

Michael Dieterle

**Biothermodynamische Studien zur Adsorption
monoklonaler Antikörper an
chromatographischen Trennmaterialien**

Institut für Technische Thermodynamik
und Thermische Verfahrenstechnik
der Universität Stuttgart

2009

Biothermodynamische Studien zur Adsorption monoklonaler Antikörper an chromatographischen Trennmaterialien

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik
der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors
der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von
Michael Dieterle
aus Pforzheim

Hauptberichter: Prof. Dr.-Ing. Hans Hasse
Mitberichter: Prof. Dr.-Ing. Jürgen Hubbuch

Tag der mündlichen Prüfung:
19.02.2009

Institut für Technische Thermodynamik
und Thermische Verfahrenstechnik
der Universität Stuttgart

2009

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Zeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Thermodynamik und Thermische Verfahrenstechnik (ITT) der Universität Stuttgart im Rahmen eines BMBF geförderten Projektes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.-Ing. Hans Hasse. Er hat mir nicht nur die Promotion an seinem Institut ermöglicht, sondern auch durch zahlreiche Diskussionen und Anregungen wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Prof. Dr.-Ing. Jürgen Hubbuch der Universität Karlsruhe für die Übernahme des Mitberichtes und die Durchsicht meiner Arbeit.

Große Anerkennung verdient die Leistung und das Engagement der Studenten, die mit ihren Studien- und Diplomarbeiten und als studentische Hilfskräfte maßgeblich am Erfolg der experimentellen Arbeiten beteiligt waren: Katharina Betz, Tim Blaschke, Andres Lehnart, Anna Mossmann, Anja Nusser und Stefanie Schweickert.

Mehrere Mitarbeiter des ITT haben mich bei der Anfertigung dieser Arbeit in besonderer Weise unterstützt: Dieter Höhn hatte stets ein offenes Ohr für Fragen rund ums Labor und hat mir in zahlreichen Diskussionen weitergeholfen. Für viele praktische Ideen und für die Hilfe bei Problemen mit diversen Messgeräten bin ich Kay Braun sehr dankbar.

Ein Dank geht auch an das Bundesministerium für Bildung und Forschung für die finanzielle Unterstützung sowie den Partnern aus Industrie (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co.KG, Sartorius AG und Tosoh Bioscience) und Forschung (Forschungszentrum Jülich) für interessante Meetings und gute Zusammenarbeit.

Meiner Familie und besonders meinen Eltern, die mich stets unterstützt haben bin ich ebenfalls sehr zu Dank verpflichtet.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	I
Inhaltsverzeichnis	III
Formelzeichen	V
Abstract	IX
1 Einleitung	1
2 Grundlagen	7
2.1 Antikörper	7
2.2 Chromatographie	9
2.2.1 Ionenaustausch-Chromatographie	10
2.2.2 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie	12
2.2.3 Größenausschluss-Chromatographie	13
2.3 Thermodynamik der Adsorption	13
2.3.1 Thermodynamische Gleichgewichtskonstante	13
2.3.2 Hypothetische Referenzzustände	15
2.4 Adsorptionsmodelle	16
2.4.1 Langmuir	16
2.4.2 Langmuir-Freundlich	18
2.4.3 Steric Mass-Action	18
2.4.4 Available Area	22
2.5 Isotherme Titrationskalorimetrie	24
2.6 Statische Laserlichtstreuung	25
2.7 Osmotische Virialgleichung	29
3 Experimentelle Untersuchungen	31
3.1 Antikörper	31
3.2 Probenvorbereitung	32
3.2.1 Herstellung der Pufferlösungen	32
3.2.2 Filtration	33
3.2.3 Zentrifugation	33

3.2.4	Dialyse.....	33
3.3	Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen.....	34
3.4	SMA-Parameter aus Säulenchromatographie.....	38
3.5	Isotherme Titrationskalorimetrie.....	38
3.6	Statische Laserlichtstreuung.....	43
3.6.1	Offline SLS-Batch-Modus.....	43
3.6.2	Online SLS-SEC-Modus.....	46
3.6.3	Bestimmung des Brechungsindexinkrements.....	49
4	Ergebnisse und Diskussion	53
4.1	Adsorptionsisothermen.....	53
4.1.1	Korrelation der Adsorptionsisothermen.....	53
4.1.2	pH-Abhängigkeit bei Kationentauschern.....	55
4.1.3	Salzabhängigkeit bei Kationentauschern.....	59
4.1.4	HIC Adsorptionsisothermen.....	66
4.2	SMA-Parameter aus Säulenchromatographie.....	67
4.3	Mikrokalorimetrie.....	70
4.3.1	Spezifische Adsorptionseenthalpie bei Kationentauschern.....	70
4.3.2	Spezifische Adsorptionseenthalpie bei HIC-Adsorbem.....	78
4.4	Laserlichtstreuung.....	81
4.4.1	Messungen im offline SLS-Batch-Modus: Salzabhängigkeit.....	81
4.4.2	Messungen im offline SLS-Batch-Modus: pH-Wert-Abhängigkeit.....	86
4.4.3	Vergleich der online und offline SLS-Messungen.....	88
5	Zusammenfassung	91
	Anhang	95
	A Analytik	95
	B Probenvorbereitung	101
	C Experimentelle Ergebnisse	103
	C 1 Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen.....	103
	C 2 Ergebnisse der Laserlichtstremessungen.....	113
	Literaturverzeichnis	117

Formelzeichen

Lateinische Buchstaben

A_2	zweiter osmotischer Virialkoeffizient
A_3	dritter osmotischer Virialkoeffizient
a	anpassbarer Parameter
$c_p^{(n)}$	Molarität des Proteins (Stoffmenge Protein pro Volumen Probe)
$c_p^{(m)}$	Proteinkonzentration (Masse Protein pro Volumen Probe)
E	Extinktion
g	molare Gibbsche Energie
h	molare Enthalpie
ΔH_p^{ads}	spezifische Adsorptionsenthalpie des Proteins
I_0	Streuintensität des eingestrahnten Lichts
I_i^θ	Streuintensität der Probe i beim Streuwinkel θ
K	optische Konstante
K_{AA}	Gleichgewichtskonstante (available area)
K_a	Assoziationskonstante (Langmuir)
K_{eq}	thermodynamische Gleichgewichtskonstante
K_{SMA}	Gleichgewichtskonstante (SMA)
k	Boltzmann Konstante
k'	Kapazitätsfaktor
k_{ads}	Geschwindigkeitskonstante der Adsorption
k_{des}	Geschwindigkeitskonstante der Desorption
k_{cal}	Kalibrierkonstante
M	Molmasse
M_w	massengemittelte Molmasse
N_A	Avogadro Konstante

N_i	Anzahl Moleküle der Sorte i
N_i^θ	Normalisierungskoeffizient der Probe i beim Streuwinkel θ
n	Brechungsindex
dn/dc	spezifisches Brechungsindexinkrement
p	Druck
P_i^θ	Strukturfaktor der Probe i beim Streuwinkel θ
$\tilde{q}_p^{(n)}$	Proteinbeladung des Adsorbers (Stoffmenge Protein pro Volumen Adsorber)
$q_p^{(m)}$	Proteinbeladung des Adsorbers (Masse Protein pro Masse Adsorber)
R_i^θ	Rayleigh-Ratio
$R_i^{\theta E}$	Exzess-Rayleigh-Ratio
r_D	Abstand zwischen Streuzentrum der Probe und Detektor
s	molare Entropie
T	Temperatur
t	Zeit
$u(r)$	radiale Paarpotentialfunktion
V	Volumen

Griechische Buchstaben

α	verfügbarer Oberflächenanteil (available area)
β	Phasenverhältnis
γ	Aktivitätskoeffizient
Δ	Differenz
ε	Porosität
θ	Streuwinkel
Λ	Ionenkapazität
λ	Wellenlänge
μ	chemisches Potential
ν	charakteristische Ladung

Π	osmotischer Druck
σ	sterischer Faktor
φ	nicht verfügbare Fläche (excluded area)
χ	beladene Oberflächenfraktion (coverage)
Ω	Leitfähigkeit

Indizes (hochgestellt)

<i>ads</i>	Adsorption
<i>c</i>	Flüssigphase
<i>E</i>	Exzess
<i>(m)</i>	massenbezogen
<i>max</i>	maximal
<i>(n)</i>	molar
<i>q</i>	adsorbierte feste Phase
<i>ref</i>	Referenzzustand
∞	unendliche Verdünnung

Indizes (tiefgestellt)

<i>ads</i>	Adsorption
<i>B</i>	Durchbruch (breakthrough)
<i>des</i>	Desorption
<i>i</i>	Komponente i
<i>LM</i>	Lösungsmittel
<i>p</i>	Protein
<i>R</i>	Retention
<i>s</i>	Salz
<i>t</i>	total
<i>0</i>	Standard, Referenz

Abkürzungen

AA	available area
CEC	Kationenaustausch-Chromatographie
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GPC	Gelpermeations-Chromatographie
HIC	hydrophobe Interaktions-Chromatographie
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IEC	Ionenaustausch-Chromatographie
IgG	Immunglobulin G
iP	isoionischer Punkt
LM	Lösungsmittel
mAb	monoklonaler Antikörper
NaCl	Natriumchlorid
pI	isoelektrischer Punkt
RI	Refractive Index
RS	Rayleigh Streuer
SEC	Größenausschluss-Chromatographie
SLS	statische Laserlichtstreuung
SMA	steric mass-action
UV	ultraviolette Strahlung

Abstract

Adsorption of therapeutic proteins on chromatographic materials is an attractive area of research which combines high academic challenges with the merits of working in an economically important and rapidly developing field. Downstream recovery of those high priced proteins is an important step in their production and high requirements on purity and aggregate content are imposed by health authorities. Protein adsorption on ion exchange (IEC) and hydrophobic interaction chromatographic (HIC) materials is extremely complex. The design of both separation methods is still based on trial and error by which the large number of process parameters like pH-value, type and quantity of salts have to be determined. Only a thorough understanding of the underlying physics and thermodynamics will allow a rational design of the technical process with its many interacting parameters.

An interesting group of those therapeutic proteins are human monoclonal antibodies (hmAbs). Their importance in modern medicine is rapidly growing, because of their great potential to treat many different indications like autoimmune diseases or even cancer. For a successful design of a chromatographic protein separation with high yield and purities both the behaviour of the protein solution and the adsorption/desorption process have to be thoroughly understood. For this, the thermodynamic behaviour of the proteins under different buffer conditions is fundamental. The choice of suboptimal solution conditions can lead to less product yield, less protein solubility or even aggregates.

This work extends the knowledge on thermodynamics of the adsorption of human monoclonal antibodies on cation exchange chromatographic (CEC) and HIC materials as well as the thermodynamic properties in solutions of monoclonal antibodies. The adsorption of two human monoclonal antibodies, which were supplied by an industrial partner, was studied with isothermal titration calorimetry (ITC) and by measuring equilibrium adsorption isotherms. Furthermore, solutions of the two hmAbs and of one mouse monoclonal antibody were studied with static laser light scattering (SLS). All relevant process parameters were systematically varied in the experiments.

For the adsorption experiments with three different strong cation exchange resins and one hydrophobic resin the pH-value was varied between 4.5 and 7.0, using different buffer systems with different salt concentrations at 25°C. The equilibrium data were modelled using adsorption models from literature, like for example the Langmuir-model. Particular attention was paid to the modelling of the salt concentration which is a very important parameter for CEC. Therefore the steric mass-action (SMA) and the available area (AA) models were used and compared. Both models are suitable to describe the salt dependency of CEC.

Calorimetric techniques are useful for acquiring thermodynamic information on biological systems. ITC is the most important technique in that field. The advantage of ITC in the present application is its ability to directly monitor the adsorption process by detecting the heat released or taken up upon binding. The ITC data and the equilibrium adsorption isotherms allow determining the specific enthalpy of adsorption of the antibody Δh_p^{ads} .

At pH-values near 7.0, where the antibodies are only weakly charged, the adsorption is exothermal. At small loadings the absolute number of Δh_p^{ads} is large and almost constant but it significantly decreases at higher loadings. This shows that the arrangement of antibody molecules on the absorber material depends on the loading and is less favourable at higher loadings. Despite the high positive charge of the antibody at pH-values of about 5.0 the value of Δh_p^{ads} is almost zero along the entire isotherm. Furthermore at pH 4.5 even endothermal effects were observed, although high binding capacities were found. At these conditions the adsorption process seems to be strongly influenced by the ions bound to the antibody. Their release upon adsorption explains the endothermal caloric effect. The adsorption equilibrium constant K_{eq} was calculated from the isotherms and the change of the Gibbs energy Δg_p^{ads} and entropy Δs_p^{ads} of the protein were determined for the different studied conditions.

For the static laser light scattering (SLS) experiments the pH-value was varied between 4.5 and 10, as well as salt concentration of two different types of salt, namely sodium chloride and ammonium phosphate. From the results the second osmotic virial coefficient A_2 and the mass-average molecular mass M_w were determined. Analysis of protein aggregates was performed with size-exclusion chromatography (SEC). For SLS two methods for measuring the A_2 were used: The offline SLS-batch-mode with a stand alone laser detector and an online mode with a laser detector integrated into a HPLC system including SEC columns (online SLS-SEC-mode). For both methods the A_2 value was determined with the Debye plot and good agreement between the results of both methods was observed. At small pH-values and also small salt concentrations the A_2 value is positive due to the positively charged antibodies and the resulting repulsive interactions. With increasing pH-values up to the isoelectric point a decreasing A_2 was observed because of decreasing protein charge. At the isoelectric point there are attractive interactions which results in a poor solubility of the antibodies. Higher salt concentrations show similar effects because of the starting salting out and the strong attractive interactions A_2 decreases and even becomes negative. At the same time M_w is decreasing due to the formation of aggregates.

1 Einleitung

Die Chromatographie ist das wichtigste Trennverfahren im Downstream-Processing von Proteinen. Die Untersuchung der Proteinadsorption an chromatographischen Trennmaterialien ist daher ein wichtiges Forschungs- und Entwicklungsgebiet. Bei der industriellen Produktion diagnostischer und pharmazeutischer Proteine ist die Chromatographie oft der entscheidende und kostenintensivste Schritt [16, 91]. Von Gesundheitsbehörden, wie der FDA (Food and Drug Administration), werden immer höhere Anforderungen an Reinheit und Aggregatgehalt gestellt [4, 94]. Um Proteine mit sehr hoher Reinheit zu erhalten, sind meist mehrere verschiedene Aufreinigungsschritte notwendig. Die wichtigsten chromatographischen Reinigungsverfahren sind die hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC), die Ionenaustausch-Chromatographie (IEC), die Größenausschluss-Chromatographie (SEC) und die Affinitäts-Chromatographie. Die HIC und die IEC werden in der vorliegenden Arbeit näher betrachtet. Für diese Verfahren ist es oft schwer, geeignete Prozessparameter zu bestimmen, da die Trennung von einer Vielzahl von Einflussgrößen, wie zum Beispiel pH-Wert, Temperatur, Salzart und Salzkonzentration bestimmt wird. Die Wahl der Prozessparameter wird meist durch zeit- und kostenintensive Screenings durchgeführt und findet empirisch nach dem Trial-and-Error-Verfahren statt [40, 58, 63]. Gerade bei der IEC und der HIC sind die Vorgänge der Proteinadsorption aufgrund zahlreicher Prozessparameter äußerst komplex. Trotz Anstrengungen in vorangegangenen Arbeiten wie z.B. [30, 59, 79, 80], ist es bis heute noch nicht gelungen, ein klares Verständnis der physikalisch-chemischen Vorgänge bei der IEC und der HIC zu erlangen. Dies wäre jedoch Voraussetzung für ein rationales Design der technischen Prozesse.

Eine wichtige Gruppe therapeutischer Proteine mit großem Potential in der modernen Medizin sind monoklonale Antikörper [19, 38]. Antikörper stellen eine Proteinfamilie mit physiologischen Funktionen in der Immunabwehr dar. Sie besitzen die Eigenschaft, über Bindestellen an bestimmte körperfremde Stoffe, den so genannten Antigenen, spezifisch zu binden [102]. Dadurch ergeben sich in der Medizin und Analytik viele Anwendungsmöglichkeiten. Bekannte Beispiele für analytische Methoden sind Nachweisverfahren wie zum Beispiel ELISA oder Western Blot, um bestimmte Moleküle bzw. Antigene zu detektieren. In der Medizin kommen Antikörper als passive Impfstoffe zum Einsatz, aber auch in der Therapeutik werden vermehrt monoklonale Antikörper eingesetzt. Anwendung finden sie hauptsächlich im Einsatz gegen Autoimmunkrankheiten, gegen rheumatische Arthritis sowie gegen Krebs [4, 19, 29]. Beispielsweise können Antikörper an

Proteine, die sich auf der Oberfläche von Tumorzellen befinden, spezifisch binden und so diese Tumorzellen für körpereigene Fresszellen markieren.

Aktuell sind einundzwanzig Antikörper oder Antikörper-ähnliche Moleküle zur Therapie solcher Krankheiten zugelassen [35]. Viele befinden sich in klinischen Untersuchungen oder der Entwicklung. Antikörper zur gezielten Therapie von Krebs oder chronischen Entzündungskrankheiten werden heute als monoklonale rekombinante Proteine biotechnologisch hergestellt. Sie werden mittels Säugetierzellen produziert und müssen danach aufwändig von produktionsbedingten Verunreinigungen getrennt werden. Die Affinitäts-Chromatographie mit Protein A ist heutzutage der dominierende Capture-Schritt bei der Aufreinigung monoklonaler Antikörper. Die Methode ermöglicht hohe Ausbeuten, Kapazitäten und Reinheiten in nur einem Prozessschritt [57]. Dieses Verfahren hat jedoch auch Nachteile wie etwa hohe Kosten, da Protein A-Trennmaterialien im Vergleich zu anderen Trennmaterialien sehr teuer sind. Die Elution findet bei niedrigen pH-Werten statt, was teilweise zum Verlust von Produktaktivität und Aggregation führt [64, 83, 86]. Aggregate stellen ein großes Problem bei der weiteren Aufarbeitung dar und können zu ungewollten Immunreaktionen bei Patienten führen [3, 97]. Des Weiteren kommt es zum so genannten „bleeding“ oder „leaching“ von Protein A welches im laufenden Prozess von der Säule gewaschen wird. Dies führt zum einen zu einer weiteren Verunreinigung, zum anderen ist deshalb die Verwendbarkeit der teuren Trennmaterialien zeitlich sehr begrenzt. In letzter Zeit wurden erhebliche Anstrengungen unternommen, um den Capture-Schritt mit Protein A durch Alternativen zu ersetzen [43, 56]. Viel versprechend ist hierbei eine Kombination aus CEC und HIC. Diese beiden Verfahren sind ökonomisch interessant und kommen schon in zahlreichen anderen industriellen Proteinreinigungen zum Einsatz [65, 118]. Für die Aufreinigung von Antikörpern wird hauptsächlich die CEC bei pH-Werten eingesetzt, die kleiner sind als der isoelektrische Punkt des Proteins. Bei diesen Bedingungen sind die Antikörper positiv geladen und adsorbieren an die CEC-Trennmaterialien. Diese Methode bietet hohe Kapazitäten und Reinheiten bei vergleichsweise milden Prozessbedingungen [37].

Um optimale Aufreinigungsbedingungen für ein Protein zu finden und ungewollte Wechselwirkungen in der Proteinlösung bei der Aufreinigung ausschließen zu können, ist nicht nur ein detailliertes Verständnis des Adsorptionsprozesses notwendig, sondern auch Kenntnisse über das Verhalten der Proteine in Lösung. Schlecht gewählte Prozessparameter führen zu verringerten Ausbeuten und Löslichkeiten sowie zu einer nicht gewünschten Denaturierung des Proteins oder Aggregatbildung. Irreversible Proteinaggregation ist ein kritischer Punkt innerhalb eines jeden Produktionsschrittes [9, 20].

Ohne ein Verständnis der thermodynamischen Grundlagen und der Zusammenhänge zwischen den Prozessparametern, den Vorgängen in der Proteinlösung und dem Adsorptionsvorgang, ist eine kostenoptimierte Produktion von Proteinen, mit hohen Anforderungen an Reinheit, Ausbeute und Funktionalität, kaum möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit soll durch thermodynamische Studien ein Beitrag zum besseren Verständnis des Adsorptionsprozesses monoklonaler Antikörper an chromatographische Trennmaterialien geliefert werden. Dies schließt thermodynamische Untersuchungen zur Stabilität, zur Löslichkeit und zum Aggregationsverhalten der Antikörper in Lösung ein. Die experimentelle Arbeit gliedert sich grob in drei Teile: Die Aufnahme und Modellierung von Adsorptionsisothermen, mikrokolorimetrische Messungen der Adsorption mit einem isothermen Titrationskalorimeter und statische Laserlichtstreuung zur Untersuchung der Wechselwirkungen der gelösten Antikörper.

Für die thermodynamischen Untersuchungen der Adsorption kommen sowohl systematische mikrokolorimetrische Studien, als auch Messungen der Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen, welche mit verschiedenen Modellen beschrieben werden, zum Einsatz. In der Vergangenheit wurde die Adsorption bei der IEC hauptsächlich als Prozess verstanden, der auf ionischen Wechselwirkungen zwischen dem geladenen Protein und dem entgegengesetzt geladenem Adsorber basiert. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass dieses Bild für einige technisch interessanten Bereiche sehr weit von der Realität entfernt ist. Die Proteinadsorption ist auf molekularer Ebene ein sehr komplexer Prozess, welcher von vielen Effekten beeinflusst wird: Proteinstruktur, Proteingesamtladung, Proteinoberflächenladung, Proteinladungsverteilung, Hydrophobizität, umgebende Ionenwolke, Oberflächenchemie und Topologie der Adsorbentmaterialien sowie deren Ladungen und Verteilungen der Gegenionen [17]. Das Verständnis dieser molekularen Parameter und ihrer Zusammenhänge mit den externen Prozessparametern wie Salzart, Konzentration oder pH-Wert ist die Voraussetzung eines rationalen Designs des Adsorptionsprozesses der Antikörper. Sowohl die *makroskopische als auch die molekulare Thermodynamik spielen eine Schlüsselrolle in dieser Entwicklung*. Diese Zusammenhänge gilt es zu charakterisieren und thermodynamisch zu modellieren, und so ein grundlegendes Verständnis der Adsorption monoklonaler Antikörper an verschiedene Adsorbentmaterialien zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit werden hierzu Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen von zwei unterschiedlichen humanen monoklonalen Antikörpern an unterschiedlichen chromatographischen Trennmaterialien (CEC, HIC) in einer Reihe von Puffersystemen mit *unterschiedlichen Ionenstärken, Puffersubstanzen und pH-Werten vermessen*. Diese vor allem in der Probenvorbereitung sehr aufwändigen Versuche sind notwendig, um einen Grundstock an Daten zu erhalten anhand derer es möglich ist, den Einfluss verschiedener Prozessparameter zu bewerten. Die so ermittelten Daten werden mittels unterschiedlicher Adsorptionsmodelle korreliert und die Modelle bezüglich ihrer Vor- und Nachteile bewertet. In der Literatur gibt es eine Vielzahl von Modellen zur Beschreibung des Gleichgewichts bei Adsorptionsvorgängen. Die meisten, wie auch das immer noch häufig eingesetzte Modell von Langmuir [12, 70], wurden für wesentlich einfacher zu beschreibende Vorgänge wie die Adsorption von Gasen an Oberflächen entwickelt. In der Vergangenheit wurden jedoch auch

Modelle entwickelt, die versuchen, die Proteinadsorption direkt zu beschreiben [40, 74, 92, 99, 107].

Bei den Ionentauschern liegt das Hauptaugenmerk hierbei auf der Beschreibung der Abhängigkeit der Adsorption von der Salzkonzentration im Lösungsmittel. In dieser Arbeit werden das steric mass-action [18] und das available area Modell [15] verglichen, welche beide in der Lage sind, diese Abhängigkeit zu beschreiben. Diese Modelle gehen von einer sterischen Hinderung bei der Adsorption der Proteine auf der Oberfläche aus und berücksichtigen somit die im Vergleich zu den Salzionen enorme Größe der Proteinmoleküle. Es besteht die Möglichkeit, die Parameter durch Anpassung an Adsorptionsisothermen oder direkt aus Chromatographieläufen zu bestimmen. Die unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung der Modellparameter werden hier vorgestellt und bezüglich ihrer Anwendbarkeit auf die Adsorption monoklonaler Antikörper untersucht.

Kalorimetrische Techniken werden häufig eingesetzt, um thermodynamische Daten und Informationen über biologische Systeme zu erhalten [39]. Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) ist eine der wichtigsten Techniken auf diesem Gebiet. Die ITC hat einen großen Anwendungsbereich und für die Untersuchung der Proteinadsorption den Vorteil, direkt die Enthalpieänderung während der Bindung des Proteins an den Adsorber zu detektieren. Dabei wird durch Titration eine konzentrierte Proteinlösung in eine Messzelle mit Pufferlösung und Adsorbermaterial injiziert. Die gemessene Adsorptionenthalpie liefert Beiträge zum Verständnis des Mechanismus [42, 54, 72, 73].

In der vorliegenden Arbeit werden mikrokolorimetrische Untersuchungen mit einem ITC durchgeführt, welche die Adsorption der Antikörper an unterschiedliche Trennmaterialien bei verschiedensten Bedingungen charakterisieren. Die Daten werden mit denen aus den Gleichgewichtsisothermen kombiniert. Dadurch wird die Basis dafür geschaffen, die thermodynamischen Eigenschaften der Proteinadsorption an Ionentauschern und der hydrophoben Interaktions-Chromatographie grundlegend zu verstehen und gezielt zu modellieren.

Zusätzlich werden über statische Laserlichtstreuungsmessungen (SLS) die Wechselwirkungen der gelösten Antikörper untersucht. In der Vergangenheit wurden zahlreiche Arbeiten durchgeführt, um die Protein-Protein Wechselwirkungen bei unterschiedlichen Pufferbedingungen zu untersuchen. Diese Wechselwirkungen sind unter anderem wichtig für die Kristallisation [41], Aggregation [3, 47] oder auch die Proteinlöslichkeit [48, 95].

Proteine in Lösung unterliegen Wechselwirkungen unterschiedlicher Natur. Diese reichen von dispersiven Wechselwirkungen über polare Wechselwirkungen und H-Brücken bis hin zu elektrostatischen Wechselwirkungen. Letztere werden auch durch die Ionenwolke, die die Proteine umgibt, beeinflusst. [14, 82].

Generell spielt die Zugabe von Salzen oder so genannten Additiven wie beispielsweise Polyethylenglykol (PEG) zum Lösungsmittel (Wasser) eine wichtige Rolle.

So sind die Löslichkeit der Proteine und deren Stabilität stark abhängig von den Lösungsmittelbedingungen. Das Verständnis der Einflüsse von Salz und pH-Wert auf Proteine in wässrigen Lösungen ist eine Herausforderung. Hierbei sind z.B. die schlechtere Löslichkeit in der Nähe des isoelektrischen Punktes zu nennen, wo das Protein annähernd neutral ist, oder die Tatsache, dass die Zugabe bestimmter Salze die Löslichkeit verbessert, während bei höheren Salzkonzentrationen ein so genannter „salting out“ Effekt eintritt und die Löslichkeit schlechter wird. Dies ist z.B. bei den häufig zum Fällen bzw. Kristallisieren von Proteinen verwendeten Salze $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und Na_2SO_4 der Fall [7].

Um diese Phänomene zu untersuchen und das thermodynamische Verhalten der Protein-Protein Wechselwirkungen zu studieren, ist die statische Laserlichtstreuung (SLS) die Methode der Wahl. Die Hauptanwendung der SLS ist die Bestimmung der massengemittelten Molmasse M_w und des zweiten osmotischen Virialkoeffizienten A_2 [28, 120]. Bei der SLS wird die Intensität des gestreuten Lichtstrahls an verschiedenen Winkeln gemessen. Der Grad der Streuung wiederum hängt von vielen Faktoren ab wie etwa der Konzentration, der Form und der Größe des streuenden Moleküls.

Der A_2 ist ein Parameter, der direkt die Wechselwirkungen von gelösten Molekülen beschreibt. Ein positiver Wert von A_2 steht für abstoßende Wechselwirkungen, ein negativer A_2 für anziehende Wechselwirkungen. Ein interessanter Punkt hierbei ist, dass sich der Wert für A_2 mit der Proteinkristallisation korrelieren lässt. George und Wilson [41] fanden für leicht negative Werte für A_2 eine bevorzugte Kristallisation, welche schwach anziehende Protein-Protein Wechselwirkungen benötigt. Die wichtigste Methode um den A_2 zu bestimmen, ist die SLS im Batch-Modus, bei der Proben unterschiedlicher Proteinkonzentration in einen Laser-Detektor injiziert werden und die Daten über Zimm- oder Debye-Plotts ausgewertet werden [68, 105]. In den letzten Jahren wurden auch Versuche unternommen, um unter Verwendung der size exclusion chromatographie (SEC) den A_2 zu ermitteln [13,10]

Ein weiterer Vorteil der SLS ist die Möglichkeit, bei größeren Polymeren Aussagen über die Form und Größe der Moleküle zu erhalten. Die Messungen erfolgen ohne Zerstörung des Proteins. Dies ist ein wichtiger Vorteil wenn das Protein teuer ist oder nur in kleinen Mengen zur Verfügung steht. Über die gemessene massengemittelte Molmasse und die Größe des Moleküls lassen sich Rückschlüsse auf den Aggregationszustand der Probe ziehen. Die Standard-Methode um Aggregate zu trennen und zu analysieren, ist die SEC in Kombination mit einem UV-Detektor. Für geringe Aggregatgehalte erreicht diese Methode jedoch die Detektionsgrenze. Eine weitaus empfindlichere Messmethode um Proteinaggregate zu detektieren, ist die Kombination der SEC mit einem SLS-Detektor [4]. Gerade bei der Bestimmung von M_w können durch diese Kombination zahlreiche Nachteile umgangen

werden, da die Methode eine direkte Bestimmung der Molmasse erlaubt und keine Molmassenstandards eingesetzt werden müssen [103, 117].

In dieser Arbeit werden die Werte von A_2 und M_w von zwei humanen monoklonalen Antikörpern (hmAb) und einem monoklonalen Mausantikörper (mmAb) über SLS bei unterschiedlichen Pufferbedingungen bestimmt. Hierbei kommen zwei unterschiedliche Methoden zum Einsatz. Zum einen die statische Laserlichtstreuung im Batch-Modus (offline SLS-Batch-Modus) und zum anderen eine online Methode bei der ein Laser-Detektor in ein HPLC-System mit SEC-Säulen integriert ist (online SLS-SEC-Modus).

2 Grundlagen

2.1 Antikörper

Antikörper oder auch Immunglobuline genannt, sind Proteine aus der Klasse der Globuline. Sie werden vom Immunsystem als Reaktion auf bestimmte Stoffe, den Antigenen, gebildet. Antikörper werden hierbei von einer Klasse von weißen Blutzellen (Leukozyten), den B-Zellen produziert und abgesondert. Sie kommen im Blut und in der extrazellulären Flüssigkeit der Gewebe vor. Sie „erkennen“ meist nicht die gesamte Struktur des Antigens, sondern nur einen bestimmten Teil, das Epitop. Antikörper erzeugen beim Kontakt mit dem Antigen die humorale Immunantwort.

Als Antigene wirken fast ausschließlich Makromoleküle oder an Partikel gebundene Moleküle, zum Beispiel Lipopolysaccharide an der Oberfläche von Bakterien. Ein bestimmtes Antigen induziert in der Regel die Bildung nur weniger, ganz bestimmter, dazu passender Antikörper, die über spezifische, nicht kovalente Bindung zumeist nur diesen Fremdstoff erkennen. Die spezifische Bindung von Antikörpern an die Antigene bildet einen wesentlichen Teil der Abwehr gegen die eingedrungenen Fremdstoffe. Bei Krankheitserregern (Pathogenen) als Fremdstoffe kann die Bildung und Bindung von Antikörpern zur Immunität führen. Antikörper sind also zentrale Bestandteile des Immunsystems höherer Wirbeltiere.

Jeder Antikörper besteht aus zwei identischen, schweren Ketten (heavy chains, H) und zwei identischen leichten Ketten (light chains, L), die durch kovalente Disulfidbrücken zu einer Ypsilon-förmigen Struktur miteinander verknüpft sind (Abbildung 1). Die leichten Ketten bestehen aus jeweils einer variablen und einer konstanten Domäne. Bezeichnet werden diese als VL und CL. Die schweren Ketten hingegen haben jeweils eine variable und drei (IgG, IgA) bzw. vier (IgM, IgE) konstante Domänen. Die variablen Domänen einer leichten und einer schweren Kette bilden die Antigenbindestelle [102].

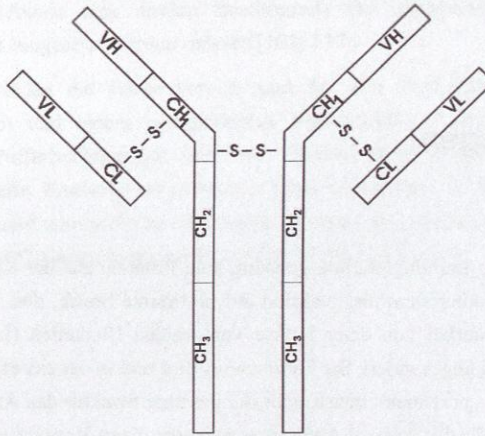


Abbildung 1: Struktur eines IgG Antikörpers. CH (Chain Heavy), CL (Chain Light), VH (Variable Heavy), VL (Variable Light).

Durch die spezifische Bindung der Antikörper an ein Epitop ergeben sich viele Anwendungen in Diagnostik und Analytik. Besonders im Bereich der Onkologie ergeben sich hier neue Möglichkeiten. Zudem eignen sich Antikörper durch ihre spezifische Bindung dazu, einen Wirkstoff ganz gezielt an den Wirkort zu transportieren („Drug-Targeting“). Die Anwendungsmöglichkeiten für therapeutische Antikörper sind sehr weit gefächert. Allerdings haben sich inzwischen Krebs- und immunologische Erkrankungen als Hauptanwendungsgebiet herauskristallisiert.

Das wohl bekannteste Beispiel für den Einsatz von monoklonalen Antikörper als Diagnostika sind die apothekenüblichen Schwangerschaftstests bei denen das schwangerschaftserhaltende Hormon HCG an einen HCG-Antikörper bindet. Im Labor gibt es mittlerweile zahlreiche Anwendungen für Antikörper wie zum Beispiel den Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) oder den Radioimmunoassay (RIA), welche beide zum Nachweis von Analyten dienen.

Bei der Produktion von Antikörpern wird zwischen polyklonalen und monoklonalen Antikörpern unterschieden. Bei einer natürlichen Immunreaktion werden gegen ein Antigen mehrere Antikörper produziert, die an verschiedene Epitope des Antigens binden. Dieses Gemisch aus verschiedenen Antikörpern wird als polyklonale Antikörper bezeichnet. In der therapeutischen und analytischen Anwendung ist meist die Bindung an ein spezifisches Epitop gewünscht. Dies ist nur mit monoklonalen Antikörpern zu erreichen.

Monoklonale Antikörper werden nach dem Verfahren von Köhler und Milstein [66] produziert. Mit dieser Methode ist es möglich, einen ganz bestimmten Antikörper, der nur an

ein Epitop bindet, in nahezu beliebiger Menge zu produzieren. Durch die Fusion einer Antikörper produzierenden B-Zelle mit einer immortalen Myelomzelle entsteht eine so genannte Hybridomazelle, die dauerhaft die gleichen Antikörper ausscheidet. Über Selektion können so monoklonale Antikörper produzierende Zelllinien erhalten werden. Mit der rekombinanten DNA-Technologie können mAbs spezifisch modifiziert werden, sodass beispielsweise ihr Backbone humanisiert wird und die jeweilige codierende DNA-Sequenz in produzierende Systeme wie etwa CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) überführt wird für die industrielle Produktion großer Mengen. Die Möglichkeit einen monoklonalen Antikörper zu humanisieren erlaubt es, ihn als therapeutisches Mittel gegen menschliche Krankheiten einzusetzen, da so die unerwünschte Immunantwort gegen den eingesetzten Antikörper im Patienten ausbleibt [61]. 2003 wurde der erste humane monoklonale Antikörper als Mittel gegen rheumatische Arthritis auf den Markt gebracht. Heute werden mAbs gegen zahlreiche Krankheiten wie etwa Asthma, Arthritis, Krebs, Leukämie und Autoimmunkrankheiten eingesetzt. Der Markt für monoklonale Antikörper wächst und für 2010 wird sich der Umsatz auf über 16 Mrd. US\$ verdoppelt haben [23]. Jedes Jahr werden große Mengen monoklonaler Antikörper produziert. Aufgrund der hohen Titer bei den Fermentationen wird die Aufarbeitung, das so genannte Downstream Processing, zum Bottleneck innerhalb der Produktion [71]. Verbesserungen innerhalb der Aufreinigungsprozesse sind daher unumgänglich.

Die Aufarbeitung erfolgt in mehreren Schritten. Die Abtrennung des Produktes vom Kulturmedium wird meist durch Filtration und Zentrifugation realisiert. Bei der Feinreinigung spielen chromatographische Verfahren wie Affinitäts-Chromatographie mit Protein A, Ionenaustausch-Chromatographie, Hydrophobe Interaktions-Chromatographie, Ultrafiltration und Dialyse eine große Rolle.

2.2 Chromatographie

Die Flüssigchromatographie ist eine physikalische Trennmethode mit einer Flüssigkeit als mobilen Phase und einem Feststoff als stationärer Phase. Tswett [109] leistete auf diesem Gebiet Pionierarbeit und veröffentlichte 1906 als erster eine Arbeit zur Chromatographie von Chlorophyllen. Die ersten kommerziell erhältlichen Geräte kamen 1969 auf dem Markt. In der chemischen und pharmazeutischen Analytik ist die High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) eine der wichtigsten Messmethoden [34].

Proteine werden über chromatographische Trennverfahren aufgereinigt, indem man sich ihre verschiedenen spezifischen Eigenschaften zunutze macht. In der Aufreinigung therapeutischer Proteine spielt die Chromatographie neben Zentrifugation und Filtration eine dominierende Rolle.

Die drei in dieser Arbeit verwendeten chromatographischen Methoden IEC, HIC und SEC werden im Folgenden detaillierter dargestellt.

2.2.1 Ionenaustausch-Chromatographie

Die Ionenaustausch-Chromatographie (IEC) trennt Moleküle nach ihren unterschiedlichen Nettoladungen. Seit 1960 wird die Ionenaustausch-Chromatographie auch für die Trennung von Biomolekülen genutzt und bekommt eine immer größere Bedeutung bei der Aufarbeitung von Proteinen. Heute ist die IEC die meistgenutzte Technik zur Aufreinigung von Proteinen, Peptiden, Nukleinsäuren und anderen geladenen Biomolekülen [62]. Sie bietet neben einer hohen Auflösung auch hohe Beladungskapazitäten [37]. Dieses Verfahren macht eine Trennung von Molekülen, welche selbst nur geringe Unterschiede in ihren Ladungseigenschaften aufweisen noch möglich, z.B. zwei Proteine, die sich nur in einer einzigen geladenen Aminosäure unterscheiden. Dies macht die IEC geeignet für alle Schritte innerhalb eines Aufreinigungsprotokolls, also sowohl Capture und Intermediate Purification, als auch Polishing vom Mikromaßstab bis zur Aufreinigung von großen Mengen Produkt [1].

Proteine unterscheiden sich in ihren Ladungseigenschaften bezüglich ihrer Gesamtladung, Ladungsdichte und Oberflächenladungsverteilung und zeigen unterschiedliche Wechselwirkungen mit geladenen Chromatographie-Materialien. Die geladenen Gruppen eines Proteins zeigen verschiedene pKa-Werte in Abhängigkeit ihrer Struktur und der chemischen Mikroumgebung.

Da alle Moleküle mit sauren bzw. basischen Gruppen titriert werden können, ist ihre Ladung äußerst pH-Wert abhängig. Proteine, welche aus vielen verschiedenen Aminosäuren mit schwach sauren und basischen Gruppen aufgebaut sind, ändern ihre Nettoladung, wenn der pH-Wert der Umgebung sich ändert. Jedes Protein besitzt seine eigene spezielle Abhängigkeit der Nettoladung vom pH-Wert. Derjenige pH-Wert, bei dem ein Protein in Wasser keine Nettoladung mehr trägt, wird isoelektrischer Punkt (pI) genannt und kann in einer Titrationskurve bestimmt werden. Ein Beispiel einer solchen Kurve für einen hmAb zeigt die *Abbildung 2*.

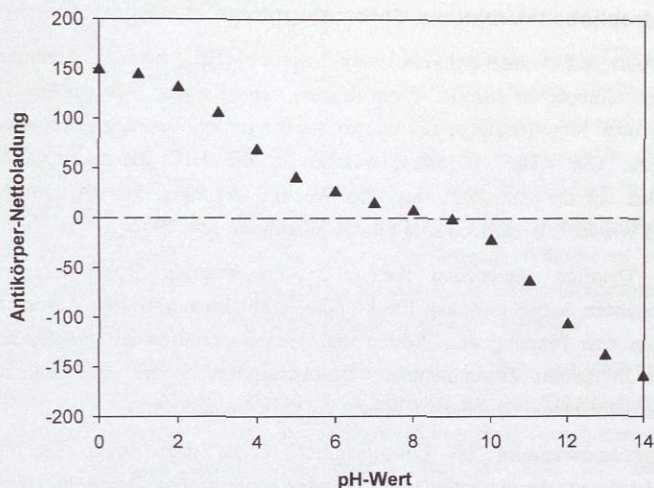


Abbildung 2: Titrationskurve eines humanen, monoklonalen Antikörpers (mAb2) bei 25°C [116]. Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 8,8.

Bei einer IEC-Trennung finden reversible Wechselwirkungen zwischen geladenen Proteinen und entgegengesetzt geladenen IEC-Trennmaterien statt, wobei entweder die Adsorption oder die Desorption bevorzugt wird um die Trennung zu gewährleisten. Ein Protein, welches am pI keine Nettoladung trägt, wird mit dem Trennmaterien nur sehr geringe Wechselwirkungen aufweisen.

Antikörper werden bei einem pH-Wert kleiner ihrem pI mit Kationentauschern abgetrennt, da hier die positiv geladenen Proteine an die negativ geladenen Kationentauscher binden. Ionentauscher-Materialien bestehen häufig aus sphärischen Partikeln, die mit geladenen Gruppen funktionalisiert sind. Bei Kationentauschern sind diese Gruppen beispielsweise negativ geladene Sulfogruppen (SO_3^-). Das Trennmaterien ist meistens porös, um eine große Oberfläche zu gewährleisten. Für die Säulenchromatographie sind die Trennmaterien in Säulen in einem festen Bett gepackt. Das Bett wird für die Aufreinigung mit einem geeigneten Puffer equilibriert, sodass bei der Auftragung der Probe auf die Säule das Zielprotein bindet und möglichst viele Verunreinigungen nicht binden. Gebundenes Protein kann durch Veränderung des pH-Wertes, Zugabe von konkurrierenden Ionen oder so genannten „molecule displacers“ eluiert werden, welche die Proteine verdrängen und an ihrer Stelle an die Trennmaterien binden [93, 110].

2.2.2 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie

Bei der Hydrophoben Interaktions-Chromatographie (HIC) werden Trennmateriale mit hydrophoben Gruppen eingesetzt. Diese reichen von schwach hydrophoben Liganden wie etwa Ether oder Propylenglycol bis hin zu stark hydrophoben Liganden wie Butyl- oder Oktylgruppen. Die vielen Theorien, welche für die HIC diskutiert werden, basieren hauptsächlich auf der Annahme, dass die Wechselwirkungen von hydrophoben, gelösten Stoffen und Wasser entscheidend sind für die Adsorption [24, 104].

Was alle Theorien gemeinsam haben, ist die zentrale Rolle von so genannten strukturformenden Salzen und dem Effekt, den sie auf Lösungsmittel, Adsorber und Protein ausüben, um eine Bindung von Protein und Trennmateriale zu realisieren. Porath [88] untersuchte in diesem Zusammenhang die Adsorption in der Anwesenheit von hohen Salzkonzentrationen und fand hierbei höhere Adsorberbelastungen.

Hohe Salzkonzentrationen im Lösungsmittel führen dazu, dass Salzionen um die Wassermoleküle aus der Hydrathülle der Proteine konkurrieren. Durch die Umstrukturierung der Wassermoleküle erhöht sich die Unordnung bzw. die Entropie des Systems und die Adsorption wird thermodynamisch durch diesen Entropiegewinn begünstigt. Diese entropiegetriebene Interaktion zweier hydrophober Gruppen (sowohl Protein-Ligand, als auch Protein-Protein) wird im Folgenden „hydrophobe Wechselwirkung“ genannt. Dabei ist zu beachten, dass sich die Proteinstruktur in Abhängigkeit vom Lösungsmittel ändern kann, z.B. können hydrophobe Gruppen, die ursprünglich im Inneren des Proteins lagen, nun für das Lösungsmittel zugänglich werden.

Hofstee [53] und später auch Shaltiel [98] verglichen die hydrophobe Interaktions-Chromatographie mit der Zusammenlagerung von kleinen, aliphatischen, organischen Molekülen in Wasser. Porath et al. [89] vermutete hinter der hydrophoben Adsorption den so genannten „salting-out“ Effekt. Hjerten [51] interpretierte dies 1977 thermodynamisch über die Änderung der Gibbschen Energie ΔG . Nach ihm führt die Entfernung und Umstrukturierung der geordneten Wassermoleküle, welche die hydrophoben Liganden und die Proteine umgeben, zu einem Entropiegewinn ΔS , wodurch sich ein negativer Wert für die Änderung der Gibbschen Energie des Systems ergibt. Daraus resultiert, dass die Wechselwirkung von hydrophoben Ligand und Protein thermodynamisch begünstigt ist und somit die Adsorption möglich wird. Ebenfalls weit verbreitet ist die Theorie von Melander und Horvath [78], welche die hydrophobe Wechselwirkung auf die Zunahme der Oberflächenspannung von Wasser zurückführt, welche durch gelöste strukturformende Salze verursacht wird.

2.2.3 Größenausschluss-Chromatographie

Die Größenausschluss-Chromatographie (SEC) oder auch Gelpermeations-Chromatographie (GPC) genannt, basiert im Gegensatz zu anderen chromatographischen Verfahren auf einer Trennung nach Molekülgröße. Die Säulen sind bei der GPC entweder mit porösem Gel oder mit porösen Partikeln gepackt. Entscheidend ist eine definierte Porengröße der Packung. Große Moleküle, die nicht in die Poren der stationären Phase eindringen können, besitzen ein kleines Elutionsvolumen und eluieren daher früher von der Säule. Moleküle, die kleiner als die Porengröße sind, können in die Poren des Säulenmaterials diffundieren und eluieren dadurch später als große Moleküle. Durch die unterschiedlichen Elutionsvolumina lassen sich so Proteine nicht nur auftrennen, sondern auch ihre Molmassen bestimmen.

Da es zu keiner Bindung auf der Säule kommt, haben verschiedene Pufferzusammensetzungen und pH-Werte nur geringen Einfluss auf das Retentionsverhalten der Proteine bei der SEC. Daher hat dieses Trennverfahren den großen Vorteil, dass es bezüglich Änderungen der Prozessparameter unempfindlich ist, die z.B. für anschließende Chromatographieschritte nötig sind. Ein weiterer Vorteil der SEC ist, dass das Protein keinen direkten Interaktionen ausgesetzt ist, durch die es zu Einschränkungen der Proteinfunktionalität kommen kann [1].

2.3 Thermodynamik der Adsorption

2.3.1 Thermodynamische Gleichgewichtskonstante

Die Adsorption ist bei vielen chromatographischen Verfahren das physikalische Trennprinzip. Im Folgenden werden die thermodynamischen Grundlagen der Adsorption einer gelösten Komponente aus der Flüssigphase an die feste Phase beschrieben.

Im thermodynamischen Gleichgewicht ist das chemische Potential der Komponente i in der Flüssigphase (Index c) und der adsorbierten Phase (Index q) gleich.

$$\mu_i^c = \mu_i^q \quad (1)$$

Die chemischen Potentiale werden nach Art des Henryschen Gesetzes normiert.

$$\mu_i^c = \mu_i^{ref c} + RT \ln \frac{c_i^{(n)}}{c_0^{(n)}} + RT \ln \gamma_i^c \quad (2)$$

$$\mu_i^q = \mu_i^{ref q} + RT \ln \frac{\tilde{q}_i^{(n)}}{q_0} + RT \ln \gamma_i^q \quad (3)$$

Hier ist $c_i^{(n)}$ die Molarität der Komponente i (Stoffmenge Komponente i pro Volumen Probe), $c_0^{(n)}$ die Referenzmolarität 1 mol l^{-1} , $\tilde{q}_i^{(n)}$ die Beladung des Adsorbers mit der Komponente i (Stoffmenge Komponente i pro Volumen Adsorber) und $\tilde{q}_0^{(n)}$ die Referenzbeladung 1 mol l^{-1} . Für die Aktivitätskoeffizienten gilt für unendliche Verdünnung:

$$\lim_{c_i^c \rightarrow 0} \gamma_i^c = 1 \quad (4)$$

$$\lim_{\tilde{q}_i^{(n)} \rightarrow 0} \gamma_i^q = 1 \quad (5)$$

Somit ist der Referenzzustand der chemischen Potentiale rein hypothetisch und kann nie erreicht werden, da gleichzeitig $c_i^{(n)} = 0$ und $c_i^{(n)} = c_0^{(n)}$ (bzw. $\tilde{q}_i^{(n)} = 0$ und $\tilde{q}_i^{(n)} = \tilde{q}_0^{(n)}$) gelten müsste. Einsetzen der Gleichung (2) und (3) in die Gleichgewichtsbedingung (1) liefert

$$\mu_i^{ref c} - \mu_i^{ref q} = RT \ln \frac{\tilde{q}_i^{(n)}}{\tilde{q}_0^{(n)}} - RT \ln \frac{c_i^{(n)}}{c_0^{(n)}} + RT \ln \gamma_i^q + RT \ln \gamma_i^c \quad (6)$$

bzw.

$$\frac{\mu_i^{ref c} - \mu_i^{ref q}}{RT} = \ln \frac{\tilde{q}_i^{(n)}}{c_i^{(n)}} + \ln \frac{\gamma_i^q}{\gamma_i^c} \quad (7)$$

und somit

$$\exp \left[\frac{\mu_i^{ref c} - \mu_i^{ref q}}{RT} \right] = \frac{\tilde{q}_i^{(n)}}{c_i^{(n)}} \frac{\gamma_i^q}{\gamma_i^c} \quad (8)$$

Der Term auf der linken Seite ist die thermodynamische Gleichgewichtskonstante K_{eq}

$$K_{eq} = \exp \left[\frac{\mu_i^{ref c} - \mu_i^{ref q}}{RT} \right] \quad (9)$$

Aus (9) ergibt sich die allgemeine Form der Gleichgewichtsisotherme. Sie hängt ab von Temperatur und Druck, der Zusammensetzung des Lösungsmittels und den Adsorbentmaterialien, nicht aber von der Konzentration des adsorbierenden Stoffes i . Es gilt:

$$K_{eq} = \frac{\tilde{q}_i^{(n)} \gamma_i^q}{c_i^{(n)} \gamma_i^c} \quad (10)$$

In unendlicher Verdünnung wird der Quotient der Aktivitätskoeffizienten der beiden Phasen gleich 1. Damit folgt für K_{eq} :

$$K_{eq} = \lim_{c_i^{(n)} \rightarrow 0, \tilde{q}_i^{(n)} \rightarrow 0} \frac{\tilde{q}_i^{(n)}}{c_i^{(n)}} \quad (11)$$

Das bedeutet, dass die thermodynamische Gleichgewichtskonstante gleich der Anfangssteigung der Adsorptionsisothermen ist. Nach Anpassung eines Modells an experimentell ermittelte Adsorptionsisothermen kann die thermodynamische Gleichgewichtskonstante durch einen Grenzübergang auf unendliche Verdünnung ermittelt werden.

2.3.2 Hypothetische Referenzzustände

Aus der Definition der Normierung nach Gleichung (4) und (5) ergibt sich für unendliche Verdünnung ($\gamma_i^c = \gamma_i^g = 1$) aus (2) und (3):

$$\lim_{c_i^{(n)} \rightarrow \infty} \frac{\mu_i^c - \mu_i^{\text{ref } c}}{RT} = \lim_{c_i^{(n)} \rightarrow \infty} \ln \frac{c_i^{(n)}}{c_0^{(n)}} \quad (12)$$

$$\lim_{q_i^{(n)} \rightarrow \infty} \frac{\mu_i^g - \mu_i^{\text{ref } g}}{RT} = \lim_{q_i^{(n)} \rightarrow \infty} \ln \frac{\tilde{q}_i^{(n)}}{\tilde{q}_0^{(n)}} \quad (13)$$

Die Ausdrücke auf der rechten Seite der Gleichungen (12) und (13) sind nicht von der Temperatur abhängig. Mit

$$\lim_{c_i^{(n)} \rightarrow 0} \mu_i^c = \mu_i^{c \infty} \quad (14)$$

bzw.

$$\lim_{q_i^{(n)} \rightarrow 0} \mu_i^g = \mu_i^{g \infty} \quad (15)$$

folgt daher durch Differenzierung nach der Temperatur

$$\frac{d}{dT} \left[\frac{\mu_i^{c \infty} - \mu_i^{\text{ref } c}}{RT} \right] = 0 \quad (16)$$

$$\frac{d}{dT} \left[\frac{\mu_i^{g \infty} - \mu_i^{\text{ref } g}}{RT} \right] = 0 \quad (17)$$

Mit der Gibbs-Helmholtz Beziehung [46]

$$\frac{d}{dT} \left[\frac{\mu_i}{RT} \right] = -\frac{h_i}{RT^2} \quad (18)$$

folgt aus (16) und (17)

$$h_i^{\text{ref } c} = h_i^{c \infty} \quad (19)$$

$$h_i^{\text{ref } g} = h_i^{g \infty} \quad (20)$$

Die partiellen molaren Enthalpien im hypothetischen Referenzzustand und in der realen unendlichen Verdünnung sind gleich. Die Differenz der Enthalpien in der adsorbierten Phase und der Flüssigphase ist die Adsorptionenthalpie.

$$\Delta h_i^{\text{ads}} = h_i^g - h_i^c \quad (21)$$

Es gilt offenbar

$$\Delta h_i^{\text{ads ref}} = \Delta h_i^{\text{ads } \infty} \quad (22)$$

Die Adsorptionenthalpie bei unendlicher Verdünnung kann experimentell mittels isothermer Titrationskalorimetrie ermittelt werden. Somit ergibt sich ein Zugang zur Differenz der Werte

der Adsorptionenthalpie in den hypothetischen Referenzzuständen. Aus der Definition der thermodynamischen Gleichgewichtskonstanten, Gleichung (9), kann die Änderung der partiellen molaren Gibbschen Energie beim Übergang zwischen den Referenzzuständen (*Adsorption im Referenzzustand*) berechnet werden.

$$\Delta g_i^{ads\ ref} = \Delta \mu_i^{ads\ ref} = \mu_i^{ref\ q} - \mu_i^{ref\ c} = -RT \ln K_{eq} \quad (23)$$

Da K_{eq} aus Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen bestimmt werden kann, lässt sich auch die Adsorptionsehtropie im Referenzzustand berechnen:

$$\Delta g_i^{ads\ ref} = \Delta h_i^{ads\ ref} - T \Delta s_i^{ads\ ref} \quad (24)$$

Für die Entropieänderung im Referenzzustand bei der Proteinadsorption gilt also

$$T \Delta s_p^{ads\ ref} = RT \ln K_{eq} + \Delta h_p^{ads\ \infty} \quad (25)$$

Die hierfür benötigten Werte für $\Delta h_p^{ads\ \infty}$ beziehen sich ebenfalls auf den Referenzzustand und können aus kalorimetrischen Messungen der spezifischen Adsorptionenthalpie Δh_p^{ads} für unendlich kleine molare Proteinkonzentrationen $c_p^{(n)}$ bzw. unendlich kleine, molare Adsorberbeladungen $q_p^{(n)}$ ermittelt werden.

2.4 Adsorptionsmodelle

In den letzten Jahren wurden viele Versuche unternommen, die Proteinadsorption mit einfachen Modellen zu beschreiben. Alle hier vorgestellten Modelle beruhen auf der Annahme, dass sich thermodynamisches Gleichgewicht zwischen freier und gebundener Phase einstellt. Dies bedeutet, dass die chemischen Potentiale aller adsorbierenden Komponenten i in beiden Phasen identisch sind (Gleichung 1). Kinetische Vorgänge werden hierbei nicht berücksichtigt.

Ziel dieser Modelle ist es, einen Zusammenhang zwischen der Konzentration der jeweiligen Komponente i in der flüssigen Phase und der adsorbierten Phase herzustellen. Dies geschieht teilweise aus physikalischen Überlegungen heraus, häufig aber auch rein empirisch.

Einige der am häufigsten zur Modellierung der Proteinadsorption eingesetzten Modelle werden im Folgenden vorgestellt.

2.4.1 Langmuir

Das einfachste und dennoch immer noch am häufigsten zur Beschreibung der Proteinadsorption verwendete Modell wurde 1918 von Langmuir entwickelt [70]. Das Modell wurde ursprünglich von einer einfachen kinetischen Betrachtung der Adsorption kleiner Gasmoleküle an einer Oberfläche abgeleitet.

Das Modell beruht auf folgenden Grundannahmen: Die Moleküle adsorbieren an einer festen Anzahl definierter Stellen und an jede dieser Stellen adsorbiert nur ein einziges Molekül. Alle

diese Bindungsstellen sind äquivalent. Des Weiteren bildet sich nur eine adsorbierte Schicht aus und bei den adsorbierten Molekülen kommt es zu keiner Interaktion. Unter diesen Annahmen kann die Langmuir-Isotherme hergeleitet werden [12, 63, 70].

Die Adsorption wird dabei konzeptionell wie eine chemische Reaktion von Proteinen P und Adsorbent A behandelt, mit der Geschwindigkeit der Adsorption k_{ads} und der der Desorption k_{des}



und



Die Gleichgewichtskonstante der Adsorption ist definiert als:

$$K_a = \frac{k_{ads}}{k_{des}} \quad (28)$$

Für die Geschwindigkeitskonstanten wird angesetzt:

$$r_{ads} = k_{ads} c_p^{(m)} \left(1 - \frac{q_p^{(m)}}{q_p^{(m) \max}} \right) \quad (29)$$

$$r_{des} = k_{des} \frac{q_p^{(m)}}{q_p^{(m) \max}} \quad (30)$$

Hierbei ist $c_p^{(m)}$ die Proteinkonzentration (Masse Protein pro Volumen Probe), $q_p^{(m)}$ die Proteinbeladung des Adsorbent (Masse Protein pro Masse Adsorbent) und $q_p^{(m) \max}$ die maximale Adsorbentbeladung.

Die Geschwindigkeiten der Adsorption und der Desorption sind im Gleichgewicht identisch. Die Adsorptiongeschwindigkeit ist proportional zur Proteinkonzentration in der Flüssigphase und die Desorption ist proportional zur Proteinbeladung des Adsorbent.

Es gilt:

$$k_{ads} c_p^{(m)} \left(1 - \frac{q_p^{(m)}}{q_p^{(m) \max}} \right) = k_{des} \frac{q_p^{(m)}}{q_p^{(m) \max}} \quad (31)$$

Aus Gleichung (31) ergibt sich die Langmuir Isotherme:

$$q_p^{(m)} = \frac{q_p^{(m) \max} c_p^{(m)}}{\frac{1}{K_a} + c_p^{(m)}} \quad (32)$$

Dieser einfache Ansatz beschreibt häufig experimentell ermittelte Werte sehr gut.

2.4.2 Langmuir-Freundlich

Das Langmuir-Freundlich-Modell [12], häufig auch als erweitertes Langmuir-Modell bezeichnet, ergänzt das Langmuir-Modell um einen weiteren Parameter a als Exponent der Flüssigphasenkonzentration. Dieser rein empirische Parameter verbessert häufig die Anpassbarkeit an Messwerte, führt jedoch für $a \neq 0$ dazu, dass die Steigung der Isotherme für $c_p^{(m)} \rightarrow 0$ gegen Null geht, was zu unphysikalischen Ergebnissen bei der Ermittlung der thermodynamischen Gleichgewichtskonstanten führt.

Die Langmuir-Freundlich Isotherme ist wie folgt definiert:

$$q_p^{(m)} = \frac{q_p^{(m)\max} \left(\frac{c_p^{(m)}}{c_0^{(m)}} \right)^{1-a}}{\frac{1}{K_a c_0^{(m)}} + \left(\frac{c_p^{(m)}}{c_0^{(m)}} \right)^{1-a}} \quad (33)$$

Die Flüssigphasenkonzentration wird hier auf eine definierte Standardkonzentration ($c_0^{(m)}$) bezogen ($c_0^{(m)} = 1 \text{ g l}^{-1}$).

2.4.3 Steric Mass-Action

Das von Brooks und Cramer [18] veröffentlichte steric mass-action Modell (SMA) ist ein dreiparametriges Modell zur Beschreibung der Adsorptionsvorgänge bei Ionentauschern. Dieses Modell beachtet die sterische Hinderung von Salzgegenionen durch adsorbierte Proteine. Durch ihre Größe verdecken die Proteine wesentlich mehr Gegenionen als es allein aufgrund ihrer Ladung der Fall wäre. Folgende Annahmen werden getroffen:

Beide Phasen sind thermodynamisch ideal, es wird mit Konzentrationen an Stelle von Aktivitäten gerechnet. Die sterisch gehinderten Salzgegenionen sind für den Ionenaustauschvorgang nicht verfügbar. Die Adsorption kann durch ein Massenwirkungs-Gleichgewicht beschrieben werden. In der stationären Phase wird Elektroneutralität gewahrt. Der Einfluss von Co-Ionen (beispielsweise Chloridionen in einer Natriumchloridlösung bei Kationenaustauschern) ist vernachlässigbar. Die Gleichgewichtsparameter im SMA-Modell sind konstant und unabhängig von der Protein- und Salzkonzentration. Dadurch werden Nichtidealitäten wie Aggregation oder Umfaltung der Proteine nicht berücksichtigt. Das Protein mit der charakteristischen Ladung ν (Anzahl der vom Protein verdrängten Gegenionen) wird an der Oberfläche an Bindungsstellen adsorbiert. Hierbei verdrängt es dieselbe Anzahl an Salzgegenionen. Der Einfachheit halber wird hier von einem einfach geladenen Salzion ausgegangen. Wie in Abbildung 3 skizziert, werden weitere Salzgegenionen sterisch gehindert und können nicht mehr am Austausch teilnehmen.

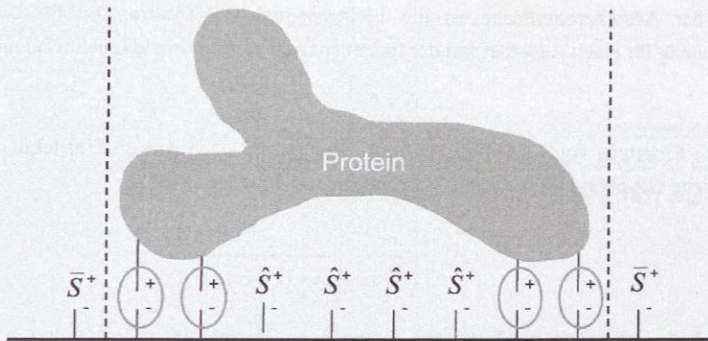


Abbildung 3: Idealisierte Proteinadsorption an einen Kationentauscher nach dem SMA-Modell. \hat{S}^+ : Sterisch gehinderte Salz-Gegenionen;
 \bar{S}^+ : Sterisch ungehinderte Salz-Gegenionen.

Der stöchiometrische Austausch von Proteinen P und verfügbaren Gegenionen \bar{S} wird durch folgendes Reaktionsschema beschrieben:



wobei der Überstrich $\bar{\quad}$ die gebundenen Salzionen beschreibt, die für den Austausch verfügbar, das heißt nicht sterisch gehindert sind. Die hochgestellten Indices c und q stehen für die Flüssigphase bzw. adsorbierte Phase. Die Gleichgewichtskonstante für dieses Reaktionsschema K_{SMA} wird nach dem Massenwirkungsgesetz definiert.

$$K_{SMA} = \left(\frac{\tilde{q}_p^{(n)}}{c_p^{(n)}} \right) \left(\frac{c_s^{(n)}}{\tilde{q}_s^{(n)}} \right) \quad (35)$$

Die zugehörigen Konzentrationen sind $c_p^{(n)}$ bzw. $\tilde{q}_p^{(n)}$ für das gelöste bzw. adsorbierte Protein P und $c_s^{(n)}$ bzw. $\tilde{q}_s^{(n)}$ entsprechend für das Salzion S. Die Konzentration der sterisch gehinderten Salzionen $\hat{q}_s^{(n)}$, die für den Ionenaustausch nicht verfügbar sind, ist definiert als

$$\hat{q}_s^{(n)} = \sigma \tilde{q}_p^{(n)} \quad (36)$$

wobei σ der sterische Faktor des Proteins ist. Dieser Faktor ist abhängig von der Größe und Orientierung des Proteins auf der Oberfläche des Adsorbers. Die Gesamtbeladung der stationären Phase mit Ionen ist gegeben durch:

$$q_s^{(n)} = \tilde{q}_s^{(n)} + \hat{q}_s^{(n)} = \tilde{q}_s^{(n)} + \sigma \tilde{q}_p^{(n)} \quad (37)$$

Auf der Adsorberoberfläche ist die Elektroneutralität gewahrt. Die Elektroneutralitätsbedingung für einen Adsorber mit der Ionenkapazität Λ (maximale Ionenbeladung) lautet:

$$\Lambda = \bar{q}_s^{(n)} + (\nu + \sigma) \bar{q}_p^{(n)} \quad (38)$$

Durch Einsetzen von Gleichung (38) in Gleichung (35) wird nach Umstellung die in $\bar{q}_p^{(n)}$ implizite Gleichung für die SMA-Adsorptionsisotherme erhalten:

$$c_p^{(n)} = \left(\frac{\bar{q}_p^{(n)}}{K_{SMA}} \right) \left(\frac{c_s^{(n)}}{\Lambda - (\nu + \sigma) \bar{q}_p^{(n)}} \right)^\nu \quad (39)$$

Die Anfangssteigung der Isotherme im linearen Bereich für $c_p^{(n)} \rightarrow 0$ und $\bar{q}_p^{(n)} \rightarrow 0$ kann analytisch bestimmt werden und ist

$$\lim_{c_p^{(n)} \rightarrow 0} \left(\frac{\bar{q}_p^{(n)}}{c_p^{(n)}} \right) = K_{SMA} \left(\frac{\Lambda}{c_s^{(n)}} \right)^\nu \quad (40)$$

Damit nimmt die Anfangssteigung der Isotherme wie erwartet mit steigender Salzkonzentration in der Flüssigphase ab. Die maximale Beladung $\bar{q}_p^{(n)\max}$, also die Beladung die für $c_p^{(n)} \rightarrow \infty$ erreicht wird, ist unabhängig von der Salzkonzentration der mobilen Phase. Rein mathematisch ergibt sich aus Gleichung (39)

$$\lim_{c_p^{(n)} \rightarrow \infty} \bar{q}_p^{(n)} = \frac{\Lambda}{\nu + \sigma} = \bar{q}_p^{(n)\max} \neq f(c_s^{(n)}) \quad (41)$$

Diese maximale Beladung wird jedoch im Experiment nur für hinreichend geringe Salzkonzentrationen tatsächlich erreicht.

Um die Gleichgewichtsisotherme zu beschreiben, ist es notwendig die drei unabhängigen Parameter ν , σ und K_{SMA} zu bestimmen. Dies kann neben der Anpassung an mindestens drei gemessene Gleichgewichtsisothermen bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen auch aus Säulenchromatographieläufen geschehen. Im Folgenden werden die Grundlagen hierzu erläutert.

Unter linearen Gleichgewichtsbedingungen (geringe Proteinkonzentrationen) können aus der Literatur bekannte Beziehungen zum Protein-Ionenaustausch zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstante K_{SMA} und der charakteristischen Ladung ν mittels isokratischer Elution aus Chromatographieläufen herangezogen werden [18, 67, 111]. Hierbei werden Protein-Pulsexperimente bei verschiedenen Salzkonzentrationen durchgeführt und die Retentionszeiten auf der Säule bestimmt.

Unter linearen Bedingungen ist der Kapazitätsfaktor k' definiert als [115]:

$$k' = \beta \left(\frac{\bar{q}_p^{(n)}}{c_p^{(n)}} \right) = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (42)$$

Das Phasenverhältnis β der Säule ist

$$\beta = \frac{1 - \varepsilon_t}{\varepsilon_t} \quad (43)$$

mit der totalen, das bedeutet inter- und intrapartikulären, Porosität ε_t . Die Retentionszeit des Proteins t_R und die Retentionszeit einer nicht wechselwirkenden Komponente t_0 können experimentell bestimmt werden. Einsetzen von Gleichung (40) in Gleichung (42) ergibt für den Kapazitätsfaktor

$$k' = \beta K_{SMA} \left(\frac{\Lambda}{c_s^{(n)}} \right)^\nu \quad (44)$$

Wird die Salzkonzentration und die Ionenkapazität auf eine Standardkonzentration bzw. Standardkapazität bezogen und beidseitig der Logarithmus genommen, ergibt sich

$$\log k' = \log \left(\beta K_{SMA} \left(\frac{\Lambda}{\Lambda_0} \right)^\nu \right) - \nu \log \frac{c_s^{(n)}}{c_0^{(n)}} \quad (45)$$

Dabei sind $\Lambda_0 = 1 \text{ mol l}^{-1}$ und $c_0^{(n)} = 1 \text{ mol ml}^{-1}$. Eine logarithmische Auftragung des Kapazitätsfaktors über der Salzkonzentration der mobilen Phase wird Kopaciewicz Plott genannt [67] und ergibt demnach eine Gerade mit der Steigung $-\nu$ und dem Achsenabschnitt $\log(\beta K_{SMA} (\Lambda/\Lambda_0)^\nu)$. Das bedeutet, dass die charakteristische Ladung ν und die Gleichgewichtskonstante K_{SMA} aus linearen Elutionsversuchen bei verschiedenen Salzkonzentrationen bestimmt werden können.

Der sterische Faktor σ liefert Informationen über den nichtlinearen Teil der Adsorptionsisotherme und kann unabhängig durch ein so genanntes Frontexperiment unter nicht linearen Bedingungen mittels Säulenchromatographie bestimmt werden [18]. Das Durchbruchvolumen V_B einer Proteinfront kann durch folgenden Ausdruck mit den Konzentrationen des Proteins in der mobilen und stationären Phase in Beziehung gesetzt werden [115].

$$V_B = V_0 \left(1 + \beta \frac{q_p^{(n)}}{c_p^{(n)feed}} \right) \quad (46)$$

Hierbei ist V_0 das Durchbruchvolumen eines Inertstoffes, gleichzusetzen mit dem Totvolumen der Säule, und $c_p^{(n)feed}$ die Feedkonzentration der Proteinlösung. Nach Einsetzen von Gleichung (46) in Gleichung (39) mit $c_p^{(n)} = c_p^{(n)feed}$ und Umstellung erhält man für den sterischen Faktor σ den Ausdruck

$$\sigma = \frac{\beta}{c_p^{(n)feed} \Pi} \left[\Lambda - c_s^{(n)} \left(\frac{\Pi}{\beta K_{SMA}} \right)^{\frac{1}{\nu}} \right] \quad (47)$$

mit

$$\Pi = \left(\frac{V_B}{V_0} - 1 \right) \quad (48)$$

Somit ist es möglich, den sterischen Faktor σ über obige Gleichung direkt aus dem Durchbruchsvolumen des Proteins zu bestimmen. Die Werte der charakteristischen Ladung und der Gleichgewichtskonstanten müssen unabhängig davon aus den zuvor beschriebenen linearen Elutionsversuchen bestimmt werden.

Sind die drei Gleichgewichtsparameter entweder über Anpassung an gemessene Isothermen aus Batch Experimenten oder über den soeben dargelegten Weg bestimmt, kann die SMA-Isotherme bei jeder beliebigen Salzkonzentration bestimmt werden. Dies ist ein Vorteil im Vergleich zur Langmuir Isotherme, bei der die Parameter für jede Salzkonzentration bestimmt werden müssen.

2.4.4 Available Area

Das available area Modell wurde 2004 von Bosma und Wesselingh [15] entwickelt und ist im Gegensatz zum SMA-Modell nicht auf Ionenaustauschprozesse beschränkt, sondern auch in der Lage, andere Adsorptionsprozesse wie beispielsweise hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC) zu beschreiben.

Für die Modellierung werden die Proteine als Scheiben mit einem charakteristischen Radius betrachtet. Die Adsorptionsoberfläche ist flach und hat eine homogen verteilte Bindungsstärke. Die Scheiben sind zufällig auf der Oberfläche verteilt und dürfen nicht überlappen. Das bedeutet, dass die Mittelpunkte der Scheiben mindestens den doppelten Radius voneinander entfernt sein müssen. Dies führt zu drei unterschiedlichen Anteilen der Oberfläche. Die mit Protein beladene Oberflächenbeladung (coverage) χ ist von den Scheiben belegt. Der Anteil der Fläche, in dem durch das Ausschlusskriterium kein weiterer Mittelpunkt liegen darf, ist die nicht verfügbare Fläche (excluded area) φ . Der restliche Anteil der Oberfläche ist die freie, also verfügbare Fläche (available area) α . Die Flächenanteile sind schematisch in Abbildung 4 dargestellt.

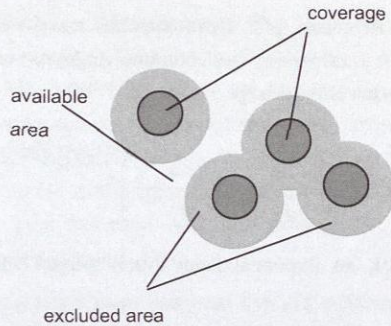


Abbildung 4: Available Area Modell: Anteile auf der Adsorberoberfläche.

Der Ansatz zur Herleitung des Modells ist ähnlich wie bei Langmuir (siehe Abschnitt 2.4.1). Im Gleichgewicht sind die Adsorptions- und die Desorptionsrate identisch. Wie bei Langmuir ist die Desorptionsrate proportional zur Oberflächenbeladung. Die Adsorptionsrate ist proportional zur Flüssigphasenkonzentration und, im Gegensatz zu Langmuir, zur verfügbaren Fläche. Daraus folgt

$$k_{ads} c_p^{(n)} \alpha = k_{des} \chi \quad (49)$$

und somit

$$c_p^{(n)} = \frac{1}{K_{AA}} \frac{\chi}{\alpha} \quad (50)$$

mit

$$K_{AA} = \frac{k_{ads}}{k_{des}} \quad (51)$$

Um die Isotherme zu vervollständigen, wird noch die Herleitung eines Zusammenhangs zwischen der verfügbaren Fläche und der Oberflächenbeladung benötigt. Für geringe Beladungen kann ein exakter Ausdruck analytisch angegeben werden.

$$\alpha = (1 - \chi)^4 \quad (52)$$

Bei höherer Beladung kann durch numerische Simulationen folgender Ausdruck hergeleitet werden [15]

$$\alpha = \left(1 - \frac{\chi}{\chi_{\max}} \right)^{(4+5,5\chi^2)\chi^{\max}} \quad (53)$$

Der Wert der maximalen Beladung χ^{\max} kann ebenfalls numerisch berechnet werden und beträgt 0,5470. Wird dieser Ausdruck in die Isotherme eingesetzt und χ / χ^{\max} ersetzt durch $\frac{\tilde{q}_p^{(n)}}{\tilde{q}_p^{(n)\max}}$ so erhält man nach Umstellung

$$c_p^{(n)} = \frac{1}{K_{AA}} \frac{\tilde{q}_p^{(n)}}{\tilde{q}_p^{(n)\max}} \left(1 - \frac{\tilde{q}_p^{(n)}}{\tilde{q}_p^{(n)\max}} \right)^{-2,2-0,9 \left(\frac{\tilde{q}_p^{(n)}}{\tilde{q}_p^{(n)\max}} \right)^2} \quad (54)$$

Der komplizierte Ausdruck im Exponent kann durch seinen Durchschnittswert von -2,7 approximiert werden.

$$c_p^{(n)} = \frac{1}{K_{AA}} \frac{\tilde{q}_p^{(n)}}{\tilde{q}_p^{(n)\max}} \left(1 - \frac{\tilde{q}_p^{(n)}}{\tilde{q}_p^{(n)\max}} \right)^{-2,7} \quad (55)$$

Dies ist die Adsorptionsisotherme für einen allgemeinen Adsorptionsprozess. Im Falle eines Ionenaustausches führt Bosma ein lokales Mass-Action Modell ein, um die Salzabhängigkeit des Prozesses zu erfassen [15]. Damit ergibt sich folgender Ausdruck für die Isotherme bei Ionenaustauschern:

$$c_p^{(n)} = \frac{1}{K_{AA}} \frac{c_s^{(n)}}{\Lambda} \frac{\tilde{q}_p^{(n)}}{\tilde{q}_p^{(n)\max}} \left(1 - \frac{\tilde{q}_p^{(n)}}{\tilde{q}_p^{(n)\max}} \right)^{-2,7} \quad (56)$$

Diese Isotherme ist äquivalent zur SMA-Isotherme (siehe Abschnitt 2.4.3) jedoch steht im AA-Modell der Exponent 2,7 anstatt ν beim SMA-Modell.

2.5 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die Kalorimetrie ist ein Messverfahren, welches es ermöglicht, Wärme, die bei Prozessen aufgenommen oder abgegeben wird, zu bestimmen. Kalorimetrische Methoden werden oft eingesetzt um thermodynamische Daten von biologischen Systemen zu ermitteln [39]. Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) ist eine der wichtigsten Techniken auf diesem Gebiet. Der Anwendungsbereich der ITC bei biologischen Fragestellungen reicht von der Untersuchung der Protein-Liganden Wechselwirkung beispielsweise beim Drug Design von Wirkstoffen bis hin zu kinetischen Messungen [21]. Der Vorteil der ITC für die vorliegende Arbeit ist die Möglichkeit, die Proteinadsorption direkt über die Messung der Wärme, die beim Adsorptionsprozess frei oder aufgenommen wird, zu detektieren. Es handelt sich um eine schnelle und sehr sensitive Methode um die Enthalpieänderung bei der Adsorption zu ermitteln, ohne den indirekten Weg über van't Hoff Analysen gehen zu müssen [54]. Obwohl die ITC heutzutage in vielen Labors und Anwendungen eingesetzt wird, stellen nach wie vor sowohl die experimentelle Durchführung, als auch die Interpretation der Daten eine große Herausforderung dar.

Es gibt drei unterschiedliche Messprinzipien bei der ITC: Zum einen wird die Temperaturänderung in einem adiabatischen System mit bekannter Wärmekapazität gemessen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Messung der Änderung der Kühl- oder Heizleistung welche nötig ist, um ein System auf konstanter Temperatur zu halten. Das dritte Messprinzip basiert auf der direkten Messung des Wärmeflusses zwischen dem System und einer großen Wärmesenke oder -quelle bei konstanter Temperatur. Dabei werden in der Regel zwei Zellen verwendet, eine Referenz- und eine Probenzelle, die in einem Wasserbad hochgenau temperiert werden können.

Das in dieser Arbeit verwendete Kalorimeter vom Typ ITC 4200 der Firma CSC Calorimetric Sciences Corp. (Lindon, USA) arbeitet nach der dritten Methode und misst also direkt den Wärmefluss. In der Messzelle wird einer der Bindungspartner, beispielsweise ein Adsorber in Pufferlösung, vorgelegt. Über eine Mikroliterspritze wird unter Rühren schrittweise der zweite Bindungspartner (z.B. Protein) zugegeben und die freiwerdende Wärme bei der Adsorption gemessen [54, 69, 90]. Da die Injektion bei konstantem Druck stattfindet, folgt aus dem ersten Hauptsatz der Thermodynamik, dass die gemessene Wärme gleich der Enthalpieänderung ΔH^{exp} ist. Das Ausgangssignal des Kalorimeters ist der Wärmefluss \dot{Q}^{exp} über der Zeit. Um die freiwerdende Wärme bzw. die Enthalpieänderung ΔH^{exp} des Experimentes zu ermitteln, muss das Signal über der Zeit integriert werden:

$$\Delta H^{\text{exp}} = \int \dot{Q}^{\text{exp}}(t) dt \quad (57)$$

Die Enthalpieänderung ΔH^{exp} muss anschließend gegebenenfalls noch korrigiert werden (siehe Kapitel 3.5).

Weiterführende Informationen zur isothermen Titrationskalorimetrie sind in verschiedenen Reviews zu finden [5, 21, 39].

2.6 Statische Laserlichtstreuung

Lichtstreuung beruht auf der Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Materie. Einfallendes Licht wird dann gestreut, wenn die Streupartikel größer sind als etwa 1 nm [3]. Trifft eine elektromagnetische Welle auf ein Teilchen, werden die äußeren Elektronen der Elektronenhülle zum Schwingen angeregt. Liegt die Anregungsfrequenz deutlich über oder unter der Resonanzfrequenz des Teilchens, wird in dem Teilchen ein schwingender Dipol mit der Frequenz des eingestrahnten Lichtes induziert. Durch diesen schwingenden Dipol sendet das Teilchen selbst Strahlung aus. Die Frequenz der vom Teilchen ausgesendeten Strahlung ist mit der Anregungsfrequenz identisch. Die Intensität der Streustrahlung wird durch die zeitliche Änderung des Dipolmoments bestimmt. Dieses ergibt sich aus der Polarisierbarkeit und der elektrischen Feldstärke des eingestrahnten Lichts. Ein detaillierter Einblick in die physikalischen Grundlagen der Lichtstreuung ist bei Huglin [55] sowie Kratochvil [68] zu finden.

Ist der Durchmesser des streuenden Teilchens kleiner als etwa $\lambda/20$ wird von Rayleigh-Streuung gesprochen. Das Teilchen kann als Punkt angesehen werden, es besitzt nur ein Streuzentrum. Das Licht wird in alle Richtungen gleichmäßig gestreut, es ist unabhängig von der Struktur des Streuzentrums.

Bei klassischen (statischen) Laserlichtstreuemessungen wird die zeitlich gemittelte, reduzierte Streuintensität bei einem Winkel θ gemessen. Die reduzierte Streuintensität wird als Rayleigh-Ratio R^θ bezeichnet und ist durch Gleichung (58) definiert.

$$R^\theta = \frac{I_{abs}^\theta r_D^2}{I_0 V} \quad (58)$$

I_0 ist die Intensität der einfallenden Strahlung, I_{abs}^θ die am Detektor gemessene absolute Intensität des Streulichts bei einem Beobachtungswinkel θ , r_D die Distanz vom Streuzentrum zum Detektor und V das Streuvolumen der Probe. Bei bekannter Messzellengeometrie und Intensität des einfallenden Lichts sowie der gemessenen absoluten Streuintensität kann das Rayleigh-Ratio berechnet werden.

In der Praxis ist es schwierig, eine absolute Intensität zu messen. Daher wird zunächst die reduzierte Intensität eines Rayleigh-Streuers mit bekanntem Rayleigh-Ratio gemessen [120]. Mit dieser Messung kann eine Kalibrierkonstante k_{cal}^θ bestimmt werden, die die Messzellengeometrie und konstante Verluste des Streulichts berücksichtigt. Für diese Kalibrierung wird in der Regel Toluol oder Benzol verwendet, da die Rayleigh-Ratios dieser Stoffe sehr gut dokumentiert und die Chemikalien in hoher Reinheit leicht zugänglich sind. Die Kalibrierkonstante wird bei dem Winkel $\theta = 90^\circ$ ermittelt. Mit der Kalibrierkonstanten kann dann das Rayleigh-Ratio einer interessierenden Probe i mittels Gleichung (59) bei einer Messung der Streuintensität I_i^θ bestimmt werden.

$$R_i^\theta = k_{cal}^\theta \cdot I_i^\theta \quad (59)$$

Können mit dem verwendeten Messgerät mehrere verschiedene Winkel gemessen werden, ist es notwendig, diese durch Normalisierungsfaktoren aufeinander abzustimmen. Diese Normalisierungsfaktoren gleichen unter anderem Sensitivitätsabweichungen zwischen den einzelnen Detektoren an den verschiedenen Winkeln aus. Die Normalisierungsfaktoren werden mittels Gleichung (60) bestimmt, indem zuerst ein Rayleigh-Streuer und dann das Lösungsmittel gemessen wird. Bei einem Rayleigh-Streuer RS sollte die Messung winkelunabhängig sein. Die Normalisierungsfaktoren werden auf den Winkel $\theta = 90^\circ$ bezogen.

$$N_{RS}^\theta = \frac{I_{RS}^{90^\circ} - I_{LM}^{90^\circ}}{I_{RS}^\theta - I_{LM}^\theta} \quad (60)$$

Der Winkel $\theta = 90^\circ$ hat folglich immer einen Normalisierungskoeffizienten von $N^{90^\circ} = 1$. Die gemessene Intensität des Streulichts der Komponente i kann durch die Normalisierung

(Gleichung 60) und die Kalibrierung (Gleichung 59) in das Rayleigh-Ratio durch Gleichung (61) umgerechnet werden.

$$R_i^\theta = N_i^\theta \cdot k_{cal} \cdot I_i^\theta \quad (61)$$

Mit der Laserlichtstreuung sollen hier Eigenschaften der gelösten Proteine untersucht werden. Hierzu muss der Betrag des reinen Lösungsmittels zum Streulicht vor der Auswertung eliminiert werden. Dies wird durch die Einführung des Exzess-Rayleigh-Ratios $R_p^{\theta E}$ erreicht

$$R_p^{\theta E} = R_p^\theta - R_{LM}^\theta \quad (62)$$

Für eine verdünnte Lösung kann $R_p^{\theta E}$ nach Zimm [120] durch Gleichung (63) ausgedrückt werden.

$$\frac{Kc_p^{(m)}}{R_p^{\theta E}} = \frac{1}{M_{w,p} P_p^\theta} + 2A_2 c_p^{(m)} + 3A_3 \left(c_p^{(m)}\right)^2 + \dots \quad (63)$$

Hierbei ist $c_p^{(m)}$ die Proteinkonzentration in der Lösung. A_2 und A_3 sind der zweite bzw. dritte osmotische Virialkoeffizient und M_w ist die massengemittelte Molmasse (Gleichung 64) des Proteins. P_p^θ ist der so genannte Strukturfaktor. Dieser beschreibt die Winkelabhängigkeit des Streulichts. Der Strukturfaktor ist vom mittleren Trägheitsradius des Moleküls abhängig, mit ihm kann auf die Größe und Struktur des Moleküls geschlossen werden. Bei Proteinen, welche zu den Rayleigh-Streuern gehören, ist das Streulicht winkelunabhängig und P_p^θ als 1 definiert.

$$M_w = \frac{\sum_i N_i \cdot (M_{w,i})^2}{\sum_i N_i \cdot M_{w,i}} \quad (64)$$

K ist die optische Konstante und ist für vertikal polarisiertes Licht durch Gleichung (65) beschrieben.

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{N_A \lambda_0^4} \quad (65)$$

N_A ist die Avogadro-Zahl, λ_0 ist die Wellenlänge des eingestrahnten Lichts, n_0 ist der Brechungsindex des Lösungsmittels und dn/dc ist das spezifische Brechungsindexinkrement der Proteinlösung.

Das spezifische Brechungsindexinkrement beschreibt wie sich der Brechungsindex der Proteinlösung ändert, wenn sich die Konzentration des gelösten Proteins ändert [55]. Da dieser Parameter in Gleichung (65) und damit in die zentrale Gleichung der Lichtstreuung (Gleichung 63) quadratisch eingeht, hat er einen sehr großen Einfluss auf die Ergebnisse von Laserlichtstreuungen. Das spezifische Brechungsindexinkrement ist durch folgende Gleichung definiert:

$$dn/dc = \lim_{c_p^{(m)} \rightarrow 0} \left(\frac{n_p - n_0}{c_p^{(m)}} \right)_{\lambda_0, T, p} \quad (66)$$

Nach Kratochvil [68] ist dieser Wert bei kleinen Konzentrationen (kleiner als ungefähr 10 g/l) normalerweise konstant.

Im Lösungsmittel zusätzlich zum Protein gelöste Salze haben einen großen Einfluss auf das dn/dc [60]. Weitere Einflüsse auf das spezifische Brechungsindexinkrement sind die Temperatur [100], der Druck [55] sowie die für die Messung verwendete Wellenlänge [32].

Das spezifische Brechungsindexinkrement ist abhängig vom verwendeten Lösungsmittel [11]. Für kleine $c_p^{(m)}$ gilt die Näherung:

$$n_p = n_0 + (dn/dc) c_p^{(m)} \quad (67)$$

wobei n_0 der Brechungsindex des Lösungsmittels ist und dn/dc das Brechungsindexinkrement der Proteinlösung. Der Brechungsindex n_p einer Proteinlösung ist proportional zur Proteinkonzentration $c_p^{(m)}$. Prinzipiell lässt sich das dn/dc mit einem Refraktometer bestimmen, indem der Brechungsindex des Lösungsmittels sowie die Brechungsindizes einer Verdünnungsreihe der Probe in dem Lösungsmittel gemessen werden. Üblicherweise wird das spezifische Brechungsindexinkrement mit einem Differential-Refraktometer bestimmt (siehe Kapitel 3.6).

Gleichung (63) ist die zentrale Gleichung zur Auswertung von statischen Lichtstreuexperimenten [120]. Für die Auswertung von Lichtstreuexperimenten sind Diagramme wichtige Hilfsmittel. Für Rayleigh-Streuer (keine Winkelabhängigkeit des Streulichts, $P_i^\theta = 1$) kann die Auftragung nach Debye [28] verwendet werden (siehe Kapitel 3.6).

Laserlichtstredetektoren lassen sich auf verschiedene Art und Weise betreiben. Die zwei häufigsten Messmethoden werden hier kurz dargestellt. LS-Detektoren lassen sich zum einen als molmassensensitive Detektoren in HPLC-Anlagen verwenden. Unter Verwendung von geeigneten SEC-Säulen bietet sich somit die Möglichkeit, die Molmassenverteilung und die Struktur der Moleküle online zu bestimmen. Dabei werden die verschiedenen Polymerfraktionen der Probe auf den Säulen aufgetrennt und können somit einzeln vermessen werden. Hierbei können auch noch relativ kleine Konzentrationen erfasst werden, die von UV- und RI-Detektoren nicht mehr detektiert werden können [3]. Das ist insbesondere bei der Detektion von Aggregaten in sehr niedrigen Konzentrationen der Fall. Diese können z.B. bei der Herstellung von therapeutischen Proteinen auftreten und zu unbeabsichtigten Nebenwirkungen führen [4].

Die online Laserlichtstremessung zur Bestimmung von Molmassen ist eine Methode, die im Gegensatz zur GPC ohne Kalibrierstandards auskommt. Das ist insbesondere bei teuren Proteinen oder bei nur geringen verfügbaren Mengen ein Vorteil, da eine aufwendige

Kalibrierung nicht nötig ist. Laserlichtstredetektoren arbeiten zudem ohne die Proben zu zerstören, die vermessenen Proteine können weiterhin verwendet werden.

Bei der Laserlichtstremessung im Batch Modus können nur Mittelwerte der Probe und ihrer Zusammensetzung gemessen werden. Problematisch kann dies sein, wenn die Probe eine hohe Polydispersität besitzt und beispielsweise unterschiedliche Aggregatgrößen aufweist [45]. Durch die Kombination von SEC- und Laserlichtstredetektoren kann dieses Problem, wie zuvor beschrieben umgangen werden.

2.7 Osmotische Virialgleichung

Der zweite osmotische Virialkoeffizient A_2 beschreibt die Abweichung eines Fluides vom idealen Verhalten aufgrund von Wechselwirkungen zwischen zwei gelösten Molekülen. Diese setzen sich aus abstoßenden und anziehenden Wechselwirkungen zusammen. Gebildet wird der Parameter bei der Virialentwicklung des osmotischen Drucks Π nach der Massenkonzentration (Gleichung 68). Er entspricht dem zweiten Koeffizienten der Reihenentwicklung.

$$\Pi = RTc_p^{(m)} \left(\frac{1}{M_w} + A_2 c_p^{(m)} + \dots \right) \quad (68)$$

A_2 ist eine experimentell zugängliche Größe, die Aussagen über die Wechselwirkungen zwischen zwei Proteinmolekülen in einer verdünnten Lösung zulässt [77]. In Lösungen mit vorwiegend abstoßenden Wechselwirkungen ist A_2 positiv. Dies bedeutet, dass die Protein-Lösungsmittel Wechselwirkungen gegenüber den Protein-Protein Wechselwirkungen bevorzugt werden. Das Lösungsmittel ist folglich gut geeignet, um das Protein zu lösen. Ist der Wert von A_2 negativ, überwiegen dagegen anziehenden Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen. Die Proteine neigen dazu, zu aggregieren und auszufallen. Das Lösungsmittel ist nicht geeignet, um das Protein in Lösung zu halten.

Von George und Wilson [41] wurde gezeigt, dass mittels A_2 Aussagen über das Verhalten eines Proteins in einer Lösung, insbesondere hinsichtlich der Kristallisation, getroffen werden können. Sie fanden einen Bereich den sie „Cristallisation-Slot“ nannten. Nur in diesem Bereich (leicht negative A_2 -Werte) ist eine Kristallisation von Proteinen möglich. Ist A_2 positiv, stoßen sich die Proteine ab und bleiben gelöst, ist A_2 zu stark negativ, fällt das Protein nur in amorphen Strukturen aus, größere Kristalle werden nicht gebildet.

Quantitativ betrachtet ist der zweite osmotische Virialkoeffizient von der Paarpotentialfunktion $u(r)$ der gelösten Moleküle abhängig [95, 114]. Für radialsymmetrische Potentiale kann A_2 mittels Gleichung (69) berechnet werden. Die Paarpotentialfunktionen insbesondere von komplexen Molekülen wie Proteinen sind meist nur schwer zugänglich.

$$A_2 = -2\pi \frac{N_A}{M_w^2} \int_{r=0}^{\infty} (\exp(-u(r)/kT) - 1) r^2 dr \quad (69)$$

T ist die Temperatur, k die Boltzmann-Konstante und r der Abstand der Moleküle zueinander. Die Paarpotentialfunktion $u(r)$ beschreibt die Wechselwirkungen zwischen zwei Molekülen. Erkenntnisse auf dem Gebiet der Modellierung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen in Lösung wurden beispielsweise von Neal et al. [82] und Asthagiri et al. [8] veröffentlicht. Die Berechnung der zwischenmolekularen Wechselwirkungen ist jedoch sehr schwierig [112], da Proteine meist eine komplexe Struktur und eine ungleichmäßige Ladungsverteilung besitzen. Auf experimentelle Untersuchungen kann nicht verzichtet werden.

Der zweite osmotische Virialkoeffizient ist bei Proteinlösungen vom pH-Wert der Lösung und von der Salzkonzentration im Lösungsmittel abhängig, zusätzlich besteht eine geringe Temperatur- und Druckabhängigkeit.

3 Experimentelle Untersuchungen

3.1 Antikörper

In dieser Arbeit wurden drei monoklonale IgG Antikörper der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG (Biberach) untersucht, zwei humanisierte Antikörper mAb1 und mAb2 und ein Mausantikörper mAb3. Die Reinheiten lagen bei über 99 %. In Tabelle 1 sind weitere physikalische Eigenschaften der Antikörper dargestellt. Die Werte für die isoelektrischen Punkte sind zum einen anhand der Aminosäuresequenz mit dem Programm ProtParam berechnet und zum anderen experimentell über isoelektrische Fokussierung bestimmt [37].

Tabelle 1: Physikalische Eigenschaften der monoklonalen Antikörper.

Antikörper	Molekulargewicht / kDa	Isoelektrischer Punkt (berechnet, ProtParam)	Isoelektrischer Punkt (Isoelektr. Fokussierung)
mAb1	158	8,42	8,1 - 8,8
mAb2	143	8,25	7,8 - 8,2
mAb3	148	6,5	5,5 - 7,5

Die Antikörper unterscheiden sich durch ihre Aminosäuresequenzen, was Auswirkungen auf ihre Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte hat (Tabelle 1). Die Oberflächenladungsverteilungen und Hydrophobizitäten sind ebenfalls verschieden. Die Struktur und die Oberflächenhydrophobizität von mAb1 ist in Abbildung 5a und die von mAb2 in Abbildung 5b dargestellt. Für mAb3 liegt die Aminosäuresequenz nicht vor, weswegen keine Strukturmodelle erstellt werden konnten.

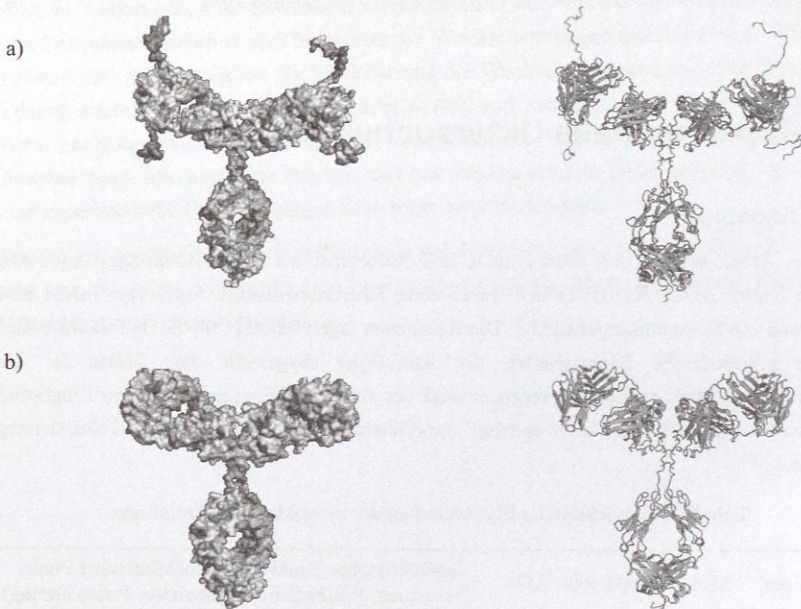


Abbildung 5: Computer Modelle der IgGs. Hydrophobizität (links) und Sekundärstruktur (rechts): a) mAb1 und b) mAb2 [101], links: dunkle Stellen hydrophob.

Die hydrophoben Regionen sind hier dunkel eingefärbt. Bei der Sekundärstruktur sind die α -Helices und β -Faltblattstrukturen zu erkennen.

Um die Antikörper in der gewünschten Konzentration in das jeweilige Puffersystem zu überführen, war eine aufwändige Probenvorbereitung notwendig. Die jeweiligen Schritte waren die Herstellung von Pufferlösungen mit den gewünschten Salzkonzentrationen und pH-Werten, Filtration und Aufkonzentrierung der Antikörper und Dialyse in das jeweilige Puffersystem. Hinzu kam eine ständige Wahrung der Sterilität sowie eine exakte Konzentrationsbestimmungen (siehe Anhang A Analytik).

3.2 Probenvorbereitung

3.2.1 Herstellung der Pufferlösungen

Pufferlösungen sind Gemische einer schwachen Säure und einer schwachen Base, meist der konjugierten Base. Sie sind in der Lage, den pH-Wert bei Zugabe einer sauren oder basischen

Lösung konstant zu halten. In dieser Arbeit wurde als Grundpuffer ein Natrium-Phosphatpuffer verwendet.

Für die Grundpufferlösungen wurden Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) und Natriumdihydrogenphosphat-dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) von der Firma Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe) bezogen. Zur Einstellung der Salzkonzentration wurde Natriumchlorid (NaCl) ebenfalls von der Firma Roth verwendet. Der gewünschte pH-Wert wurde über das Säure-Base-Verhältnis eingestellt (vgl. Anhang B Probenvorbereitung).

Die benötigten Salzmengen wurden an einer Feinwaage abgewogen und in bidestilliertem Wasser gelöst. Danach wurde auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mittels einer pH-Sonde vom Typ HI221 der Firma Hannah Instruments (Ann Arbor, Michigan, USA) kontrolliert und gegebenenfalls mit Phosphorsäure bzw. Natronlauge eingestellt. Zur Kontrolle der Salzkonzentration wurde eine Leitfähigkeitsmessung durchgeführt. Es wurde eine Orion 013610MD Elektrode an einem Orion 3Star Conductivity Benchtop der Thermo Electron Corp. (Waltham, MA, USA) verwendet.

3.2.2 Filtration

Jede zu messende Antikörperlösung wurde mit einem Membranfilter (Firma Whatman, (Schleicher und Schüll, Dassel) mit einer Porengröße von $0,1 \mu\text{m}$ filtriert. Hierdurch wurden ungewollte Aggregate aus der Lösung entfernt. Für die Laserlichtstremessungen war die Filtration der Proben besonders wichtig. Vor dem Einlass in die Messzelle des Lichtstremessgeräts war daher ein weiterer Membranfilter (Firma GE Water + Process Technologies, Trevose, PA) mit einer Porengröße von $0,22 \mu\text{m}$ angebracht, um eventuelle Stäube beziehungsweise Verunreinigungen herauszufiltern. Dieser Filter wurde nach jeder Messung einer Konzentrationsreihe ausgetauscht.

3.2.3 Zentrifugation

Um die Konzentration der Antikörperlösung einzustellen, wurde eine Ultrazentrifugation über einen Membraneinsatz durchgeführt. Als Zentrifugeneinsatz wurden die Zentrifugalkonzentratoren Vivaspin 20 der Firma Sartorius Vivascience GmbH (Göttingen) verwendet, welche mit einer Zwillingsmembran versehen sind. Das Grenzmolekulargewicht der Membranen betrug 100 kDa , so dass die Antikörper von der Membran zurückgehalten wurden. Zentrifugiert wurde bei 3000-facher Erdbeschleunigung und einer Temperatur von 4°C in einer Heraeus Biofuge Hochleistungszentrifuge der Thermo Electron Corp. (Waltham, MA, USA).

3.2.4 Dialyse

Die monoklonalen Antikörper wurden von der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. in einem 100 mmol l^{-1} Glycin-Phosphatpuffer bei pH 6,0 angeliefert. Um die Antikörper

in den Natrium-Phosphatpuffer zu überführen, musste dialysiert werden. Immer wenn das Puffersystem nicht mehr durch Zugabe von Salzen oder Säure beziehungsweise Lauge eingestellt werden konnte, wurde dialysiert.

Die Dialyse wurde in drei Schritten durchgeführt. Bei jedem Schritt wurden 10 ml hochkonzentrierte Antikörperlösung in einem Dialyseschlauch gegen 2 l Stammpuffer mindestens sechs Stunden dialysiert. Dabei wurde der Puffer der Antikörperlösung mit dem neuen Stammpuffer jeweils im Verhältnis 1/200 verdünnt. Bei drei Schritten führt dies zu einer Verdünnungsrate von 1/8000000. Die Dialyse wurde bei 4°C unter ständigem Rühren durchgeführt. Es wurden Nadir-Membranschläuche mit einer mittleren Porengröße von 25-30 Å der Firma Carl Roth GmbH+Co. Kg (Karlsruhe) verwendet. Um Schwermetalle und Sulfide aus den Poren zu entfernen, wurden die Membranschläuche mit einer EDTA-Lösung, bestehend aus 20 g l⁻¹ Natriumdicarbonat und 1 mmol l⁻¹ EDTA, weich gekocht und in fünfzigprozentiger Wasser-Ethanollösung aufbewahrt.

3.3 Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen

Für die Untersuchung und Modellierung der Adsorption der Antikörper wurden Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen mit verschiedenen chromatographischen Trennmaterialien bei unterschiedlichen Bedingungen aufgenommen. Zusätzlich dienten die Adsorptionsisothermen zur Berechnung des Beladungszustandes während der mikrokalorimetrischen Experimente (Kapitel 3.5). Daher wurden die Adsorptionsmessungen und die kalorimetrischen Messungen unter denselben Versuchsbedingungen durchgeführt. Die verwendeten Adsorbentmaterialien und ihre Eigenschaften wie Ionenkapazitäten, d.h. die molaren Konzentrationen an Gegenionen pro Liter sedimentiertem Adsorber sowie die Partikelgrößen sind in Tabelle 2 dargestellt, die Versuchsbedingungen in den Tabellen 3 bis 6. Für die Adsorptionsexperimente wurden drei verschiedene jeweils starke Ionentauscher-Materialien und ein HIC-Adsorber verwendet.

Tabelle 2: Eigenschaften der untersuchten Adsorbentmaterialien.

Adsorber	Typ	Ionenkapazität Λ / mmol l ⁻¹	Partikelgröße / μm
Fractogel EMD SO ₃ ⁻	CEC	88	40 - 90
Fractogel EMD SE Hicap	CEC	73	40 - 90
Toyopearl SP550C	CEC	160	50 - 150
Toyopearl Butyl	HIC	-	50 - 150

Die beiden Kationentauscher Fractogel EMD SO₃⁻ und Fractogel EMD SE Hicap wurden von der Firma Merck KGaA (Darmstadt) bezogen. Diese Trennmaterialien sind gefraufte

Tentakelgele, deren Poren mit einem Acrylamid-Polymer aufgefüllt sind, an dem Spacer mit funktionellen Gruppen angebracht sind. Die beiden Toyopearl Materialien wurden von der Firma Tosoh Bioscience GmbH (Stuttgart) zur Verfügung gestellt. Diese Materialien sind nicht gegraftet und die Spacer sitzen direkt an der Adsorberoberfläche. Alle Materialien haben ein hochporöses Grundgerüst aus Methacrylatpolymer gemeinsam. Die funktionelle Einheit der Ionentauscher ist eine negativ geladene Sulfogruppe. Die Ionentauscher unterscheiden sich jeweils in ihrem Spacer, bei Fractogel EMD SO_3^- handelt es sich um eine Isobutyl-, bei Fractogel EMD SE Hicap um eine Ethyl- und bei Toyopearl SP550C um eine Propylgruppe.

Für die Bestimmung der Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen wurde jeweils 5 mg getrocknetes Adsorbermaterial mit Puffer und Antikörperlösung in einem Gesamtvolumen von 800 μl eingesetzt. Nach einer Inkubation von 3 h unter ständigem Rühren im Mikroreaktionsgefäß bei 25°C wurde die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt (siehe Anhang A Analytik) und die Proteinbeladung des Adsorbers mittels Massenbilanz berechnet. Die Proteinbeladung des Adsorbers ergibt sich aus der Differenz der eingesetzten Proteinmasse und der nach der Bindung noch verbleibenden Proteinmasse im Überstand. Der relative Fehler in der Konzentration bei der Bestimmung der Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen wird auf etwa 10 % geschätzt.

Um die Salzabhängigkeit der Adsorption zu beschreiben, wurden jeweils drei der aufgenommenen Adsorptionsisothermen mit verschiedener Salzkonzentration bei konstantem pH-Wert herangezogen und an die jeweiligen Modelle angepasst. Die unterschiedlichen Salzkonzentrationen im Puffer wurden einerseits durch die Zugabe von NaCl oder durch einen höher konzentrierten Natrium-Phosphatpuffer erreicht. Zu beachten ist hierbei, dass, wenn bei den Modellen von Salzkonzentration $c_s^{(n)}$ die Rede ist, immer die Konzentration an Gegenionen, sprich in diesem Falle Natriumionen, gemeint ist. In einem Natrium-Phosphatpuffer ist jedoch die Natriumkonzentration nicht gleich der Phosphatkonzentration. Die Natriumkonzentration muss über das Verhältnis von Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4 berechnet werden. Eine Liste der Natriumkonzentrationen aller verwendeten Puffer ist im Anhang B zu finden. Die Tabellen 3 bis 6 zeigen eine Übersicht der Versuchsbedingungen aller in dieser Arbeit aufgenommenen Adsorptionsisothermen für die Antikörper mAb1 und mAb2.

Tabelle 3: Übersicht über die Versuchsbedingungen bei der Messung der Adsorptionsisothermen von mAb1 mit CEC-Trennmaterien.

Adsorber	pH-Wert
20 mM Natrium-Phosphatpuffer	
Fractogel EMD SE Hicap	6,5
	7,0
Fractogel EMD SO ₃ ⁻	6,5
	7,0
20 mM Natrium-Acetatpuffer	
Fractogel EMD SO ₃ ⁻	4,5
	6,5

Tabelle 4: Übersicht über die Versuchsbedingungen bei der Messung der Adsorptionsisothermen von mAb2 in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer mit CEC-Trennmaterien.

Adsorber	pH-Wert	c _{NaCl} / mmol l ⁻¹
Fractogel EMD SO ₃ ⁻	4,5	0
	5,5	0
	6,0	0
	6,5	0
	7,0	0
	7,0	10
	7,0	30
	Fractogel EMD SE Hicap	4,5
5,5		0
6,0		0
6,5		0
7,0		0
Toyopearl SP550C	6,0	0
	6,0	30
	6,0	60

Tabelle 5: Übersicht über die Versuchsbedingungen bei der Messung der Adsorptionsisothermen von mAb2 in verschiedenen Puffersystemen mit CEC-Trennmaterien.

Adsorber	pH-Wert	$c_{\text{NaCl}} / \text{mmol l}^{-1}$
50 mM Natrium-Phosphatpuffer		
Fractogel EMD SO_3^-	6,0	0
Fractogel EMD SE Hicap	4,5	0
	6,0	0
80 mM Natrium-Phosphatpuffer		
Fractogel EMD SO_3^-	6,0	0
Fractogel EMD SE Hicap	6,0	0
20 mM Natrium-Acetatpuffer		
Fractogel EMD SO_3^-	4,5	0
	6,5	0

Tabelle 6: Übersicht über die Versuchsbedingungen bei der Messung der Adsorptionsisothermen von mAb2 in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer mit HIC-Trennmaterien.

Adsorber	pH-Wert	$c_{\text{NaCl}} / \text{mol l}^{-1}$
Fractogel Butyl	6,5	1,2
		2,0
Fractogel Butyl	6,5	$c_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} / \text{mol l}^{-1}$
		0,6
		0,8
Fractogel Butyl	6,5	$c_{\text{K-Citrat}} / \text{mol l}^{-1}$ $c_{\text{NaCl}} / \text{mol l}^{-1}$
		0,2 2,0

In Kapitel 4 werden die Ergebnisse der Adsorptionsisothermen graphisch dargestellt und diskutiert. Bei den CEC-Trennmaterien wurden sowohl die pH-Abhängigkeit als auch die Salzabhängigkeit untersucht, während für die HIC-Trennmaterien unterschiedliche

Salzarten und Salzkonzentrationen betrachtet wurden. Im Anhang C sind die Ergebnisse tabellarisch zusammengefasst.

3.4 SMA-Parameter aus Säulenchromatographie

Die drei Parameter des SMA-Modells ν , σ und K_{SMA} wurden, wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, mittels Säulenchromatographie bestimmt. Hierzu wurde zum einen ein HPLC-Gerät vom Typ Finnigan Spectra Systems 4000 HPLC der Thermo Electron Corp. (Waltham, MA, USA) verwendet und zum anderen eine Chromatographieranlage vom Typ Äkta Purifier der Firma Amersham Biosciences (Piscataway, NY, USA). Als Chromatographiesäule diente eine mit Fractogel EMD SO_3^- gepackte 3 ml Säule.

Für die Bestimmung der charakteristischen Ladung ν und der Gleichgewichtskonstanten K_{SMA} wurden Proteinpulsexperimente im linearen Bereich der Isotherme an der HPLC durchgeführt und mit konstantem Fluss eluiert. Es wurde jeweils die Retentionszeit bei mindestens drei unterschiedlichen Salzkonzentrationen gemessen.

Die Bestimmung des sterischen Faktors σ erfolgte am Äkta Purifier. Hierbei wurde ein Proteinfrontexperiment mit konstanter Flussrate durchgeführt und das Durchbruchvolumen der Antikörperprobe gemessen. Die Antikörperkonzentration muss hier im nichtlinearen Bereich der Isotherme liegen. Die Versuchsbedingungen sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Als Salzkonzentrationen für die drei Proteinpulsexperimente wurden 10 mM, 20 mM und 30 mM Natriumchlorid gewählt.

Tabelle 7: Versuchsbedingungen der Säulenchromatographie-Läufe.

Antikörper	Konzentration g l ⁻¹	Puffer	c _{NaCl} mmol l ⁻¹	Elution	Flussrate ml min ⁻¹
mAb2	1,9	20 mM Natrium-	10	1 M NaCl	1,0
		Phosphat,	20		
		pH 7,0	30		

Die experimentellen Ergebnisse werden in Kapitel 4.2 dargestellt und diskutiert.

3.5 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die mikrokolorimetrischen Messungen wurden mit dem isothermen Titrationskalorimeter ITC 4200 der Firma CSC durchgeführt (Calorimetry Science Corporation, Lindon, NY, USA). Das ITC 4200 misst den Wärmefluss zwischen dem betrachteten System und einem

großen thermostatisierten Wärmebad bei konstanter Temperatur. Für eine bessere Stabilität und Auflösung werden zwei Zellen, eine Messzelle und eine Referenzzelle, verwendet. Beide Zellen sind herausnehmbar, was bei der Reinigung einen großen Vorteil darstellt. Als Wärmeflussdetektoren dienen Halbleiter Thermolemente.

Für die ITC Experimente wurde die Messzelle jeweils mit 5 mg getrocknetem Adsorber befüllt, 800 μl des jeweiligen Puffers zugegeben und bei 430 μm gerührt. Nach Erreichen des thermischen Gleichgewichts wurde die zuvor in einem Exikator unter Vakuum entgaste Antikörperlösung schrittweise über eine motorgesteuerte Hamilton-Spritze injiziert. Es wurden jeweils 25 Injektionen mit je 10 μl Lösung in einem Intervall von 10 Minuten durchgeführt. Diese Zeitspanne reichte aus, um nach jeder Injektion wieder die Basislinie zu erreichen. Die Temperatur betrug 25°C innerhalb einer Genauigkeit von 0,01°C. Das Ausgangssignal des Kalorimeters wurde als Wärmefluss $\dot{Q}^{\text{exp}} / \mu\text{Watt}$ über der Zeit aufgenommen. Zur Kalibrierung des Messsignals ist ein elektrisches Heizelement im Kalorimeter integriert. Um die freierwerdende Wärme bzw. die Enthalpieänderung ΔH^{exp} des Experiments zu ermitteln, wurde das Signal über der Zeit integriert.

Während der kalorimetrischen Experimente wird auch dann ein geringes Signal detektiert, wenn die Lösung, welche zudosiert wird, identisch ist mit der Lösung in der Messzelle. Dieses Signal wird durch Reibung während der Injektion, den unterschiedlichen Füllmengen der Zellen und minimalen Temperaturabweichungen verursacht. Dieser Beitrag wurde in Blank Experimenten bestimmt und die experimentellen Ergebnisse entsprechend korrigiert.

Bei den durchgeführten ITC Experimenten gibt es unterschiedliche Beiträge zur gemessenen Enthalpieänderung ΔH^{exp} des Experimentes. Sie wird nicht nur durch die Adsorption der Antikörper (ΔH_p^{ads}), sondern auch durch die Adsorption von Pufferionen (ΔH_s^{ads}), der Verdünnung der injizierten, hoch konzentrierten Antikörperlösung in der Messzelle (ΔH_p^{mix}) und dem entsprechen Effekt der Pufferionen ΔH_s^{mix} verursacht:

$$\Delta H^{\text{exp}} = \Delta H_p^{\text{ads}} + \Delta H_p^{\text{mix}} + \Delta H_s^{\text{ads}} + \Delta H_s^{\text{mix}} \quad (70)$$

Um die gesuchte Adsorptionsenthalpie der Antikörper ΔH_p^{ads} aus ΔH^{exp} zu berechnen, müssen die anderen Beiträge in weiteren Blank Experimenten ermittelt werden. Diese wurden unter exakt denselben Bedingungen wie das Antikörper-Adsorptionsexperiment durchgeführt.

Um ΔH_s^{mix} und ΔH_s^{ads} zu bestimmen, wurde das Experiment ohne Antikörper durchgeführt. In einem weiteren Blank Experiment ohne Adsorbermaterial, in dem Antikörperlösung in reine Pufferlösung injiziert wurde, konnte die Verdünnungsenthalpie des Proteins ΔH_p^{mix} gemessen werden. Jedes dieser Blank Experimente bestand aus einem kompletten Set von 25 Injektionen. Die Beiträge von ΔH_p^{mix} und ΔH_s^{ads} sind oft gering und können meist vernachlässigt werden.

Als Beispiel für ein Adsorptionsexperiment zeigt Abbildung 6 die Rohdaten des isothermen Titrationskalorimeters für die Adsorption von mAb2 an Fractogel EMD SE Hicap bei pH 6,5

in einem 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei 25°C. Es sind alle 25 Injektionen mit jeweils 10 μl Antikörperlösung dargestellt

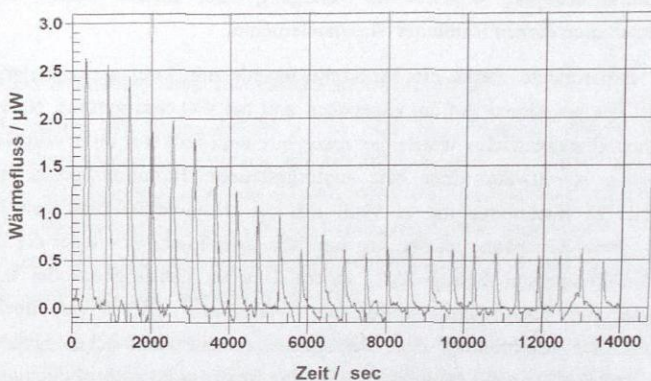


Abbildung 6: Rohdaten für ein ITC Experiment der Adsorption von mAb2 an Fractogel EMD SE Hicap in einem 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei pH 6,5 und 25°C.

Die erste Injektion der Antikörperlösung in die Messzelle verursacht einen maximalen gemessenen Wärmefluss von 2,6 μW , was einer Enthalpieänderung ΔH^{exp} von -250 μJ entspricht (siehe Abbildung 7). Positive Peaks stellen beim ITC 4200 exotherme Effekte dar, da Wärme freigesetzt wird. Der Verlauf des Experimentes soll anhand der entsprechenden Enthalpieänderungen in Abbildung 7 erläutert werden. Hier sind die einzelnen Beiträge der Enthalpieänderungen während des Adsorptionsexperimentes aus Abbildung 6 dargestellt. Es sind die Enthalpieänderungen des gemessenen Gesamtexperimentes ΔH^{exp} , der Beitrag des Protein Blank Experimentes ΔH_p^{mix} sowie die berechnete und mithilfe der Blank Experimente korrigierte Adsorptionsenthalpie des Antikörpers ΔH_p^{ads} zu sehen.

ΔH^{exp} ändert sich von anfänglich -250 μJ auf ca. -50 μJ , ab Injektion Nr. 12 wird ein Plateau erreicht. ΔH_p^{mix} zeigt eine lineare Änderung von -45 μJ auf -25 μJ . ΔH_s^{mix} und ΔH_s^{ads} können hier vernachlässigt werden. Das berechnete ΔH_p^{ads} zeigt denselben Verlauf wie ΔH^{exp} , jedoch müssen die Beiträge der Blank Experimente abgezogen werden, in diesem Fall nur ΔH_p^{mix} . Die nötige Korrektur betrug hier knapp 20 %. Der Beitrag der Korrektur kann jedoch bis zu 50 % betragen, je nach Puffersystem und dem Verhalten der Antikörper und Salzionen.

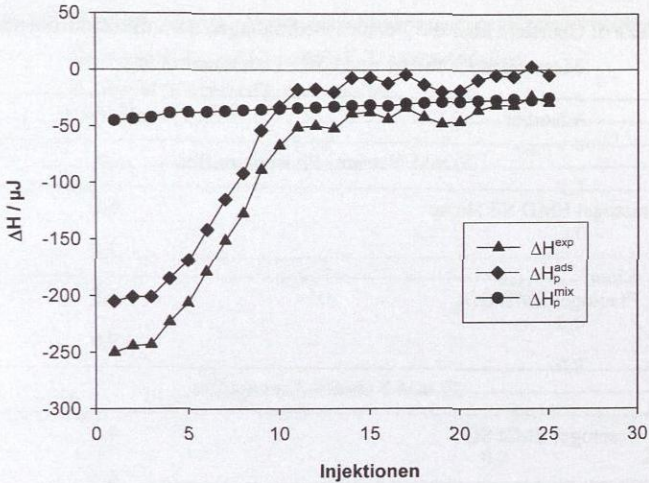


Abbildung 7: Enthalpieänderungen beim Adsorptionsexperiment aus Abbildung 6: Messwerte ΔH^{exp} , Beitrag des Antikörper Blank Experimentes ΔH_p^{mix} und die berechnete Adsorptionenthalpie des Antikörpers ΔH_p^{ads} .

Die absolute Adsorptionenthalpie ΔH_p^{ads} ist wenig aussagekräftig. Viel interessanter ist die Adsorptionenthalpie bezogen auf die Masse des jeweils adsorbierten Proteins, d.h. die spezifische Adsorptionenthalpie Δh_p^{ads} mit

$$\Delta h_p^{\text{ads}} = \frac{\Delta H_p^{\text{ads}}}{\Delta m_p^{\text{ads}}} \quad (71)$$

Die Menge des pro Injektion adsorbierten Proteins im kalorimetrischen Experiment wurde über den in Kapitel 2.4.2 beschriebenen Langmuir-Freundlich Fit der Adsorptionsisothermen mittels Massenbilanz berechnet.

Die Tabellen 8 bis 10 zeigen für die Antikörper mAb1 und mAb2 eine Übersicht der Versuchsbedingungen der in dieser Arbeit durchgeführten mikrokalorimetrischen Messungen.

Tabelle 8: Übersicht über die Versuchsbedingungen der mikrokalorimetrischen Messungen für mAb1 und CEC-Trennmaterien.

Adsorber	pH-Wert
20 mM Natrium-Phosphatpuffer	
Fractogel EMD SE Hicap	6,5
	7,0
Fractogel EMD SO ₃ ⁻	6,5
	7,0
20 mM Natrium-Acetatpuffer	
Fractogel EMD SO ₃ ⁻	4,5
	6,5

Tabelle 9: Übersicht über die Versuchsbedingungen der mikrokalorimetrischen Messungen für mAb2 und CEC-Trennmaterien.

Adsorber	pH-Wert
20 mM Natrium-Phosphatpuffer	
Fractogel EMD SE Hicap	4,5
	5,5
	6,5
	7,0
Fractogel EMD SO ₃ ⁻	4,5
	5,5
	6,5
	7,0
20 mM Natrium-Acetatpuffer	
Fractogel EMD SO ₃ ⁻	4,5
	6,5

Tabelle 10: Übersicht über die Versuchsbedingungen der mikrokalorimetrischen Messungen für mAb2 und HIC-Trennmaterien in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer.

Adsorber	pH-Wert	$c_{\text{NaCl}} / \text{mol l}^{-1}$
Fractogel Butyl	6,5	1,2
		2,0
Fractogel Butyl	6,5	$c_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} / \text{mol l}^{-1}$
		0,6
		0,8
Fractogel Butyl	6,5	$c_{\text{K-Citrat}} / \text{mol l}^{-1}$
		0,2
		$c_{\text{NaCl}} / \text{mol l}^{-1}$
		2,0

In Kapitel 4 werden die Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Messungen graphisch dargestellt und diskutiert. Bei den CEC-Trennmaterien wurde die pH-Abhängigkeit untersucht, während für die HIC-Trennmaterien unterschiedliche Salzarten und Salzkonzentrationen betrachtet wurden.

3.6 Statische Laserlichtstreuung

3.6.1 Offline SLS-Batch-Modus

In dieser Arbeit wurde zur Bestimmung der massengemittelten Molmasse M_w und des zweiten osmotischen Virialkoeffizienten A_2 die statische Laserlichtstreuung eingesetzt. Die experimentelle Bestimmung der Parameter erfolgte über zwei unterschiedliche Methoden: Die Laserlichtstreuung im offline Batch-Modus sowie die online HPLC-SEC-Methode mit einem integrierten Laserlichtstreu-Detektor (online SLS-SEC-Modus).

Als Detektor wurde in beiden Fällen das SLD 7000 Laserlichtstreu-Photometer von Brookhaven Instruments Corp. (Holtville, NY, USA) mit einem 35 mW vertikal polarisiertem Laser bei einer festen Wellenlänge von 635 nm verwendet. Der Detektor besitzt sieben Streuwinkel (35°, 50°, 75°, 90°, 105°, 130° und 145°). Alle Messungen wurden bei 25°C durchgeführt.

Für die SLS im Batch-Modus wurde die Streuintensität der Antikörper in Abhängigkeit der jeweiligen Proteinkonzentration gemessen. Für jedes Experiment wurden zehn Proben mit Proteinkonzentrationen zwischen 1,0 g l⁻¹ und 3,5 g l⁻¹ angesetzt und mit einem 0,1 µm Whatman Filter (Schleicher und Schüll, Dassel) vor der Messung filtriert. Die Proben, jeweils Dreifach-Bestimmungen, wurden mit einer Spritzenpumpe KDS 200 (Ismatec GmbH,

Wertheim-Mondfeld) bei einer Flussrate von $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ in die Messzelle des Detektors gepumpt. Die jeweiligen Streuintensitäten I_p^θ wurden über die Kalibrierkonstante k_{cal}^θ und einen Normalisierungsfaktor N_i^θ für jeden Winkel in das entsprechende Rayleigh-Ratio R_p^θ umgerechnet. Die Kalibriersubstanz war Toluol mit einem bekannten Rayleigh-Ratio $R_{Tol}^\theta = 11.83 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$ bei 635 nm. Die sieben Winkel wurden mit Pullulan (PSS Polymer, Mainz) als Rayleigh Streuer normalisiert. Das Exzess-Rayleigh-Ratio $R_p^{\theta E}$ (vgl. Formel (62) aus Kapitel 2.6) jeder Probe wurde durch Subtrahieren des Rayleigh-Ratios des reinen Lösungsmittels R_{LM}^θ von dem Rayleigh-Ratio des Lösungsmittels mit dem gelösten Antikörper R_p^θ berechnet.

Die zentrale Formel zur Auswertung der SLS-Messungen lautet, wie in Kapitel 2.6 beschrieben:

$$\frac{Kc_p^{(m)}}{R_p^{\theta E}} = \frac{1}{M_{w,p} P_p^\theta} + 2A_2 c_p^{(m)} \quad (72)$$

Zur Auswertung der SLS-Daten aus den Batch-Messungen wurde basierend auf Formel (72) ein Debye Plot [28] konstruiert. Bei diesem Diagramm wird auf der Abszisse die Proteinkonzentration $c_p^{(m)}$ der Probe aufgetragen und auf der Ordinate $K \cdot c_p^{(m)} / R_p^{\theta E}$ (siehe Abbildung 8a).

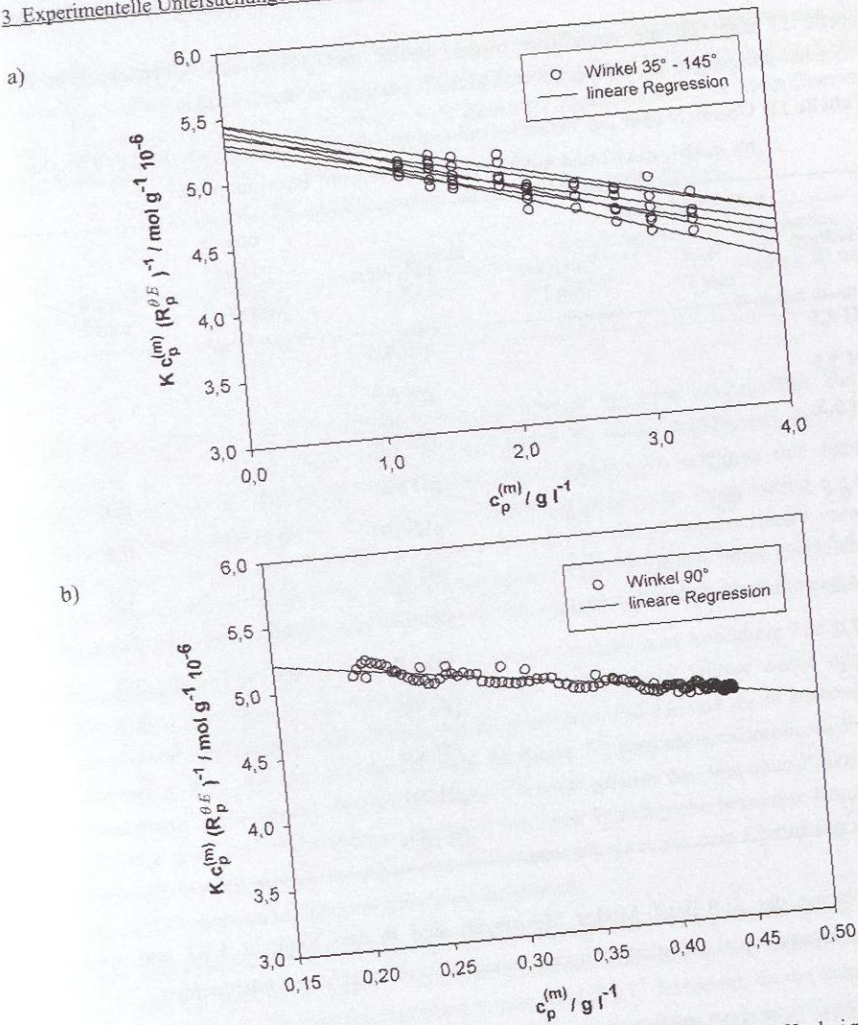


Abbildung 8: Debye Plot von mAb3 in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei pH 6,0
 a) SLS-Messungen im Batch-Modus mit sechs Winkeln (50° - 145°)
 b) Online SLS-SEC-Messung (nur der 90° Winkel ist abgebildet).

An die Messpunkte kann eine Gerade angepasst werden. Gemäß Gleichung (72) entspricht der Achsenabschnitt der Geraden dem Kehrwert der massengemittelten Molmasse M_w , und die Steigung dem doppelten Wert des zweiten osmotischen Virialkoeffizienten A_2 der Antikörper in der Lösung.

Tabelle 11 zeigt für die Antikörper mAb1, mAb2 und mAb3 eine Übersicht über die Versuchsbedingungen der durchgeführten SLS Messungen im Batch Modus.

Tabelle 11: Übersicht über die Versuchsbedingungen der SLS-Messungen im Batch Modus für mAb1, mAb2 und mAb3 in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer.

mAb1 und mAb2			mAb3		
pH-Wert	c_{NaCl} mol l ⁻¹	$c_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$ mol l ⁻¹	pH-Wert	c_{NaCl} mol l ⁻¹	$c_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$ mol l ⁻¹
pH 4,5	-	-	pH 4,5	-	-
pH 5,5	-	-	pH 5,5	-	-
pH 6,5	-	-	pH 6,0	-	-
pH 6,5	0,2	0,5	pH 6,0	0,1	0,1
pH 6,5	0,4	1,0	pH 6,0	0,2	0,5
pH 6,5	0,6	1,5	pH 6,0	0,4	1,0
pH 6,5	0,8	2,0	pH 6,0	0,6	1,5
pH 7,0	-	-	pH 6,0	0,8	2,0
pH 7,5	-	-	pH 7,0	-	-
pH 8,0	-	-	pH 8,0	-	-
pH 9,0	-	-	pH 9,0	-	-
pH 10,0	-	-	pH 10,0	-	-

Die Ergebnisse der SLS-Batch-Modus Messungen sind in den Kapiteln 4.4.1 und 4.4.2 graphisch dargestellt und diskutiert sowie im Anhang C tabellarisch zusammengefasst.

3.6.2 Online SLS-SEC-Modus

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Matlab (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) basiertes Auswerteprogramm entwickelt, um auch aus online SLS-SEC-Messungen den A_2 der Antikörperlösungen zu ermitteln. Dies war mit der kommerziell erhältlichen Software bislang nicht möglich. Das entwickelte Programm ermöglicht es, aus einer einzigen Injektion in die HPLC mit nur einer Proteinkonzentration aus dem Chromatogramm der SEC-Säulen unterschiedliche Proteinkonzentrationen zu berechnen und den jeweiligen Streuintensitäten zuzuordnen. Dies ist möglich, da sich die Proteinprobe auf den SEC-Säulen auftrennt und so ein Peak entsteht, der an den Flanken andere Konzentrationen aufweist als am Peakmaximum.

Für die online SLS-SEC-Messungen wurden zwei analytische Proteema Säulen und eine Proteema Vorsäule der Firma PSS Polymer Standard Service GmbH (Mainz) an eine Agilent HPLC Workstation HP 1100 Serie (Agilent, Waldbronn) angeschlossen. Die Spezifikationen der Säulen sind in Tabelle 12 zu finden.

Tabelle 12: Spezifikationen der verwendeten SEC-Säulen.

Name	Funktion	Porosität	Partikelgröße	Abmessung
Proteema	Vorsäule	300 Å	5 µm	8 mm x 50 mm
	Trennsäule	300 Å	5 µm	8 mm x 50 mm

Die Trennung wurde bei einer Flussrate von $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ bei 25°C durchgeführt. Ein UV-Detektor und ein RI-Detektor (beide Agilent HP 1100 Serie, Waldbronn) dienen zum Aufzeichnen des Proteinsignals. Die Laserlichtstreu-Messungen erfolgten mit dem oben beschriebenen Detektor SLD 7000. Die Proteinkonzentration jeder Probe betrug 6 g l^{-1} und zur Injektion wurde ein manuelles Rheodyne Ventil mit 100 µl Probenschleife verwendet. Vor jeder Injektion wurden die Proben mit einem $0,1 \text{ µm}$ Whatman Filter (Schleicher und Schüll, Dassel) filtriert. Auch hier erfolgten die Messungen in Dreifach-Bestimmungen.

Das so erhaltene Chromatogramm des UV- und Laser-Detektors in Abbildung 9 zeigt die UV-Absorption bei 280 nm und das Streusignal des 90° Winkels. Dieses wurde nun weiter ausgewertet, um daraus einen Debye-Plot zu generieren und M_w und A_2 zu berechnen (siehe Abbildung 8b). Der für die Berechnung benötigte Proteinkonzentrationsbereich und die zugehörige Streuintensität wurden aus dem Chromatogramm des Monomer-Peaks ermittelt (Abbildung 9). Der UV-Detektor war zuvor mit einer Proteinprobe bekannter Konzentration kalibriert worden, um so die injizierten Probenkonzentration aus dem Chromatogramm über die UV-Absorption bei 280 nm berechnen zu können.

Alle Datenpunkte der Streuintensität mit einer berechneten Proteinkonzentration, die größer war als ein definiertes Limit, wurden umgerechnet zum Exzess-Rayleigh-Ratio R_p^{RE} . Die untere Grenze der Proteinkonzentration wurde auf $0,2 \text{ g l}^{-1}$ festgelegt, da die Schwankungen der Streuintensität bei noch kleineren Proteinkonzentrationen zu hohen Ungenauigkeiten führen. Für die Umrechnung der Intensität auf R_p^{RE} wurde die Lösungsmittelintensität, ermittelt über die Baseline des Readers abgezogen und dieselbe Kalibrierkonstante verwendet, wie im Batch- Modus.

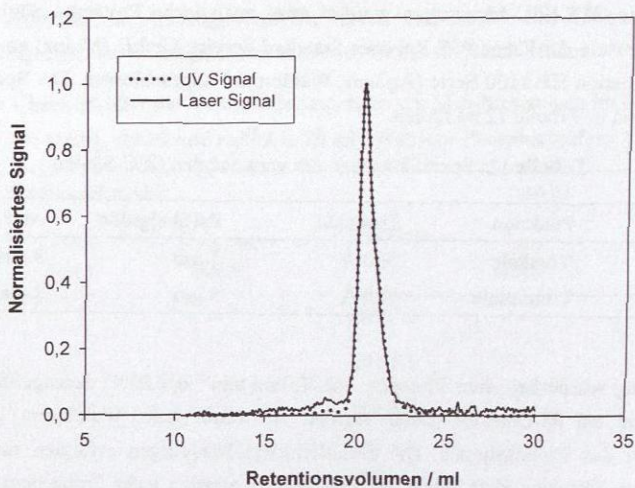


Abbildung 9: Chromatogramm für mAb2 eluiert von Proteoma SEC-Säulen in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei pH 8,0 und 25°C.

Die Messungen im online SLS-SEC-Modus wurden nur für Antikörper mAb3 durchgeführt. Tabelle 13 zeigt eine Übersicht über die Versuchsbedingungen der online SLS-SEC-Messungen.

Tabelle 13: Übersicht über die Versuchsbedingungen der online SLS-SEC-Messungen für mAb3 in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer.

pH-Wert	$c_{\text{NaCl}} / \text{mol l}^{-1}$	$c_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} / \text{mol l}^{-1}$
pH 4,5	-	-
pH 5,5	-	-
pH 6,0	-	-
pH 6,0	0,1	0,1
pH 6,0	0,2	0,5
pH 6,0	0,4	1,0
pH 6,0	0,6	1,5
pH 6,0	0,8	2,0
pH 7,0	-	-
pH 8,0	-	-
pH 9,0	-	-
pH 10,0	-	-

Die Ergebnisse der Messungen im online SLS-SEC-Modus sind in Kapiteln 4.4.3 tabellarisch zusammengefasst und werden dort mit den Ergebnissen des offline SLS-Batch-Modus verglichen.

3.6.3 Bestimmung des Brechungsindexinkrements

Da das dn/dc einer Proteinlösung stark vom Lösungsmittel abhängt und signifikanten Einfluss auf die optische Konstante K besitzt (siehe Gleichung 72), wurde es für jedes Antikörper-Puffersystem separat bestimmt. In dieser Arbeit wurde dn/dc über eine Batch-Messung des Brechungsindex n_p mit einem Abbe Refraktometer RG 701 (Optotechnik Schneider, Bad Kreuznach) bei 25°C bestimmt. Das dn/dc wurde hierbei durch Auftragen des Brechungsindex n_p über der jeweiligen Antikörperkonzentration $c_p^{(m)}$ für alle Protein-Puffersysteme wie in Kapitel 2.6 beschrieben berechnet. Mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode lässt sich dn/dc nur mit einer Genauigkeit von ca. 10 % ermitteln, da bei hohen Salzkonzentrationen die Auflösungsgrenze des Abbe Refraktometers erreicht wird. Eine mögliche systematische Fehlerquelle bei der Messung besteht darin, dass die Wellenlänge des Lichts bei der dn/dc Messung (Tageslichtspektrum) nicht mit der des Streuexperimentes ($\lambda = 635 \text{ nm}$) übereinstimmt. Ein Differentialrefraktometer mit variabler Lichtwellenlänge

stand zum Zeitpunkt der Durchführung der Untersuchungen nicht zur Verfügung. Ein Beispiel für die Bestimmung des dn/dc über ein Abbe Refraktometer für Antikörper mAb2 in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei pH 6,5 mit 0,6 M Ammonium-Sulfat ist in Abbildung 10 zu sehen.

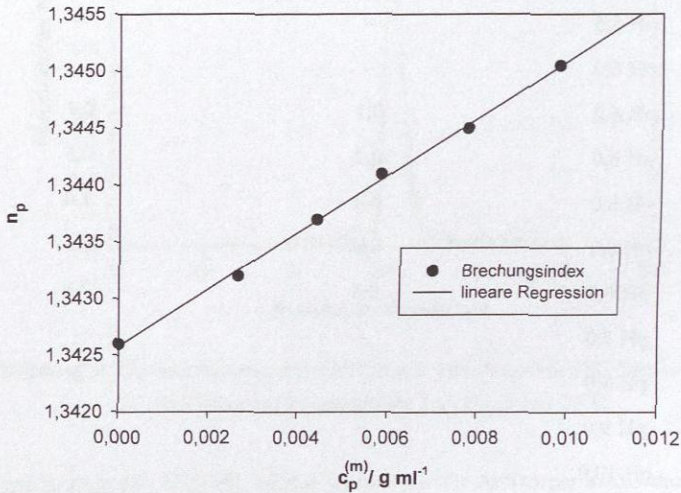


Abbildung 10: Bestimmung von dn/dc über lineare Regression für mAb2 in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei pH 6,5 mit 0,6 M Ammonium-Sulfat.

In Abbildung 11 ist die Abhängigkeit des so ermittelten dn/dc von der Ammonium-Sulfatkonzentration für die drei Antikörper mAb1, mAb2 und mAb3 abgebildet. Die kompletten dn/dc -Werte aller im Rahmen dieser Arbeit vermessenen Protein-Puffersysteme sind im Anhang C zu finden.

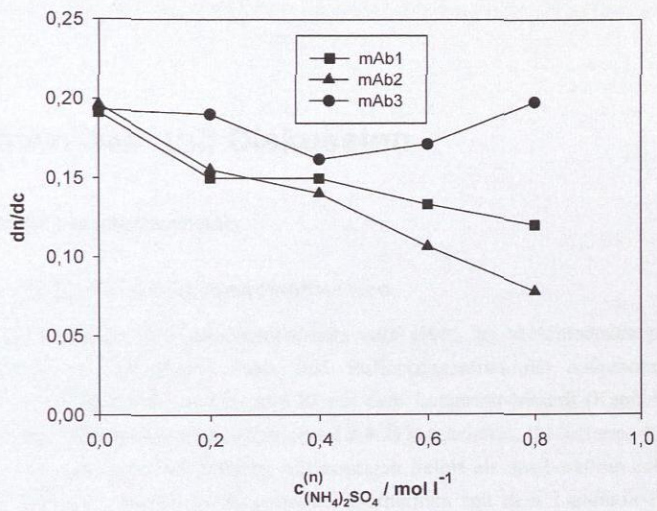
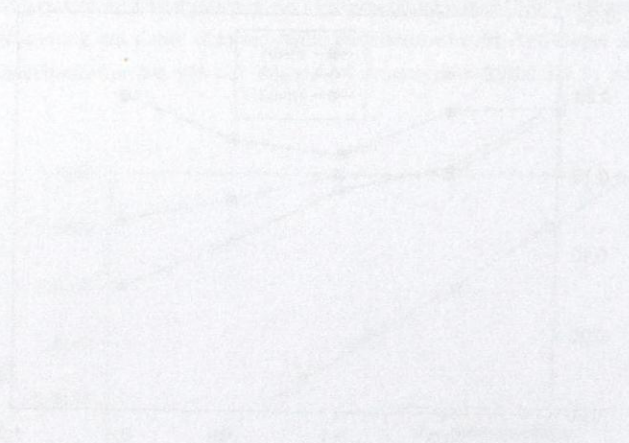


Abbildung 11: Spezifisches Brechungsindexinkrement von mAb1, mAb2 und mAb3 in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei pH 6,5 und 25°C in Abhängigkeit der Ammonium- Sulfatkonzentration.



The graph illustrates the relationship between the two variables over time. The upper series shows a slight dip followed by a rise, while the lower series shows a consistent upward trend. This suggests that the lower variable is more stable and predictable, while the upper variable is more volatile.

The data points for the upper series are approximately: (1, 90), (2, 85), (3, 80), (4, 85). The data points for the lower series are approximately: (1, 10), (2, 20), (3, 30), (4, 40).

The overall trend indicates that the lower variable is increasing at a constant rate, while the upper variable is fluctuating around a high value.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Adsorptionsisothermen

4.1.1 Korrelation der Adsorptionsisothermen

In dieser Arbeit wurden Adsorptionsisothermen zum einen bei verschiedenen pH-Werten, zum anderen bei verschiedenen Salz- und Pufferkonzentrationen aufgenommen (vgl. Kapitel 3.3). Die Isothermen wurden sowohl mit dem Langmuir-Modell (Kapitel 2.4.1) als auch dem Langmuir-Freundlich-Modell (Kapitel 2.4.2) beschrieben. Da letzteres durch seinen *zusätzlichen Fit-Parameter a oft bessere Anpassungen liefert als das herkömmliche Modell*, sind alle im Kapitel 4 graphisch dargestellten Isothermen mit dem Langmuir-Freundlich-Modell gefittet. Beim Fit der experimentellen Daten war die Zielfunktion die Summe der absoluten Fehlerquadrate der Proteinbeladungen des Adsorbers. Als Korrelationskoeffizient bzw. Gütemaß des Fits wurde der NRMSD-Koeffizient verwendet (normalized root mean square deviation).

$$NRMSD = \frac{\sqrt{\frac{1}{n} \sum (q_p^{(m)ex} - q_p^{(m)fit})^2}}{q_p^{(m)max}} \quad (73)$$

wobei n für die Anzahl der Messpunkte steht und $q_p^{(m)}$ die jeweilig experimentell ermittelte, maximale oder gefittete Proteinbeladung des Adsorbers ist.

Ein Vergleich der beiden Modelle für CEC-Trennmaterien ist in Tabelle 14 (mAb1), und Tabelle 15 (mAb2) sowie in Tabelle 16 (mAb2) für HIC-Trennmaterien dargestellt. Das Langmuir-Freundlich-Modell weist durchgehend kleinere Werte für NRMSD auf, was auf eine bessere Anpassung hindeutet. Neben dem Korrelationskoeffizienten NRMSD sind zusätzlich die jeweiligen Fit Parameter beider Modelle angegeben. Die Diskussion der Isothermen erfolgt in den nächsten Kapiteln anhand der graphischen Darstellungen.

Die Salzabhängigkeit bei der Proteinadsorption an CEC-Trennmaterien kann sowohl vom SMA-Modell (Kapitel 2.4.3) als auch vom available area Modell (Kapitel 2.4.4) beschrieben werden. Die experimentell ermittelten Isothermen wurden mit den beiden Modellen über eine nichtlineare least-squares Methode in dem Programm Matlab (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) angepasst. Um beim Fitten ein von der Salzkonzentration unabhängiges Set der drei Parameter der Modelle zu erhalten, wurden jeweils drei Isothermen bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen herangezogen.

Tabelle 14: Parameter des Langmuir und des Langmuir-Freundlich-Modells für mAb1 und CEC-Trennmaterien bei 25°C.

Fractogel	pH-Wert	Langmuir-Freundlich				Langmuir			
		K_a l g ⁻¹	$q_p^{(m) \max}$ mg g ⁻¹	a	NRMSD	K_a l g ⁻¹	$q_p^{(m) \max}$ mg g ⁻¹	K_{eq}	NRMSD
20 mM Natrium-Phosphat									
SE Hicap	6,5	7176,4	813,2	-1,28	0,079	43,8	843,8	6153,3	0,110
	7,0	65,1	688,1	-0,22	0,050	26,9	705,2	3166,3	0,051
EMD SO ₃ ⁻	6,5	1483,0	763,4	-0,68	0,113	79,4	779,2	10667	0,112
	7,0	82,7	674,1	-0,23	0,052	33,0	687,3	3911,3	0,054
20 mM Natrium-Acetat									
EMD SO ₃ ⁻	4,5	10,3	620,9	0,16	0,119	16,9	605,8	1764,4	0,120
	6,5	968,2	812,7	-0,85	0,109	35,0	834,0	5087,9	0,127

Tabelle 15: Parameter des Langmuir und des Langmuir-Freundlich-Modells für mAb2 und CEC-Trennmaterien bei 25°C.

Fractogel	pH-Wert	Langmuir-Freundlich				Langmuir			
		K_a l g ⁻¹	$q_p^{(m) \max}$ mg g ⁻¹	a	NRMSD	K_a l g ⁻¹	$q_p^{(m) \max}$ mg g ⁻¹	K_{eq}	NRMSD
20 mM Natrium-Phosphat									
SE Hicap	4,5	31,3	754,4	-0,06	0,123	25,2	760,2	3187,6	0,123
	5,5	304,5	828,3	-0,20	0,061	111,1	835,9	15480,0	0,063
	6,5	12,5	712,6	0,46	0,045	136,8	668,4	15239,5	0,066
	7,0	1,4	753,3	0,18	0,057	1,3	750,9	168,5	0,066
EMD SO ₃ ⁻	4,5	5,8	783,9	0,51	0,046	83,7	673,7	9726,8	0,081
	5,5	21,7	792,2	0,33	0,052	117,4	762,7	15433,5	0,060
	6,5	213,9	619,6	-0,38	0,050	42,0	633,3	4587,0	0,058
	7,0	2,6	440,7	0,11	0,022	3,4	421,9	245,8	0,025
20 mM Natrium-Acetat									
EMD SO ₃ ⁻	4,5	38,4	576,2	-0,11	0,084	21,6	588,9	2199,5	0,081
	6,5	205,6	697,3	-0,57	0,071	25,4	723,1	3168,5	0,074

Tabelle 16: Parameter des Langmuir und des Langmuir-Freundlich-Modells für mAb2 und Toyopearl Butyl (HIC-Trennmateriale) bei 25°C.

c_{Salz} mol l ⁻¹	pH- Wert	Langmuir-Freundlich				Langmuir			
		K_a l g ⁻¹	$q_p^{(m)\text{max}}$ mg g ⁻¹	a	NRMSD	K_a l g ⁻¹	$q_p^{(m)\text{max}}$ mg g ⁻¹	K_{eg}	NRMSD
20 mM Natrium-Phosphat + NaCl									
1,2	6,5	4,9	123,4	0,53	0,025	60,5	105,4	1159,5	0,077
2,0	6,5	9,3	163,6	0,67	0,095	49,1	153,3	1368,2	0,105
20 mM Natrium-Phosphat + Ammonium-Sulfat									
0,6	6,5	7,1	138,8	0,52	0,056	91,9	125,5	2098,7	0,091
0,8	6,5	1,9	245,3	0,37	0,055	97,3	177,5	3138,8	0,113
0,2 M K-Citrat + NaCl									
2,0	6,5	10,91	263,3	2,90	0,069	94,8	257,0	3767,5	0,086

4.1.2 pH-Abhängigkeit bei Kationentauschern

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Adsorptionsisothermen der CEC-Trennmateriale bei verschiedenen pH-Werten graphisch dargestellt und diskutiert.

Die Adsorptionsisothermen für mAb1 in Natrium-Phosphatpuffer sind in Abbildung 12, und die für mAb2 in dem selben Puffersystem in Abbildung 13 gezeigt. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse für beide Antikörper in einem Natrium-Acetatpuffer. Die Messungen mit Natrium-Phosphatpuffer wurden für Fractogel EMD SE Hicap und Fractogel EMD SO₃⁻ durchgeführt, die für den Natrium-Acetatpuffer nur mit Fractogel EMD SO₃⁻. In allen Fällen wurde der pH-Wert variiert. Allgemein ist zu sagen, dass die Isothermen eine annähernd rechteckige Form aufweisen und vom Langmuir-Freundlich-Modell sehr gut beschrieben werden. Die Isothermen in Abbildung 12 zeigen, dass für denselben Antikörper, Puffer und pH-Wert nur geringe Abweichungen zwischen beiden Fractogelen bestehen. Offenbar ist der Einfluss der beiden unterschiedlichen Spacer (vgl. Kapitel 3.3), an denen die funktionelle SO₃⁻ Gruppe gebunden ist, nur gering.

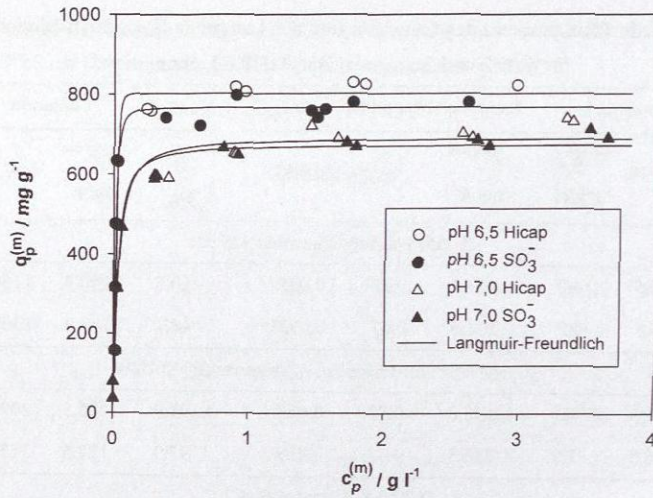


Abbildung 12: Adsorptionsisothermen von mAb1 in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei 25°C: Korrelation mit dem Langmuir-Freundlich-Modell (Linien) und experimentelle Daten (Symbole).

Ein Vergleich der Ergebnisse in Abbildung 12 (mAb1) und Abbildung 13a, b (mAb2) zeigt, dass für denselben pH-Wert die Kapazitäten der Adsorbentmaterialien für mAb1 um etwa 25 % größer sind als die von mAb2.

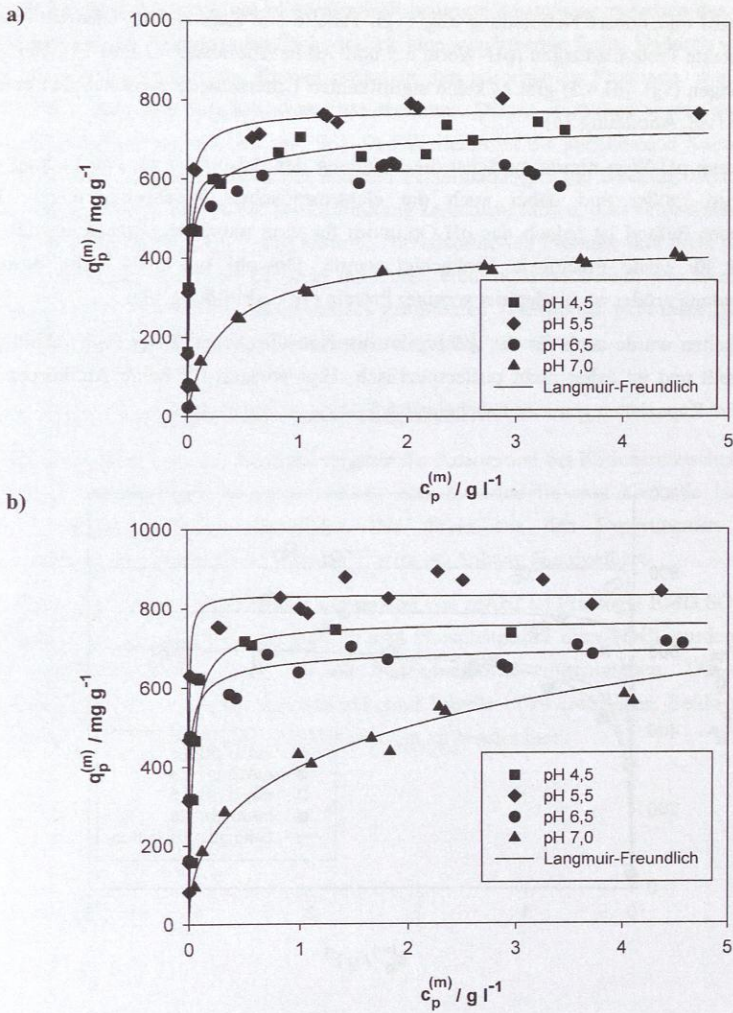


Abbildung 13: Adsorptionsisothermen von mAb2 in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei 25°C: Korrelation mit dem Langmuir-Freundlich-Modell (Linien) und experimentelle Daten (Symbole): a) Fractogel EMD SO_3^- und b) Fractogel EMD SE Hicap.

Die höhere Kapazität für mAb1 kann durch Ladungseffekte erklärt werden, da der isoelektrische Punkt von mAb1 größer ist als der von mAb2, sodass bei einem gegebenen

pH-Wert mAb1 eine höhere Nettoladung trägt (vgl. Tabelle 1 in Kapitel 3.1). Dies gilt jedoch nur für moderate Proteinladungen (pH-Werte 6,5 und 7,0 in Abbildung 12 und 13). Bei sehr hohen Ladungen (vgl. pH 4,5) gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Antikörpern (vgl. Abbildung 14).

Mit geringerem pH-Wert nimmt zunächst die Beladung des Adsorbers zu. Die Ladung des Proteins wird größer und daher auch die elektrostatischen Wechselwirkungen. Ein überraschender Befund ist jedoch das pH-Optimum für eine maximale Bindekapazität bei pH 5,5, das für beide Fractogele beobachtet wurde. Obwohl bei pH 4,5 die positive Antikörperladung größer ist, bindet hier weniger Protein (vgl. Abbildung 13).

Dieses Verhalten wurde auch für die Adsorption im Natrium-Acetatpuffer (vgl. Abbildung 14) festgestellt und ist daher nicht pufferspezifisch. Hier wurden für beide Antikörper bei pH 6,5 höhere Kapazitäten gemessen als bei pH 4,5.

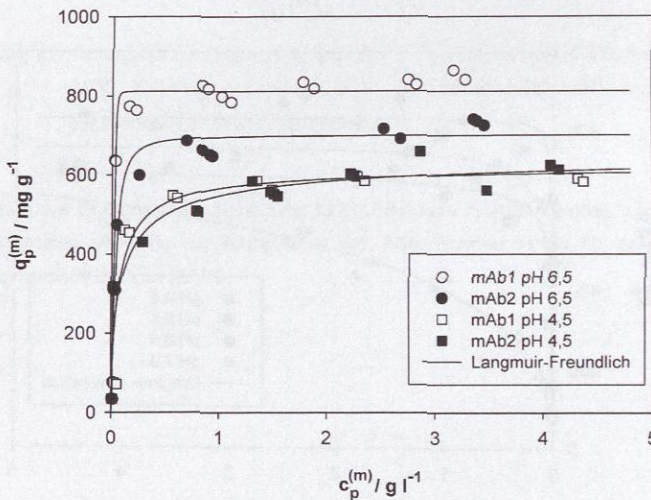


Abbildung 14: Adsorptionsisothermen von mAb1 und mAb2 an Fractogel EMD SO_3^- in 20 mM Natrium-Acetatpuffer bei 25°C. Korrelation mit dem Langmuir-Freundlich-Modell (Linien) und experimentelle Daten (Symbole).

Da bei Ionentauschern bislang der Adsorptionsmechanismus hauptsächlich auf elektrostatische Wechselwirkungen bzw. ionische Wechselwirkungen zurückgeführt wurde, ist ein pH-Optimum für eine maximale Adsorberbeladung zunächst überraschend. Aufgrund der höheren positiven Nettoladung bei geringen pH-Werten müssten bei diesen Bedingungen die Proteine eigentlich stärker binden. Bei hohen Proteinladungen, wie es bei geringen pH-

Werten der Fall ist, spielt die elektrostatisch bedingte Abstoßung zwischen den gebundenen Proteinen auf der Adsorberoberfläche jedoch eine zunehmende Rolle. Dadurch verschlechtert sich die Zugänglichkeit des Raums zwischen den adsorbierten Proteinen, was letztendlich dazu führt, dass die Beladungskapazität abnimmt. Dieses Verhalten wurde auch schon in anderen Arbeiten beschrieben [84, 96]. Des Weiteren ist die abnehmende Kapazität auf die Tatsache zurückzuführen, dass bei höheren Proteinladungen die Bindung zwischen Protein und Adsorber stärker ist. Diese starke Bindung kann dazu führen, dass es zu einem Blockieren von kleineren und engeren Poren kommt. Die adsorbierten Proteine sind nicht mehr flexibel genug um weitere Proteine tiefer in die Poren eindringen zu lassen, was dazu führt, dass Bindungsplätze weiter innen aufgrund des gehinderten Transportes nicht mehr zur Verfügung stehen und dadurch die Kapazität verringert wird [49].

4.1.3 Salzabhängigkeit bei Kationentauschern

In diesem Kapitel wird die Salzabhängigkeit der Adsorption bei Kationentauschern diskutiert. Aufgrund der zugrunde liegenden SMA- und AA-Modelle sind hier alle Isothermen in molaren Konzentrationen abgebildet. Die direkt aus den Experimenten bestimmten massenbezogenen Werte für $c_p^{(m)}$ und $q_p^{(m)}$ sind im Anhang C aufgeführt.

Abbildung 15 zeigt Isothermen der Adsorption von mAb2 an Fractogel EMD SO_3^- bei einem pH-Wert von 7,0 und 25°C . Zu dem 20 mM Phosphatpuffer ohne NaCl wurden Isothermen mit zusätzlich 10 mM bzw. 30 mM Natriumchlorid aufgenommen. Die berechneten Parameter des SMA- und des AA-Modells sind Tabelle 17 zu entnehmen. Beide Modelle sind in der Lage, die experimentellen Daten sehr gut zu beschreiben.

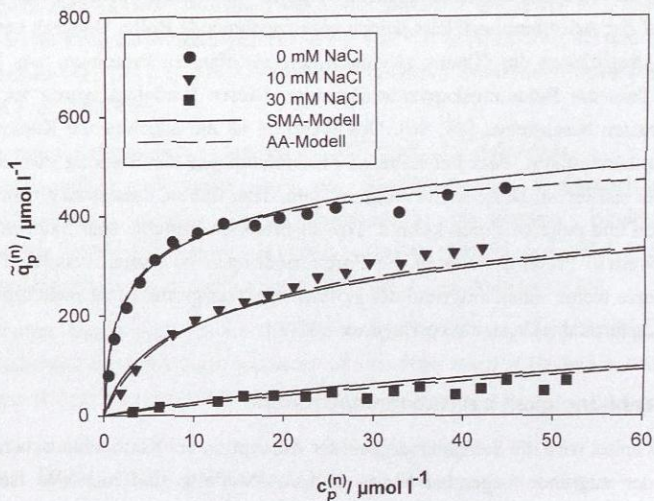


Abbildung 15: Adsorptionsisothermen von mAb2 an Fractogel EMD SO_3^- in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei pH 7,0 und 25°C: Korrelation mit dem SMA- bzw. AA-Modell (Linien) und experimentelle Daten (Symbole).

Tabelle 17: Parameter des SMA- und AA-Modells für mAb2 in Natrium-Phosphatpuffer bei 25°C.

Fractogel	pH	Salz	Steric-Mass-Action-Modell			available area Modell		
			K_{SMA}	σ	ν	K_{AA} $l \mu\text{mol}^{-1}$	$\tilde{q}_p^{(n) \max}$ $\mu\text{mol} \cdot l^{-1}$	ν
EMD SO_3^-	7,0	NaCl	0,2	65,8	7,6	0,26	0,624	7,5
	6,0	NaPO_4	32,1	70,6	5,4	20,8	0,904	5,3
SE Hicap	6,0	NaPO_4	47,4	47,6	5,4	30,3	1,043	5,3
	4,5	NaPO_4	$4 \cdot 10^4$	81,7	4,3	-	-	-
SP550C	6,0	NaCl	0,1	257,5	7,0	0,2	0,447	6,4

Bei einem pH-Wert von 7,0 ist der Antikörper schon nahe an seinem isoelektrischen Punkt. Die positive Nettoladung ist daher sehr gering. Die maximale Beladung des starken Kationentauschers Fractogel EMD SO_3^- ist selbst bei einer niedrigen Salzkonzentration ohne Zugabe von NaCl mit ca. $400 \mu\text{mol} \cdot l^{-1}$ gering. Bei niedrigeren pH-Werten kann eine

maximale Beladung von über $800 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ erreicht werden (vgl. Abbildung 16 für pH 6,0). Bei pH 7,0 belegen ebenfalls die niedrigen Gleichgewichtskonstanten der beiden Modelle von ca. 0,2 eine schwächere Adsorption (siehe Tabelle 17). Eine niedrige Gleichgewichtskonstante bedeutet, dass das Gleichgewicht eher auf der desorbierten Seite liegt, eine hohe Gleichgewichtskonstante zeigt an, dass das Gleichgewicht auf der adsorbierten Seite liegt. Das zeigt, dass der schwach geladene Antikörper hier nur bedingt in der Lage ist, die Salz-Gegenionen zu verdrängen. Ein ν von 7,6 bedeutet hierbei, dass ca. acht positive Ladungen des Antikörpers mit acht funktionellen Gruppen des Adsorbers wechselwirken und die entsprechende Anzahl an Gegenionen verdrängen. Ein σ von 65,8 wiederum gibt an, dass ca. 66 Gegenionen bei der Bindung des Antikörpers an den Adsorber sterisch gehindert werden. Die Adsorption von mAb2 an Fractogel EMD SE Hicap und Fractogel EMD SO_3^- mit unterschiedlichen Natrium-Phosphatkonzentrationen bei 25°C und pH 6,0 kann anhand von Abbildung 16 und Abbildung 17 verglichen werden.

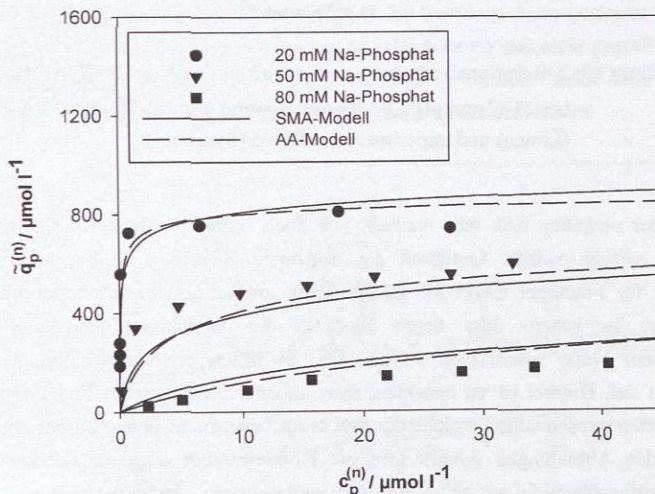


Abbildung 16: Adsorptionsisothermen von mAb2 an Fractogel EMD SO_3^- bei 25°C und pH 6,0: Korrelation mit dem SMA- bzw. AA-Modell (Linien) und experimentelle Daten (Symbole).

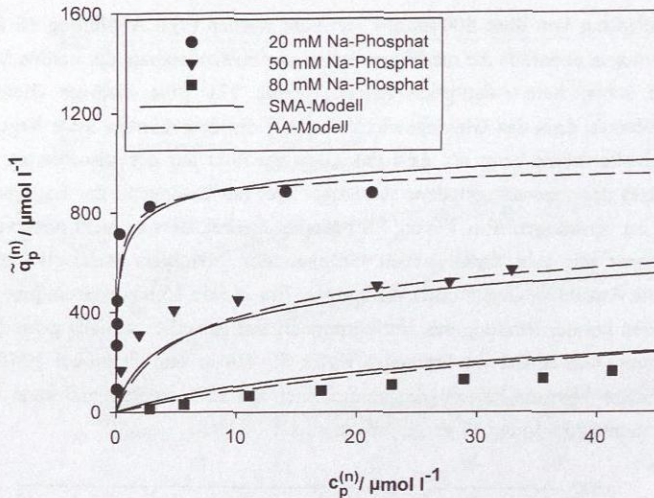


Abbildung 17: Adsorptionsisothermen von mAb2 an Fractogel EMD SE Hicap bei 25°C und pH 6,0 : Korrelation mit dem SMA- bzw. AA-Modell (Linien) und experimentelle Daten (Symbole).

Beide Adsorber verhalten sich sehr ähnlich, wie auch schon in Kapitel 4.1.2 bei der pH-Abhängigkeit gezeigt wurde. Lediglich die maximale Beladung ist bei niedriger Salzkonzentration für Fractogel EMD SE Hicap etwas größer als für Fractogel EMD SO_3^- . Allerdings ist zu sehen, dass beide Modelle die Salzabhängigkeit nur noch in eingeschränktem Maße beschreiben können und es treten erste Abweichungen bei der Anpassbarkeit auf. Hierbei ist zu beachten, dass anhand der gezeigten Fits keine Aussage darüber getroffen werden sollte, welche der drei Isothermen nicht genau beschrieben werden kann. In beiden Abbildungen scheint dies die Isotherme bei mittlerer Salzkonzentration gerade im Anfangsbereich zu sein. Bei der nichtlinearen Anpassung kann über eine Fehlgewichtung das Modell an je zwei Isothermen sehr gut angepasst werden, was jedoch das Ergebnis der dritten Isotherme verschlechtert. Alle hier gezeigten Fits sind ohne Fehlgewichtung mit dem geringsten absoluten Fehler angepasst worden, um Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Wenn nun also eine Isotherme nicht mehr gut anpassbar ist, kann nur eine Aussage über die Anwendbarkeit des gesamten Modells getroffen werden und weniger über eine bestimmte Salzkonzentration.

Aus Tabelle 17 ist zu entnehmen, dass die Gleichgewichtskonstante K_{SMA} für Fractogel EMD SE Hicap mit 47,4 etwas größer ist, als die von Fractogel EMD SO_3^- mit 32,1. Dies spricht wiederum für eine bevorzugte Adsorption. Die Werte für die charakteristische Ladung bzw. Anzahl der Bindungsstellen ν sind gleich, da ja auch der pH-Wert konstant ist. Die Tatsache,

dass bei Fractogel EMD SO_3^- der sterische Faktor σ größer ist, kann zum einen mit der höheren Ionenkapazität des Adsorbers erklärt werden (vgl. Tabelle 2). Ist die Ionenkapazität größer, so können bei einer Bindung auch mehr Ionen vom Protein sterisch gehindert und verdeckt werden. Eine weitere Erklärung hierfür sind die unterschiedlichen Spacer beider Fractogele, welche aufgrund ihrer chemischen Struktur zu verschiedenen räumlichen Anordnungen der Proteine auf der Oberfläche führen können und somit unterschiedlich viele Gegenionen verdeckt werden.

Abbildung 18 zeigt Isothermen für Toyopearl SP550C bei einem pH-Wert von 6,0 und 25°C. Bei der Variation der Salzkonzentration wurde zusätzlich zum 20 mM Natrium-Phosphatpuffer 30 mM bzw. 60 mM Natriumchlorid zugegeben. Beide Modelle beschreiben die Isothermen im Rahmen der Messgenauigkeit in weiten Teilen gut. Hier hat jedoch das SMA-Modell einen kleinen Vorteil gegenüber dem AA-Modell.

Die Gleichgewichtskonstante für SP550C zeigt bei pH 6,0 und der damit verbundenen höheren Nettoladung des Antikörpers als bei pH 7,0 trotzdem einen geringen Wert von 0,1. (vgl. Tabelle 17). Dies ist hier auf den insgesamt schwächeren und nicht gegrifteten Adsorber SP550C zurückzuführen. Der sehr hohe sterische Faktor σ kann mit der höheren Ionenkapazität Λ von Toyopearl SP550C (vgl. Tabelle 2) erklärt werden.



Abbildung 18: Adsorptionsisothermen von mAb2 an Toyopearl SP550C in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei pH 6,0 und 25°C: Korrelation mit dem SMA- bzw. AA-Modell (Linien) und experimentelle Daten (Symbole).

Die bisherigen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Anwendbarkeit beider Modelle mit zunehmender Ladung der Antikörper, also abnehmendem pH-Wert, schlechter wird. Beim Vergleich mit den Isothermen von mAb2 an Fractogel Hicap bei einem pH-Wert von 4,5, die in Abbildung 19 gezeigt sind, zeigt sich zunächst ein anderes Bild. Die Anpassbarkeit scheint hier sehr gut zu sein. Die Unterschiede in den Salzkonzentrationen sind hier jedoch so gering, dass bei der sehr starken Wechselwirkung die Salzhängigkeit kaum eine Rolle spielt. Der Anschaulichkeit halber wurde hier auf die Darstellung des AA-Modells verzichtet. Der sehr hohe Wert für K_{SMA} in Tabelle 17 zeigt, dass bei diesem pH-Wert und der damit sehr hohen Nettoladung des Antikörpers das Gleichgewicht extrem auf der adsorbierten Seite liegt und daher die Isothermen für alle Salzkonzentrationen im Anfangsbereich sehr steil sind.

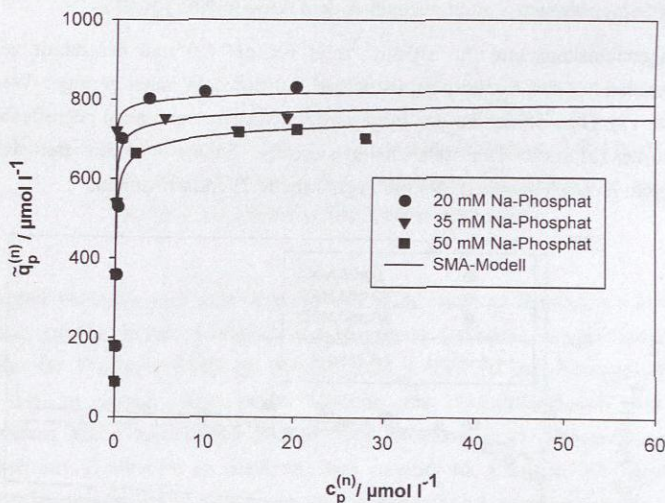


Abbildung 19: Adsorptionsisothermen von mAb2 an Fractogel EMD SE Hicap bei pH 4,5 und 25°C: Korrelation mit dem SMA- bzw. AA-Modell (Linien) und experimentelle Daten (Symbole).

Auffällig in Tabelle 17 ist, dass für niedrigere pH-Werte insgesamt die Werte für ν abnehmen. Dies ist auf den ersten Blick überraschend, da mit geringerem pH die Nettoladung des Proteins eigentlich zunimmt. ν beschreibt jedoch nicht die Nettoladung, sondern die Anzahl der Ladungen, die tatsächlich an der Bindung teilnehmen und Gegenionen verdrängen. Wenn ν abnimmt, kann das auch an einer Konformationsänderung des Antikörpers bei der Bindung bzw. einer Umorientierung auf der Oberfläche liegen.

Darauf deuten auch die in Tabelle 17 angegebenen sterischen Faktoren σ hin. Am Beispiel von mAb2 an Fractogel EMD SE Hicap bei pH 6,0 und pH 4,5 ist zu sehen, dass der sterische

Faktor bei pH 4,5 mit 81,7 nahezu doppelt so groß ist wie bei pH 6,0. Dies könnte durch die größere Abstoßung der Proteine auf der Oberfläche oder durch eine Konformationsänderung des Antikörpers erklärt werden. Die Abstoßung der Proteine auf der Adsorberoberfläche bei geringerem pH-Wert und die dadurch verursachte geringere Beladung wurde auch schon in Kapitel 4.1.2 beschrieben. Der sterische Faktor ist ein Maß für die vom Antikörper am Austausch gehinderten Gegenionen. Dies können nicht nur vom Antikörper verdeckte Ionen sein, sondern auch die Ionen, die sich zwischen den sich abstoßenden Antikörpern befinden. Bei einer Umfaltung des Antikörpers ändert sich ebenfalls die Zahl der abgeschirmten Ionen.

Auch die später in Kapitel 4.3 diskutierten kalorimetrischen Experimente deuten auf unterschiedlichen Konformationen und Orientierungen bei der Antikörperadsorption hin.

Die beiden hier vorgestellten Modelle wurden bislang nur für kleinere Proteine bzw. Aminosäuren verwendet. Die Anwendbarkeit für größere Moleküle, wie etwa die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, stellt eine große Herausforderung dar. Aus den Adsorptionsisothermen ist der Schluss zu ziehen, dass beide Modelle die Salzabhängigkeit der Adsorption monoklonaler Antikörper an Kationentauschern für einen gewissen Bereich von Salzkonzentrationen gut bis sehr gut beschreiben können. Die Breite dieses Bereichs nimmt jedoch mit höherer Proteinladung stark ab. Bei pH-Werten nahe des isoelektrischen Punktes (vgl. Abbildung 15 bei pH 7,0) ist die Anpassbarkeit hervorragend, während schon bei einem pH-Wert von 6,0 erste Abweichungen zu sehen sind (Abbildung 16 und 17). Als Gründe hierfür sind Wechselwirkungen in der Proteinlösung zu nennen, die die Modelle in ihren Annahmen nicht berücksichtigen. Insbesondere wird in den Modellen die Ionenwolke um den Antikörper nicht berücksichtigt. Diese Ionenwolke, welche die Antikörper umgibt, muss bei der Adsorption verdrängt werden. Je nach pH-Wert, Salzart und Konzentration hat dies einen mehr oder weniger großen Einfluss.

Zum anderen wird bei beiden Modellen die Adsorberoberfläche als homogen betrachtet und keine Interaktionen der Proteine berücksichtigt. Dies ist jedoch wie zuvor beschrieben vor allem bei niedrigen pH-Werten und hoher Proteinladung nicht mehr der Fall. Die stark positiv geladenen Proteine stoßen sich auch auf der Oberfläche ab oder hindern einander daran, in die Poren des Adsorbers einzudringen [31, 49, 96].

Weiterhin werden auch Konformationsänderungen des Antikörpers bei unterschiedlichen pH-Werten und Salzkonzentrationen sowie die Aggregation der Proteine nicht berücksichtigt. Allgemein ist daher zuzusagen, dass bei extremeren Bedingungen, also pH-Werten entfernt vom pI, und höheren Salzkonzentrationen zahlreiche Wechselwirkungen auftreten, welche von den hier verwendeten Modellen nicht mehr richtig beschrieben werden können. Das erst kürzlich vorgestellte AA-Modell zeigt in den durchgeführten Experimenten keinerlei nennenswerte Vorteile gegenüber dem zwölf Jahre älteren SMA-Modell. Auch für die Zukunft scheint angesichts der Komplexität und der Vielzahl an Prozessparametern und Wechselwirkungen beim Adsorptionsvorgang die Modellierung eine große Herausforderung darzustellen und

eine rein analytische Beschreibung auf der Basis grober Modellvorstellungen nur schwer möglich. Dennoch ist es mit diesen Adsorptionsstudien und einfachen Modellen gelungen, einen Einblick in die komplizierten Adsorptionsmechanismen zu erhalten, um eine Grundlage für weiterführende Modellierung zu schaffen. Computersimulationen könnten eine Möglichkeit bieten, um auch komplizierte Wechselwirkungen quantitativ berücksichtigen zu können. Entscheidend für ein Vorankommen ist jedoch ein grundlegendes Verständnis des Adsorptionsprozesses.

4.1.4 HIC Adsorptionsisothermen

In diesem Kapitel werden die aufgenommenen Adsorptionsisothermen des HIC-Adsorbens Toyopearl Butyl vorgestellt und diskutiert. Die Adsorptionsisothermen in Abbildung 20 wurden mit dem Langmuir-Freundlich-Modell angepasst und zeigen, dass die Bindekapazitäten bei der HIC deutlich geringer sind als die der Kationentauscher. Die Bindekapazitäten sind stark von der Salzkonzentration abhängig. Eine Erhöhung der Salzkonzentration beispielsweise von $1,2 \text{ mol l}^{-1}$ auf $2,0 \text{ mol l}^{-1}$ führt zu einer Kapazitätssteigerung von ca. 50 %. Hierbei ist jedoch immer die Löslichkeitsgrenze des Proteins bei hohen Salzkonzentrationen zu beachten.

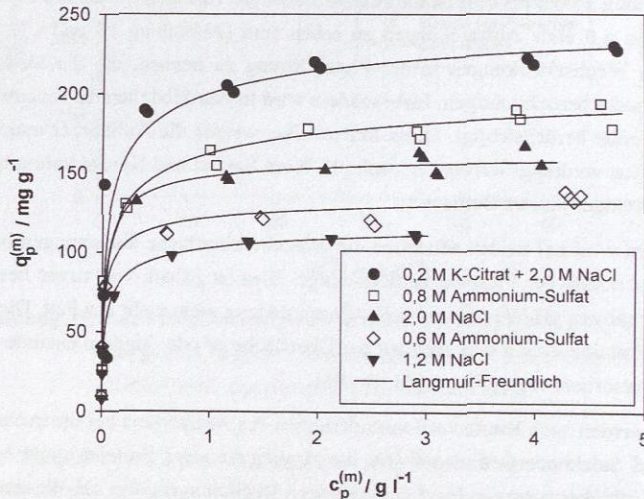


Abbildung 20: Adsorptionsisothermen von mAb2 an Toyopearl Butyl in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei pH 6,5 und 25°C.

Ein entscheidender Parameter für die Bindekapazität bei der Adsorption an HIC-Trennmaterialien ist die Salzart und deren Einordnung in die so genannte Hofmeisterreihe [52]. Die Hofmeisterreihe (vgl. Tabelle 18) ist eine Reihe von Anionen und Kationen, geordnet nach deren Eigenschaft Protein auszufällen.

Tabelle 18: Auszug aus der Hofmeisterreihe einiger Anionen und Kationen [1].

← Zunehmender „salting-out“ Effekt, kosmotrop									
Anionen	PO_4^{3-}	SO_4^{2-}	$\text{CH}_3\cdot\text{COO}^-$	Cl^-	Br^-	NO_3^-	CLO_4^-	I^-	SCN^-
Kationen	NH_4^+	Rb^+	K^+	Na^+	Cs^+	Li^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Ba^{2+}
Zunehmender „salting-in“ Effekt, chaotrop →									

Die weiter links stehenden (so genannten antichaotropen oder kosmotropen) Salze sind besonders schonende Fällungsmittel. Sie vergrößern hydrophobe Effekte der Lösung indem sie zur Stabilität und Struktur von Wasser-Wasser Wechselwirkungen beitragen und fördern so die Proteinaggregation über hydrophobe Wechselwirkungen, was zum Ausfall von Proteinen führen kann [75].

Die weiter rechts stehenden chaotropen Salze dagegen lösen geordnete Wasserstoffbrückenbindungen in Wasser auf. Indem die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen werden, stören die chaotropen Substanzen die Wasserstruktur und sorgen für Unordnung (Zunahme der Entropie). Bei Aminosäuren vermindern sie damit hydrophobe Effekte und wirken denaturierend auf Proteine, da die treibende Kraft der Proteinfaltung die Zusammenlagerung der hydrophoben Aminosäuren im Wasser ist. Sie stören also die Kräfte, welche die Proteine in ihrer tertiären bzw. quartären Struktur halten und können sie dadurch denaturieren [113].

Ionen und Salze die auf der linken Seite zu finden sind, wie etwa Ammonium-Sulfat, verstärken den so genannten „salting-out“ Effekt und führen zu höheren Bindekapazitäten. Dies zeigt sich auch in den Isothermen in Abbildung 20. Die Probe mit einer Ammonium-Sulfat Konzentration von $0,8 \text{ mol l}^{-1}$ weist eine deutlich höhere Bindekapazität auf als etwa die Probe mit $2,0 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaCl}$, welches in der Hofmeisterreihe weiter rechts steht.

4.2 SMA-Parameter aus Säulenchromatographie

Die hier dargestellten Ergebnisse der Säulenchromatographie-Läufe wurden nur für ein einziges Puffersystem ermittelt und können nur als Beispiel für die Machbarkeit dieser Methode dienen. Sie ermöglichen zudem einen Vergleich der Ergebnisse der Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen mit denen der Säulensäulenläufe. Als Salzkonzentrationen für die drei Proteinpulsexperimente wurden 10 mM, 20 mM und 30 mM Natriumchlorid gewählt. In der

Auswertung wird hier wiederum die Natriumionenkonzentration $c_s^{(n)}$ verwendet. Die Konzentrationen sind in Tabelle 19 bzw. im Anhang B zu finden.

Abbildung 21 zeigt die UV-Signale der drei Chromatographieläufe des Pulsexperimentes. Der höchste Peak mit der niedrigsten Retentionszeit wird bei der höchsten Salzkonzentration detektiert. Die Wechselwirkungen des Proteins mit dem Adsorber sind hier am geringsten und das Protein wandert am schnellsten durch die Säule. Dementsprechend wird die höchste Retentionszeit bei der niedrigsten Salzkonzentration erreicht. Hier herrschen starke Wechselwirkungen mit der Säule und das Protein wird entsprechend zurückgehalten. Die Peakflächen sind jeweils gleich groß, da immer dieselbe Proteinmasse injiziert wurde.

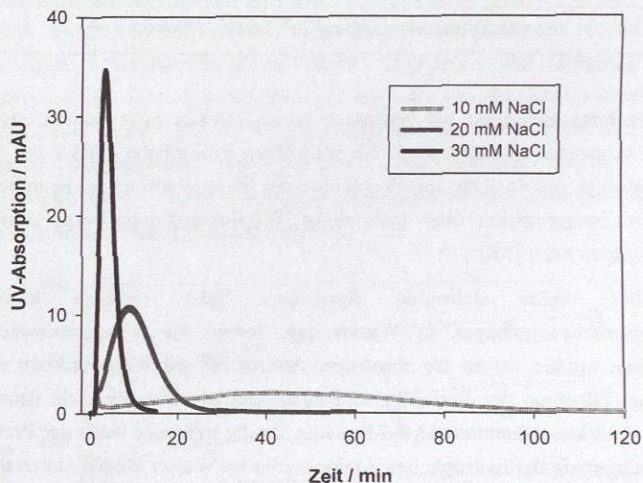


Abbildung 21: Detektorsignal der Protein Pulsexperimente mit mAb2 bei drei unterschiedlichen Salzkonzentrationen mit linearer Elution.

Die Retentionszeiten wurden über das Peakmaximum bestimmt und sind zusammen mit den sich daraus ergebenden Kapazitätsfaktoren k' in Tabelle 19 dargestellt. Die Kapazitätsfaktoren wurden, wie in Kapitel 2.4.3 beschreiben, mit Gleichung (42) berechnet.

Tabelle 19: Retentionszeiten und berechnete Kapazitätsfaktoren der Pulsexperimente.

$c_{Na^+}^{(n)} / \text{mmol l}^{-1}$	t_R / min	k'
41,5	42,0	37,2
51,5	9,0	7,2
61,5	3,2	1,9

In doppelt logarithmischer Darstellung des Kapazitätsfaktors über der Salzkonzentration ergibt sich wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, eine Gerade. Die Gerade ist zusammen mit den Messpunkten in Abbildung 22 gezeigt. Ihre Funktionsgleichung lautet wie folgt:

$$\log k' = 13,78 - 7,55 \cdot \log \frac{c_s^{(n)}}{c_0^{(n)}} \quad (74)$$

Die charakteristische Ladung ν ist gleich der negativen Steigung der Geraden. Die SMA-Gleichgewichtskonstante K_{SMA} ergibt sich aus dem Achsenabschnitt $\log(\beta K_{SMA} (\Lambda/\Lambda_0)^\nu)$. So erhält man:

$$\nu = 7,6 \quad (75)$$

$$K_{SMA} = 0,13 \quad (76)$$

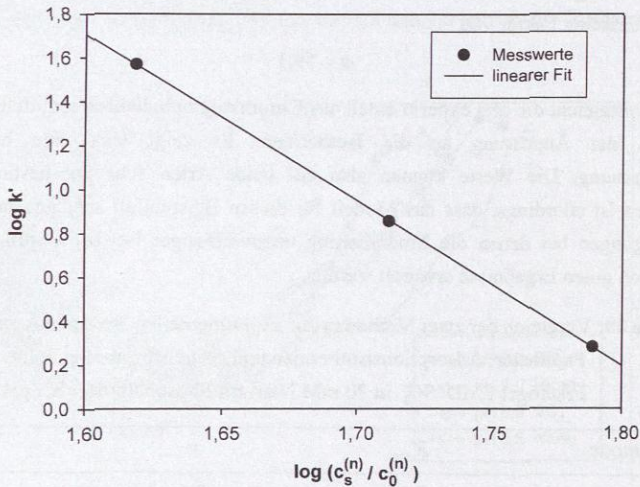


Abbildung 22: Kopaciewicz-Plot zur Bestimmung der SMA-Parameter K_{SMA} und ν . Der Kapazitätsfaktor ist über der Salzkonzentration logarithmisch aufgetragen.

Zur Bestimmung des sterischen Faktors σ wurden, wie zuvor beschrieben, Durchbruchversuche durchgeführt. Nach der Säule wurde die Proteinkonzentration über UV-Spektrometrie gemessen. Es wurde definiert, dass der Durchbruch bei zehn Prozent der ursprünglichen Antikörperkonzentration erreicht ist. Als Puffersystem wurde ein 20 mM Natrium-Phosphatpuffer mit zusätzlich 10 mM Natriumchlorid gewählt.

Für die Berechnung weiterhin notwendig war das Durchbruchvolumen bei nichtbindenden Bedingungen V_0 . Dies kann über Gleichung (77) berechnet werden:

$$V_0 = \varepsilon_t \cdot V_{\text{Säule}} \quad (77)$$

V_0 betrug 3 ml und ε_t entspricht der totalen Porosität des Adsorbermaterials und betrug für diesen Fall [85].

$$\varepsilon_t = 0,505 \quad (78)$$

Daraus ergibt sich:

$$V_0 = 1,515 \text{ ml} \quad (79)$$

und das Phasenverhältnis β ist somit nach Gleichung (43) (Kapitel 2.4.3)

$$\beta = 0,98 \quad (80)$$

Für den Versuch wurde ein Durchbruchsvolumen V_0 von 21,1 ml bestimmt. Damit ergibt sich aus den Gleichungen (47) und (48) aus Kapitel 2.4.3 unter Verwendung der eben berechneten Werte ein sterischer Faktor von:

$$\sigma = 59,1 \quad (81)$$

Tabelle 20 vergleicht die drei experimentell aus Chromatographieläufen ermittelten Werte mit denen aus der Anpassung an die Isothermen. Es zeigt sich eine hervorragende Übereinstimmung. Die Werte können also auf beide Arten sehr gut bestimmt werden. Anzumerken ist allerdings, dass das Modell für diesen Beispielfall sehr gut anpassbar war. Bei Bedingungen bei denen die Modellierung unzuverlässiger ist (bspw. pH 6,0), können keine ähnlich guten Ergebnisse erwartet werden.

Tabelle 20: Vergleich der zwei Methoden zur experimentellen Bestimmung der SMA-Parameter: Adsorptionsisothermen und Säulenchromatographie für mAb2 an Fractogel EMD SO_3^- in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei pH 7,0.

Methode	K_{SMA}	ν	σ
Säulenchromatographie	0,13	7,6	59,1
Adsorptionsisotherme	0,20	7,6	65,8

4.3 Mikrokalorimetrie

4.3.1 Spezifische Adsorptionenthalpie bei Kationentauschern

Im Folgenden werden die kalorimetrischen Ergebnisse der beiden Fractogel-Kationentauscher gezeigt. Sie sind dargestellt als spezifische Adsorptionenthalpie der Antikörper Δh_p^{ads} entlang der jeweiligen Adsorptionsisotherme, also aufgetragen über der Adsorberbeladung $q_p^{(m)}$.

Die experimentellen Ergebnisse in den folgenden Abbildungen sind in derselben Art und Weise organisiert wie die zugehörigen Adsorptionsisothermen aus Kapitel 4.1. Die Ergebnisse für mAb1 in Natrium-Phosphatpuffer sind in Abbildung 23 zu sehen, jene für mAb2 im selben Puffer in Abbildung 25 und schließlich zeigt Abbildung 26 die Ergebnisse für beide Antikörper in Natrium-Acetatpuffer. Wiederum wurden die Messungen mit Natrium-Phosphat mit beiden Fractogelen ausgeführt, die mit Natrium-Acetat jedoch nur mit Fractogel EMD SO_3^- . In allen Fällen wurde der pH-Wert variiert. Ein Überblick über die Daten zeigt, dass die Resultate sowohl für beide Adsorbentmaterialien als auch für beide Antikörper ähnlich sind. Die Daten zeigen jedoch auch, dass die spezifische Adsorptionenthalpie der Antikörper Δh_p^{ads} stark vom pH-Wert und der Adsorberbeladung $q_p^{(m)}$ abhängt.

Abbildung 23 zeigt eine solche Abhängigkeit der spezifischen Adsorptionenthalpie von der Adsorberbeladung bei moderaten pH-Werten von 6,5 und 7,0 entlang der Isotherme.

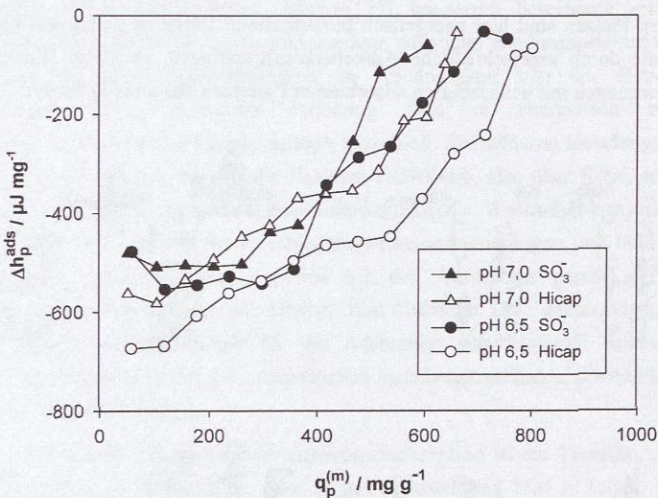


Abbildung 23: Spezifische Adsorptionenthalpie Δh_p^{ads} von mAb1 in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei 25°C: Fractogel EMD SE Hicap (offene Symbole) und Fractogel EMD SO_3^- (geschlossene Symbole).

Da die Adsorption bei Ionentauschern zum großen Teil auf elektrostatischen Wechselwirkungen basiert, wurde für die Adsorption bei diesen Bedingungen wie erwartet eine exotherme Enthalpieänderung beobachtet ($\Delta h_p^{ads} < 0$). Für geringe Beladungen ist Δh_p^{ads} nahezu konstant, jedoch wird Δh_p^{ads} mit steigendem $q_p^{(m)}$ betragsmäßig geringer und läuft gegen Null wenn $q_p^{(m)max}$ erreicht ist. Dieses Verhalten konnte für alle untersuchten Adsorbentmaterialien und Antikörper festgestellt werden für pH-Werte, welche nicht zu weit vom isoelektrischen Punkt des Proteins entfernt sind. Offenbar ist Δh_p^{ads} von der Beladungsdichte der Adsorbentoberfläche abhängig. Diese experimentellen Ergebnisse deuten auf die ebenfalls in der Literatur diskutierte Theorie hin, dass Proteine bei der Adsorption in Abhängigkeit von $q_p^{(m)}$ verschiedene Konformationen bei der Bindung einnehmen können und somit auf verschiedene Art und Weise adsorbieren. Bei geringen Beladungen werden zuerst die energetisch günstigsten Plätze und Positionen eingenommen, bei höheren Beladungen sind nur noch ungünstige Plätze vorhanden, die belegt werden können. Dies führt zu unterschiedlichen Orientierungen bzw. Konformationen (Abbildung 24), was wiederum zu unterschiedlichen Adsorptionenthalpien führt. Diese Theorie vertritt auch Janzen [59]. Mit ungünstigen Plätzen sind hier energetisch benachteiligte Bindungsstellen auf dem Adsorbent gemeint, die durch unterschiedliche Adsorbentkonfigurationen, sterische Hindernisse oder Wechselwirkungen mit benachbarten adsorbierten Proteinen zustande kommen.

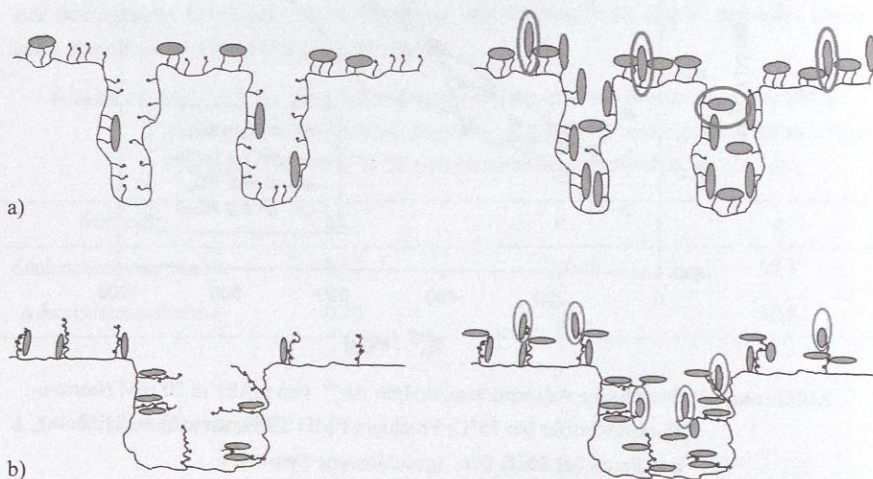


Abbildung 24: Darstellung der Proteinadsorption bei geringer und hoher Beladung: a) konventionelles poröses Material b) poröser gegraffeter Tentakeladsorbent. Bei geringer Beladung werden zuerst die attraktiven Plätze besetzt, und erst bei hohen Beladungen die ungünstigen und weniger bevorzugten.

Die gefrafrteten tentakelähnlichen Fractogele bieten aufgrund ihrer Anordnung der funktionellen Gruppen sehr viele unterschiedliche Bindungsstellen an. Jedoch nehmen auch für diesen Typ die Antikörper zuerst die energetisch günstigen Plätze ein. Dies ist schließlich der Grund, warum Δh_p^{ads} für geringe Beladungen nahezu konstant ist und mit zunehmender Adsorberbeladung betragsmäßig geringer wird. (vgl. Abbildung 23). Ein weiterer wichtiger Einfluss auf Δh_p^{ads} bei höheren Beladungen sind die zuvor beschriebenen abstoßenden Wechselwirkungen zwischen benachbarten adsorbierten Proteinen, welche zu geringeren Bindekapazitäten führen können und offensichtlich auch die Adsorptionsenthalpie verändern.

Dieses Bild der verschiedenen Bindungsorientierungen der Antikörper und die daraus resultierenden geringeren Enthalpieänderungen wird ebenfalls von anderen experimentellen Arbeiten zur Proteinadsorption unterstützt: Lin et al. [72] fand ähnliche Ergebnisse für Anionentauscher: Die Adsorption war exotherm, Δh_p^{ads} daher negativ und für geringe Oberflächenbeladungen nahezu konstant.

Gil et al. [44] beobachteten für Anionentauscher steigende endotherme Adsorptionsenthalpien für zunehmende Adsorberbeladungen. Minton [79] wiederum berechnete mithilfe von Gleichgewichts- und Kinetik-Modellen verschiedene mögliche Bindungsorientierungen und Konformationen für die Proteinadsorption in Abhängigkeit von der Beladung der Adsorberoberfläche. Bei geringerer Beladung fand er energetisch begünstigte Konformationen, bei denen das Protein seitlich adsorbiert. Bei höheren Beladungszuständen kommt es zu einer Änderung bei der die Proteine endständig, also über Kopf, adsorbieren. Yao und Lehnhoff [119] berechneten freie Energien für die Wechselwirkungen zwischen Protein und Adsorberoberfläche für verschiedene Proteinorientierungen und fanden heraus, dass die seitliche Anordnung des Proteins bei der Adsorption gerade bei geringen Oberflächenbeladungen bevorzugt ist. Dimer und Hubbuch [30] entdeckten schließlich mittels konfokaler Lasermikroskopie für die Adsorption von Lysozym Präferenzen für verschiedene Bindungsstellen bei unterschiedlichen Beladungszuständen, jeweils für geringe und hohe Oberflächenbedeckung.

Eine weitere interessante Eigenschaft der Antikörperadsorption ist die Tatsache, dass Δh_p^{ads} vom jeweiligen pH-Wert abhängig ist. Dies ist gut in Abbildung 25a) zu sehen. Wie zuvor beschrieben ist bei pH-Werten von 6,5 und 7,0 die Adsorption exotherm und $\Delta h_p^{ads} < 0$. Da bei pH 6,5 die Ladung des Antikörpers größer ist, ergibt sich auch ein betragsmäßig größerer Wert für Δh_p^{ads} . Bei weiterer Absenkung des pH-Wertes zeigt sich jedoch ein unerwarteter Effekt: Der Betrag von Δh_p^{ads} nimmt ab, obwohl die Proteinladung selbst im Säuren zunimmt. Bei pH 5,5 wird nahezu kein kalorischer Effekt mehr gemessen, bei pH 4,5 ist die spezifische Adsorptionsenthalpie sogar positiv und die Adsorption damit endotherm, obwohl der Antikörper bei diesen Bedingungen eine große positive Ladung trägt und die Bindekapazität noch sehr hoch ist.

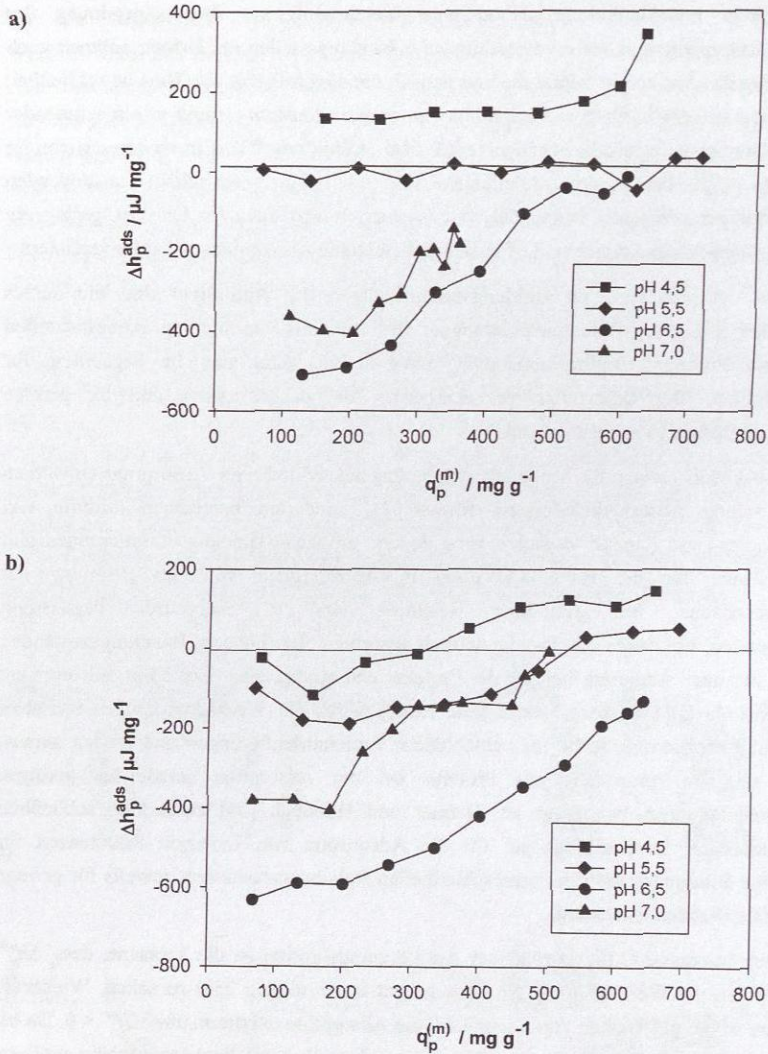


Abbildung 25: Spezifische Adsorptionsenthalpie Δh_p^{ads} von mAb2 in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer a) Fractogel EMD SO_3^- b) Fractogel EMD SE Hicap.

Um den Einfluss des Puffersystems zu überprüfen, wurden auch Experimente mit Natrium-Acetatpuffer durchgeführt (siehe Abbildung 26).

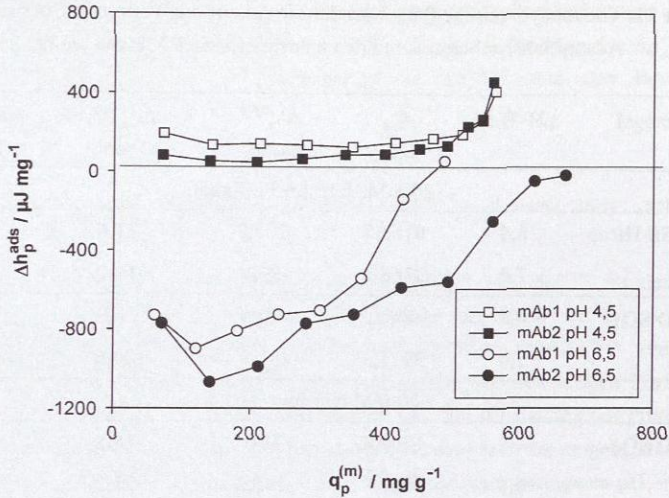


Abbildung 26: Spezifische Adsorptionenthalpie Δh_p^{ads} von mAb1 und mAb2 an Fractogel EMD SO_3^- in 20 mM Natrium-Acetatpuffer bei 25°C.

Die Ergebnisse sind für beide Puffersysteme ähnlich und alle oben beschriebenen Effekte wurden auch hier gefunden.

Das Verhalten, dass bei geringen pH-Werten die spezifische Adsorptionenthalpie Δh_p^{ads} positiv ist, und die Adsorption damit endotherm ist, ist auf den ersten Blick für Ionentauscher zunächst ungewöhnlich. Dies lässt vermuten, dass die Adsorption im Säuren nicht enthalpisch sondern aufgrund eines Entropiegewinns bei der Adsorption entropisch getrieben ist.

Tabelle 21 und Tabelle 22 zeigen thermodynamische Parameter, welche aus den Adsorptionsisothermen und den kalorimetrischen Messungen berechnet wurden. Die thermodynamischen Grundlagen hierzu und die Herleitung der jeweiligen hypothetischen Referenzzustände sind in Kapitel 2.3.2 ausführlich beschrieben.

Beide Tabellen zeigen bei einem Vergleich mit den maximalen Adsorberbeladungen $q_p^{(m)\text{max}}$ der jeweiligen Isotherme aus Kapitel 4.1.2, dass bei höheren Werten für K_{eq} auch höhere maximale Adsorberbeladungen erreicht werden. Die höchsten Werte wurden für mAb1 bei pH 6,5 und für mAb2 bei beiden Fractogelen bei pH 5,5 erreicht.

Tabelle 21: Thermodynamische Parameter für die Adsorption von mAb1, berechnet aus den Adsorptionsisothermen und den kalorimetrischen Messungen bei 25°C.

Fractogel	pH-Wert	K_{eq}	$\Delta h_p^{ads,ref}$ kJ mol ⁻¹	$\Delta g_p^{ads,ref}$ kJ mol ⁻¹	$T \Delta s_p^{ads,ref}$ kJ mol ⁻¹
20 mM Natrium-Phosphat					
EMD SE Hicap	6,5	6153,3	-107,7	-21,6	-86,1
	7,0	3166,3	-97,6	-19,9	-77,7
EMD SO ₃ ⁻	6,5	10667,3	-90,4	-22,9	-67,4
	7,0	3911,3	-81,8	-20,5	-61,3
20 mM Natrium-Acetat					
EMD SO ₃ ⁻	4,5	1764,4	21,0	-18,5	39,5
	6,5	5087,9	-140,3	-21,2	-119,1

Tabelle 22: Thermodynamische Parameter für die Adsorption von mAb2, berechnet aus den Adsorptionsisothermen und den kalorimetrischen Messungen bei 25°C

Fractogel	pH-Wert	K_{eq}	$\Delta h_p^{ads,ref}$ kJ mol ⁻¹	$\Delta g_p^{ads,ref}$ kJ mol ⁻¹	$T \Delta s_p^{ads,ref}$ kJ mol ⁻¹
20 mM Natrium-Phosphat					
EMD SE Hicap	4,5	3187,6	-16,7	-19,9	3,3
	5,5	15480,0	-23,0	-23,9	0,1
	6,5	15239,5	-93,7	-23,9	-69,8
	7,0	168,5	-54,0	-12,7	-41,3
EMD SO ₃ ⁻	4,5	9726,8	18,4	-22,7	41,2
	5,5	15433,5	0,0	-23,9	23,9
	6,5	4587,0	-75,6	-20,9	-54,7
	7,0	245,8	-60,2	-13,6	-46,6
20 mM Natrium-Acetat					
EMD SO ₃ ⁻	4,5	2199,5	3,2	-19,1	22,3
	6,5	3168,5	-155,7	-19,9	-135,7

In Tabelle 22 wird die Abhängigkeit der thermodynamischen Parameter vom pH-Wert deutlich. Für alle Bedingungen ist $\Delta g_p^{ads ref} < 0$. Es gibt zwei Beiträge für $\Delta g_p^{ads ref}$, die spezifische Adsorptionenthalpie im Referenzzustand $\Delta h_p^{ads ref}$ und den Beitrag der Entropieänderung der Adsorption $T\Delta s_p^{ads ref}$:

$$\Delta g_p^{ads ref} = \Delta h_p^{ads ref} - T\Delta s_p^{ads ref} \quad (82)$$

Im Folgenden wird unter „entropisch getrieben“ $\Delta s_p^{ads ref} > 0$ bzw. unter „enthalpisch getrieben“ $\Delta h_p^{ads ref} < 0$ verstanden.

Bei größeren pH-Werten ist die Adsorption exotherm ($\Delta h_p^{ads ref} < 0$), $\Delta s_p^{ads ref}$ ist kleiner Null und die Adsorption enthalpisch getrieben. Für geringe pH-Werte ist die Adsorption endotherm, die Adsorption ist entropisch getrieben und alle Werte von $\Delta s_p^{ads ref}$ sind positiv (vgl. Tabelle 22). Diese experimentellen Ergebnisse deuten auf den großen Einfluss der Pufferbedingungen und damit der Ladung des Proteins hin. Bei der Ladung des Proteins darf aber nicht nur die Oberflächenladung betrachtet werden sondern auch die umgebenden Puffer- und Salzionen, die so genannte Ionenwolke. Die größte Folge eines geringeren pH-Wertes ist die Zunahme der Ladung des Antikörpers und damit auch die Bedeutung der Ionenwolke. In Abbildung 27 ist hierzu ein Bild der Antikörperadsorption bei niedrigen pH-Werten und der Einfluss der Ionenwolke zu sehen. Die gelösten und positiv geladenen Antikörper sind von negativ geladenen Pufferionen umgeben. Bei der Adsorption wird ein Teil der Ionenwolke verdrängt. Diese Trennung von positiver Antikörperladung und negativer Ionenladung ist energetisch gesehen ungünstig und daher endotherm und direkt mit einem Entropiegewinn verbunden. Die bei der Adsorption aus der Ionenwolke frei werdenden Ionen erhöhen die Unordnung bzw. Entropie des Systems. Dieser Beitrag wird mit geringer werdendem pH-Wert immer wichtiger.

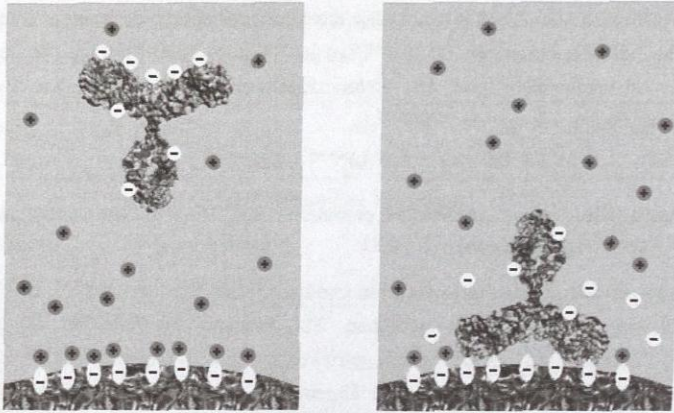


Abbildung 27: Bild der Antikörperadsorption bei Kationenaustauschern für niedrige pH-Werte unter Berücksichtigung des Einflusses der Ionenwolke.

Es existieren zahlreiche weitere Parameter, welche $\Delta h_p^{ads\ ref}$ und $\Delta s_p^{ads\ ref}$ beeinflussen. Für die Adsorption auf molekularer Ebene ergibt sich dadurch ein erstes Bild der Abläufe: Bei der Adsorption werden Ionen aus der Ionenwolke, welche das Protein umgeben, verdrängt. Vor der Bindung an die Adsorberoberfläche werden die Gegenionen verdrängt, welche die funktionellen Gruppen des Adsorbers umgeben. Je nach Adsorbentyp treten elektrostatische und unspezifische Wechselwirkungen, wie etwa hydrophobe Interaktionen zwischen Protein und Adsorber auf. Es kommt zu einer strukturellen Umordnung der Proteinkonformation während der Adsorption und zu einer Umstrukturierung der verdrängten Gegenionen im Lösungsmittel. Lin et al. [72] beschreibt den Adsorptionsmechanismus ähnlich und unterteilt diesen in mehrere Unterprozesse, welche zur Gesamtenthalpieänderung des Adsorptionsprozesses beitragen.

4.3.2 Spezifische Adsorptionenthalpie bei HIC-Adsorbent

Die spezifische Adsorptionenthalpie zeigt für HIC einen charakteristischen Verlauf entlang der Isotherme (siehe Abbildung 28). Δh_p^{ads} ist bei allen Ansätzen positiv, d.h. die Adsorption bei der HIC ist endotherm. Entlang der Isotherme nimmt Δh_p^{ads} betragsmäßig ab und kurz vor $q_p^{(m)\ max}$ steigt Δh_p^{ads} wieder leicht an.

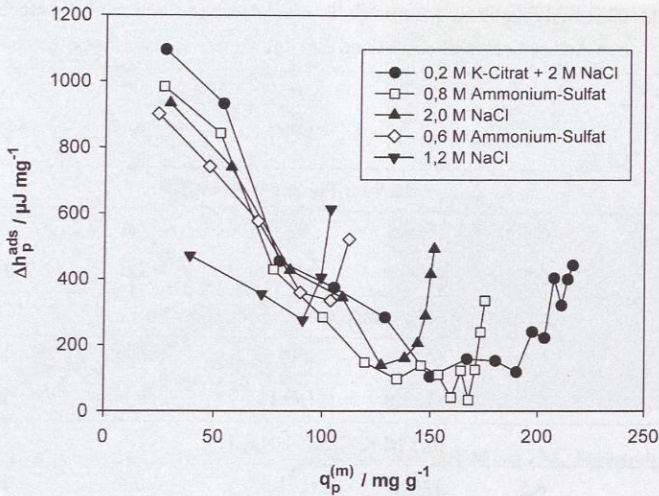


Abbildung 28: Spezifische Adsorptionenthalpie Δh_p^{ads} von mAb2 an Toyopearl Butyl in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei pH 6,5, 25°C und variierenden Salzkonzentrationen.

Auch hier zeigt sich wieder der Einfluss der Hofmeisterreihe [52]. Salze, die dort weiter links eingeordnet sind (z.B. Ammonium-Sulfat) und zu höheren Beladungen führen, führen auch zu größeren spezifischen Adsorptionenthalpien.

Tabelle 23 zeigt die thermodynamischen Parameter, welche aus den Adsorptionsisothermen und den kalorimetrischen Messungen berechnet wurden. Die Adsorption bei der HIC ist im Gegensatz zu den Ionentauschern grundsätzlich für alle Bedingungen endotherm ($\Delta h_p^{ads, ref} > 0$) und entropisch getrieben ($\Delta s_p^{ads, ref} > 0$). Für höhere Salzkonzentrationen bzw. bei Salzen, die in der Hofmeisterreihe weiter links stehen sind die Werte von $\Delta s_p^{ads, ref}$ entsprechend größer.

Tabelle 23: Thermodynamische Parameter für die Adsorption von mAb2, berechnet aus den Adsorptionsisothermen und den kalorimetrischen Messungen bei 25°C

c_{Salz} mol l ⁻¹	pH-Wert	K_{eq}	$\Delta h_p^{ads,ref}$ kJ mol ⁻¹	$\Delta g_p^{ads,ref}$ kJ mol ⁻¹	$T \Delta s_p^{ads,ref}$ kJ mol ⁻¹
20 mM Natrium-Phosphat + NaCl					
1,2	6,5	1159,5	82,9	-17,4	100,4
2,0	6,5	1368,2	150,1	-17,9	168,0
20 mM Natrium-Phosphat + Ammonium-Sulfat					
0,6	6,5	2098,7	157,3	-18,9	176,2
0,8	6,5	3138,8	160,16	-19,9	180,1
0,2 M K-Citrat + NaCl					
2,0	6,5	3767,5	171,6	-20,4	192,0

Die Abbildung 29 zeigt ein Bild der Antikörperadsorption bei HIC-Trennmateriale und den Einfluss der Hydrathülle.

Bei geringen Salzkonzentrationen sind die Proteine gelöst und von einer Hülle aus Wassermolekülen umgeben. Die Wassermoleküle in der Hydrathülle haben eine höhere Ordnung als die Wassermoleküle in der Bulkphase des Lösungsmittels. Zusätzlich schirmen sie hydrophobe Gruppen der Antikörper nach außen hin ab. Die Proteine haben aufgrund ihrer Aminosäuresequenz und den verschiedenen Eigenschaften der Aminosäuren eine dreidimensionale Struktur die so genannte Proteinfaltung. In wässriger Lösung ist das Protein so gefaltet, dass hydrophobe Gruppen möglichst nach innen gekehrt sind. Aus sterischen Gründen ist diese Faltung jedoch nicht für alle hydrophoben Gruppen möglich und so bleibt auch in wässrigen Lösungen ein Anteil der Proteinoberfläche hydrophob (vgl. Abbildung 5). Bei einer Erhöhung der Salzkonzentration, wie es bei der HIC üblich ist, um hohe Adsorberbeladungen zu erreichen, konkurrieren die zugegebenen Salzionen um die Wassermoleküle aus der Hydrathülle der Proteine. Dies ist bei der HIC die treibende Kraft, da nun frei zugängliche hydrophobe Gruppen der Proteine mit den hydrophoben Gruppen des Adsorbers wechselwirken und an diese binden. Durch die Umstrukturierung der Wassermoleküle erhöht sich die Unordnung bzw. die Entropie des Systems und die Adsorption wird energetisch durch diesen Entropiegewinn begünstigt.

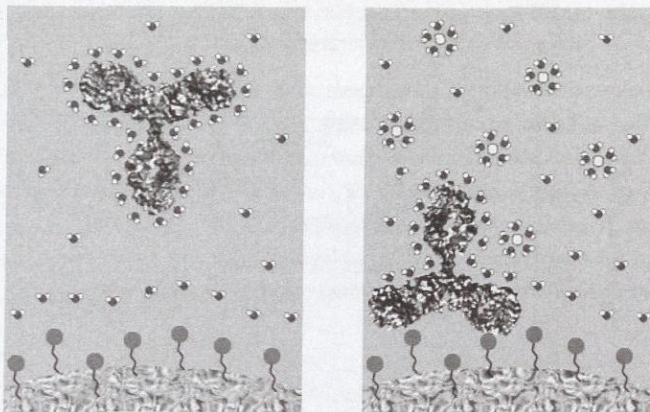


Abbildung 29: Darstellung der Antikörperadsorption bei HIC-Materialien und der Einfluss der Hydrathülle.

Bei den vorgestellten Bildern der Adsorption handelt es sich bislang nur um qualitative Veranschaulichungen, um die experimentellen Daten zu interpretieren und zu verstehen. Auch für die Mikrokalorimetrie gilt, wie bei den zuvor diskutierten Adsorptionsisothermen, dass aufgrund der Komplexität und der Vielzahl an Prozessparametern und Wechselwirkungen beim Adsorptionsvorgang eine quantitative Modellierung sich noch sehr schwierig gestaltet. Die zuvor erwähnten Computersimulationen könnten jedoch direkt an die hier dargestellten qualitativen Modelle anknüpfen und so einen noch tieferen Einblick in die Proteinadsorption ermöglichen.

4.4 Laserlichtstreuung

4.4.1 Messungen im offline SLS-Batch-Modus: Salzabhängigkeit

Der Einfluss von Ammonium-Sulfat auf den zweiten osmotischen Virialkoeffizienten A_2 und die massengemittelte Molmasse M_w der Antikörper ist in Abbildung 30 und 31 dargestellt. Die A_2 -Werte für alle drei Antikörper zeigen für steigende Ammonium-Sulfatkonzentrationen ähnliche Verläufe (Abbildung 30).

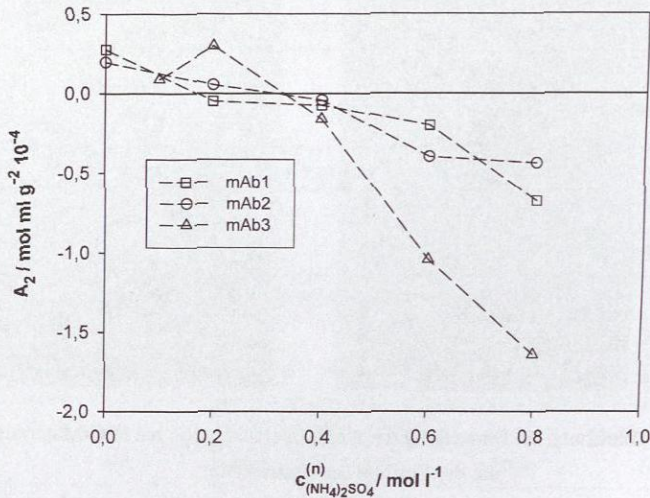


Abbildung 30: Zweiter osmotischer Virialkoeffizient A_2 von mAb1, mAb2 und mAb3 in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei pH 6,5 und unterschiedlichen Ammonium-Sulfatkonzentration bei 25°C.

Aufgrund ihres isoelektrischen Punktes sind die beiden humanen Antikörper bei pH 6,5 negativ geladen. Der isoelektrische Punkt von mAb3 liegt im Bereich von pH 6,5, der Antikörper trägt bei diesen Bedingungen nur eine geringe Nettoladung. Ohne Salzzugabe bzw. bei geringer Salzkonzentration herrschen zwischen den negativ geladenen humanen Antikörper abstoßende Wechselwirkungen, der A_2 ist positiv. Die Werte für A_2 nehmen mit zunehmender Salzkonzentration kontinuierlich ab und werden negativ. Bei steigender Salzkonzentration werden abstoßende elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den gleich geladenen Proteinen zunehmend durch Abschirmung durch Gegenionen verhindert, welche an die Proteinladungen binden. Dies führt zur Abnahme des A_2 , siehe auch Elcock [33]. Des Weiteren ist Ammonium-Sulfat ein kosmotropes Salz, welches die Eigenschaften des Wassers verändert und insgesamt hydrophober macht. Dadurch werden die anziehenden Protein-Protein Wechselwirkungen begünstigt. Es kommt zu dem bereits erwähnten salting-out Effekt. Die Salzionen konkurrieren mit den Proteinen um das Wasser als Lösungsmittel. Eine Erhöhung der Salzkonzentration wirkt daher wie eine Erniedrigung der Wasserkonzentration bzw. eine Erhöhung der Proteinkonzentration.

Das gleiche Verhalten und ähnliche experimentelle Daten wurden auch für andere Proteine wie Lysozym und Chymotrypsin beobachtet [13, 81, 112]. Die anziehenden Wechselwirkungen mit zunehmender Salzkonzentration werden auch in diesen Arbeiten mit

zunehmend hydrophoben Wechselwirkungen und dem salting-out Effekten erklärt. Weitere Erklärungen hierzu sind in [26, 27, 78] zu finden.

Das gemessene M_w der Antikörper bei verschiedenen Ammonium-Sulfatkonzentrationen ist in Abbildung 31 dargestellt. Für mAb1 und mAb2 sind die experimentellen Ergebnisse von M_w größer als die Molmassen des jeweiligen Monomers (mAb1 158 kDa und mAb2 143 kDa), was auf Aggregation schließen lässt oder mit hochmolekularen Verunreinigungen erklärt werden könnte. Da im SDS-Gel [36] keine solchen Verunreinigungen gefunden wurden, sind Aggregate wahrscheinlicher. Bei der Diskussion sollte berücksichtigt werden, dass die Bestimmung von M_w , wie in Kapitel 3.6 beschrieben, mit Unsicherheiten von bis zu 10 % behaftet ist.

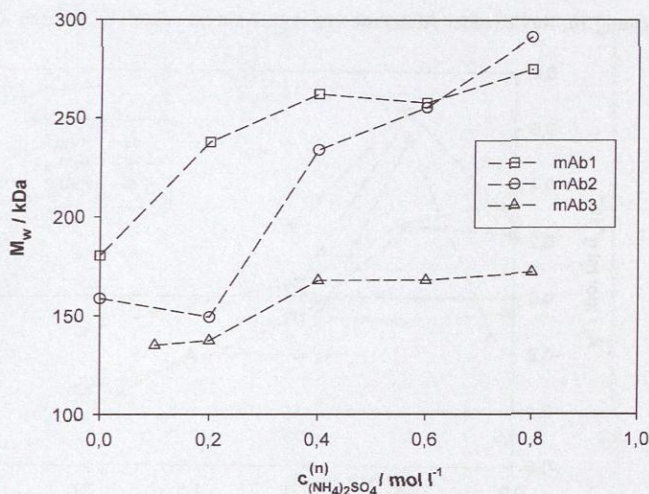


Abbildung 31: Massengemittelte Molmasse M_w von mAb1, mAb2 und mAb3 in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei pH 6,5 und unterschiedlichen Ammonium-Sulfatkonzentration bei 25°C. Das jeweilige M_w des Monomers beträgt für mAb1: 158 kDa, mAb2: 143 kDa und mAb3: 148 kDa.

M_w steigt mit zunehmender Salzkonzentration an. Aus der Definition von M_w (vgl. Kapitel 2.6, Gleichung 64) ist ersichtlich, dass schon kleine Aggregatmengen ausreichen, um ein weitaus höheres M_w zu erhalten, als das des Monomers. Diese kleinen Aggregatmengen konnten ebenfalls in den SEC-Chromatogrammen detektiert werden (vgl. Abbildung 9). Mit zunehmend anziehenden Wechselwirkungen, was auch die abnehmenden A_2 -Werte in Abbildung 30 zeigen, steigt die Tendenz, Dimere, Trimere und höhere Aggregate zu bilden.

Dieser Effekt ist für mAb3 jedoch nicht ganz so ausgeprägt. Das M_w steigt auch bei höheren Salzkonzentrationen nur leicht an, auch wenn die Werte für A_2 negativ werden.

In Abbildung 32 ist der zweite osmotische Virialkoeffizient aller drei Antikörper in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei pH 6,5 dargestellt. Die beiden humanen Antikörper sind bei pH 6,5 negativ geladen und ohne Salzzugabe herrschen zwischen den humanen Antikörper abstoßende Wechselwirkungen, der A_2 ist positiv. Bei dem schwach geladenen Mausantikörper überwiegen die anziehenden Wechselwirkungen, der A_2 ist negativ. Eine geringe Salzzugabe ($c_{\text{NaCl}} = 0.5 \text{ mol l}^{-1}$) führt bei allen drei Antikörpern zu einem Anstieg des Virialkoeffizienten. Bei weiterer Salzzugabe bis hin zu hohen Salzkonzentrationen nehmen aufgrund der zuvor beschriebenen Abschirmung der Proteinladungen und des salting-out Effektes die anziehende Wechselwirkungen in der Proteinlösung zu, was zu einer Abnahme von A_2 bis hin zu negativen Werten führt.

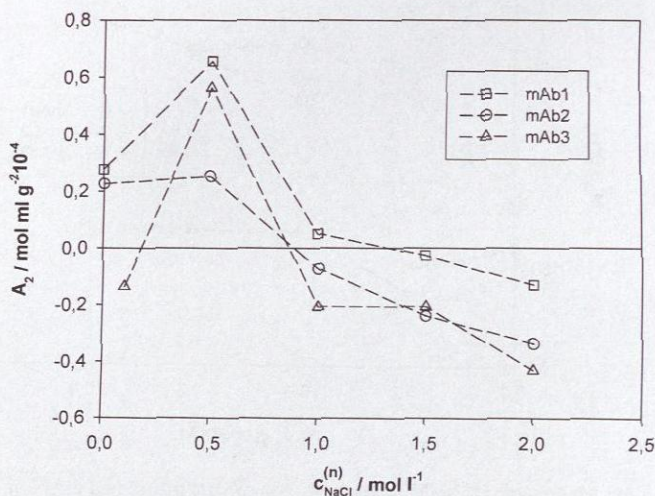


Abbildung 32: Zweiter osmotischer Virialkoeffizient A_2 von mAb1, mAb2 und mAb3 in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei pH 6,5 und variierender NaCl-Konzentration bei 25°C.

Der beobachtete Effekt, dass bei geringer Salzkonzentration A_2 leicht ansteigt, lässt sich mit den unterschiedlichen Eigenschaften der Salze erklären. Es ist aus der Literatur bekannt, dass chaotrope Salze bei geringen Salzkonzentrationen die Proteine stabilisieren und daher teilweise zu einer besseren Proteinlöslichkeit führen können. Dies ist als salting-in Effekt beschrieben [6, 22, 108]. Eine bessere Löslichkeit ist wiederum aufgrund der abstoßenden Wechselwirkungen direkt mit größeren und positiven Werten für A_2 verbunden [48]. Das

beobachtete Verhalten lässt sich für NaCl gut erklären, da es eher in der Mitte der Hofmeisterreihe [52] (vgl. Kapitel 4.1.4) eingeordnet wird und weder eindeutig kosmotrop noch chaotrop ist.

Die Tatsache, dass die Werte für A_2 bei Ammonium-Sulfat schon bei Salzkonzentrationen zwischen $0,2$ und $0,4 \text{ mol l}^{-1}$ negativ werden und bei NaCl erst ab $1,0 \text{ mol l}^{-1}$, lässt sich ebenfalls mit der Hofmeisterreihe erklären: Ammonium-Sulfat ist stärker kosmotrop als NaCl und steht auch in der Hofmeisterreihe weiter links, daher führt Ammonium-Sulfat zu geringeren Löslichkeiten und verstärkt den oben beschriebenen salting-out Effekt.

In Abbildung 33 ist die Molmasse der Antikörper in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration zu sehen.

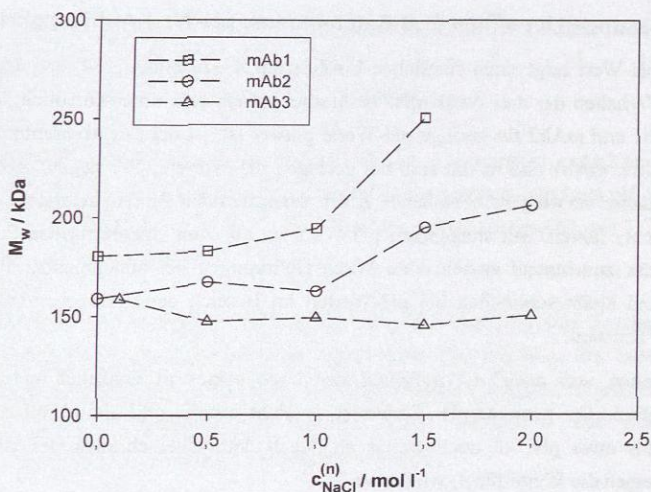


Abbildung 33: Massengemittelte Molmasse M_w von mAb1, mAb2 und mAb3 in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei pH 6,5 und unterschiedlichen NaCl-Konzentration bei 25°C. Das jeweilige M_w des Monomers beträgt für mAb1: 158 kDa, mAb2: 143 kDa und mAb3: 148 kDa.

Die Aggregation scheint von der NaCl-Konzentration abzuhängen. Für Salzkonzentrationen bis $1,0 \text{ mol l}^{-1}$ ist M_w nahezu konstant, wobei M_w jedoch für höhere Salzkonzentrationen bei mAb1 und mAb2 leicht ansteigt. Für mAb3 ergeben sich andere Befunde. Das M_w ist für alle NaCl-Konzentrationen nahezu konstant und entspricht dem Wert des Monomers. Offenbar führt ein negativer Wert von A_2 nicht immer zur Aggregation genauso wenig wie ein positiver Wert von A_2 sicherstellt, dass keine Aggregate auftreten.

Im Vergleich mit den zuvor gezeigten Messungen mit Ammonium-Sulfat ist das M_w bei allen drei Antikörpern für NaCl insgesamt geringer. Auch der unterschiedliche Einfluss der Salze auf M_w kann über die Hofmeisterreihe beschrieben werden. Während sich bei der Zugabe von NaCl die Werte von M_w nur wenig ändern, steigen diese mit zunehmender Ammonium-Sulfatkonzentration deutlich an. Wie zuvor erklärt, ist Ammonium-Sulfat ein kosmotropes Salz auf der linken Seite der Hofmeisterreihe und führt eher zur Aggregation und damit zu höheren Molmassen als NaCl. Curtis et al. [26] beobachteten dasselbe Verhalten für M_w von Lysozym in Lösungen mit Ammonium-Sulfat und NaCl. Es wurden ebenfalls bei steigenden Ammonium-Sulfatkonzentrationen ein höheres M_w und folglich Aggregatbildung festgestellt.

4.4.2 Messungen im offline SLS-Batch-Modus: pH-Wert-Abhängigkeit

Auch der pH-Wert zeigt einen deutlichen Einfluss auf A_2 (Abbildung 34) und M_w (Abbildung 35). Das Verhalten der drei Antikörper ist hierbei jedoch sehr unterschiedlich. Während der A_2 für mAb1 und mAb2 für geringe pH-Werte positiv ist, ist der des Mausantikörpers mAb3 schon negativ. mAb1 und mAb2 sind bei geringen pH-Werten stark negativ geladen und es herrschen daher vorwiegend abstoßende Kräfte zwischen den Proteinen, welche zu positiven Werten für A_2 führen. Mit steigendem pH-Wert bis hin zum isoelektrischen Punkt wird A_2 aufgrund der zunehmend anziehenden Wechselwirkungen bei abnehmender Proteinladung geringer und bleibt schließlich bei pH-Werten im Bereich des pIs von mAb1 und mAb2 annähernd konstant.

Das Verhalten von mAb3 ist aufgrund der Lage seines pI zwischen pH 6,0 und 7,0 unterschiedlich. Bei geringen pH-Werten ist A_2 leicht negativ und nimmt mit zunehmendem pH-Wert bis etwa pH 7,0 noch weiter ab. Nach dem Überschreiten des isoelektrischen Punktes steigen die Werte für A_2 wieder an.

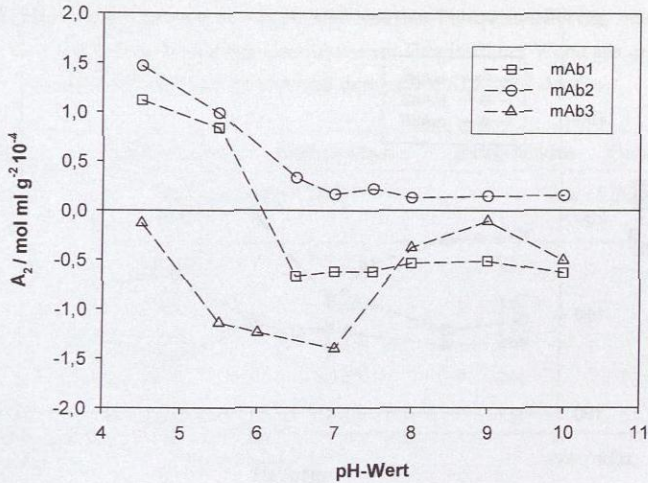


Abbildung 34: Zweiter osmotischer Virialkoeffizient A_2 von mAb1, mAb2 und mAb3 in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei unterschiedlichem pH-Wert und 25°C (pI von mAb1: pH 8,5, mAb2: pH 8,0 und mAb3: pH 7,0).

Ähnliche Ergebnisse für A_2 haben auch Curtis [25] für Lysozym und Tessier [106] für Lysozym und Chymotrypsin veröffentlicht. Nach dem Überschreiten des isoelektrischen Punktes (bei ca. pH 8,0) bleibt A_2 für mAb1 und mAb2 nahezu konstant, ist jedoch für mAb2 leicht positiv und für mAb1 leicht negativ. Dieses Verhalten lässt sich mit der unterschiedlichen Hydrophobizität der Antikörper erklären.

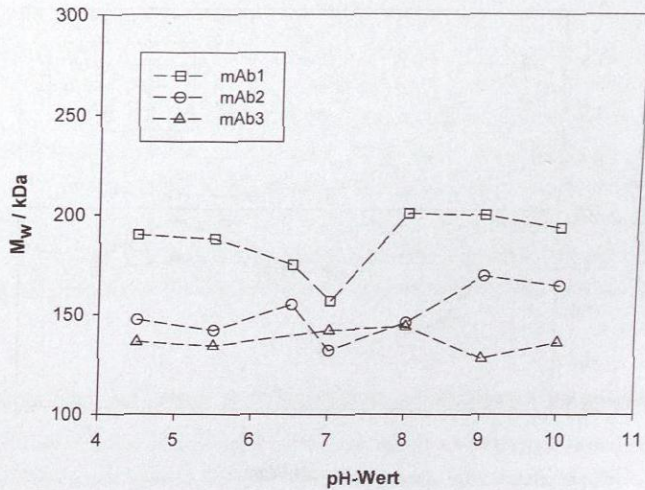


Abbildung 35: Massengemittelte Molmasse M_w von mAb1, mAb2 und mAb3 in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei unterschiedlichem pH-Wert und 25°C. Das jeweilige M_w des Monomers beträgt für mAb1: 158 kDa, mAb2: 143 kDa und mAb3: 148 kDa.

Die Molmassen in Abbildung 35 sind für alle drei Antikörper im Rahmen der Messgenauigkeit konstant und zeigen keinen signifikanten Anstieg wie etwa bei höheren Salzkonzentrationen. Es scheint, also ob der pH-Wert keinen wirklichen Einfluss auf das Aggregationsverhalten der Antikörper hat. Überraschend sind jedoch die höheren M_w -Werte von mAb1 bei geringen pH-Werten. Da sich bei diesen Bedingungen die geladenen Antikörper eher abstoßen, wurden geringere Werte erwartet. Es ist jedoch durchaus denkbar, dass mAb1 bei kleineren pH-Werten instabil ist und erste Aggregate bildet.

4.4.3 Vergleich der online und offline SLS-Messungen

Um die beiden in dieser Arbeit vorgestellten SLS-Messmethoden zu bewerten, wurde ein Vergleich mit Werten von M_w und A_2 durchgeführt, welche jeweils mit beiden Methoden bestimmt wurden. In Tabelle 24 sind die Ergebnisse von mAb3 in verschiedenen Puffersystemen mit unterschiedlichen NaCl- und Ammonium-Sulfatkonzentrationen sowie variierenden pH-Werten zu sehen.

Tabelle 24: A_2 und M_w von mAb3 in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei verschiedenen pH-Werten und Salzkonzentrationen. Vergleich der Werte aus dem offline SLS-Batch-Modus und dem online SLS-SEC-Modus.

Bedingungen	Batch-Modus	Online-Modus	Batch-Modus	Online-Modus
$c_{\text{NaCl}} / \text{mol l}^{-1}$ (pH 6,5)	$A_2 / (\text{mol ml g}^{-2} 10^{-4})$		M_w / kDa	
0.1	-0.14	-0.13	159	149
0.5	0.56	0.75	147	148
1.0	-0.21	-0.24	149	148
1.5	-0.21	-0.25	146	147
2.0	-0.43	-0.83	150	149
$c_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} / \text{mol l}^{-1}$ (pH 6,5)	$A_2 / (\text{mol ml g}^{-2} 10^{-4})$		M_w / kDa	
0.1	0.09	0.02	135	146
0.2	0.30	0.44	137	146
0.4	-0.16	-0.54	168	148
0.6	-1.04	-1.37	168	148
0.8	-1.64	-1.02	172	149
pH-Wert (ohne Salzzugabe)	$A_2 / (\text{mol ml g}^{-2} 10^{-4})$		M_w / kDa	
4.5	-0.13	-1.68	136	146
5.5	-1.14	-1.64	134	147
6.0	-1.24	-3.09	167	149
7.0	-1.40	-4.82	142	148
8.0	-0.38	-0.68	144	148
9.0	-0.11	-0.31	128	146
10.0	-0.51	-0.39	136	148

Da bei der Auswertung des online SLS-SEC-Modus nur der Monomer Peak der Probe betrachtet wird und das Monomer für alle Bedingungen dieselbe Molmasse besitzt, wurde auch hier im online SLS-SEC-Modus durchgehend ein M_w von ca. 148 kDa gemessen. Für den Batch-Modus wiederum wird die gesamte Probe betrachtet, also sowohl Monomer als auch mögliche Aggregate. Daher variieren diese Werte, wie schon zuvor in den Kapiteln 4.4.1 und 4.4.2 gezeigt, in Abhängigkeit der jeweiligen Pufferbedingungen.

Der Vergleich in Tabelle 24 zeigt jedoch, dass es möglich ist, mit beiden vorgestellten Methoden konsistente Ergebnisse für A_2 zu erzielen. Die unsystematischen Abweichungen liegen überwiegend im Rahmen der Messgenauigkeit. Die online Methode hat gegenüber den Batch-Messungen den Vorteil, dass nur eine einzige Probe vermessen werden muss. Sie bietet daher Einsparungen, sowohl bei der Zeit als auch beim Probenmaterial. Der Nachteil ist jedoch, dass bislang nur die Molmasse des Monomers bestimmt werden kann und somit die Aggregation nur indirekt über den A_2 bzw. das Chromatogramm untersucht werden kann.

Bei der Diskussion und Interpretation der SLS-Daten wurde in der vorliegenden Arbeit die Differenz zwischen dem pH-Wert und dem isoelektrischen Punkt verwendet. Alternativ kann statt dem isoelektrischen Punkt auch der so genannte isoionische Punkt verwendet werden, der über Zetapotentialmessungen bestimmt wird [37] und den Einfluss der an das Protein gebundenen Gegenionen berücksichtigt.

5 Zusammenfassung

Monoklonale Antikörper sind therapeutische Proteine mit großem Potential in der modernen Medizin. Durch ihre hohe Bindungsspezifität bieten sie zahlreiche Möglichkeiten im Bereich der Therapeutik und Diagnostik. Sie finden schon heute ihren Einsatz bei der Krebstherapie, im Kampf gegen Autoimmunkrankheiten und der rheumatischen Arthritis. Bei der industriellen Herstellung dieser Proteine werden meist teure chromatographische Trennverfahren eingesetzt und die Prozesse werden häufig im Trial-and-Error Verfahren empirisch ausgelegt. Aufgrund der Fülle an Prozessparametern, wie Temperatur, pH-Wert und Salzkonzentration ist der Adsorptionsmechanismus der Proteine an die Adsorbentmaterialien sehr komplex und teilweise noch unverstanden. Dies trifft auch auf den Zustand und das Verhalten der Proteine in der Lösung zu, wie etwa die Proteinaggregation.

Für eine kostenoptimierte Produktion und ein rationales Design der technischen Trennprozesse ist ein Verständnis der Zusammenhänge zwischen den Prozessparametern, den Vorgängen in der Proteinlösung und dem Adsorptionsvorgang notwendig. Schlecht gewählte Prozessparameter führen zu verringerten Ausbeuten, Kapazitäten und Löslichkeiten, und können zu einer nicht gewünschten Denaturierung der Proteine oder Aggregatbildung führen.

In der vorliegenden Arbeit wurden systematisch thermodynamische Untersuchungen zum Adsorptionsvorgang zweier monoklonaler Antikörper an CEC-Trennmaterialien sowie einige erste Untersuchungen an HIC-Trennmaterialien durchgeführt. Für die CEC-Trennmaterialien wurden in Batch-Experimenten Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen bei unterschiedlichen pH-Werten, Salzkonzentrationen und unterschiedlichen Adsorbentmaterialien aufgenommen. An diese Gleichgewichtsdaten wurden Modelle aus der Literatur angepasst. Zur reinen Korrelation der Meßwerte wurde sowohl das Langmuir-Modell als auch das Langmuir-Freundlich-Modell verwendet. Beide Modelle wurden verglichen und bewertet. Das Langmuir-Freundlich-Modell liefert erwartungsgemäß eine bessere Anpassung der Daten. Für die thermodynamische Betrachtung ist es jedoch aufgrund unphysikalischer Aussagen über den Zustand unendlicher Verdünnung ungeeignet und daher wird hierfür das herkömmliche Langmuir-Modell eingesetzt. Obwohl die Proteinladung mit kleiner werdenden pH-Werten steigt, wird ein pH-Optimum für die maximale Adsorberbeladung bzw. Bindekapazität beobachtet. Die Ursache hierfür dürfte die Abstoßung der stark geladenen adsorbierten Proteine sein.

Zur Beschreibung der Abhängigkeit der Proteinadsorption von der Salzkonzentration wurden das steric mass-action (SMA) und das available area Modell (AA) bewertet. Beide liefern

ähnliche Ergebnisse. Bei pH-Werten nahe dem isoelektrischen Punkt der Antikörper konnte die Abhängigkeit der Adsorption von der Salzkonzentration mit diesen Modellen sehr gut beschrieben werden. Die aus der Anpassung erstellten Modellparameter lassen sich physikalisch sinnvoll interpretieren. Die Antikörpernettoladung ist hier gering. Bei hohen Antikörperladungen, d.h. pH-Werte, die deutlich vom pI abweichen, treffen wesentliche Annahmen beider Modelle nicht mehr zu, sodass sich keine sinnvollen Korrelationen mehr erzielen lassen.

Zusätzlich wurden in der Arbeit unterschiedliche Methoden zur Bestimmung der SMA-Modellparameter vorgestellt und untersucht. Einerseits können die Parameter durch Anpassung an Gleichgewichtsisothermen, andererseits direkt aus Chromatographieläufen bestimmt werden. Es zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung.

Eine weitere Methode, um die thermodynamischen Grundlagen des Adsorptionsmechanismus zu untersuchen, ist die Mikrokalorimetrie. Durch Experimente mit einem isothermen Titrationskalorimeter konnte in Verbindung mit den Ergebnissen der Adsorptionisothermen die spezifische Adsorptionenthalpie Δh_p^{ads} als wichtige thermodynamische Größe bestimmt werden. Δh_p^{ads} ist sowohl vom Beladungszustand des Adsorbers, als auch vom pH-Wert der Pufferlösung abhängig. Entlang der Isotherme ist Δh_p^{ads} nicht konstant und nimmt betragsmäßig ab. In Abhängigkeit der Adsorberbeladung adsorbieren die Antikörper auf unterschiedliche Art und Weise und nehmen andere Konformationen bzw. Orientierungen ein. Während bei neutralen pH-Werten Δh_p^{ads} negativ ist, ist die Adsorption im Sauren dagegen endotherm und entropisch getrieben, verursacht durch den großen Einfluss der Ionenwolke und den bei der Adsorption im Sauren verursachten Entropiegewinn.

Die Kombination aus kalorimetrischen Experimenten und Adsorptionisothermen ermöglicht eine Berechnung der thermodynamischen Parameter der Adsorption $\Delta G_p^{ads,ref}$, $\Delta h_p^{ads,ref}$, $T\Delta S_p^{ads,ref}$ und K_{eq} . Mit diesen Werten konnte eine quantitative Aussage zum Gleichgewichtsverhalten bei der Adsorption getroffen werden. Die maximalen Werte für K_{eq} liegen im schwach Sauren, vergleichbar mit dem pH-Optimum für die maximale Adsorberbeladung. Bei größeren pH-Werten ist die Adsorption exotherm ($\Delta h_p^{ads,ref} < 0$), ebenso ist $\Delta S_p^{ads,ref} < 0$ und die Adsorption daher enthalpisch getrieben. Für geringe pH-Werte ist die Adsorption endotherm ($\Delta h_p^{ads,ref} > 0$) und entropisch getrieben (alle Werte von $\Delta S_p^{ads,ref} > 0$).

Aus den ersten Untersuchungen an HIC-Trennmaterialien wurde anhand der Adsorptionisothermen der große Einfluss verschiedener Salze auf das Adsorptionsverhalten deutlich. Eine höhere Salzkonzentration führt grundsätzlich zu höheren Beladungen des Adsorbers wobei das unterschiedliche Verhalten des jeweiligen Salzes mit der Hofmeisterreihe beschrieben werden kann. Die Adsorption bei der HIC ist im Gegensatz zu CEC-Trennmaterialien grundsätzlich entropisch getrieben ($\Delta S_p^{ads,ref} > 0$) und endotherm ($\Delta h_p^{ads,ref} > 0$). Dies lässt sich mit der Veränderung des Wassers durch die hohen

Salzkonzentrationen beschreiben. Durch die Umstrukturierung der Wassermoleküle erhöht sich die Unordnung bzw. die Entropie des Systems und die Adsorption wird energetisch gesehen durch diesen Entropiegewinn begünstigt.

Im Rahmen dieser Arbeit dienten statische Laserlichtstreuemessungen zur Untersuchung der Wechselwirkungen der gelösten Antikörper. Dabei wurde der zweite osmotische Virialkoeffizient A_2 sowie die massengemittelte Molmasse M_w ermittelt. Bei den Messungen wurden der pH-Wert, die Salzkonzentration und die Salzzart variiert. Mit steigender Salzkonzentration nimmt der A_2 ab und für hohe Salzkonzentrationen wird er negativ, da starke anziehende Wechselwirkungen überwiegen. Hohe Salzkonzentrationen haben aufgrund dieser anziehenden Kräfte und der beginnenden Aggregation ebenfalls ein höheres M_w zur Folge. Die Salzzart hat einen großen Einfluss auf A_2 . Verschiedene Salzzionen wirken sich unterschiedlich auf die Wechselwirkungen zwischen den Antikörpern in der Lösung aus. Dieser Effekt ist bei Proteinen schon lange durch die Hofmeisterreihe bekannt und die hier erzielten Ergebnisse stimmen mit den Aussagen der Hofmeisterreihe überein. Auch der Einfluss des pH-Wertes auf A_2 und M_w wurde für alle drei Antikörper untersucht. Wie erwartet hat die Proteinladung einen großen Einfluss auf elektrostatische Abstoßung und ionische Wechselwirkungen.

Die Lichtstreuemessungen wurden nach zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt. Zum einen im Batch-Modus (SLS-Batch-Modus) und zum anderen im online Modus bei dem ein Laser-Detektor in ein HPLC-System mit SEC-Säulen integriert ist (online SLS-SEC-Modus). Beide Methoden zeigen konsistente Resultate. Zur Auswertung wurden in beiden Fällen selbst entwickelte Programme eingesetzt, die auf dem Debye-Plot basieren. Die online Bestimmung des A_2 war mit der kommerziell erhältlichen Software bislang nicht möglich. Das entwickelte Programm ermöglicht nun die Bestimmung aus einer einzigen Injektion in die HPLC mit nur einer Proteinkonzentration.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass thermodynamische Untersuchungen einen Beitrag zum besseren Verständnis der Proteinadsorption und der Vorgänge sowie der Wechselwirkungen in Proteinlösungen liefern. Dieses Wissen und die hier vorgestellten Methoden und Ergebnisse stellt eine Grundlage dar, um optimale Aufreinigungsbedingungen für ein Protein zu finden.

Anhang

A Analytik

Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteine haben ein UV-Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm. Bei geringen Proteinkonzentrationen ist die UV-Absorption linear von der Proteinkonzentration abhängig. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein UV-VIS-Spektrometer vom Typ Lambda 40 der Firma Perkin Elmer (Waltham, MA, USA) verwendet und die jeweilige Extinktion bei 280 nm vermessen. Höher konzentrierte Lösungen mussten vor der Messung verdünnt werden, als Referenz wurde jeweils der reine Puffer verwendet, der auch zum Verdünnen der Proteine eingesetzt wurde. Mittels Kalibriergeraden (siehe Abbildung 36 bis 38) und der Kalibriergeradengleichungen, Gleichung (83) bis (85), konnten direkt die Konzentrationen bestimmt werden.

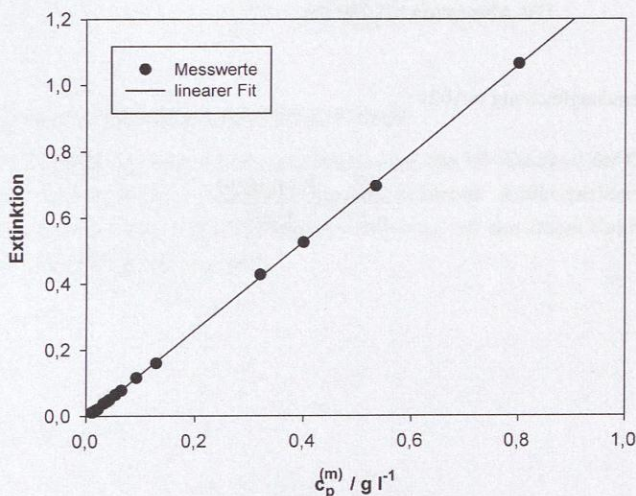


Abbildung 36: Kalibriergerade von mAb1 zur Bestimmung der Proteinkonzentration. UV-Absorption bei 280 nm.

Kalibriergeradengleichung mAb1:

$$\frac{c_p^{(m)}}{g\ l^{-1}} = \frac{E + 0,0063}{1,3338} \quad (83)$$

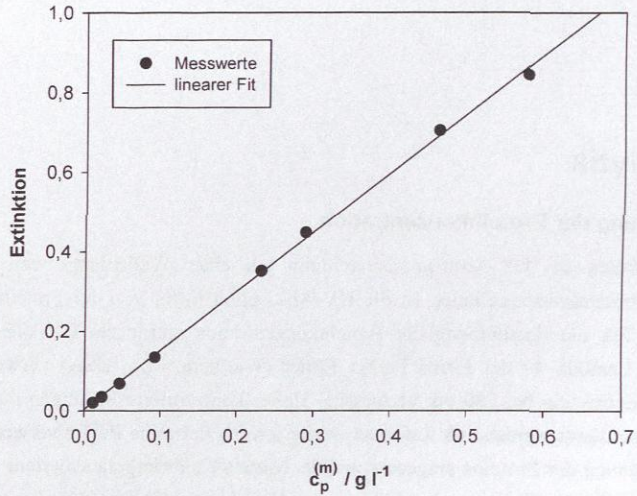


Abbildung 37: Kalibriergerade von mAb2 zur Bestimmung der Proteinkonzentration.
UV-Absorption bei 280 nm.

Kalibriergeradengleichung mAb2:

$$\frac{c_p^{(m)}}{g\ l^{-1}} = \frac{E - 0,0026}{1,507} \quad (84)$$

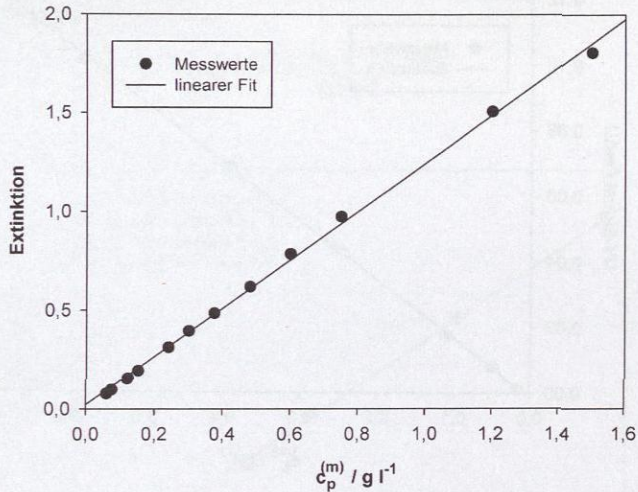


Abbildung 38: Kalibriergerade von mAb3 zur Bestimmung der Proteinkonzentration.
UV-Absorption bei 280 nm.

Kalibriergeradengleichung mAb3:

$$\frac{c_p^{(m)}}{\text{g l}^{-1}} = \frac{E + 0,0004}{1,3012} \quad (85)$$

Kalibrierung des UV-Detektors der HPLC-Anlage

Zur online Bestimmung der Antikörperkonzentration über den UV-Detektor der GPC-Anlage wurden für die drei Antikörper Verdünnungsreihen bekannter Antikörperkonzentrationen hergestellt. Diese wurden mit dem UV-Detektor vermessen, mit den Daten Kalibriergeraden erstellt und Geradengleichungen bestimmt.

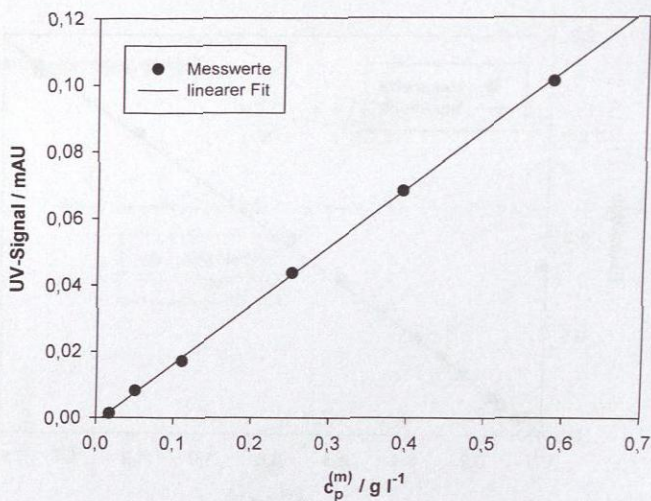


Abbildung 39: Kalibriergerade von mAb1 zur Bestimmung der Proteinkonzentration über den UV-Detektor der HPLC-Anlage bei 280 nm.

Kalibriergeradengleichung mAb1:

$$\frac{c_p^{(m)}}{\text{g l}^{-1}} = \frac{UV(\text{mAU})^{-1} + 0,0013}{0,1775} \quad (86)$$

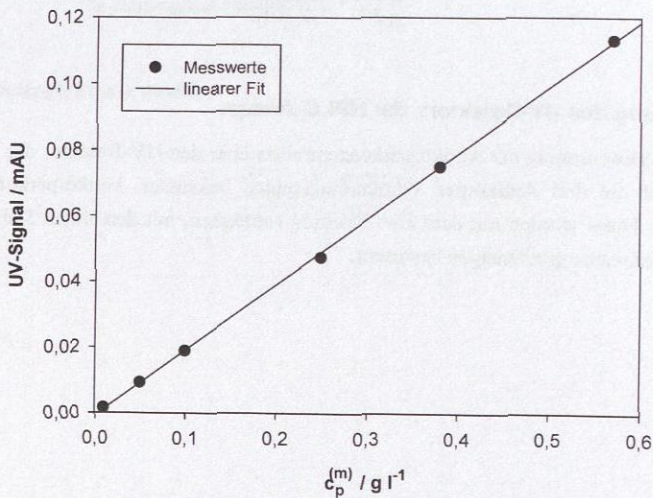


Abbildung 40: Kalibriergerade von mAb2 zur Bestimmung der Proteinkonzentration über den UV-Detektor der HPLC-Anlage bei 280 nm.

Kalibriergeradengleichung mAb2:

$$\frac{c_p^{(m)}}{\text{g l}^{-1}} = \frac{UV(\text{mAU})^{-1} + 0,0009}{0,1992} \quad (87)$$

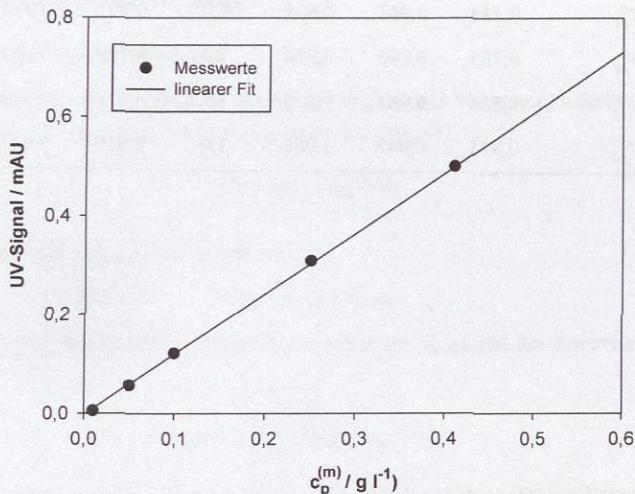


Abbildung 41: Kalibriergerade von mAb3 zur Bestimmung der Proteinkonzentration über den UV-Detektor der HPLC-Anlage bei 280 nm.

Kalibriergeradengleichung mAb3:

$$\frac{c_p^{(m)}}{\text{g l}^{-1}} = \frac{UV(\text{mAU})^{-1} + 0,0025}{1,2225} \quad (88)$$

Kalibrierung und Normalisierung des Laserlichtstreudetektors

Das Laserlichtstreugerät wurde mit Toluol kalibriert, die Kalibrierkonstante k_{cal} wurde mit $3,579 \cdot 10^6$ bestimmt. Vor jeder Messreihe wurde eine Normalisierung des Lasers durchgeführt. Dies erfolgte mit einer Pullulanlösung ($M_w = 100$ kDa) mit einer Konzentration von 2 g l^{-1} . Für die mAb1-Messreihe wurde der Normalisierungsfaktor N_{p1}^θ , für die mAb2-Messreihe der Normalisierungsfaktor N_{p2}^θ , für die mAb3-Messreihe der Normalisierungsfaktor N_{p3}^θ und für die online SLS-SEC-Messreihen der Normalisierungsfaktor N_{p4}^θ verwendet. Die Werte sind in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: Normalisierungsfaktoren des Laserlichtstreuendetektors.

Normalisierungs- faktor	Winkel θ						
	35°	50°	75°	90°	105°	130°	145°
N_{p1}^{θ}	0,744	0,901	0,936	1,0	0,791	0,913	0,706
N_{p2}^{θ}	0,785	0,893	0,924	1,0	0,799	0,899	0,689
N_{p3}^{θ}	0,524	0,904	0,956	1,0	0,813	0,939	0,728
N_{p4}^{θ}	0,813	0,947	1,083	1,0	0,819	0,917	0,858

B Probenvorbereitung

Herstellung der Pufferlösungen

Die Verhältnisse von Säure und Base zur Einstellung des pH-Werts der Pufferlösung wurden über die Henderson-Hasselbalch Gleichung berechnet [50, 87].

$$\text{pH} = \text{pK}_s + \log \frac{c_{\text{Base}}}{c_{\text{Säure}}} \quad (89)$$

Daraus lässt sich durch Umformung und mit

$$c_{\text{Base}} + c_{\text{Säure}} = c_{\text{Puffer}} \quad (90)$$

die einzuwiegende Stoffmenge an Base für ein Volumen V_{Puffer} mit der Konzentration c_{Puffer} berechnen.

$$n_{\text{Base}} = \frac{10^{(\text{pH}-\text{pK}_s)}}{1+10^{(\text{pH}-\text{pK}_s)}} c_{\text{Puffer}} \cdot V_{\text{Puffer}} \quad (91)$$

Die Menge an Säure lässt sich dann nach Gleichung (90) berechnen. Die Stoffmengen werden über die Molmassen in Massen umgerechnet.

Weitere Daten für Natriumphosphat-Puffer:

- Molmasse $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $177,99 \text{ g mol}^{-1}$
- Molmasse $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $156,01 \text{ g mol}^{-1}$

Die Konzentration an Natriumkationen ist aufgrund der zwei Natriumkationen der Base nicht identisch mit der Phosphatkonzentration und variiert je nach pH-Wert. Sie wird jedoch für die Modellierung häufig benötigt und kann leicht berechnet werden. Der Einfachheit halber sind die Natriumionenkonzentrationen der in dieser Arbeit verwendeten Pufferlösungen in Tabelle 26 angegeben.

Tabelle 26: Natriumionenkonzentration von Natrium-Phosphatpuffern.

pH-Wert	Phosphatpuffer / mM	$c_{Na^+}^{(n)} / \text{mmol l}^{-1}$
4,5	20	20,1
	35	35,2
	50	50,2
5,0	20	20,3
	50	50,7
	80	81,1
6,0	20	22,4
	50	56,0
	80	89,6
6,5	20	26,0
7,0	20	31,5
	50	78,9
	80	126,2

C Experimentelle Ergebnisse

C 1 Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen

Die Tabellen 27-36 fassen die Ergebnisse aller aufgenommenen Gleichgewichtsisothermen zusammen. Die Daten sind hierbei in derselben Art und Weise zusammengefasst wie in den zuvor gezeigten Schaubildern der Adsorptionsisothermen aus Kapitel 4.

Tabelle 27: Experimentelle Daten der Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen von mAb1 in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei 25°C.

Fractogel EMD SO ₃ ⁻				Fractogel EMD SE Hicap			
pH 6,5		pH 7,0		pH 6,5		pH 7,0	
$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹	$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹	$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹	$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹
0,008	157,9	0,002	36,7	0,016	156,7	0,004	36,4
0,010	476,2	0,004	79,1	0,016	156,7	0,006	78,6
0,013	316,3	0,016	156,9	0,016	315,8	0,013	156,9
0,019	315,5	0,038	312,9	0,015	316,1	0,014	156,6
0,021	633,7	0,039	470,8	0,018	474,9	0,022	314,1
0,031	632,0	0,040	469,5	0,021	474,4	0,050	468,4
0,378	741,8	0,292	588,2	0,033	631,7	0,060	467,2
0,630	721,5	0,303	597,6	0,031	632,1	0,312	595,3
0,898	798,0	0,805	665,7	0,269	759,3	0,401	591,0
1,451	759,6	1,715	679,8	0,239	764,2	0,886	653,0
1,555	762,9	1,783	668,8	0,892	818,9	0,900	650,6
1,759	780,5	2,671	685,5	1,846	825,6	1,641	690,4
2,604	780,5	2,759	671,7	2,960	823,2	2,569	702,9
		3,634	691,0			3,371	732,4

Tabelle 28: Experimentelle Daten der Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen von mAb2 an Fractogel EMD SO_3^- in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei 25°C.

pH 4,5		pH 5,5		pH 6,5		pH 7,0	
$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹	$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹	$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹	$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹
0,002	162,8	0,001	74,3	0,002	22,6	0,027	27,6
0,004	162,5	0,002	156,5	0,007	82,8	0,036	27,2
0,005	325,5	0,006	312,4	0,009	158,8	0,065	73,2
0,013	324,2	0,008	312,0	0,027	317,6	0,064	72,6
0,076	469,1	0,011	468,2	0,026	317,7	0,123	139,5
0,087	467,3	0,012	468,1	0,055	472,5	0,133	137,9
0,231	599,3	0,053	625,4	0,064	471,5	0,442	251,4
0,304	588,2	0,0840	622,0	0,213	530,5	0,471	246,8
0,626	600,5	0,589	705,7	0,269	600,0	1,051	319,0
0,828	668,2	0,658	714,6	0,459	569,2	1,091	313,0
1,025	708,2	1,237	766,0	0,688	609,2	1,772	367,8
1,580	658,5	1,266	760,9	1,567	590,4	2,713	380,9
1,841	660,6	1,365	745,2	1,767	633,2	2,784	369,9
2,072	667,9	1,504	780,1	1,795	637,6	3,605	396,6
2,174	665,0	2,033	793,9	1,865	643,3	3,666	388,1
2,366	739,7	2,104	783,6	2,904	637,7	4,497	412,6
2,608	701,0	2,885	807,6	3,123	621,6	4,558	402,5
3,210	747,6	3,326	790,4	3,172	613,7		
3,469	727,7	4,387	789,1	5,183	614,0		
		4,728	769,4	5,684	662,5		

Tabelle 29: Experimentelle Daten der Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen von mAb2 an Fractogel EMD SE Hicap in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei 25°C.

pH 4,5		pH 5,5		pH 6,5		pH 7,0	
$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹	$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹	$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹	$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹
0,020	319,8	0,002	156,4	0,001	162,6	0,054	94,2
0,020	473,3	0,002	156,4	0,002	162,2	0,055	93,9
0,023	157,8	0,003	81,6	0,004	317,5	0,122	185,6
0,035	157,6	0,004	312,7	0,008	316,8	0,126	184,8
0,041	316,4	0,004	81,5	0,018	477,7	0,324	285,0
0,065	466,1	0,006	312,4	0,029	475,8	0,328	284,3
0,086	624,3	0,009	468,6	0,373	583,2	0,991	431,5
0,110	620,3	0,010	468,5	0,432	573,8	1,111	407,7
0,513	717,4	0,021	630,8	0,719	683,6	1,664	471,9
0,577	707,2	0,024	630,2	0,999	638,8	1,837	437,4
1,338	746,9	0,276	754,1	1,483	703,7	2,293	550,2
1,346	745,7	0,296	750,9	1,818	670,2	2,349	539,0
1,550	735,7	0,837	828,4	2,879	656,0	4,020	581,6
1,601	740,5	1,011	800,6	2,922	649,2	4,106	564,4
2,962	737,5	1,024	798,6	3,577	706,8	5,321	685,4
		1,086	788,6	3,721	683,8	5,400	669,5
		1,433	879,8	4,414	715,4	6,814	682,3
		1,827	826,6	4,571	710,2	6,827	679,6
		2,282	893,0	5,447	725,7		
		2,514	870,8	5,776	673,1		
		3,257	871,3				
		3,715	808,0				
		4,369	842,5				

Tabelle 30: Experimentelle Daten der Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen von mAb1 und mAb2 an Fractogel EMD SO_3^- in 20 mM Natrium-Acetatpuffer bei 25°C.

mAb1				mAb2			
pH 4,5		pH 6,5		pH 4,5		pH 6,5	
$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹	$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹	$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹	$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹
0,021	317,9	0,015	76,8	0,008	34,8	0,006	35,0
0,024	75,5	0,017	75,8	0,011	34,3	0,014	33,6
0,028	316,8	0,020	316,8	0,025	313,1	0,021	312,6
0,050	71,3	0,021	317,4	0,033	311,8	0,039	309,7
0,116	461,6	0,022	636,7	0,280	431,0	0,043	474,1
0,160	454,5	0,031	635,2	0,287	429,8	0,046	473,7
0,567	548,1	0,157	773,5	0,784	508,8	0,250	599,1
0,608	541,6	0,221	763,3	0,799	506,4	0,250	599,0
1,352	585,1	0,838	826,2	1,307	583,8	0,693	686,1
1,494	562,3	0,891	817,8	1,478	556,4	0,837	663,0
2,266	597,5	1,018	797,4	1,511	551,1	0,910	651,3
2,281	595,1	1,104	783,6	1,546	545,6	0,934	647,6
2,349	584,3	1,296	803,1	2,222	603,1	2,525	716,2
4,321	590,1	1,775	834,6	2,252	598,3	2,680	691,2
4,369	582,3	1,877	818,4	2,866	658,6	3,360	740,4
5,648	634,0	2,750	840,4	3,480	560,5	3,364	739,9
5,798	602,5	2,825	828,4	4,070	624,6	3,390	735,6
		3,170	864,3	4,147	612,4	3,457	725,0
		3,282	840,7	5,553	635,8		

Tabelle 31: Experimentelle Daten der Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen von mAb2 an Fractogel EMD SO₃⁻ in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei pH 7,0 und 25°C.

0 mM NaCl		10 mM NaCl		30 mM NaCl	
$c_p^{(m)} / \text{g l}^{-1}$	$q_p^{(m)} / \text{mg g}^{-1}$	$c_p^{(m)} / \text{g l}^{-1}$	$q_p^{(m)} / \text{mg g}^{-1}$	$c_p^{(m)} / \text{g l}^{-1}$	$q_p^{(m)} / \text{mg g}^{-1}$
0,067	68,1	0,263	38,2	0,473	6,2
0,165	131,4	0,511	78,8	0,906	13,4
0,354	185,3	1,137	139,2	1,865	23,7
0,576	228,7	1,483	164,1	2,290	32,2
0,829	267,1	1,879	181,1	2,790	34,1
1,129	298,0	2,298	194,3	3,317	31,7
1,521	314,2	2,693	206,8	3,752	38,5
1,949	329,9	3,110	220,5	4,325	28,7
2,465	326,2	3,508	237,1	4,763	40,5
2,873	339,9	3,964	244,3	5,194	48,0
3,325	346,4	4,357	261,7	5,785	35,4
3,789	356,3	4,869	260,1	6,203	45,0
4,824	348,5	5,274	275,6	6,626	59,2
5,619	379,1	5,747	280,3	7,244	42,2
6,575	389,3	6,211	286,3	7,615	59,2

Tabelle 32: Experimentelle Daten der Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen von mAb2 an Fractogel EMD SO_3^- in Natrium-Phosphatpuffer bei pH 6,0 und 25°C.

20 mM Natrium-Phosphat		50 mM Natrium-Phosphat		80 mM Natrium-Phosphat	
$c_p^{(m)} / \text{g l}^{-1}$	$q_p^{(m)} / \text{mg g}^{-1}$	$c_p^{(m)} / \text{g l}^{-1}$	$q_p^{(m)} / \text{mg g}^{-1}$	$c_p^{(m)} / \text{g l}^{-1}$	$q_p^{(m)} / \text{mg g}^{-1}$
0,005	79,3	0,013	76,6	0,333	19,7
0,006	159,6	0,173	292,7	0,353	23,0
0,007	319,6	0,204	287,7	0,743	41,2
0,007	159,3	0,690	367,2	0,747	40,5
0,008	319,5	0,708	364,5	1,534	74,7
0,014	478,8	1,414	414,4	1,536	74,2
0,015	478,7	1,465	406,3	2,276	115,9
0,111	623,7	2,245	438,8	2,361	102,3
0,120	622,3	2,277	433,7	3,221	124,7
0,784	676,3	3,015	478,6	3,258	118,7
1,148	618,2	3,165	454,7	4,166	133,5
2,525	714,4	3,980	481,5	4,177	131,8
2,777	674,0	4,071	467,1	5,031	155,1
3,971	643,3	4,783	516,1	5,116	141,5
4,070	627,4	4,803	512,9	6,003	159,7

Tabelle 33: Experimentelle Daten der Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen von mAb2 an Fractogel EMD SE Hicap in Natrium-Phosphatpuffer bei pH 6,0.

20 mM Natrium-Phosphat		50 mM Natrium-Phosphat		80 mM Natrium-Phosphat	
$c_p^{(m)} / \text{g l}^{-1}$	$q_p^{(m)} / \text{mg g}^{-1}$	$c_p^{(m)} / \text{g l}^{-1}$	$q_p^{(m)} / \text{mg g}^{-1}$	$c_p^{(m)} / \text{g l}^{-1}$	$q_p^{(m)} / \text{mg g}^{-1}$
0,006	80,7	0,027	74,3	0,410	10,6
0,006	319,3	0,059	148,0	0,415	9,8
0,010	155,5	0,060	147,8	0,836	26,3
0,013	475,2	0,272	276,8	0,841	25,4
0,015	154,6	0,293	273,5	1,640	57,7
0,016	474,7	0,711	363,9	1,642	57,2
0,016	317,7	0,726	361,6	2,521	76,8
0,031	635,6	1,458	407,4	2,536	74,2
0,037	634,7	1,550	392,7	3,375	100,1
0,402	733,3	3,095	465,8	3,402	95,8
0,407	732,4	3,317	430,3	4,219	125,0
2,062	788,0	4,055	469,6	4,341	105,5
2,098	782,1	4,140	456,0	5,207	127,1
3,102	784,9	4,816	510,8	5,297	112,6
3,161	775,3	4,876	501,2	6,104	143,5

Tabelle 34: Experimentelle Daten der Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen von mAb2 an Toyopearl SP550C in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei pH 6,0 und 25°C.

0 mM NaCl		30 mM NaCl		60 mM NaCl	
$c_p^{(m)} / \text{g l}^{-1}$	$q_p^{(m)} / \text{mg g}^{-1}$	$c_p^{(m)} / \text{g l}^{-1}$	$q_p^{(m)} / \text{mg g}^{-1}$	$c_p^{(m)} / \text{g l}^{-1}$	$q_p^{(m)} / \text{mg g}^{-1}$
0,002	78,0	0,020	78,1	0,384	16,6
0,002	161,5	0,171	135,1	0,816	30,5
0,039	233,9	0,432	168,7	1,212	45,1
0,215	284,1	0,862	181,0	1,727	45,7
0,577	309,6	1,366	181,6	2,181	51,2
0,941	329,7	1,727	205,0	2,606	61,3
1,167	371,8	2,338	188,5	3,078	68,7
1,757	361,0	2,805	189,2	3,556	70,4
2,301	352,2	3,256	198,2	3,964	87,9
2,604	382,0	3,709	207,0	4,384	98,9
3,228	365,8	4,216	207,0	4,893	95,5
3,567	389,8	4,831	189,9	5,440	90,9
4,532	397,1	5,718	204,5	6,428	94,0
5,612	380,9	6,826	189,7	7,285	113,0
6,581	387,7	7,683	209,1	8,453	87,2

Tabelle 35: Experimentelle Daten der Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen von mAb2 an Fractogel EMD SE Hicap in Natrium-Phosphatpuffer bei pH 4,5 und 25°C.

20 mM Natrium-Phosphat		35 mM Natrium-Phosphat		50 mM Natrium-Phosphat	
$c_p^{(m)} / \text{g l}^{-1}$	$q_p^{(m)} / \text{mg g}^{-1}$	$c_p^{(m)} / \text{g l}^{-1}$	$q_p^{(m)} / \text{mg g}^{-1}$	$c_p^{(m)} / \text{g l}^{-1}$	$q_p^{(m)} / \text{mg g}^{-1}$
0,035	157,6	0,002	77,7	0,004	79,4
0,023	157,8	0,002	317,6	0,006	159,3
0,041	316,4	0,003	479,5	0,011	318,6
0,020	319,8	0,003	161,5	0,012	158,2
0,065	466,1	0,006	479,1	0,014	318,2
0,020	473,3	0,008	640,7	0,018	477,7
0,110	620,3	0,009	640,6	0,020	477,4
0,086	624,3	0,807	668,9	0,282	595,5
0,577	707,2	1,964	645,8	0,355	583,9
0,513	717,4	2,033	634,8	2,013	638,9
1,601	705,0	2,781	677,1	2,045	633,8
1,550	713,1	2,866	663,5	2,903	656,7
1,346	745,7	3,826	665,8	3,073	629,5
1,338	746,9	3,927	649,6	3,996	641,9
2,962	737,5			4,230	604,5

Tabelle 36: Experimentelle Daten der Gleichgewichts-Adsorptionsisothermen von mAb2 an Toyopearl Butyl in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei pH 6,5 und 25°C.

0,2 M K-Citrat + 2,0 M NaCl		0,8 M Ammonium- Sulfat		2,0 M NaCl		0,6 M Ammonium- Sulfat		1,2 M NaCl	
$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹	$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹	$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹	$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹	$c_p^{(m)}$ g l ⁻¹	$q_p^{(m)}$ mg g ⁻¹
0,011	35,5	0,001	10,4	0,003	9,6	0,001	9,6	0,001	7,8
0,013	72,6	0,002	26,2	0,006	39,0	0,001	9,6	0,001	7,8
0,018	72,7	0,004	25,7	0,008	78,3	0,002	40,6	0,002	23,5
0,021	142,6	0,005	82,1	0,009	38,7	0,002	40,3	0,004	23,3
0,023	142,5	0,006	81,8	0,010	9,1	0,027	78,7	0,007	38,9
0,390	189,5	0,221	130,4	0,011	78,0	0,031	78,5	0,008	38,8
0,413	187,8	0,238	127,5	0,321	132,1	0,593	112,0	0,103	72,9
1,154	205,1	1,004	164,3	0,323	132,0	0,603	111,2	0,111	72,1
1,217	200,6	1,064	154,7	1,158	147,4	1,477	122,2	0,645	97,9
1,967	220,0	1,914	178,1	1,185	145,2	1,494	120,9	0,648	97,6
2,010	216,9	2,919	176,5	2,072	152,1	2,481	120,4	1,348	106,9
2,020	216,2	2,949	171,7	2,939	162,7	2,524	117,0	1,363	105,4
3,938	222,1	3,831	189,8	2,975	159,8	4,279	138,4	2,120	108,9
3,991	218,3	3,868	184,0	3,095	150,3	4,279	138,2	2,126	108,4
4,724	229,7	4,601	193,8	3,111	148,9	4,326	134,7	2,885	111,7
4,750	227,2	4,701	177,9	3,911	166,8	4,359	132,0	2,887	111,4
		5,344	207,0	4,060	154,9	4,419	136,0	2,893	110,9
		5,358	195,9					2,906	109,6
		5,388	200,1						

C 2 Ergebnisse der Laserlichtstreuungen

Die nachfolgenden Tabellen fassen die Ergebnisse aller Laserlichtstreuungen zusammen.

Tabelle 37: Ergebnisse der Laserlichtstreuungen von mAb1
in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei unterschiedlichen Bedingungen.

pH-Wert	c_{Salz} mol l ⁻¹	dn/dc ml g ⁻¹	n_0	A_2 mol ml g ⁻² 10 ⁻⁴	M_w kDa
4,5	-	0,1737	1,3310	1,1184	190
5,5	-	0,1922	1,3308	0,8383	187
6,5	-	0,1914	1,3310	-0,6724	180
7,0	-	0,2004	1,3305	-0,6230	156
7,5	-	0,1834	1,3310	-0,6235	193
8,0	-	0,1741	1,3310	-0,5377	200
9,0	-	0,1766	1,3308	-0,5168	200
10,0	-	0,1917	1,3306	-0,6371	193
pH-Wert	$c_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$ mol l ⁻¹	dn/dc ml g ⁻¹	n_0	A_2 mol ml g ⁻² 10 ⁻⁴	M_w kDa
6,5	0,2	0,1501	1,3353	-0,0475	237
	0,4	0,1498	1,3395	-0,0741	262
	0,6	0,1334	1,3432	-0,1993	257
	0,8	0,1203	1,3470	-0,6733	274
pH-Wert	c_{NaCl} mol l ⁻¹	dn/dc ml g ⁻¹	n_0	A_2 mol ml g ⁻² 10 ⁻⁴	M_w kDa
6,5	0,5	0,1899	1,3355	0,2767	183
	1,0	0,1730	1,3405	0,6566	194
	1,5	0,1517	1,3453	0,0510	250
	2,0	0,087	1,3495	-0,0263	698

Tabelle 38: Ergebnisse der Laserlichtstreuungsmessungen von mAb2
in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei unterschiedlichen Bedingungen.

pH-Wert	c_{Salz} mol l^{-1}	dn/dc ml g^{-1}	n_0	A_2 $\text{mol ml g}^{-2} 10^{-4}$	M_w kDa
4,5	-	0,2136	1,3308	1,4665	147
5,5	-	0,2166	1,3308	0,9891	141
6,5	-	0,2047	1,3310	0,3312	161
7,0	-	0,2236	1,3304	0,1639	132
7,5	-	0,1903	1,3308	0,2207	177
8,0	-	0,2138	1,3305	0,1267	145
9,0	-	0,1975	1,3306	0,1460	169
10,0	-	0,2321	1,3306	0,1513	164
pH-Wert	$c_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$ mol l^{-1}	dn/dc ml g^{-1}	n_0	A_2 $\text{mol ml g}^{-2} 10^{-4}$	M_w kDa
6,5	0,2	0,1555	1,3348	0,0559	149
	0,4	0,1403	1,3390	-0,0413	233
	0,6	0,1066	1,3432	-0,3966	255
	0,8	0,078	1,3473	-0,4370	291
pH-Wert	c_{NaCl} mol l^{-1}	dn/dc ml g^{-1}	n_0	A_2 $\text{mol ml g}^{-2} 10^{-4}$	M_w kDa
6,5	0,5	0,1962	1,3365	0,2273	167
	1,0	0,1906	1,3410	0,2538	162
	1,5	0,1678	1,3453	-0,0715	195
	2,0	0,1582	1,350	-0,2390	206

Tabelle 39: Ergebnisse der Laserlichtstreuungsmessungen von mAb3
in 20 mM Natrium-Phosphatpuffer bei unterschiedlichen Bedingungen.

pH-Wert	c_{Salz} mol l^{-1}	dn/dc ml g^{-1}	n_0	A_2 $\text{mol ml g}^{-2}10^{-4}$	M_w kDa
4,5	-	0,1539	1,3306	-0,1300	136
5,5	-	0,1999	1,3302	-1,1400	134
6,0	-	0,1657	1,3305	-1,2400	186
7,0	-	0,1813	1,3304	-1,4000	142
8,0	-	0,1865	1,3306	-0,3800	144
9,0	-	0,1956	1,3312	-0,1100	128
10,0	-	0,186	1,3309	-0,5121	136
pH-Wert	$c_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$ mol l^{-1}	dn/dc ml g^{-1}	n_0	A_2 $\text{mol ml g}^{-2}10^{-4}$	M_w kDa
6,0	0,1	0,1432	1,3331	0,0900	135
	0,2	0,1903	1,3351	0,3000	137
	0,4	0,1618	1,3394	-0,1600	167
	0,6	0,1714	1,3428	-1,0400	168
	0,8	0,1979	1,3466	-1,6400	172
pH-Wert	c_{NaCl} mol l^{-1}	dn/dc ml g^{-1}	n_0	A_2 $\text{mol ml g}^{-2}10^{-4}$	M_w kDa
6,0	0,1	0,1973	1,3315	-0,1363	158
	0,5	0,1486	1,336	0,5636	147
	1,0	0,1687	1,3403	-0,2061	149
	1,5	0,1676	1,3447	-0,2063	145
	2,0	0,1626	1,3486	-0,4304	150

Literaturverzeichnis

1. Protein Separations' Handbook Collection, Amersham Biosciences, Uppsala Schweden, (2003).
2. M.H. ABRAHAM, J. LISZI: Calculations on ionic solvation, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **15** (1982) 197-356.
3. K. AHRER, A. BUCHACHER, G. IBERER, D. JOSIC, A. JUNGBAUER: Analysis of aggregates of human immunoglobulin G using size-exclusion chromatography, static and dynamic light scattering, *Journal of Chromatography A* **1009** (2003) 89-96.
4. K. AHRER, A. BUCHACHER, G. IBERER, A. JUNGBAUER: Detection of aggregate formation during production of human immunoglobulin G by means of light scattering, *Journal of Chromatography A* **1043** (2004) 41-46.
5. A. AITOMÄKI, I. VIITA, A. VÄLIMÄKI: Isothermal Calorimeter for Measuring Heat of Adsorption, *Experimental Thermal and Fluid Science* **5** (1992) 570-573.
6. T. ARAKAWA, S.N. TIMASHEFF: Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding, *Biochemistry* **23** (1984) 5912-5923.
7. T. ARAKAWA, S.N. TIMASHEFF: Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions, *Biochemistry* **21** (1982) 6545-6552.
8. D.P. ASTHAGIRI, A.; ABRAS, D.; LENHOFF, A. M. PAULAITIS: A consistent experimental and modeling approach to light-scattering studies of protein-protein interactions in solution, *Biophysical Journal* **88** (2005) 3300-3309.
9. H. BAJAJ, V.K. SHARMA, A. BADKAR, D. ZENG, S. NEMA, D.S. KALONIA: Protein structural conformation and not second virial coefficient relates to long-term irreversible aggregation of a monoclonal antibody and ovalbumin in solution, *Pharmaceutical Research* **23** (2006) 1382-1394.
10. H. BAJAJ, V.K. SHARMA, D.S. KALONIA: Determination of second virial coefficient of proteins using a dual-detector cell for simultaneous measurement of scattered light intensity and concentration in SEC-HPLC, *Biophysical Journal* **87** (2004) 4048-4055.
11. V. BALL, J.J. RAMSDEN: Buffer Dependence of Refractive Index Increments of Protein Solutions, *Biopolymers* **46** (1998) 489-492.

12. J.C.C. BELLOT: Modelling of liquid chromatography equilibria, *Process Biochemistry* **28** (1993) 365-376.
13. J. BLOUSTINE, V. BEREJNOV, S. FRADEN: Measurements of protein-protein interactions by size exclusion chromatography, *Biophysical Journal* **85** (2003) 2619-2623.
14. F. BONNETE, D. VIVARES: Interest of the normalized second virial coefficient and interaction potentials for crystallizing large macromolecules, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **58** (2002) 1571-1575.
15. J.C. BOSMA, J.A. WESSELINGH: Available area isotherm, *AIChE Journal* **50** (2004) 848-853.
16. J.C. BOSMA, J.A. WESSELINGH: pH dependence of ion-exchange equilibrium of proteins, *AIChE Journal* **44** (1998) 2399-2409.
17. W.R. BOWEN, D.T. HUGHES: Ion Exchange of Proteins: A Microcalorimetric Study of Adsorption of Bovine Serum Albumin on Anion-Exchange Materials, *Journal of Colloid and Interface Science* **158** (1993) 395-402.
18. C.A. BROOKS, S.M. CRAMER: Steric mass-action ion exchange: Displacement profiles and induced salt gradients, *AIChE Journal* **38** (1992) 1969-1978.
19. P. CARTER, L. PRESTA, C.M. GORMAN, J.B. RIDGWAY, D. HENNER, W.L. WONG, A.M. ROWLAND, C. KOTTS, M.E. CARVER, H.M. SHEPARD: Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89** (1992) 4285-4289.
20. J.L. CLELAND, M.F. POWELL, S.J. SHIRE: The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **10** (1993) 307-377.
21. M.J. CLIFF, J.E. LADBURY: A survey of the year 2002 literature on applications of isothermal titration calorimetry, *Journal of Molecular Recognition* **16** (2003) 383-91.
22. K.D. COLLINS: Ion hydration: Implications for cellular function, polyelectrolytes, and protein crystallization, *Biophysical Chemistry* **119** (2006) 271-281.
23. M.R. COUNCIL: Stories of discovery: Therapeutic antibodies. London, UK, (2008).
24. T.E. CREIGHTON: Proteins, structure and molecular properties. W.E. Freeman, New York, (1984).
25. R.A. CURTIS, J.M. PRAUSNITZ, H.W. BLANCH: Protein-protein and protein-salt interactions in aqueous protein solutions containing concentrated electrolytes, *Biotechnology and Bioengineering* **57** (1998) 11-21.

26. R.A. CURTIS, C. STEINBRECHER, M. HEINEMANN, H.W. BLANCH, J.M. PRAUSNITZ: Hydrophobic forces between protein molecules in aqueous solutions of concentrated electrolyte, *Biophysical Chemistry* **98** (2002) 249-265.
27. R.A. CURTIS, J. ULRICH, A. MONTASER, J.M. PRAUSNITZ, H.W. BLANCH: Protein-protein interactions in concentrated electrolyte solutions, *Biotechnology and Bioengineering* **79** (2002) 367-380.
28. P. DEBYE: Molecular weight determination by light scattering, *Journal of Physical and Colloid Chemistry* **51** (1947) 18-32.
29. T.M. DINGERMAN, H.: Monoklonale Antikörper: Gezielte Therapie mit Hightech-Arzneimittel, *Pharmazeutische Zeitung* **145** (2000) 4187-4190.
30. F. DISMER, J. HUBBUCH: A novel approach to characterize the binding orientation of lysozyme on ion-exchange resins, *Journal of Chromatography A* **1149** (2007) 312-320.
31. S.R. DZIENNIK, E.B. BELCHER, G.A. BARKER, A.M. LENHOFF: Effects of ionic strength on lysozyme uptake rates in cation exchangers. I: Uptake in SP Sepharose FF, *Biotechnology and Bioengineering* **91** (2005) 139-153.
32. H.J. EISENBERG, R. REISLER: Scattering correction to the absorbance, wavelength dependence of the refractive index increment, and molecular weight of the bovine liver glutamate dehydrogenase oligomer and subunits, *Biopolymers* **16** (1977) 2773-2783.
33. A.H.M. ELCOCK: Calculation of weak protein-protein interactions: the pH dependence of the second virial coefficient, *Biophysical Journal* **80** (2001) 613-625.
34. H. ENGELHARDT: One century of liquid chromatography. From Tswett's columns to modern high speed and high performance separations, *Journal of Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci* **800** (2004) 3-6.
35. A. FAUDE: Novel Electrokinetic Approaches to Improve Purification Processes with Monoclonal Antibodies. Universität Stuttgart, Stuttgart, (2008).
36. A. FAUDE: Private Mitteilung: Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart. (2006).
37. A. FAUDE, D. ZACHER, E. MULLER, H. BOTTINGER: Fast determination of conditions for maximum dynamic capacity in cation-exchange chromatography of human monoclonal antibodies, *Journal of Chromatography A* **1161** (2007) 29-35.
38. D.K. FOLLMAN, R.L. FAHRNER: Factorial screening of antibody purification processes using three chromatography steps without protein A, *Journal of Chromatography A* **1024** (2004) 79-85.

39. E. FREIRE, O.L. MAYORGA, M. STRAUME: Isothermal Titration, *Analytical Chemistry* **62** (1990) 950-959.
40. S.R.K. GALLANT, S. CRAMER: Modeling non-linear elution of proteins in ion-exchange chromatography, *Journal of Chromatography A* **702** (1995) 125-142.
41. A. GEORGE, W.W. WILSON: Predicting protein crystallization from a dilute solution property, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **50** (1994) 361-365.
42. J.A.B. GERSTNER, A. JEFFREY, S. CRAMER: Gibbs free energy of adsorption for biomolecules in ion-exchange systems, *Biophysical Chemistry* **52** (1994) 97-106.
43. R. GHOSH, L. WANG: Purification of humanized monoclonal antibody by hydrophobic interaction membrane chromatography, *Journal of Chromatography A* **1107** (2006) 104-109.
44. D.S. GILL, D.J. ROUSH, K.A. SHICK, R.C. WILLSON: Microcalorimetric characterization of the anion-exchange adsorption of recombinant cytochrome b5 and its surface-charge mutants, *Journal of Chromatography A* **715** (1995) 81-93.
45. S. GIROD, P. BALDET-DUPY, H. MAILLOLS, J.M. DEVOISSELLE: On-line direct determination of the second virial coefficient of a natural polysaccharide using size-exclusion chromatography and multi-angle laser light scattering, *Journal of Chromatography A* **943** (2002) 147-152.
46. J. GMEHLING, B. KOLBE: Thermodynamik. VCH, Weinheim, 2. Auflage (1992).
47. A.O. GRILLO, K.L. EDWARDS, R.S. KASHI, K.M. SHIPLEY, L. HU, M.J. BESMAN, C.R. MIDDAGH: Conformational origin of the aggregation of recombinant human factor VIII, *Biochemistry* **40** (2001) 586-595.
48. B. GUO, S. KAO, H. McDONALD, A. ASANOV, L.L. COMBS, W.W. WILSON: Correlation of second virial coefficients and solubilities useful in protein crystal growth, *Journal of Crystal Growth* **196** (1999) 424-433.
49. C. HARINARAYAN, J. MUELLER, A. LJUNGLOF, R. FAHRNER, J. VAN ALSTINE, R. VAN REIS: An exclusion mechanism in ion exchange chromatography, *Biotechnology and Bioengineering* **95** (2006) 775-87.
50. L.J. HENDERSON: Concerning the Relationship between the Strength of Acids and their Capacity to Preserve Neutrality, *American Journal of Physiology* **21** (1908) 173-179.
51. S. HJERTEN: Fractionation of proteins by hydrophobic interaction chromatography, with reference to serum proteins, *Proceedings Intl. Workshop on Technology for Protein Separation & Improvement of Blood Plasma Fractionation* (1977) 410-421.

52. F. HOFMEISTER: Zur Lehre von der Wirkung der Salze, *Archives of Experimental Pathology and Pharmacology* **24** (1888) 247-260.
53. B.H. HOFSTEE: Hydrophobic affinity chromatography of proteins, *Analytical Biochemistry* **52** (1973) 430-448.
54. G.A. HOLDGATE: Making Cool Drugs Hot: Isothermal Titration Calorimetry as a Tool to Study Binding Energetics, *BioTechniques* **31** (2001) 164-186.
55. M.B. HUGLIN: *Light scattering from polymer solutions*. Academic Press, London, (1972).
56. T. ISHIHARA, T. KADOYA, N. ENDO, S. YAMAMOTO: Optimization of elution salt concentration in stepwise elution of protein chromatography using linear gradient elution data. Reducing residual protein A by cation-exchange chromatography in monoclonal antibody purification, *Journal of Chromatography A* **1114** (2006) 97-101.
57. T. ISHIHARA, S. YAMAMOTO: Optimization of monoclonal antibody purification by ion-exchange chromatography. Application of simple methods with linear gradient elution experimental data, *Journal of Chromatography A* **1069** (2005) 99-106.
58. H.T. IYER, S. LESTER, P. WOLK, R. VAN REIS: Use of the steric mass action model in ion-exchange chromatographic process development, *Journal of Chromatography A* **832** (1999) 1-9.
59. R. JANZEN, UNGER, K.K.: Adsorption of proteins on porous and non-porous poly(ethyleneimine) and tentacle-type anion exchangers, *Journal of Chromatography* **522** (1990) 77-93.
60. Y. JIA, J. NARAYANAN, X.Y. LIU, Y. LIU: Investigation on the mechanism of crystallization of soluble protein in the presence of nonionic surfactant, *Biophysical Journal* **89** (2005) 4245-4251.
61. P.T. JONES, P.H. DEAR, J. FOOTE, M.S. NEUBERGER, G. WINTER: Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse, *Nature* **321** (1986) 522-525.
62. D. JOSIC, Y.P. LIM: Analytical and Preparative Methods in purification of Antibodies, *Food Biotechnology* **39** (2001) 215-226.
63. M.K. JOZWIK, K. FREITAG: Evaluation of the Langmuir Formalism for Modeling the Adsorption Isotherms of Proteins and Polyelectrolytes in Simulations of Ion Exchange Chromatography, *Chemical Engineering & Technology* **28** (2005) 1346-1359.
64. A. JUNGBAUER, E. WENISCH: *High Performance Liquid Chromatography and related Methods in Purification of Monoclonal Antibodies*, Alan R. Liss, New York, (1989).

65. H.L.-. KNUDSEN, R.L. FAHRNER, Y. XU, L.A. NORLING, G.S. BLANK: Membrane ion-exchange chromatography for process-scale antibody purification, *Journal of Chromatography A* **907** (2001) 145-154.
66. G.M. KÖHLER, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* **256** (1975) 495-497.
67. W. KOPACIEWICZ, F.E. REGNIER: Mobile phase selection for the high-performance ion-exchange chromatography of proteins, *Analytical Biochemistry* **133** (1983) 251-259.
68. P. KRATOCHVIL: Classical Light Scattering from Polymer Solutions, Elsevier, Amsterdam, (1987).
69. J.E.C. LADBURY, BABUR Z.: Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions, *Chemistry & Biology* **3** (1996) 791-801.
70. I. LANGMUIR: The Adsorption of Gases on Plane Surfaces of Glass, Mica and Platinum, *Journal of the American Chemical Society* **40** (1918) 1361-1403.
71. F. LI, J.X. ZHOU, X YANG, T. TRESSEL, B. LEE: Current therapeutic antibody production and process optimization, *Bioprocess Journal* (2005) 23.
72. F.-Y.C. LIN, CHIN-SUNG; CHEN, WEN-YIH & YAMAMOTO, SHUICHI: Microcalorimetric studies of the interaction mechanisms between proteins and Q-Sepharose at pH near the isoelectric point (pI): Effects of NaCl concentration, pH-value, and temperature, *Journal of Chromatography A* **912** (2001) 281-289.
73. F.-Y.C. LIN, M.T.W. HEARN: Microcalorimetric Studies on the Interaction Mechanism between Proteins and Hydrophobic Solid Surfaces in Hydrophobic Interaction Chromatography: Effects of Salts, Hydrophobicity of the Sorbent, and Structure of the Protein, *Analytical Chemistry* **73** (2001) 3875-3883.
74. F.-Y.C. LIN, WEN-YIH, M.T.W. HEARN HEARN: Thermodynamic analysis of the interaction between proteins and solid surfaces: application to liquid chromatography, *Journal of Molecular Recognition* **15** (2002) 55-93.
75. F. LOTTSPEICH, H. ZORBAS: Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, 2. Aufl. (2006).
76. J.P. MCCUE, R.H. HEIN, R. TENOLD: Three generations of immunoglobulin G preparations for clinical use, *Reviews of Infectious Diseases* **8** (1986) 374-381.
77. W.G.M. McMILLAN, JOSEPH E.: The Statistical Thermodynamics of Multicomponent Systems, *Journal of Chemical Physics* **13** (1945) 276-305.

78. W. MELANDER, C. HORVATH: Salt effect on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **183** (1977) 200-215.
79. A.P. MINTON: Adsorption of globular proteins on locally planar surfaces. II. Models for the effect of multiple adsorbate conformations on adsorption equilibria and kinetics, *Biophysical Journal* **76** (1999) 176-187.
80. E. MÜLLER: Comparison between mass transfer properties of weak-anion-exchange resins with graft-functionalized polymer layers and traditional ungrafted resins, *Journal of Chromatography A* **1006** (2003) 229-240.
81. J. NARAYANAN, X.Y. LIU: Protein interactions in undersaturated and supersaturated solutions: a study using light and x-ray scattering, *Biophysical Journal* **84** (2003) 523-532.
82. B.L. NEAL, D. ASTHAGIRI, A.M. LENHOFF: Molecular origins of osmotic second virial coefficients of proteins, *Biophysical Journal* **75** (1998) 2469-2477.
83. R. NECINA, K. AMATSCHEK, A. JUNGBAUER: Capture of Human Monoclonal Antibodies from Cell Culture Supernatant by Ion Exchange Media Exhibiting High Charge Density, *Biotechnology and Bioengineering* **60** (1998) 689-698.
84. W. NORDE, J. LYKLEMA: Why proteins prefer interfaces, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2** (1991) 183-202.
85. L. PEDERSEN, J. MOLLERUP, E. HANSEN, A. JUNGBAUER: Whey proteins as a model system for chromatographic separation of proteins, *Journal of chromatography B* **790** (2003) 161-173.
86. J.B. PILCHER, V.C. TSANG, W. ZHOU, C.M. BLACK, C. SIDMAN: Optimization of binding capacity and specificity of protein G on various solid matrices for immunoglobulins, *Journal of Immunological Methods* **136** (1991) 279-286.
87. H.N. PO, N.M. SENOZAN: Henderson-Hasselbalch Equation: Its History and Limitations, *Journal of Chemical Education* **78** (2001) 1499.
88. J. PORATH: Salt-promoted adsorption: recent developments, *Journal of Chromatography* **376** (1986) 331-341.
89. J. PORATH, L. SUNDBERG, N. FORNSTEDT, I. OLSSON: Salting-out in amphiphilic gels as a new approach to hydrophobic adsorption, *Nature* **245** (1973) 465-466.
90. G.J.H. PRAEFCKE, A. CHRISTIAN: Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) zur Charakterisierung biomolekularer Wechselwirkungen, *BIOspektrum* **1** (2005) 44-47.

91. T.M. PRZYBYCIEN, N.S. PUJAR, L.M.S. STEELE: Alternation bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography, *Current Opinion in Biotechnology* **15** (2004) 469-478.
92. P.P. RAJE, NEVILLE G.: Combination of the steric mass action and non-ideal surface solution models for overload protein ion-exchange chromatography, *Journal of Chromatography A* **760** (1997) 89-103.
93. K. REGE, A. LADIWALA, S.M. CRAMER: Multidimensional high-throughput screening of displacers, *Analytical Chemistry* **77** (2005) 6818-6827.
94. A.C. ROQUE, C.R. LOWE, M.A. TAIPA: Antibodies and Genetically Engineered Related Molecules: Production and Purification, *Biotechnology Progress* **20** (2004) 639-654.
95. D.F. ROSENBAUM, C.F. ZUKOSKI: Protein interactions an crystallisation, *Journal of Crystal Growth* **168** (1996) 752-758.
96. B. SAIFUL, Z., WESSLING, M.: Enzyme capturing and concentration with mixed matrix membrane adsorbers, *Journal of Membrane Science* **280** (2006) 406-417.
97. H. SCHELLEKENS: Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins, *Nephrology, Dialysis, Transplantation* **20** (2005) 3-9.
98. S. SHALTIEL, Z. ER-EL: Hydrophobic chromatography: use for purification of glycogen synthetase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70** (1973) 778-781.
99. Q.Z. SHI, Y. & SUN, Y.: Influence of pH and Ionic Strength on the Steric Mass-Action Model Parameters around the Isoelectric Point of Protein, *Biotechnology Progress* **21** (2005) 516-523.
100. V.L. SORIA, A.; CELDA, B.; CAMPOS, A. & FIGUERUELO, J. E.: Static Measurements of Refractive Index Increments at 633 nm with a Modified Refractive Index Detector, *Polymer Bulletin* **13** (1985) 83-88.
101. A. STEUDLE: Private Mitteilung. Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart, (2006).
102. L. STRYER: Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, (1996).
103. T. TAKAGI: Application of low-angle laser light scattering detection in the field of biochemistry, *Journal of Chromatography* **506** (1990) 409-416.
104. C. TANFOR: The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes. John Wiley & sons, New York, (1973).
105. C. TANFORD: Physical Chemistry of Macromolecules, Wiley, New York, (1961).

106. P.M. TESSIER, A.M. LENHOFF, S.I. SANDLER: Rapid measurement of protein osmotic second virial coefficients by self-interaction chromatography, *Biophysical Journal* **82** (2002) 1620-1631.
107. M.E.P. THRASH, NEVILLE G.: Characterization of enthalpic events in overloaded ion-exchange chromatography, *Journal of Chromatography A* **944** (2002) 61-68.
108. K. TSUMOTO, D. EJIMA, A.M. SENCZUK, Y. KITA, T. ARAKAWA: Effects of salts on protein-surface interactions: applications for column chromatography, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **96** (2007) 1677-1690.
109. M. TSWETT: Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode, *Berichte der Deutschen Biotechnologischen Gesellschaft* (1906) 384.
110. N. TUGCU, S.M. CRAMER: The effect of multi-component adsorption on selectivity in ion exchange displacement systems, *Journal of Chromatography A* **1063** (2005) 15-23.
111. A. VELAYUDHAN: Studies in Nonlinear Chromatography, Yale University, (1990).
112. O.D.K. VELEV, E. W. & LENHOFF, A. M.: Protein interactions in solution characterized by light and neutron scattering: comparison of lysozyme and chymotrypsinogen, *Biophysical Journal* **75** (1998) 2682-2697.
113. D. VOET, J.G. VOET: Biochemistry, Wiley-Verlag, 3. Aufl. (2004).
114. J.P. WANKA, WOLFGANG: Die Bedeutung des zweiten osmotischen Virialkoeffizienten für die Proteinkristallisation, *Chemie Ingenieur Technik* **78** (2006) 273-278.
115. P.C. WANKAT: Rate Controlled Separations, Elsevier Science, New York, (1990).
116. M. WIEDMANN: Private Mitteilung. Institut für technische Biochemie, Universität Stuttgart. (2007).
117. P.J. WYATT: Mean square radius of molecules and secondary instrumental broadening, *Journal of Chromatography* **648** (1993) 27-32.
118. S. YAMAMOTO, T. ISHIHARA: Ion-exchange chromatography of proteins near the isoelectric points, *Journal of Chromatography A* **852** (1999) 31-36.
119. Y. YAO, A.M. LENHOFF: Electrostatic contributions to protein retention in ion-exchange chromatography. 1. Cytochrome C variants, *Analytical Chemistry* **76** (2004) 6743-6752.
120. B.H. ZIMM: The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions, *Journal of Chemical Physics* **16** (1948) 1093-1099.

