule auf die Peakform nicht relevant, weil nur die Bulkkonzentration am Partikelrand für die Bestimmung von  $D_{ip}$  benötigt wurde, unabhängig von möglichen Rückvermischungs- oder Dispersionseffekten. In den kommenden Kapiteln wird die Adsorption von Proteinen in Mikrosäulen betrachtet. Obwohl auch bei diesen Experimenten eine stärkere Rückvermischung und Dispersion der Proteine durch die Mikrosäule zu erwarten ist, ist die Aufenthaltszeit der Proteine durch die adsorptiven Wechselwirkungen wesentlich größer als bei einer SEC Trennung, sodaß diese Effekte vernachlässigt werden können.

Trotz der Rückvermischungseffekte ist eine Trennung der beiden Proteine über die Säulenlänge zu beobachten, mit einem Anstieg der Auflösung. Erwartungsgemäß verringert sich der Anstieg der Auflösung mit steigender Säulenlänge, weil die Peakverbreiterung durch die Stofftransportwiderstände zunimmt.

#### ***Simulation der Trennung von $\alpha$ -Chymotrypsinogen A und $\gamma$ -Globulin auf Superdex 200 prep grade***

Die Simulation von SEC Trennungen innerhalb einer gepackten Säule im direkten Vergleich mit experimentell bestimmten Daten aus CLSM Versuchen wurde in der Literatur noch nicht

beschrieben und stellt den ersten Versuch einer detaillierteren Beschreibung der Stofftransportphänomene in der Proteinchromatographie dar.

Die Tatsache, daß die experimentellen Daten mittels unabhängig bestimmter Modellparameter und an unterschiedlichen Positionen innerhalb der Mikrosäule mit dem GRM erfolgreich beschrieben werden kann, ist ein Hinweis auf die Güte der experimentellen Daten und die Qualität des verwendeten GRM's. Trotz Unsicherheiten in der Bestimmung des Dispersions- und Filmdiffusionskoeffizienten sowie der vereinfachten Annahme, daß  $D_{ip}$  für Sepharose 6 FF und Superdex 200 prep grade identisch ist, musste keine Parameteranpassung für die Simulation durchgeführt werden, um zu einer befriedigenden Übereinstimmung der Daten zu gelangen. Unter Umständen ist der Einfluß der Dispersion und des Filmdiffusionskoeffizienten auf die Güte der Anpassung bei dem betrachteten System gering, wie es häufig in der Simulation von chromatographischen Trennungen beschrieben wurde (Guiochon und Lin, 2003; Ladish, 2001). In einer Sensitivitätsanalyse kann der Einfluß der einzelnen Modellparameter auf die Simulation von SEC Trennungen untersucht werden, um die entscheidenden Parameter für die Beschreibung von SEC Trennungen herauszuarbeiten.

## 4.5 Adsorption von nativen Proteinen und Biokonjugaten auf Kationentauschern – SMA Isothermen

Adsorptionsisothermen sind die zentralen Bestandteile jeder Modellierung von chromatographischen Prozessen, weil sie das Gleichgewicht zwischen adsorbiertem und ungebundenem Protein auf einer Festphase beschreiben. Für die Adsorption von Proteinen auf Ionentauschern wurde das SMA Isothermenmodell entwickelt (vgl. Kapitel 2.7.2), welches in der Lage ist, mit drei experimentell bestimmten Parametern, die kompetitive Adsorption von Proteinen über einen weiten Salzkonzentrationsbereich (bei konstantem pH-Wert) zu beschreiben (Brooks und Cramer, 1991). Die charakteristische Ladung  $v$  und die Gleichgewichtskonstante  $K$  werden als lineare Parameter bezeichnet, wohingegen der sterische Faktor  $\sigma$  als nicht-linearer Faktor bei höheren Proteinkonzentrationen an Bedeutung gewinnt. Modellhaft kann  $v$  mit der Anzahl der Ladungen, mit der das Protein mit der Festphase wechselwirkt, gleichgesetzt werden und  $K$  beschreibt die Bindungsaffinität. Der sterische Faktor  $\sigma$  steht für die Ladungen, die das Protein auf der Adsorberfläche abschirmt. Die Kopplung eines Fluoreszenzfarbstoffes an ein Protein kann die Eigenschaften des Proteins signifikant verändern (vgl. Kapitel 2.1.3). Nachdem in Kapitel 4.1 die Unterschiede der Biokonjugate im Vergleich mit den nativen Proteinen unter nicht-bindenden Bedingungen untersucht wurden, wird im Folgenden der Einfluß der Fluoreszenzfarbstoffe während der Adsorption betrachtet. SMA Isothermen für den quantitativen Vergleich und die spätere Modellierung von Durchbruchkurven mit CTG und OVT, sowie deren Atto635, BODIPY und Cy5 Biokonjugate, auf SP Sepharose FF und SP Sepharose XL wurden gemessen. Die Ergebnisse werden hinsichtlich der Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe interpretiert und mögliche Konsequenzen für die Untersuchung von Adsorptionsprozessen mittels CLSM werden genannt.

### 4.5.1 SMA Parameterbestimmung

Die linearen SMA Parameter werden durch analytische Ionenaustauschchromatographie mit Gradientenelutionen von 30, 60, 120, 180 und 240 Säulenvolumen (engl. column volume, cv) ermittelt, bei einer Probeninjektion von 10  $\mu$ l und einer Proteinkonzentration von  $\sim 0.03$  mM. Zusätzlich können durch die Elutionsversuche Affinitätsunterschiede zwischen nativem Protein und den jeweiligen Biokonjugaten anschaulich dargestellt werden und das Auftreten von multiplen Produkten innerhalb der Biokonjugatfraktion überprüft werden.

Ausgehend von den Ergebnissen der linearen SMA Parameterbestimmung wird der sterische Faktor  $\sigma$  mittels Durchbruchskurve ermittelt, welche mit nativen Protein aufgenommen wurde. Für den sterischen Faktor wird angenommen, daß sich  $\sigma$  des nativen Proteins nicht vom sterischen Faktor des Biokonjugates unterscheidet.

In Abb. 4.5.1 sind Chromatogramme von CTG und OVT auf SP Sepharose FF und XL, die mit einem linearen Gradienten über 30 cv (Phosphat, Salzkonzentration von 50 mM bis 525 mM, pH 7.0 für CTG bzw. pH 6.0 für OVT, 153 cm/h) eluiert wurden, sowohl für die nativen Proteine (schwarz), als auch für das Atto635 (rot), BODIPY (grün) und Cy5 (blau) Biokonjugat dargestellt. Im Falle von OVT wurde die Adsorption bei einer Salzkonzentration von 20 mM (SP Sepharose FF) bzw. 10 mM (SP Sepharose XL) durchgeführt, weil bei 50 mM die Adsorption zu gering war und die Probe frühzeitig isokratisch eluierte (Daten nicht gezeigt). Die weiteren Chromatogramme der Gradienten sind im Anhang (Abb. 7.12-7.15) zu finden. Weil die Proteine generell früh eluieren, wurden die Gradienten nach der Hälfte der angestrebten Salzkonzentration abgebrochen, bei Beibehaltung der jeweiligen Gradientensteilheit.

Die Peaks der nativen Proteine sind näherungsweise gaussförmig mit Ausnahme von OVT auf SP Sepharose XL, welche ein ausgeprägtes Tailing aufweisen. Die Retentionszeit sinkt in der Reihenfolge CTG(SP Sepharose FF) > CTG(SP Sepharose XL) > OVT(SP Sepharose FF) > OVT(SP Sepharose XL).

Bei CTG-Atto635 ist auf beiden Festphasen eine weitere Komponente sichtbar, die früher als das native Protein eluiert. Der Hauptpeak eluiert später als das native Protein. Für CTG-Atto635 auf SP Sepharose XL und OVT-Atto635 auf beiden Festphasen ist ein stärkeres Tailing des Biokonjugates erkennbar. Im Falle von OVT-Atto635 auf SP Sepharose FF deutet eine Schulter auf eine nicht vollständig aufgelöste, zweite Komponente hin, die später als der Hauptpeak eluiert.

Die BODIPY Biokonjugate zeigen generell eine geringere Retentionszeit als das native Protein für alle Proteine und Festphasenkombinationen. Bei CTG-BODIPY ist eine zweite Komponente auf SP Sepharose FF zu erkennen, die früher eluiert als der Hauptpeak des Biokonjugates.

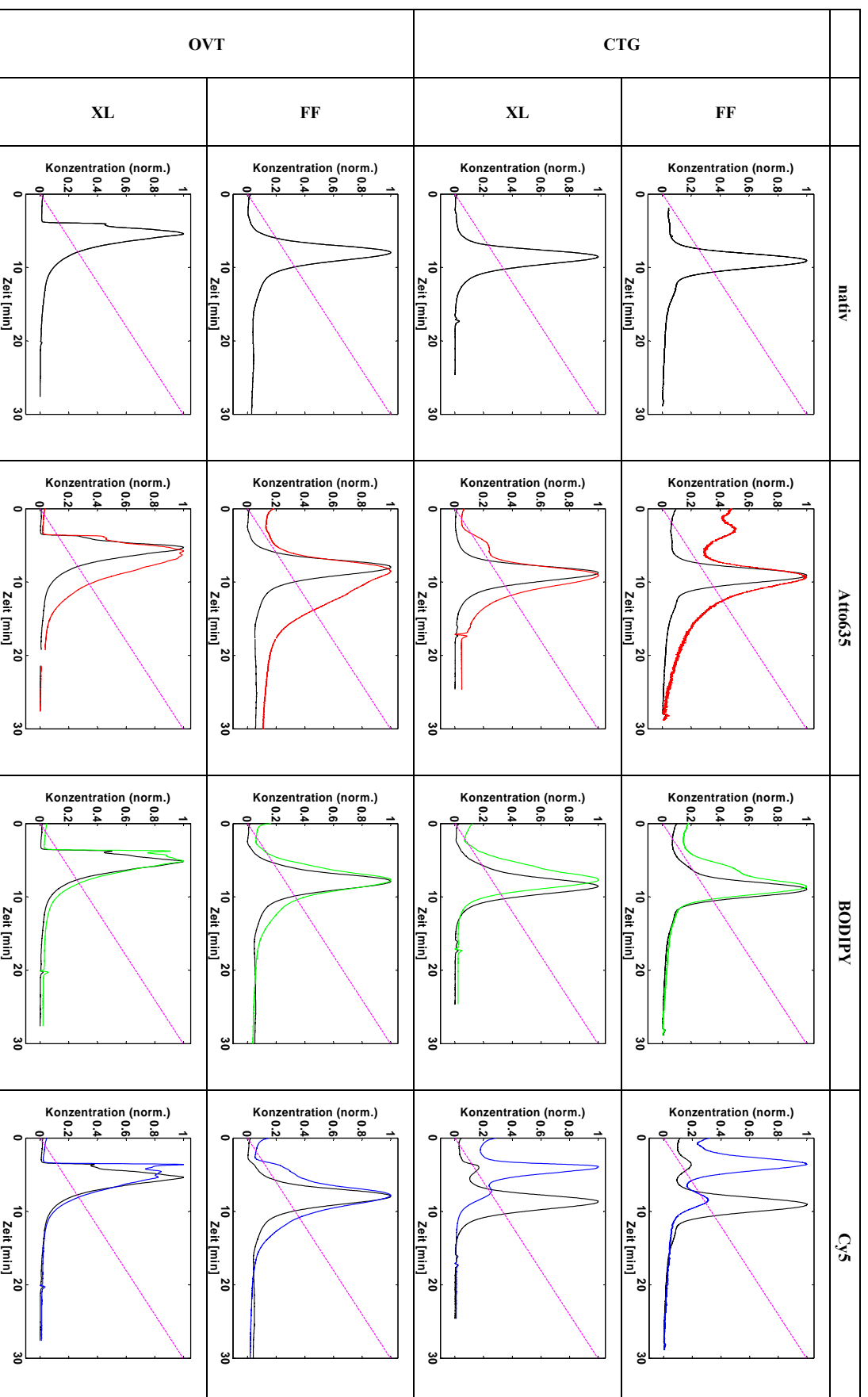


Abbildung 4.5.1. Chromatogramme der Gradientenelution (30 cv, 153 cm/h) von nativem Protein oder Biokonzugat. (—) natives Protein bei 280 nm korrigiert um Absorption des Farbstoffes. (—) Atto635 bei 635 nm. (—) BODIPY bei 504 nm. (—) Cys bei 654 nm. CTG bei pH 7.0 (Phosphat, 50 mM) und OVT bei pH 6.0 (Phosphat; 20 mM; SP Sepharose FF; 10 mM; SP Sepharose XL). (—) Gradient von 0 bis 25 % Hochsalzpuffer (entspricht Gradient in cv bis 50 % Hochsalzpuffer).



Für CTG-Cy5 sind zwei Komponenten auf beiden Festphasen deutlich sichtbar. Die Hauptkomponente eluiert früher als das native Protein, wohingegen die zweite Komponente ungefähr in der ersten Hälfte des nativen Proteinpeaks eluiert. Für OVT-Cy5 auf SP Sepharose FF deuten sowohl Schulter als auch Tailing auf mehrere Komponenten hin, die jedoch nicht aufgelöst werden können. Die Hauptkomponente von OVT-Cy5 hat eine vergleichbare aber kleinere Retentionszeit, wie das native Protein. Für OVT-Cy5 auf SP Sepharose XL ist keine zweite Komponente zu erkennen und das Biokonjugat besitzt eine kleinere Retentionszeit wie die native Komponente, mit einem vergleichbaren Tailing.

Zusammenfassend besitzen alle Biokonjugate unter linearen Bedingungen ein unterschiedliches Retentionsverhalten im Vergleich mit dem nativen Protein. Mit Ausnahme von CTG-Cy5 auf SP Sepharose FF und XL ähnelt das Retentionsverhalten dem der nativen Komponente mit jeweils mehr oder weniger ausgeprägten Schultern und/oder Tailing. In Tabelle 4.5.1 sind die Abweichungen der Retentionszeit der quantifizierbaren Biokonjugatpeaks vom nativen Protein, für die in Abb. 4.5.1 aufgeführten Chromatogramme, dargestellt.

**Tabelle 4.5.1. Prozentuale Abweichung der Retentionszeit der Biokonjugate von der Retentionszeit vom nativen Protein für experimentelle Ergebnisse aus Abb. 4.5.1.**

Festphase	Protein	Abweichung vom nativen Protein [%]
SP Sepharose FF	CTG-Atto635	2.43
	CTG-BODIPY	-5.72
	CTG-Cy5 <sup>1</sup>	-62.90
	CTG-Cy5 <sup>2</sup>	-8.76
SP Sepharose XL	CTG-Atto635	7.15
	CTG-BODIPY	-11.30
	CTG-Cy5 <sup>1</sup>	-56.26
	CTG-Cy5 <sup>2</sup>	-15.33
SP Sepharose FF	OVT-Atto635	7.69
	OVT-BODIPY	-3.21
	OVT-Cy5	-2.22
SP Sepharose XL	OVT-Atto635	6.94
	OVT-BODIPY	-5.90
	OVT-Cy5	-17.04

(1) Erster aufgelöster Peak. (2) Zweiter aufgelöster Peak.

Die Abweichungen von 62.9 bzw. 56.3 % für die früher eluierende Komponente von CTG-Cy5 auf SP Sepharose FF bzw. XL sind fast 10-mal größer als alle anderen Abweichungen. Mit Ausnahme von CTG-Cy5 (SP Sepharose XL) und OVT-Cy5 (SP Sepharose XL) ist die prozentuale Abweichung aller Biokonjugatpeaks unter 10% im Vergleich zum jeweiligen nativen Protein. Atto635 Biokonjugate besitzen als Einzige eine positive Abweichung, wohingegen die BODIPY und Cy5 Konjugate früher, als das native Protein eluieren.

In Abb. 4.5.2 sind die Durchbruchskurven für die nativen Proteine auf den jeweiligen Festphasen dargestellt, die zur Bestimmung des sterischen Faktors benötigt werden.

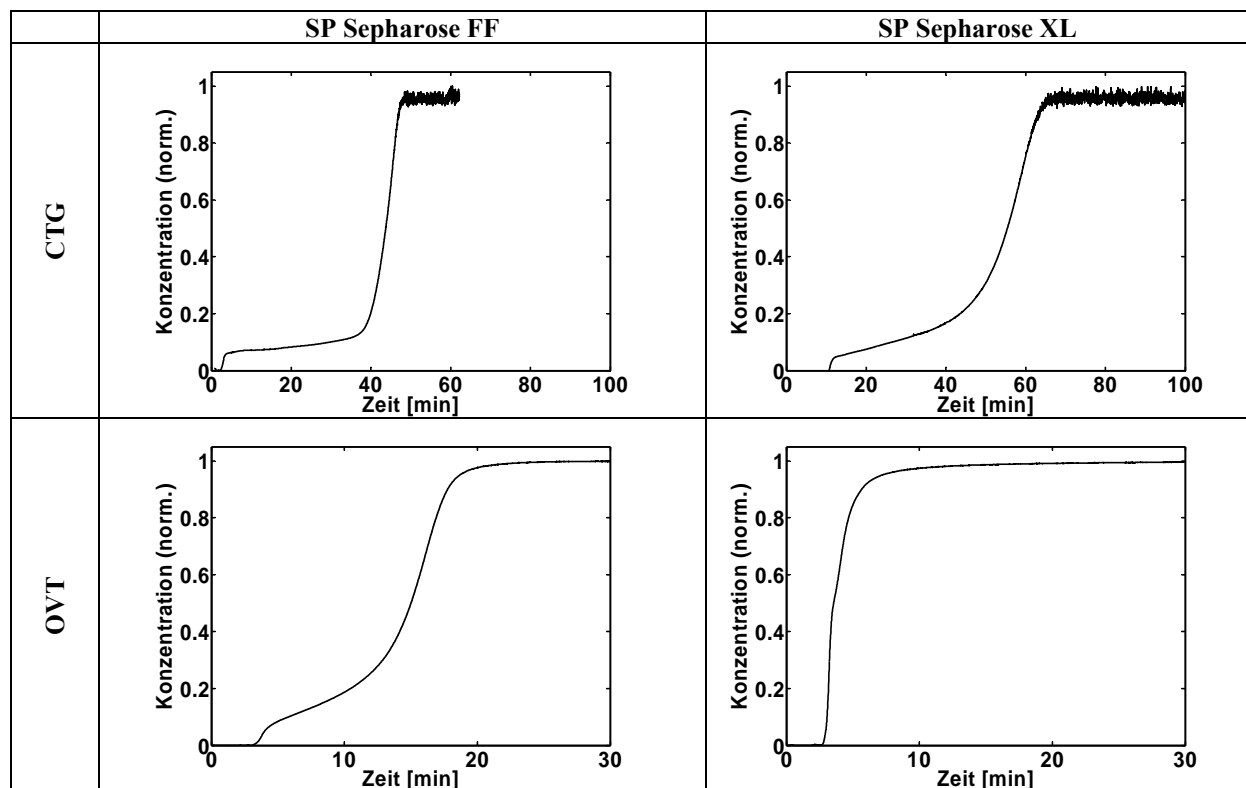


Abbildung 4.5.2. Durchbruchskurven für die Bestimmung des sterischen Faktors. Chromatogramm normiert auf maximales Signal bei 280 nm. Durchbruch bei 76 cm/h. Proteinkonzentration 0.2 mM für CTG und 0.12 mM für OVT. Salzkonzentration 50 mM für CTG, 20 mM für OVT auf SP Sepharose FF und 10 mM für OVT auf SP Sepharose XL.

Die Reihenfolge der Durchbruchzeiten bei 10 % der Ausgangsproteinkonzentration ist CTG(SP Sepharose FF: 9.55 ml) > CTG(SP Sepharose XL: 9.32 ml) > OVT(SP Sepharose FF 2.51 ml) > OVT(SP Sepharose XL 0.76 ml). Die Steilheit der Durchbruchskurve nimmt in der gleichen Reihenfolge ab, wobei OVT auf SP Sepharose XL eine sehr geringe Kapazität besitzt und nahezu sofort nach Start der Beladung am Säulenende detektiert wird.

Mit Ausnahme von OVT auf SP Sepharose XL zeigen alle Proteine einen vorzeitigen Durchbruch, der durch eine nicht-bindende Komponente in den nativen Proteinlösungen hervorgerufen wird und das Durchbruchssignal der nativen Proteine überlagert. Das Vorhandensein nicht-bindender Komponenten bei den nativen Proteinlösungen ist bei den Gradientenexperimenten sichtbar, wenn die Waschphase nach Probeninjektion mit dargestellt wird (siehe Abb. Anhang 7.11).

### 4.5.2 SMA Isothermenparameter

Ausgehend von den Elutionsexperimenten im linearen Gradienten unterschiedlicher Länge (siehe Abb. 4.5.1), wurden die linearen SMA Parameter  $v$  und  $K$  der, in allen Gradientenexperimenten, quantifizierbaren Peaks bestimmt. Es wird davon ausgegangen, daß sich unter linearen Bedingungen die Biokonjugate und das native Protein unabhängig voneinander bewegen. Die Bestimmung erfolgt durch Anpassung der Retentionszeiten der fünf Gradientenexperimente, korrigiert um das Totvolumen und die Gradientenverzögerung, an die in Kapitel 2.7.3 vorgestellte Gleichung 2-29. Für die Anpassung werden Säulenparameter benötigt, die mit den in Kapitel 3.2.4 vorgestellten Methoden bestimmt wurden und in Tab. 4.5.2 für die jeweiligen Festphasen dargestellt sind.

**Tabelle 4.5.2. Säulenparameter für die SMA Parameterbestimmungen.**

Säule	Festphase	Porosität	$\Lambda$ [mM]	Totvolumen [ml]	Gradientenverzögerung [ml]
Tricorn 5/20	SP Sepharose FF	0.821	584	0.0654	0.29
Tricorn 5/50	SP Sepharose FF	0.773	518	0.0654	0.29
Tricorn 5/20	SP Sepharose XL	0.615	571	0.0654	0.29
Tricorn 5/50	SP Sepharose XL	0.539	331	0.0654	0.29

Die Anpassung ist graphisch für das native CTG auf SP Sepharose FF in Abb. 4.5.3 dargestellt. Die Retentionszeiten können sehr gut über das SMA Modell beschrieben werden. Die vollständigen graphischen Darstellungen aller Anpassungen sind im Anhang (Abb. 7.16-7.32) zu finden.

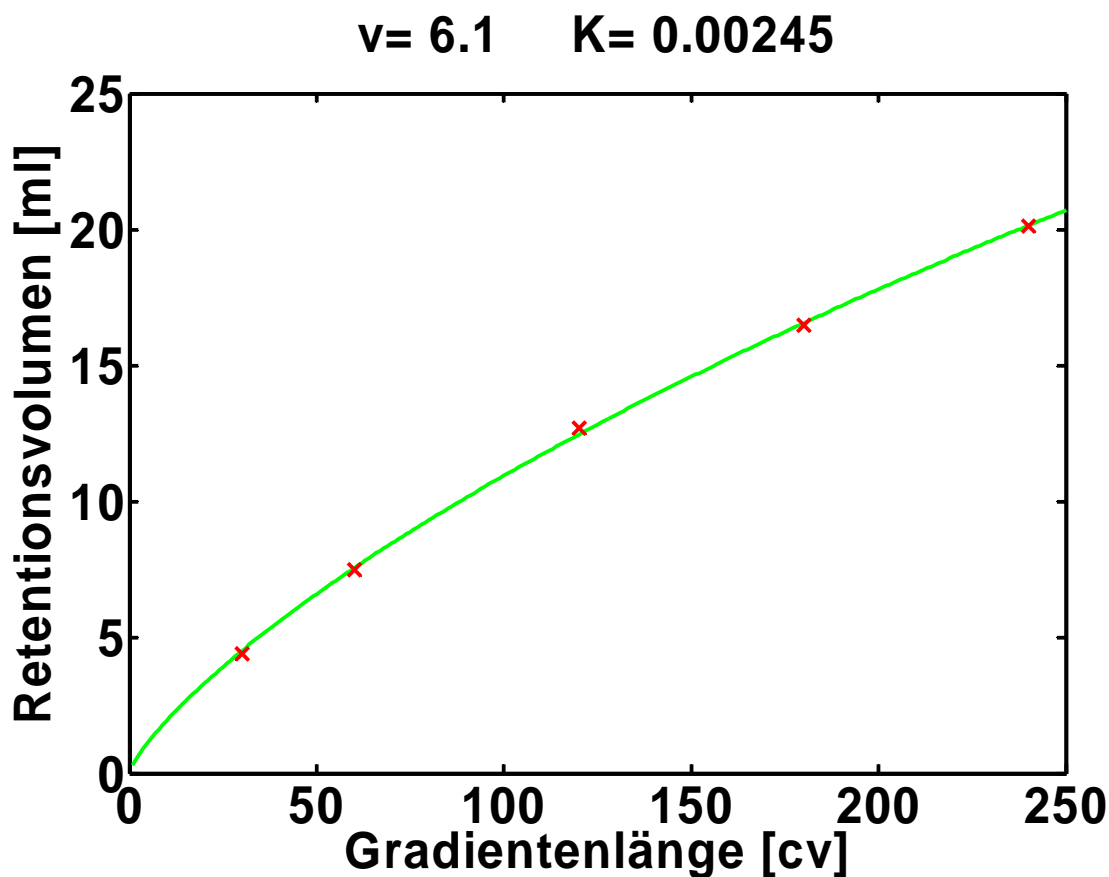


Abbildung 4.5.3. Auftragung des Retentionsvolumens gegen Gradientenlänge für CTG auf SP Sepharose FF (pH 7.0). (x) experimentelle Daten. (—) Anpassung an SMA Modell.

Mit den angepassten linearen Parametern wird der sterische Faktor  $\sigma$  unter Verwendung von Gleichung 2-30 und 2-31 für das native Protein berechnet. In Tabelle 4.5.3 sind die angepassten SMA Parameter der nativen Proteine und deren Biokonjugate für die verschiedenen Festphasen angegeben.

Tabelle 4.5.3. SMA Parameter für native Proteine und Atto635, BODIPY bzw. Cy5 Konjugate.

Festphase	Protein	v	K	$\sigma$
SP Sepharose FF	CTG	6.1	$2.45 \cdot 10^{-3}$	3.53
	CTG-Atto635	5.9	$3.37 \cdot 10^{-3}$	3.53
	CTG-BODIPY	6.6	$7.64 \cdot 10^{-4}$	3.53
	CTG-Cy5 <sup>1</sup>	7.0	$1.51 \cdot 10^{-5}$	3.53
	CTG-Cy5 <sup>2</sup>	6.8	$4.86 \cdot 10^{-4}$	3.53
SP Sepharose XL	CTG	5.2	$1.08 \cdot 10^{-1}$	35.9
	CTG-Atto635	5.0	$1.75 \cdot 10^{-1}$	35.9
	CTG-BODIPY	5.3	$5.42 \cdot 10^{-2}$	35.9
	CTG-Cy5 <sup>1</sup>	6.4	$1.09 \cdot 10^{-3}$	35.9
	CTG-Cy5 <sup>2</sup>	5.5	$3.40 \cdot 10^{-2}$	35.9
SP Sepharose FF	OVT	3.9	$1.38 \cdot 10^{-2}$	102
	OVT-Atto635	3.5	$3.79 \cdot 10^{-2}$	102
	OVT-BODIPY	3.7	$2.01 \cdot 10^{-2}$	102
	OVT-Cy5	3.7	$2.16 \cdot 10^{-2}$	102
SP Sepharose XL	OVT	6.1	$2.65 \cdot 10^{-5}$	1418
	OVT-Atto635	3.1	$5.91 \cdot 10^{-2}$	1418
	OVT-BODIPY	5.8	$2.97 \cdot 10^{-5}$	1418
	OVT-Cy5	5.4	$3.90 \cdot 10^{-5}$	1418

(1) Erster aufgelöster Peak. (2) Zweiter aufgelöster Peak (siehe Abb. 4.5.1).

Der größte Unterschied zwischen den Proteinen und Festphasen ist beim sterischen Faktor zu erkennen, der speziell für OVT auf SP Sepharose XL sehr hoch ist und durch die geringe Kapazität des Proteins unter den gewählten experimentellen Bedingungen zu erklären ist.

Die Unterschiede im Retentionsverhalten (vgl. Abb. 4.5.1) manifestieren sich tendenziell in der Gleichgewichtskonstanten  $K$ : im Vergleich zum nativen CTG ( $2.45 \cdot 10^{-3}$ ) zeigt das später eluierende CTG-Atto635 ein höheres  $K$  ( $3.37 \cdot 10^{-3}$ ) und die früher eluierenden CTG-BODIPY ( $7.64 \cdot 10^{-4}$ ) und CTG-Cy5 ( $4.86 \cdot 10^{-4}$ ) Komponenten ein entsprechend niedrigeres  $K$ . Die früher eluierende CTG-Cy5 Komponente besitzt ein deutlich niedrigeres  $K$  ( $1.51 \cdot 10^{-5}$ ).

### 4.5.3 Diskussion

#### *Affinitätsunterschiede der nativen Proteine auf den verschiedenen Festphasen*

Die Elution der (nativen) Proteine auf den verschiedenen Festphasen zeigen Unterschiede in der Affinität zu der jeweiligen Festphase, die sich mit dem Nettoladungskonzept und der Proteingröße erklären lassen: CTG (25 kDa) mit einem pI von 9.1 wurde bei einem pH-Wert von 7.0 untersucht, wohingegen OVT (76 kDa) mit einem pI von 6.8 bei einem pH-Wert von 6.0 adsorbiert wurde. D.h. der Unterschied zwischen dem pI und dem verwendeten pH von CTG ist mit 2.1 höher als von OVT mit 0.8, was die höhere Retentionszeit von CTG gegenüber OVT erklären kann. OVT ist ca. 3-mal so groß wie CTG, sodaß OVT aus sterischen Gründen ebenfalls eine niedrigere Kapazität als CTG besitzen sollte. Durch Vergleich der intrapartikulären Diffusionskoeffizienten von CTG und OVT aus Kapitel 4.3 für Sepharose 6 FF (entspricht SP Sepharose FF) und Cpto Q (entspricht SP Sepharose XL) kann die flachere Durchbruchskurve von CTG auf SP Sepharose XL ( $1.49 \cdot 10^{-11}$  m<sup>2</sup>/s) im Vergleich mit SP Sepharose FF ( $5.51 \cdot 10^{-11}$  m<sup>2</sup>/s) und von CTG im Vergleich mit OVT ( $2.18 \cdot 10^{-11}$  m<sup>2</sup>/s) auf SP Sepharose FF erklärt werden: ein niedrigerer  $D_{ip}$  deutet auf ungünstigere Stofftransportvorgänge hin. Die Unterschiede im Durchbruchverhalten der Proteine wird ausführlich in Kapitel 4.6 behandelt.

Für beide Proteine ist die Affinität und Kapazität auf SP Sepharose XL niedriger, als im Vergleich mit SP Sepharose FF. Da die Grundmatrix, die Partikelgröße und der SP Ligand bei beiden Festphasen identisch ist, müssen andere Parameter für die beobachteten Unterschiede zwischen SP Sepharose FF und XL für CTG und OVT verantwortlich sein. Die Porosität von SP Sepharose XL ist ca. 1.9-fach und die totale ionische Kapazität ca. 1.2-fach niedriger als für SP Sepharose FF (vgl. Tabelle 4.5.2). Der Porenradius (nach dem Renkinmodell, vgl. Kapitel 4.2) für SP Sepharose XL ist mit 7.8 nm 2.1-fach kleiner als für SP Sepharose (16.5

nm). Dadurch wäre die Adsorption der beiden Proteine unter rein sterischen Gesichtspunkten auf SP Sepharose XL benachteiligt gegenüber der Situation auf SP Sepharose FF. Dieser Effekt wirkt sich stärker bei OVT als bei CTG aus, weil OVT ca. 3-mal größer ist als CTG.

In der Literatur wurde ein positiver Effekt der verankerten Dextransketten im Porenraum der Sepharose FF durch verbesserte Ladungszugänglichkeit der SP Liganden durch das flexible Dextran postuliert (Thömmes, 1999). Neben der besseren Ladungszugänglichkeit sollen die Dextransketten unter bestimmten Bedingungen (pH, Ionenstärke) eine gelartige Phase bilden, in dem Proteine nicht nur auf einer Oberfläche, sondern in einem dreidimensionalen Raum adsorbieren können. Damit wäre die Kapazität höher als für eine Oberfläche. Direkte Vergleiche von XL und FF Medien zeigen allerdings ein uneinheitliches Bild bezüglich der Kapazität (Hubbuch *et al.*, 2003). Die XL Medien besitzen nicht immer eine höhere Kapazität als die FF Medien unter vergleichbaren Bedingungen, was darauf schließen lässt, daß die postulierte verbesserte Ladungszugänglichkeit durch verankerte Dextransketten nicht immer realisiert werden kann, oder andere Gründe für eine höhere Kapazität von XL Medien verantwortlich sind.

Die Identität der nicht-bindenden Komponenten bei CTG und OVT ist nicht bekannt, aber es könnte sich um Verunreinigungen (Abbauprodukte) in den Proteinlösungen handeln, die auch in den Validierungsstudien (vgl. Kapitel 4.1) in den Chromatogrammen auf Superose 12 zu erkennen sind.

Für eine detaillierte Analyse der Stofftransportvorgänge mittels CLSM würden solche nichtbindenden Verunreinigungen eine untergeordnete Rolle spielen, weil sie nicht auf der Festphase ankonzentriert werden und im Totvolumen der Säule erscheinen.

### ***Affinitätsunterschiede zwischen nativen Proteinen und Biokonjugaten***

Im Anschluß an die Diskussion der Unterschiede in der Adsorption der nativen Proteine auf den beiden Festphasen werden im Folgenden die Unterschiede zwischen den Biokonjugaten und den jeweiligen nativen Proteinen diskutiert.

Im Allgemeinen ist die Affinität eines Proteins zu einem bestimmten Ionentauscher abhängig von der Ladungsverteilung und –zugänglichkeit auf der Proteinoberfläche (Yamamoto, 1988; Kopaciewicz *et al.*, 1983). Die Ladungsverteilung wird durch den pH-Wert, aufgrund der amphoteren Eigenschaften der Aminosäureseitenketten der Proteine, beeinflusst (Tanford, 1961). Selbst geringfügige Unterschiede in der Proteinstruktur, wie z.B. der Austausch einer Aminosäure oder der Modifizierung von einzelnen Aminosäuren, kann zu meßbaren

Unterschieden in der Retention auf Ionentauschern führen (Brautigan, *et al.*, 1978; van der Veen *et al.*, 2004; Drager und Regnier, 1987; Chicz und Regnier, 1989; Chicz und Regnier, 1988; Fausnaugh-Pollitt *et al.*, 1988). Die Ergebnisse der Elutionsstudien bzw. der SMA Parameter verdeutlichen die quantitativen Unterschiede im Adsorptionsverhalten von Biokonjugat und nativem Protein. Mit Ausnahme der schwächer bindenden CTG-Cy5 Komponente ähneln sich natives Protein und Biokonjugat sehr, besitzen aber trotzdem ein unterschiedliches Retentionsverhalten. Neben CTG und OVT wurden vergleichbare Phänomene auch für LYS und  $\alpha$ -Lactalbumin gefunden (Teske *et al.*, 2005).

Die Ergebnisse können qualitativ über das Nettoladungskonzept interpretiert werden: die Fluoreszenzfarbstoffe reagieren mit dem N-Terminus und Lysin. Unter den gewählten Adsorptionsbedingungen würden diese Seitenketten eine positive Ladung besitzen. Für den Atto635 Farbstoff wird eine positive Ladung, die eine pH-Wert Abhängigkeit besitzt, durch eine positive Ladung ersetzt. Die Nettoladung des Proteins würde daher konstant bleiben, aber es besteht die Möglichkeit der Änderung der Ladungszugänglichkeit. Für den neutralen Farbstoff BODIPY verringert sich die Nettoladung des Proteins um eins und für den negativ geladenen Farbstoff Cy5 um zwei. Obwohl die Reaktionsbedingungen der Biokonjugation so gewählt wurden, daß ein monosubstituiertes Produkt bevorzugt erhalten wird (DOL zwischen 0.2 und 0.24), ist das Auftreten von mehrfach substituierten Biokonjugaten möglich. Zudem kann der Reaktivfarbstoff an unterschiedlichen Stellen an das Protein binden (Krull *et al.*, 1997). Die beobachteten Zusatzpeaks für CTG-Cy5 und OVT-Cy5 können durch mehrfach substituierte Biokonjugate oder monosubstituierte Produkte mit einer unterschiedlichen Ladungszugänglichkeit erklärt werden. Die zusätzlichen Peaks der Atto635 Biokonjugate lassen sich nicht über das SMA Modell beschreiben und verhalten sich wie schwach retadierte Moleküle, die Kontaminaten in der CTG Präparation oder Abbauprodukten von CTG entsprechen können.

Es besteht zudem die Möglichkeit, daß weitere Biokonjugatprodukte vorhanden sind, die unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht aufgelöst werden können.

Bezogen auf die Analyse der Stofftransportvorgänge während einer Durchbruchskurve mittels CLSM ist zu erwarten, daß es für die BODIPY und Cy5 Konjugate zu Verdrängungsvorgängen kommen kann, da ihre Affinität niedriger ist, als die native Komponente, wohingegen die Atto635 Konjugate keinen solchen Effekt zeigen sollten. Insbesondere unter den Bedingungen der konfokalen Messung, wo ein D/P von 0.01 eingesetzt wird, also nur 1 von 100 Proteinen ein Biokonjugat ist, sind Verdrängungsvorgänge für BODIPY und Cy5 Konjugate sehr wahrscheinlich.

### ***SMA Isothermenparameter***

Die ermittelten SMA Parameter sind die Grundlage für die spätere Modellierung der intrapartikulären Profile unter kompetitiven Bedingungen (vgl. Kapitel 4.8). Die Wahl der SMA Isotherme als Modell für die Beschreibung der Adsorption wird in dem vorliegenden Fall bevorzugt, weil sie die kompetitive Adsorption von Mehrkomponentensystemen in der Ionenaustauschchromatographie beschreiben kann ohne das Modell zu modifizieren und ein SMA Datensatz über einen Salzkonzentrationsbereich gültig ist. Im Vergleich mit dem Langmuirmodell bzw. erweiterten Formen, die kompetitive Adsorption beinhalten, ist das SMA Modell überlegen, weil es die Salzkonzentration als Parameter besitzt und somit Adsorptionsisothermenbestimmungen für jede Salzkonzentration überflüssig macht. Unter nicht-linearen Bedingungen, wie sie während einer Durchbruchkurve vorliegen, kann das SMA Modell zudem induzierte Salzgradienten beschreiben (Brooks und Cramer, 1991; Gallant, 2004), die einen Einfluß auf die Form der intrapartikulären Profile besitzen können. Es ist eine gute Anpassung für alle Datensätze möglich, bis auf OVT für SP Sepharose XL, wo die Retentionszeiten für Gradientenlängen von 120 und 180 cv auffällig unterschiedlich von den restlichen drei Datensätzen sind. Zusätzlich besitzen die Chromatogramme für OVT auf SP Sepharose XL ein starkes Rauschen, was auf technische Schwierigkeiten bei der chromatographischen Trennung und der Detektion hindeutet. Das stärkere Tailing für OVT auf SP Sepharose XL ist auf die geringe Kapazität zurückzuführen, die zu einer geringen Verweilzeit innerhalb der Säule und unsymmetrischen Peaks führt.

Die sichtbaren zusätzlichen Peaks für CTG-Atto635, CTG-BODIPY, OVT-Atto635 und OVT-Cy5 besitzen eine von der Gradientenlänge unabhängige Retentionszeit und lassen sich nicht über das SMA Modell beschreiben (Daten nicht gezeigt). Es sind schwach retadierte, fluoreszenzfarbstoffhaltige Kontaminanten, deren Identität unklar ist.

Die Gradientenmethode der SMA Parameterbestimmung wurde speziell für die simultane Messung der linearen Parameter für komplexe Gemische unterschiedlicher Proteine oder Proteinformen (Glykoproteine) entwickelt und die Annahme einer unabhängigen Bestimmung der Parameter für Mehrkomponentensysteme unter linearen Bedingungen wurde bestätigt (Barnhouse, 1998). Die Annahme eines konstanten sterischen Faktors  $\sigma$  für das native Protein und den Biokonjugaten wird prinzipiell getroffen, weil es experimentell schwierig wäre, die sterischen Faktoren der Biokonjugate zu bestimmen, da dazu reine Biokonjugatspecies in großer Menge bereit gestellt werden müssten. Der sterische Faktor repräsentiert die Ladungen, die durch ein Protein nach Bindung an den Adsorber aus sterischen Gründen abgeschirmt werden und ist prinzipiell von der Form des Proteins



abhängig, sodaß die Annahme eines konstanten  $\sigma$  für die Biokonjugate gerechtfertigt ist, weil der Fluoreszenzfarbstoff die Proteingröße nur unwesentlich ändern sollte.

In der Literatur konnten keine Daten für CTG oder OVT auf den Festphasen bei den gewählten pH-Werten gefunden werden. In der Arbeit von Gallant *et al.* (1996) wurden SMA Parameter für CTG auf SOURCE 15S bei pH 6.0 mit der isokratischen Methode bestimmt mit  $v = 5.03$ ,  $K = 1.35 \cdot 10^{-2}$  und  $\sigma = 7.43$ , die in der Größenordnung der in dieser Studie ermittelten Werte liegen. Die niedrigere Gleichgewichtskonstante ist durch den niedrigeren pH-Wert von 6.0 zu erklären, bei dem CTG stärker an einen Kationentauscher bindet.

Eine systematische Untersuchung der Parameterqualität wurde nicht durchgeführt und ist auch nicht in der Literatur veröffentlicht. Der relative Fehler aus ausgewählten Veröffentlichungen (Barntouse, 1998; Vunnum, 1997) für  $v$  ist ca. 5 %, für  $K$  ca. 16 % und für  $\sigma$  ca. 14 %.

Zusammenfassend legen die SMA Parameterbestimmungen den Schluß nahe, daß sich Biokonjugate messbar vom chromatographischen Verhalten der nativen Proteine unterscheiden und es Anzeichen für multiple Produkte der Biokonjugation gibt. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da die Konjugationsreaktion mehrere Gruppen auf der Proteinoberfläche verwenden kann, und diese je nach sterischer Zugänglichkeit und elektrostatischem Umfeld mehr oder weniger belegt wird. Generell können die Unterschiede über das Nettoladungskonzept nachvollzogen werden. Aufgrund der möglichen Anzahl an unterschiedlichen Biokonjugaten in einem Ansatz müssen CLSM Untersuchungen als Nettosignal der ‚synthetischen Proteinmutanten‘ angesehen werden. Das deutlichste Beispiel hierfür bildet das System CTG-Cy5.

#### **4.6 Adsorption von nativen Proteinen und Biokonjugaten auf Kationentauschern – Durchbruchkurven**

Nicht-lineare Adsorptionsprozesse in Form von Durchbruchkurven werden häufig in der Aufreinigung von Proteinen verwendet. Versuche mit unterschiedlich großen Proteinen (CTG oder OVT) bei unterschiedlicher Salzkonzentration auf zwei unterschiedlichen Festphasen (SP Sepharose FF oder SP Sepharose XL) sollen den Einfluß der Proteingröße, Festphase und Ionenstärke auf den Transport und die Adsorption von Proteinen unter nicht-linearen Bedingungen untersuchen. Wie im vorangegangenen Kapitel 4.5 gezeigt, existieren meßbare Unterschiede im Adsorptionsverhalten der Biokonjugate, im Vergleich mit den jeweiligen nativen Proteinen. Bedingt durch den inneren Filtereffekt (vgl. Kapitel 2.1) werden die Biokonjugate bei der Messung der intrapartikulären Konzentrationsprofile mittels CLSM im Unterschuss eingesetzt. Es ist zu erwarten, daß es unter nicht-linearen Bedingungen zu kompetitiven Adsorptionsprozessen mit dem nativen Protein kommt. Dabei sollte das Verhalten der Biokonjugate durch die kompetitive Adsorption des nativen Proteins bestimmt werden und das Durchbruchsverhalten des nativen Proteins nahezu unabhängig vom verwendeten Biokonjugat sein, weil es 100-fach konzentriert vorliegt. Das Bulkprofil des nativen Proteins am Partikel ist experimentell über die CLSM Messung nicht zugänglich. Die Annahme eines idealen Stufenprofils wurde in Kapitel 4.3 bei der Messung des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten als fehlerhaft identifiziert, weswegen auch für die Simulation von Adsorptionsprozessen die exakte Form der Durchbruchkurve des nativen Proteins für die Modellierung benötigt wird. Die Unabhängigkeit im chromatographischen Verhaltens des nativen Proteins vom Biokonjugat ist Voraussetzung für die Abschätzung des Proteinkonzentrationsprofil des nativen Proteins am Partikel über das Chromatogramm am Säulenende, welches für die Simulation der intrapartikulären Profile (vgl. Kapitel 4.8) benötigt wird.

Im Folgenden wird das Durchbruchsverhalten von CTG und OVT auf SP Sepharose FF und SP Sepharose XL bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen über die Absorptionmessung des Säuleneffluents charakterisiert und der potentielle Einfluß des Biokonjugats auf den Durchbruch des nativen Proteins überprüft. Desweiteren werden die Chromatogramme am Säuleneffluent der Biokonjugate analysiert und Konsequenzen für die Messung der intrapartikulären Profile abgeleitet

#### 4.6.1 Durchbruchskurven der nativen Proteine

Alle Durchbruchsexperimente wurden auf einer Mikrosäule (vgl. Kapitel 3.3) mit 2 mm Länge bei einer Fließgeschwindigkeit von 96 cm/h durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug 0.135 mM für CTG (3.5 g/l) und 0.046 mM (3.5 g/l) für OVT. Durchbrüche mit CTG wurden bei pH 7.0 bei Salzkonzentrationen von 20, 50 und 100 mM aufgenommen, wohingegen OVT bei pH 6.0 und 10, 20 sowie 50 mM analysiert wurde. Das D/P Verhältnis war bei allen Versuchen 0.01, unabhängig vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff (Ausnahme OVT bei 20 mM D/P 0.1). Die Analyse der Durchbruchskurven erfolgte über die Messung der Absorption des Säuleneffluents bei 280 nm und des jeweiligen Absorptionsmaximums des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes. Die mittels CLSM gemessenen intrapartikulären Profile in der Mikrosäule werden im nächsten Kapitel (4.7) dargestellt.

In Abb. 4.6.1 werden alle Durchbruchskurven der nativen Proteine bei den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen miteinander verglichen, wobei für jede Parameterkombination die Durchbruchskurven des nativen Proteins der drei Versuche mit den jeweiligen Biokonjugaten zusammen dargestellt werden.

Bei allen Durchbruchskurven ist ein früher Durchbruch einer schwach bindenden Komponente zu erkennen, die in den Versuchen für die SMA Parametergenerierung (vgl. Kapitel 4.5) identifiziert wurde. Generell erfolgt der Durchbruch früher mit steigender Salzkonzentration für beide Proteine auf beiden Festphasen und tendenziell verläuft die Durchbruchskurve flacher auf SP Sepharose XL im Vergleich mit SP Sepharose FF. Die dynamische Kapazität wurde über das Chromatogramm des Säuleneffluents bei 10 % der Konzentration der aufgetragenen Proteinlösung bestimmt, wobei der anfängliche Durchbruch der nicht bindenden Komponenten von den Durchbruchskurven abgezogen wurde. Die molare dynamische Kapazität für alle Versuche ist in Abb. 4.6.2 dargestellt. Vergleicht man die molare dynamische Kapazität von CTG mit OVT bei den drei Salzkonzentrationspaaren (10 und 20 mM; 20 und 50 mM; 50 und 100 mM), besitzt CTG auf SP Sepharose FF durchschnittlich eine 5.5-fach höhere Kapazität und auf SP Sepharose XL eine bis zu 75-fach höhere Kapazität im Vergleich mit OVT.

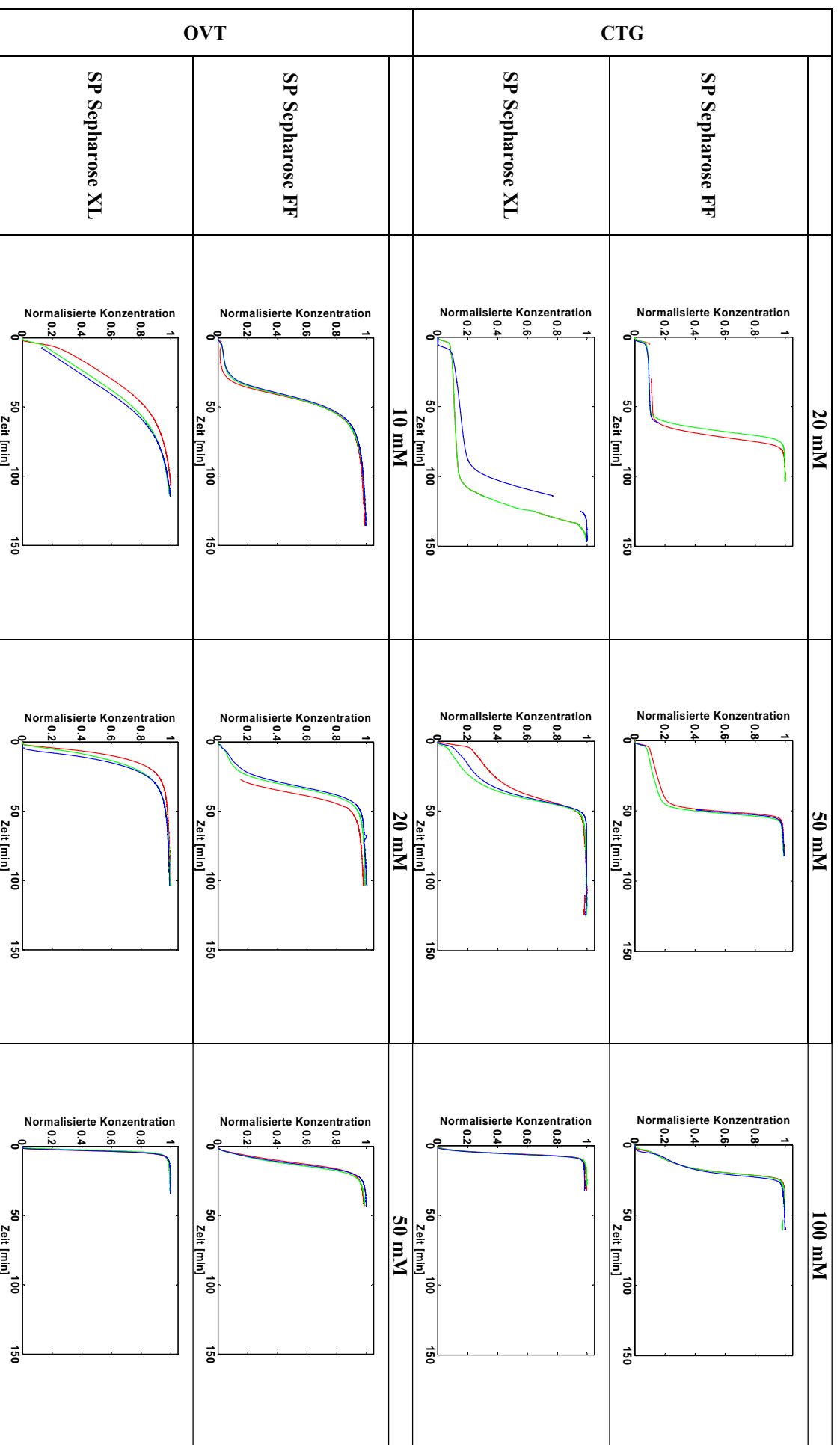


Abbildung 4.6.1. Normierte Durchbruchskurven der nativen Proteine für unterschiedliche Biokonjugate: 280 nm Signal für (—) Atto635 Biokonjugat, (—) BODIPY Biokonjugat, (—) Cys Biokonjugat. Durchbruch bei 96 cm/h bei pH 7.0 für CTG und pH 6.0 für OVT. Signal normiert auf maximales Signal.

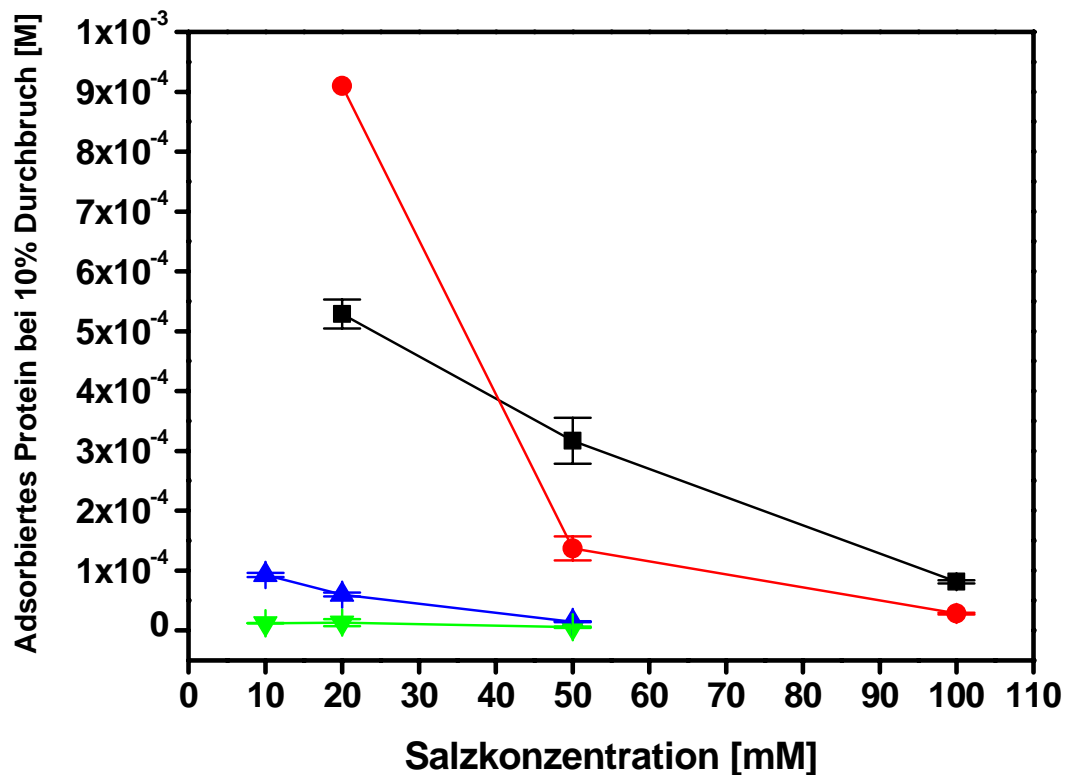


Abbildung 4.6.2. Auftragung der molaren dynamischen Kapazität gegen die verwendete Salzkonzentration während der Durchbruchexperimente. (—) CTG auf SP Sepharose FF. (—) CTG auf SP Sepharose XL. (—) OVT auf SP Sepharose FF. (—) OVT auf SP Sepharose XL.

Mit Ausnahme der Salzkonzentration bei 20 mM ist die molare dynamische Kapazität von CTG auf SP Sepharose FF durchschnittlich 2.6-fach höher im Vergleich mit SP Sepharose XL. Bei 20 mM besitzt CTG auf SP Sepharose XL eine 1.7-fach höhere Kapazität als auf SP Sepharose FF. Für OVT ist die molare dynamische Kapazität auf SP Sepharose FF immer durchschnittlich 4.9-fach größer als auf SP Sepharose XL. OVT besitzt auf SP Sepharose XL, unabhängig von der gewählten Salzkonzentration, eine geringe Kapazität, die  $1.32 \cdot 10^{-5}$  M nicht übersteigt.

Die Übereinstimmung der Durchbruchkurven der nativen Proteine für jedes verwendete Biokonjugat ist sehr gut und es ist kein systematischer Zusammenhang zwischen der Verwendung eines bestimmten Fluoreszenzfarbstoffs und der Änderung der Durchbruchkurve des nativen Proteins zu erkennen. Die größten Abweichungen sind für CTG auf SP Sepharose XL bei 20 mM zu erkennen, bei der die Durchbruchkurve bei Verwendung von Cy5 früher als bei BODIPY ansteigt. Allerdings ist die Form der Durchbruchkurve identisch. Die Durchbrüche wurden generell nicht auf derselben gepackten Mikrosäule durchgeführt, sondern mit, an unterschiedlichen Tagen, neu gepackten Säulen,

sodaß eine gewisse Variation der Säuleneigenschaften zu erwarten ist (z.B. durch die Packungsdichte). Dies kann die beobachteten, geringen Variationen zwischen den Durchbruchskurven erklären.

#### **4.6.2 Durchbruchskurven der Biokonjugate**

Die Vergleiche zwischen den Durchbruchskurven der nativen Proteine unter Verwendung unterschiedlicher Biokonjugate zeigen, daß sich im Wesentlichen das native Protein unabhängig von den gewählten Biokonjugaten verhält und man von denselben Adsorptions- und Transportvorgängen für das native Protein ausgehen kann. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse schließt sich die Analyse der Durchbruchskurven der Biokonjugate bei unterschiedlicher Salzkonzentration und Festphase an. Bei den Durchbruchversuchen wurde ein D/P von 0.01 gewählt, d.h. nur jedes 100ste Protein ist ein Biokonjugat. Bei der Darstellung der Durchbruchskurven, zusammen mit den Daten der nativen Proteine, wurden die Kurven, zur besseren Vergleichbarkeit, auf den maximal erreichten Absorptionwert normiert. Dabei ist zu bedenken, daß das Signal des Biokonjugates ca. 100-fach niedriger ist, als das, des nativen Proteins. Die Durchbruchskurven für die einzelnen Protein- und Festphasenkombinationen sind in den Abb. 4.6.3, 4.6.4, 4.6.5 sowie 4.6.6 dargestellt. Die Formen der Durchbruchskurven für die Biokonjugate ähneln nur in Ausnahmefällen einer typischen Durchbruchskurve und zeigen Effekte, die durch Verdrängungsmechanismen durch kompetitive Adsorption hervorgerufen werden (Gallant, 2003; Skidmore und Chase, 1990). Aufgrund dessen ist die Angabe einer dynamischen Kapazität bei 10% Durchbruch für die vorliegenden Daten nicht sinnvoll.

##### **4.6.2.1 Durchbruchskurven der CTG Biokonjugate auf SP Sepharose FF**

Die Durchbruchskurven der drei verschiedenen CTG Biokonjugate auf SP Sepharose FF zeigen sowohl ein unterschiedliches Verhalten untereinander als auch im Vergleich mit dem nativen CTG. Wie auch das native CTG, verläuft der Durchbruch der Biokonjugate früher mit steigender Salzkonzentration. Im Gegensatz zum nativen Protein haben die Biokonjugate bei Abbruch des Durchbruchversuch noch nicht den endgültigen Gleichgewichtszustand erreicht und zeigen ein dynamisches Verhalten, was auf weitere Ad- und Desorptionsvorgänge innerhalb der Säule hindeutet. Die Durchbruchskurven der Biokonjugate weisen, ebenso wie die, des nativen Proteins, einen frühen Durchbruch einer nicht oder schwach bindenden Komponente auf, die ebenfalls mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist.

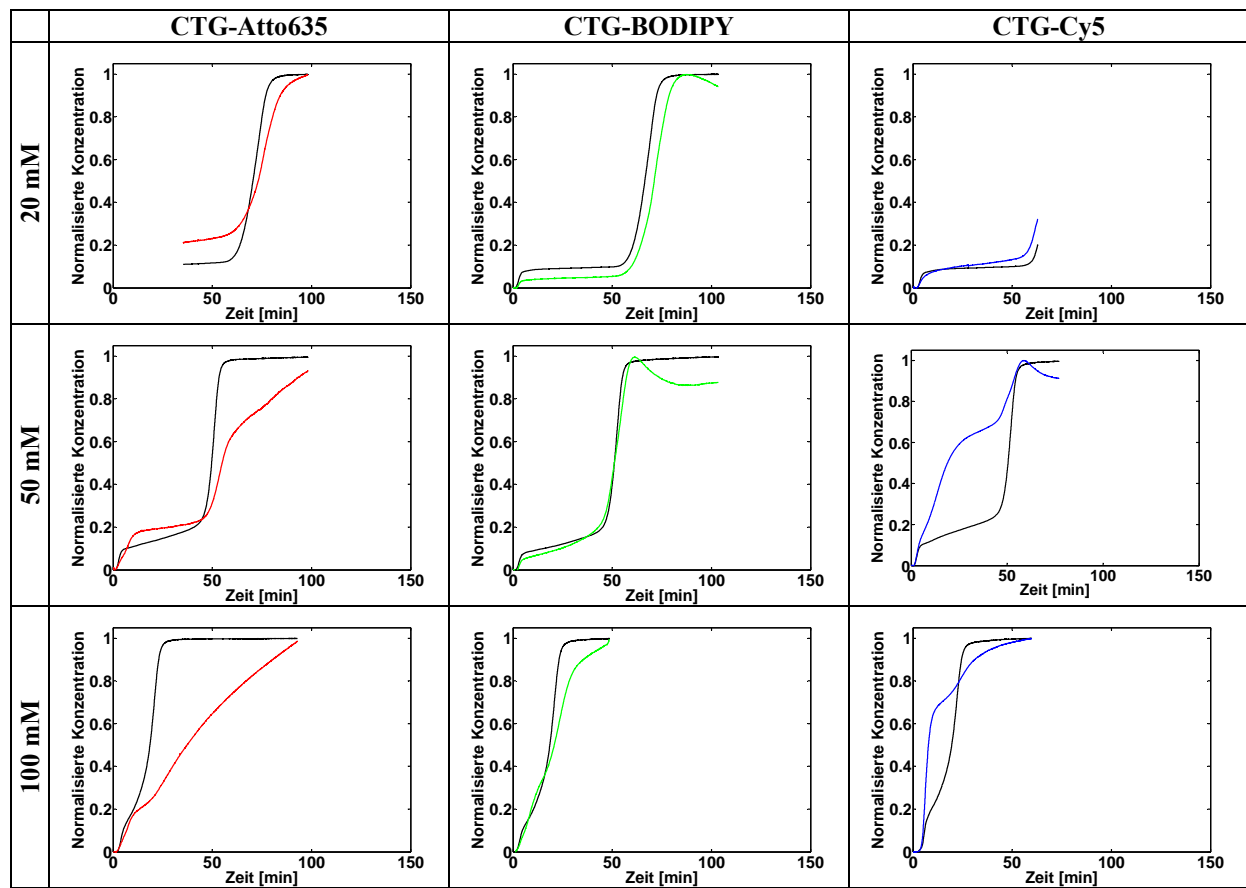


Abbildung 4.6.3. Vergleich der normierten Chromatogramme des nativen CTG und der jeweiligen Biokonjugate auf SP Sepharose FF. (—) natives CTG. (—) CTG-Atto635. (—) CTG-BODIPY. (—) CTG-Cy5. Durchbruch bei 96 cm/h und Signal normiert auf maximales Signal während des Durchbruchs. Signal von CTG-Atto635 und CTG-Cy5 bei 20 mM durch Drift und Luftblasen gestört.

Die Durchbruchskurve von CTG-Atto635 auf SP Sepharose FF weist einen anfänglich ähnlichen Verlauf wie das native Protein auf, weicht aber mit zunehmender Beladung dahingehend ab, daß der Durchbruch abflacht und sich die Konzentration des Säuleneffluents dem der Proteinklösung langsamer nähert. Dieser Effekt tritt mit steigender Salzkonzentration früher auf und ist bei 100 mM nahezu sofort nach Start des Durchbruchs zu erkennen.

CTG-BODIPY auf SP Sepharose FF zeigt bei 20 und 50 mM ein typisches Durchbruchsprofil eines 2-Komponentensystems unter kompetitiver Adsorption, bei dem CTG-BODIPY schwächer bindet als CTG und dementsprechend durch Verdrängungseffekte ein Überschuß an CTG-BODIPY am Säuleneffluent detektiert wird, der höher als die Ausgangskonzentration ist. Bei 100 mM ist kein deutlicher Überschußpeak zu erkennen, sondern die CTG-BODIPY Konzentration steigt nach dem Durchbruch linear an.

Die Durchbruchskurven von CTG-Cy5 sind vergleichbar mit CTG-BODIPY und zeigen ebenfalls einen Überschußpeak bei 50 mM (Signal bei 20 mM durch Meßfehler nicht zugänglich, aber aller Wahrscheinlichkeit nach ebenfalls mit Überschuß, vgl. 4.7 Abb. 4.7.1).

Zusätzlich weist CTG-Cy5 bei 50 und 100 mM einen frühen Durchbruch einer zweiten, schwächer bindenden Komponente auf, die vom chromatographischen Verhalten und Signalanteil sehr gut mit der schwächer bindenden CTG-Cy5 Komponente aus den SMA Parameterbestimmungen übereinstimmt (Kapitel 4.5).

#### 4.6.2.2 Durchbruchskurven der CTG Biokonjugate auf SP Sepharose XL

Die allgemeinen Bemerkungen zu den Durchbruchskurven von CTG auf SP Sepharose FF (geringere Kapazität mit steigender Salzkonzentration, früher Durchbruch einer nicht bindenden Komponente, nicht Erreichen eines Gleichgewichtszustandes für das Biokonjugat) treffen auch für die CTG Biokonjugate auf SP Sepharose XL zu.

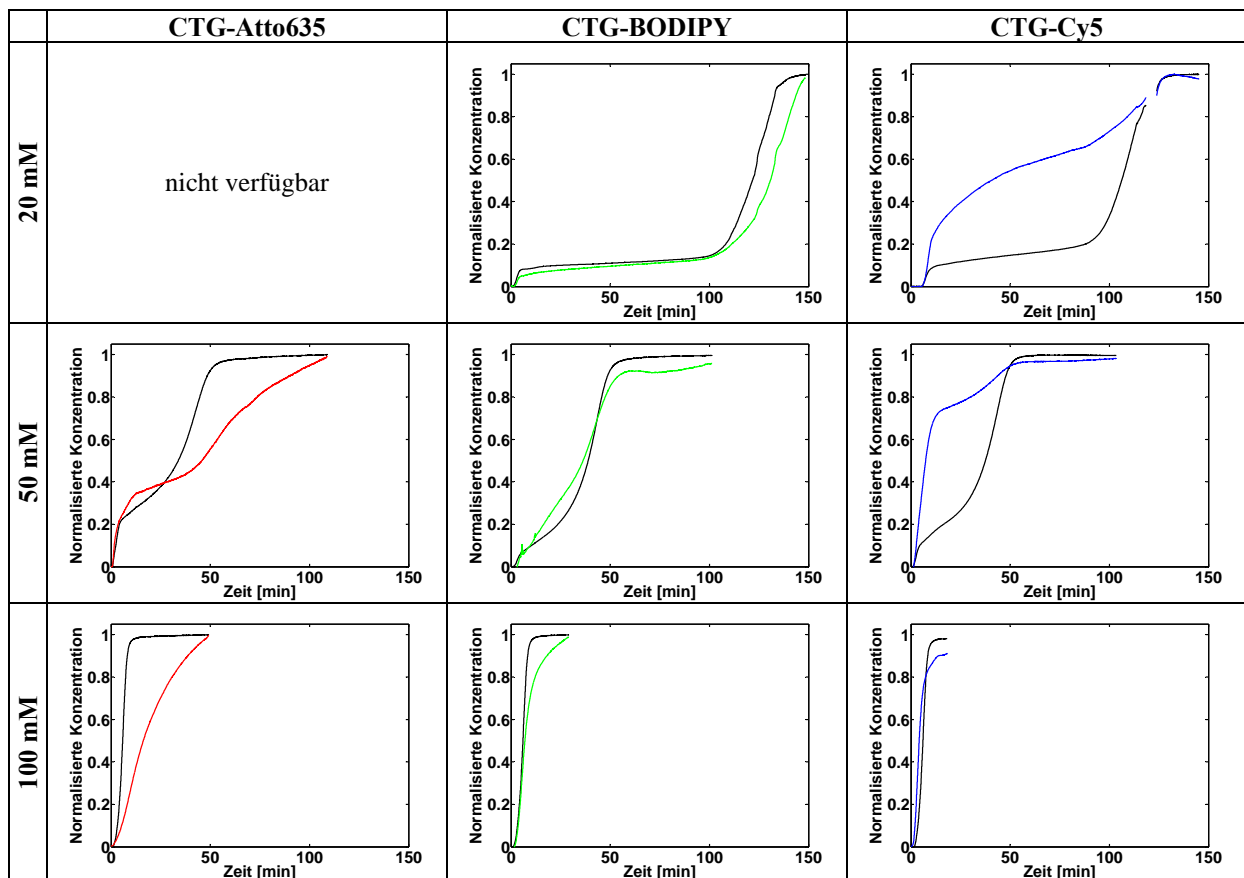


Abbildung 4.6.4. Vergleich der normierten Chromatogramme des nativen CTG und der jeweiligen Biokonjugate auf SP Sepharose XL. (—) natives CTG. (—) CTG-Atto635. (—) CTG-BODIPY. (—) CTG-Cy5. Durchbruch bei 96 cm/h und Signal normiert auf maximales Signal während des Durchbruchs.

Im Wesentlichen weisen die Durchbruchskurven der CTG Biokonjugate auf SP Sepharose XL qualitativ ein vergleichbares Verhalten wie auf SP Sepharose FF auf, allerdings ist die Ausprägung einiger Phänomene unterschiedlich.



Bei CTG-Atto635 ist auch auf SP Sepharose XL ein flacher Durchbruch mit langsamen Anstieg auf die Proteinkonzentration der Ausgangslösung zu beobachten, die bei Abbruch des Durchbruchs noch nicht abgeschlossen ist.

Für CTG-BODIPY auf SP Sepharose XL ist nur bei 50 mM andeutungsweise ein Überschußpeak durch kompetitive Adsorption mit Verdrängung zu erkennen. Die Situation bei 20 mM ist unklar, weil bei Abbruch des Durchbruchsexperiments die Entwicklung des CTG-BODIPY Chromatogramms noch nicht beendet ist.

CTG-Cy5 weist sowohl bei 20 als auch 50 mM einen frühen Durchbruch der schwächer bindenden CTG-Cy5 Komponente auf, allerdings fehlt auf SP Sepharose XL die Ausbildung eines Überschußpeaks bei Durchbruch der nativen Komponente.

#### 4.6.2.3 Durchbruchskurven der OVT Biokonjugate auf SP Sepharose FF

Auch die Durchbruchskurven der OVT Biokonjugate auf SP Sepharose FF zeigen alle ein unterschiedliches Verhalten im Vergleich mit dem nativen Protein mit einer geringeren Kapazität mit steigender Salzkonzentration. Ebenso wie bei CTG, ist auch bei den OVT Biokonjugaten ein früher Durchbruch einer nicht oder schwach bindenden Komponente sofort nach Start des Durchbruchs zu erkennen.

Im Gegensatz zu den Durchbruchskurven der CTG Biokonjugate zeigen die OVT Biokonjugate eine geringe Varianz untereinander und ein Überschußprofil, wie es für die schwächer bindenden BODIPY und Cy5 Konjugate von CTG gefunden wurde, ist bei OVT nicht zu beobachten.

Die Durchbruchskurven aller drei Biokonjugate verlaufen flach mit einem initialen Anstieg der Biokonjugatkonzentration und einem langsamen, nahezu linearen Anstieg der Proteinkonzentration. Der initiale Anstieg der Proteinkonzentration ist für OVT-Cy5 am größten, gefolgt von OVT-BODIPY und OVT-Atto635. Bei OVT-Cy5 (10 und 20 mM) ist ein früher Durchbruch einer schwächer bindenden Komponente zu erkennen. Inwieweit die OVT Biokonjugatkonzentration auf SP Sepharose FF bei den gewählten experimentellen Bedingungen am Säuleneffluent über die, der eingesetzten Proteinkonzentration steigen kann ist nicht klar, da der Durchbruch abgebrochen wurde, wo die Biokonjugate immer noch ein dynamisches Verhalten zeigen. D.h. falls es zu einer Verdrängung von OVT-BODIPY oder OVT-Cy5 durch das native OVT kommt, verläuft diese deutlich langsamer als bei den Versuchen mit den CTG Biokonjugaten.

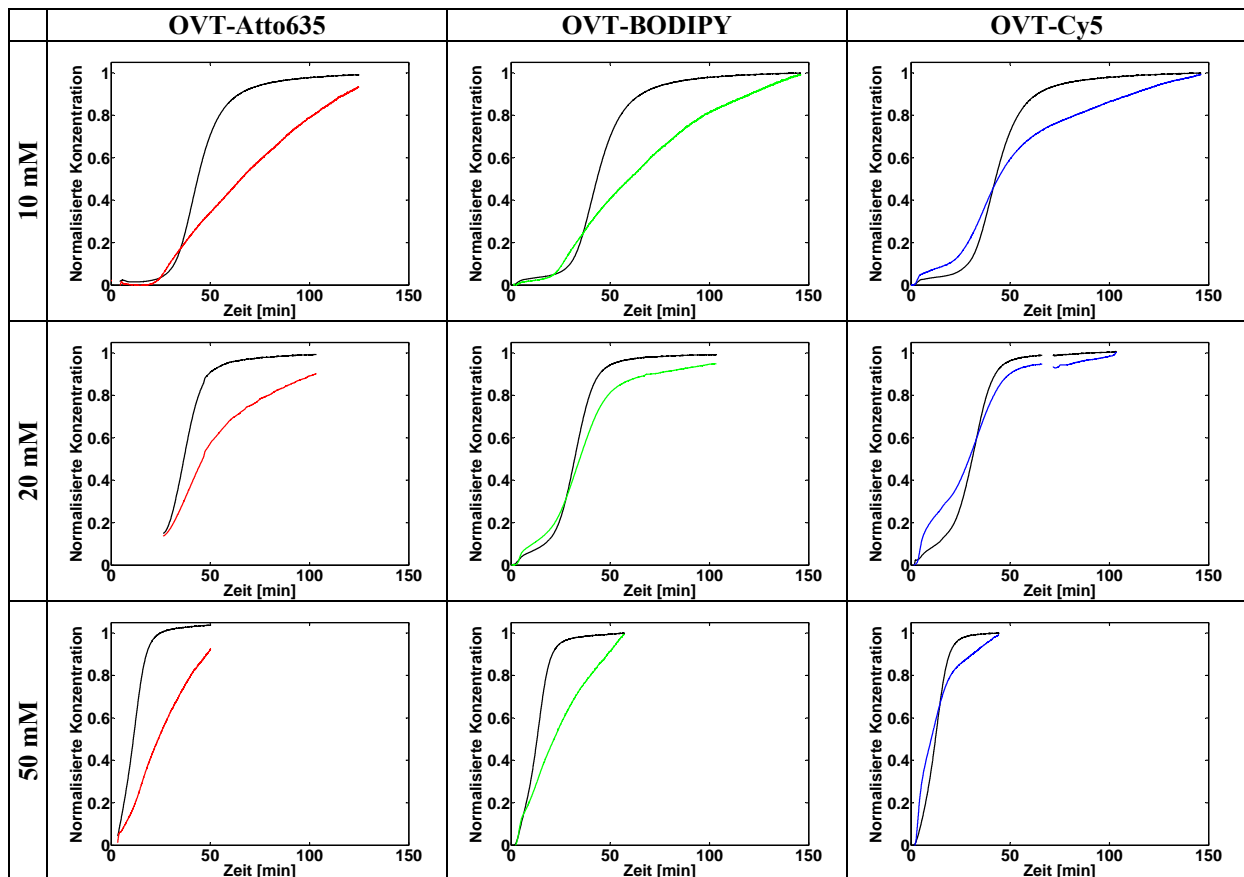


Abbildung 4.6.5. Vergleich der normierten Chromatogramme des nativen OVT und der jeweiligen Biokonjugate auf SP Sepharose FF. (—) natives OVT. (—) OVT-Atto635. (—) OVT-BODIPY. (—) OVT-Cy5. Durchbruch bei 96 cm/h und Signal normiert auf maximales Signal während des Durchbruchs. Signal von OVT-Atto635 bei 20 mM durch Drift und Luftblasen gestört.

#### 4.6.2.4 Durchbruchkurven der OVT Biokonjugate auf SP Sepharose XL

Vergleichbar wie auf SP Sepharose FF zeigen die OVT Biokonjugate auf SP Sepharose XL ebenfalls ein ähnliches Durchbruchsverhalten, unabhängig vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff. Auch hier ist ein früher Durchbruch einer nicht oder schwach bindenden Komponente sofort nach Start des Experiments zu erkennen, allerdings ist die Kapazität von OVT auf SP Sepharose XL so niedrig, daß auch OVT und die Biokonjugate nahezu sofort am Säuleneffluent detektiert werden.

Die Durchbruchkurven der OVT Biokonjugate verlaufen flacher, als für das native Protein und es sind keine Überschüßpeaks oder deutliche Verdrängungsprozesse innerhalb der Chromatogramme zu erkennen. Wie auch bei SP Sepharose FF ist es, bedingt durch das fehlende Erreichen eines Gleichgewichtszustandes bei Abbruch des Experiments, nicht eindeutig, ob langsame Verdrängungsprozesse zu einer Überhöhung der Säuleneffluentkonzentration der OVT-BODIPY oder OVT-Cy5 Biokonjugate führen, im Vergleich mit der Ausgangsproteinlösung.

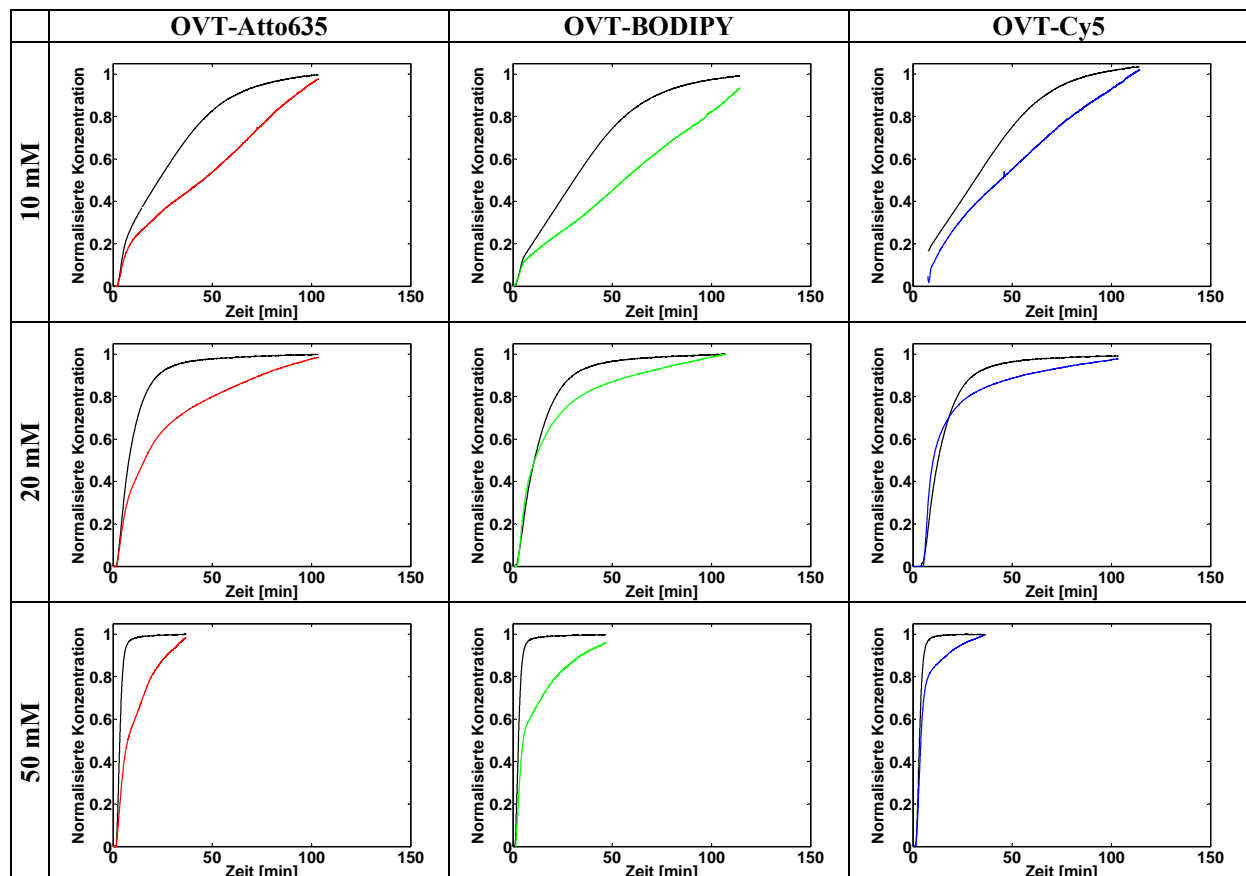


Abbildung 4.6.6. Vergleich der normierten Chromatogramme des nativen OVT und der jeweiligen Biokonjugate auf SP Sepharose XL. (—) natives OVT. (—) OVT-Atto635. (—) OVT-BODIPY. (—) OVT-Cy5. Durchbruch bei 96 cm/h und Signal normiert auf maximales Signal während des Durchbruchs.

### 4.6.3 Diskussion

#### *Durchbruchskurven der nativen Proteine*

In Kapitel 4.4 wurde gezeigt, daß es bei der Untersuchung von SEC Trennungen auf einer Mikrosäule (47 mm Länge) zu Peakverbreiterungen durch die Bauweise der Mikrosäule kommt, die einen direkten Vergleich mit konventionellen Säulen erschwert. Die hier dargestellten Durchbruchskurven des nativen Proteins auf einer Mikrosäule (2 mm Länge) zeigen eine gute Übereinstimmung der Kurvenform mit den Daten von Abb. 4.5.2 aus Kapitel 4.5, die auf einer konventionellen Tricorn 5/20 Säule aufgenommen wurden. Eine exakte Übereinstimmung ist nicht zu erwarten, weil die eingesetzte Proteinkonzentration, das Säulenvolumen und die lineare Fließgeschwindigkeit unterschiedlich waren. Der Vergleich zeigt jedoch, daß Daten aus einer Mikrosäule, unter adsorptiven Bedingungen, vergleichbar sind mit Ergebnissen, die auf konventionellen Säulen aufgenommen wurden. Demnach sind gemessene intrapartikuläre Profile aus einer Mikrosäule repräsentativ für

Adsorptionsvorgänge in industriell eingesetzten Chromatographiematerialien und Chromatogramme des Säuleneffluents können direkt zu Daten aus dem gepackten Bett in Beziehung gesetzt werden. Wie schon in Kapitel 4.4 beschrieben, läßt sich dies über die höhere Verweilzeit durch adsorptive Wechselwirkungen innerhalb der Säule erklären, sodaß der negative Einfluß der Peakverbreiterung durch die Mikrosäuleneigenschaften verringert wird.

Die Übereinstimmung der Durchbruchkurven für das native Protein für jedes Experiment mit einem bestimmten Biokonjugat bestätigt die Annahme, daß das 100-fach stärker konzentrierte native Protein in seinem Adsorptions- und Transportverhalten nicht erkennbar von den Biokonjugaten beeinflusst wird. Auch wenn die Atto635 Konjugate generell eine höhere Affinität zur chromatographischen Festphase besitzen, ist es aufgrund des Konzentrationsunterschiedes unwahrscheinlich, daß es zu meßbaren Änderungen des Verhaltens des nativen Proteins kommt, insbesondere weil die Biokonjugate zwar unterschiedliche, aber sehr ähnliche Adsorptionsisothermen, wie die nativen Proteine besitzen.

Die Durchbruchkurven der nativen Proteine bei den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen lassen sich gut über das in Kapitel 4.5 dargestellte Nettoladungskonzept erklären. Der frühere und flachere Durchbruch von OVT im Vergleich zu CTG kann über die Proteingröße und die SMA Parameter der Proteine erklärt werden. OVT ist ca. 3-mal größer als CTG. Es wird allgemein beobachtet, daß größere Proteine eine niedrigere Kapazität als kleinere Proteine besitzen, weil sie aus sterischen Gründen zu einem gewissen Grad vom Porenraum ausgeschlossen werden und bei gleicher zur Verfügung stehenden Adsorptionsfläche, mehr Platz für die Adsorption benötigen (Garke *et al.*, 1999). Die Nettoladung von CTG bei pH 7.0 (+4) ist niedriger als die Nettoladung von OVT pH 6.0 (+10) ([www.scripps.edu/~cdputnam/protcharge.html](http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcharge.html)), allerdings entscheidet nicht die Nettoladung über die Retention auf einen Kationentauscher, sondern die tatsächlich an der Bindung beteiligten Ladungen. So wird für CTG auf einem anderen Kationentauscher (Mono S) eine höhere Retention für CTG bei pH 7.0 als für OVT bei pH 6.0 erzielt (Kopaciewicz *et al.*, 1983). Dementsprechend sind die Gleichgewichtskonstanten der SMA Parameter (Daten für natives Protein) für CTG auf SP Sepharose FF ca. 8-mal und für SP Sepharose XL ca. 6000-mal größer als für OVT. Zudem sind die sterischen Faktoren für OVT mit 102 für SP Sepharose FF und 1418 für SP Sepharose XL ca. 29-mal (SP Sepharose FF) bzw. ca. 39-mal (SP Sepharose XL) größer als die Werte für CTG, was ebenfalls den größeren, sterischen Bedarf von OVT gegenüber CTG unterstreicht. Die flacheren Durchbruchkurven für OVT

können durch den niedrigeren intrapartikulären Diffusionskoeffizienten und der ungünstigeren Adsorptionsisotherme von OVT gegenüber CTG erklärt werden. Durch den niedrigeren  $D_{ip}$  werden die Partikel langsamer vom Protein penetriert und die Durchbruchskurve weicht dementsprechend von einer scharfen Adsorptionsfront ab. Durch eine ungünstigere Adsorptionsisotherme wird zudem eine scharfe Adsorptionsfront zunehmend flacher (Guiochon und Lin, 2003; Hall *et al.*, 1965). Zusätzlich flachen die Durchbruchskurven für OVT im oberen Teil stärker ab und führt zu einer Asymmetrie im Durchbruch (vgl. Abb. 4.6.1). Ein Erklärungsansatz für die Asymmetrie ist gegeben durch eine sterische Überlegung während der Adsorption: große Proteine benötigen eine größere, freie Adsorptionsfläche, um an den Kationentauscher zu binden. Mit zunehmender Beladung nimmt die zur Verfügung stehende Adsorptionsfläche ab und das Protein benötigt mehr Zeit, einen geeigneten Adsorptionsplatz zu finden. Dies manifestiert sich in der Abflachung der Durchbruchskurven zu späteren Zeiten hin. Dieser Effekt wurde in Studien zur Membranchromatographie (Yang und Etzel, 2003) und in der Chromatographie (Jin *et al.*, 1994) dokumentiert und wird das „car parking“ Modell genannt. Der Effekt tritt insbesondere bei größeren Proteinen in Erscheinung. Eine weitere Erklärung könnte die Anwesenheit von Dimeren in der OVT Lösung sein, wie sie in Kapitel 4.1 in den SEC Versuchen auf Superose 12 dokumentiert wurden. Hunter und Carta (2001) beobachteten ebenfalls eine Abflachung der Durchbruchskurve gegen Ende der Beladung für BSA auf Q Sepharose FF und konnten BSA Dimere als Ursache dafür identifizieren.

Die XL Medien zeigen eine geringere Kapazität und eine flachere Durchbruchskurve als die FF Medien. Da die Grundmatrix, die Partikelgröße, der SP Ligand und die Versuchsbedingungen bei allen Versuchen gleich ist, müssen andere Parameter für die beobachteten Unterschiede verantwortlich sein. Die Porosität von SP Sepharose XL ist ca. 1.9-fach und die totale ionische Kapazität ca. 1.2-fach niedriger als für SP Sepharose FF. Einhergehend mit der gemessenen Porosität, ist auch der Verteilungskoeffizient unter nicht-bindenden Bedingungen für CTG und für OVT 1.7-fach niedriger auf SP Sepharose XL als auf SP Sepharose FF (vgl. Kapitel 4.3). Dementsprechend ergibt die Auswertung der Daten nach dem Renkin Modell einen Porenradius von 7.04 nm für SP Sepharose XL gegenüber 14.25 nm für SP Sepharose FF. Aus rein sterischen Überlegungen sind die Poren des XL Mediums kleiner, was durch die vorhandenen Dextranketten im Porenraum hervorgerufen wird. Dadurch wäre die Adsorption der beiden Proteine unter rein sterischen Gesichtspunkten auf SP Sepharose XL benachteiligt gegenüber der Situation auf SP Sepharose FF. Es wurden keine Diffusionsversuche mit SP Sepharose FF oder XL durchgeführt, allerdings ähnelt SP

Sepharose FF eher der Sepharose 6 FF Matrix, wohingegen SP Sepharose XL eine größere Übereinstimmung mit der Capto Q Matrix besitzen müsste. Der langsamere, intrapartikuläre Transport im XL Medium wird aller Wahrscheinlichkeit nach durch die vorhandenen Dextranketten bewirkt. Eine Verlangsamung des diffusiven Transports in Agarose-Dextran Komposit Medien (Kosto und Deen, 2004) oder Tentakel Medien (Müller, 2003) wurde beobachtet. Zusammengenommen wird folgendes Szenario für die Beschreibung der Unterschiede der Durchbruchskurven bei beiden Proteinen vorgeschlagen: die Dextran Ketten im SP Sepharose XL Medium führen zu einer Verkleinerung des Porenradius und damit zu einer niedrigeren Kapazität der Proteine. Dieser Effekt wirkt sich stärker bei OVT als bei CTG aus, weil OVT ca. 3-mal größer ist als CTG. Dementsprechend adsorbiert OVT auf SP Sepharose XL sehr wenig, was an der niedrigen Kapazität bei allen Salzkonzentrationen zu sehen ist. Die flacheren Durchbruchskurven für SP Sepharose XL werden durch den höheren Stofftransportwiderstand in Form des niedrigeren  $D_{ip}$ 's der Proteine hervorgerufen.

Diese Überlegungen erklären nicht die höhere Kapazität von CTG auf SP Sepharose XL bei 20 mM gegenüber den Ergebnissen für SP Sepharose FF. Im Vergleich zur Durchbruchskurve auf SP Sepharose FF ist die Durchbruchskurve auf SP Sepharose XL flacher. Daher ist der Stofftransportwiderstand auf dem XL Medium höher, als auf dem FF Medium, allerdings steigt die Kapazität unerwartet stark an. Für CTG könnte daher die bessere Ladungszugänglichkeit (vgl. Kapitel 4.5) bei 20 mM zu tragen kommen, wohingegen bei höheren Salzkonzentrationen die ungünstigeren sterischen Eigenschaften überwiegen. Dieser Effekt ist unerwartet, weil für XL Medien eine relative Kapazitätssteigerung mit steigender Salzkonzentration erwartet wird, bei der die Fluidität der immobilisierten, negativ geladenen Dextranketten durch Verringerung der Abstoßung untereinander erhöht wird und dementsprechend die Ladungszugänglichkeit sich verbessern sollte.

### ***Durchbruchskurven der Biokonjugate***

Im Folgenden sollen die Chromatogramme des Säuleneffluents der Biokonjugate diskutiert werden. Wie in Kapitel 4.5 verdeutlicht, ist das Verhalten der Biokonjugate unter adsorptiven Verhältnissen auf Kationentauschern nicht gleichzusetzen mit den jeweiligen nativen Proteinen, was eindeutig an den Durchbruchskurven der Biokonjugate bei allen Versuchsbedingungen gezeigt werden kann: keine Durchbruchskurve eines Biokonjugats entspricht dem Verhalten, des entsprechenden nativen Proteins und weicht teilweise deutlich davon ab (BODIPY und Cy5 Konjugate von CTG). Es ist zu erwarten, daß die

intrapartikulären Profile der Biokonjugate nicht mit dem Adsorptionsprofil des nativen Proteins gleichzusetzen sind, sondern für jeden Fluoreszenzfarbstoff ein unterschiedliches Profil zu erwarten ist, welches sich nur über die kompetitive Adsorption des Biokonjugats in Anwesenheit des 100-fach konzentrierteren nativen Proteins erklären lässt (siehe Kapitel 4.7). Die beobachteten Durchbruchkurven der Biokonjugate lassen sich über das in Kapitel 4.5 vorgestellte Nettoladungskonzept, angewendet auf die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe, erklären, welches hier nicht wiederholt werden soll. Anstelle dessen werden die Auswirkungen der kompetitiven Adsorption unter nicht-linearen Bedingungen näher betrachtet und diskutiert. Die Chromatogramme für CTG-BODIPY und CTG-Cy5 auf SP Sepharose FF bei 20 und 50 mM zeigen ein typisches Überschußprofil einer schwächer bindenden Komponente unter frontalchromatographischen Bedingungen, welches als Aufrollen (engl. roll up) bezeichnet wird (Skidmore und Chase, 1990). Das Entstehen eines „Aufrollprofils“ kann über folgendes Szenario verstanden werden: anfänglich können beide Komponenten gleichzeitig auf der unbesetzten Festphase adsorbieren. Mit zunehmenden Beladungsgrad wird die schwächer bindende Komponente in das Partikelzentrum verdrängt und für neu eintreffendes Protein erhöht sich der Diffusionsweg bis geeignete Adsorptionsplätze vorhanden sind, weil die äußeren Partikelschalen bevorzugt von der stärker bindenden Komponente belegt werden (vgl. Ghose *et al.*, 2005). Durch die anfängliche Konzentrierung mit anschließender Verdrängung der schwächer bindenden Komponente kommt es zum Auftreten eines Konzentrationsüberschusses im Säuleneffluent. Die Höhe des Konzentrationsüberschusses nimmt mit größerem Affinitätsunterschied und Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Komponenten, der Kapazität der Festphase und schneller Sorptionskinetik zu (Whitley *et al.*, 1993; Skidmore und Chase, 1990; Lewus und Carta, 1999). Dementsprechend ist das Aufrollprofil nur bei den schwächer bindenden Biokonjugaten CTG-BODIPY und CTG-Cy5 zu beobachten. Die Abwesenheit eines Konzentrationsüberschusses beim Atto635 Konjugat unterstützt das kompetitive Adsorptionsmodell, weil es aufgrund der stärkeren Bindung des Atto635 Konjugat zu keiner Verdrängung durch das native Protein kommt. Das Fehlen eines Aufrollprofils bei allen anderen Versuchen mit BODIPY und Cy5 ist auf die geringere Affinität der Proteine auf der Festphase, geringe Kapazität, langsamere Stofftransportvorgänge oder Sorptionskinetiken unter den gewählten, experimentellen Bedingungen zurückzuführen, sodaß es nicht zur Entstehung eines prägnanten Aufrollprofils kommt.

#### **4.7 Adsorption von nativen Proteinen und Biokonjugaten auf Kationentauscher – Konfokale Messung auf Einzelpartikelniveau**

Die konfokale Laser Raster Mikroskopie ermöglicht die Messung intrapartikulärer Adsorptionsprofile von Proteinen in chromatographischen Festphasen und gibt einen direkten Einblick in die Adsorptions- und Stofftransportvorgänge während eines Durchbruchversuchs. Die hier verwendete konfokale Messtechnik kann die Konzentration von geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen, die an die Proteine konjugiert wurden, örtlich auflösen, aber nicht die Konzentration des nativen Proteins. Die Addition eines Fluoreszenzfarbstoffes an ein Protein kann die Eigenschaften des Proteins signifikant verändern (vgl. Kapitel 2.1, 4.5 und 4.6) und verändert die Art und Weise, wie konfokale Ergebnisse interpretiert werden müssen. Wie in Kapitel 4.5 und 4.6 gezeigt, weisen alle Biokonjugate unterschiedliche Eigenschaften auf, im Vergleich untereinander und mit dem nativen Protein. Nachdem die Durchbruchkurven für das native Protein und für die jeweiligen Biokonjugate über die Absorptionsmessung des Säuleneffluents analysiert wurden, sollen im Folgenden die entsprechenden intrapartikulären Profile während der Adsorption für jedes verwendete Biokonjugat beschrieben und miteinander in Beziehung gebracht werden. Der Schwerpunkt liegt auf der Darstellung der Unterschiede zwischen den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen und dem Einfluß der Salzkonzentration auf die beobachteten Muster.

Im Hinblick auf die Modellierung und Simulation der Adsorption (vgl. Kapitel 4.8) werden die Chromatogramme der Biokonjugate am Partikel und am Säuleneffluent miteinander verglichen um eine Aussage über die Rekonstruierbarkeit des Chromatogramms des nativen Proteins am Partikel treffen zu können.

Die Eignung von Transportmodellen zur Beschreibung der gefundenen Adsorptionsprofile unter Berücksichtigung der Einflüsse der Fluoreszenzfarbstoffe werden diskutiert und mit veröffentlichten Transportmodellen verglichen. Die Limitierungen der CLSM Meßmethode werden aufgezeigt und Veröffentlichungen, die Daten zur Adsorption von Proteinen aus CLSM Messungen beinhalten, werden diskutiert.



#### 4.7.1 Vergleich der Bulkchromatogramme der Biokonjugate am Partikel mit Chromatogrammen des Säuleneffluents

Die Verwendung einer Mikrosäule kann zu verstärktem Auftreten von Rückvermischungseffekten und Dispersion der aufgetragenen Proteinlösungen führen, die einen Vergleich zwischen Daten aus dem gepackten Bett, dem Säuleneffluent und herkömmlichen Säulen erschwert (vgl. Kapitel 4.4). Desweiteren wird für die Modellierung intrapartikulärer Adsorptionsprofile als Randbedingung die Konzentration des nativen Proteins am Partikelrand benötigt, die im Gegensatz zum Biokonjugat, nicht direkt gemessen werden kann, sondern in geeigneter Weise abgeschätzt werden muß. Über den Vergleich der Chromatogramme der Biokonjugate am Partikel und des Säuleneffluents wird der Ansatz der Rekonstruktion des nativen Proteinprofils am Partikel über die Absorptionmessung am Säuleneffluent überprüft.

Die experimentellen Ergebnisse beziehen sich auf die in Kapitel 4.6 vorgestellten Durchbruchversuche, die auf einer Mikrosäule (vgl. Kapitel 3.3) mit 2 mm Länge bei einer Fließgeschwindigkeit von 96 cm/h durchgeführt wurden. Die Proteinkonzentration betrug 0.135 mM für CTG (3.5 g/l) und 0.046 mM (3.5 g/l) für OVT. Durchbrüche mit CTG wurden bei pH 7.0 und Salzkonzentrationen von 20, 50 und 100 mM aufgenommen, wohingegen OVT bei pH 6.0 und 10, 20 sowie 50 mM analysiert wurde. Das D/P Verhältnis war bei allen Versuchen 0.01 (Ausnahme: OVT bei 20 mM; D/P 0.1), unabhängig vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff.

In Abb. 4.7.1 sind die Chromatogramme der jeweiligen CTG Biokonjugate auf SP Sepharose FF für die Salzkonzentrationen 20, 50 und 100 mM am Partikel (über CLSM Messung, vgl. Kapitel 3.4) und am Säuleneffluent (Messung am Absorptionsmaximum der jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe) dargestellt. Die direkte Messung des Verlaufs der Proteinkonzentration in der Bulkphase am Partikel mittels CLSM unter adsorptiven Bedingungen wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal demonstriert.

Der Verlauf der Durchbruchkurven am Partikel (am sichtbaren Säulenkopf) und im Säuleneffluent zeigt für alle Biokonjugate bei allen Salzkonzentrationen eine gute Übereinstimmung. Die Durchbruchkurven besitzen das gleiche Muster, werden aber am Säuleneffluent mit sinkender Salzkonzentration zu späteren Zeiten verschoben, was durch die höhere dynamische Kapazität unter diesen Bedingungen zu erklären ist (vgl. Kapitel 4.6). Die Durchbruchkurven weisen ein konstantes Muster auf (engl. constant pattern) bis auf die

früher eluierenden Komponenten von CTG-BODIPY und CTG-Cy5 (sichtbar bei 50 und 100 mM), die in Form eines proportionalen Musters durch die Säule migrieren.

Es ist keine auffällige Änderung der Durchbruchkurvenform zwischen dem Säulenkopf und am Ende der Säule zu erkennen, die auf Rückvermischungseffekte innerhalb der Mikrosäule hindeuten.

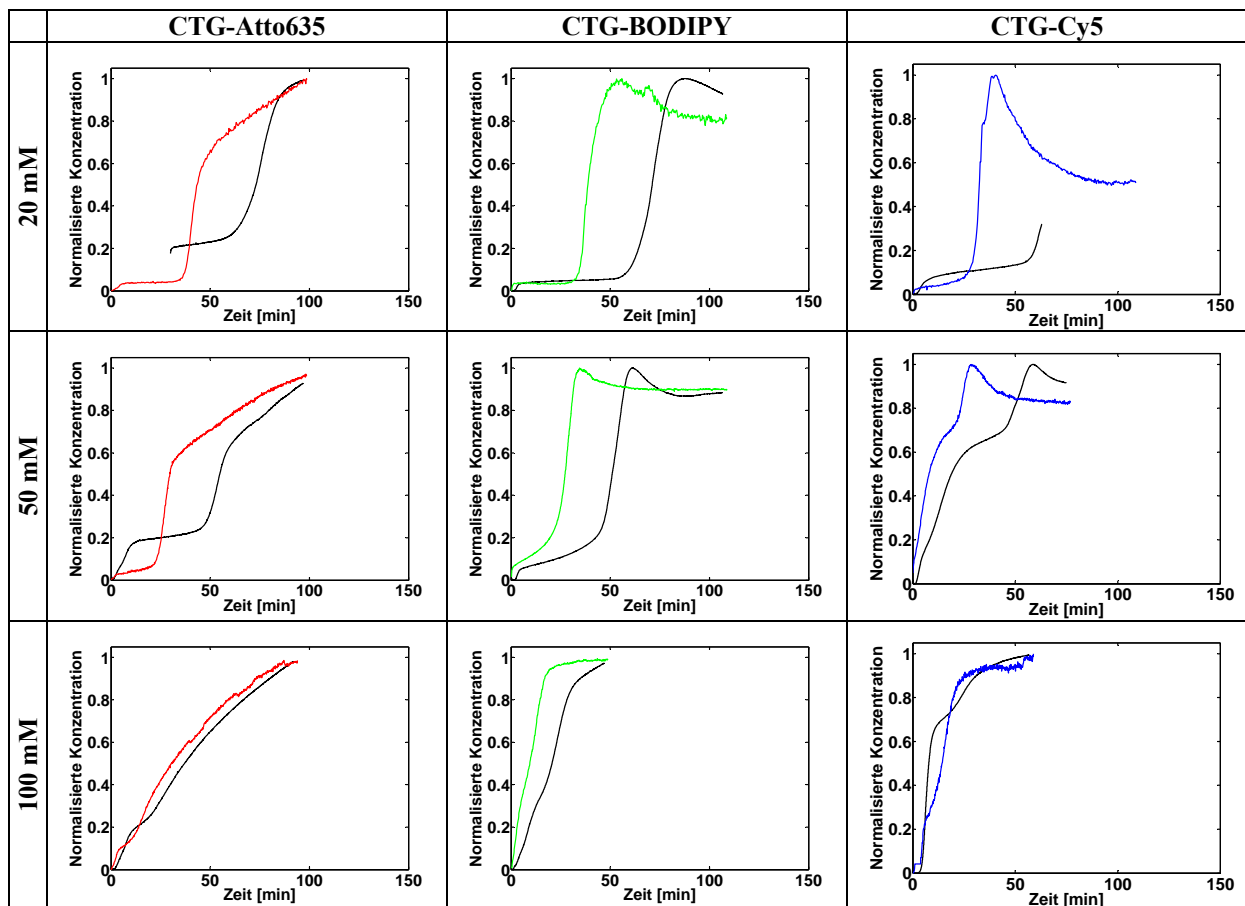


Abbildung 4.7.1. Normierte Chromatogramme für die jeweiligen Biokonjugate am Säuleneffluent (—) und am Partikel (CLSM Messung) von (—) Atto635, (—) BODIPY und (—) Cy5. Durchbruch von CTG auf SP Sepharose FF bei pH 7.0, 96 cm/h und D/P von 0.01. Signal normiert auf Maximalwert während Durchbruch.

Die Vergleiche der Chromatogramme am Säuleneffluent und am Partikel für CTG auf SP Sepharose XL und für OVT auf beiden Festphasen weisen ein entsprechendes Verhalten auf wie für CTG auf SP Sepharose FF und sind im Anhang (Abb. 7.33-7.35) abgebildet.

## 4.7.2 Intrapartikuläre Profile der Biokonjugate

Die folgenden Abschnitte stellen die Analyse der intrapartikulären Profile während der Durchbrüche dar, die in Kapitel 4.6 ausführlich dargestellt wurden. Die Messung am Partikel findet mit Start der Proteinbeladung statt und die Position des analysierten Partikels ist am sichtbaren Säulenkopf (vgl. Kapitel 3.4.4 und 3.4.5). Bei der Darstellung der Ergebnisse werden die gemessenen Signale jedes Biokonjugats auf das maximale Signal während des Versuches normiert und gegen den normierten Radius aufgetragen. Für jede Protein-Festphasen-Salzkonzentration Kombination werden die Profile der drei Biokonjugate in einer Abbildung dargestellt. Es werden jeweils 25 Graphen dargestellt, die den dynamischen Bereich der Adsorption abdecken.

### 4.7.2.1 Intrapartikuläre Profile der CTG Biokonjugate auf SP Sepharose FF

In Abb. 4.7.2, 4.7.3 und 4.7.4 sind die intrapartikulären Profile während der Adsorption von CTG auf SP Sepharose FF für jeden verwendeten Fluoreszenzfarbstoff bei 20, 50 bzw. 100 mM dargestellt.

Bei einer Salzkonzentration von 20 mM sind für jedes Biokonjugat unterschiedliche Profile zu erkennen: nachdem bis ca. 30 min keine signifikante Proteinkonzentration im Partikel zu beobachten ist, zeigen der CTG-BODIPY und CTG-Cy5 Datensatz ab diesem Zeitpunkt ein Profil mit einem hohen Signal am Rand, welches sich als Konzentrationsring über die Zeit (35 bis 61.5 min) bis in das Partikelzentrum fortsetzt. Während das Signal am Partikelrand näherungsweise konstant bleibt, sinkt das Signal im Partikelzentrum wieder ab. Qualitativ zeigen beide Biokonjugate das selbe Muster, bei dem CTG-Cy5 sowohl früher die Partikelmitte erreicht als auch einen spitzeren und, im Vergleich zum Signal am Partikelrand, höheren Überschuss zeigt als CTG-BODIPY. Im Gegensatz dazu zeigt CTG-Atto635 ein völlig anderes Muster, bei dem am Partikelrand mehr Protein gemessen wird als in der Partikelmitte und diese Verteilung über die Zeit an Intensität zunimmt, bei Beibehaltung der Relationen zueinander. Es ist kein Konzentrationsring zu erkennen, der sich zur Partikelmitte bewegt.

Bei einer Salzkonzentration von 50 mM stimmen qualitativ die gemessenen Profile mit denen bei 20 mM überein. Im Unterschied zu 20 mM ist bei CTG-BODIPY ein potentieller Überschuss aufgrund einer Detektorsättigung nicht beobachtbar. CTG-Cy5 zeigt einen Konzentrationsring, der aber weniger scharf ausgeprägt ist, wie bei 20 mM. Im Gegensatz zu

den Daten bei 20 mM startet die Adsorption bei ca. 8 min und der Konzentrationsring erreicht das Partikelzentrum nach 28 min (CTG-Cy5) anstelle von 56 min bei 20 mM. Für CTG-Atto635 ist im Wesentlichen das gleiche Profil wie bei 20 mM zu erkennen.

Bei 100 mM ist kein differenziertes Muster für jeden Fluoreszenzfarbstoff zu erkennen, sondern die Profile ähneln sich im örtlichen und zeitlichen Verlauf. Eine Adsorption ist schon nach ca. 4 min sichtbar, das intrapartikuläre Profil ist näherungsweise flach über den gesamten Proteinradius und steigt gleichmäßig mit der Zeit an.

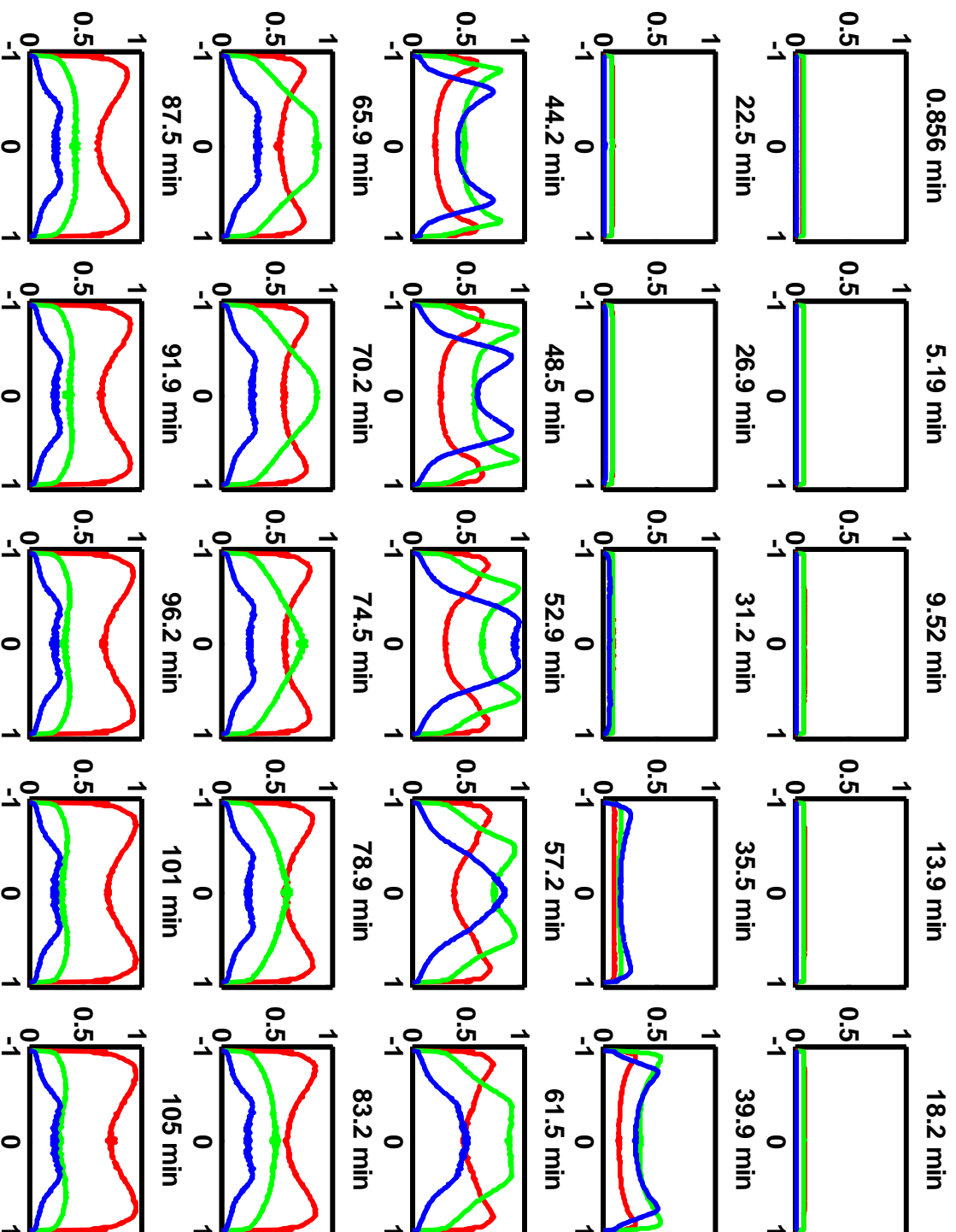


Abbildung 4.7.2. Normierte intrapartikeläre Profile für (—) Atto635, (—) BODIPY und (—) Cy5 Biotinjugate von CTG auf SP Sepharose FF bei 20 mM, pH 7.0, 96 cm/h, D/P 0.01. Signal normiert auf Maximalwert während des Durchbruchs. x-Achse: normierter Radius. y-Achse: normierte Signalintensität.

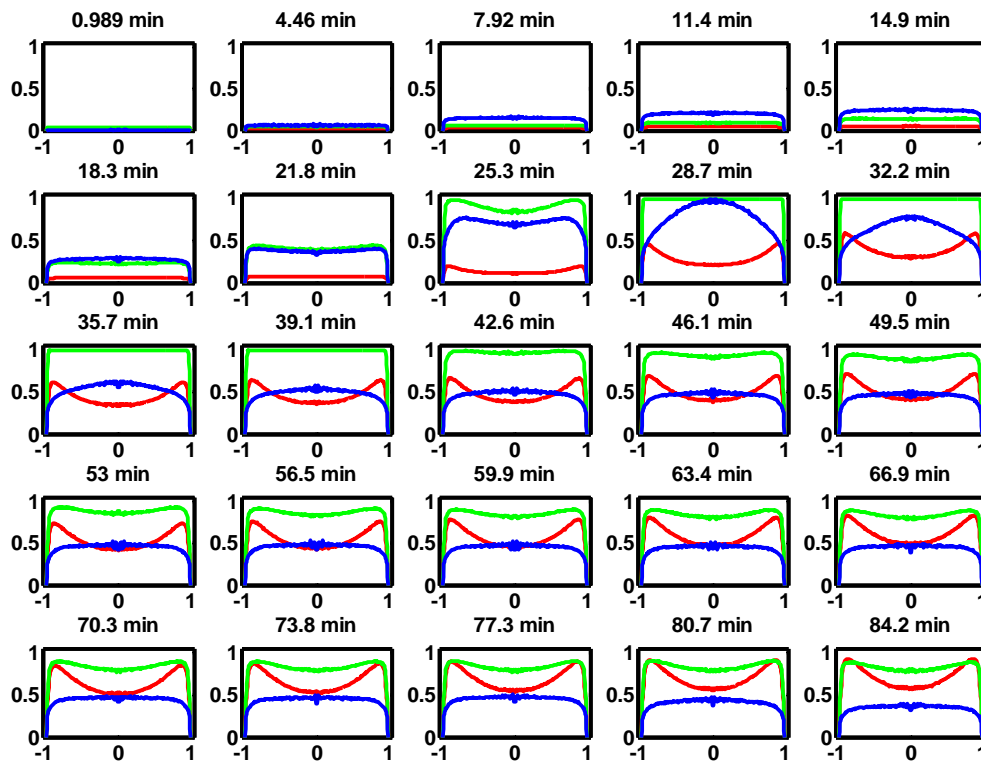


Abbildung 4.7.3. Normierte intrapartikuläre Profile für (→) Atto635, (→) BODIPY und (→) Cy5 Biokonjugate von CTG auf SP Sepharose FF bei 50 mM, pH 7.0, 96 cm/h, D/P 0.01. Signal normiert auf Maximalwert während des Durchbruchs. x-Achse: normierter Radius. y-Achse: normierte Signalintensität.

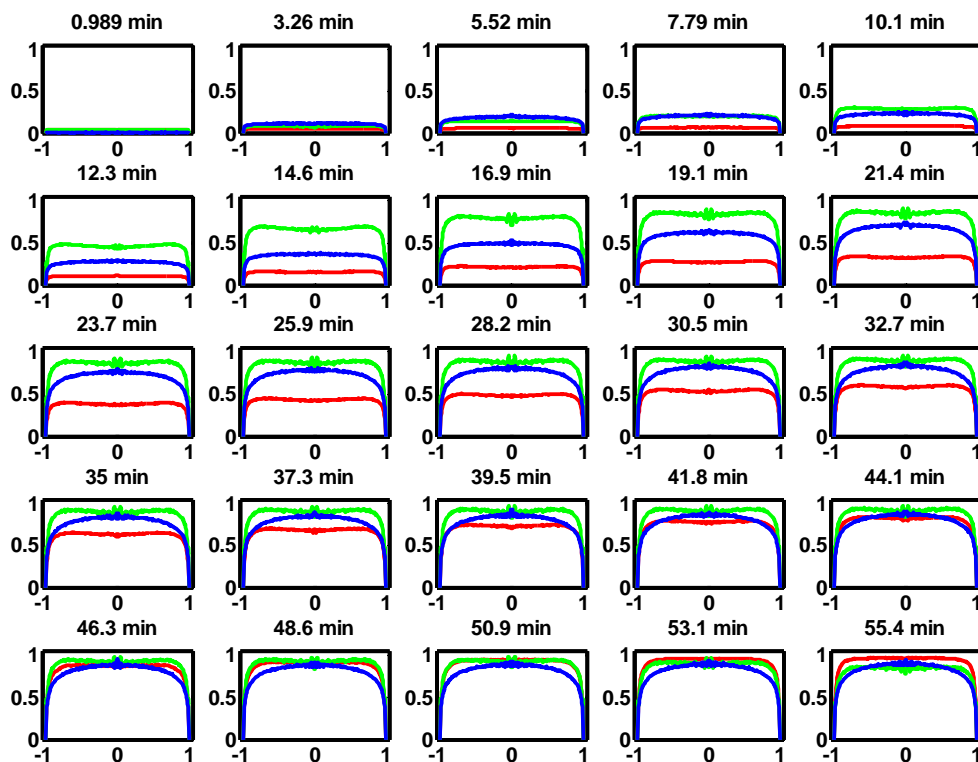


Abbildung 4.7.4. Normierte intrapartikuläre Profile für (→) Atto635, (→) BODIPY und (→) Cy5 Biokonjugate von CTG auf SP Sepharose FF bei 100 mM, pH 7.0, 96 cm/h, D/P 0.01. Signal normiert auf Maximalwert während des Durchbruchs. x-Achse: normierter Radius. y-Achse: normierte Signalintensität.

#### 4.7.2.2 Intrapartikuläre Profile der CTG Biokonjugate auf SP Sepharose XL

Entsprechend der Darstellungen der intrapartikulären Profile für CTG auf SP Sepharose FF werden im Folgenden die intrapartikulären Profile von CTG auf SP Sepharose XL für 20 mM (Abb. 4.7.5), 50 mM (Abb. 4.7.6) und 100 mM (Abb. 4.7.7) für jeden Fluoreszenzfarbstoff dargestellt. Bei 20 mM ist der Start der Adsorption bei ca. 33 min für CTG-Cy5 und 60 min bei CTG-BODIPY oder CTG-Atto635 zu erkennen. Die Profile von CTG-BODIPY und CTG-Cy5 sind vergleichbar, wobei eine frühere Migration von CTG-Cy5 zur Partikelmitte beobachtet wird. Wie bei SP Sepharose FF, deutet das Profil auf eine Verdrängung der Biokonjugate zur Partikelmitte hin, allerdings ist kein eindeutiger Konzentrationsring zu erkennen. Stattdessen wird ein diffuser Überschuss erst nach ca. 65 min für CTG-Cy5 oder 75 min bei CTG-BODIPY deutlich, mit einem höheren Signal in der Partikelmitte, als am Partikelrand. Auch auf SP Sepharose XL bei 20 mM zeigt CTG-Atto635 ein deutlich unterschiedliches Profil im Vergleich mit CTG-Cy5 oder CTG-BODIPY, vergleichbar wie auf SP Sepharose FF, mit einem höheren Signal am Partikelrand, als in der Partikelmitte, über den gesamten Durchbruchversuch.

Bei 50 mM ist bei allen drei Biokonjugaten statt eines differenzierten, radialen Profils ein flaches Profil über den gesamten Partikelradius zu beobachten. Für alle drei Datensätze entwickelt sich das Profil zum Ende dahingehend, daß mehr Protein in der Partikelmitte als am Partikelrand vorliegt, allerdings startet die Adsorption bei CTG-BODIPY und CTG-Cy5 ab ca. 10 min und später für CTG-Atto635 ab ca. 25 min. Für CTG-BODIPY und CTG-Cy5 ist ab ca. 25.5 min ansatzweise ein Überschussprofil zu erkennen.

Wie auch schon bei SP Sepharose FF, existiert bei einer Salzkonzentration von 100 mM kein differenziertes Adsorptionsmuster, sondern die drei Datensätze zeigen eine hohe örtliche und zeitliche Kongruenz, mit einem anfänglichen flachen Profil, welches sich zu einem Profil mit höherem Signal in der Partikelmitte entwickelt.

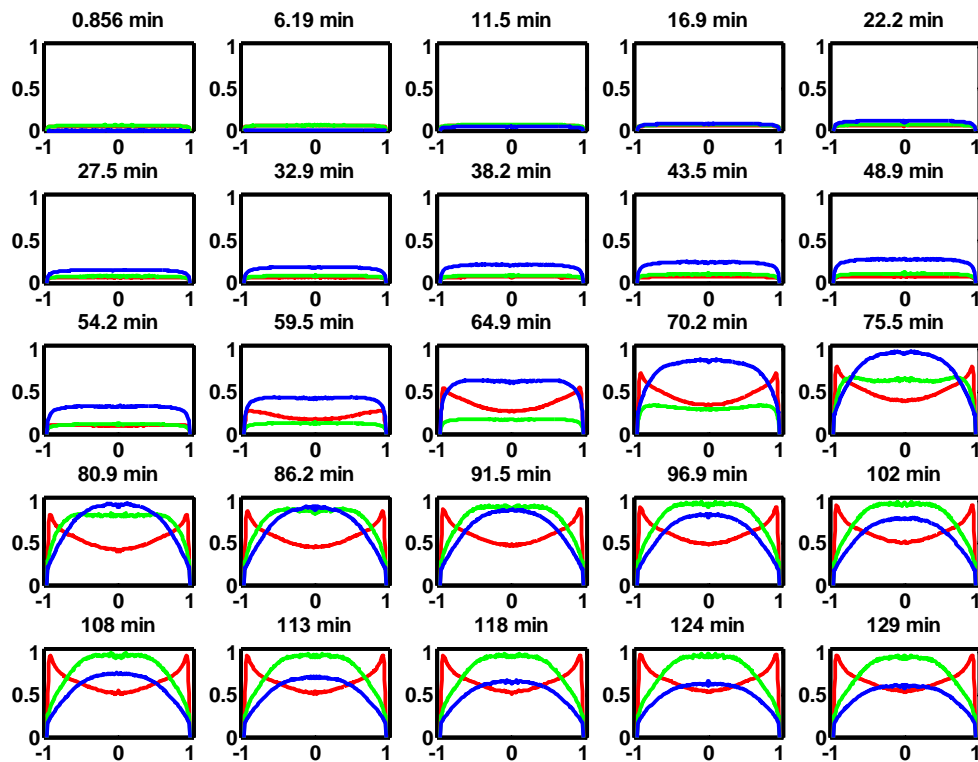


Abbildung 4.7.5. Normierte intrapartikuläre Profile für (—) Atto635, (—) BODIPY und (—) Cy5 Biokonjugate von CTG auf SP Sepharose XL bei 20 mM, pH 7.0, 96 cm/h, D/P 0.01. Signal normiert auf Maximalwert während des Durchbruchs. x-Achse: normierter Radius. y-Achse: normierte Signalintensität.

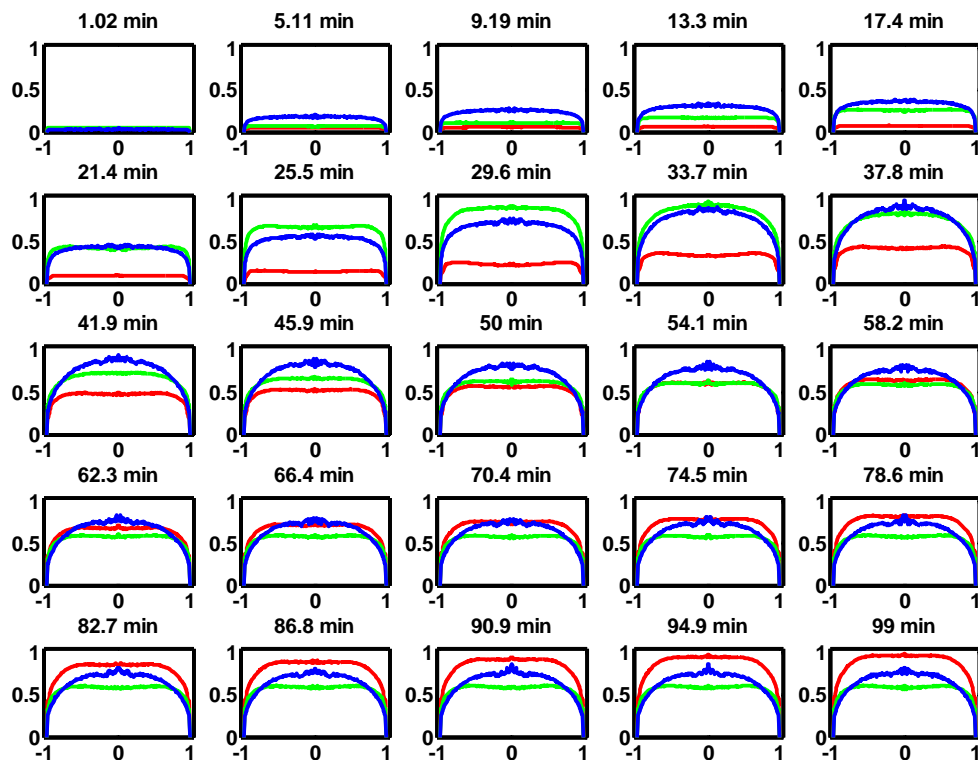


Abbildung 4.7.6. Normierte intrapartikuläre Profile für (—) Atto635, (—) BODIPY und (—) Cy5 Biokonjugate von CTG auf SP Sepharose XL bei 50 mM, pH 7.0, 96 cm/h, D/P 0.01. Signal normiert auf Maximalwert während des Durchbruchs. x-Achse: normierter Radius. y-Achse: normierte Signalintensität.



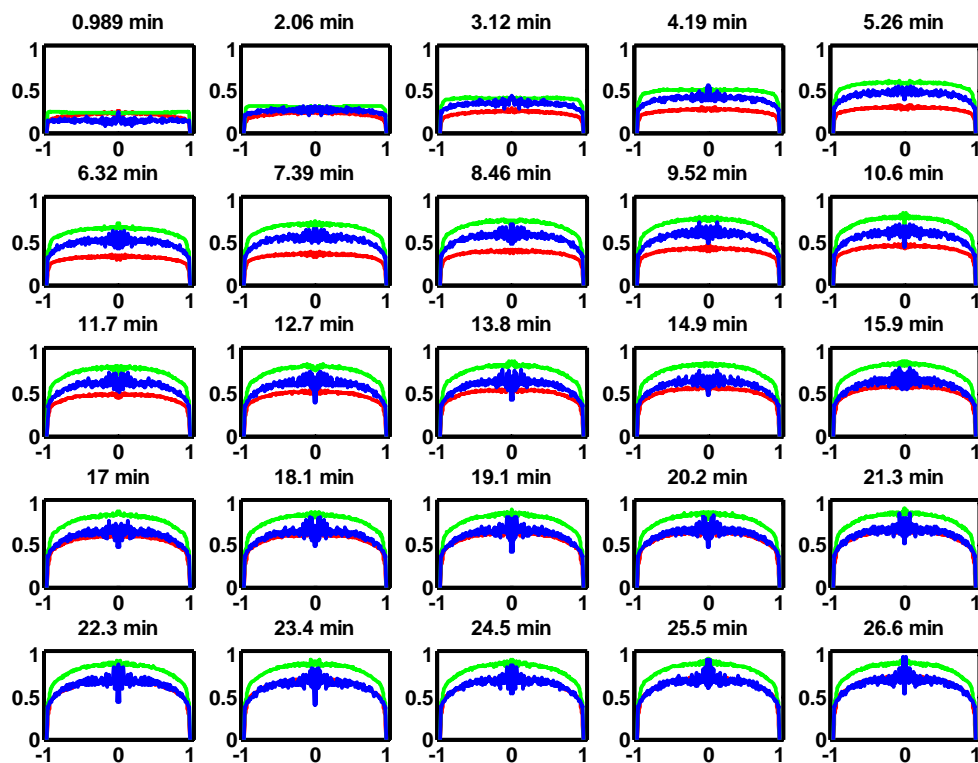


Abbildung 4.7.7. Normierte intrapartikuläre Profile für (→) Atto635, (→) BODIPY und (→) Cy5 Biokonjugate von CTG auf SP Sepharose XL bei 100 mM, pH 7.0, 96 cm/h, D/P 0.01. Signal normiert auf Maximalwert während des Durchbruchs. x-Achse: normierter Radius. y-Achse: normierte Signalintensität.

#### 4.7.2.3 Intrapartikuläre Profile der OVT Biokonjugate auf SP Sepharose FF

Die intrapartikulären Profile der OVT-Biokonjugate auf SP Sepharose FF werden für 10 mM (Abb. 4.7.8), 20 mM (Abb. 4.7.9) und 50 mM (Abb. 4.7.10) dargestellt.

Der Start der Adsorption bei 10 mM ist nahezu sofort bei allen Biokonjugaten zu erkennen. Die verschiedenen Biokonjugate zeigen anfänglich eine stärkere Beladung des Partikelrandes. Nach ca. 33 min kommt es zu einer Differenzierung der drei Profile: bei OVT-Atto635 ist immer eine höhere Proteinkonzentration am Partikelrand zu erkennen. Für OVT-BODIPY und OVT-Cy5 ist ein diffuses Überschussprofil ohne deutlichen Konzentrationsring zu erkennen, welches zeitlich und örtlich für beide Biokonjugate sehr gut übereinstimmt.

Bei 20 mM ist für OVT-Atto635 erst nach ca. 60 min ein stärkerer Anstieg der Randkonzentration gegenüber der Konzentration in der Partikelmitte zu verzeichnen. Bis dahin steigt die Proteinkonzentration relativ gleichmäßig über den gesamten Radius an. Für OVT-BODIPY und OVT-Cy5 ist ein diffuses Überschussprofil zu erkennen. Allerdings kommt es für OVT-BODIPY zu einem diffuseren und für OVT-Cy5 zu einem kaum beobachtbaren Überschuss im Vergleich zur Situation bei 10 mM. Entgegen der Erwartung

zeigt OVT-Cy5 nach ca. 48 min konstant einen Abfall der Proteinkonzentration in der Partikelmitte und ein Anstieg am Partikelrand, was evtl. durch das höhere D/P Verhältnis von 0.1 bei diesem Versuch zu erklären ist, bei dem es zu inneren Filtereffekten beim Überschuß von OVT-Cy5 kommen könnte.

Für 50 mM zeigen alle Biokonjugate im Wesentlichen das gleiche Muster mit einem gleichförmigen Anstieg der Proteinkonzentration über den gesamten Partikelradius über die Zeit, wobei bei allen drei Datensätzen am Partikelrand eine niedrigere Proteinkonzentration gemessen wird, als im Partikelzentrum.

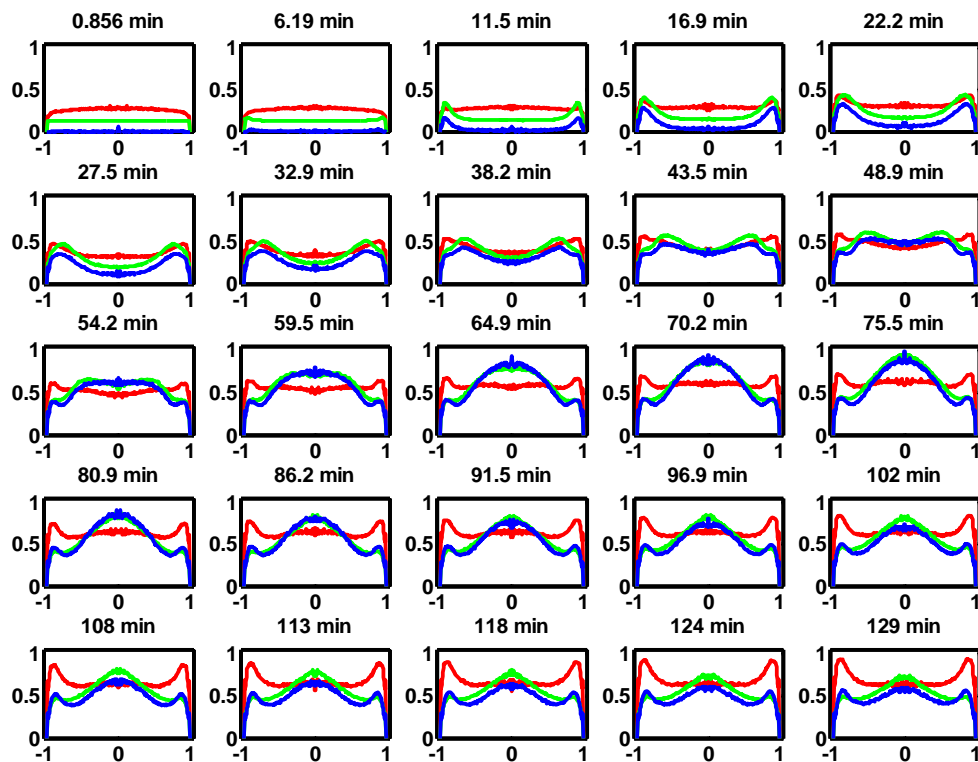


Abbildung 4.7.8. Normierte intrapartikuläre Profile für (—) Atto635, (—) BODIPY und (—) Cy5 Biokonjugate von OVT auf SP Sepharose FF bei 10 mM, pH 6.0, 96 cm/h, D/P 0.01. Signal normiert auf Maximalwert während des Durchbruchs. x-Achse: normierter Radius. y-Achse: normierte Signalintensität.

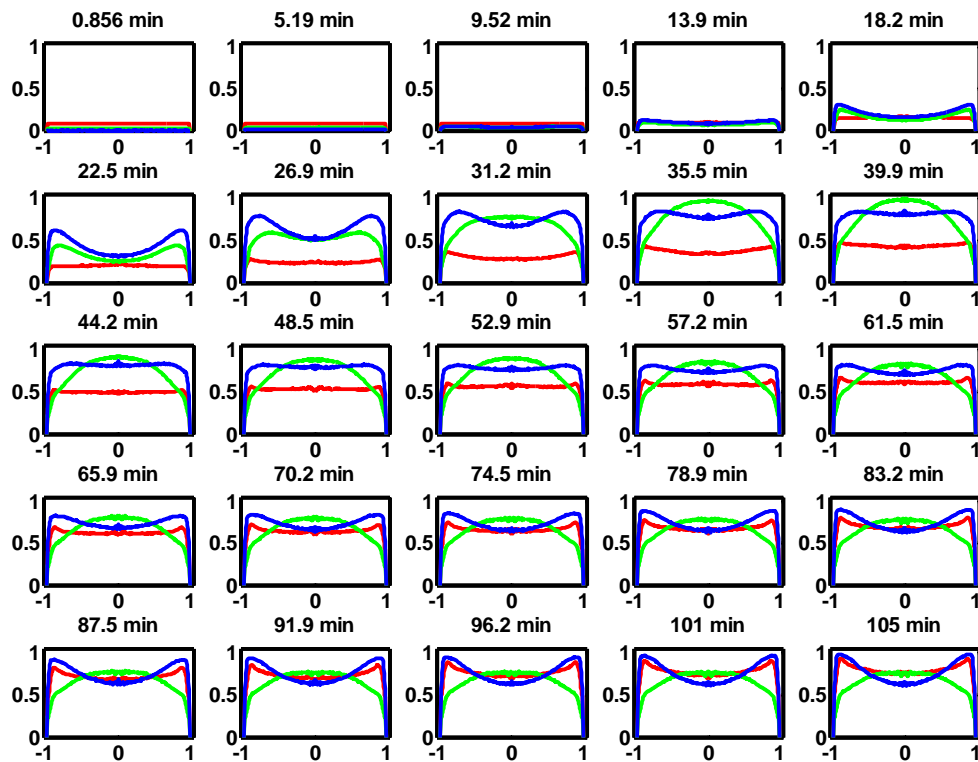


Abbildung 4.7.9. Normierte intrapartikuläre Profile für (—) Atto635, (—) BODIPY und (—) Cy5 Biokonjugate von OVT auf SP Sepharose FF bei 20 mM, pH 6.0, 96 cm/h, D/P 0.1. Signal normiert auf Maximalwert während des Durchbruchs. x-Achse: normierter Radius. y-Achse: normierte Signalintensität.

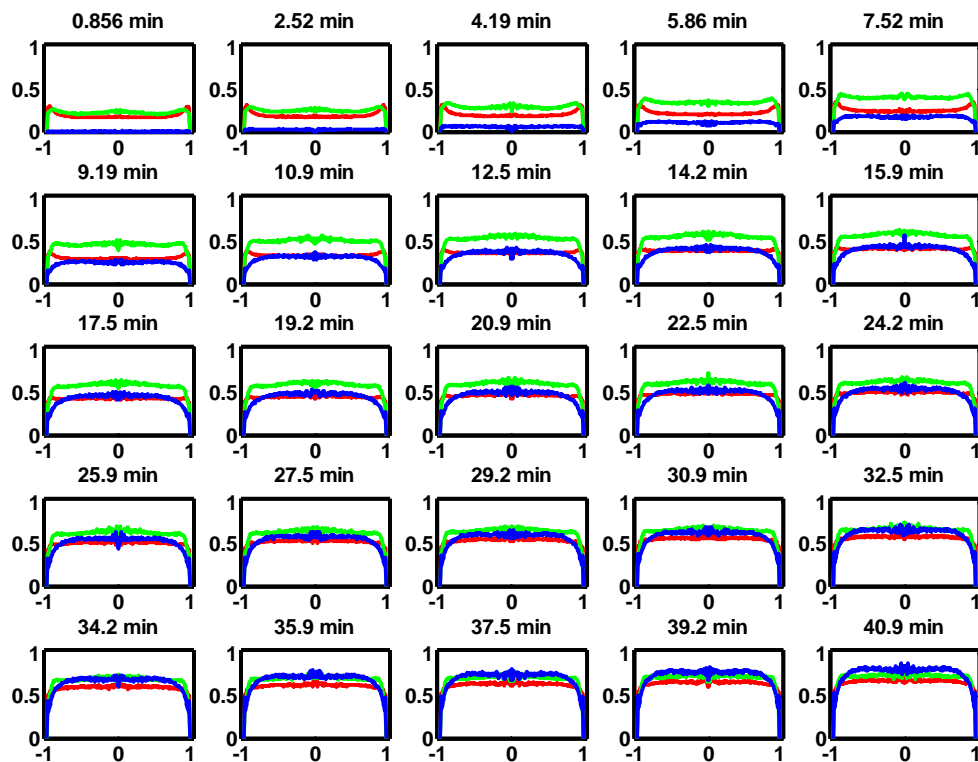


Abbildung 4.7.10. Normierte intrapartikuläre Profile für (—) Atto635, (—) BODIPY und (—) Cy5 Biokonjugate von OVT auf SP Sepharose FF bei 50 mM, pH 6.0, 96 cm/h, D/P 0.01. Signal normiert auf Maximalwert während des Durchbruchs. x-Achse: normierter Radius. y-Achse: normierte Signalintensität.

#### 4.7.2.4 Intrapartikuläre Profile der OVT Biokonjugate auf SP Sepharose XL

Die intrapartikulären Profile für OVT auf SP Sepharose XL für 10, 20 und 50 mM sind in Abb. 4.7.11, Abb. 4.7.12 und Abb. 4.7.13 dargestellt.

Bei 10 mM ist bei allen Biokonjugaten eine initiale Bindung am Partikelrand zu erkennen. Nach ca. 13 min können zwei unterschiedliche Muster beobachtet werden: für OVT-Atto635 steigt das Signal auch im Partikelzentrum an, bei gleichzeitigem Anstieg der Randregionen. Bei OVT-BODIPY, als auch bei OVT-Cy5, ist ein Überschußprofil zu sehen, welches für beide Biokonjugate zeitlich und örtlich näherungsweise gleich verläuft. Im Vergleich mit den Profilen auf SP Sepharose FF ist der Überschuß weniger stark ausgeprägt.

Bei 20 und 50 mM verlaufen die Profile näherungsweise flach über den gesamten Partikelradius für jedes Biokonjugat, wobei der Start der Adsorption bei 50 mM nahezu sofort mit Start der Messung der intrapartikulären Profile zu beobachten ist.

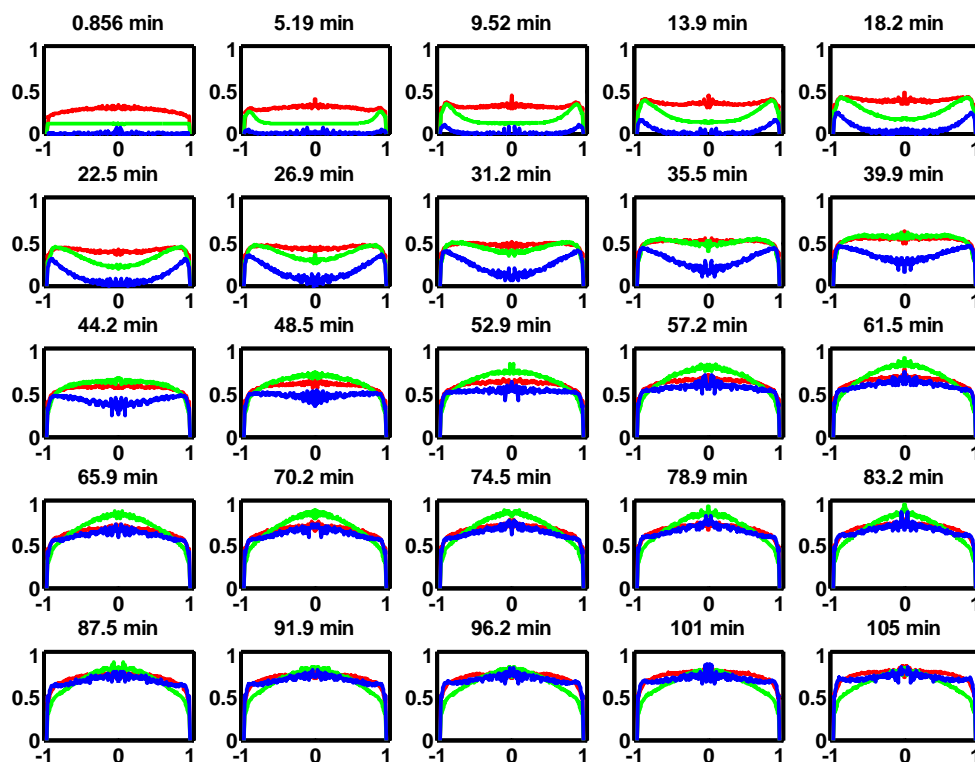


Abbildung 4.7.11. Normierte intrapartikuläre Profile für (—) Atto635, (—) BODIPY und (—) Cy5 Biokonjugate von OVT auf SP Sepharose XL bei 10 mM, pH 6.0, 96 cm/h, D/P 0.01. Signal normiert auf Maximalwert während des Durchbruchs. x-Achse: normierter Radius. y-Achse: normierte Signalintensität.

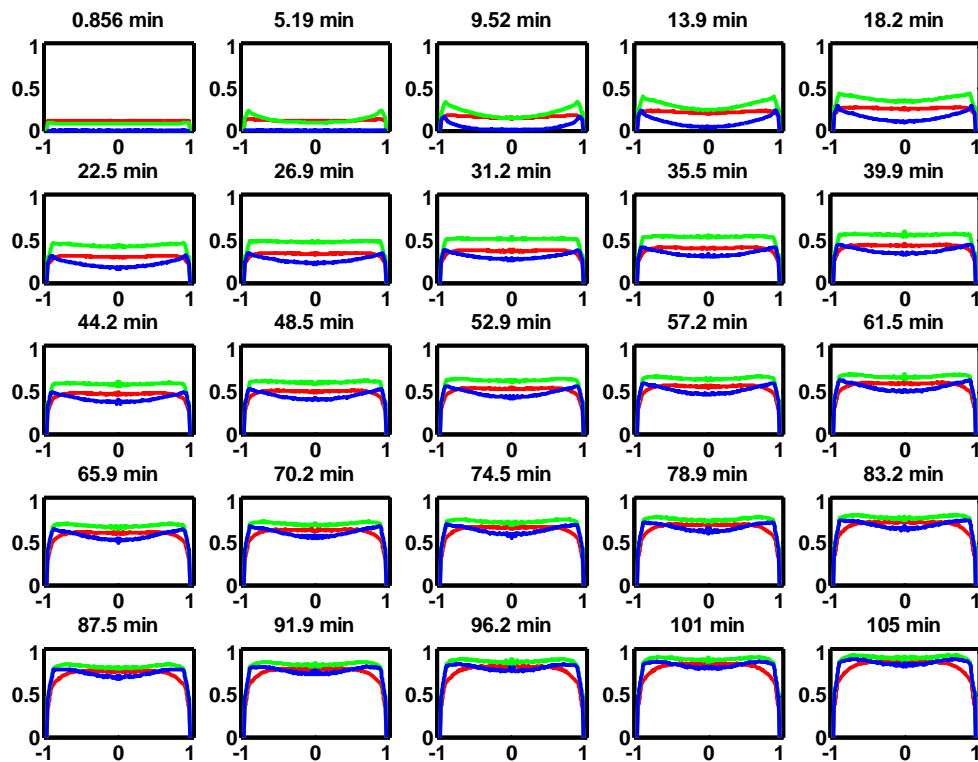


Abbildung 4.7.12. Normierte intrapartikuläre Profile für (—) Atto635, (—) BODIPY und (—) Cy5 Biokonjugate von OVT auf SP Sepharose XL bei 20 mM, pH 6.0, 96 cm/h, D/P 0.1. Signal normiert auf Maximalwert während des Durchbruchs. x-Achse: normierter Radius. y-Achse: normierte Signalintensität.

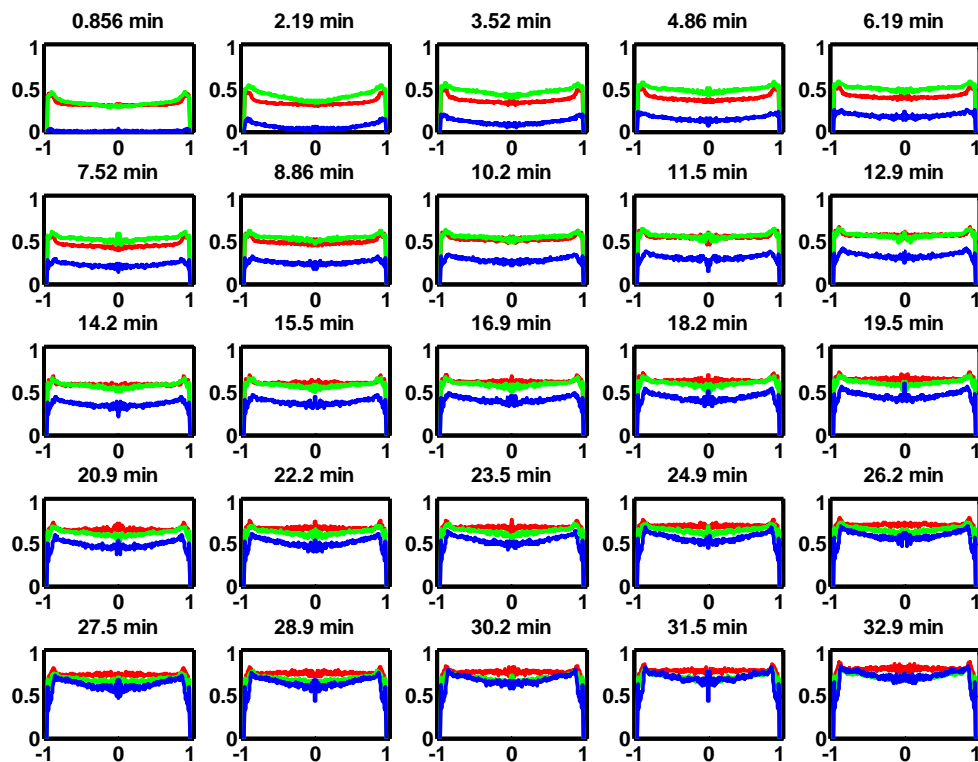


Abbildung 4.7.13. Normierte intrapartikuläre Profile für (—) Atto635, (—) BODIPY und (—) Cy5 Biokonjugate von OVT auf SP Sepharose XL bei 50 mM, pH 6.0, 96 cm/h, D/P 0.01. Signal normiert auf Maximalwert während des Durchbruchs. x-Achse: normierter Radius. y-Achse: normierte Signalintensität.

### 4.7.3 Diskussion

Die Messung intrapartikulärer Proteinkonzentrationsprofile in einem gepackten Bett mittels CLSM wurde in der Literatur in wenigen Studien demonstriert, auf deren Methodik die vorliegende Studie aufbaut (Hubbuch *et al.*, 2002; Hubbuch *et al.*, 2003). Bis auf die Arbeiten von Teske *et al.* (2005) und Teske *et al.* (2006) wird identisches Transport- und Adsorptionsverhalten der Biokonjugate im Vergleich mit den jeweiligen nativen Proteinen angenommen. In keiner Arbeit werden CTG oder OVT als Protein verwendet, sodaß ein direkter Vergleich der Ergebnisse nicht möglich ist. Klassische Untersuchungen mit gepackten Betten und Detektion über die Absorption des Säuleneffluents wurden ebenfalls nicht mit CTG oder OVT auf SP Sepharose FF oder XL bei den gewählten, experimentellen Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse können daher nur bedingt mit Arbeiten zu ähnlichen Festphasen, Proteinen oder Salzkonzentrationen verglichen werden.

#### *Vergleich der Bulkchromatogramme am Partikel mit Chromatogrammen des Säuleneffluents für die Biokonjugate*

Der Vergleich der Bulkchromatogramme, die mittels CLSM am Partikel gemessen wurden, und der Chromatogramme des Säuleneffluents zeigt im Wesentlichen, daß das Biokonjugat in Form eines konstanten bzw. proportionalen Musters (Hall *et al.*, 1966) durch die Säule migriert. Für jedes Experiment zeigt sich ein nahezu identisches Chromatogramm sowohl am Partikel, als auch im Säuleneffluent, welches, beeinflusst durch die Säulenkapazität, zu späteren Elutionszeiten verschoben ist. Zusammen mit dem Vergleich der Durchbruchkurven des nativen Proteins auf der Mikrosäule und auf konventionellen Säulen (vgl. Kapitel 4.5 und 4.6) unterstreichen die dargestellten Ergebnisse die Annahme, daß die Messungen mit der Mikrosäule unter adsorptiven Bedingungen repräsentativ für chromatographische Trennungen auf industriell verwendeten Festphasen sind. Die Daten des Säuleneffluents können für die Signalrekonstruktion des nativen Bulkchromatogramms am Partikel verwendet werden.

Die quantitativen Diskrepanzen zwischen dem Chromatogramm am Partikel und im Säuleneffluent für CTG-Atto635 sind durch das Normierungsverfahren zu erklären: das Signal am Säulenende für CTG-Atto635 entspricht noch nicht einem Gleichgewichtszustand. Weil das Chromatogramm des Säuleneffluents verzögert dem Bulkchromatogramm am Partikel entspricht, ist das maximale Signal am Partikel, auf das normiert wird, höher, im Vergleich zum beobachteten ersten Anstieg, als das Signal am Säulenende. Deswegen

erscheint das Signal des ersten Durchbruchs, direkt nach Start der Proteinauftragung, am Säulenausgang höher als am Partikel. Da der erste Durchbruch auf eine nicht-bindende Komponente zurückzuführen ist (vgl. Kapitel 4.5 und 4.6), ist keine nennenswerte Verzögerung zwischen dem Bulkchromatogramm am Partikel und dem Signal am Säulenende zu verzeichnen.

### ***Intrapartikuläre Profile der CTG Biokonjugate auf SP Sepharose FF***

Die intrapartikulären Adsorptionsprofile der jeweiligen Biokonjugate weisen ein unterschiedliches Muster auf, welches mit sinkender Salzkonzentration stärker differenziert ist. Dabei zeigen CTG-BODIPY und CTG-Cy5 näherungsweise ein vergleichbares Adsorptionsmuster, wohingegen CTG-Atto635 ein deutlich unterschiedliches besitzt. Die Adsorptionsprofile von CTG-BODIPY und CTG-Cy5 bei 20 und 50 mM weisen ein Überschußprofil auf, welches, bei Annahme eines Einzelkomponentensystems nicht über ein sphärisches Diffusionsmodell (vgl. Kapitel 2.5 und 2.7.4) erklärt werden könnte, weil während der Adsorption im Partikelinneren eine höhere Konzentration, als in den äußeren Bereichen vorliegt. Entsprechend den Ergebnissen aus Kapitel 4.5 und 4.6 passt dieses Adsorptionsverhalten zu einem Verdrängungsmodell, bei dem die schwächer bindenden BODIPY und Cy5 Konjugate vom nativen CTG zum Partikelzentrum verdrängt werden. Dieser Effekt ist umso prägnanter ausgeprägt, je höher die Bindungsstärken der Biokonjugate sind. D.h. je niedriger die Salzkonzentration, desto ausgeprägter sind Konzentrationsringe und Überschußprofile. Dabei muß auch beachtet werden, daß sich das Adsorptionsmuster des nativen Proteins, welches nicht meßbar ist, sich mit der Salzkonzentration ändert und das Verhalten des nativen Proteins das Adsorptionsmuster der Biokonjugate beeinflusst. Die Abwesenheit eines deutlichen Überschußprofils bei 100 mM lässt sich über die geringere Bindungsstärke sowohl des Biokonjugates, als auch des nativen Proteins erklären. Die geringe Bindungsstärke lässt sich auch an dem flachen Profil erkennen, welches nahezu von Beginn an zu beobachten ist. Im Gegensatz zu den teilweise beobachteten „shrinking core“ Adsorptionsprofilen mit einer steilen Adsorptionsfront (Linden, 2001), die gleichbedeutend mit einer näherungsweise rechteckigen Adsorptionsisotherme sind, ist die Bindungsaffinität von CTG zu SP Sepharose FF auch bei der niedrigsten Salzkonzentration so niedrig, daß es nicht zur Ausbildung eines „shrinking core“ Profils kommt.

Die Abwesenheit eines Überschußprofils bei CTG-Atto635 unterstreicht die Annahme, daß Atto635 Biokonjugate stärker als das respektive native Protein binden und nicht verdrängt werden.

#### ***Intrapartikuläre Profile der CTG Biokonjugate auf SP Sepharose XL***

Qualitativ stimmen die intrapartikulären Profile der CTG Biokonjugate auf SP Sepharose XL mit denen auf SP Sepharose FF überein. Auch hier sind für CTG-BODIPY und –Cy5 bei 20 und 50 mM die Effekte der Verdrängung zu erkennen und CTG-Atto635 zeigt kein Profil, welches auf Verdrängungseffekte hindeutet. Die Adsorptionsprofile bei 20 mM für CTG-BODIPY und CTG-Cy5 zeigen keine deutlichen Konzentrationsringe auf und ähneln eher der Situation von CTG bei 50 mM auf SP Sepharose FF. Dies kann einerseits durch die geringere Bindungsaffinität von CTG auf SP Sepharose XL im Vergleich mit SP Sepharose FF hervorgerufen werden. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß durch die Anwesenheit der Dextranketten der intrapartikuläre Transport verlangsamt wird und dementsprechend die Profile weniger scharf sind.

Allgemein besteht auch die Möglichkeit, daß veränderte Ad- und Desorptionsgeschwindigkeiten sowohl des Biokonjugates als auch des nativen Proteins die intrapartikulären Profile beeinflussen. Allerdings ist es aufgrund des komplexen Zusammenspiels der Adsorptionsisothermen, intrapartikulären Diffusion und Sorptionsgeschwindigkeiten schwierig, den entscheidenden Faktor für die beobachteten Unterschiede zwischen den Festphasen aus den gemessenen Adsorptionsprofilen zu ermitteln.

#### ***Intrapartikuläre Profile der OVT Biokonjugate auf SP Sepharose FF***

Auch für die OVT-Biokonjugate auf SP Sepharose FF sind qualitativ vergleichbare Adsorptionsmuster für die jeweiligen Biokonjugate zu erkennen: OVT-BODIPY und OVT-Cy5 zeigen Profile, die auf Verdrängungsprozesse der Biokonjugate durch das native Protein hindeuten, bei niedriger Salzkonzentration. OVT-Atto635 verhält sich wie eine nicht verdrängte Species.

Bei 10 mM zeigt sich der Verdrängungseffekt für OVT-BODIPY und OVT-Cy5 erst nach einer Adsorptionsphase von ca. 38 min. Ein verzögertes Auftreten einer sichtbaren Konkurrenz zwischen Biokonjugat und nativem Protein ist auch bei CTG auf SP Sepharose XL (20 mM) zu erkennen und könnte durch die geringere Bindungsaffinität aller



Komponenten hervorgerufen werden, die erst im Laufe des Durchbruches mit zunehmender Beladung zu einer sichtbaren Verdrängung führt.

Das ungewöhnliche Verhalten von OVT-Cy5 bei 20 mM könnte durch das 10-fach höhere D/P Verhältnis bei den Versuchen mit OVT bei 20 mM erklärt werden: der Überschuß von OVT-Cy5 auf SP Sepharose FF könnte eine so hohe Cy5 Konzentration erzeugen, die zu einem inneren Filtereffekt führt, bei dem das Signal mit steigender Fluoreszenzfarbstoffkonzentration zuerst konstant bleibt und später sogar sinkt.

### ***Intrapartikuläre Profile der OVT Biokonjugate auf SP Sepharose XL***

Die intrapartikulären Profile der OVT Biokonjugate auf SP Sepharose XL weisen nur bei 10 mM Anzeichen einer Verdrängung der BODIPY und Cy5 Konjugate zum Partikelzentrum auf, wohingegen bei 20 und 50 mM die Profile nahezu flach über den gesamten Partikelradius sind. Aufgrund der geringen Kapazität von OVT unter diesen Bedingungen sind diese Profile zu erwarten, weil weder das native OVT noch die Bionkonjugate eine ausreichende Bindungsaffinität besitzen, als das es zur Ausbildung von Konzentrationsringen oder eines ausgeprägten Überschußprofils käme. Die Situation für OVT auf SP Sepharose XL ähnelt der Situation bei 100 mM für CTG, weil auch dort die Bindungsaffinität niedrig ist und kein differenziertes Profil für jedes Biokonjugat zu beobachten ist.

### ***Konfokale Messung von Adsorptionsvorgängen von Proteinen auf Einzelpartikelniveau***

Die Untersuchungen von CTG und OVT auf SP Sepharose FF und XL zeigen teilweise Effekte, die durch Verdrängungsprozesse der Biokonjugate durch das native Protein hervorgerufen werden. Im Folgenden werden die diskutierten Ergebnisse mit Daten aus Veröffentlichungen in Beziehung gesetzt, Gründe für das Auftreten dieses Effektes gegeben und die Konsequenzen für die Messung und Modellierung von Adsorptionsprofilen auf Einzelpartikelniveau mittels CSLM genannt.

Publikationen zum Thema Proteintransport und -adsorption, die CLSM für Transportuntersuchungen verwenden, gehen von der Annahme aus, daß sich das Biokonjugat nicht oder nur unwesentlich vom nativen Protein unterscheidet (Dziennik *et al.*, 2003; Hubbuch *et al.*, 2002; Linden *et al.*, 2002; Hubbuch *et al.*, 2003; Hubbuch *et al.*, 2003). Für die konfokalen Untersuchungen hat dies zur Folge, daß die gemessenen Signale als repräsentativ für das native Protein angesehen werden. Typischerweise werden konfokale

Adsorptionsversuche mit einem D/P von 0.01 durchgeführt, um innere Filtereffekte und Quenching zu vermeiden. D.h. nur jedes 100ste Protein ist ein Biokonjugat und das native Protein liegt im Überschuß vor.

In Kapitel 4.5 wurde gezeigt, daß sich das adsorptive Verhalten der Biokonjugate von dem der nativen Proteine unterscheidet und teilweise (CTG-Cy5) unterschiedlich substituierte Biokonjugate vorliegen.

Die Durchbruchversuche aus Kapitel 4.6 mit den unterschiedlichen Biokonjugaten bestätigen die Annahme eines unterschiedlichen Verhaltens der Biokonjugate gegenüber dem nativen Protein, indem Verdrängungseffekte durch kompetitive Adsorption der beiden Proteinspecies gezeigt wurden. Generell zeigen Atto635 Konjugate eine stärkere Bindung als das native Protein, wohingegen BODIPY und Cy5 Konjugate schwächer als das native Protein binden. Dabei zeigen die Cy5 Konjugate eine nochmals schwächere Bindung im Vergleich zu den BODIPY Konjugaten. Die Möglichkeit einer Verdrängung von Proteinkomponenten unter kompetitiven Bedingungen ist unter den gewählten experimentellen Bedingungen wahrscheinlich und wurde in der Literatur dokumentiert, sodaß auch die konfokalen Daten von diesen Implikationen betroffen sein können (Teske *et al.*, 2005; Gallant, 2003).

In einer Reihe von Publikationen wurden mittels CLSM ungewöhnliche Adsorptionsmuster für Proteine auf unterschiedlichen Ionenaustauschermaterialien gemessen, die sich nicht mit herkömmlichen Modellen (vgl. Kapitel 2.7) beschreiben lassen (Dziennik *et al.*, 2003; Hubbuch *et al.*, 2002; Linden *et al.*, 2002; Hubbuch *et al.*, 2003; Hubbuch *et al.*, 2003). Das als Überschuß bezeichnete Phänomen wurde als beschleunigte Proteinaufnahme identifiziert (Dziennik *et al.*, 2003; Hubbuch *et al.*, 2002; Hubbuch *et al.*, 2003). Für die Beschreibung der beobachteten Stofftransportvorgänge wurde ein Transportmodell vorgestellt, welches den radialen Gradienten der adsorbierten Proteinkonzentration mit dem radialen Gradienten des elektrostatischen Potentials verknüpft und über die Nernst-Planck Diffusionsgleichung eine zusätzliche Triebkraft für den Stofftransport bereitstellt (Dziennik *et al.*, 2003). Änderungen im elektrostatischen Potential werden durch die Adsorption der geladenen Proteine an die Oberfläche der Ionenaustauscher hervorgerufen. Der Ansatz kann, mit physikalisch sinnvollen Parametern, qualitativ einen Überschuß in der Proteinkonzentration im Porenraum des Partikels erzeugen, ohne die gemessenen Daten zu beschreiben.

In einem anderen Ansatz wurde der oben genannte Ansatz um die diskrete Modellierung der Protein- und Salzionenstofftransportvorgänge und der detaillierten Beschreibung der elektrischen Doppelschicht mit lokalen Gradienten im elektrostatischen Potential erweitert (Liapis *et al.*, 2005; Liapis und Grimes, 2005). Auch dieser Ansatz ist nur qualitativ im

Stand, einen Überschuss im Partikel zu modellieren, der zudem mit physikalisch unrealistischen Parametern für die Isothermen gerechnet wurde und Inkonsistenzen in der Modellformulierung der Elektroneutralität und elektrischen Kopplung der Stofffluxe beinhaltet (Dziennik *et al.*, 2003).

In Validierungsstudien wurde die Abwesenheit von Kontaminanten in der Proteinlösung, die den Überschuss erzeugen könnten, dokumentiert (Dziennik *et al.*, 2003), sowie die Gleichheit zwischen nativem Protein und Biokonjugat in Gelfiltrationsexperimenten und unter adsorptiven Bedingungen aufgezeigt (Linden *et al.*, 2002; Linden, 2001). Die Möglichkeit eines identischen Stofftransportverhaltens unter nicht-bindenden Bedingungen wurde in Kapitel 4.1 demonstriert. Allerdings kann daraus keine Gleichheit unter adsorptiven Bedingungen abgeleitet werden (vgl. Kapitel 4.5). Die Chromatogramme unter adsorptiven Bedingungen wurden bei 220 nm untersucht und nicht zusätzlich beim Absorptionsmaximum des verwendeten Farbstoffs (Linden, 2001). Da das Biokonjugat nur einen geringen Anteil der gesamten Proteinmenge ausmacht, würde eine Änderung der Retentionszeiten nur in Ausnahmefällen bei 220 nm detektiert werden können.

Ergebnisse von Teske *et al.* (2005), Teske *et al.* (2006) und den Elutions- und Durchbruchstudien aus Kapitel 4.5 und 4.6 legen den Schluß nahe, daß die beobachteten Überschussphänomene in den genannten Studien, und für die BODIPY und Cy5 Biokonjugate von CTG und OVT bei niedriger Salzkonzentration, durch Verdrängungsprozesse der Biokonjugate durch das native Protein bewirkt werden.

Die gemessenen intrapartikulären Profile sind in qualitativer Übereinstimmung mit Arbeiten von Teske *et al.* (2005) und können über ein kompetitives Multikomponenten Adsorptionsmodell verstanden werden (Gallant, 2003; Lewus und Carta, 1999; Carta *et al.*, 2005). Das mit dem CLSM gemessene Signal korreliert mit dem Verhalten des Biokonjugats. Das native Protein ist 100-fach im Überschuss gegenüber den Biokonjugaten und adsorbiert unter nichtlinearen Bedingungen auf der Festphase während des Durchbruchversuchs. Konzentrationsringe und Überschussprofile, wie sie in Abb. 4.7.2 zu sehen sind oder in Publikationen beschrieben werden (Dziennik *et al.*, 2003; Hubbuch *et al.*, 2002; Hubbuch *et al.*, 2003) wurden u.a. in einem Partikelmodell, welches das SMA Modell zur Beschreibung der kompetitiven Adsorption zweier Proteine verwendet, gefunden (Gallant, 2003; Teske *et al.*, 2006). Teske *et al.* (2005) demonstrierte, daß LYS-BODIPY und LYS-Cy5 Konjugate durch natives LYS nach einem Durchbruchversuch verdrängt werden können, wohingegen LYS-Atto635 nicht verdrängt wird, was für das Nettoladungskonzept spricht (vgl. Kapitel 4.5).

Zusammenfassend spricht gegen die vorgeschlagenen erweiterten Stofftransportmodelle auf Basis von elektrokinetischen Stofftransportvorgängen der meßbare Unterschied im Retentionsverhalten der Biokonjugate im Vergleich zum nativen Protein, die näherungsweise über das Nettoladungskonzept erklärt werden können, sowie die unterschiedlichen Ergebnisse bei den Durchbruchuntersuchungen in Abhängigkeit vom verwendeten Farbstoff. Die Abwesenheit eines Überschusses bei Verwendung des positiv geladenen Atto635 Farbstoffes ist ein eindeutiger Hinweis auf das Verdrängungskonzept zur Beschreibung der auftretenden Stofftransportphänomene.

Die Abwesenheit von Konzentrationringen bei höheren Salzkonzentrationen, wie sie in Abb. 4.6.7 - 4.6.9 aufgezeigt werden, kann durch fehlende Konkurrenz bei schwacher Bindungsstärke erklärt werden. U.U. ist auch bei hohen Salzkonzentrationen ein Konzentrationsring zu beobachten, der aber aufgrund der niedrigen Kapazität der Festphase so schnell abläuft, daß er von den CLSM Messungen nicht erfasst wird.

Die Abwesenheit eines Überschusses bei z.B. BSA auf SP Sepharose FF (Linden, 2001) bei einem pH-Wert von 4.5 könnte durch Denaturierung des BSA Moleküls nach Bindung an den Ionentauscher erklärt werden (Tanford, 1961). Die Bindung sowohl des nativen Proteins als auch des Biokonjugates wäre demnach vollständig irreversibel, sodaß keine Verdrängung stattfindet.

Die Abwesenheit eines Überschusses bei Untersuchungen auf Protein A Medien (Ljunglöf und Hjorth, 1996) ist zu erwarten, wenn die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes nicht im Bereich der Bindestellen eines Antikörpers mit Protein A erfolgt und der verwendete Fluoreszenzfarbstoff keine nicht-spezifischen Interaktionen mit der Festphase oder Protein A ausbildet. D.h. die Signale der Stofftransportmessungen in der Chromatographie mittels CLSM können u.U. direkt mit dem nativen Protein gleichgesetzt werden, wenn die Bindungsaffinität zum chromatographischen Medium nicht durch die Anwesenheit des Fluoreszenzfarbstoffes gestört wird. Weiterhin ist zu erwarten, dass unter sehr affinen Bindungsbedingungen wie z.B. in der Affinitätschromatographie die Bindung zu stark ist, um sichtbare Verdrängung zu erzeugen.

Die weitere Analyse und Modellierung von konfokalen Daten unter adsorptiven Bedingungen bei Ionentauschern mit fluoreszenzmarkierten Proteinen muß daher unter folgenden Gesichtspunkten stattfinden:

- das gemessene Signal entspricht nicht dem Stofftransportverhalten des nativen Proteins

- das gemessene Signal repräsentiert das Adsorptionsverhalten des Biokonjugates, welches durch die 100 mal größere Konzentration des nativen Proteins beeinflusst wird
- das Biokonjugat kann unterschiedlich stark substituierte oder an unterschiedlichen Stellen substituierte Varianten, sowie fluoreszenzmarkierte Kontaminaten enthalten, sodaß das resultierende Signal eine Überlagerung dieser Komponenten ist

Es ist zu erwarten, daß sich die gemessenen Adsorptionsprofile der Biokonjugate in deutlicher Weise von den Profilen des jeweiligen nativen Proteins unterscheiden, speziell bei stärkerer Adsorption (niedrige Salzkonzentration), sodaß die Ermittlung des Adsorptionsprofils des nativen Proteins nur über ein modell-gestütztes Verfahren zu erreichen ist und nicht direkt aus den experimentellen Daten abgeleitet werden kann.

Ein GRM, welches die kompetitive Adsorption von Proteinen beschreiben kann (vgl. Kapitel 2.7), erscheint geeignet, um die beobachteten intrapartikulären Profile zu modellieren. Eine Erweiterung der Stofftransporttriebkkräfte um eine elektrokinetische Komponente ist aufgrund der oben genannten Argumente nicht sinnvoll.

## 4.8 Adsorption von nativen Proteinen und Biokonjugaten auf Kationentauscher – Modellierung und Simulation

Nachdem die intrapartikulären Profile im vorangegangenen Kapitel beschrieben und die Durchbruchkurven über die Absorption des Säuleneffluents charakterisiert wurden (Kapitel 4.6), wird im Folgenden das in Kapitel 2.7.5 vorgestellte GRM mit den in Kapitel 4.3 und 4.5 ermittelten Parameter verwendet, um die intrapartikulären Profile eines ausgewählten Datensatzes (CTG auf SP Sepharose FF) zu simulieren. Für die Simulation der intrapartikulären Adsorptionsprofile wird ein 2-Komponentensystem, bestehend aus dem nativen Protein und dem jeweiligen Biokonjugat, angenommen.

Die Simulation verwendet die Approximation des Bulkchromatogramms des nativen Proteins, welches abgeleitet wird aus dem Chromatogramm am Säuleneffluent.

Die Simulationen der intrapartikulären Adsorptionsprofile sollen untersuchen, ob das SMA-basierte GRM in der Lage ist, die experimentellen Daten zu beschreiben. Speziell das Auftreten und die Form von Konzentrationsringen und Überschußprofilen wird überprüft. Die experimentell nicht zugänglichen Profile des nativen Proteins werden simuliert und können auf ihre Plausibilität überprüft werden.

Die gefunden Übereinstimmungen und Unterschiede der Simulationsergebnisse werden diskutiert und mit veröffentlichten Daten in Beziehung gesetzt. Schließlich sollen die Limitierungen des gewählten Ansatzes gezeigt und Ansätze für eine Verbesserung der Modellierung und Simulation der intrapartikulären Profile aufgezeigt werden.

### 4.8.1 Übersicht der Simulationsparameter

Die SMA Parameter werden den Ergebnissen aus Kapitel 4.5 entnommen und für den intrapartikulären Diffusionskoeffizienten werden die Daten aus Kapitel 4.3 von Sepharose 6 FF verwendet. Dementsprechend ist  $D_{ip}$  für CTG  $5.51 \cdot 10^{-11}$  m<sup>2</sup>/s. Für den intrapartikulären Diffusionskoeffizienten der Natriumionen wird  $1.6 \cdot 10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s angenommen (Teske *et al.*, 2006).

Die intrapartikulären Adsorptionsprofile und der Verlauf der Bulkkonzentration der Biokonjugate werden aus den experimentellen Daten der CLSM Messungen entnommen (vgl. Kapitel 4.7). Der Verlauf der Bulkkonzentration des nativen Proteins kann nicht mittels CLSM gemessen werden (vgl. Kapitel 4.6 und 4.7) und muß approximiert werden (s.u.).

Die Konzentration der Natriumionen entspricht der eingesetzten Pufferkonzentration des jeweiligen Versuchs. Als Startbedingung wird angenommen, daß die Partikel equilibriert sind und kein Protein im Partikel oder Bulk vorliegt.

Die Festphasenparameter wurden auf gepackten Säulen für die SMA Parametergenerierung gemessen (Kapitel 4.5) und für SP Sepharose FF wird für  $\Lambda$  551 mM und für  $\epsilon_p$  0.679 verwendet.

#### 4.8.2 Modellierung der Bulkchromatogramme am Partikel für das native Protein

Für die Modellierung der intrapartikulären Profile während des Durchbruchs wird der Verlauf der Bulkkonzentration des nativen Proteins benötigt, welches nicht direkt experimentell bestimmt werden kann (vgl. Kapitel 2.7.5 und 4.7). Wie in Kapitel 4.7 für das Biokonjugat gezeigt wurde, migrieren die Proteine in Form eines konstanten Musters durch das gepackte Bett. Somit kann der Verlauf des nativen Proteins am Partikel aus dem Verlauf des Chromatogramms des Säuleneffluents abgeleitet werden. Für die Modellierung der Durchbrüche mit den jeweiligen Biokonjugaten wird immer dasselbe Bulkchromatogramm des nativen Proteins verwendet, weil sich das Durchbruchverhalten des nativen Proteins nicht durch die Anwesenheit des Biokonjugates ändert (vgl. Kapitel 4.6).

Um das Bulkchromatogramm des nativen Proteins in geeigneter Form für die Simulation der intrapartikulären Profile zur Verfügung zu stellen, wird das Chromatogramm mit einer Funktion beschrieben, die vier Parameter beinhaltet, um die Durchbruchkurven zu beschreiben (vgl. Kapitel 3.5.3). Die vier Parameter wurden manuell durch den Vergleich mit dem Chromatogramm des nativen Proteins am Säuleneffluent bestimmt.

In Abb. 4.8.1 sind die simulierten Bulkchromatogramme des nativen Proteins zusammen mit den Chromatogrammen des Säuleneffluents dargestellt. Der Verlauf der Chromatogramme des nativen Proteins kann mit der Funktion gut nachverfolgt werden.

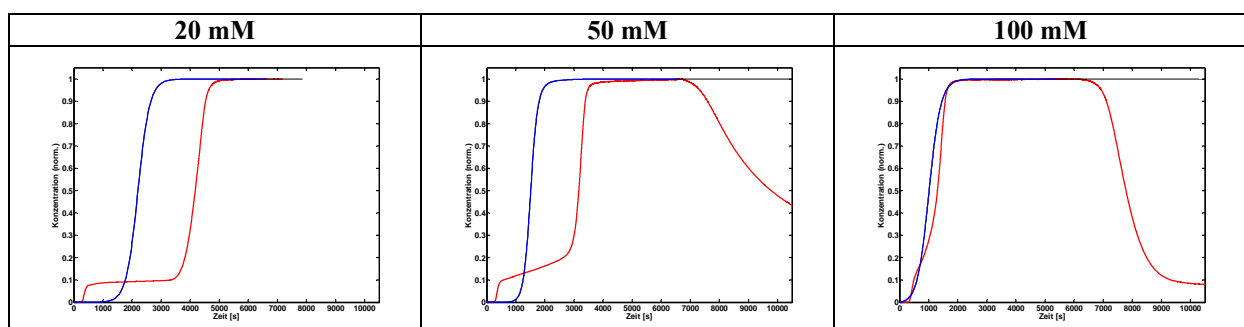


Abbildung 4.8.1. (—) Gemessene Durchbruchkurven des nativen Proteins im Säuleneffluent und (—) simulierte Durchbruchkurven am Partikel für CTG auf SP Sepharose FF. (—) Waschphase die nicht für die Modellierung verwendet wird. Normierung auf maximales Signal während Durchbruch.

Die Verschiebung der Durchbruchskurve zu früheren Zeiten für Datensätze mit deutlicher Adsorption (20 und 50 mM) ist die Hauptunsicherheit in der Bestimmung des Bulkchromatogramms des nativen Proteins und wird über den zeitlichen Abstand des Anstieges des Durchbruches der Biokonjugate am Partikel und im Säuleneffluent abgeschätzt. Durchbruchskurven, die einen initialen Vordurchbruch zeigen (20 und 50 mM), können mit der zur Verfügung stehenden Funktion nicht vollständig nachgebildet werden kann. Dieser Vordurchbruch ist einer nicht-adsorbierenden Species zuzurechnen (vgl. Kapitel 4.5).

Tabelle 4.8.1 führt die verwendeten Formfaktoren FF(n) der Bulkchromatogramme des nativen CTG auf SP Sepharose FF bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen auf.

**Tabelle 4.8.1. Formfaktoren für die Beschreibung der Bulkchromatogramme am Partikel des nativen CTG auf SP Sepharose FF.**

NaCl [mM]	FF(1)	FF(2)	FF(3)	FF(4)
20	2200	200	500	0
50	1500	120	500	0
100	1000	200	300	0

### 4.8.3 Modellierung und Simulation der intrapartikulären Profile

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Modellierung der intrapartikulären Profile mit den experimentellen Daten verglichen. Insbesondere soll die Übereinstimmung der Profile in zeitlicher und räumlicher Dimension, das Nachbilden von Überschußprofilen und die Plausibilität der simulierten Profile der nativen Komponente überprüft werden.

Bei allen Datensätzen werden die experimentellen Daten in rot, die simulierten Daten der Biokonjugate in blau und der nativen Komponenten in grün dargestellt, unabhängig vom jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff. Es wurden nur die Sorptionsgeschwindigkeiten des nativen Proteins und des Biokonjugates angepasst, wohingegen alle anderen benötigten Parameter aus unabhängigen Messungen oder Veröffentlichungen stammen (s.o.).

#### 4.8.3.1 Simulation der Adsorption von CTG auf SP Sepharose FF bei 20 mM

In Abb. 4.8.2, 4.8.3 und 4.8.4 werden die Ergebnisse der Modellierung für CTG bei 20 mM auf SP Sepharose FF für das Atto635, BODIPY bzw. Cy5 Biokonjugat dargestellt.

Die Anpassung für CTG-Atto635 bei 20 mM auf SP Sepharose FF ist gut. Der zeitliche Start der Adsorption und der Verlauf am Partikelrand und im Partikelzentrum wird sehr gut wiedergegeben. Von ca. 42 min bis 86 min wird die Proteinkonzentration am Partikelrand unterschätzt, wohingegen ab ca. 88 min die Proteinkonzentration speziell am Partikelrand überschätzt wird.



Die experimentellen Daten für CTG-BODIPY bei 20 mM auf SP Sepharose FF werden nicht zufriedenstellend simuliert. Das Überschußprofil ab ca. 40 min mit den Konzentrationsringen, die zum Partikelzentrum wandern, werden nicht erfasst. Stattdessen ist nach 41 min ein Verdrängungsprofil zu erkennen, welches keine Konzentrationsringe entwickelt und der Unterschied zwischen der Konzentration am Partikelrand und im Zentrum ist gering. Nachdem der Überschuß nach ca. 80 min das Zentrum erreicht hat und die Konzentration im Partikel wieder abnimmt, nähert sich die Form des simulierten und experimentellen Profils an und ab ca. 95 min ist eine sehr gute Übereinstimmung zu sehen.

Die Situation für CTG-Cy5 ist vergleichbar mit den Ergebnissen für CTG-BODIPY. Auch hier werden die Konzentrationsringe vom Modell nicht erfasst und das simulierte Profil nähert sich erst nach ca. 69 min dem Experimentellen an. Das simulierte Profil des Biokonjugats zeigt eine höhere Konzentration im Zentrum im Vergleich mit dem Partikelrand, ohne Ausbildung von scharfen Konzentrationsringen.

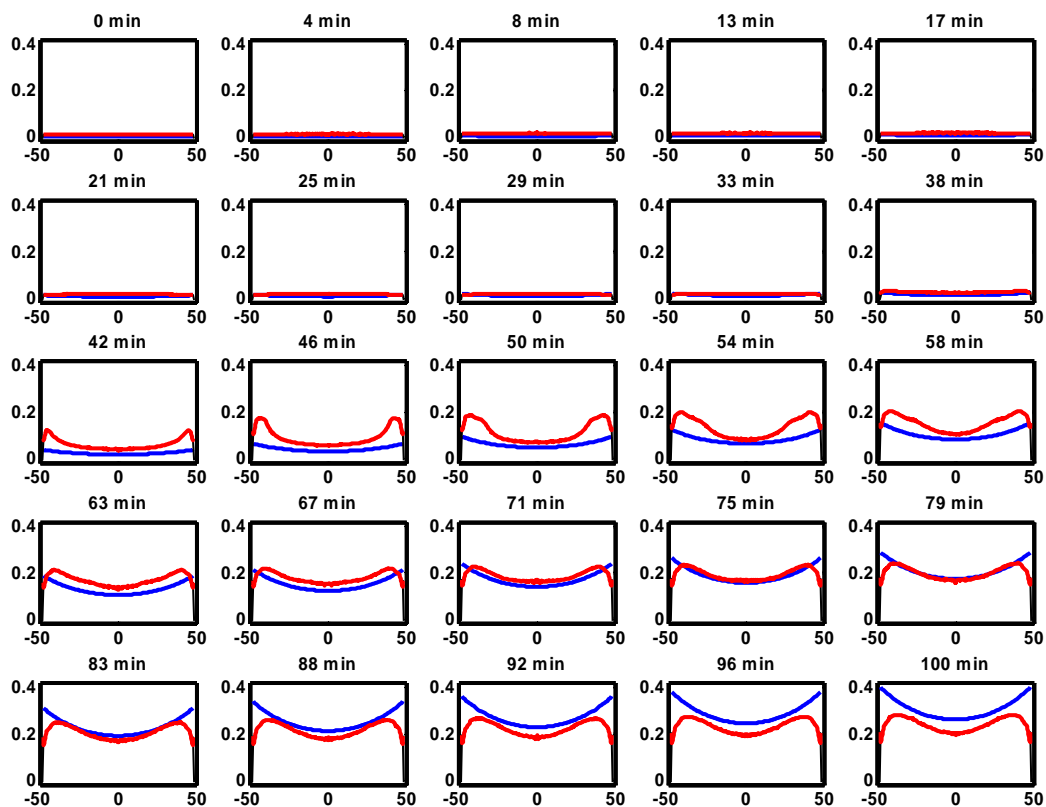


Abbildung 4.8.2. Vergleich der experimentellen Profile (—) und der Simulation (—) für CTG-Atto635 auf SP Sepharose FF bei 20 mM. x-Achse: Partikelradius in  $\mu\text{m}$ . y-Achse: Konzentration in mM.

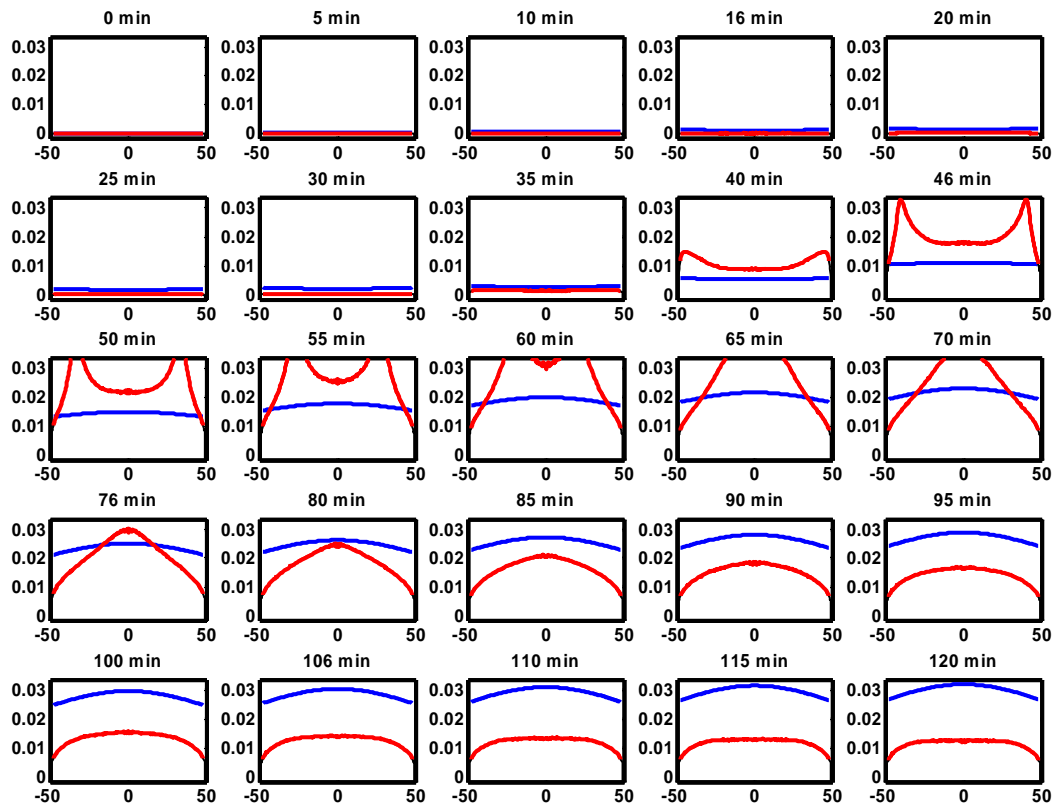


Abbildung 4.8.3. Vergleich der experimentellen Profile (—) und der Simulation (—) für CTG-BODIPY auf SP Sepharose FF bei 20 mM. x-Achse: Partikelradius in  $\mu\text{m}$ . y-Achse: Konzentration in mM.

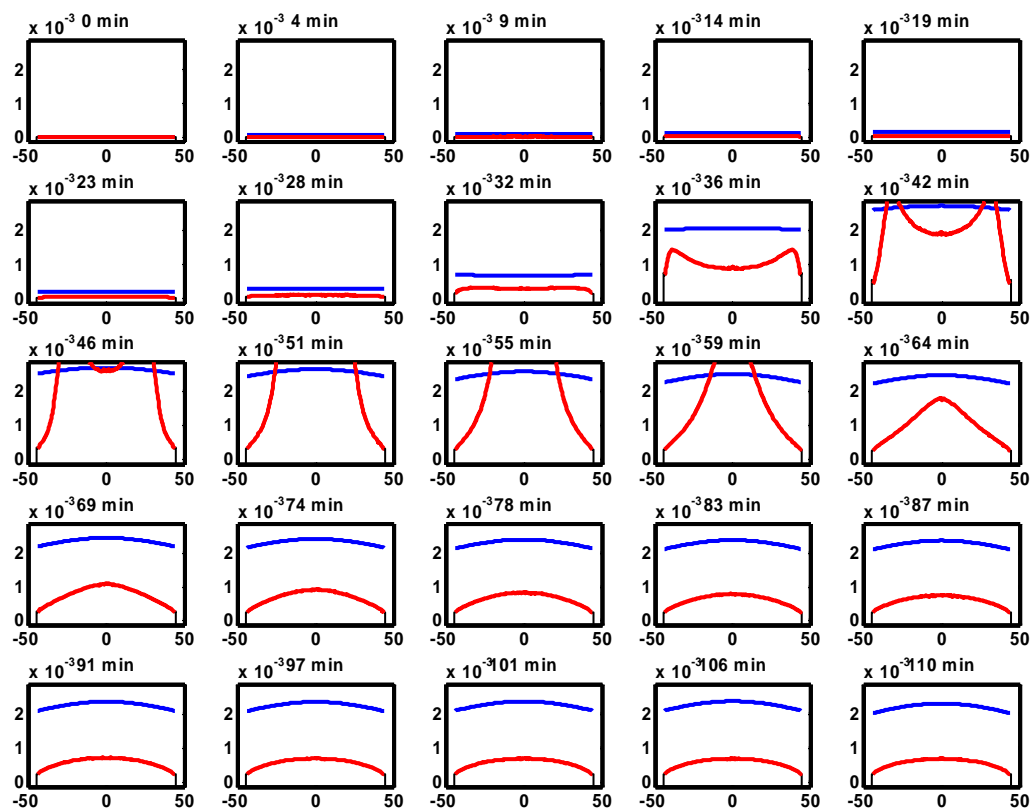


Abbildung 4.8.4. Vergleich der experimentellen Profile (—) und der Simulation (—) für CTG-Cy5 auf SP Sepharose FF bei 20 mM. x-Achse: Partikelradius in  $\mu\text{m}$ . y-Achse: Konzentration in mM.

In Abb. 4.8.6 sind die simulierten Profile für das native CTG auf SP Sepharose FF bei 20 mM für den Durchbruchversuch mit Atto635, BODIPY bzw. Cy5 dargestellt. Qualitativ zeigen alle drei Simulationen einen vergleichbaren Verlauf mit einem flachen Profil und einer leichten Krümmung über den gesamten Radius. Quantitativ zeigen die Profile für BODIPY und Cy5 eine weitestgehende Übereinstimmung, wohingegen die Konzentration für den Atto635 Datensatz zu vergleichbaren Zeiten ca. halb so groß ist.

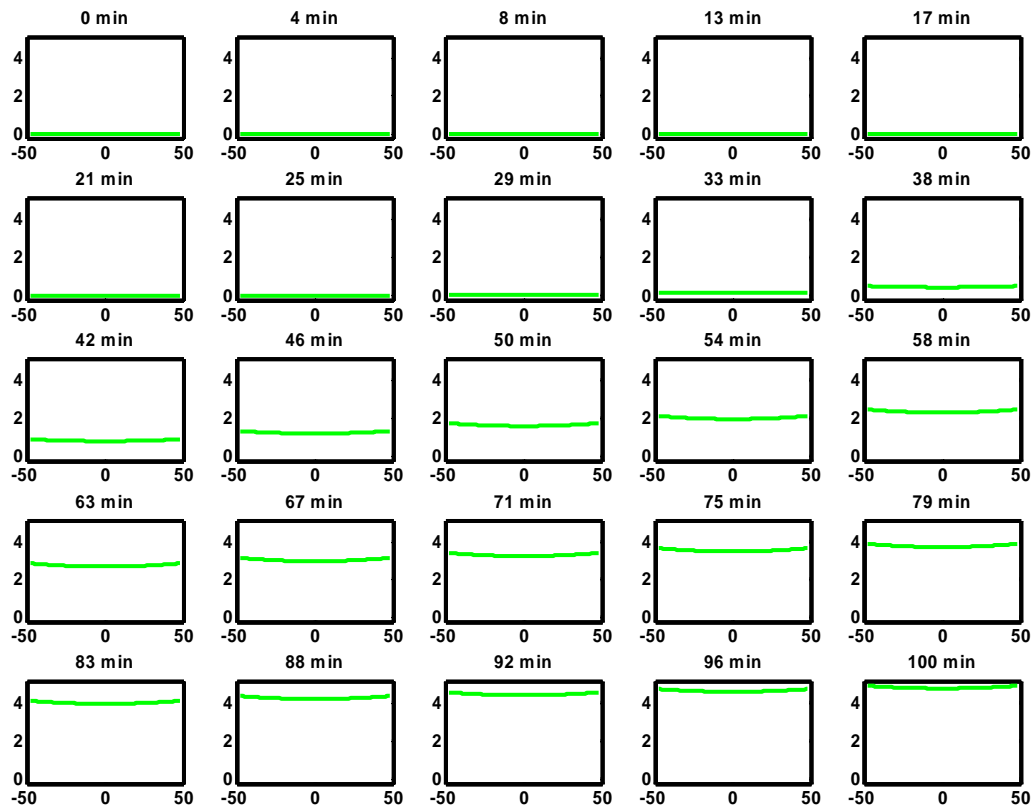


Abbildung 4.8.5. Simulierte Profile (—) für CTG (Atto635 Biokonjugat) auf SP Sepharose FF bei 20 mM. x-Achse: Partikelradius in  $\mu\text{m}$ . y-Achse: Konzentration in mM.

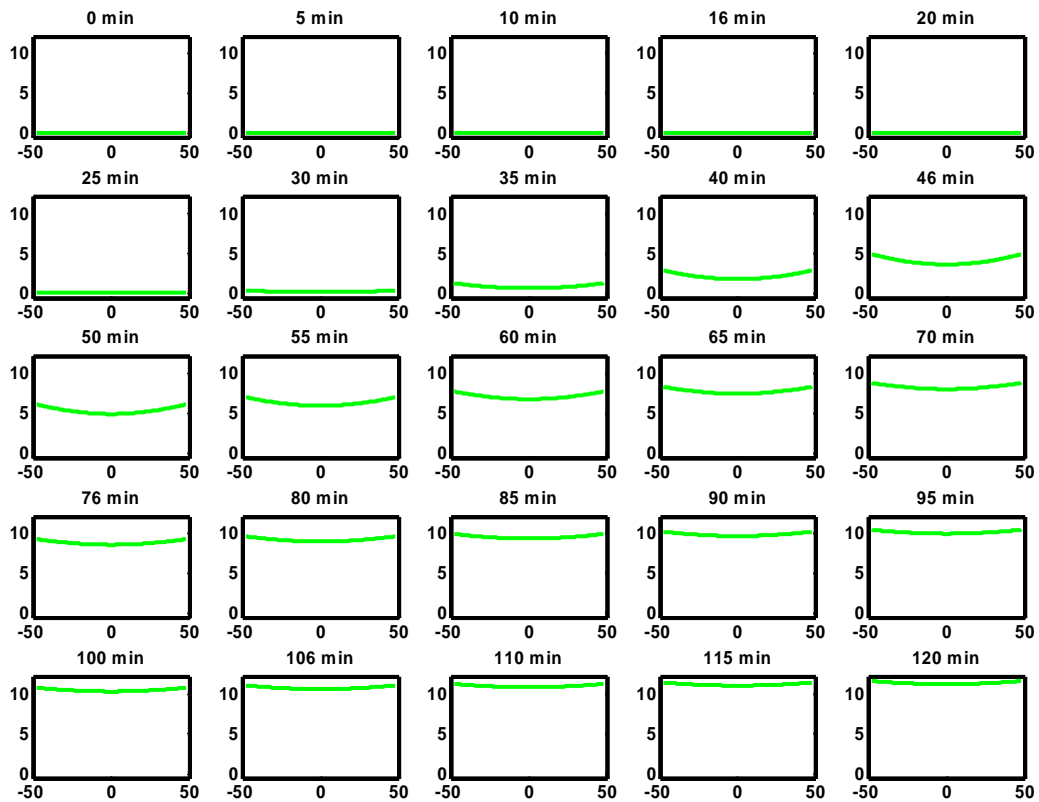


Abbildung 4.8.6. Simulierte Profile (—) für CTG (BODIPY Biokonjugat) auf SP Sepharose FF bei 20 mM. x-Achse: Partikelradius in  $\mu\text{m}$ . y-Achse: Konzentration in mM.

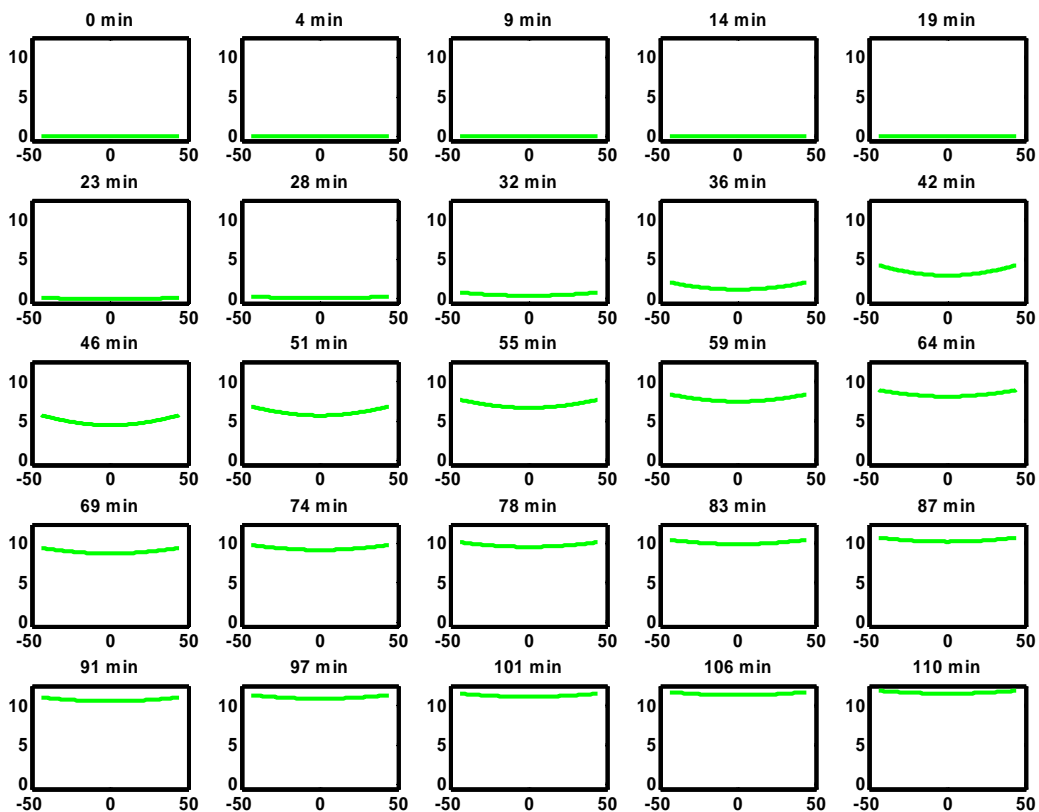


Abbildung 4.8.7. Simulierte Profile (—) für CTG (Cy5 Biokonjugat) auf SP Sepharose FF bei 20 mM. x-Achse: Partikelradius in  $\mu\text{m}$ . y-Achse: Konzentration in mM.

#### 4.8.3.2 Simulation der Adsorption von CTG auf SP Sepharose FF bei 50 mM

Ein Vergleich zwischen simulierten und gemessenen intrapartikulären Profilen für CTG-Atto635 auf SP Sepharose FF bei 50 mM (Abb. 4.8.8) zeigt, vergleichbar mit der Situation bei 20 mM, eine gute Übereinstimmung zwischen beiden Datensätzen über den gesamten Durchbruch.

Beim CTG-BODIPY Datensatz (Abb. 4.8.9) ist das Signal nach 44 min bis 67 min übersteuert, weswegen die Anpassung in diesem Zeitraum nicht nachvollzogen werden kann. Der Anstieg der Proteinkonzentration und das intrapartikuläre Profil kann bis ca. 38 min gut nachvollzogen werden. Danach steigt die experimentelle Konzentration im Partikel schneller an und weist eine höhere Proteinkonzentration am Partikelrand auf. In der Simulation wird dieser Verlauf nicht erfasst. Stattdessen steigt die Proteinkonzentration kontinuierlich an und zeigt ab ca. 67 min ein diffuses Profil mit einer höheren Proteinkonzentration im Zentrum, im Vergleich mit dem Partikelrand.

Für den CTG-Cy5 Datensatz (Abb. 4.8.10) ist, wie bei 20 mM, keine zufriedenstellende Anpassung zu erzielen. Im Gegensatz zum diffusen Überschussprofil der experimentellen Daten, mit einer höheren Proteinkonzentration im Partikelzentrum, im Vergleich mit dem Partikelrand, bleibt das simulierte Signal stets flach über den gesamten Radius und durchläuft ein Maximum der Konzentration, dessen zeitlicher Verlauf näherungsweise dem Maximum des Überschussprofils ähnelt, ohne radiale Profilbildung. Der „flache Überschuss“ erreicht sein Maximum früher als das Überschussprofil der experimentellen Daten. Nach ca. 40 min passt sich das simulierte Profil dem Verlauf der experimentellen Daten an, ohne die niedrigere Konzentration am Partikelrand nachzubilden.

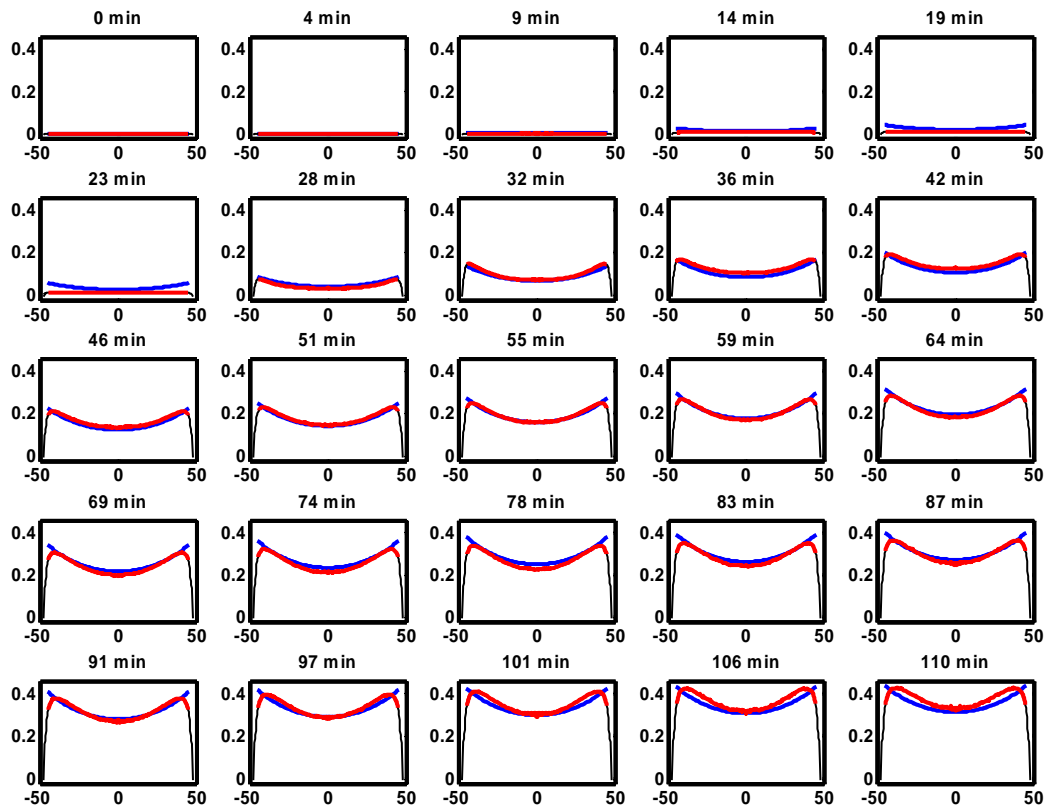


Abbildung 4.8.8. Vergleich der experimentellen Profile (—) und der Simulation (—) für CTG-Atto635 auf SP Sepharose FF bei 50 mM. x-Achse: Partikelradius in  $\mu\text{m}$ . y-Achse: Konzentration in mM.

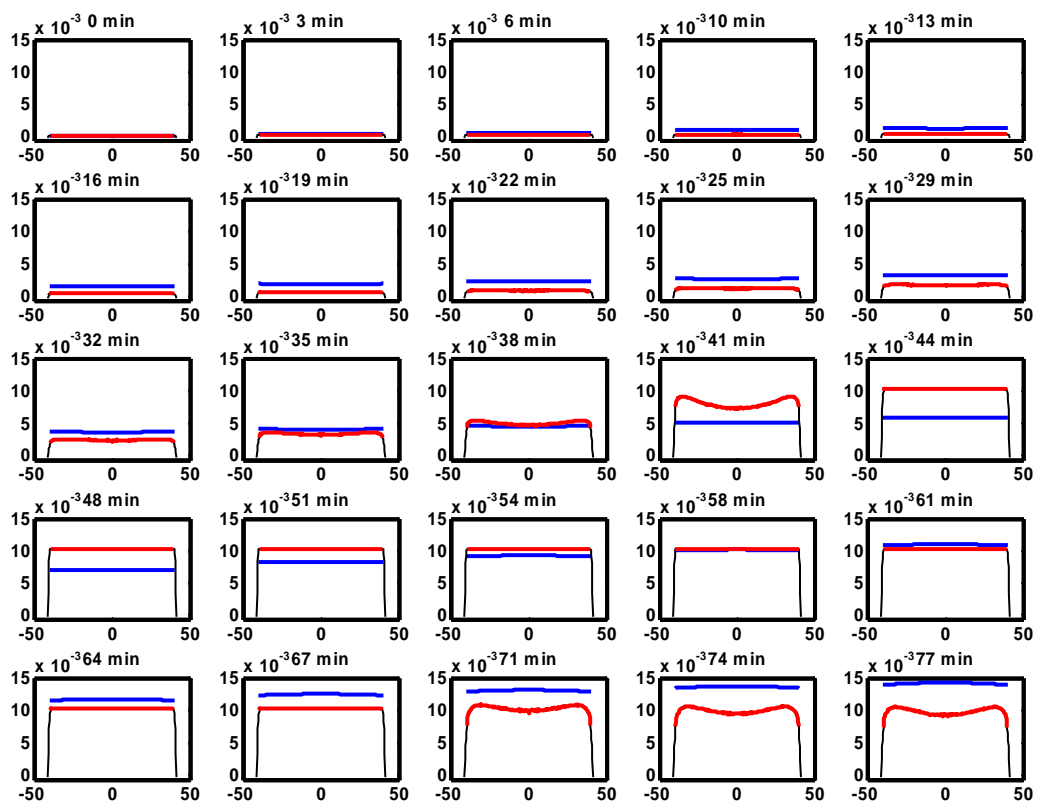


Abbildung 4.8.9. Vergleich der experimentellen Profile (—) und der Simulation (—) für CTG-BODIPY auf SP Sepharose FF bei 50 mM. x-Achse: Partikelradius in  $\mu\text{m}$ . y-Achse: Konzentration in mM.

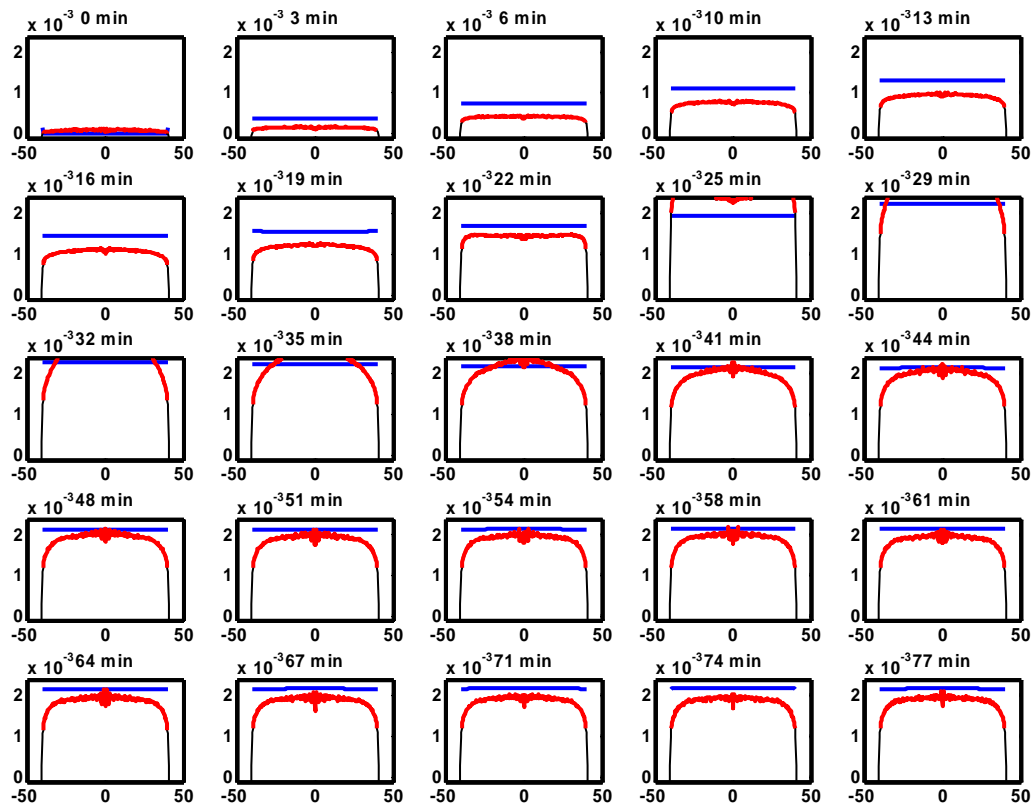


Abbildung 4.8.10. Vergleich der experimentellen Profile (—) und der Simulation (—) für CTG-Cy5 auf SP Sepharose FF bei 50 mM. x-Achse: Partikelradius in  $\mu\text{m}$ . y-Achse: Konzentration in mM.

Die intrapartikulären Profilverläufe des nativen Proteins (Abb. 4.8.11-4.8.13) bei allen verwendeten Biokonjugaten stimmt qualitativ gut überein und ähnelt dem Profil bei 20 mM. Die Krümmung des Profils bei 50 mM ist weniger stark ausgeprägt als bei 20 mM. Die maximal erreichte Konzentration für den BODIPY und Cy5 Datensatz ist mit ca. 6 mM niedriger als bei 20 mM. Entgegen der Erwartung bei einer höheren Salzkonzentration, weist der Atto635 Datensatz durchschnittlich eine höhere Konzentration auf, als bei 20 mM.

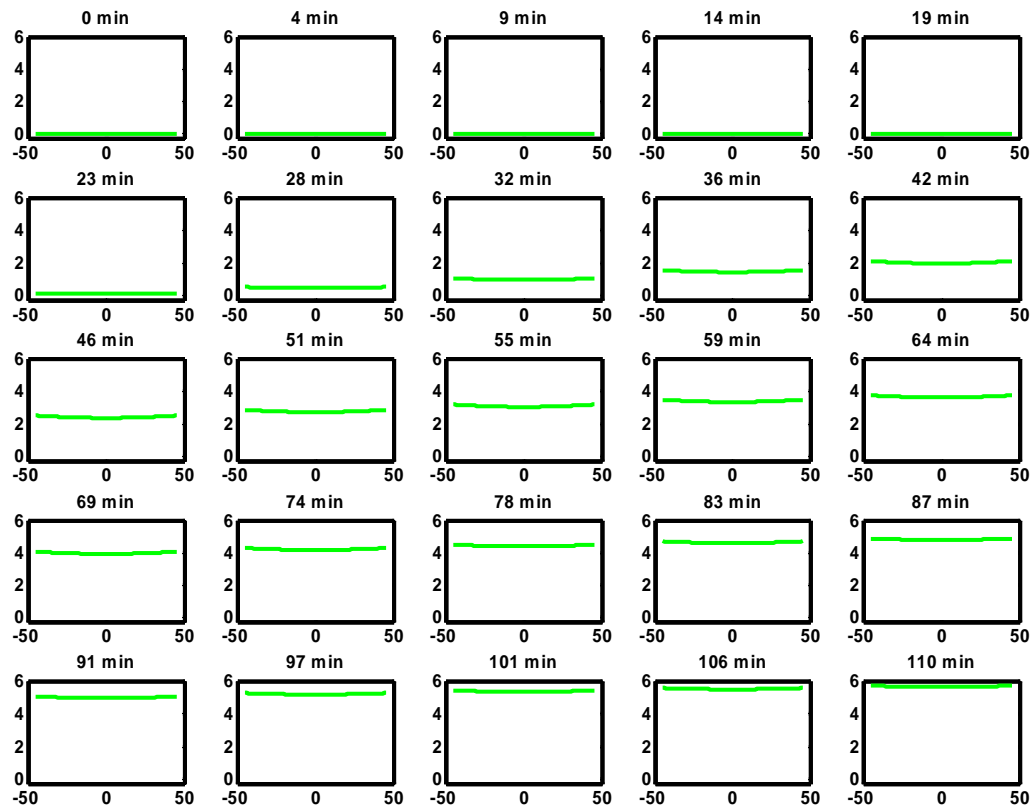


Abbildung 4.8.11. Simulierte Profile (—) für CTG (Atto635 Biokonjugat) auf SP Sepharose FF bei 50 mM. x-Achse: Partikelradius in  $\mu\text{m}$ . y-Achse: Konzentration in mM.

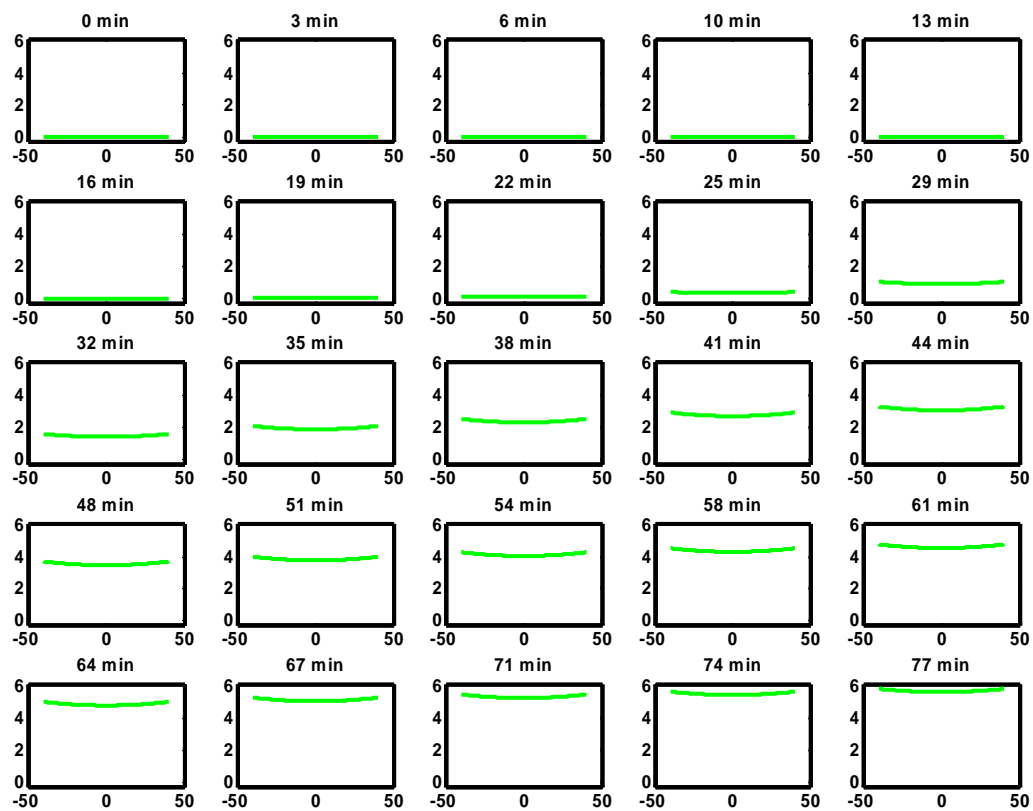


Abbildung 4.8.12. Simulierte Profile (—) für CTG (BODIPY Biokonjugat) auf SP Sepharose FF bei 50 mM. x-Achse: Partikelradius in  $\mu\text{m}$ . y-Achse: Konzentration in mM.



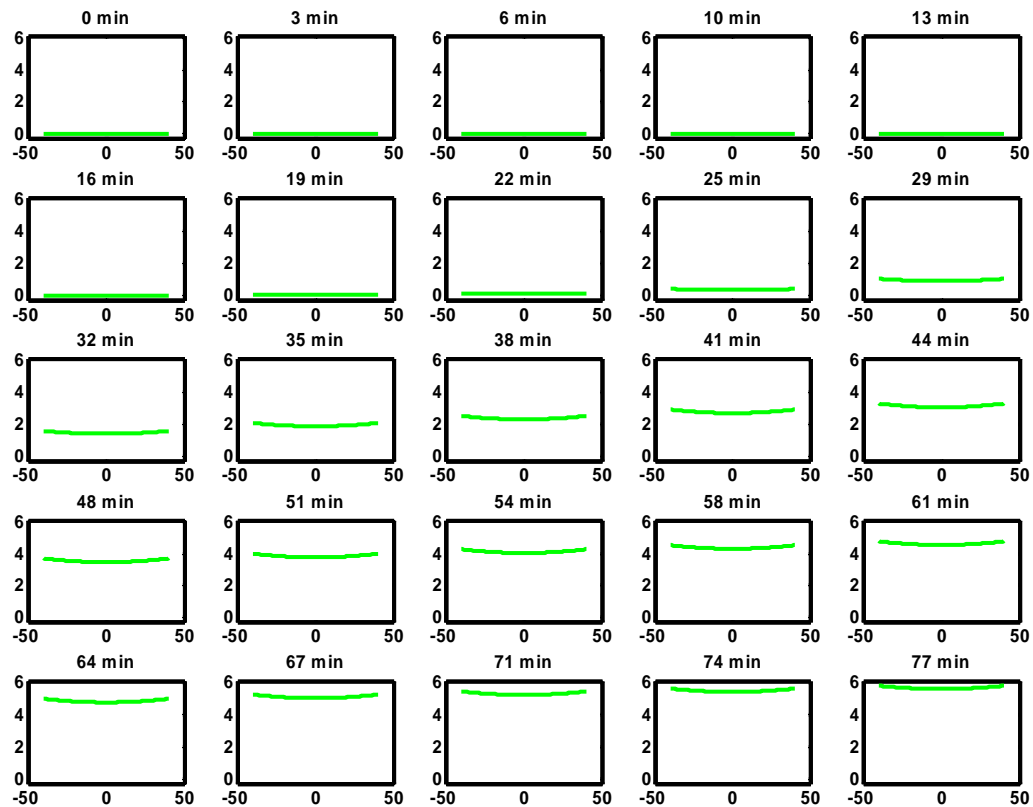


Abbildung 4.8.13. Simulierte Profile (—) für CTG (Cy5 Biokonjugat) auf SP Sepharose FF bei 50 mM. x-Achse: Partikelradius in  $\mu\text{m}$ . y-Achse: Konzentration in mM.

#### 4.8.3.3 Simulation der Adsorption von CTG auf SP Sepharose FF bei 100 mM

Die intrapartikulären Profile für CTG-Atto635, -BODIPY und -Cy5 auf SP Sepharose FF bei 100 mM (Abb. 4.8.14-4.8.16) werden vom Modell in den Simulationen gut beschrieben. Der zeitliche Anstieg der Proteinkonzentration über den gesamten Radius für den Atto635 Datensatz wird gut erfasst, wohingegen der Anstieg beim BODIPY und Cy5 Datensatz in der Simulation zu früh startet.

Bei allen drei Datensätzen wird die niedrigere Konzentration am Partikelrand vom Modell nicht erfasst und die simulierten Profile sind näherungsweise flach bzw. zeigen eine leicht höhere Konzentration am Partikelrand.

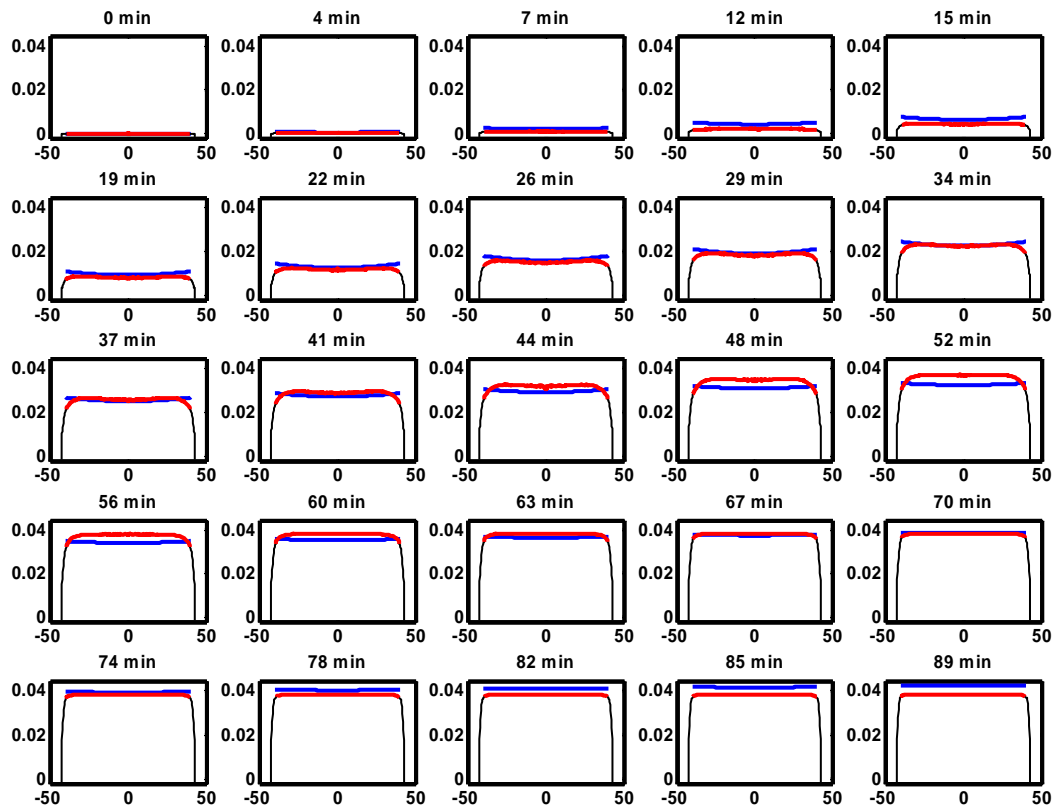


Abbildung 4.8.14. Vergleich der experimentellen Profile (—) und der Simulation (—) für CTG-Atto635 auf SP Sepharose FF bei 100 mM. x-Achse: Partikelradius in  $\mu\text{m}$ . y-Achse: Konzentration in mM.

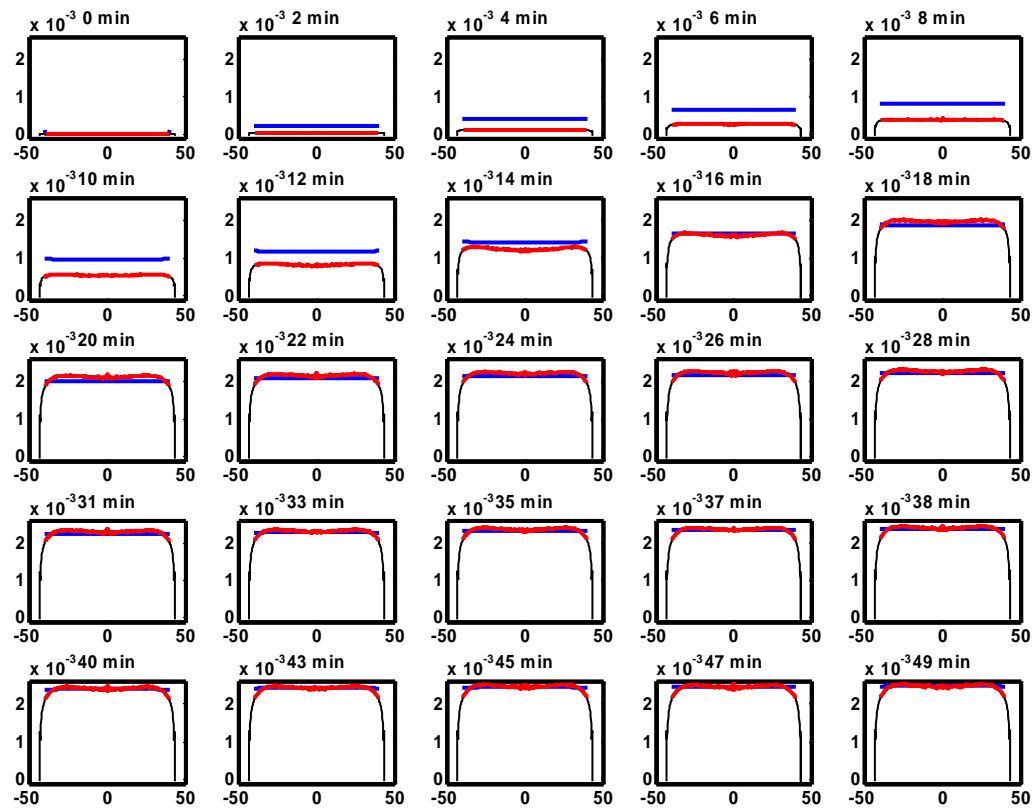


Abbildung 4.8.15. Vergleich der experimentellen Profile (—) und der Simulation (—) für CTG-BODIPY auf SP Sepharose FF bei 100 mM. x-Achse: Partikelradius in  $\mu\text{m}$ . y-Achse: Konzentration in mM.

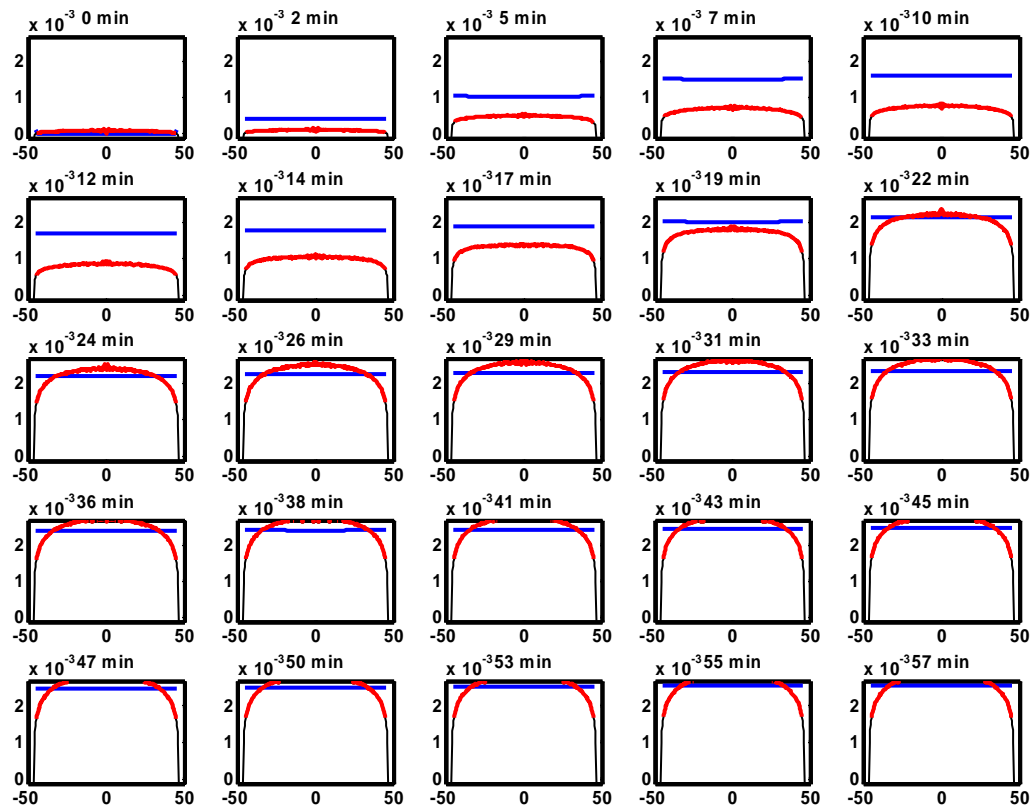


Abbildung 4.8.16. Vergleich der experimentellen Profile (—) und der Simulation (—) für CTG-Cy5 auf SP Sepharose FF bei 100 mM. x-Achse: Partikelradius in  $\mu\text{m}$ . y-Achse: Konzentration in mM.

Die Formen der intrapartikulären Profile für das native Protein sind flach über den gesamten Radius mit einer geringfügig höheren Konzentration am Partikelrand. Die Atto635 und BODIPY Datensätze zeigen eine zufriedenstellende Übereinstimmung, wohingegen der Cy5 Datensatz zu vergleichbaren Zeiten eine ca. 3 bis 6-fach niedrigere Konzentration aufweist.

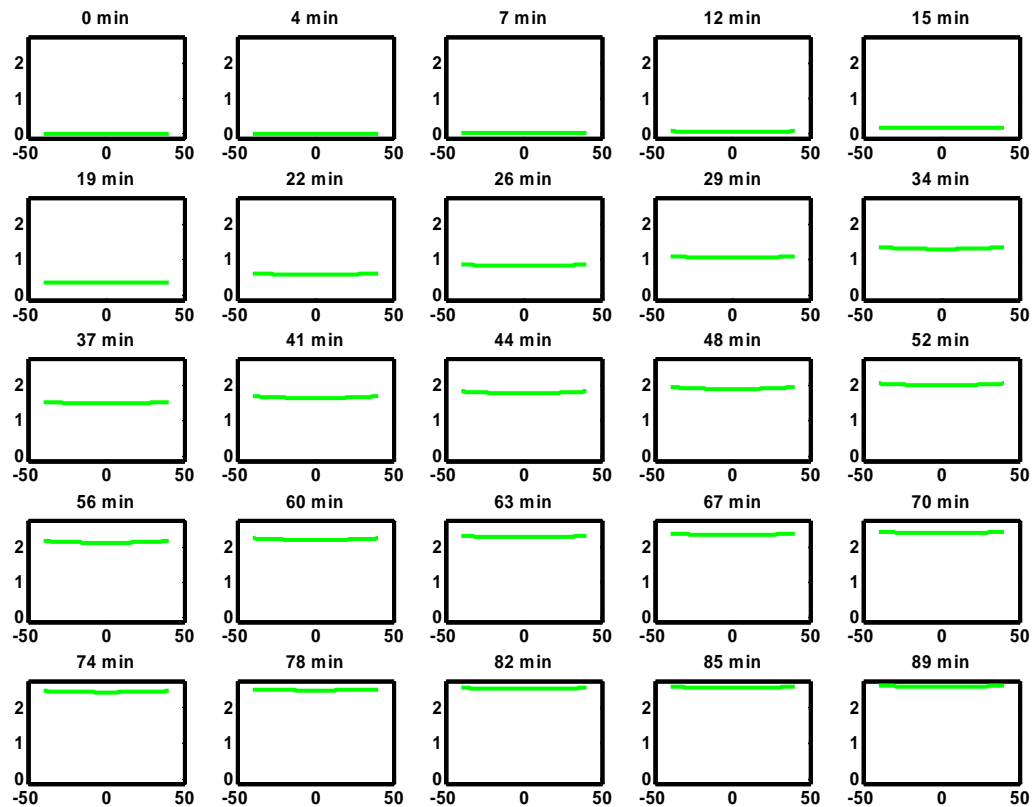


Abbildung 4.8.17. Simulierte Profile (—) für CTG (Atto635 Biokonjugat) auf SP Sepharose FF bei 100 mM. x-Achse: Partikelradius in  $\mu\text{m}$ . y-Achse: Konzentration in mM.

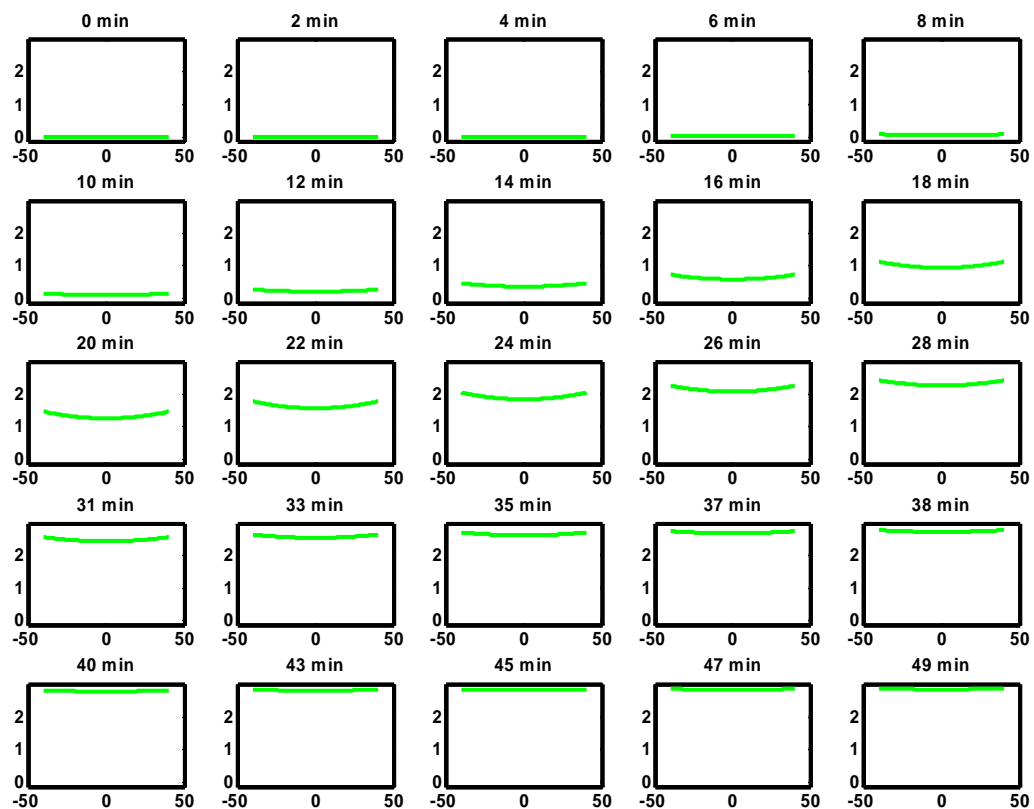


Abbildung 4.8.18. Simulierte Profile (—) für CTG (BODIPY Biokonjugat) auf SP Sepharose FF bei 100 mM. x-Achse: Partikelradius in  $\mu\text{m}$ . y-Achse: Konzentration in mM.

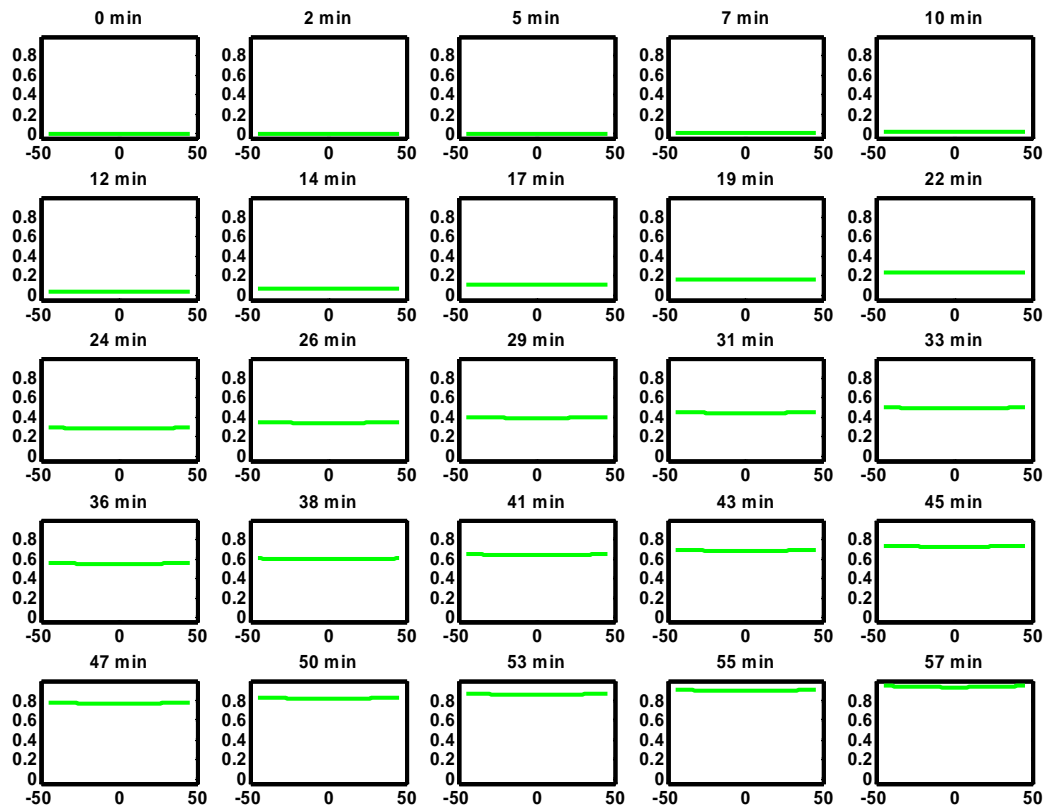


Abbildung 4.8.19. Simulierte Profile (—) für CTG (Cy5 Biokonjugat) auf SP Sepharose FF bei 100 mM. x-Achse: Partikelradius in  $\mu\text{m}$ . y-Achse: Konzentration in mM.

#### 4.8.4 Vergleich der Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten der Simulationen

Die optimierten Desorptionskonstanten, die für die Simulationen verwendet wurden, sind in Abb. 4.8.20 in Abhängigkeit von der Salzkonzentration dargestellt. Sowohl für das native CTG, als auch die Biokonjugate ist eine Tendenz zu niedrigeren Desorptionskonstanten mit steigender Salzkonzentration zu erkennen. Es wird keine systematische Abhängigkeit der Desorptionskonstanten vom verwendeten Biokonjugat beobachtet.

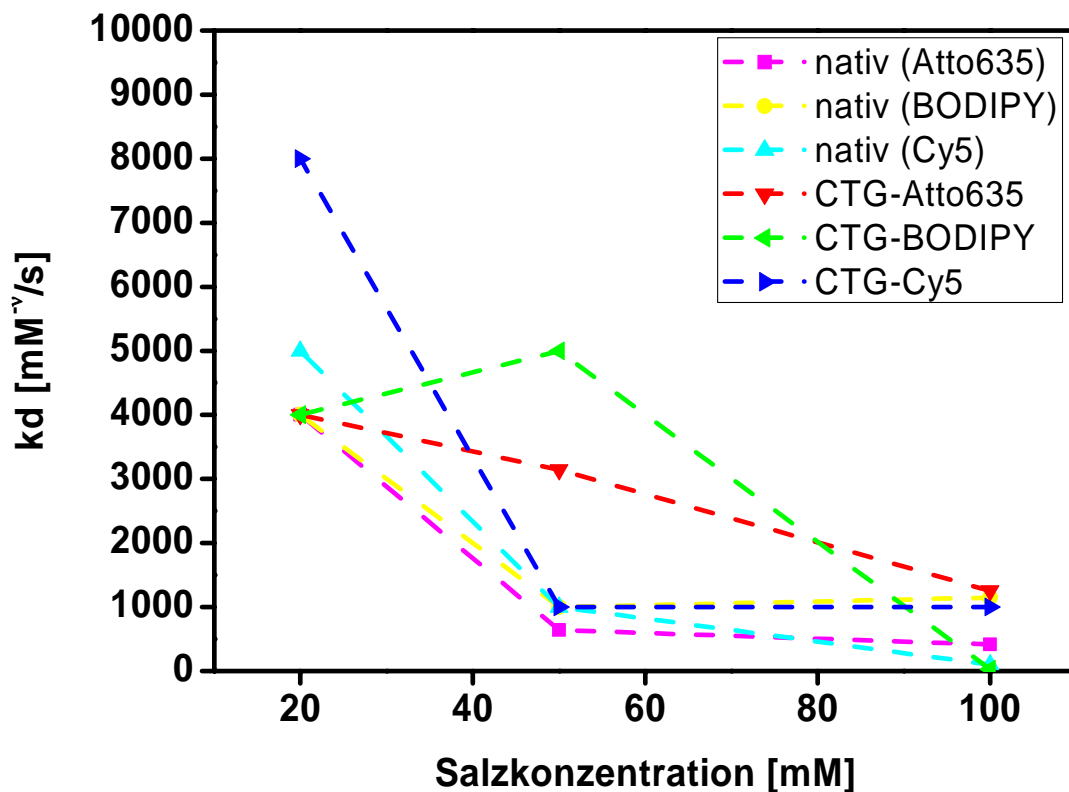


Abbildung 4.8.20. Ermittelte Desorptionskonstanten des nativen CTG und der CTG-Biokonjugate auf SP Sepharose FF bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen.

#### 4.8.5 Diskussion

Die Simulationen der intrapartikulären Profile für unterschiedliche Biokonjugate weisen folgende Trends auf:

- Intrapartikuläre Profile ohne Überschußprofil können mit den vorgegebenen Parametern über das GRM gut beschrieben werden
- Intrapartikuläre Profile mit Überschußprofil können mit den vorgegebenen Parametern über das GRM nicht zufriedenstellend beschrieben werden
- Das Modell beschreibt experimentelle Daten unter schwach bindenden Bedingungen gut
- Die Veränderung der Sorptionsgeschwindigkeiten verbessert die Anpassung
- Die Profile des nativen Proteins zeigen kein „shrinking core“ Verhalten
- Für die meisten Datensätze wird die Konzentration am Partikelrand vom Modell überschätzt

Die Tatsache, daß für die Atto635 Datensätze eine gute Anpassung erzielt wird, und der durchschnittliche Verlauf der Proteinkonzentration für die restlichen Datensätze nachvollzogen werden kann, ist ein Hinweis, daß ein Partikel GRM zusammen mit der SMA Isotherme Adsorptions- und Transportprozesse unter nichtlinearen und kompetitiven Bedingungen in der Ionenaustauschchromatographie beschreiben kann. Die theoretischen Ansätze und Modellierungsergebnisse von Gallant (2003) und Carta *et al.* (2005) werden zum ersten Mal durch experimentelle Daten gestützt.

Das postulierte Modell, daß die gemessenen intrapartikulären Profile nicht dem Profil des nativen Proteins entsprechen und durch Verdrängungseffekte entstehen, wird in der Hinsicht bestätigt, daß unter Verwendung der experimentell gemessenen Parameter (speziell SMA Parameter) kein Überschußprofil für das native CTG oder die Atto635 Datensätze erhalten wird. Obwohl die Form der experimentell bestimmten Überschußprofile nicht nachvollzogen werden kann, zeigen die BODIPY und Cy5 Simulationsdatensätze bei 20 und 50 mM einen Verdrängungseffekt, bei dem im Partikelzentrum eine höhere Proteinkonzentration vorliegt, als am Partikelrand.

Die experimentell beobachteten Konzentrationsringe bzw. Überschußprofile für die BODIPY und Cy5 Biokonjugate bei 20 und 50 mM können in der Simulation nicht nachvollzogen werden. Die simulierten Profile weisen zwar eine Verdrängung der Biokonjugate zum Partikelzentrum auf, allerdings ist dieses Profil nahezu sofort beim Start der Adsorption etabliert. Für die Erzeugung der experimentellen Profile müssten die SMA Parameter niedriger werden, d.h. die Adsorption sowohl der nativen als auch der Biokonjugatkomponente müsste verstärkt werden, damit es zu ausgeprägteren Verdrängungsprofilen kommt. Zusätzlich können Änderungen der Porosität und der totalen ionischen Kapazität, als auch der Position des Bulkchromatogramms des nativen Proteins das simulierte Profil beeinflussen (s.u.). Aufgrund der Komplexität des verwendeten GRM ist eine manuelle Anpassung aller oben genannten Parameter kaum möglich und müsste automatisiert werden.

Eine Begründung für die guten Anpassungsergebnisse für hohe Salzkonzentrationen liegt in der niedrigen Kapazität der untersuchten Systeme. Die Unterschiede in der Retention zwischen der nativen Komponente und des Biokonjugats sind gering und daher verlieren kompetitive Adsorptionsvorgänge an Bedeutung (vgl. Kapitel 4.9).

Die Tatsache, daß Veränderungen der Sorptionsgeschwindigkeiten zu einer besseren Anpassung der Daten führt, ist ein Hinweis auf die postulierte Bedeutung der finiten Sorptionsgeschwindigkeiten in der Proteinadsorption an Ionentauschern (Whitley *et al.*, 1993;

Yang und Etzel, 2003). Andererseits weisen die Werte der Sorptionskonstanten keine offensichtlichen Trends auf und könnten, durch die Begrenzung der Anpassung auf die Sorptionsparameter, von Effekten anderer Parameter, wie z.B. der Säulenparameter, beeinflusst werden.

Die simulierten intrapartikulären Profile der nativen Proteine zeigen keine scharfen Adsorptionsfronten, wie sie bei Linden *et al.* (2002) oder Dziennik *et al.* (2003) beschrieben wurden. Die Abwesenheit eines „shrinking core“ Profils entspricht den Erwartungen für die vorliegenden experimentellen Parameter, weil die Adsorptionsisothermen nicht näherungsweise rechteckig sind, sondern eine deutliche Krümmung bzw. für höhere Salzkonzentrationen zunehmend linear sind. Unter diesen Voraussetzungen ist kein „shrinking core“ Profil zu erwarten (Ruthven, 1984) und die Formen der intrapartikulären Profile für das native CTG sind plausibel.

Für das verwendete GRM ist eine Unterteilung in Porendiffusionsmodell oder homogenes Diffusionsmodell unnötig, weil mit der diskreten Proteinkonzentrationsverteilung über den Partikelradius gerechnet wird und daher eine Approximation der vorherrschenden Triebkräfte über das homogene oder Porendiffusionsmodell nicht sinnvoll ist.

In den meisten Publikationen zum Stofftransport und Adsorption von Proteinen in der Ionenaustauschchromatographie werden die Extremfälle von linearer bzw. rechteckiger Adsorptionsisotherme behandelt, für die analytische Lösungen zur Modellierung von Durchbruchkurven zur Verfügung stehen (Golshan-Shirazi und Guiochon, 1994). Diese Extremfälle liegen bei den vorliegenden experimentellen Daten nicht vor, sodaß die Wahl eines GRM für die Modellierung der Daten gerechtfertigt ist.

In dieser Studie wurden nur die initial unbekanntes Sorptionsgeschwindigkeiten für eine Anpassung verwendet. Dementsprechend können sich die Profile der nativen Proteinkomponente nur begrenzt verändern, um zu einer besseren Anpassung der experimentellen Daten zu führen. Die Änderungen der Sorptionsgeschwindigkeiten führte, für die vorliegenden Daten, zu einer Erhöhung oder Verringerung der radialen Proteinkonzentrationen, tragen aber nicht zur Veränderung des Adsorptionsmuster bei. Diese können nur über eine Änderung der SMA Parameter oder der Säulenkapazität bewirkt werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Simulation der nativen Komponente ein plausibles Bild für den Verlauf der intrapartikulären Profile ohne Adsorptionsmuster, die nicht über einen rein diffusiven Stofftransport zu erklären wären. Die quantitativen Unterschiede zwischen den simulierten Profilen der nativen Komponente bezüglich der



Konzentrationen deuten darauf hin, daß die Modellierung der experimentellen Daten über die Sorptionsgeschwindigkeiten zu Unsicherheiten in der Bestimmung des Adsorptionsprofils der nativen Komponente führt und die alleinige Anpassung der Sorptionsgeschwindigkeiten nicht ausreichend ist für eine Beschreibung der intrapartikulären Profile.

Um die Genauigkeit der Anpassung zu erhöhen, müssten die experimentellen Daten von allen drei Versuchen gleichzeitig an ein identisches Adsorptionsprofil der nativen Komponente angepasst werden, weil anhand der Ergebnisse aus Kapitel 4.6 nicht zu erwarten ist, daß sich die intrapartikulären Profile für die native Komponente für die jeweiligen Biokonjugate unterscheiden. Zudem müsste die Optimierung sowohl über die Sorptionsgeschwindigkeit als auch die SMA Parameter, dem nativen Bulkchromatogramm und der Säulenparameter (Porosität und totale ionische Kapazität) verlaufen. Aufgrund der Komplexität des GRM ist eine manuelle Optimierung dieser Parameter nicht mehr sinnvoll und sollte über einen automatischen Optimierungsalgorithmus erfolgen.

Im Vergleich mit den Anpassungen von Teske *et al.* (2006), wurden auch bei dem vorliegenden Ansatz keine zufriedenstellende Anpassung speziell von Adsorptionsprofilen mit Konzentrationsringen erzielt. Der Ansatz von Teske *et al.* wurde um die Einbeziehung der Bulkchromatogramme und der Sorptionsgeschwindigkeiten erweitert. Beide Faktoren sollten eine Annäherung an die realen experimentellen Gegebenheiten gewährleisten. Auch diese Erweiterungen des Modells führen nicht zu den gewünschten Anpassungsergebnissen. Prinzipiell ist durch eine Änderung der SMA Parameter und der Säulenparameter eine verbesserte Anpassung an die experimentellen Ergebnisse erreichbar.

Es besteht daher die Möglichkeit, daß entweder die Fehler in der SMA Parameterbestimmung für die Diskrepanzen verantwortlich sind, oder es zu Änderungen der SMA Parameter unter nicht-linearen Bedingungen in einem 2-Komponenten Gemisch kommt (Tugcu *et al.*, 2005).

Als Konsequenz aus den obigen Resultaten sollte eine Sensitivitätsanalyse durchgeführt werden, um zu ermitteln, welche Parameter den größten Einfluß auf die Anpassung besitzen, um den Schwerpunkt der experimentellen Versuche auf die Messung dieser Parameter zu legen.

## 4.9 Stofftransport unter Elutionsbedingungen

Nachdem in den Kapiteln 4.5 bis 4.8 Adsorptions- und Stofftransportvorgänge mittels CLSM auf dem Einzelpartikelniveau untersucht wurden, werden im Folgenden Stofftransportvorgänge bei einer Stufenelution von einem Kationentauscher charakterisiert. Der Elutionsschritt stellt den Abschluß einer chromatographischen Aufreinigung dar und ist, ebenso wie der Adsorptionsschritt, an der Gesamtproduktivität eines Aufreinigungsschrittes beteiligt. Bei der Elution (von einem Ionentauscher) wird die Bindungsstärke des Proteins durch Erhöhen der Ionenstärke gesenkt, sodaß das Adsorptionsgleichgewicht auf Seiten des nicht gebundenen Proteins liegt (vgl. Kapitel 2.7). Die einfachste Form der Elution ist eine Erhöhung der Ionenstärke in Form einer Stufe, die hier untersucht wird und häufig Verwendung findet in der präparativen Aufreinigung von Biopharmazeutika. Stofftransportvorgänge während der Elution sind deutlich seltener Bestandteil von veröffentlichten Studien, wo der Schwerpunkt i.d.R. auf dem Adsorptionsschritt liegt, und vergleichbare Arbeiten, wie die im Folgenden vorgestellte detaillierte Analyse intrapartikulärer Konzentrationsprofile während einer Stufenelution, wurden noch nicht veröffentlicht. Durch den Vergleich von Elutionen mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Proteinen wird der Einfluß des Farbstoffes auf Elutionsvorgänge abgeschätzt und im Anschluß ein charakteristisches intrapartikuläres Elutionsprofil beschrieben.

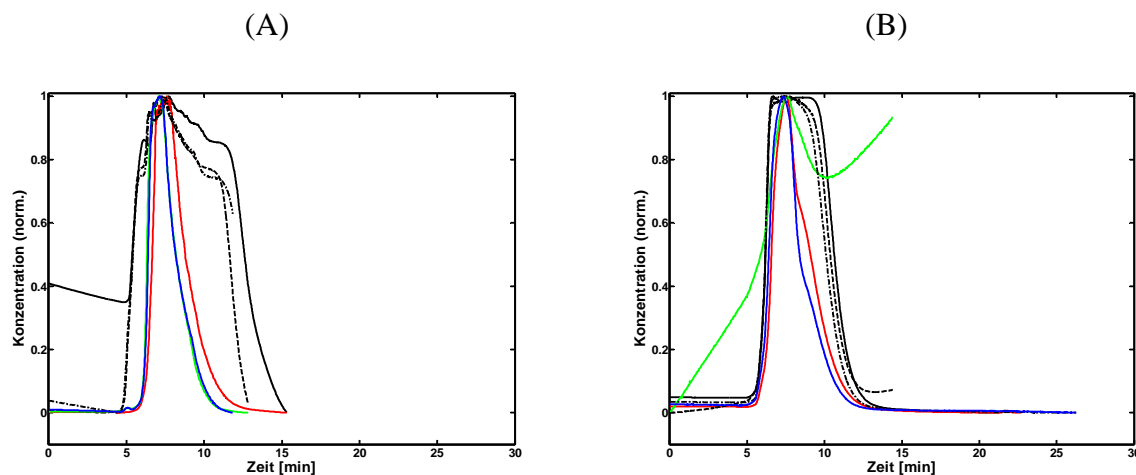
### 4.9.1 Einfluß des Biokonjugates auf Stofftransportvorgänge bei einer Stufenelution

Die folgenden Ergebnisse beziehen sich alle auf eine Stufenelution bei einer Fließgeschwindigkeit von 96 cm/h und einer verwendeten NaCl Konzentration von 1 M. Die Elution erfolgt im Anschluß an die Durchbruchversuche (gefolgt von einem Waschschrift), die in den Kapiteln 4.6-4.8 dargestellt werden. D.h. die in der Säule befindlichen Adsorbentien wurden vor der eigentlichen Elution bei verschiedenen Pufferbedingungen beladen.

Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt wurde, kann der verwendete Fluoreszenzfarbstoff einen signifikanten Einfluß auf die, mittels CLSM gemessenen, intrapartikulären Profile besitzen. Vor der Beschreibung der Stofftransportvorgänge während einer Stufenelution wird zunächst die Abhängigkeit der Ergebnisse vom verwendeten Farbstoff überprüft. Als Vergleichsdaten werden die Versuchsserien für CTG bei pH 7.0 auf SP Sepharose FF verwendet.

Die Chromatogramme des Säuleneffluents für die drei verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe Atto635, BODIPY und Cy5 werden verglichen, gefolgt von den Bulkchromatogrammen am Partikel, den relativen Kapazitäten und den eigentlichen intrapartikulären Profilen.

In Abb. 4.9.1 werden die Chromatogramme des Säuleneffluents bei 280 nm für das native Protein und den jeweiligen Wellenlängen der Absorptionsmaxima der Biokonjugate für die Stufenelutionen von CTG auf SP Sepharose FF nach Adsorption bei 20 oder 100 mM miteinander verglichen.



**Abbildung 4.9.1.** Säuleneffluent Chromatogramme für (—) Atto635 (635 nm), (—) BODIPY (504 nm), (—) Cy5 (654 nm) und (— / — — / — ■ —) natives Protein bei 280 nm für Stufenelution von CTG-Atto635, CTG-BODIPY bzw. CTG-Cy5 Konjugat bei pH 7.0 (Phosphat, 1 M NaCl) und 96 cm/h auf SP Sepharose FF. Signale normiert auf maximales Signal. (A) Durchbruch bei 20 mM. (B) Durchbruch bei 100 mM. Signal von CTG-Atto635 (280 nm) bei 20 mM und CTG-BODIPY (504 nm) bei 100 mM gestört durch Drift.

Der Beladungsgrad für das native Protein sinkt mit steigender Salzkonzentration während des Durchbruchs, was an der größeren Fläche unter der Elutionskurve in Abb. 4.9.1-A im Vergleich mit Abb. 4.9.1-B zu sehen ist. Die Elutionskurven für das native Protein zeigen sowohl für die Stufenelution nach Durchbruch bei 20 mM, als auch für 100 mM eine gute Übereinstimmung für jeden verwendeten Farbstoff. Der Anstieg findet bei ca. 5 min statt und die Form des Anstiegs ist bei jedem Datensatz gleich. Die Dauer der Plateauphase bei 20 mM ist länger als bei 100 mM. Nach der Plateauphase sinkt die Elutionskurve mit einem vergleichbaren Tailing auf die Basislinie ab. Anhand der Chromatogramme des Säuleneffluents kann davon ausgegangen werden, daß der gewählte Fluoreszenzfarbstoff keinen meßbaren Einfluß auf das Elutionsprofil des nativen Proteins besitzt.

Im Gegensatz zum nativen Protein existiert bei den Chromatogrammen der Biokonjugate keine Plateauphase, sondern die Elutionskurven besitzen einen Peak mit einem ausgeprägten

Tailing, der ebenfalls für jedes Biokonjugat vergleichbar ist. Der Peakanfang ist vergleichbar mit dem Start der Elution für das native Protein.

In Abb. 4.9.2 sind die entsprechenden Chromatogramme der Bulkphase neben dem Partikel in der gepackten Säule dargestellt, die mittels CLSM für die Biokonjugate gemessen wurden. Ähnlich wie bei den oben dargestellten Ergebnissen der Chromatogramme am Säuleneffluent, zeigen auch die Chromatogramme der Bulkphase eine näherungsweise Übereinstimmung des Starts der Elution (2 min) und der Form des Elutionspeaks für alle Biokonjugate. Einzig für CTG-Atto635 ist das Chromatogramm um ca. 1 min verzögert (Abb. 4.9.2-A). Hierbei muß beachtet werden, daß u.U. nicht immer an der selben Position am Säulenkopf ein Partikel vermessen wurde, da eine absolute Orientierung innerhalb der Mikrosäule nicht realisiert wurde.

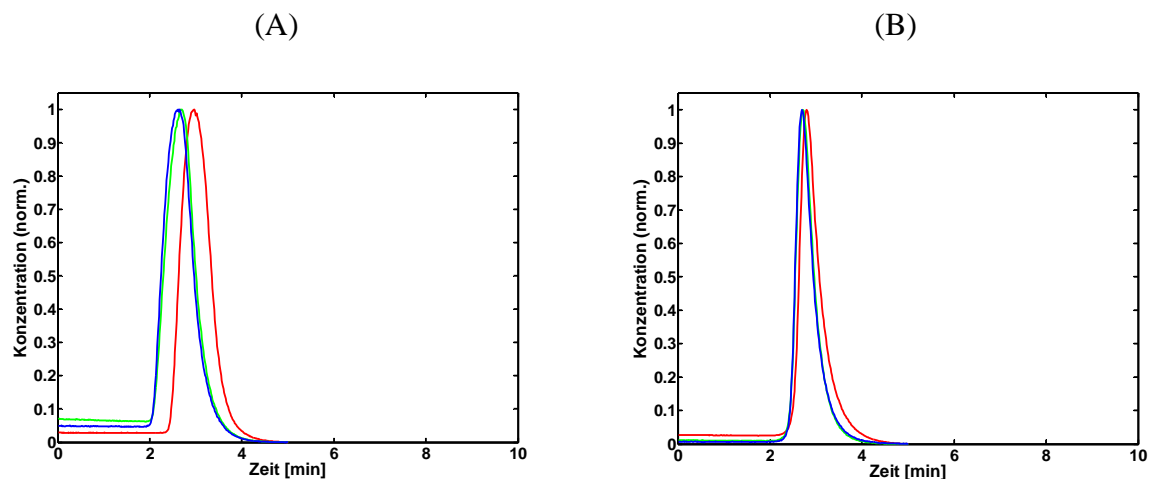


Abbildung 4.9.2. Bulkchromatogramme für (—) CTG-Atto635, (—) CTG-BODIPY bzw. (—) CTG-Cy5 für Stufenelution bei pH 7.0 (Phosphat, 1 M NaCl) und 96 cm/h auf SP Sepharose FF. Signale normiert auf maximales Signal. (A) Durchbruch bei 20 mM. (B) Durchbruch bei 100 mM.

Die in Abb. 4.9.2 gefundenen Übereinstimmungen zwischen den Biokonjugaten werden durch die Auftragung der relativen Kapazität (gemessenen über die Fluoreszenz; Linden, 2001) gegen die Zeit bestätigt (siehe Abb. 4.9.3). Ausgehend vom Zustand nach Adsorption und Waschschrift, steigt die Kapazität nahezu zeitgleich für jedes gewählte Biokonjugat an und sinkt im Anschluß vergleichbar ab. Ebenso wie im Bulkchromatogramm ist das Peakmaximum der Kapazität für CTG-Atto635 bei der Elution nach Durchbruch bei 20 mM auf SP Sepharose FF um ca. 1 min verzögert, im Vergleich mit CTG-BODIPY und CTG-Cy5. Vor dem Anstieg der Kapazität ist bei allen Datensätzen ein unterschiedlich stark ausgeprägter Abfall der Kapazität zu erkennen. Im Vergleich mit der Kapazität vor Start der Elution wird ein unterschiedlich hohes Peakmaximum für die jeweiligen Biokonjugate erzielt.

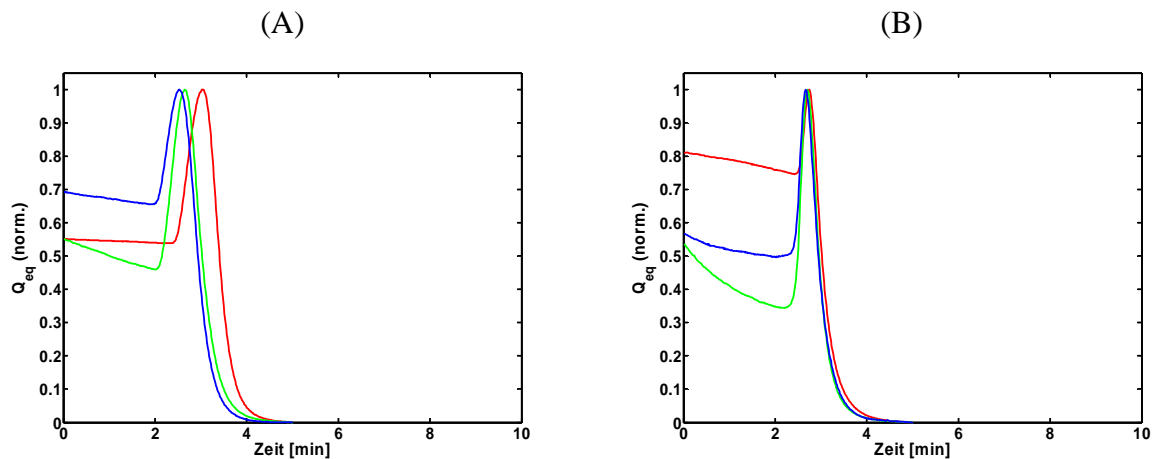


Abbildung 4.9.3. Relative Kapazitäten für (—) CTG-Atto635, (—) CTG-BODIPY bzw. (—) CTG-Cy5 für Stufenelution bei pH 7.0 (Phosphat, 1 M NaCl) und 96 cm/h auf SP Sepharose FF. Signale normiert auf maximales Signal. (A) Durchbruch bei 20 mM. (B) Durchbruch bei 100 mM.

Abschließend werden die intrapartikulären Profile während der Stufenelution dargestellt (siehe Abb. 4.9.4 und 4.9.5) und bezüglich des Einflusses des Fluoreszenzfarbstoffs auf das gemessene Profil beurteilt.

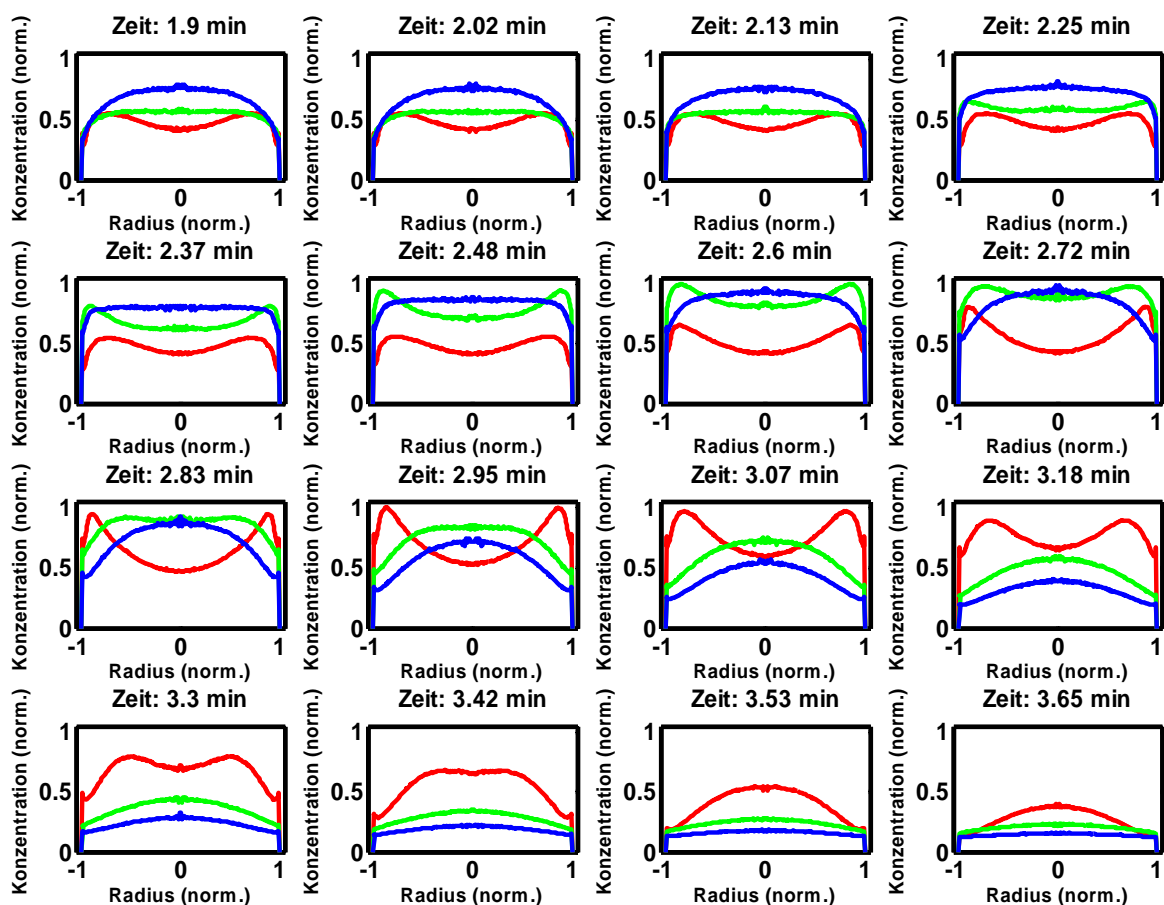


Abbildung 4.9.4. Intrapartikuläre Profile für (—) CTG-Atto635, (—) CTG-BODIPY bzw. (—) CTG-Cy5 für Stufenelution bei pH 7.0 (Phosphat, 1 M NaCl) und 96 cm/h nach Durchbruch bei 20 mM auf SP Sepharose FF. Signale normiert auf maximales Signal.

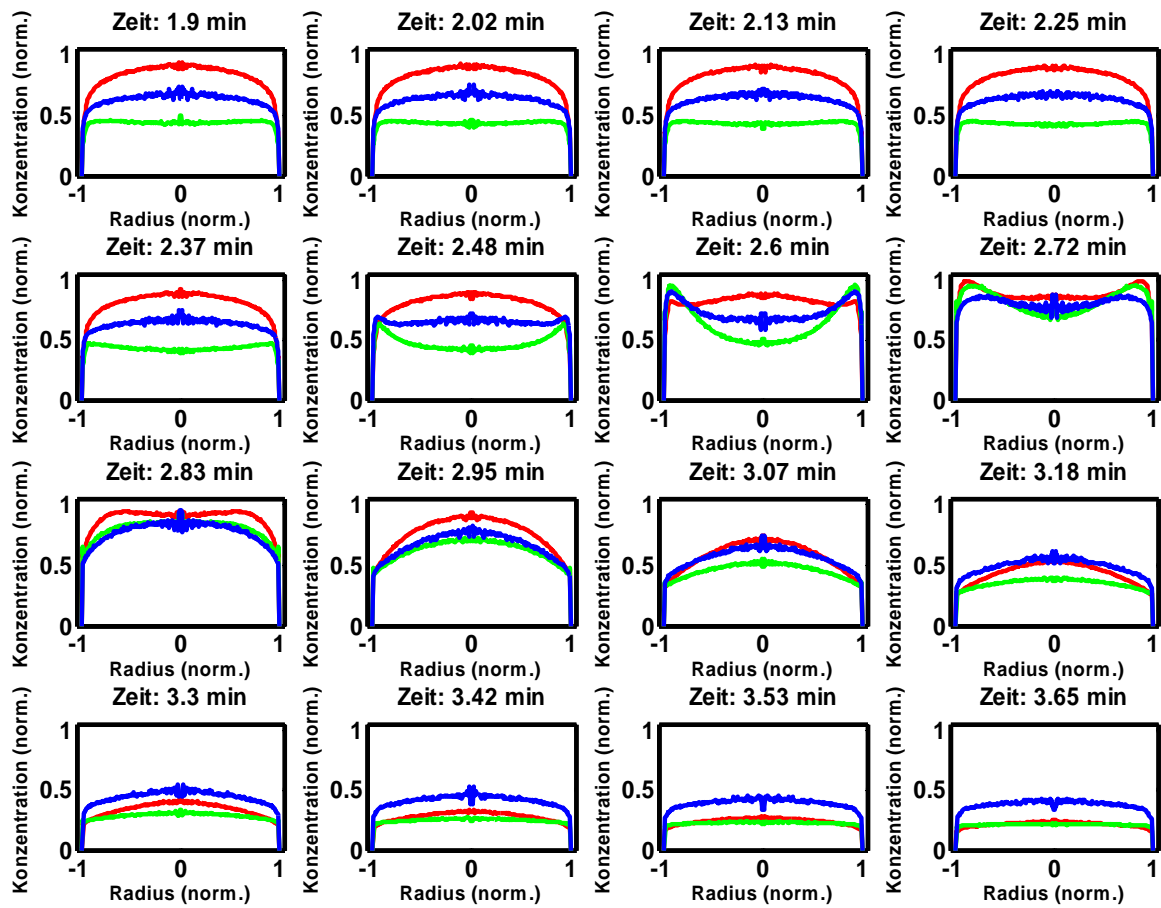


Abbildung 4.9.5. Intrapartikuläre Profile für (—) CTG-Atto635, (—) CTG-BODIPY bzw. (—) CTG-Cy5 für Stufenelution bei pH 7.0 (Phosphat, 1 M NaCl) und 96 cm/h nach Durchbruch bei 100 mM auf SP Sepharose FF. Signale normiert auf maximales Signal.

Die Ausgangsprofile der Elutionsversuche unterscheiden sich bedingt durch die unterschiedlichen Vorgänge der vorangegangenen Durchbruchskurven und Waschschritte für die jeweiligen Biokonjugate. Komplementär zu den vorangegangenen Daten, startet die Elution ebenfalls für alle Biokonjugate, näherungsweise zur gleichen Zeit, nach ca. 2 min. Berücksichtigt man die unterschiedlichen Ausgangsprofile, ist bei beiden Datensätze, für jedes Biokonjugat, ein vergleichbares Elutionsprofil zu erkennen, bei dem anfänglich ein Anstieg der Biokonjugatkonzentration am Partikelrand gefolgt wird von einem Abfall der Konzentration über den Partikelradius mit einer höheren Konzentration im Partikelzentrum. Zusammengenommen deuten die vergleichbaren Chromatogramme am Säulenende (Abb. 4.9.1), Bulkchromatogramme am Partikel (Abb. 4.9.2), Kapazitäten (Abb. 4.9.3) und intrapartikuläre Profile (Abb. 4.9.4) der CTG Biokonjugate bei der Stufenelution auf SP Sepharose FF nach Durchbruch bei 20 oder 100 mM darauf hin, daß es, im Gegensatz zu den Vorgängen bei der Adsorption, zu keinen signifikanten Unterschieden im chromatographischen Verhalten zwischen den Biokonjugaten kommt. Der vergleichbare Start

der Elution sowohl für das native Protein, als auch der Biokonjugate, ist ein eindeutiger Hinweis auf die Vergleichbarkeit zwischen dem chromatographischen Verhalten des nativen Proteins und des Biokonjugats unter Elutionsbedingungen.

#### 4.9.2 Stofftransportvorgänge bei einer Stufenelution

Nachdem die Abhängigkeit des Stofftransports vom gewählten Biokonjugat abgeschätzt wurde und als vernachlässigbar angesehen werden kann, werden die Stofftransportvorgänge während einer Stufenelution dargestellt.

Die experimentellen Ergebnisse beziehen sich auf die Elution nach einem Durchbruch (vgl. Kapitel 4.6) bei zwei bestimmten Salzkonzentrationen (20 oder 100 mM) auf SP Sepharose FF für CTG bei 96 cm/h. Im Anschluß an den Durchbruch wurde eine Waschphase ohne Proteinzufuhr ebenfalls bei 96 cm/h mit dem jeweiligen Bindepuffer (20 oder 100 mM) durchgeführt. Die Position innerhalb der Mikrosäule während der Elution ist identisch mit der Position während der Durchbruchs- und Waschphase. Bedingt durch die kompetitive Adsorption des Biokonjugates und des nativen Proteins während des Durchbruchs (vgl. Kapitel 4.5-4.8) liegt eine unterschiedliche intrapartikuläre Verteilung des jeweiligen Biokonjugates nach Abschluß der Waschphase vor. Ausgehend von dieser Situation wurde mit Start der Aufnahmen am CLSM die Stufenelution durch Erhöhung der NaCl Konzentration auf 1 M bei gleichbleibendem pH von 7.0 gestartet.

Für jedes Biokonjugat nach Durchbruch sowohl bei 20 als auch 100 mM kann näherungsweise das gleiche Elutionsmuster beobachtet werden. Der Verlauf des Bulkchromatogramms am Partikel, sowie der Kapazität über die Zeit zeigt eine Übereinstimmung insofern, als dass der Start des Konzentrationsanstiegs bei ca. 2 min liegt und der Abfall der Proteinkonzentration auf das Basislinienniveau bis 4 min erfolgt ist (vgl. Abb. 4.9.2 und 4.9.3). Sowohl die Breite als auch das Tailing der Peaks ist vergleichbar. Das intrapartikuläre Konzentrationsprofil während der Stufenelution stellt sich wie folgt dar (exemplarisch für CTG-Atto635 auf SP Sepharose FF nach Durchbruch bei 20 mM): Nach einem anfänglichen, schnellen Anstieg der Proteinkonzentration am Partikelrand (Abb. 4.9.6: 2.5 bis 2.93 min) steigt die Proteinkonzentration zum Partikelmittelpunkt an, bei gleichzeitiger Absenkung der Proteinkonzentration zum Partikelrand hin (Abb. 4.9.6: 3 bis 3.33 min). Nachdem ein Maximum der Proteinkonzentration im Partikelzentrum erreicht wird, sinkt die gemessene Proteinkonzentration über den Partikelradius gleichmäßig ab (Abb. 4.9.6: 3.5 bis 3.67 min). Zum Ende sinkt auch die höhere Proteinkonzentration im

Partikelzentrum ab und der Partikel ist, im Rahmen der Meßgenauigkeit, vom Protein geleert (Abb. 4.9.6: 3.83 bis 4.8 min).

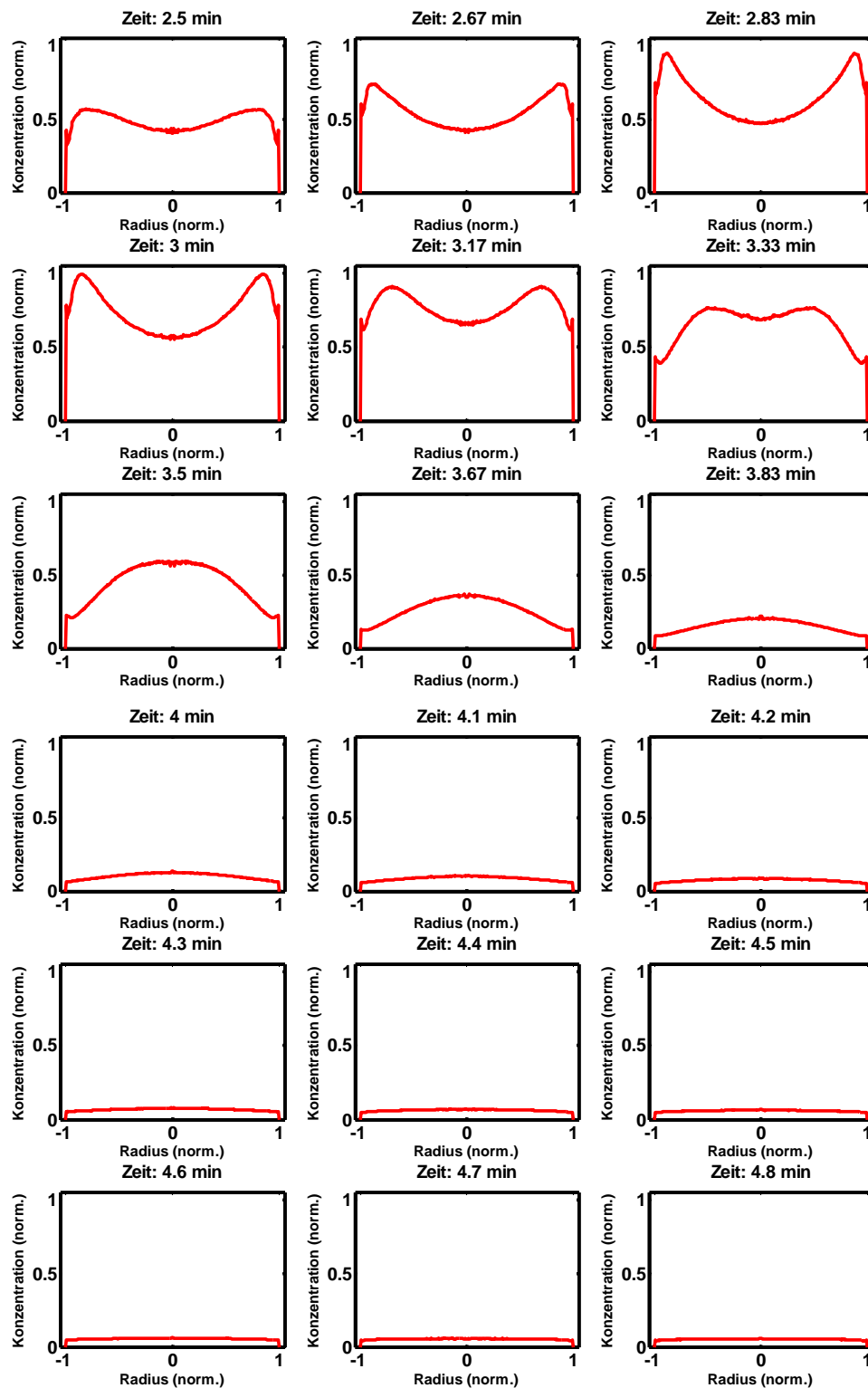


Abbildung 4.9.6. Intrapartikuläre Profile für (—) CTG-Atto635 bei Stufenelution auf SP Sepharose FF bei pH 7.0 (Phosphat, 1 M NaCl) und 96 cm/h nach Durchbruch bei 20 mM. Signale normiert auf maximales Signal.



### 4.9.3 Diskussion

Im Folgenden sollen Gründe für die fehlende Abhängigkeit der gemessenen Stofftransportvorgänge während der Stufenelution vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff gegeben und die Vorgänge während der Stufenelution diskutiert werden.

#### *Einfluß des Biokonjugats auf Stofftransportvorgänge bei einer Stufenelution*

Im Gegensatz zur Adsorption (vgl. Kapitel 4.5 bis 4.8) zeigen die Ergebnisse der Elution generell keine signifikante Abhängigkeit vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff. Der Einfluß ist weder im Chromatogramm des Säuleneffluents noch im Bulkchromatogramm am Partikel, dem Kapazitätsverlauf oder intrapartikulärem Profil zu beobachten. Geringe Abweichungen zwischen den experimentellen Ergebnissen können durch Unterschiede in der Position des zu untersuchenden Partikels in der Mikrosäule erklärt werden. Ein Trend, der durch die Verwendung der Fluoreszenzfarbstoffe zu erklären ist, wird nicht beobachtet.

Die Ergebnisse deuten auf folgende Vorgänge hin: die Anhebung der Salzkonzentration auf 1 M NaCl führt sowohl für das native Protein als auch die Biokonjugate zu einer linearen Isotherme mit vernachlässigbarer Kapazität für beide Komponenten. D.h. alle adsorbierten Proteine desorbieren im Wesentlichen vollständig, weil die hohe Salzkonzentration für alle Proteine eine Bindung verhindert. Nach der Desorption bleibt die Salzkonzentration im Partikel gleich hoch, und einmal desorbierte Proteine bleiben in diesem Zustand, sodaß es zu keinen Verdrängungsvorgängen kommt. Wie schon in Kapitel 4.1 gezeigt, sind die Stofftransporteigenschaften des Biokonjugats und des nativen Proteins unter nicht-bindenden Bedingungen vergleichbar. Da nach der Desorption der Proteine im Porenraum der Abtransport an den Partikelrand nur durch den diffusiven Transport bestimmt wird, ist ein Unterschied der intrapartikulären Profile in Abhängigkeit des Fluoreszenzfarbstoffs nicht zu erwarten.

Für Untersuchungen bei niedrigeren Salzkonzentrationen (ca. 200 bis 500 mM), oder bei Verwendung eines Salzgradienten, ist zu erwarten, daß die Unterschiede zwischen Biokonjugat und dem nativen Protein zu Unterschieden im chromatographischen Verhalten der Species führt, was an den unterschiedlichen Retentionszeiten bei den Elutionen für die SMA Parameterbestimmungen zu sehen ist (vgl. Kapitel 4.5).

### ***Stofftransportvorgänge bei einer Stufenelution***

Bei der Analyse von intrapartikulären Stofftransportvorgängen unter Elutionsbedingungen beeinflussen folgende Abläufe die beobachteten Ergebnisse: die Salzfront des Stufengradienten wird durch die Dispersion und die Mikrosäulengeometrie (vgl. Kapitel 4.3, 4.4) gekrümmt (Yamamoto *et al.*, 1983). Die Natriumionen besitzen eine ca. 160-fach höhere Diffusivität als die Proteine (vgl. Kapitel 4.8, Teske *et al.*, 2006; Gallant, 2003), können die poröse Matrix aber nur mit einer finiten Geschwindigkeit penetrieren. Die Desorptionsgeschwindigkeit der Proteine ist nicht unendlich schnell und muß nicht identisch sein mit der Desorptionsgeschwindigkeit unter adsorptiven Bedingungen (Hunter und Carta, 2001; Arve und Liapis, 1987). Der Transport der Proteine in der Matrix erfolgt durch behinderte Porendiffusion (vgl. Kapitel 4.3). Der beobachtete Partikel liegt unterhalb des Säulenkopfes, d.h. eluiertes Protein aus den Partikeln oberhalb des beobachteten Partikels strömt während der Elution vorbei.

Das charakteristische Elutionsmuster kann wie folgt erklärt werden: der Porenraum ist frei von ungebundenem Protein, wenn die Salzstufe und das schon eluierte Protein aus den weiter oben liegenden Partikeln den beobachteten Partikel erreicht. Der Anstieg der Proteinkonzentration am Rand wird durch die Diffusion des Proteins aus der Bulkphase in den Partikel hervorgerufen, weil vor Beginn der Elution der adsorbierten Proteine ein Konzentrationsgradient von der Bulkphase zum Porenraum des Partikels existiert. Obwohl die Natriumionen den Partikel schnell penetrieren, wird die Desorption durch die finite Desorptionsgeschwindigkeit verzögert. In dem Moment wo die Desorption der adsorbierten Proteine beginnt, existiert je nach Position im Partikel ein Konzentrationsgradient zum Partikelrand oder zum Partikelzentrum, wo die Desorption noch nicht stattgefunden hat und der Porenraum noch frei von ungebundenem Protein ist. Die Bulkproteinkonzentration sinkt sehr schnell wieder ab, sodaß gegen Ende der Elutionsphase ein starker Konzentrationsgradient vom Partikel zur Bulkphase existiert und alle Proteine im Porenraum zum Partikelrand diffundieren.

Der initiale Anstieg der intrapartikulären Proteinkonzentration durch Proteine aus dem Bulk erscheint intuitiv ungewöhnlich, ist aber mit einer Parameterkombination von Desorptionsgeschwindigkeit, Salzkonzentration und Diffusionskoeffizienten erklärbar. Aufgrund fehlender experimenteller Daten wurde dieser Effekt in der Literatur nicht modelliert, da die resultierende Peakverbreiterung durch den diffusiven Transport von schon eluiertem Protein in den Partikelrand, für ein Modell, daß keine intrapartikulären

---

Transportvorgänge diskret simuliert, durch andere Stofftransportparameter ausgedrückt werden kann.

## **5.1 Zusammenfassung**

### **5.1.1 Validierung**

Die Unterschiede im Verteilungs- und Stofftransportverhalten für Cy5 Biokonjugate unter nicht-bindenden Bedingungen im Vergleich mit nativen Proteinen sind im Allgemeinen gering. Die mittels CLSM gemessenen Signale können deshalb mit dem Verhalten des nativen Proteins gleichgesetzt werden. Im Gegensatz dazu zeigen BODIPY und Atto635 Fluoreszenzfarbstoffe nicht-spezifische Interaktionen mit Agarosematerialien, die sie für die Untersuchung des Stofftransports unter nicht-bindenden Bedingungen ungeeignet machen. In allen Biokonjugatpräparationen ist ein Restanteil von freiem Farbstoff vorhanden, sowie evtl. vorhandene Di- oder Multimere der Proteine, die ebenfalls als Biokonjugat vorliegen. Für Lysozym sind nach Konjugation mit Cy5 zwei unterschiedliche Peaks mittels hochauflösender Größenausschlusschromatographie detektierbar. Für die Interpretation von CLSM Messungen unter nicht-bindenden Bedingungen müssen diese Effekte berücksichtigt werden.

Die Konsequenz der Validierungsstudie ist, daß man jede Protein-Fluoreszenzfarbstoff Kombination unter nicht-bindenden Bedingungen auf ihre Ähnlichkeit mit dem nativen Protein untersuchen muß, weil es u.U. zu Abweichungen im chromatographischen Verhalten des Biokonjugates kommen kann, die nicht vorhergesagt werden können. Die Prüfung der Gleichheit zwischen Biokonjugat und nativem Protein ist unabdingbare Voraussetzung für die Analyse sämtlicher CLSM Untersuchungen unter nicht-bindenden Bedingungen.

### **5.1.2 Gleichgewichtsverteilungskoeffizient**

Der Gleichgewichtsverteilungskoeffizient kann direkt auf dem Einzelpartikelniveau mittels CLSM gemessen werden. Ein Vergleich unterschiedlicher Festphasen zeigt deutliche Unterschiede im Verteilungsverhalten von Proteinen zwischen 14.3 und 160 kDa bei Verwendung von Agarose- und Agarose-Dextran-Kompositmaterialien: die Porengrößen von Kompositmaterialien sind kleiner und deuten auf eine stärkere sterische Behinderung durch immobilisierte Dextranketten im Porenraum hin. Die Modellierung der Daten über das Renkin- und Ogstonmodell ist bedingt möglich. Beide Modelle verhalten sich für den experimentellen Bereich im Wesentlichen identisch. Die Porengrößen stimmen gut mit veröffentlichten Daten überein.

Der Einfluß von anziehenden und abstoßenden elektrostatischen Wechselwirkungen konnte für eine Auswahl an Proteinen mit unterschiedlichen pI's und Festphasen mit unterschiedlicher Ladungsdichte gezeigt werden. Die beobachteten Effekte korrelieren mit der Nettoladung und geben quantitative Einblicke in die Ursachen von elektrostatischen Wechselwirkungen unter nicht-bindenden Bedingungen.

### **5.1.3 Intrapartikulärer Diffusionskoeffizient**

Der intrapartikuläre Diffusionskoeffizient kann mittels CLSM aus dynamischen Messungen innerhalb eines gepackten Bettes mit einem modellgestützten Verfahren bestimmt werden.

Die Anpassung über ein sphärisches Diffusionsmodell liefert sehr gute Anpassungsergebnisse sowohl für die Diffusion in, als auch aus einem Partikel für Proteine zwischen 14.3 und 160 kDa. Die Methode wurde auf Multikomponentendiffusionsvorgänge erweitert.

Im Vergleich mit der underivatisierten Festphase Sepharose 6 FF weist das Agarose-Dextran Kompositmaterial Capto Q einen niedrigeren Diffusionskoeffizienten für jedes untersuchte Protein auf.

### **5.1.4 Größenausschlusschromatographie**

Die Trennung von  $\alpha$ -Chymotrypsinogen A und  $\gamma$ -Globulin auf Superdex 200 prep grade kann mittels CLSM innerhalb eines gepackten Bettes verfolgt werden. Die Simulation der Trennung, unter Verwendung von unabhängig bestimmten Parametern, über ein allgemeines Geschwindigkeitsmodell war erfolgreich ohne Parameteranpassung. Die Verwendung von speziell entwickelten Mikrosäulen für die Stofftransportanalyse mittels CLSM ist für die Analyse von größenausschlusschromatographischen Trennungen nur bedingt geeignet, weil die Probanddispersion und Rückvermischung, durch die Säulenkonstruktion, einen zu großen Einfluß auf die beobachteten Peakformen besitzt.

### **5.1.5 SMA Parameter**

Unter adsorptiven Bedingungen unterscheiden sich Biokonjugate von  $\alpha$ -Chymotrypsinogen A und Ovotransferrin mit Atto635, BODIPY oder Cy5 Fluoreszenzfarbstoffen von dem jeweiligen nativen Protein. Das unterschiedliche Retentionsverhalten korreliert mit der Nettoladung: Cy5 und BODIPY Farbstoffe ändern die Nettoladung eines Proteins um -2 bzw.

-1 und zeigen eine geringere Retention als das native Protein. Atto635 Konjugate ändern die Nettoladung eines Proteins nicht, aufgrund der positiven Ladung des Farbstoffes, und zeigen eine höhere Retention als das native Protein. Für Untersuchungen zum Stofftransport- und Adsorptionsverhalten in der Ionenaustauschchromatographie mittels CLSM bedeutet dies, daß die gemessenen Signale nicht dem Verhalten des nativen Proteins entsprechen, sondern durch einen kompetitiven Multikomponentenadsorptionsvorgang von Biokonjugat und nativem Protein entstehen.

Für die Modellierung der Adsorptionsvorgänge wurden SMA Isothermenparameter für das jeweilige native Protein und Atto635, BODIPY und Cy5 Konjugate auf SP Sepharose FF und XL gemessen.

### 5.1.6 Durchbruchskurven

Es wurden Durchbruchskurven mit  $\alpha$ -Chymotrypsinogen A bei pH 7.0 und Ovotransferrin bei pH 6.0 auf SP Sepharose FF und XL bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen durchgeführt. Jeder Durchbruch wurde mit jeweils dem Atto635, BODIPY und Cy5 Biokonjugat vollzogen, um die Unterschiede im Adsorptionsverhalten der Biokonjugate zu untersuchen.

Dabei ist das Durchbruchsverhalten des nativen Proteins unabhängig vom gewählten Biokonjugat, weil es ca. 100-fach stärker konzentriert vorliegt. D.h. die gemessenen Adsorptionsprofile der Biokonjugate werden von einem identischen Profil des nativen Proteins beeinflusst.

Entsprechend der Ergebnisse der SMA Isothermenparameter weisen BODIPY und Cy5 Biokonjugate Durchbruchskurven auf, die auf Verdrängungsprozesse durch das native Protein hinweisen, wohingegen die Atto635 Konjugate nicht verdrängt werden. Keine Durchbruchskurve der Biokonjugate stimmt mit dem Profil des nativen Proteins überein.

Die dynamische Kapazität von  $\alpha$ -Chymotrypsinogen A auf beiden Festphasen ist deutlich höher, als die Kapazität von Ovotransferrin. Die Kapazität auf SP Sepharose XL ist für beide Proteine generell geringer als auf SP Sepharose FF, wobei  $\alpha$ -Chymotrypsinogen A bei der niedrigsten Salzkonzentration von 20 mM unerwarteterweise eine höhere Kapazität als auf SP Sepharose FF besitzt. Die Durchbruchskurven auf SP Sepharose XL sind generell flacher als auf SP Sepharose FF und deuten auf einen höheren Stofftransportwiderstand durch die immobilisierten Dextranketten hin.

### 5.1.7 Intrapartikuläre Profile

Intrapartikuläre Konzentrationsprofile für die in 5.1.6 vorgestellten Experimente wurden während eines Durchbruchexperiment in einem gepackten Bett auf dem Einzelpartikelniveau mittels CLSM gemessen.

Die intrapartikulären Profile der jeweiligen Biokonjugate unterscheiden sich voneinander. Bei der niedrigsten Salzkonzentration von 20 mM zeigen die BODIPY und Cy5 Biokonjugate von  $\alpha$ -Chymotrypsinogen A Verdrängungseffekte, die als Konzentrationsringe vorliegen. Die Atto635 Biokonjugate zeigen keine Verdrängungseffekte. Mit steigender Salzkonzentration sind Verdrängungseffekte der schwächer bindenden Biokonjugate weniger stark ausgeprägt bzw. nicht mehr zu beobachten.

Der Verlauf der Bulkproteinkonzentration am Partikel wurde zum ersten Mal mittels CLSM gemessen. Durch den Vergleich des Verlaufs der Bulkkonzentration am Partikel und am Säuleneffluent konnte ermittelt werden, daß die Biokonjugatkomponente in Form eines konstanten Musters durch das gepackte Bett wandert.

Die gemessenen intrapartikulären Profile sind repräsentativ für das 100-fach niedriger konzentrierte Biokonjugat, welches unterschiedliche Adsorptionseigenschaften wie das native Protein besitzt, und durch die kompetitive Adsorption mit dem nativen Protein geprägt wird. Ein direkter Rückschluss auf das Adsorptionsprofil des nativen Proteins ist nicht möglich, weil keines der Biokonjugate eine hinreichende Ähnlichkeit mit dem nativen Protein ausweist.

Weil die schwächer bindenden BODIPY und Cy5 Biokonjugate Verdrängungsprofile aufweisen und die stärker bindenden Atto635 Konjugate diesen Effekt nicht zeigen, liegt der Schluß nahe, daß die gefundenen Überschußprofile nicht durch einen zusätzlichen Beitrag einer elektrokinetischen Triebkraft hervorgerufen wird, wie sie in der Literatur postuliert wurde. Stattdessen können die gefundenen Ergebnisse mit einem herkömmlichen kompetitiven Multikomponentenadsorptionsmodell mit Fick'scher Diffusion erklärt werden.

### 5.1.8 Modellierung und Simulation

Die gemessenen intrapartikulären Profile auf dem Einzelpartikelniveau wurden über ein allgemeines Geschwindigkeitsmodell, welches das SMA Isothermenmodell implementierte, simuliert. Die Simulation geht von einem 2-Komponentensystem bestehend aus dem nativen Protein und dem jeweiligen Biokonjugat aus. Die benötigten Parameter werden aus den

vorangegangenen Experimenten zur Bestimmung des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten, der SMA Parametergenerierung und den Durchbruchkurven entnommen. Als einziger Anpassungsparameter werden die Ad- und Desorptionsgeschwindigkeitkonstanten manuell optimiert. Der Verlauf der Bulkkonzentration am Partikel für das Biokonjugat wird direkt aus dem CLSM Experiment entnommen, wohingegen der Verlauf des nativen Proteins aus der Durchbruchkurve am Säuleneffluent rekonstruiert wird.

Die intrapartikulären Profile der Atto635 Biokonjugate können mit dem vorgestellten Verfahren gut nachvollzogen werden, wohingegen die Überschußprofile der BODIPY und Cy5 Biokonjugate nicht zufriedenstellend simuliert werden. Eine Verdrängung der Biokonjugate zum Partikelzentrum wird unter Verwendung der ermittelten SMA Parameter simuliert, allerdings ist die Form und die Ausprägung der Konzentrationsringe deutlich geringer, als in den experimentellen Profilen. Die Adsorptionsprofile der Biokonjugate bei 100 mM können über das verwendete Modell simuliert werden.

Die simulierten Adsorptionsprofile der nativen Komponente ist von der Form vergleichbar für jedes Biokonjugat bei einer bestimmten Salzkonzentration, allerdings zeigen sich Unterschiede in der Beladungskapazität. Die simulierten Profile zeigen kein „shrinking core“ Profil, sondern sind diffus, wobei mit steigender Salzkonzentration die Adsorptionsfronten flacher werden. Die Form der Profile, bei den verwendeten experimentellen Bedingungen, ist plausibel, weil bei den Bedingungen keine sehr starke Adsorption zu erwarten ist.

### 5.1.9 Elution

Proteinkonzentrationsprofile während einer Stufenelution nach einem Durchbruchversuch wurden zum ersten Mal auf dem Einzelpartikelniveau mittels CLSM gemessen. Es wurde ein typisches Elutionsprofil beschrieben. Dabei zeigt sich ein diffusiver Flux des schon eluierten Proteins aus Bereichen oberhalb des untersuchten Partikels in das Partikel, bevor das adsorbierte Protein eluiert, was zur Peakverbreiterung beiträgt.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen unter adsorptiven Bedingungen, zeigten sich keine deutlichen Unterschiede im Verhalten der Biokonjugate im Vergleich mit dem nativen Protein, da die Salzkonzentration mit 1 M so hoch gewählt wurde, daß alle Proteinspecies im Wesentlichen vollständig und gleichzeitig eluierten.



## **5.2 Ausblick**

### **5.2.1 Gleichgewichtsverteilungskoeffizient**

Weitere Messungen des Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten in chromatographischen Festphasen für die Modellierung sollten mit definierteren Makromolekülen wie Dextran, Ficoll oder Pullulan durchgeführt werden, um den Einfluß von nicht-spezifischen Interaktionen und Unsicherheiten in der Größenbestimmung der Proteine zu vermeiden.

Die Untersuchungen sollten auf Multikomponentenversuche ausgeweitet werden. Der Einfluß eines adsorbierten Proteins auf den Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten eines nicht-adsorbierenden Proteins sollte ermittelt werden.

### **5.2.2 Intrapartikulärer Diffusionskoeffizient**

Wie auch beim Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten sollten definierte Polymere für die Messung eingesetzt werden, um Festphaseneigenschaften zu bestimmen.

Die Messung des intrapartikulären Diffusionskoeffizienten in Multikomponentensysteme sollte ausgeweitet werden und geeignete Modelle für die Beschreibung der gefundenen Effekte entwickelt werden.

Entsprechend den Arbeiten zum Gleichgewichtverteilungskoeffizienten sollte der intrapartikuläre Diffusionskoeffizient in weiteren Festphasen gemessen werden, um den Einfluß von Festphaseneigenschaften auf den intrapartikulären Transport besser zu verstehen. Es sollten Anpassungen der experimentellen Daten an andere Modelle durchgeführt werden, da die formale Beschreibung der gefunden Effekte unzureichend ist.

Desweiteren sind weitere Proteinkombinationen auszutesten, die eine Diffusionsmessung in Anwesenheit eines schon adsorbierten Proteins erlaubt, um einen Einblick in die Änderung des intrapartikulären Transports durch adsorbierte Proteine zu gewinnen.

### **5.2.3 Größenausschlusschromatographie**

Für weitergehende Untersuchungen zu größenausschlusschromatographischen Trennungen sollte eine Verbesserung der Mikrosäulenkonstruktion erreicht werden, die eine Minimierung der Rückvermischungseffekte bewirkt.

Die Beschreibung der Trennung über ein GRM sollte auf weitere Proteine und Festphasensysteme ausgeweitet werden.

#### **5.2.4 Adsorptionsmessungen auf dem Einzelpartikelniveau**

Die Anwesenheit von multiplen Biokonjugatprodukten, z.B. mehrere Fluoreszenzfarbstoffe an einem Protein bzw. ein Fluoreszenzfarbstoff an unterschiedlichen Positionen des Proteins, sollte mit geeigneten hochauflösenden Methoden, wie z.B. MALDI-TOF Massenspektrometrie, untersucht werden. Die Auswirkungen der Biokonjugation auf die Oberflächenladung sollte mit Molecular Modeling Programmen untersucht werden, um die Änderung der Adsorptionseigenschaften auf molekularem Niveau zu verstehen.

Verfahren zur Bestimmung von Multikomponenten SMA Parameter sollten entwickelt werden, um die evtl. vorhandene Abweichung der Einzelkomponenten SMA Parameter vom Verhalten der Proteine in einem Multikomponentensystem zu überprüfen.

Generell müsste überprüft werden, ob native fluoreszierende Proteine wie das grüne fluoreszierende Protein für die Adsorptionsmessungen geeignet sind, weil damit das Problem der Biokonjugation umgangen werden kann. Als Alternative könnten rekombinante Proteine mit einer freien Thiolgruppe vollständig derivatisiert werden, wobei unter geeigneten experimentellen Bedingungen keine Nebenprodukte entstehen würden. Die Verwendung von Multiphotonenanregung für die direkte Detektion von nativem Protein über die intrinsische Fluoreszenz sollte zusätzlich überprüft werden.

Um die Problematik der Unterschiede zwischen Biokonjugat und nativem Protein zu umgehen, könnten affinitätschromatographische Trennungen untersucht werden, bei denen die Ähnlichkeit zwischen den beiden Species sehr wahrscheinlich ist. Bei der hydrophoben Interaktionschromatographie sind aller Wahrscheinlichkeit nach ähnliche Probleme im Unterschied zwischen Biokonjugat und nativem Protein zu erwarten.

#### **5.2.5 Modellierung und Simulation**

Die Komplexität des verwendeten allgemeinen Geschwindigkeitsmodell macht die manuelle Parameteroptimierung nahezu unmöglich. Eine Sensitivitätsanalyse über alle Parameter, speziell die SMA Parameter, sollte die entscheidenden Faktoren ermitteln, die den größten Effekt auf die Anpassungsergebnisse besitzen. Ferner sollten alle Parameter in eine

Optimierungsroutine einbezogen werden, um zu überprüfen, ob das vorgestellte Modell generell in der Lage ist, die gemessenen Adsorptionsprofile nachzuvollziehen.

Die drei unterschiedlichen Adsorptionsversuche mit den jeweiligen Biokonjugaten sollten gleichzeitig an ein Adsorptionsprofil des nativen Proteins angepasst werden, da davon ausgegangen werden kann, daß sich das Adsorptionsprofil des nativen Proteins nicht ändert.

Die Simulation auf Einzelpartikelniveau sollte auf die gesamte Säulenlänge ausgeweitet werden, wobei weitere Messungen an unterschiedlichen Positionen innerhalb der Mikrosäule eine höhere Anpassungsgenauigkeit ermöglichen würde.

Ausgehend von den Anpassungsergebnissen und einer Sensitivitätsanalyse sollten modellbasiert weitere Experimente geplant werden, die den vermuteten Einfluß der Ad- und Desorptionsgeschwindigkeit in der Ionenaustauschchromatographie von Proteinen gezielt untersuchen können.

### **5.2.6 Elution**

Das gefundene Elutionsprofil sollte über ein GRM modelliert werden, um das Zusammenspiel zwischen Proteindiffusion, Desorptionskinetik und Bulkproteinverlauf auf den intrapartikulären Proteinkonzentrationsverlauf besser zu verstehen.

Eine Ausweitung der Untersuchung von intrapartikulären Elutionsvorgängen mittels CLSM auf Gradientenversuche erscheint nicht sinnvoll, solange die hier verwendeten Biokonjugate verwendet werden, weil es zu Unterschieden im Elutionsverhalten zwischen Biokonjugat und nativem Protein bei niedrigeren Salzkonzentrationen kommen wird.

## 6 Literatur

### 6.1 Bücher

Amersham Biosciences. (2002). Gel filtration.

Atkins, P.W. (1996). Physikalische Chemie. VCH.

Cussler, E.L. (1997). Diffusion. 2<sup>nd</sup> edition. Cambridge University Press.

Dubin, P.L. (ed.). (1988). Aqueous Size-exclusion Chromatography. Elsevier.

Giddings, J.C. (1991). Unified separation science. Wiley.

Guiochon, G., Lin, B. (2003). Modeling for preparative chromatography. Academic Press.

Hermanson, G.T. (1996). Bioconjugate techniques. Academic Press.

Janson, J.C., Ryden, L. (1998). Protein purification 2<sup>nd</sup> edition. Wiley-VCH.

Ladish, M.R. (2001). Bioseparations engineering. Wiley.

Lakowicz, J.R. (1997). Principles of fluorescence spectroscopy. 2<sup>nd</sup> edition. Plenum Press.

Neue, U.D. (1997). HPLC columns. Wiley-VCH.

Pawley, J.B. (ed.). (1995). Handbook of biological confocal microscopy. 2<sup>nd</sup> edition. Plenum Press.

Ruthven, D.M. (1984). Principles of adsorption and adsorption processes. Wiley.

Sober, H.A. (ed.). (1970). Handbook of biochemistry. 2<sup>nd</sup> edition. CRC Press.

Subramanian, G. (ed.), (1998). Bioseparation and Bioprocessing. Wiley-VCH.

Tanford, C. (1961). Physical chemistry of macromolecules. Wiley.

Wankat, P.C. (1994). Rate-controlled separations. Kluwer.

Yamamoto, S. (1988). Ion exchange chromatography of proteins. Dekker.

### 6.2 Artikel

Amsden, B. (1998). Solute diffusion within hydrogels. Mechanisms and models. *Macromolecules* 31: 8382-8395.

Anderson, J.R., *et al.* (2002). Analysis by capillary electrophoresis of the kinetics of charge ladder formation for bovine carbonic anhydrase. *Anal Chem* 74: 1870-1878.

Arshady, R. (1991). Beaded polymer supports and gels I. Manufacturing techniques. *J Chromatogr* 586: 181-197.

Arshady, R. (1991). Beaded polymer supports and gels II. Physico-chemical criteria and functionalization. *J Chromatogr* 586: 199-219.

Arve, B.H., Liapis, A.I. (1987). Modeling and analysis of elution stage of biospecific adsorption in finite bath. *Biotech Bioeng* 31: 240-249.

Attiya, S. *et al.* (2002). Affinity protection chromatography for efficient labeling of antibodies for use in affinity capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 23: 750–758.

Banerjee, S.K., Pogolotti, A., Rupley, J.A. (1975). Self-Association of lysozyme. *J Biol Chem* 250: 8260-8266.

Banks, P.R., Paquette D.M. (1995). Monitoring of a conjugation reaction between fluorescein isothiocyanate and myoglobin by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr A* 693: 145-154.

Barnthouse, K. (1998). Ion-exchange displacement chromatography of recombinant protein therapeutics from complex biological mixtures. Dissertation. Troy.

Berk, D.A., Yuan, F., Leunig, M., Jain, R.K. (1993). Fluorescence photobleaching with spatial fourier analysis. *Biophys J* 65: 2428-2436.

Berlier, J.E., *et al.* (2003). Quantitative comparison of long-wavelength alexa fluor dyes to cy dyes: fluorescence of the dyes and their biocojugates. *J Histochem Cytochem* 51: 1699-1712.

Biesheuvel, P.M., Stroeve, P., Barneveld, P.A. (2004). Effect of protein adsorption and ionic strength on the equilibrium partition coefficient of ionizable macromolecules in charged nanopores. *J Phys Chem B* 108: 17660-17665.

Boardman, N.K., Partridge, S.M. (1955). Separation of neutral proteins on ion-exchange resins. *Biochem J* 59: 543-552.

Böhmer, M., Pampaloni, F., Wahl, M., *et al.* (2001). Time-resolved confocal scanning device for ultrasensitive fluorescence detection. *Rev Sci Instr* 72: 4145-4152.

Boschetti, E. (1994). Advanced sorbents for preparative protein separation purposes. *J Chromatogr A* 658: 207-236.

Bosma, J.C., Wesselingh, J.C. (2000). Partitioning and diffusion of large molecules in fibrous structures. *J Chromatogr B* 743: 169–180.

Boyer, P.M., Hsu, J.T. (1991). Experimental studies of restricted protein diffusion in an agarose matrix. *AIChE J* 38: 259-272.

Brautigan, D.L., Ferguson-Miller, S., Margoliash, E. (1978). Definition of cytochrome c binding domains by chemical modification. *J Biol Chem* 253: 130-139.

Brinkley, M. (1992). A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens, and cross-linking reagents. *Bioconj Chem* 3: 2-13.

Brooks, C.A., Cramer, S.M. (1992). Steric mass-action ion exchange displacement profiles and induced salt gradients. *AIChE J* 38: 1969-1978.

Brownlow, S., Cabral, J.H.M., Cooper, R., *et al.* (1997). Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 angstrom resolution - Still an enigmatic lipocalin. *Structure* 5: 481-495.

Buck, K.K.S., Dungan, S.R., Phillips, R.J. (1999). The effect of solute concentration on hindered gradient diffusion in polymeric gels. *J Fluid Mech* 396: 287-317.

Burns, D.B., Zydney, A.L. (2001). Contributions to electrostatic interactions on protein transport in membrane systems. *AIChE J* 41: 1101-1114.

Buschmann, V., Weston, K.D. und Sauer, M. (2003). Spectroscopic study and evaluation of red-absorbing fluorescent dyes. *Bioconj Chem* 14: 195-204.

Carlsson, F., Hyltner, E., Arnebrant, T., *et al.* (2004). Lysozyme adsorption to charged surfaces. A Monte Carlo study. *J Phys Chem B* 108: 9871-9881.

Carta, G., Ubiera, A.R., Pabst, T.M. (2005). Protein mass transfer kinetics in ion exchange media: measurements and interpretations. *Chem Eng Technol* 28: 1252-1264.

Charcosset, C., Bernengo, J.C. (2000). Comparison of microporous membrane morphologies using confocal scanning laser microscopy. *J Memb Sci* 168: 53-62.

Chicz, R.M., Regnier, F.E. (1989). Single amino acid contributions to protein retention in cation-exchange chromatography. *Anal Chem* 61: 2059-2066.

Chicz, R.M., Regnier, F.E. (1988). Surface-mediated retention effects of subtilisin site-specific variants in cation-exchange chromatography. *J Chromatogr* 443: 193-203.

Coffman, J.L., Lightfoot, E.N., Root, T.W. (1997). Protein diffusion in porous chromatographic media studied by proton and fluorine PFG-NMR. *J Phys Chem B* 101: 2218-2223.

Cong, R., Temyanko, E., Russo, P.S. (2005). Diffusion of labeled polyelectrolyte probes in unlabeled polyelectrolyte matrix solutions. *Macromolecules* 38: 10627-10630.

Cox, W.G., Beaudet, M.P., Agnew, J.Y., Ruth, J.L. (2004). Possible sources of dye-related signal correlation bias in two-color DNA microarray assays. *Anal Biochem* 331: 243-254.

Craig, D.B., Dovichi, N.J. (1998). Multiple labeling of proteins. *Anal Chem* 70: 2493-2494.

Cvetkovic, A., Straathof, A.J., Krishna, R., van der Wielen, L.A. (2005). Adsorption of xanthene dyes by lysozyme crystals. *Langmuir* 21: 1475-1480.

Cvetkovic, A., Picioreanu, C., Straathof, A.J., Krishna, R., van der Wielen, L.A. (2005). Relation between pore sizes of protein crystals and anisotropic solute diffusivities. *J Am Chem Soc* 127: 875-9.

Cvetkovic, A., Zomerdijk, M., Straathof, A.J., Krishna, R., van der Wielen, L.A. (2004). Adsorption of fluorescein by protein crystals. *Biotechnol Bioeng* 87: 658-68.

- Cvetkovic, A., Straathof, A.J., Hanlon, D.N., van der Zwaag, S., Krishna, R., van der Wielen, L.A. (2004). Quantifying anisotropic solute transport in protein crystals using 3-D laser scanning confocal microscopy visualization. *Biotechnol Bioeng* 86: 389-98.
- Dai, W.S. und Barbari, T.A. (2000). Characterization of mesh size asymmetry in hydrogel membranes using confocal microscopy. *J Memb Sci* 171: 45–58.
- Danilov, A.V., Mustaeva, L.G., Vagenina, I.V., *et al.* (1996). Size-exclusion chromatography on soft packing material under axial compression. *J Chromatogr A* 732: 17-25.
- Davies, P.A. (1989). Determination of diffusion coefficients of proteins in beaded agarose by gel filtration. *J Chromatogr* 483: 221-237.
- DePhillips, P., Lenhoff, A.M. (2000). Pore size distributions of cation-exchange adsorbents determined by inverse size-exclusion chromatography. *J Chromatogr A* 883: 39–54.
- Doherty, P., Benedek, G.B. (1974). The effect of electric charge on the diffusion of macromolecules. *J Chem Phys* 61: 5426-5434.
- Dong, S.-Y., Ma, H.-M., Duan, X.-J., Chen, X.-Q. und Li, J. (2005). Detection of local polarity of  $\alpha$ -Lactalbumin by N-terminal specific labeling with a new tailor-made fluorescent probe. *J Proteome Res* 4: 161-166.
- Drager, R.R., Regnier, F.E. (1986). Application of the stoichiometric displacement model of retention to anion-exchange chromatography of nucleic acids. *J Chromatogr* 359: 147-155.
- Drager, R.R., Regnier, F.E. (1987). Retention mechanism of lactate dehydrogenase in anion-exchange chromatography. *J Chromatogr* 406: 237-246.
- Drevin, I., Larsson, L., Eriksson, I., Johansson, B.L. (1990). Chemical properties of and solute-support interactions with the gel filtration medium Superdex 75 prep grade. *J Chromatogr* 514: 137-146.
- Drevin, I., Johansson, B.L. (1991). Stability of Superdex 75 prep grade and Superdex 200 prep grade under different chromatographic conditions. *J Chromatogr* 547: 21-30.
- Dubin, P.L., Edwards, S.L., Mehta, M.S., Tomalia, D. (1993). Quantitation of non-ideal behavior in protein size exclusion chromatography. *J Chromatogr* 635: 51-60.
- Dziennik, S.R., Belcher, E.B., Barker, G.A., *et al.* (2003). Nondiffusive mechanisms enhance protein uptake rates in ion exchange particles. *Proc Nat Acad Sci* 100: 420-425.
- Duckworth, M., Yaphe, W. (1971). The structure of agar. *Carbohydrate Res* 16: 189-197.
- Fausnaugh, J., Regnier, F. (1986). Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J Chromatogr* 359: 131– 146.
- Fausnaugh-Pollitt, J., Thevenon, G., Janis, L., Regnier, F.E. (1988). Chromatographic resolution of lysozyme variants. *J Chromatogr* 443: 221-228.

- Fernandez-Sousa, J.M., Rodriguez, R. (1977). Lysozyme-agarose interaction. *Biochem Biophys Res Commun* 74: 1426-1431.
- Gallant, S.R., Vunnum, S., Cramer, S.M. (1996). Optimization of preparative ion-exchange chromatography of proteins: linear gradient separations. *J Chromatogr A* 725: 295-314.
- Gallant, S.R. (2003). Modeling ion-exchange adsorption of proteins in a spherical particle. *J Chromatogr A* 1028: 189-195.
- Gallant, S., Vunnum, S., Cramer, S.M. (1996). Modeling gradient elution of proteins in ion exchange chromatography. *AIChE J* 42: 2511-2520.
- Gallant, S., Vunnum, S., Cramer, S.M. (1996). Optimization of preparative ion-exchange chromatography of proteins-linear gradient separations. *J Chromatogr* 725: 295-314.
- Gao, J. und Whitesides, G.M. (1997). Using protein charge ladders to estimate the effective charges and molecular weights of proteins in solution. *Anal Chem* 69: 575-580.
- Garke, G., Hartmann, R., Papamichael, M., Deckwer, W.D., Anspach, F.B. (1999). The influence of protein size on adsorption kinetics and equilibria in ion-exchange chromatography. *Sep Sci Tech* 32: 2521-2538.
- Gentle, I.E., De Souza, D.P. und Baca, M. (2004). Direct production of proteins with N-terminal cysteine for site-specific conjugation. *Bioconj Chem* 15: 658-663.
- Ghose, S., Nagrath, D., Hubbard, B., Brooks, C., Cramer, S.M. (2004). Use and optimization of a dual-flowrate loading strategy to maximize throughput in Protein-A affinity chromatography. *Biotechnol Prog* 20: 830-840.
- Gibbs, S.J., Chu, A.S., Lightfoot, E.N., Root, T.W. (1991). Ovalbumin diffusion at low ionic strength. *J Phys Chem* 95: 467-471.
- Gibbs, S.J., Lightfoot, E.N., Root, T.W. (1992). Protein diffusion in porous gel filtration chromatography media studied by pulsed field gradient NMR spectroscopy. *J Phys Chem* 96: 1458-1462.
- Golshan-Shirazi, S., Guiochon, G. (1994). Modeling of preparative chromatography. *J Chromatogr A* 658: 147-171.
- Gruber, H.J., *et al.* (2000). Anomalous fluorescence enhancement of cy3 and cy3.5 versus anomalous fluorescence loss of cy5 and cy7 upon covalent Linking to IgG and noncovalent binding to avidin. *Bioconj Chem* 11: 696-704.
- Grunwaldt, G., Haebel, S., Spitz, C., *et al.* (2002). Multiple binding sites of fluorescein isothiocyanate moieties on myoglobin: photophysical heterogeneity as revealed by ground- and excited-state spectroscopy. *J Photochem Photobiol B* 67: 177-186.
- Guo, X, Condra, M., Kimura, K., Berth, G., Dautzenberg, H., Dubin, P.L. (2003). Determination of molecular weight of heparin by size exclusion chromatography with universal calibration. *Anal Biochem* 312: 33-39.



- Gutenwik, J., Nilsson, B., Axelsson, A. (2004). Determination of protein diffusion coefficients in agarose gel with a diffusion cell. *Biochem Eng J* 19: 1–7.
- Hagel, L., Ostberg, M., Andersson, T. (1996). Apparent pore size distributions of chromatography media. *J Chromatogr A* 743: 33-42.
- Hall, K.R., Eagleton, L.C., Acrivos, A. and Vermeulen, T. (1966). Pore- and solid diffusion kinetics in fixed-bed adsorption under constant-pattern conditions. *I&EC Fund* 5: 212-223.
- He, L., Niemeyer, B. (2003). A novel correlation for protein diffusion coefficients based on molecular weight and radius of gyration. *Biotechnol Prog* 19: 544-548.
- Heinemann, M., Limper, U., Büchs, J. (2004). New insights in the spatially resolved dynamic pH measurement in macroscopic large absorbent particles by confocal laser scanning microscopy. *J Chromatogr A* 1024: 45–53.
- Hellberg, U., Ivarsson, J.P., Johansson, B.L. (1996). Characteristics of Superdex® prep grade media for gel filtration chromatography of proteins and peptides. *Process Biochem* 31: 163-172.
- Hjerten, S., Liu, Z.Q., Yang, D. (1984). Some studies on the resolving power of agarose-based high-performance liquid chromatography media for the separation of macromolecules. *J Chromatogr* 296: 115-120.
- Holland, D.J., Sederman, A.J., Mantle, M.D., Gladden, L.F., Middelberg, A.P.J. (2004). Quantitative magnetic resonance imaging of urea and lysozyme in protein chromatography. *J Chromatogr A* 1033: 311–319.
- Homsy, G.M. (1987). Viscous fingering in porous media. *Annu Rev Fluid Mech* 19: 271-311.
- Houen, G., Olsen, D.T., Hansen, P.R., Petersen, K.B. und Barkholt, V. (2003). Preparation of bioconjugates by solid-phase conjugation to ion exchange matrix-adsorbed carrier proteins. *Bioconj Chem* 14: 75-79.
- Hubbuch, J., Linden, T., Knieps, E., Ljunglof, A., Thommes, J., Kula, M.R. (2003). Mechanism and kinetics of protein transport in chromatographic media studied by confocal laser scanning microscopy. Part I. The interplay of sorbent structure and fluid phase conditions. *J Chromatogr A* 1021: 93-104.
- Hubbuch, J., Linden, T., Knieps, E., Thommes, J., Kula, M.R. (2003). Mechanism and kinetics of protein transport in chromatographic media studied by confocal laser scanning microscopy. Part II. Impact on chromatographic separations. *J Chromatogr A* 1021: 105-115.
- Hubbuch, J., Linden, T., Knieps, E., Thommes, J., Kula, M.R. (2002). Dynamics of protein uptake within the adsorbent particle during packed bed chromatography. *Biotechnol Bioeng* 80: 359-368.
- Hunter, A.K., Carta, G. (2001). Protein adsorption on novel acrylamido-based polymeric ion-exchangers. III. Salt concentration effects and elution behaviour. *J Chromatogr A* 930: 79-93.

- Hussain, S., Mehta, M.S., Kaplan, J.I., Dubin, P.L. (1991). Experimental evaluation of conflicting models for size exclusion chromatography. *Anal Chem* 63: 1132-1138.
- Jin, X., Talbot, J., Wang, N.-H.L. (1994). Analysis of steric hindrance effects on adsorption kinetics and equilibria. *AIChE J* 40: 1685.
- Jing, P., Kaneta, T. und Imasaka, T. (2002). Micellar electrokinetic chromatography with diode laser-induced fluorescence detection as a tool for investigating the fluorescence labeling of proteins. *Electrophoresis* 23: 550–555.
- Johnson, E.M., Berk, D.A., Jain, R.K., Deen, W.M. (1995). Diffusion and partitioning of proteins in charged agarose gels. *Biophys J* 68: 1561-1568.
- Johnson, E.M., Deen, W.M. (1996). Electrostatic effects on the equilibrium partitioning of spherical colloids in random fibrous media. *J Colloid Interf Sci* 178: 749–756.
- Kagedal, L., Engström, B., Ellegren, H., Lieber, A.K., Lundström, H., Persson, A., Schenning, M. (1991). Chemical, physical and chromatographic properties of Superdex 75 prep grade and Superdex 200 prep grade gel filtration media. *J Chromatogr* 537: 17-32.
- Kapanidis, A.N., Ebricht, Y.W. und Ebricht, R.H. (2001). Site-specific incorporation of fluorescent probes into protein: hexahistidine-tag-mediated fluorescent labeling with  $(\text{Ni}^{2+}:\text{nitrilotriacetic acid})_n$ -fluorochrome conjugates. *J Am Chem Soc* 123: 12123-12125.
- Kapanidis, A.N., Weiss, S. (2002). Fluorescent probes and bioconjugation chemistries for single-molecule fluorescence analysis of biomolecules. *J Chem Phys* 117: 10953-10964.
- Karolin, J., Johansson L.B.-A., Strandberg, L., Ny, T. (1994). Fluorescence and absorption spectroscopic properties of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) derivatives in liquids, lipid membranes, and proteins. *J Am Chem Soc* 116: 7801-7806.
- Kopaciewicz, W., Rounds, R.A., Fausnaugh, J., Regnier, F.E. (1983). Retention model for high-performance ion exchange chromatography. *J Chromatogr* 266: 3-21.
- Kosto, K.B., Panuganti, S., Deen, W.M. (2004). Equilibrium partitioning of Ficoll in composite hydrogels. *J Colloid Interf Sci* 277: 404–409.
- Kosto, K.B., Deen, W.M. (2004). Diffusivities of macromolecules in composite hydrogels. *AIChE J* 50: 2648-2658.
- Krull, I.S., *et al.* (1997). Labeling reactions applicable to chromatography and electrophoresis of minute amounts of proteins. *J Chromatogr B* 699: 173-208.
- Larsson, M., Lindgren, J., Ljunglof, A., Knuutila, K.G. (2003). Ligand distributions in agarose particles as determined by confocal Raman spectroscopy and confocal scanning laser microscopy. *Appl Spectrosc* 57: 251-255.
- Larsson, M., Lindgren, J., Ljunglof, A., Knuutila, K.G. (2002). Confocal Raman and fluorescence spectroscopy applied to polymeric chromatographic adsorbent particles. *J Chromatogr A* 954: 151-158.

- Lazzara, M.J., Blankschtein, D., Deen, W.M. (2000). Effects of multisolute steric interactions on membrane partition coefficients. *J Colloid Interf Sci* 226: 112-122.
- Lebreton, B., Lyddiatt, A. (2000). Application of aqueous two-phase partition to the production of homogeneous preparations of fluorescently labelled human serum albumin. *J Chromatogr B* 743: 263-269.
- Lee, S.C., Whitaker, J.R. (2004). Are molecular weights of proteins determined by Superose 12 column chromatography correct? *J Agric Food Chem* 52: 4948-4952.
- Leonard, M. (1997). New packing materials for protein chromatography. *J Chromatogr B* 699: 3-27.
- Lewus, R.K., Carta, G. (1999). Binary protein adsorption gel-composite ion-exchange media. *AIChE J* 45: 512-522.
- Li, Y.L., Pinto, N.G. (1994). Influence of lateral interactions on preparative protein chromatography. *J Chromatogr* 658: 445-457.
- Li, Z.G., Gu, Y.S., Gu, T.Y. (1998). Mathematical modeling and scale-up of size-exclusion chromatography. *Biochem Eng J* 2: 145-155.
- Liu, H.J., Strong, R.E., Krull, I.S., Cohen, S.A. (2001). Homogeneous preparation of fluorescent-derivatized insulin and its application to competitive chromatographic immunoassays. *Anal Biochem* 298: 103-111.
- Liapis, A.I., Grimes, B.A. (2005). The coupling of the electrostatic potential with the transport and adsorption mechanisms in ion exchange chromatography systems: theory and experiments. *J Sep Sci* 28: 1909-1926.
- Liapis, A.I., Grimes, B.A., Lacki, K., Neretnieks, I. (2001). Modeling and analysis of the dynamic behavior of mechanisms that result in the development of inner radial humps in the concentration of a single adsorbate in the adsorbed phase of porous adsorbent particles observed in confocal scanning laser microscopy experiments: diffusional mass transfer and adsorption in the presence of an electrical double layer. *J Chromatogr A* 921: 135-145.
- Linden, T. (2001). Untersuchungen zum inneren Transport bei der Proteinadsorption an poröse Medien mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie. Dissertation. Düsseldorf.
- Linden, T., Ljunglöf, A., Hagel, L., Kula, M.R., Thömmes, J. (2002). Visualizing patterns of protein uptake to porous media using confocal laser scanning microscopy. *Sep Sci Tech* 37: 1-32.
- Linden, T., Ljunglöf, A., Kula, M.R., Thömmes, J. (1999). Visualizing two-component protein diffusion in porous adsorbents by confocal scanning laser microscopy. *Biotechnol Bioeng* 65: 622-630.
- Ljunglöf, A., Bergvall, P., Bhikhabhai, R., Hjorth, R. (1999). Direct visualisation of plasmid DNA in individual chromatography adsorbent particles by confocal scanning laser microscopy. *J Chromatogr A* 844: 129-135.

- Ljunglöf, A., Thommes, J. (1998). Visualising intraparticle protein transport in porous adsorbents by confocal microscopy. *J Chromatogr A* 813: 387-395.
- Ljunglöf, A., Larsson, M., Knuutila, K.G., Lindgren, J. (2000). Measurement of ligand distribution in individual adsorbent particles using confocal scanning laser microscopy and confocal micro-Raman spectroscopy. *J Chromatogr A* 893: 235-244.
- Ljunglöf, A., Hjorth, R. (1996). Confocal microscopy as a tool for studying protein adsorption to chromatographic matrices. *J Chromatogr A* 743: 75-83.
- Lu, J.Z., Zenobi, R. (1999). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for identifying the composition of labeled proteins. *Anal Biochem* 269: 312-316.
- Lu, J. und Zenobi, R. (2000). In-situ monitoring of protein labeling reactions by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Fresenius J Anal Chem* 366: 3–9.
- Malmsten, M., Xing, K., Ljunglöf, A. (1999). Confocal microscopy studies of trypsin immobilization on porous glycidyl methacrylate beads. *J Colloid Interface Sci* 220: 436-442.
- Masaro, L. Zhu, X.X. (1999). Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids. *Prog Polym Sci* 24: 731–775.
- Mattisson, C., Roger, P., Jonsson, B., Axelsson, A., Zacchi, G. (2000). Diffusion of lysozyme in gels and liquids. A general approach for the determination of diffusion coefficients using holographic laser interferometry. *J Chromatogr B* 743: 151–167.
- Moussaoui, M., Benlyas, M., Wahl, P. (1992). Diffusion of proteins in Sepharose Cl-B gels. *J Chromatogr* 591: 115-120.
- Müller, E. (2003). Polymere Oberflächenbeschichtung – eine Methode zur Herstellung von Trägermaterialien für die Biochromatographie. Habilitation. Magdeburg.
- Mujumdar, R.B., *et al.* (1993). Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconj Chem* 4: 105-111.
- Ogston, A.G. (1958). The spaces in a uniform random suspension of fibres. *Trans Faraday Soc* 54: 1754-1757.
- Ogston, F.R.S., Preston, B.N., Wells, J.D. (1973). On the transport of compact particles through solutions of chain-polymers. *Proc R Soc London A* 333: 297-316.
- Parente, E.S., Wetlaufer, D.B. (1986). Relationship between isocratic and gradient times in the high-performance liquid chromatography of proteins. *J Chromatogr* 355: 29-40.
- Pappenheimer, J.R., Renkin, E.M., Borrero, L.M. (1951). Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes. *Amer J Physiol* 167: 13-46.
- Parola, A.L., Lin, S. und Kobilka, B.K. (1997). Site-specific fluorescence labeling of the  $\beta_2$  adrenergic receptor amino terminus. *Anal Biochem* 254: 88–95.

- Pinto, D., *et al.* (2003). Kinetics and apparent activation energy of the reaction of the fluorogenic reagent 5-furoylquinoline-3-carboxaldehyde with ovalbumin. *J Chromatogr B* 793: 107-114.
- Pluen, A., Netti, P.A., Jain, P.K., Berk, D.A. (1999). Diffusion of macromolecules in agarose gels: comparison of linear and globular configurations. *Biophys J* 77: 542–552.
- Potschka, M. (1993). Mechanism of size-exclusion chromatography. *J Chromatogr* 648: 41-69.
- Potschka, M. (1991). Size exclusion chromatography of DNA and viruses: properties of spherical and asymmetric molecules in porous networks. *Macromolecules* 24: 5023-5039.
- Potschka, M. (1991). Interfacial effects in size-exclusion chromatography of latex. *J Chromatogr* 587: 276-279.
- Pujar, N.S., Zydney, A.L. (1998). Electrostatic effects on protein partitioning in size-exclusion chromatography and membrane ultrafiltration. *J Chromatogr A* 796: 229–238.
- Pujar, N.S., Zydney, A.L. (1997). Charge regulation and electrostatic interactions for a spherical particle in a cylindrical pore. *J Colloid Interf Sci* 192: 338–349.
- Pusey, M.L. (1991). Estimation of the initial equilibrium-constants in the formation of tetragonal lysozyme nuclei. *J Cryst Growth* 110: 60-65.
- Reichert, U., Linden, T., Belfort, G., *et al.* (2002). Visualising protein adsorption to ion-exchange membranes by confocal microscopy. *J Memb Sci* 199: 161-166.
- Renkin, E.M. (1954). Filtration, diffusion, and molecular sieving through porous cellulose membranes. *J Gen Physiol* 38: 225–243.
- Righetti, P.G., Caravaggio, T. (1976). Isoelectric points and molecular weights of proteins. *J Chromatogr* 127: 1-28.
- Rounds, M.A., Regnier, F.E. (1984). Evaluation of a retention model for high-performance ion-exchange chromatography using two different displacing salts. *J Chromatogr* 283: 37-45.
- Schmidt, D.E., Giese, R.W., Conron, D. *et al.* (1980). High-performance liquid-chromatography of proteins on a diol-bonded silica-gel stationary phase. *Anal Chem* 52: 177-182.
- Schröder, M., von Lieres, E., Hubbuch, J. (2006). Direct quantification of intraparticle protein diffusion in chromatographic media. *J Phys Chem B* 110: 1429-1436.
- Schuler, B. und Pannell, L.K. (2002). Specific labeling of polypeptides at amino-terminal cysteine residues using cy5-benzyl thioester. *Bioconj Chem* 13: 1039-1043.
- Shukla, A.A., Bae, S.S., Moore, J.A., Barnthouse, K.A., Cramer, S.M. (1998). Synthesis and characterization of high-affinity, low molecular weight displacers for cation-exchange chromatography. *Ind Eng Chem Res* 37: 4090-4098.

- Sinnecker, D., Voigt, P., Hellwig, N., Schaefer, M. (2005). Reversible photobleaching of enhanced green fluorescent proteins. *Biochemistry* 44: 7085-7094.
- Skidmore, G.L., Chase, H.A. (1990). Two-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose FF. *J Chromatogr* 505: 329-347.
- Shimura, K., Karger, B.L. (1994). Affinity probe capillary electrophoresis. *Anal Chem* 66: 9-15.
- Smith, F.G., Deen, W.M. (1980). Electrostatic double-layer interactions for spherical colloids in cylindrical pores. *J Colloid Interf Sci* 78: 444-465.
- Stoyanov, A.V., Ahmadzadeh, H., Krylov, S.N. (2002). Heterogeneity of protein labeling with a fluorogenic reagent, 3-(2-furoyl)quinoline-2- carboxaldehyde. *J Chromatogr B* 780: 283–287.
- Tanford, C., Kirkwood, J.G. (1957). Theory of protein titration curves. I. General equations for impenetrable spheres. *J Am Chem Soc* 59: 5333-5339.
- Tarvers, R.C., Church, F.C. (1985). Use of high-performance size-exclusion chromatography to measure protein molecular weight and hydrodynamic radius. *Int J Peptide Res* 26: 539-549.
- Teske, C.A., Schröder, M., Simon, R., *et al.* (2005). Protein-labeling effects in confocal laser scanning microscopy. *J Phys Chem B* 109: 13811-13817.
- Thömmes, J. (1999). Investigations on protein adsorption to agarose–dextran composite media. *Biotechnol Bioeng* 62: 358–362.
- Tugcu, N., Cramer, S.M. (2005). The effect of multi-component adsorption on selectivity in ion exchange displacement systems. *J Chromatogr A* 1063: 15-23.
- Tyn, M.T., Gusek, T.W. (1990). Prediction of diffusion coefficients of proteins. *Biotech Bioeng* 35: 327-338.
- van der Veen, M., Norde, W., Stuart, M.C. (2004). Electrostatic interactions in protein adsorption probed by comparing lysozyme and succinylated lysozyme. *Coll Surf B* 35: 33–40.
- Vunnun, V.S. (1997). Non-linear immobilized metal affinity chromatography of proteins. Dissertation. Troy.
- Whitley, R.D., van Cott, K.E., Wang, N.H.L. (1993). Analysis of nonequilibrium adsorption/desorption kinetics and implications for analytical and preparative chromatography. *Ind Eng Chem Res* 23: 149-159.
- Wilson, L.J., Adcock, L.D., Pusey, M.L. (1993). A dialysis technique for determining aggregate concentrations in crystallizing protein solutions. *J Phys D*: B113-B117.
- Williams, J.C., Mark, L.A., Eichholtz, S. (1998). Partition and permeation of dextran in polyacrylamide gels. *Biophys J* 75: 493–502.

Wood, R.J. *et al.* (2004). Optimized conjugation of a fluorescent label to proteins via intein-mediated activation and ligation. *Bioconj Chem* 15: 366-372.

Yamamoto, S., Nakanishi, K., Matsuno, R., Kamikubo, T. (1983). Ion exchange chromatography of proteins – prediction of elution curves and operating conditions. *Biotech Bioeng* 25: 1465-1483.

Yang, H., Etzel, M.R. (2003). Evaluation of three kinetic equations in models of protein purification using ion-exchange membranes. *Ind Eng Chem Res* 42: 890-896.

Yeh, Y., Iwai, S., Feeney, R.E. (1979). Conformations of denatured and renatured ovotransferrin. *Biochemistry* 18: 882-889.

Zhu, Y., Potschka, M., Dubin, P.L., Cai, C.H. (2001). A method for the quantitation of charge by size exclusion chromatography demonstrated with components of Ficoll 400. *Macromol Chem Phys* 202: 61–72.

## 7 Anhang

## 7.1 Material und Methoden

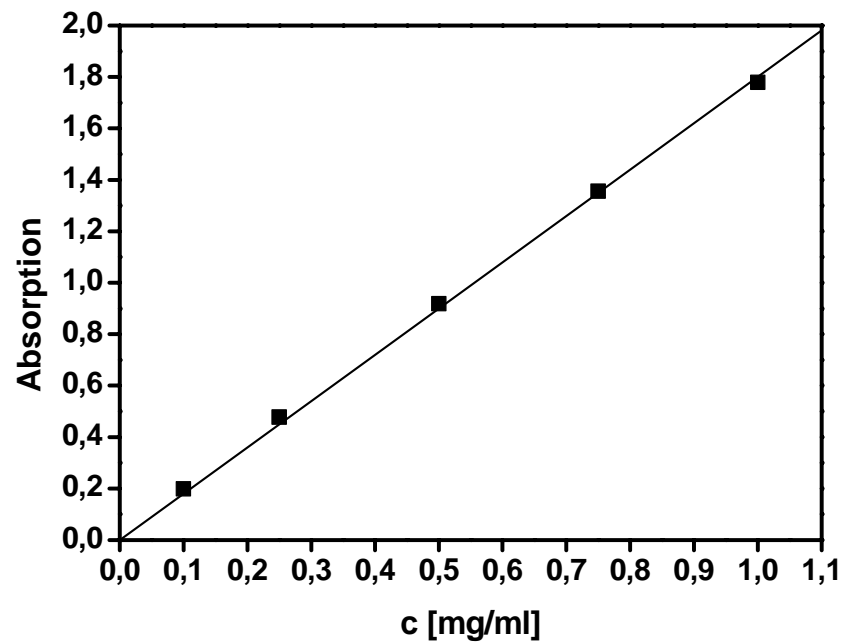


Abbildung 7.1. Auftragung der Absorption bei 280 nm von CTG-Lösungen unterschiedlicher Konzentration in Phosphatpuffer (pH 7,0, 50 mM) gemessen mit einem Cary 50 Spektrophotometer in Einmalplastikküvetten für UV Messungen.



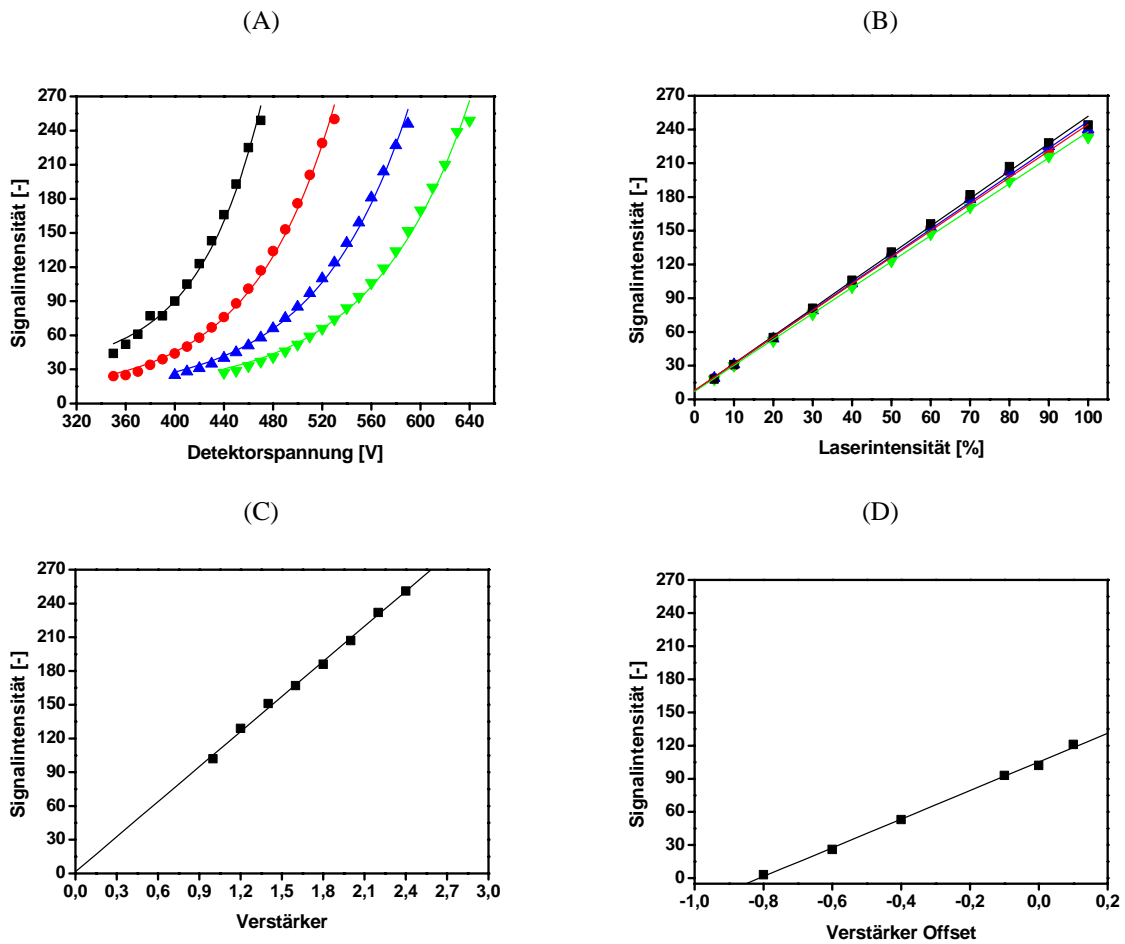


Abbildung 7.2. Auftragung der Signalintensität gemessen mit einem LSM 510 CLSM für BSA-Cy3 auf SP Sepharose FF. (A) Variation des Detector Gains für unterschiedlich beladene SP Sepharose FF Partikel. Q(Cy3): (■):  $3.2 \cdot 10^{-7}$  M (●):  $7.9 \cdot 10^{-8}$  M (▲):  $4.1 \cdot 10^{-8}$  M (▼):  $2.2 \cdot 10^{-8}$  M. (B) Variation der Laserintensität für unterschiedlich beladene SP Sepharose FF Partikel. (■):  $3.2 \cdot 10^{-7}$  M (●):  $7.9 \cdot 10^{-8}$  M (▲):  $4.1 \cdot 10^{-8}$  M (▼):  $2.2 \cdot 10^{-8}$  M. Detektor Gain für jeden Datensatz modifiziert um Übersteuern bei 100% Laserintensität zu vermeiden. (C) Variation des Amplifier Gains für einen Datensatz. (■):  $3.24 \cdot 10^{-7}$  M. (D) Variation des Amplifier Offsets für einen Datensatz. (■):  $3.24 \cdot 10^{-7}$  M.

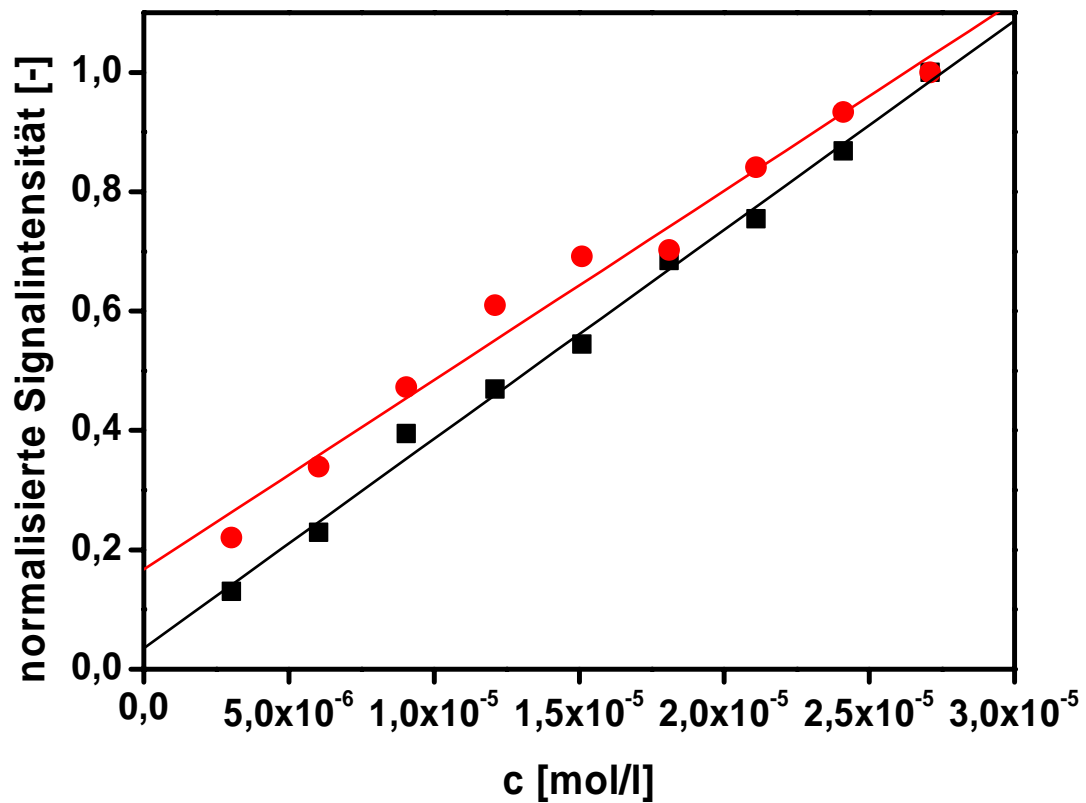


Abbildung 7.3. Auftragung der normalisierten Fluoreszenzintensität von BSA-Cy5 Lösungen in Phosphatpuffer (pH 7,0, 50 mM, 200 mM NaCl) in Anwesenheit von Sepharose 6 FF gemessen mit einem LSM 510 CLSM bei konstanten Detektoreinstellungen für jeden Datensatz. (■) Normalisierte Daten der gemittelten Bulkkonzentration neben dem Sepharose 6 FF Partikel. (●) Normalisierte Daten der gemittelten Partikelkonzentration im Sepharose 6 FF Partikel.

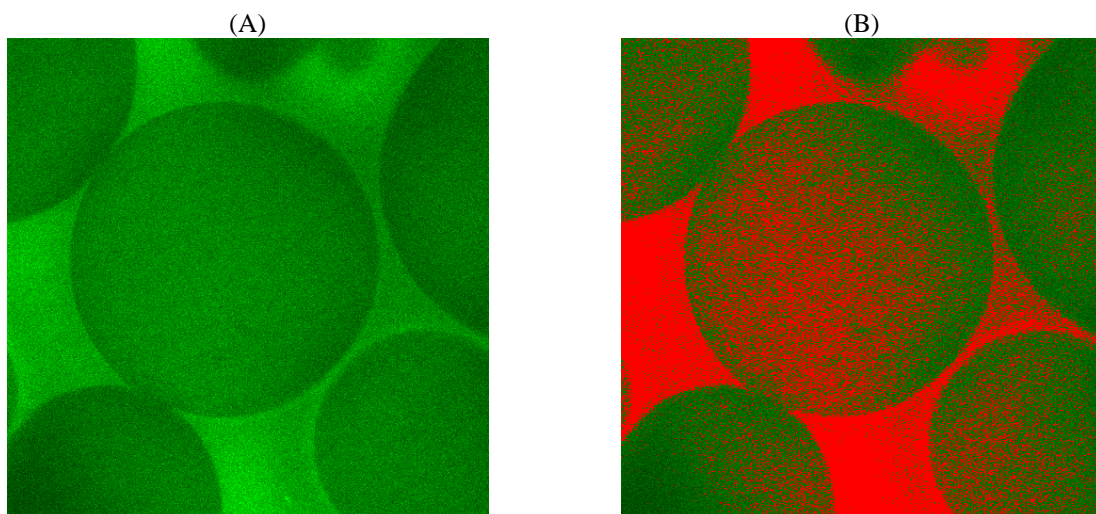


Abbildung 7.4. (A) Konfokale Messung eines Sepharose 6 FF Partikels mit BSA-Cy5 in einem gepackten Bett mit benachbarten Partikeln während eines Diffusionsversuches. (B) Gleicher Partikel wie in (A) mit Schwellenwertanpassung. Signale größer 125 werden rot und kleiner 125 grün dargestellt.

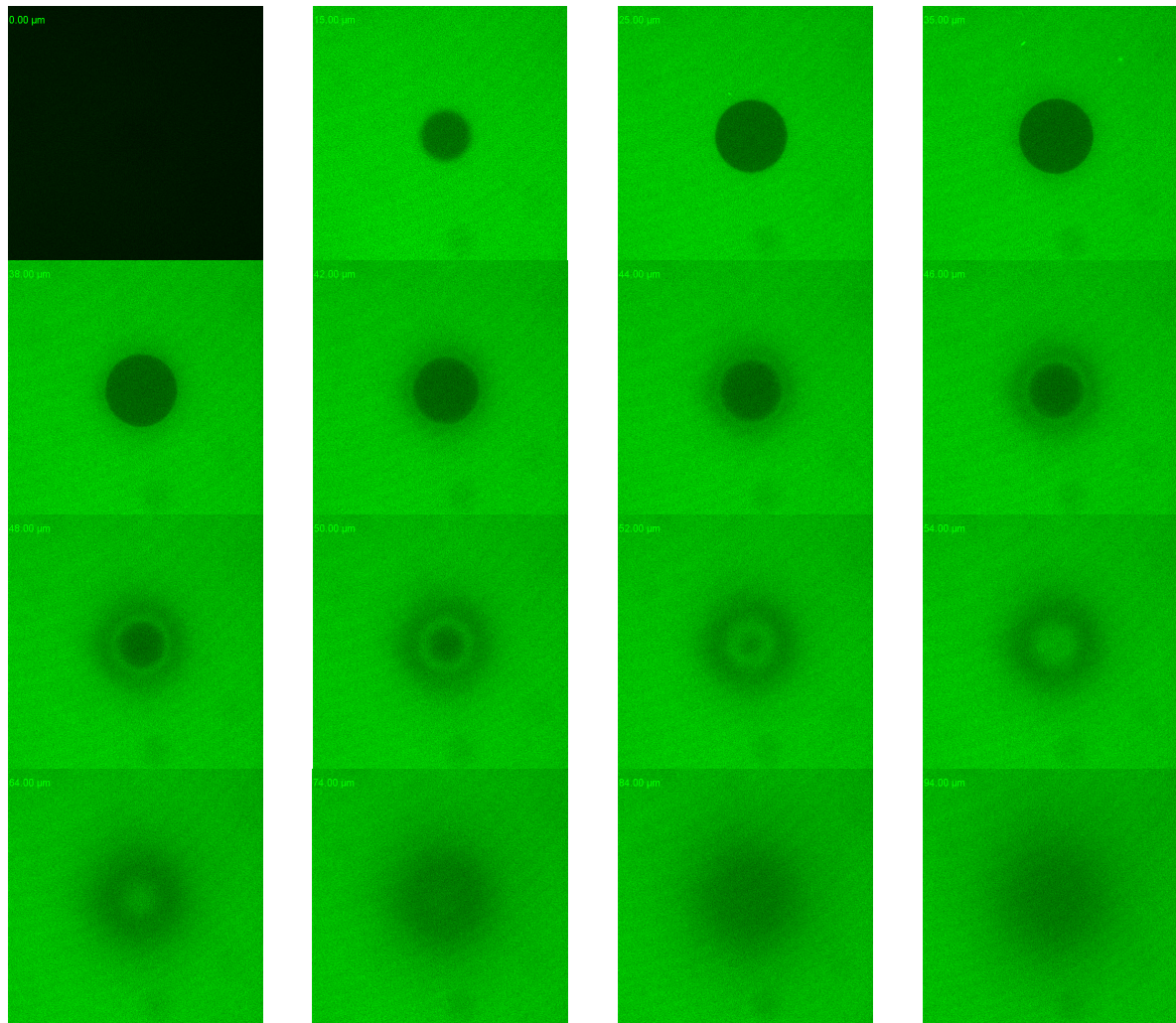


Abbildung 7.5. z-Stapel eines Q Sepharose FF Partikels inkubiert mit OVA-Cy5 (Phosphatpuffer, pH 7,0, 1 M NaCl) bis zum Gleichgewicht. Eindringtiefe vom Mikrotiterplattenboden in  $\mu\text{m}$  links oben in jedem Teilbild.

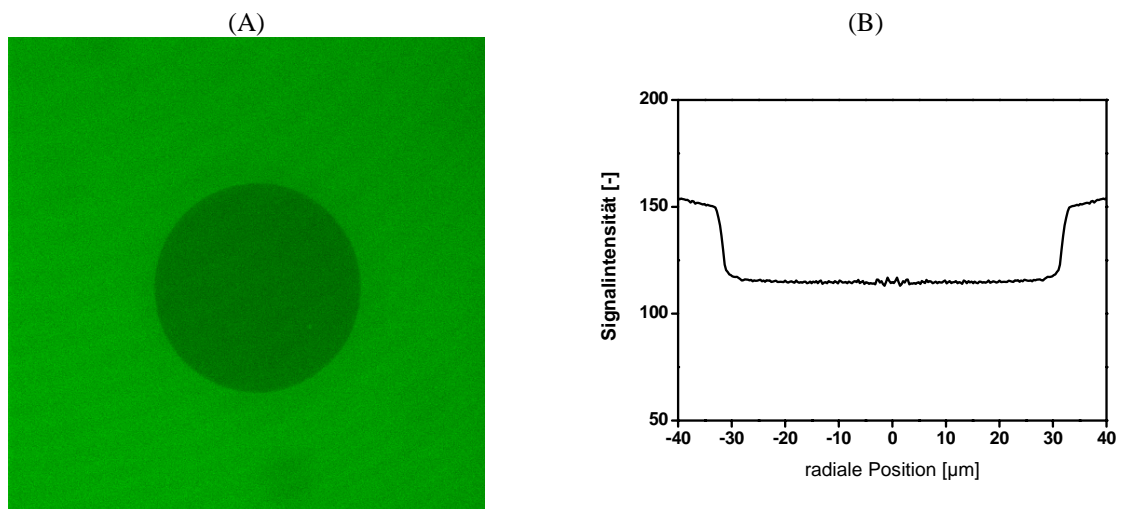


Abbildung 7.6. (A) Konfokale Messung von Sepharose 6 FF Partikel im Gleichgewicht mit OVA-Cy5 mit Fokus durch Partikelmitte. (B) Radial gemittelttes Signal von Partikel aus (A). Der Mittelungsring wurde größer gewählt als der sichtbare Radius des Partikels.

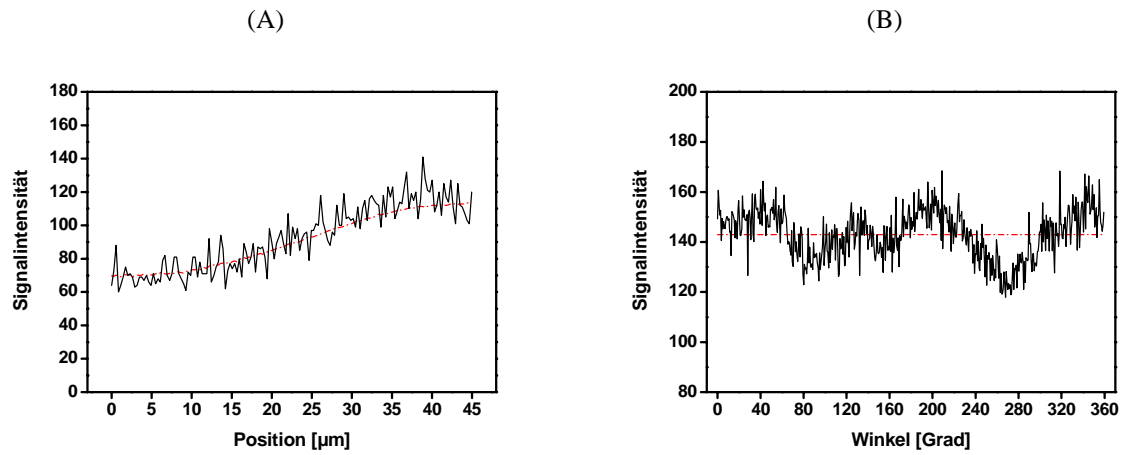


Abbildung 7.7. (A) Signalintensität auf einer Linie durch den Partikel (—) und radial gemittelt Signal (—) für BSA-Cy5 auf Sepharose 6 FF während eines Diffusionsversuchs. (B) Signal auf einem Kreisradius (—) und gemittelt Signal (—) für BSA-Cy5 auf Sepharose 6 FF.

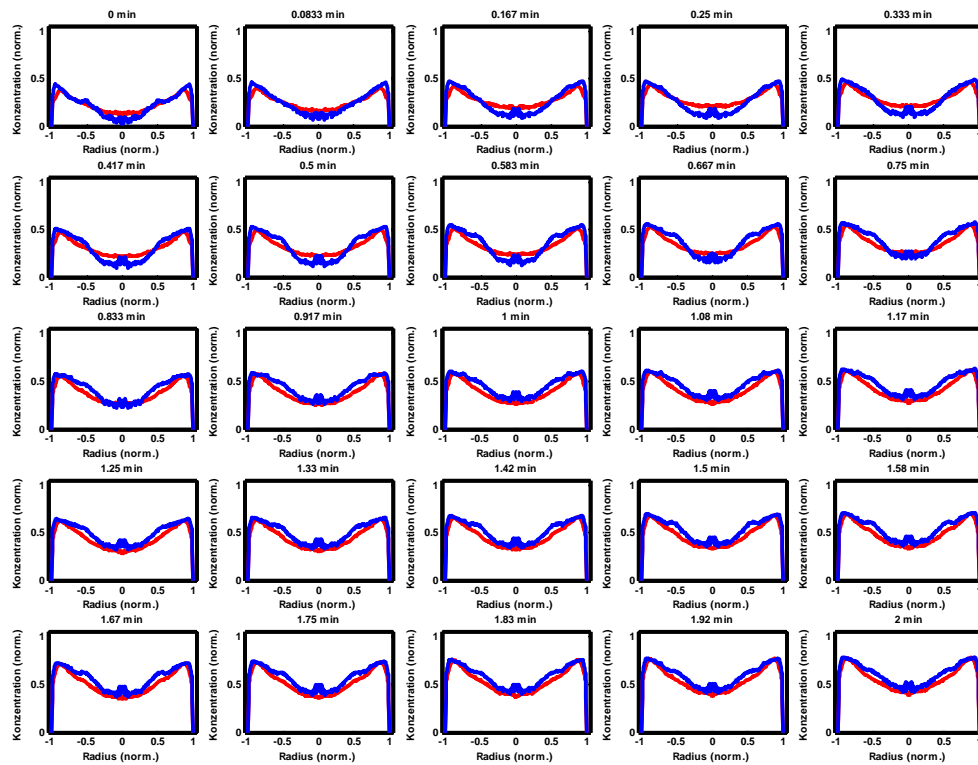


Abbildung 7.8. Normierte intrapartikuläre Profile eines konfokalen Datensatzes mit bewegendem Partikel. (—) Profil mit starrem Mittelungsring. (—) Profil mit manuell korrigiertem Mittelungsring.

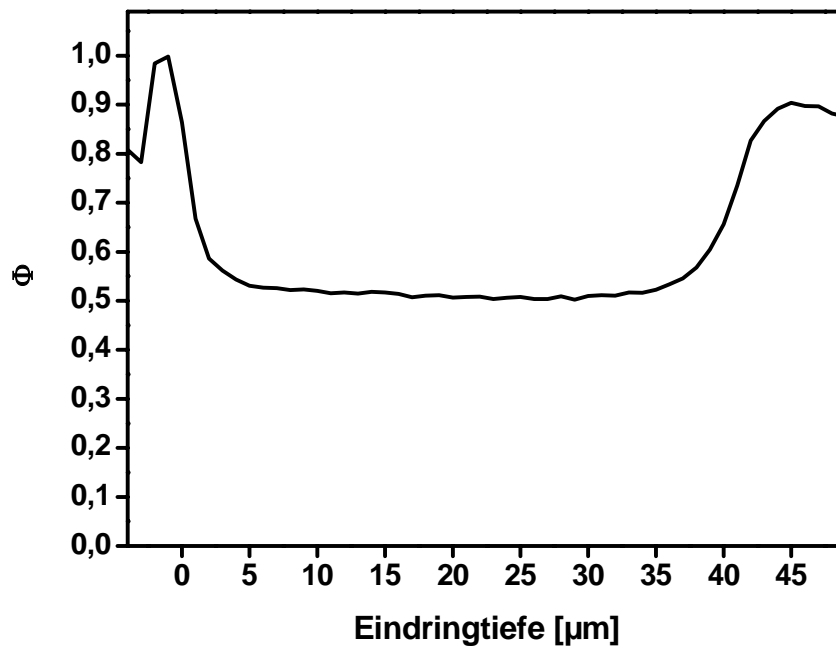


Abbildung 7.9. Auftragung des konfokal gemessenen Gleichgewichtsverteilungskoeffizienten gegen die Eindringtiefe für OVA-Cy5 auf Sepharose 6 FF.

## 7.2 Validierungsstudien

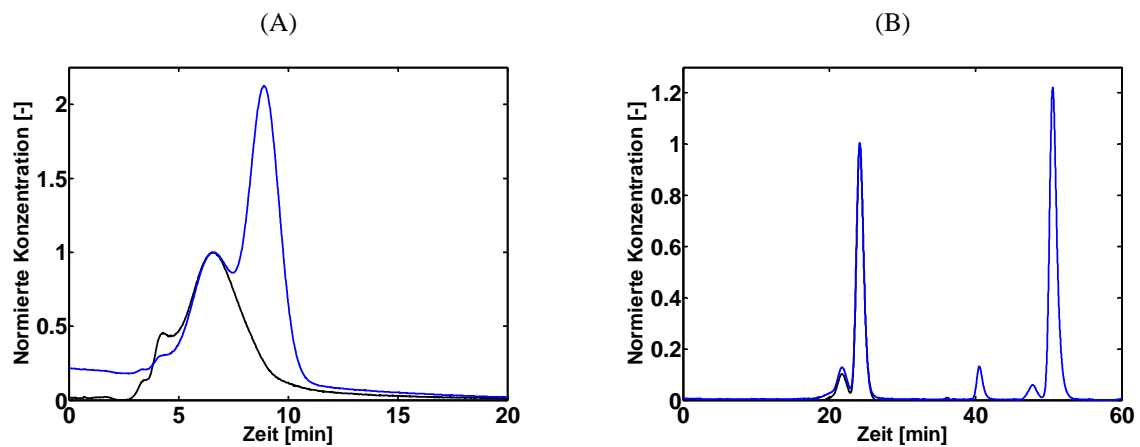


Abbildung 7.10. Isokratische Trennungen von (A) BSA-Cy5 mit zugefügtem, reinem Cy5 auf Sepharose 6 FF. (B) BSA-Cy5 mit zugefügtem, reinem Cy5 auf Superose 12. Detektion bei (—) 280 nm und (—) 654 nm. Signalnormierung auf den jeweiligen BSA Hauptpeak.

### 7.3 Chromatogramme der Gradientenversuche für die Bestimmung der linearen SMA Parameter

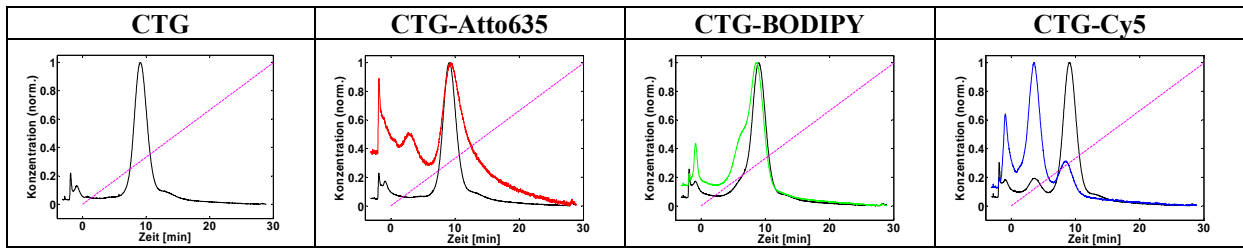


Abbildung 7.11. Normierte Chromatogramme der Gradientelution (30 cv, 153 cm/h) von nativem Protein oder Biokonjugat. (—) natives Protein bei 280 nm korrigiert um Absorption des Farbstoffes. (—) Atto635 bei 635 nm. (—) BODIPY bei 504 nm. (—) Cy5 bei 654 nm. SP Sepharose FF bei pH 7.0 (Phosphat, 50 mM). (—) Gradient von 0 bis 25 % Hochsalzpuffer (entspricht Gradient in cv bis 50 % Hochsalzpuffer). Anzeige des Signals vor der Totzeit mit Waschphase nach Injektion.

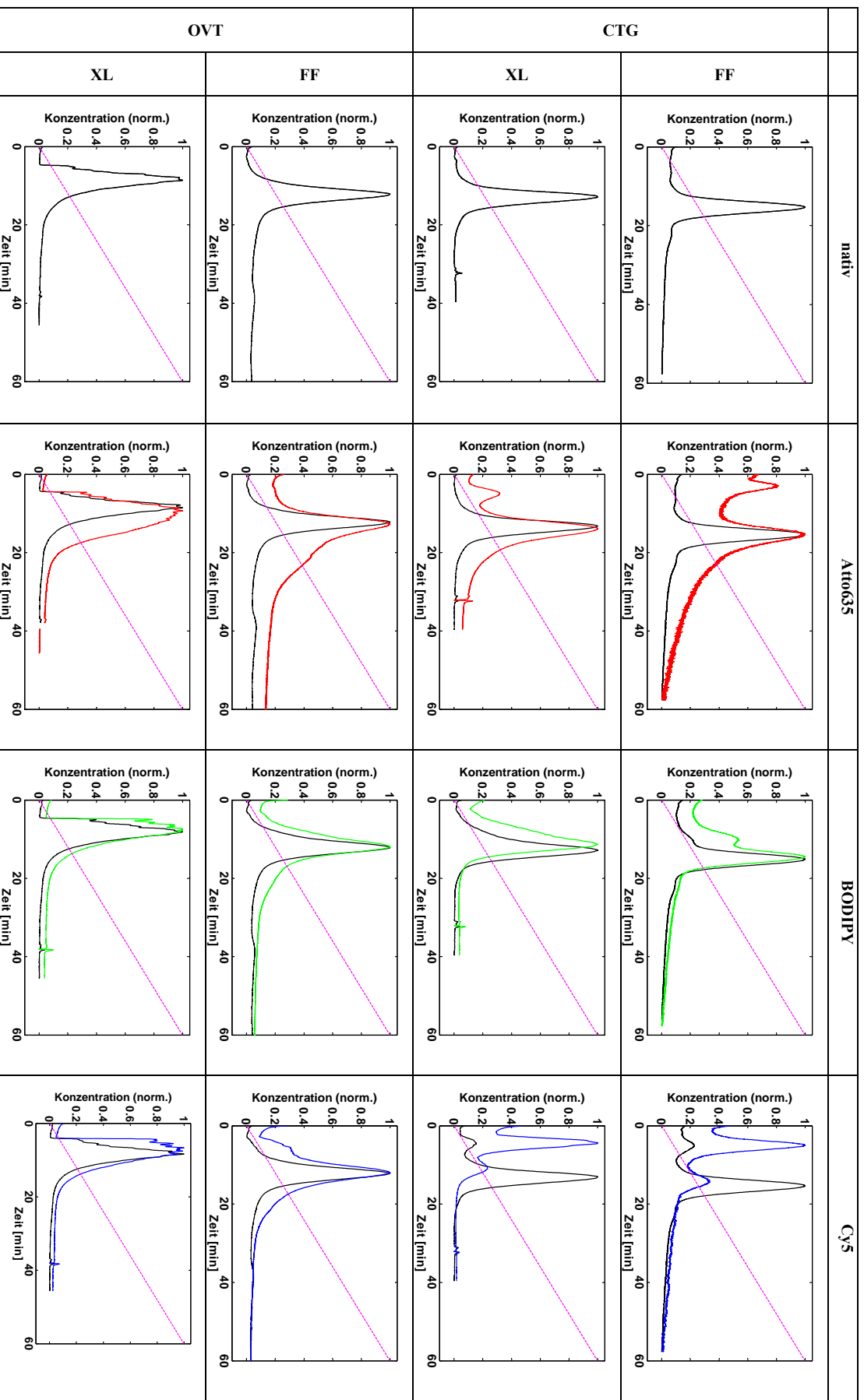


Abbildung 7.12. Normierte Chromatogramme der Gradientenelution (60 cv, 153 cm/h) von nativem Protein oder Biokonjugat. (—) natives Protein bei 280 nm korrigiert um Absorption des Farbstoffes. (—) Atto635 bei 635 nm. (—) BODIPY bei 504 nm. (—) Cys bei 654 nm. CTG bei pH 7.0 (Phosphat, 50 mM) und OVT bei pH 6.0 (Phosphat; 20 mM; SP Sepharose FF; 10 mM; SP Sepharose XL). (—) Gradient von 0 bis 25% Hochsalzpuffer (entspricht Gradient in cv bis 50% Hochsalzpuffer).



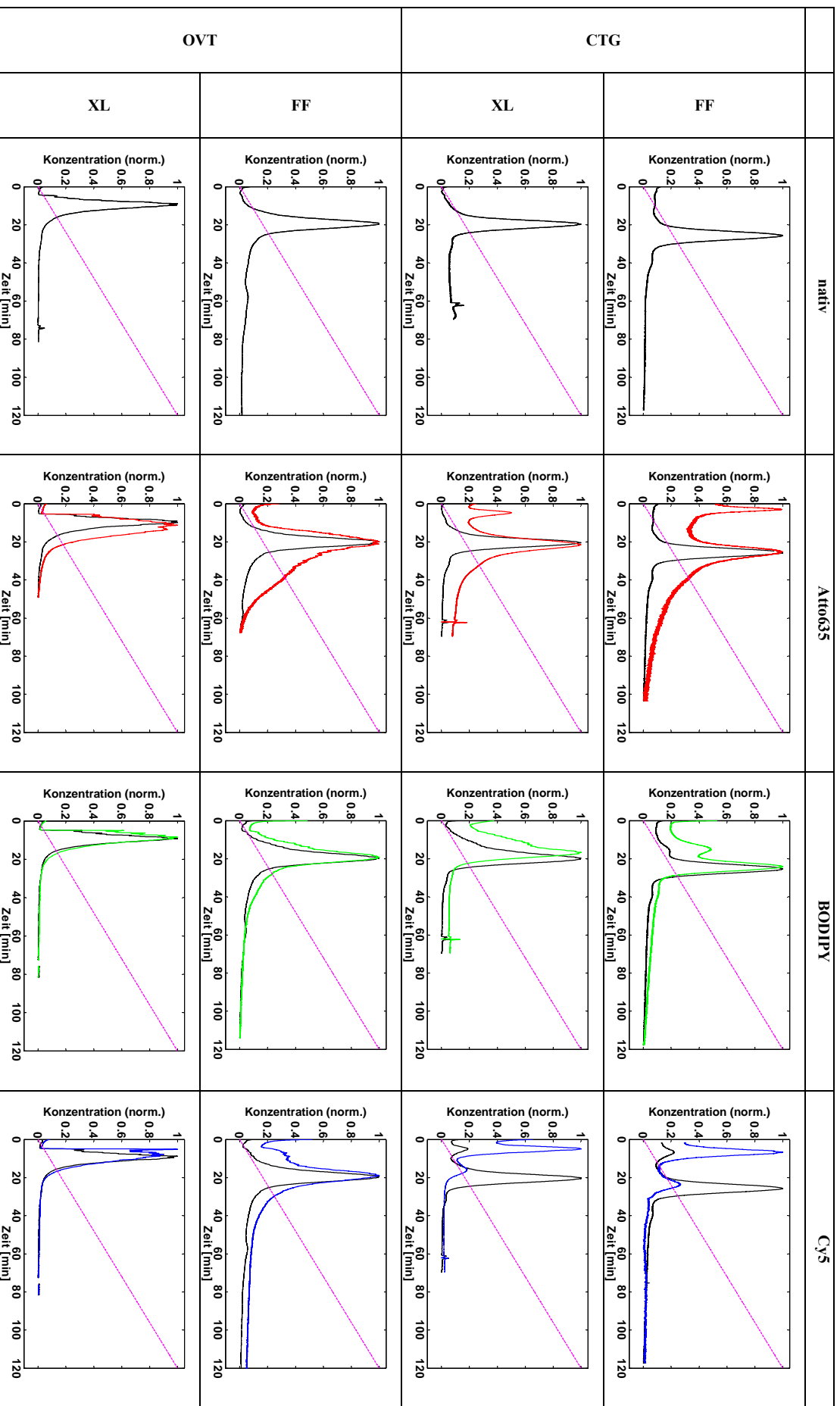


Abbildung 7.13. Normierte Chromatogramme der Gradientelution (120 cv, 153 cm/h) von nativem Protein oder Biokonjugat. (—) natives Protein bei 280 nm korrigiert um Absorption des Farbstoffes. (—) Atto635 bei 635 nm. (—) BODIPY bei 504 nm. (—) Cys bei 654 nm. CTG bei pH 7.0 (Phosphat, 50 mM) und OVT bei pH 6.0 (Phosphat; 20 mM; SP Sepharose FF; 10 mM; SP Sepharose XL). (—) Gradient von 0 bis 25 % Hochsalzpuffer (entspricht Gradient in cv bis 50 % Hochsalzpuffer).



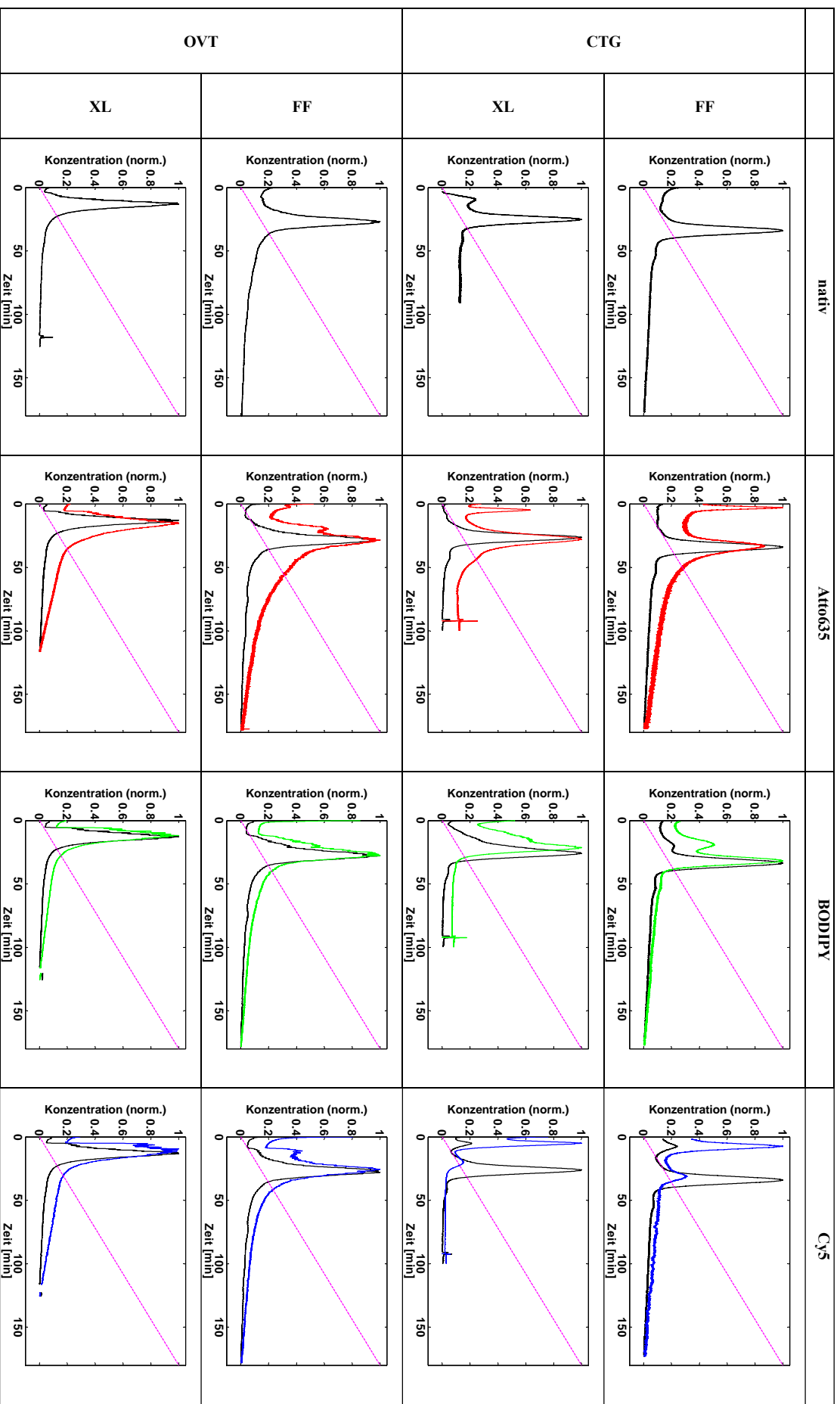


Abbildung 7.14. Normierte Chromatogramme der Gradientelution (180 cv, 153 cm/h) von nativem Protein oder Biokonjugat. (—) natives Protein bei 280 nm korrigiert um Absorption des Farbstoffes. (—) Atto635 bei 635 nm. (—) BODIPY bei 504 nm. (—) Cys bei 654 nm. CTG bei pH 7.0 (Phosphat, 50 mM) und OVT bei pH 6.0 (Phosphat; 20 mM; SP Sepharose FF; 10 mM; SP Sepharose XL). (—) Gradient von 0 bis 25 % Hochsalzpuffer (entspricht Gradient in cv bis 50 % Hochsalzpuffer).

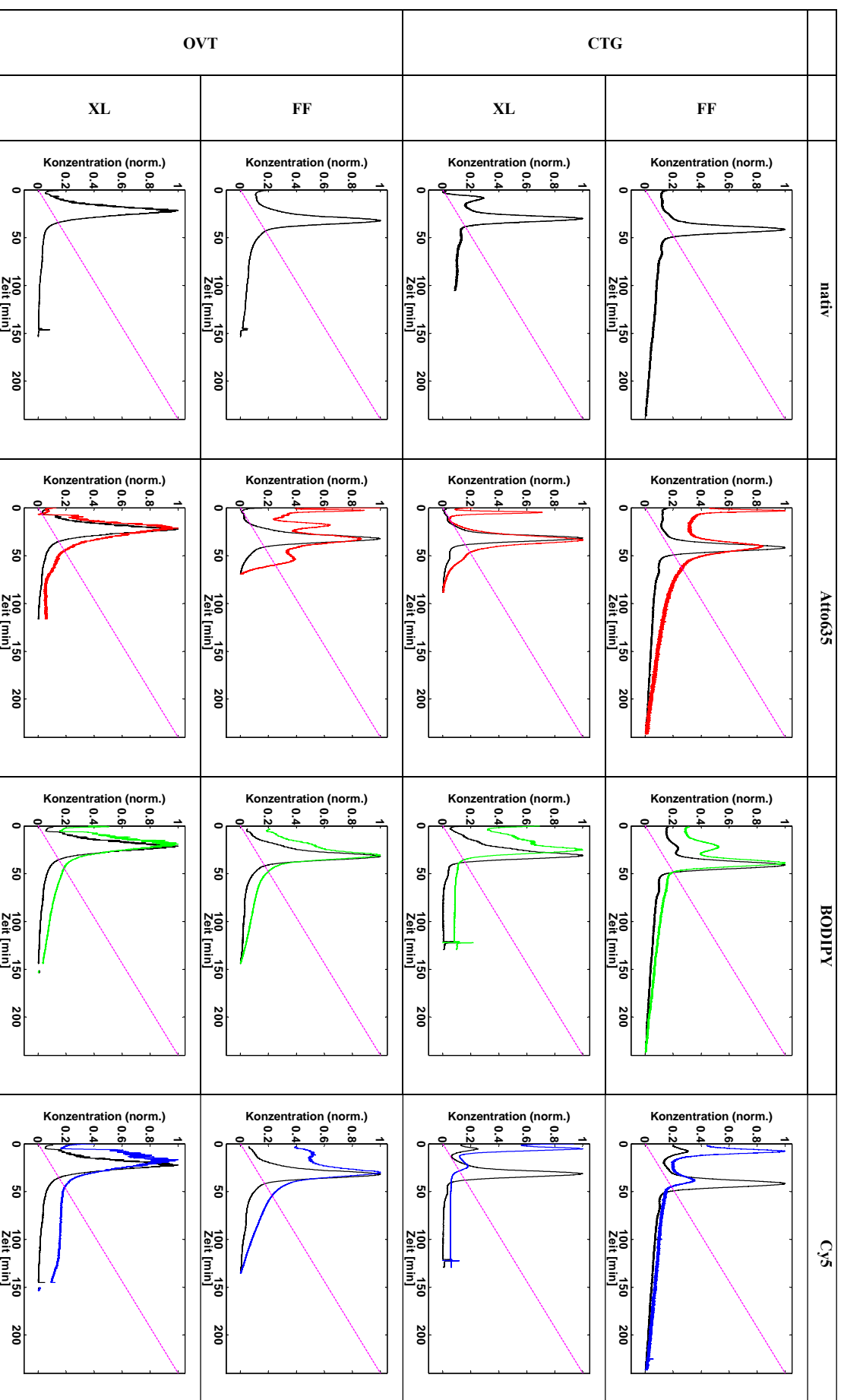


Abbildung 7.15. Normierte Chromatogramme der Gradientelution (240 cv, 153 cm/h) von nativem Protein oder Biokonjugat. (—) natives Protein bei 280 nm korrigiert um Absorption des Farbstoffes. (—) Atto635 bei 635 nm. (—) BODIPY bei 504 nm. (—) Cys bei 654 nm. CTG bei pH 7.0 (Phosphat, 50 mM) und OVT bei pH 6.0 (Phosphat; 20 mM; SP Sepharose FF; 10 mM; SP Sepharose XL). (—) Gradient von 0 bis 25 % Hochsalzpuffer (entspricht Gradient in cv bis 50 % Hochsalzpuffer).

## 7.4 Bestimmung der linearen SMA Parameter

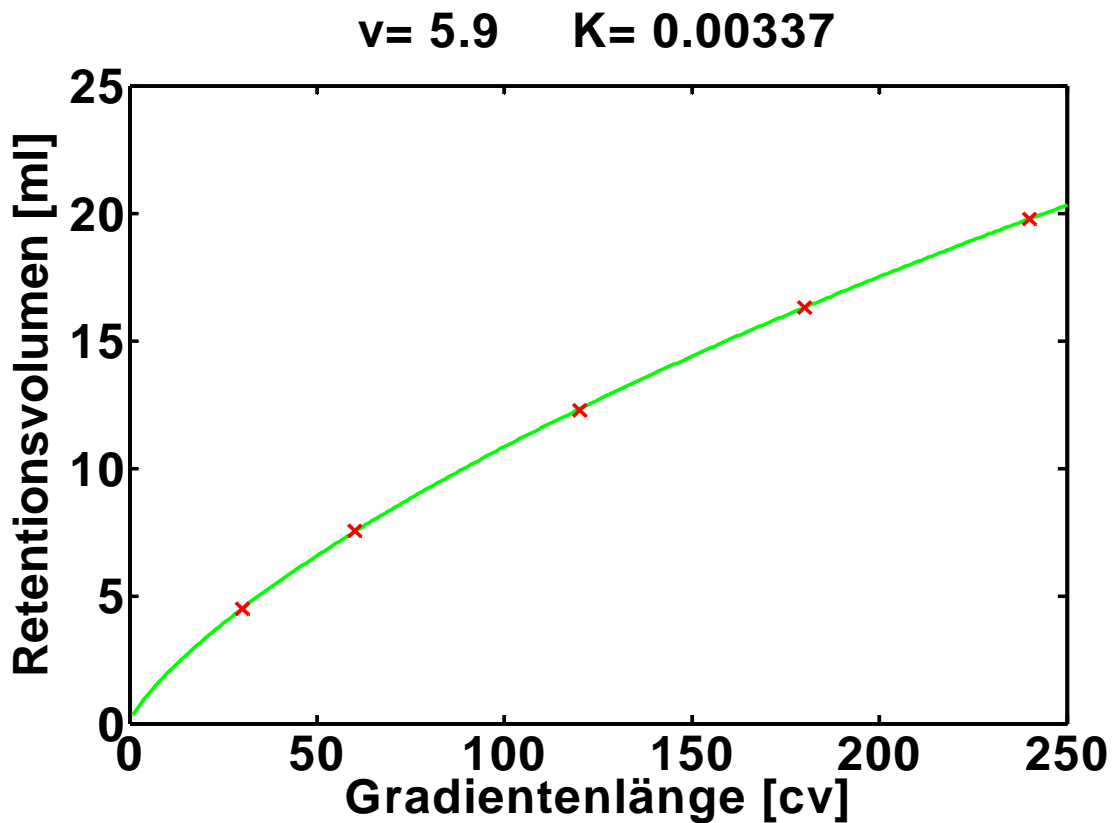


Abbildung 7.16. Auftragung des Retentionsvolumens gegen Gradientenlänge für CTG-Atto635 auf SP Sepharose FF (pH 7.0). (x) experimentelle Daten. (—) Anpassung an SMA Modell.

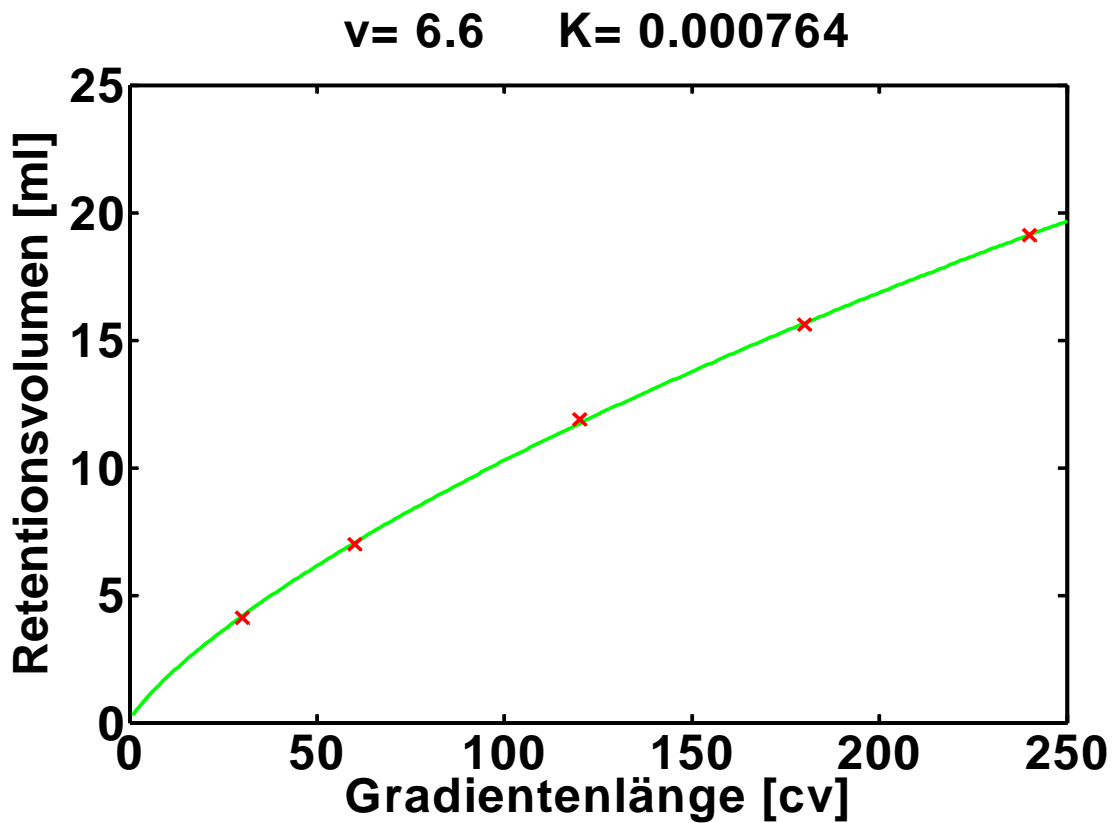


Abbildung 7.17. Auftragung des Retentionsvolumens gegen Gradientenlänge für CTG-BODIPY auf SP Sepharose FF (pH 7.0). (x) experimentelle Daten. (—) Anpassung an SMA Modell.

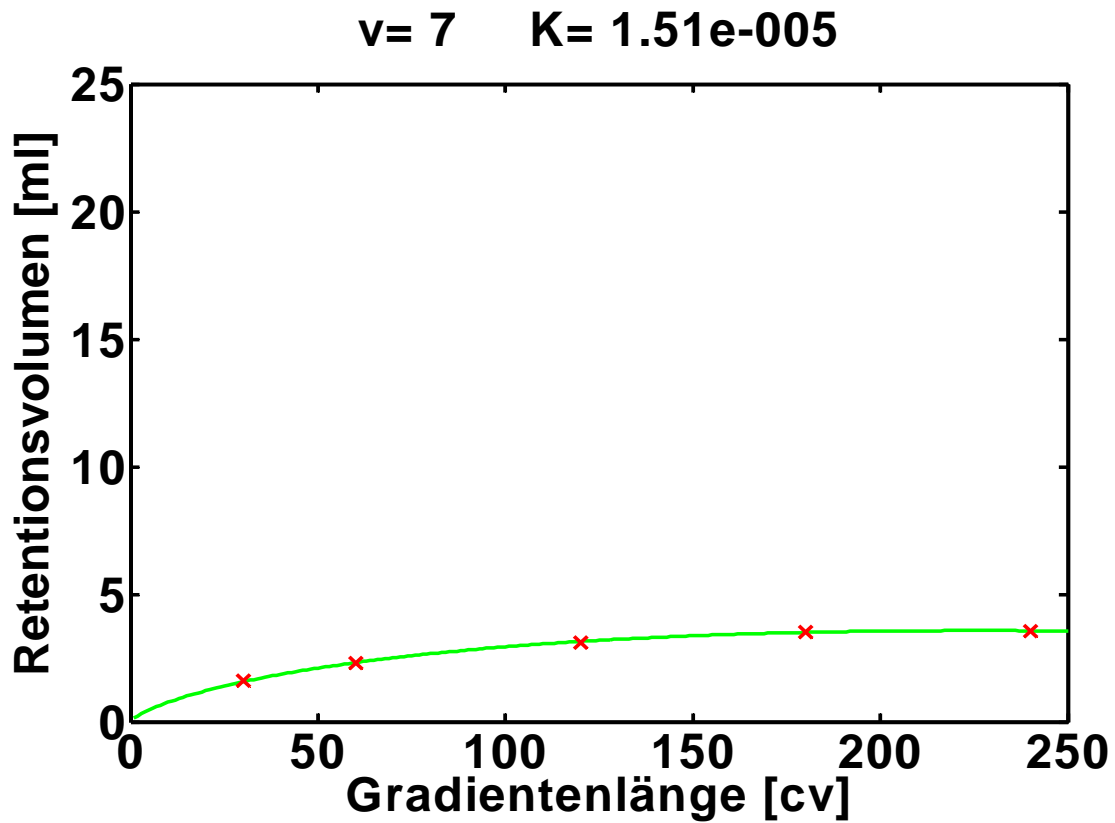


Abbildung 7.18. Auftragung des Retentionsvolumens gegen Gradientenlänge für CTG-Cy5 Komponente 1 auf SP Sepharose FF (pH 7.0). (x) experimentelle Daten. (—) Anpassung an SMA Modell.

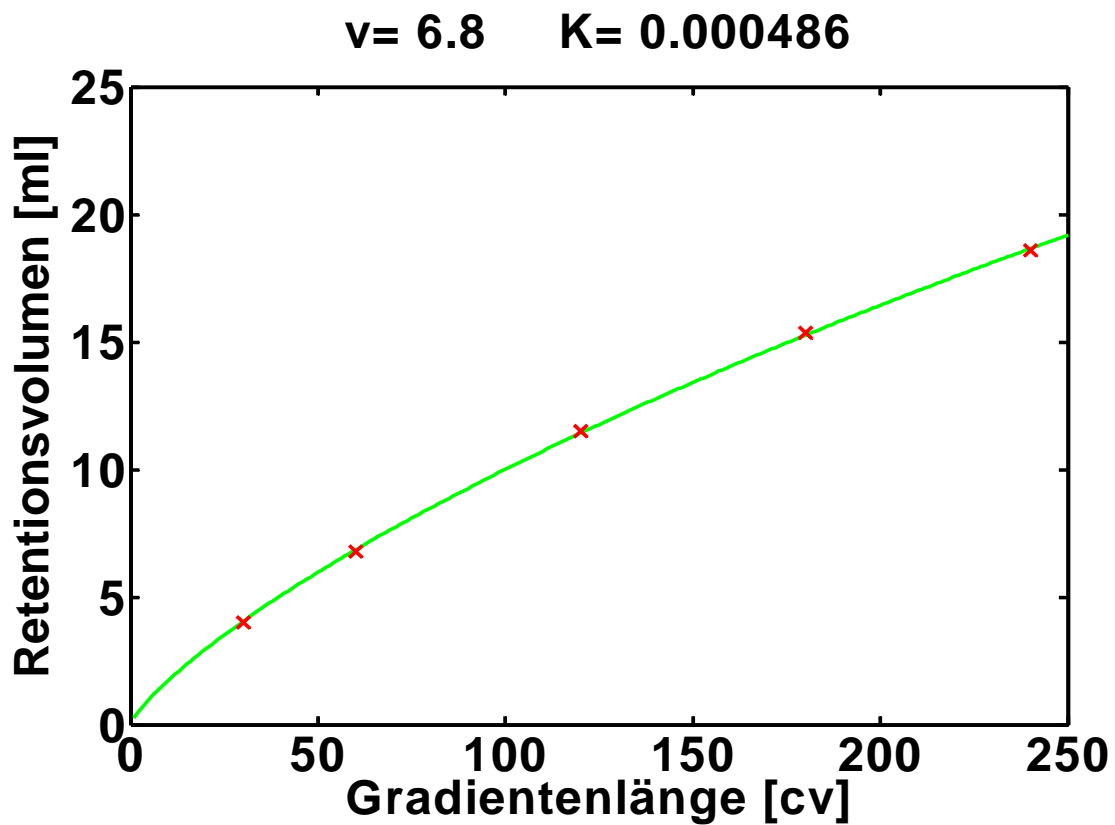


Abbildung 7.19. Auftragung des Retentionsvolumens gegen Gradientenlänge für CTG-Cy5 Komponente 2 auf SP Sepharose FF (pH 7.0). (x) experimentelle Daten. (—) Anpassung an SMA Modell.

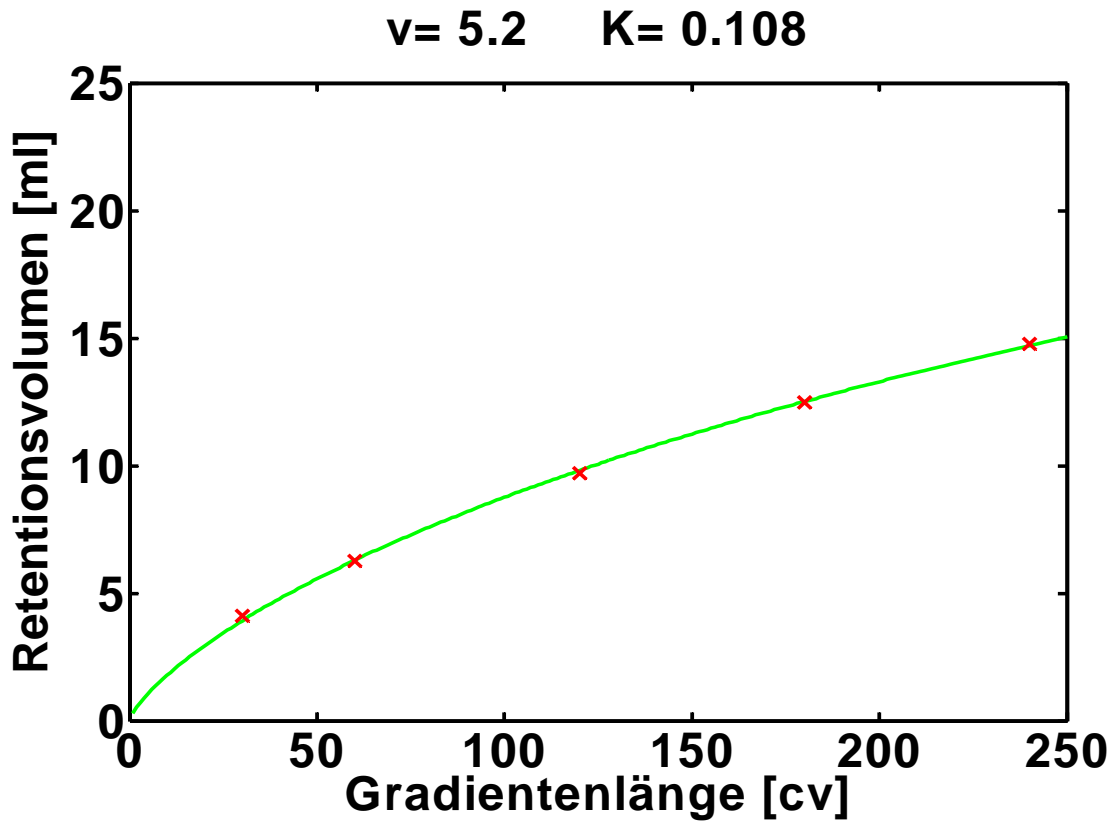


Abbildung 7.20. Auftragung des Retentionsvolumens gegen Gradientenlänge für CTG auf SP Sepharose XL. (x) experimentelle Daten (pH 7.0). (—) Anpassung an SMA Modell.

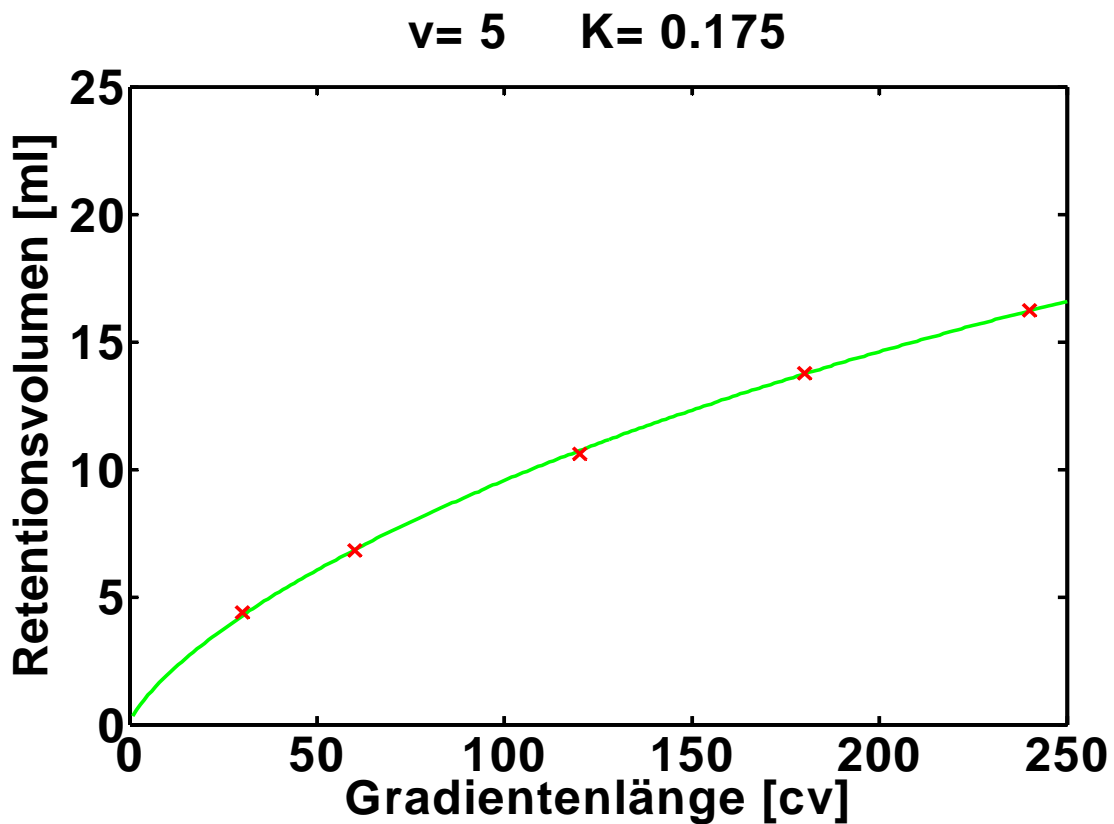


Abbildung 7.21. Auftragung des Retentionsvolumens gegen Gradientenlänge für CTG-Atto635 auf SP Sepharose XL (pH 7.0). (x) experimentelle Daten. (—) Anpassung an SMA Modell.

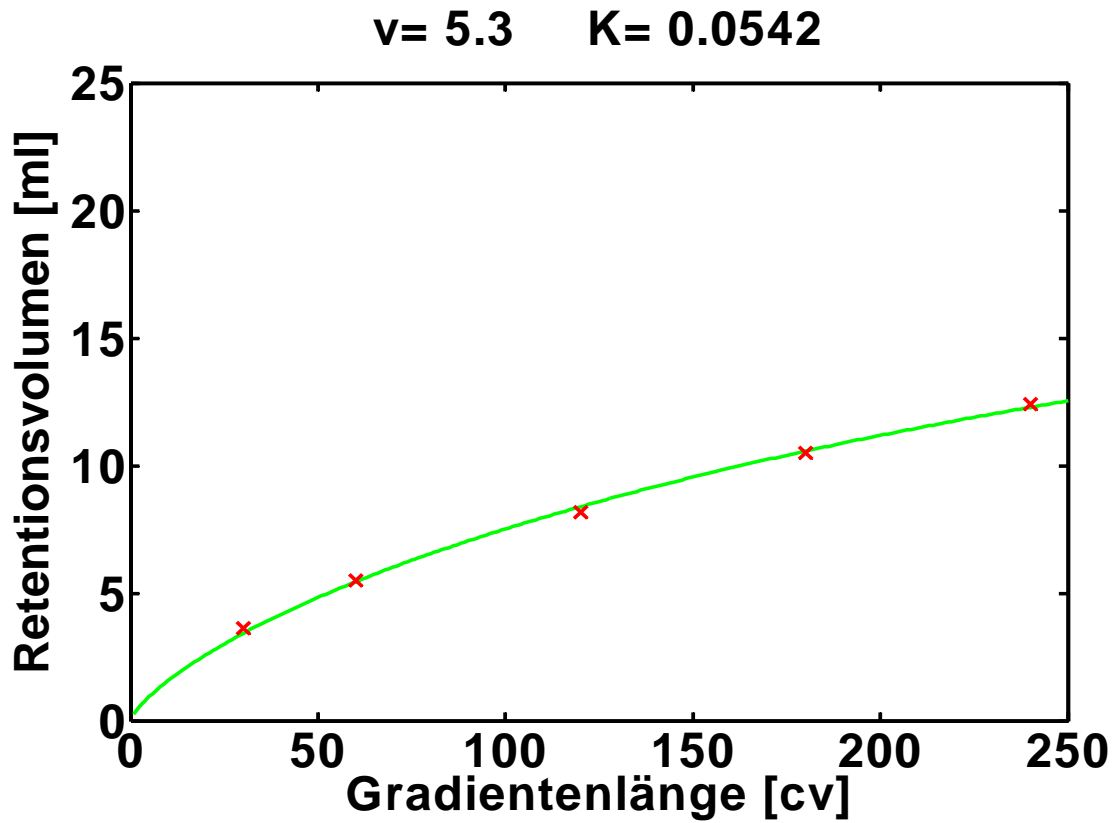


Abbildung 7.22. Auftragung des Retentionsvolumens gegen Gradientenlänge für CTG-BODIPY auf SP Sepharose XL (pH 7.0). (x) experimentelle Daten. (—) Anpassung an SMA Modell.

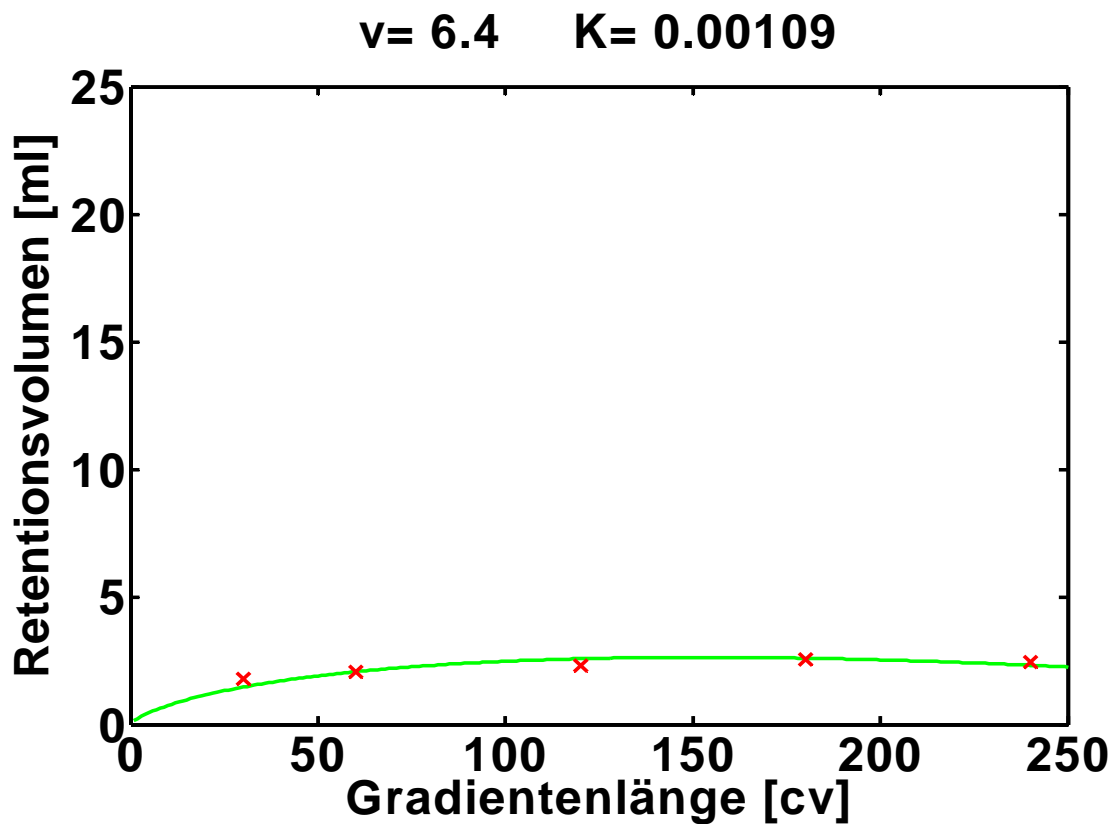


Abbildung 7.23. Auftragung des Retentionsvolumens gegen Gradientenlänge für CTG-Cy5 Komponente 1 auf SP Sepharose XL (pH 7.0). (x) experimentelle Daten. (—) Anpassung an SMA Modell.

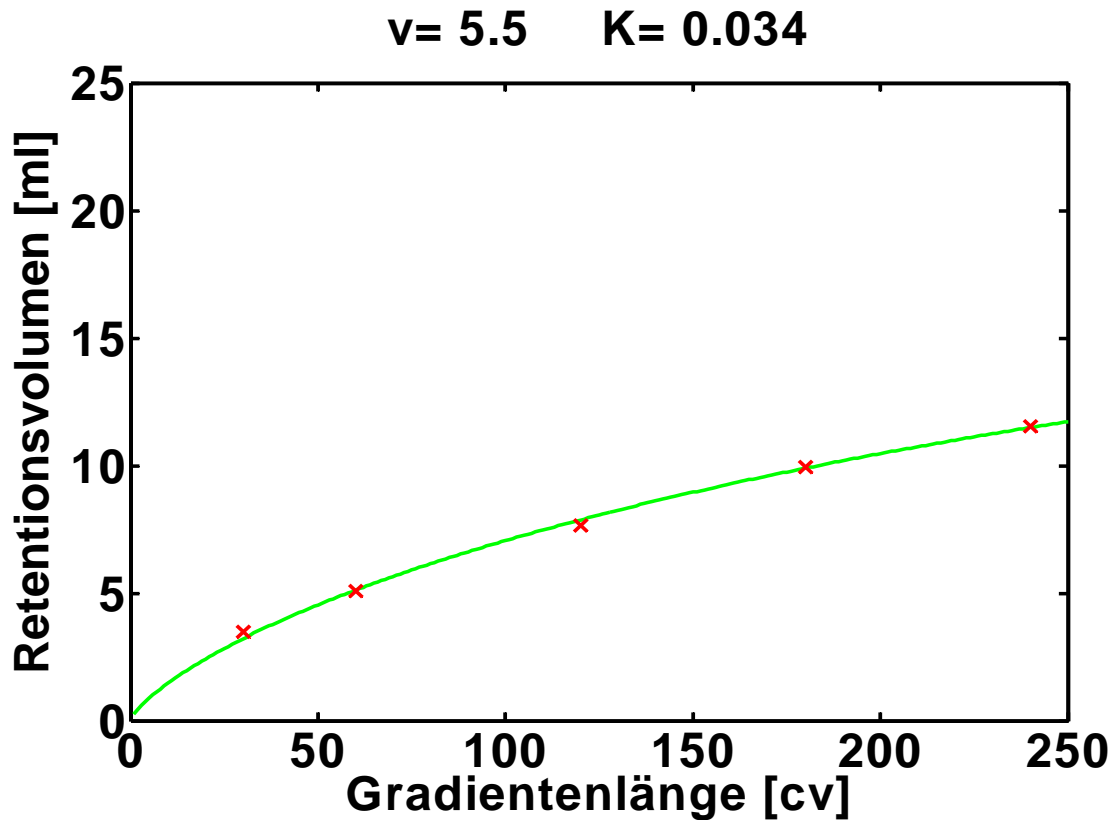


Abbildung 7.24. Auftragung des Retentionsvolumens gegen Gradientenlänge für CTG-Cy5 Komponente 2 auf SP Sepharose XL (pH 7.0). (x) experimentelle Daten. (—) Anpassung an SMA Modell.

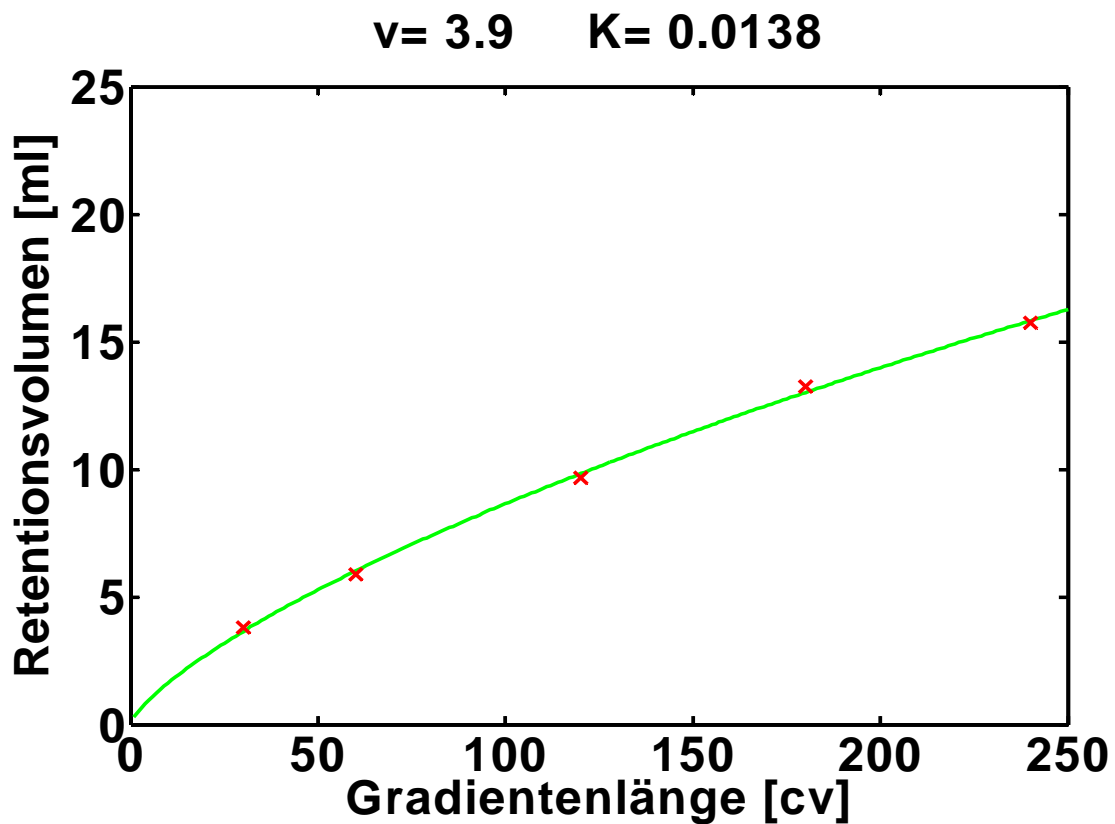


Abbildung 7.25. Auftragung des Retentionsvolumens gegen Gradientenlänge für OVT auf SP Sepharose FF (pH 6.0). (x) experimentelle Daten. (—) Anpassung an SMA Modell.

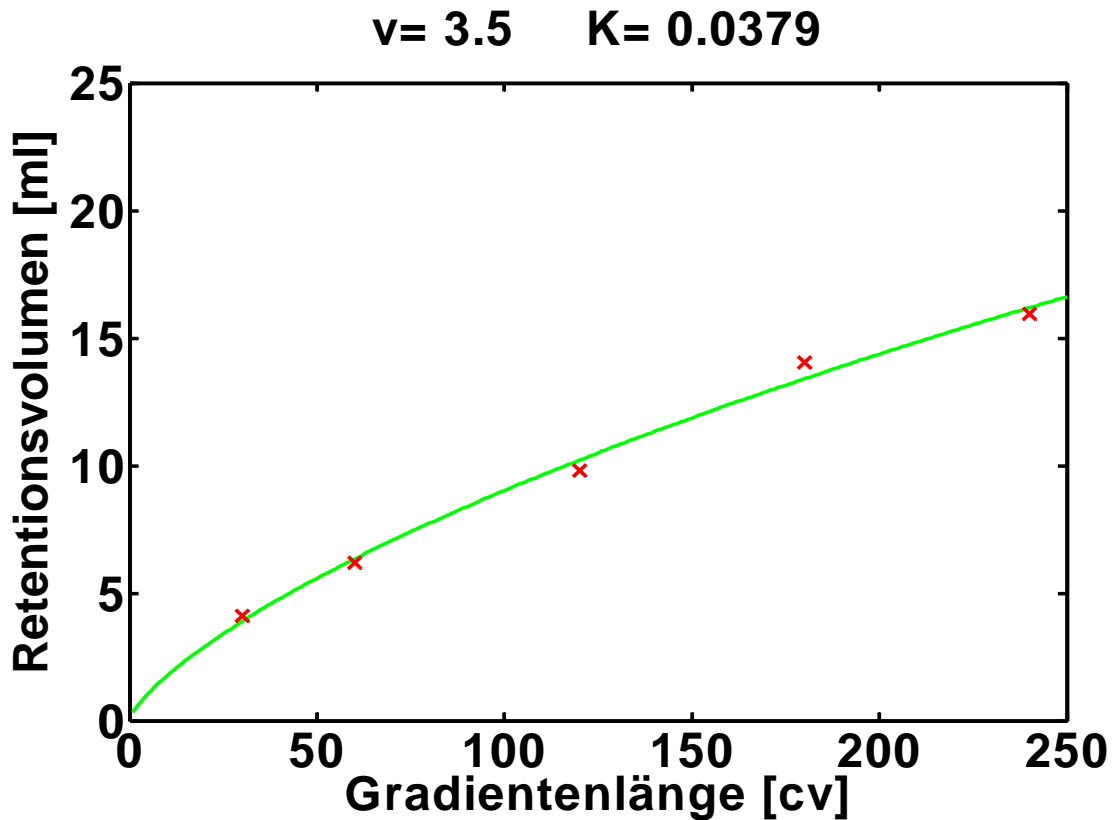


Abbildung 7.26. Auftragung des Retentionsvolumens gegen Gradientenlänge für OVT-Atto635 auf SP Sepharose FF (pH 6.0). (x) experimentelle Daten. (—) Anpassung an SMA Modell.

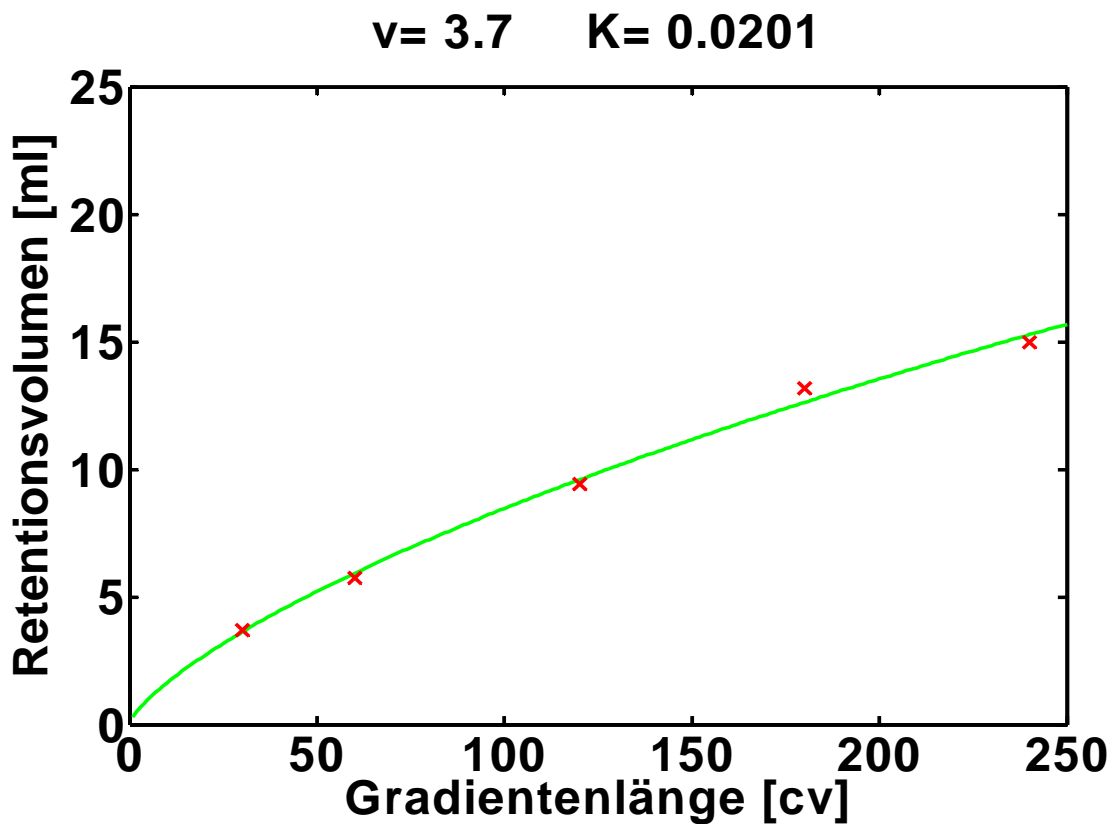


Abbildung 7.27. Auftragung des Retentionsvolumens gegen Gradientenlänge für OVT-BODIPY auf SP Sepharose FF (pH 6.0). (x) experimentelle Daten. (—) Anpassung an SMA Modell.



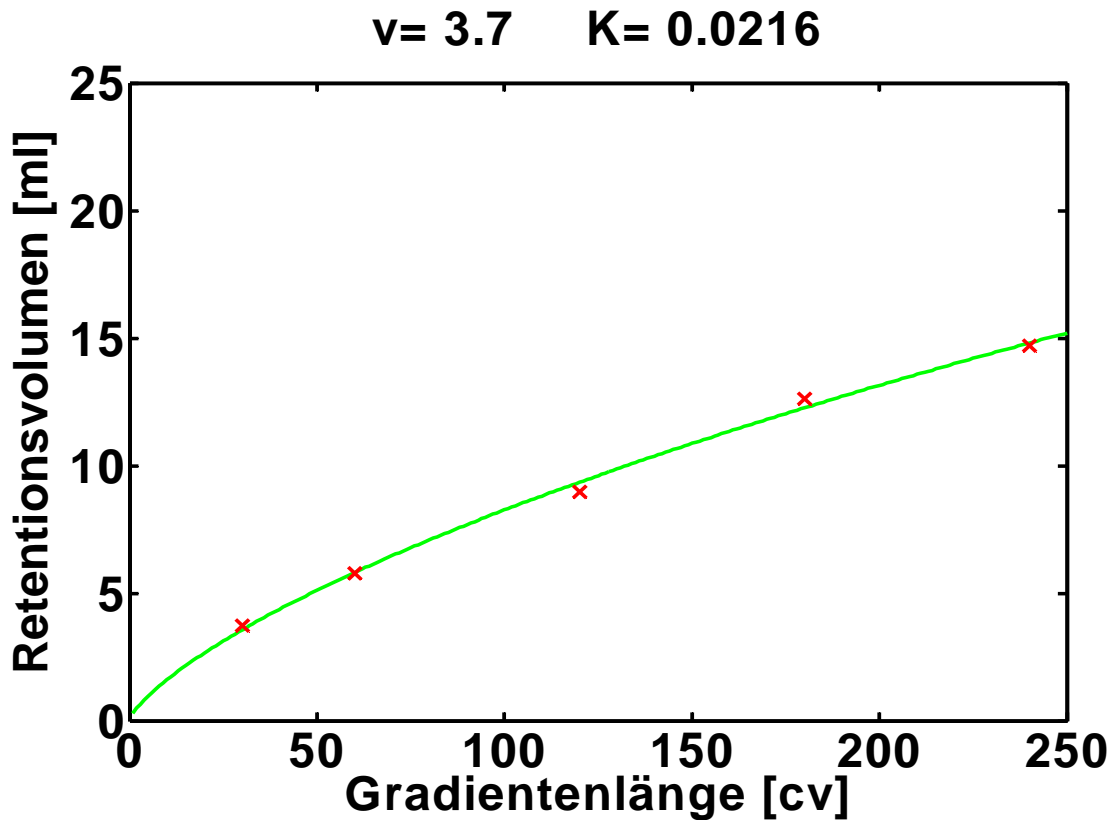


Abbildung 7.28. Auftragung des Retentionsvolumens gegen Gradientenlänge für OVT-Cy5 auf SP Sepharose FF (pH 6.0). (x) experimentelle Daten. (—) Anpassung an SMA Modell.

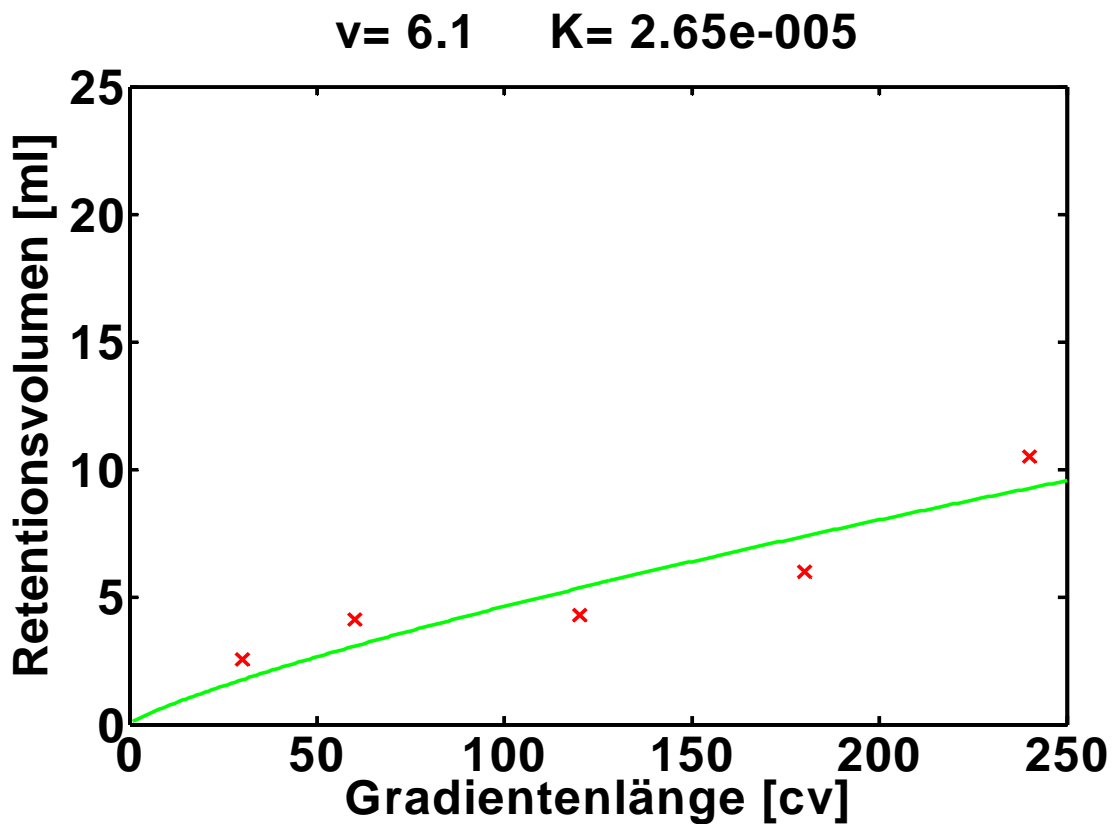


Abbildung 7.29. Auftragung des Retentionsvolumens gegen Gradientenlänge für OVT auf SP Sepharose XL (pH 6.0). (x) experimentelle Daten. (—) Anpassung an SMA Modell.

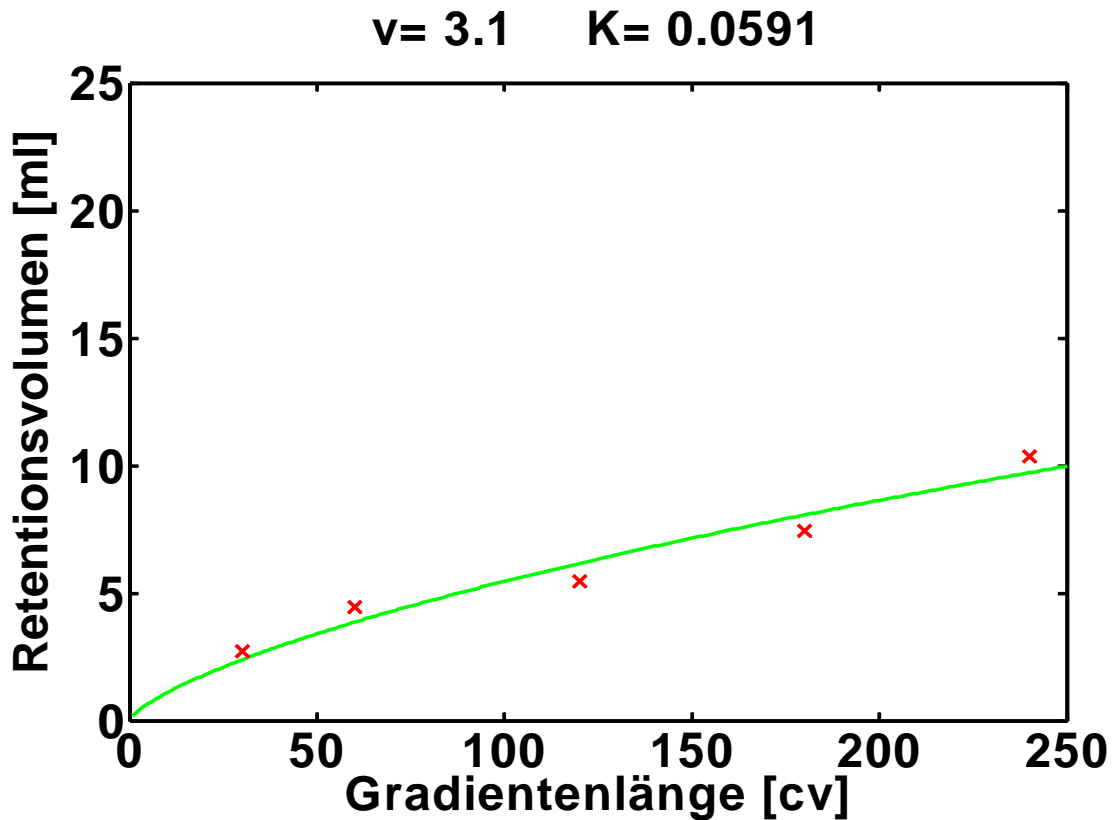


Abbildung 7.30. Auftragung des Retentionsvolumens gegen Gradientenlänge für OVT-Atto635 auf SP Sepharose XL (pH 6.0). (x) experimentelle Daten. (—) Anpassung an SMA Modell.

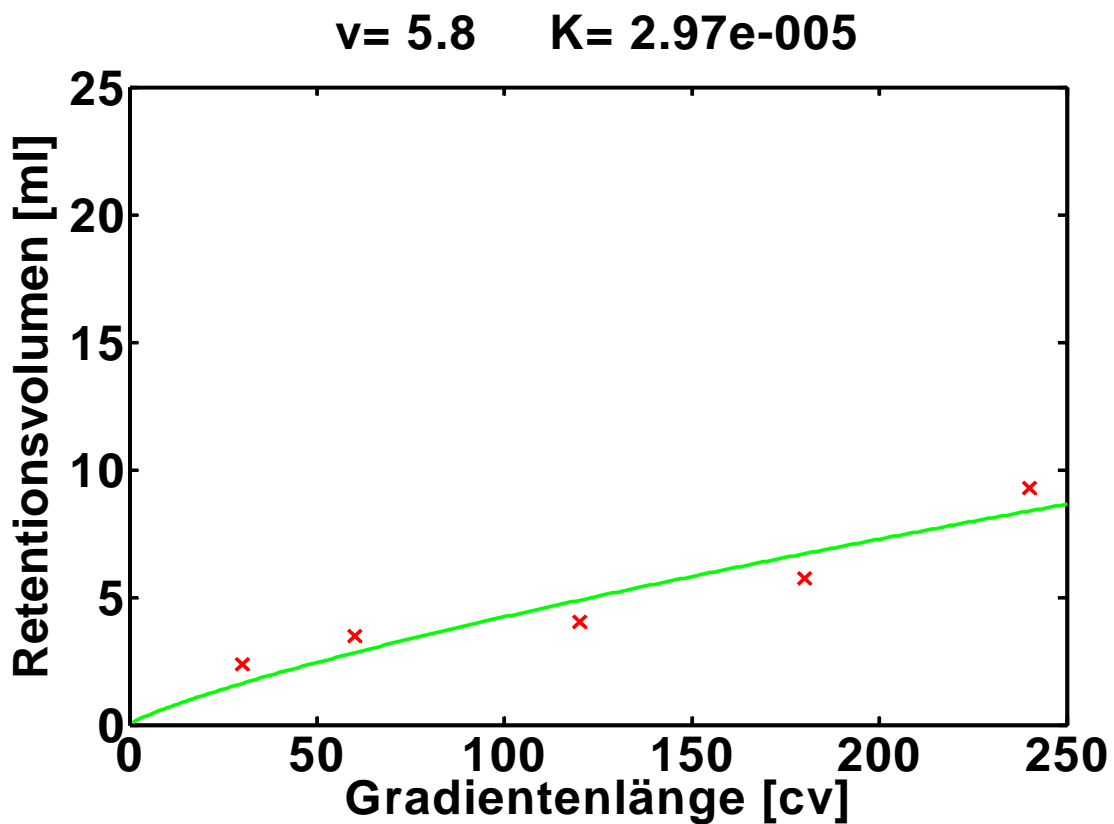


Abbildung 7.31. Auftragung des Retentionsvolumens gegen Gradientenlänge für OVT-BODIPY auf SP Sepharose XL (pH 6.0). (x) experimentelle Daten. (—) Anpassung an SMA Modell.

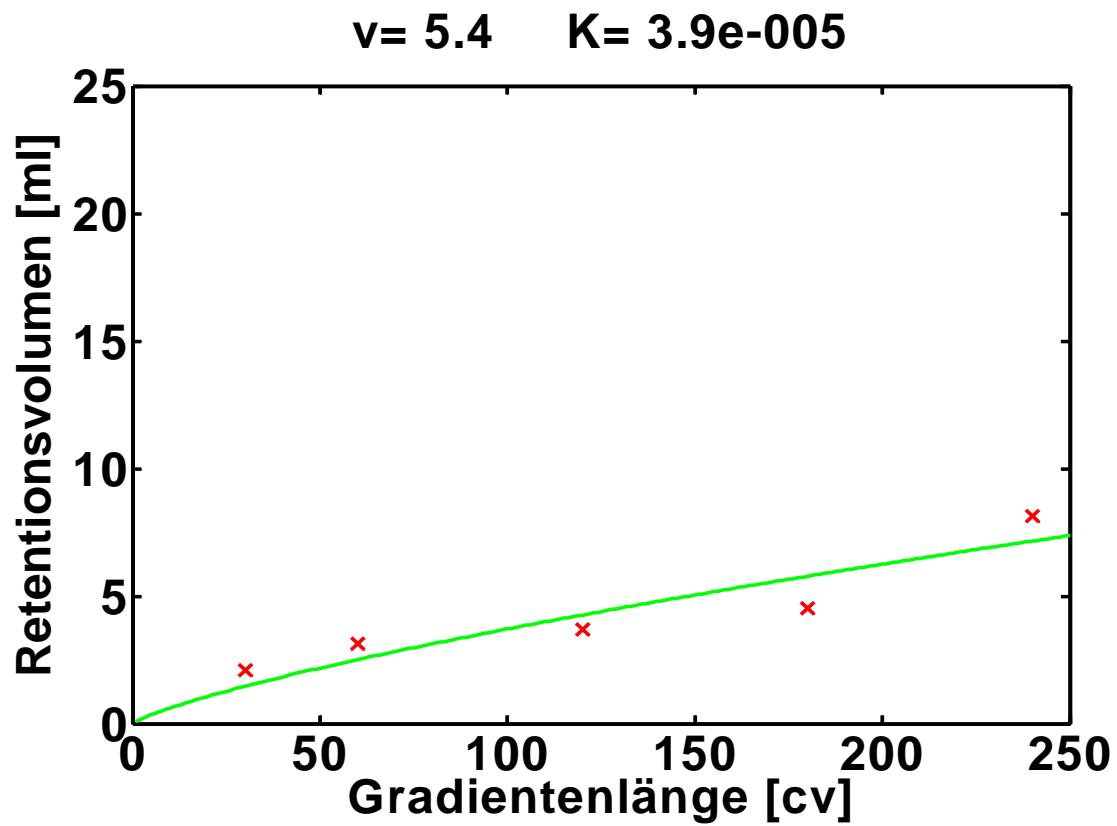


Abbildung 7.32. Auftragung des Retentionsvolumens gegen Gradientenlänge für OVT-Cy5 auf SP Sepharose XL (pH 6.0). (x) experimentelle Daten. (—) Anpassung an SMA Modell.

### 7.5 Vergleich der Bulkchromatogramme am Partikel und am Säuleneffluent für das Biokonjugat

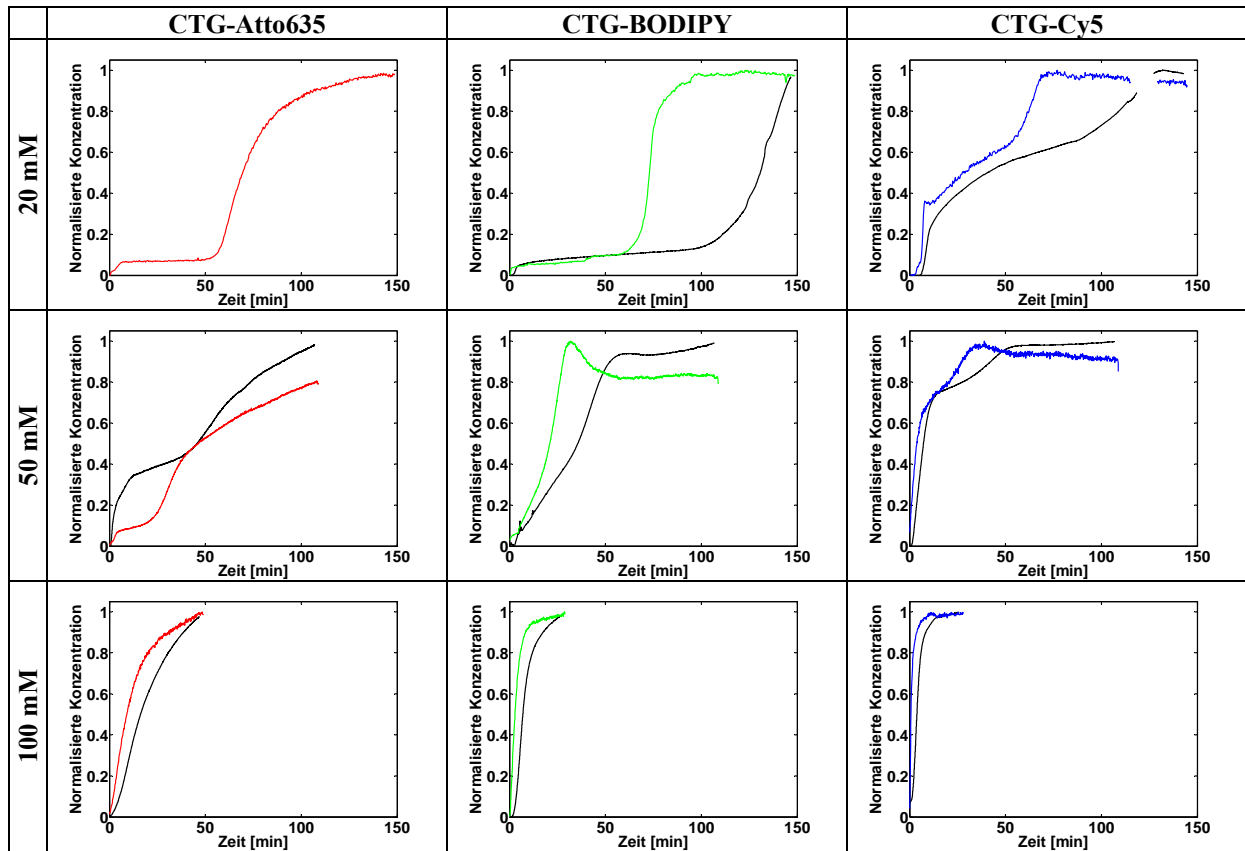


Abbildung 7.33. Normierte Chromatogramme für die jeweiligen Biokonjugate am Säuleneffluent (—) und am Partikel (CLSM Messung) von (—) Atto635, (—) BODIPY und (—) Cy5. Durchbruch von CTG auf SP Sepharose XL bei pH 7.0, 96 cm/h und D/P von 0.01. Signal normiert auf Maximalwert während Durchbruch. Säuleneffluentdaten für CTG-Atto635 bei 20 mM nicht verfügbar.

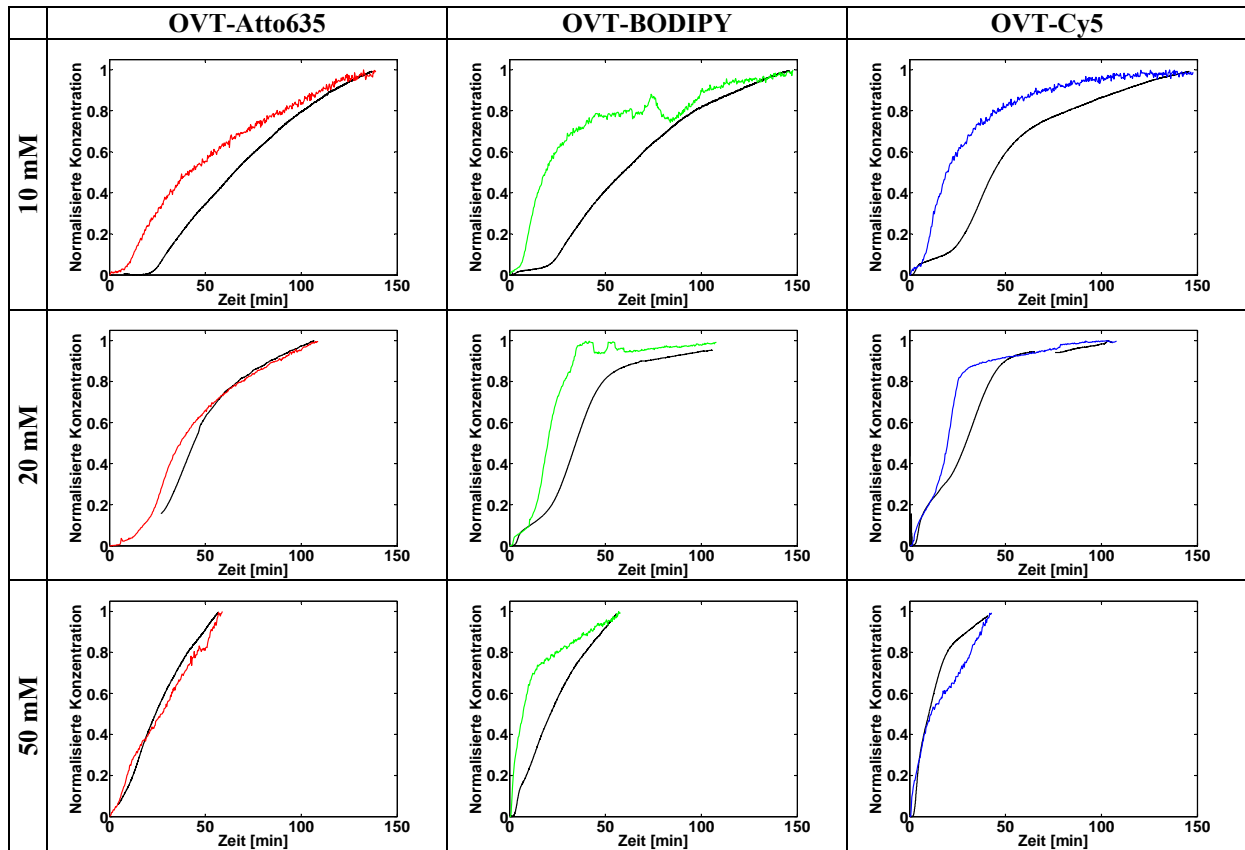


Abbildung 7.34. Normierte Chromatogramme für die jeweiligen Biokonjugate am Säuleneffluent (—) und am Partikel (CLSM Messung) von (—) Atto635, (—) BODIPY und (—) Cy5. Durchbruch von OVT auf SP Sepharose FF bei pH 6.0, 96 cm/h und D/P von 0.01 (0.1 bei 20 mM). Signal normiert auf Maximalwert während Durchbruch.

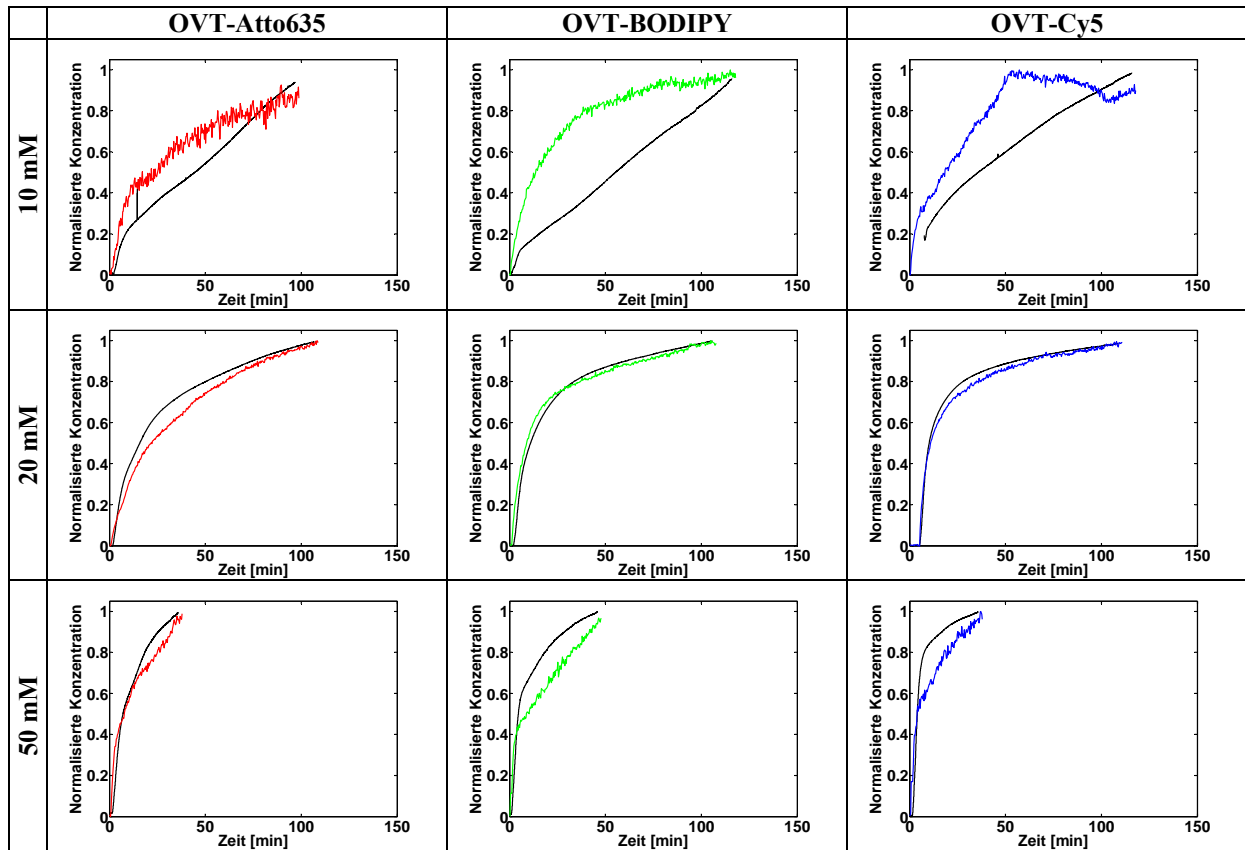


Abbildung 7.35. Normierte Chromatogramme für die jeweiligen Biokonjugate am Säuleneffluent (—) und am Partikel (CLSM Messung) von (—) Atto635, (—) BODIPY und (—) Cy5. Durchbruch von OVT auf SP Sepharose XL bei pH 6.0, 96 cm/h und D/P von 0.01 (0.1 bei 20 mM). Signal normiert auf Maximalwert während Durchbruch.