

Membranadsorber-Modul zur
Aufarbeitung ungeklärter Bioprozessmedien

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.Ing. André Pastor
geboren am 19.01.1974 in Kleve

2010

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Bernd Hitzmann
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 13.09.2010

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Diese Arbeit wurde nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Göttingen, September 2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	
Zusammenfassung.....	1
Abstract.....	2
1 Einleitung und Aufgabenstellung.....	3
2 Theoretische Grundlagen.....	5
2.1 Proteinaufreinigung in biopharmazeutischen Prozessen.....	5
2.2 Integrierte Verfahren in der Proteinaufreinigung.....	8
2.2.1 Expanded Bed Adsorption (EBA)	8
2.2.2 Makroporöse Monolithen.....	11
2.2.3 Wässrige 2-Phasen Extraktion	12
2.2.4 Batch-Adsorption.....	13
2.2.5 High Gradient Magnetic Separation (HGMS).....	16
2.2.6 Suspended Bed Chromatographie (SBC).....	17
2.3 Integrierte Verfahren mit Membranadsorbern	17
2.3.1 Membranadsorber	17
2.3.2 Cross-Flow Affinity Filtration (CFAF)	19
2.3.3 Controlled Shear Affinity Filtration (CSAF).....	21
2.3.4 Membranadsorber-Modul zur Aufreinigung von partikelhaltigen Medien ..	22
3 Praktische Arbeiten	26
3.1 Modulentwicklung	26
3.1.1 Adsorptive Membran	26
3.1.2 Abstandshalter.....	31
3.1.3 Verteilerplatten	39
3.1.4 Modulgeometrie.....	43
3.2 Einsatzweise	50
3.2.1 Modulbeladung	50
3.2.2 Wasch- und Elutionsschritte	60
3.2.3 Maßstabsübertragung.....	70
3.3 Applikationen.....	76
3.3.1 Integrierte Aufreinigung von humanem Immunglobulin G (hIgG) aus Hybridomzellkulturen	76
3.3.2 Integrierte Aufreinigung von HSA aus Pichia Pastoris Kulturen	81
3.3.3 Integrierte Aufreinigung von GFP-his aus Escherichia coli Zelllysaten	86
4 Zusammenfassung und Ausblick.....	92
Literaturverzeichnis.....	96
Anhang.....	103
Lebenslauf.....	126

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Blockdiagramm – Proteinaufreinigung nach Pertrides.....	6
Abbildung 2: Vergleich einer dicht gepackten Säule mit Expanded Bed Säule.....	9
Abbildung 3: EBA-Verteiler.. ..	10
Abbildung 4: Vergleich Stofftransfer in Chromatographiegelen und Membranadsorbern.	18
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Adsorptions-Schrittes bei der CFAF.	19
Abbildung 6: Druckabfall im Strömungskanal einer Crossflow-Cassette.....	20
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Aufbau eines CSAF Moduls.....	21
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines partikelgängigen Membranadsorber-Moduls.....	22
Abbildung 9: Vergleich von Durchlaufverfahren und Rezirkulationsverfahren	23
Abbildung 10: Ausführungsformen von Abstandshaltern.....	24
Abbildung 11: Ausführungsformen der Ausgangsgeometrie von Chromatographiesäulen.	25
Abbildung 12: Entnahme von Membranstanzlingen zur Aufnahme von Adsorptionsisothermen. 26	
Abbildung 13: Adsorptionsisothermen unterschiedlich stark gefropfter Membranen.	27
Abbildung 14: Modulbeladung bei Verwendung unterschiedlich stark gefropfter Membranen..	29
Abbildung 15: Mikroskopische Aufnahmen der verwendeten Abstandshalter.	32
Abbildung 16: Modulbeladung bei Verwendung unterschiedlicher Abstandshalter.....	33
Abbildung 17: Modul-Elution bei Verwendung unterschiedlicher Abstandshalter.	34
Abbildung 18: Differenzdruck bei Verwendung unterschiedlicher Abstandshalter.....	35
Abbildung 19: Modul-Partikelgängigkeit bei Verwendung unterschiedlicher Abstandshalter.....	36
Abbildung 20: Einfluss von Biomasse auf die Modulbeladung bei Verwendung unterschiedlicher Abstandshalter.	37
Abbildung 21: Vorrichtung zum Test von Modulkomponenten	39

Abbildung 22: Verteilerplatten Sinterplatte, Edelstahllochplatte.....	40
Abbildung 23: Modulbeladung unter Verwendung von Verteilerplatten.....	40
Abbildung 24: Modul-Elution unter Verwendung von Verteilerplatten	41
Abbildung 25: Modul-Differenzdruck unter Verwendung von Verteilerplatten.....	41
Abbildung 26: Modul-Partikelgängigkeit unter Verwendung von Verteilerplatten.....	42
Abbildung 27: CFD-Simulation der Strömungsführung in partikelgängigen Membranadsorber- Modulen unter Verwendung unterschiedlicher Ausgangsgeometrien.....	43
Abbildung 28: Verschiedene Ausführungen des Bauteils Kappe.....	44
Abbildung 29: Dispersion bei unterschiedlichen Geometrien des Modulein- und Ausgangs.....	45
Abbildung 30: Partikelgängige Membranadsorber-Wickel unterschiedlicher Länge	45
Abbildung 31: Modulbeladung unter Verwendung von Wickeln unterschiedlicher Länge.....	46
Abbildung 32: Modul-Elution unter Verwendung von Wickeln unterschiedlicher Länge.	47
Abbildung 33: Differenzdruck unter Verwendung von Wickeln unterschiedlicher Länge.....	48
Abbildung 34: Modulbeladung im Durchlaufverfahren bei unterschiedlichen Volumenströmen .	51
Abbildung 35: Strömungsführung in partikelgängigen Membranadsorber-Modulen	52
Abbildung 36: Modulbeladung bei unterschiedlichen Volumenströmen (Zeit).....	53
Abbildung 37: Modulbeladung bei unterschiedlichen Volumenströmen (Passagen).....	54
Abbildung 38: Zusammenhang zwischen Volumenstrom und Geschwindigkeitskonstante.....	55
Abbildung 39: Vergleich der Adsorptionseffizienz aus Versuchsdaten mit der Adsorptionseffizienz aus Isothermenparametern.	57
Abbildung 40: Modulbeladung: Vergleich von Durchlauf- und Rezirkulationsverfahren.....	59
Abbildung 41: OD während der Elution nach Durchführung unterschiedlicher Waschprotokolle	61
Abbildung 42: Biomasseverteilung unter Anwendung eines optimierten Waschprotokolls.....	62
Abbildung 43: Einfluss des Waschprotokolls auf die Adsorptionsgeschwindigkeit in Folgeläufen	63

Abbildung 44: Modul-Elution unter Anwendung unterschiedlicher Volumenströme	64
Abbildung 45: Zusammenhang zwischen der Konzentration der Zielsubstanz und der Wiederfindung.....	66
Abbildung 46: Modul-Elution im Rezirkulationsverfahren (Einfluss Volumenstrom).....	67
Abbildung 47: Modul-Elution im Rezirkulationsverfahren (Einfluss Volumen).....	68
Abbildung 48: Vergleich von Durchlaufverfahren und Rezirkulationsverfahren bei der Elution .	69
Abbildung 49: Modulbeladung bei der Maßstabsvergrößerung.....	72
Abbildung 50: Modul-Elution bei der Maßstabsvergrößerung	73
Abbildung 51: Maßstabsübertragung. Untersuchte Formate.....	74
Abbildung 52: Integrierte Aufreinigung von hIgG - Adsorption.	78
Abbildung 53: Integrierte Aufreinigung von hIgG - Elution.....	79
Abbildung 54: Integrierte Aufreinigung von hIgG, HPLC-Chromatogramm Beladungslösung ...	79
Abbildung 55: Integrierte Aufreinigung von hIgG, HPLC-Chromatogramm Eluat.	82
Abbildung 56: Integrierte Aufreinigung von HSA, Bestimmung der HSA-Konzentration.	83
Abbildung 57: Integrierte Aufreinigung von HSA, optische Dichte während der Elution.	84
Abbildung 58: Integrierte Aufreinigung von HSA, HPLC-Chromatogramm der Elutionsfraktion	84
Abbildung 59: Integrierte Aufreinigung von GFP, Adsorption.....	88
Abbildung 60: Integrierte Aufreinigung von GFP, Elution.....	89
Abbildung 61: Integrierte Aufreinigung von GFP, SDS-PAGE der Prozessfraktionen.....	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pfropfgrad und Permeabilität der verwendeten Membranen.....	27
Tabelle 2: Isothermenparameter der verwendeten Membranen	28
Tabelle 3: Einfluss des Pfropfgrades auf die Adsorptionseffizienz.....	30
Tabelle 4: Charakteristik der untersuchten Abstandshalter	31
Tabelle 5: Abstandshalter – Parameter zur Beurteilung der Elution	34
Tabelle 6: Bewertung der untersuchten Abstandshalter.....	38
Tabelle 7: Elution im Durchlaufverfahren – Einfluss des Volumenstroms.....	65
Tabelle 8: Elution im Rezirkulationsverfahren – Einfluss des Rezirkulationsvolumens	69
Tabelle 9: Maßstabsübertragung - Versuchsparameter.	71
Tabelle 10: Integrierte Aufreinigung von hIgG - Versuchsbedingungen.....	77
Tabelle 11: Integrierte Aufreinigung von hIgG - Ergebnisse.....	80
Tabelle 12: Integrierte Aufreinigung von HSA - Versuchsbedingungen.....	82
Tabelle 13: Integrierte Aufreinigung von HSA - Ergebnisse.....	85
Tabelle 14: Integrierte Aufreinigung von GFP-his - Versuchsbedingungen.....	87
Tabelle 15: Integrierte Aufreinigung von GFP-his - Ergebnisse.....	90

Abkürzungsverzeichnis

A	Membranfläche
A _S	Asymmetriefaktor
BSA	Rinderserumalbumin, bovine serum albumin
c	Konzentration des Proteins in Lösung
CFD	Computational fluid dynamics
CFAF	Cross-Flow Affinity Filtration
CHO	chinese hamster ovary cell
CSAF	Controlled Shear Affinity Filtration
DNA	Desoxyribonukleinsäure, deoxyribonucleic acid
dp	Differenzdruck
EBA	Expanded bed adsorption
E. coli	Escherichia coli
GFP	Greenfluorescent protein
hGMF	humaner epidermalem Wachstumsfaktor, human epidermal growth factor
HGMS	High gradient magnetic separation
hIgG	humanes Immunglobulin G
his	Histidin-tag
HPLC	high performance liquid chromatography
IDA	Iminodiacetat
IMAC	Immobilized Metal Chelate Affinity Chromatography
k	Geschwindigkeitskonstante
k _d	Dissoziationskonstante
kDa	kilo-Dalton
KPi	Kaliumphosphat
LDH	Laktatdehydrogenase
mAu	milli-Absorptionseinheiten, milli-absorptionunit
MV	Membranvolumen (Produkt aus Membranhöhe und Membranfläche)
N	Anzahl der Passagen
n.d.	nicht definiert
OD	optische Dichte bei 600 nm
P	Produktivität
PEG	Polyethylenglycol
PTFE	Polytetrafluorethylen
RNA	Ribonukleinsäure, Ribonucleic Acid
RT	Raumtemperatur

Q	Quatäreres Amin
q	Konzentration des Proteins am Adsorbens
q _{max}	maximale Bindungskapazität des Adsorbens
r	rekombinant
S	Sulfonsäure
SBC	Suspended Bed Chromatographie
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SEC	Größenausschluss-Chromatographie, size exclusion chromatography
t	Zeit, time
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volumen
V _h	Peak-Breite auf halber Peak-Höhe
\dot{V}	Volumenstrom
W	Wiederfindung

Für Längen-, Massen-, Stoffmengen- und Zeitangaben werden SI-Einheiten verwendet sowie Vorsilben für dezimale Vielfache und Teile der SI-Einheiten nach DIN 1301.

Zusammenfassung

Die Aufreinigung biotechnologisch hergestellter Substanzen durch den Einsatz integrierter Verfahren eröffnet die Möglichkeit der Reduktion einzelner Schritte innerhalb eines Prozessschemas. Hierdurch ergibt sich die Aussicht, die Produktausbeute zu erhöhen und die Prozesszeit und die Prozesskosten zu senken.

In dieser Arbeit wurde ein Membranadsorber-Modul entwickelt, das die integrierte Protein-Aufreinigung aus partikelhaltigen Bioprozessmedien ermöglicht. Die Untersuchung des Einflusses einzelner Modul-Komponenten sowie deren Auswahl stellen einen wesentlichen Aspekt der Arbeit dar. Es wurde gezeigt, dass die Modul-Leistung neben der adsorptiven Membran maßgeblich durch die Auswahl eines geeigneten Abstandshalters bestimmt wird. Die Modul-Leistung wurde anhand der Adsorptionsgeschwindigkeit, der Adsorptionseffizienz, der Partikelgängigkeit und der erreichbaren Aufkonzentrierung bewertet. Darüber hinaus wurden der Druckabfall und die Verarbeitbarkeit einzelner Materialien in die Bewertung mit einbezogen. Die Entwicklung des partikelgängigen Membranadsorber-Moduls umfasste drei Modulgrößen, welche Arbeiten im Labormaßstab und im Pilotmaßstab ermöglichen.

Die Entwicklung geeigneter Einsatzweisen der partikelgängigen Membranadsorber-Module bildeten den zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit. Es wurde erkannt, dass eine effektive Adsorption und eine hohe Produktivität durch Anwendung des Rezirkulationsverfahrens bei der Modulbeladung erreicht werden können. Es wurde erörtert, dass die Gesetze der Batch-Adsorption für diese Betriebsweise Gültigkeit besitzen und die Kenntnis der Adsorptionsisotherme des verwendeten Adsorbens die Auslegung von Prozessen erleichtert. Das Ziel einer effektiven Elution, welches in der Erreichung eines hohen Aufkonzentrierungsgrades bei gleichzeitig hoher Ausbeute der Zielsubstanz besteht, konnte am besten verwirklicht werden, indem das Durchlaufverfahren angewendet wurde, welches im Gegensatz zum Rezirkulationsverfahren eine einmalige Passage durch das Modul vorsieht. Das Durchlaufverfahren wurde mit dem Ziel einer effektiven Entfernung von Partikeln auch bei der Durchführung von Waschschritten angewandt und optimiert, wodurch der Klärungsfaktor des Prozesses verbessert werden konnte.

Die Funktionalität der entwickelten Module wurde anhand der integrierten Aufreinigung von Proteinen aus Bioprozessmedien überprüft. Um hierbei ein möglichst breites Spektrum abzubilden, wurden drei unterschiedliche Expressionssysteme in die Untersuchung einbezogen.

Schlagwörter: integrierte Verfahren, Aufarbeitung, Membranadsorber-Modul

Abstract

The purification of biotechnologically manufactured substances by means of integrated processes allows the reduction of single steps within a process scheme. The result is the prospect of increased product yields as well as decreased process times and total costs.

A membrane adsorber module was developed in this project, which allows integrative protein-purification from particulate biological process media. The selection and investigation of single module components are key aspects of this thesis. It was demonstrated that the module performance is mostly dependent on the adsorptive membrane and the selected spacer. Module performance was evaluated on the basis of adsorption kinetics, adsorption efficiency, particle permeability, and the concentration factor achieved. Further parameters included were the pressure drop and the processibility of the materials of construction. The development of the particle-permeable membrane adsorber module included three different formats, which allows its use on a laboratory as well as on a pilot scale.

The development of appropriate operating methods for the particle-permeable membrane adsorber module is another focal point of this thesis. It was revealed that effective adsorption and a high level of productivity was attainable by performing the loading step in recirculation mode. It was argued, that the principle of batch-adsorption was applicable for that operation mode and the knowledge of the adsorption-isotherm provided valuable information when dimensioning the process. The target of an effective elution, which is characterized by a preferably high concentration factor as well as a high yield of the target substance, was best achieved by applying the principle of single pass mode which comprises a single passage through the module. The single-pass mode was also applied on the performance of washing steps with the aim of effective removal of particles, whereby an optimal clarification factor could be achieved.

The functionality of the developed module was verified by the integrative purification of proteins from bioprocess-media. Three different expression systems were investigated, in order to represent a preferably wide spectrum of applications.

Keywords: integrated processes, downstream-processing, membrane adsorber module

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die Herstellung von Wirkstoffen und Substanzen mit Hilfe biotechnologischer Verfahren gewinnt an Bedeutung, wobei die Produktion rekombinanter therapeutischer Proteine eines der wachstumsstärksten Felder innerhalb der Biotechnologie ist. Die Aufarbeitung wird hierbei zunehmend als limitierender Abschnitt innerhalb von Prozessen wahrgenommen und ist für einen Großteil der anfallenden Kosten verantwortlich. Es besteht daher die Notwendigkeit, neue Methoden zu finden, welche der Vereinfachung bzw. Optimierung von Aufarbeitungsprozessen dienen. Ein Ansatz, der die Zusammenfassung einzelner Aufarbeitungsschritte zum Ziel hat, wird als integriertes Verfahren beschrieben. Integrierte Verfahren besitzen das Potential, durch Verkürzung von Aufarbeitungsschemata die Prozesskosten zu senken und die Prozessausbeute zu steigern. Aufgrund technischer Defizite der existenten integrierten Prozesslösungen ist deren Einsatz allerdings auf einige wenige Anwendungen beschränkt.

Membranadsorber sind chemisch funktionalisierte, makroporöse Membranen, deren Hauptvorteil in der Erzielung hoher Durchsatzraten besteht. Sie werden in zunehmendem Maße bei der Aufarbeitung biotechnologischer Produkte eingesetzt, wobei sich ihr Einsatz hauptsächlich auf die Entfernung von Verunreinigungen am Ende einer Aufarbeitungskette konzentriert. Anforderungen, die an ein Modul und die Verfahrenstechnik zur integrierten Aufarbeitung aus partikelhaltigen Bioprozessmedien gestellt werden, beinhalten die effektive und möglichst selektive Adsorption der Zielsubstanz ohne die Notwendigkeit einer Vorbehandlung des Mediums. Es soll eine geklärte, möglichst partikelfreie Fraktion erhalten werden, in der die Zielsubstanz in möglichst hoher Konzentration und Reinheit vorliegt. Darüber hinaus besteht die Notwendigkeit, dass ein Modul in verschiedenen Baugrößen vorliegt, damit eine Verfahrensentwicklung unter Einsatz geringer Mengen Prozesslösung im Labormaßstab erfolgen kann und die Übertragung der gefundenen Bedingungen auf ein größeres Format ermöglicht wird.

Im Rahmen dieser Dissertation wird ein Membranadsorber-Modul zur integrierten Aufarbeitung biotechnologischer Produkte entwickelt. Die Untersuchung und Optimierung der Module, sowie die Entwicklung der Einsatzweise, die eine direkte Aufreinigung von Biomolekülen aus partikelhaltigen Bioprozessmedien gewährleistet, ist im Fokus dieser Arbeit.

Verschiedene Materialien werden hinsichtlich ihrer Eignung zum Aufbau derartiger Module bewertet. Dazu gehören adsorptive Membranen, die, bedingt durch die Herstellparameter, deutliche Unterschiede aufweisen. Die Untersuchung von Abstandshaltern, die einerseits die Ausbildung partikelgängiger Strömungskanäle bewirken und andererseits einen Einfluss auf den

Stofftransport innerhalb des Moduls haben können, ist ein weiterer Teil dieser Arbeit. Die Modulgeometrie und die Untersuchung weiterer Modulkomponenten, die einen möglichen Einfluss auf die Modul-Leistung haben, werden außerdem behandelt.

Die Funktionalität wird abschließend anhand von typischen Applikationsbeispielen überprüft. Bioprozesslösungen sind, je nach verwendetem Produktionsorganismus und der Prozessführung während der Kultivierung sehr unterschiedlich, weshalb diese Untersuchungen anhand dreier unterschiedlicher Expressionssysteme erfolgen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Proteinaufreinigung in biopharmazeutischen Prozessen

Die biopharmazeutische Industrie bedient einen der wachstumsstärksten Märkte der globalen Ökonomie [1-3]. Innerhalb der Biopharmazeutika stellen Proteine eine wichtige Produktklasse dar. Fortschritte in der Molekular- und Zellbiologie erlauben heutzutage die Herstellung einer Vielzahl therapeutisch wirksamer Proteine im Produktionsmaßstab, wobei die Produktionstiter, also die Konzentration des Produktes in der Kulturbrühe, deutliche Steigerungen erfahren haben [4, 5]. Die Produktaufarbeitung wird zunehmend als limitierender Schritt im Gesamtprozess wahrgenommen. Zahlreiche Publikationen weisen darauf hin, dass 50-90% der anfallenden Gesamtkosten durch die Aufarbeitung entstehen [6-12].

Die Herausforderungen im Bereich der Proteinaufreinigung sind zahlreich: Bioprozessmedien, aus denen das Produkt aufgereinigt werden muss, sind äußerst komplex. Eine Vielzahl von Fremdproteinen (Wirtszellproteine, Bestandteile des Kultivierungsmediums), Nukleinsäuren (DNA, RNA), Produkte des Zellmetabolismus, sowie besonders kritische Verunreinigungen wie z.B. Viren oder Endotoxine müssen sicher aus der Prozesslösung entfernt werden ohne die Stabilität des Produktes zu beeinflussen [13]. Aufgrund der Tatsache, dass therapeutische Proteine in der Regel durch Injektion verabreicht werden, müssen sehr hohe Anforderungen an die Produktreinheit erfüllt werden. Dies gilt insbesondere im Bereich der Antikörper-basierten Pharmazeutika, welche in vergleichsweise hohen Dosen über einen langen Zeitraum verabreicht werden [7]. Erschwerend kommt hinzu, dass Verunreinigungen ähnliche Eigenschaften wie das Produkt aufweisen können, was deren Abtrennung verkompliziert. Proteine können sensitiv auf Änderungen des umgebenden Mediums reagieren (Temperatur, pH-Wert, Leitfähigkeit) und sind gegebenenfalls Proteasen ausgesetzt, was eine zügige Aufarbeitung notwendig macht. Mit dem Ziel, die Kosten im Bereich der Proteinaufreinigung zu senken, gilt es, Prozesszeiten zu verkürzen und die Ausbeuten zu erhöhen [8].

Der Aufbau eines Aufreinigungsprozesses kann stark variieren, da er von einer Vielzahl von Faktoren abhängig ist. Das verwendete Expressionssystem entscheidet beispielsweise darüber, ob das Produkt während der Kultivierung in das Medium sekretiert wird oder ob ein initialer Zellaufschluss zu erfolgen hat. Nach Pertrides [14] lässt sich ein Proteinaufreinigungsprozess in 4 Stufen einteilen, welche in Abbildung 1 skizziert sind.

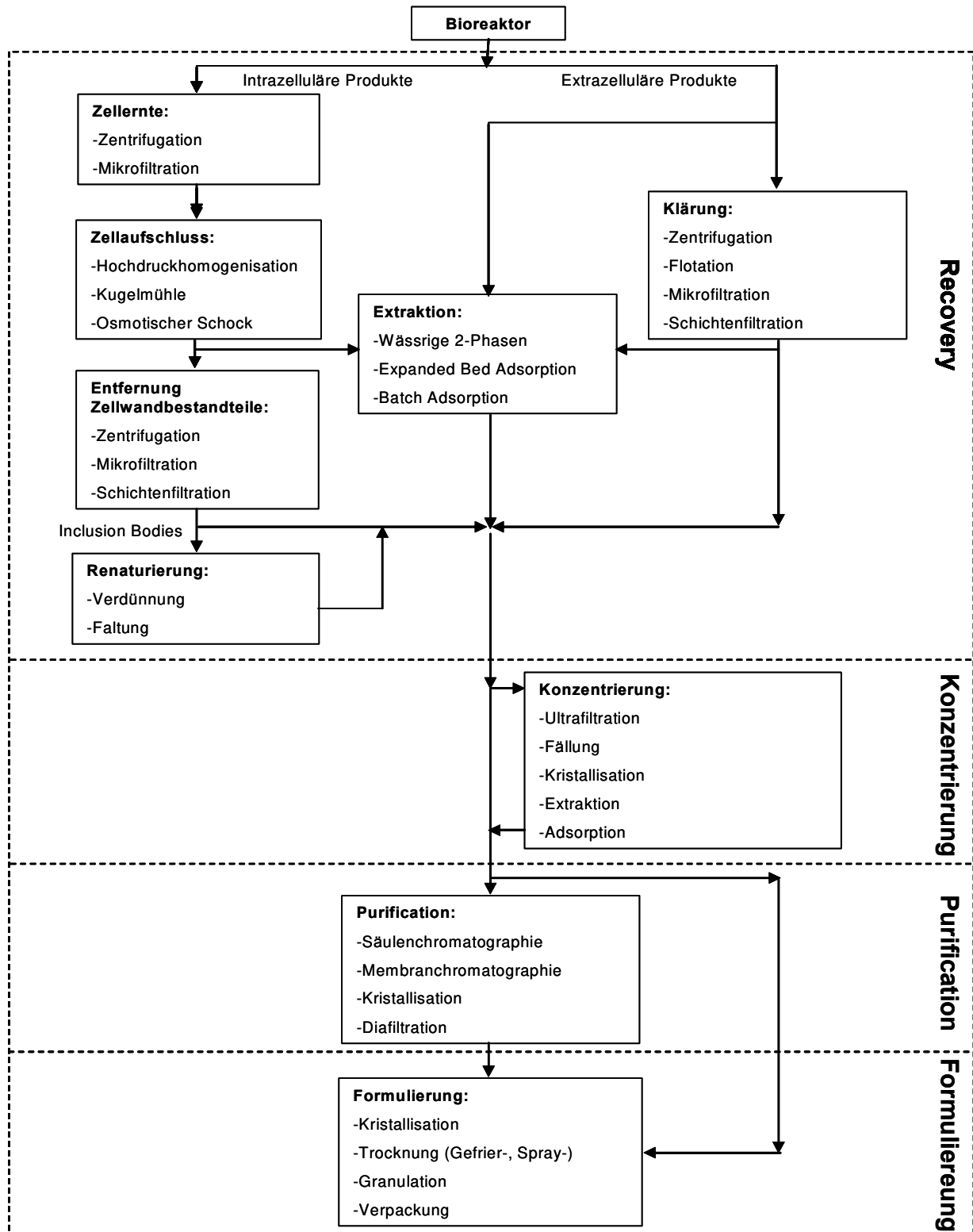


Abbildung 1: Blockdiagramm – Proteinaufreinigung nach Pertrides [14].

Im Folgenden werden diese Schritte erläutert:

Recovery: Diese Stufe beinhaltet die ersten Schritte eines Aufreinigungsprozesses. Neben einer ersten Vorreinigung des Produktes dienen die hier angeordneten Verfahrensschritte der Klärung der Kulturbrühe und einer Aufkonzentrierung des Produktes. Die Auswahl der Verfahren richtet sich u.a. danach, ob das Produkt intrazellulär oder extrazellulär exprimiert wird.

Konzentrierung: Die geklärte Kulturbrühe enthält das Produkt oft in sehr geringer Konzentration. Die Entfernung von Wasser aus der Prozesslösung ist daher ein wichtiger Aspekt der Proteinaufreinigung, welcher sich an die Klärung anschließt. Je nach Art der Kulturbrühe bzw. des Produktes können erneut unterschiedliche Verfahren zum Einsatz kommen. Im Falle der Crossflow-Filtration werden Filtrationsmembranen tangential überströmt und durch Anlegen eines Transmembrandruckes ein definierter Volumenstrom durch die Membran induziert. Die tangentielle Überströmung minimiert hierbei die Ausbildung einer Deckschicht, wodurch eine Verblockung der Filtrationsmembran verhindert wird. Im betrachteten Fall der Aufkonzentrierung von Proteinlösungen werden Ultrafiltrationsmembranen eingesetzt, deren Ausschlussgrenze so gewählt wird, dass das Produkt im Retentat (Unfiltrat) verbleibt, während Wasser, Salze und Verunreinigungen mit geringem Molekulargewicht durch die Membran treten und damit eine Aufkonzentrierung und eine weitere Aufreinigung des Produktes ermöglichen. Die Permeation von Salzen erlaubt es darüber hinaus, diese aus der Prozesslösung zu entfernen bzw. gegen andere Salze auszutauschen. Diese Umpufferung des Mediums ist unter Umständen Voraussetzung für die nachfolgenden Prozess-Schritte, die unter der Überschrift Purification zusammengefasst sind.

Purification: Eine häufig eingesetzte Methode, um Proteine in eine hochreine Form zu überführen, ist die Chromatographie. Die chromatographische Aufreinigung von Proteinen beinhaltet typischerweise die Verfahrensschritte Capturing, Intermediate Purification und Polishing. Weit verbreitet ist der Einsatz von Chromatographiesäulen, welche eine Schüttung aus porösen Kugeln (engl. beads) enthalten. Heutzutage wird eine Vielzahl von beads angeboten, die je nach vorliegender Trennaufgabe mit spezifischen Liganden (Affinitätschromatographie, Ionenaustauschchromatographie) ausgestattet sind. Darüber hinaus sind Chromatographie-Produkte erhältlich, welche auf porösen Membranen (Membranadsorber) oder porösen Polymerstrukturen, sog. Monolithen, basieren.

Formulierung: Ziel des letzten Schrittes in einem Aufreinigungs-Schema ist, das Protein in eine stabile Form zu überführen, in der es dem Patienten verabreicht werden kann. Die Formulierung kann dabei die Zugabe von Additiven beinhalten, welche die Haltbarkeit des Medikamentes steigern.

2.2 Integrierte Verfahren in der Proteinaufreinigung

Jeder einzelne Schritt in einem Proteinaufreinigungs-Schema bedeutet einen Aufwand an Prozesszeit und Einbußen in der Produktausbeute. Durch Reduzierung der Anzahl der Aufreinigungsschritte besteht das Potential, die Produktausbeute und die Produktivität eines Gesamtprozesses zu steigern. [9, 15]. Eine Möglichkeit, die Anzahl von Aufreinigungsschritten in einem Prozess zu minimieren liegt in der Integration einzelner Prozess-Schritte. Aufgrund der Tatsache, dass die Prozess-Schritte aus dem Bereich Recovery und Aufkonzentrierung auf der einen Seite nur zu einem geringen Teil zur Erhöhung der Reinheit eines Proteins beitragen, auf der anderen Seite aber für einen Großteil der Ausbeuteverluste sowie der Produktionskosten stehen, erscheint es sinnvoll, eine möglichst selektive Produktisolation bereits am Beginn eines Aufreinigungs-Schemas zu etablieren. Diverse Ansätze zur Integration von Verfahrensschritten im Bereich der Proteinaufreinigung beschäftigen sich daher mit der Verknüpfung der Recovery-Schritte, der Aufkonzentrierung sowie einer ersten Fraktionierung. Eine Voraussetzung für diese Art integrierter Aufreinigungstechnik ist die Entwicklung von Trennverfahren, welche im Gegensatz zu herkömmlichen säulenchromatographischen Prozessen die Aufarbeitung von partikelhaltigen Medien erlauben [7, 8, 16]. Der wohl bekannteste Vertreter dieser Gattung integrierter Aufreinigungsverfahren wird mit dem Begriff „Expanded Bed Adsorption“ (EBA) bezeichnet.

2.2.1 Expanded Bed Adsorption (EBA)

Leitet man eine partikelhaltige Lösung durch eine gepackte Chromatographiesäule, so werden die Partikel am Säuleneingang zurückgehalten und die Säule verblockt (siehe Abbildung 2). Durch kontrolliertes Anströmen von unten erreicht man eine Ausdehnung des Chromatographie-Bettes, welche als Fluidisierung bezeichnet wird. Durch Vergrößerung des Abstandes der beads ergibt sich eine Vergrößerung des Zwischenkornvolumens (engl. void-volume), wodurch Partikel durch die Säule treten können. Im Gegensatz zu herkömmlichen, dicht gepackten (engl. fixed-bed) Chromatographiesäulen, erhält man ein partikelgängiges Adsorbens [17, 18].

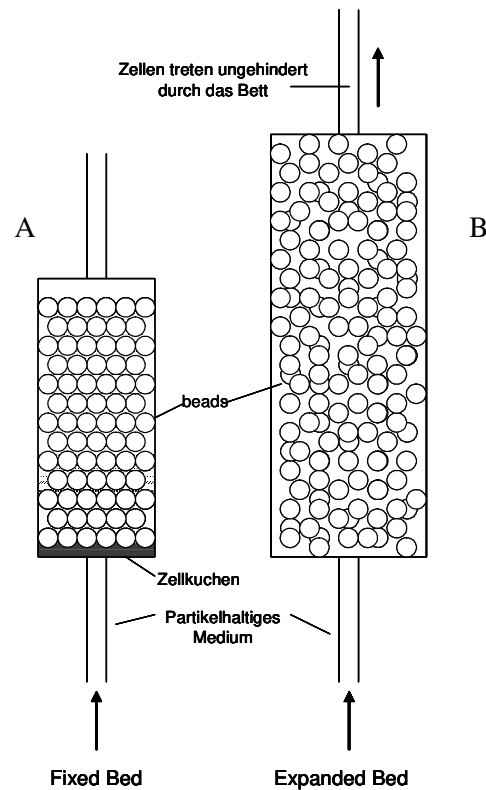


Abbildung 2: A, dicht gepackte Säule (Fixed Bed); B, Expanded Bed Säule. Dicht gepackte Säulen verblocken, wenn partikelhaltige Lösungen aufgetragen werden. Expanded Bed Säulen sind partikelgängig [17]

Die beschriebene Betriebsweise erinnert an Systeme, welche aus der chemischen Industrie unter der Bezeichnung fluidisierte Bett-Reaktoren bekannt sind. Diese Systeme sehen allerdings eine starke Dispersion des Adsorbens vor und werden typischerweise zirkulierend betrieben, um eine bestimmte Verweilzeit im Bett zu gewährleisten. Bei der Entwicklung der Expanded Bed Adsorption wurde dagegen großer Wert darauf gelegt, Dispersionseffekte zu minimieren, um ähnlich gute Trennergebnisse wie mit einer gepackten Säule erzielen zu können [17].

Zur Minimierung von Dispersionseffekten sind zwei Komponenten einer EBA-Säule von besonderer Bedeutung: Adsorbens und Verteiler. Diese müssen an die speziellen Anforderungen der Adsorption aus partikelhaltigen Lösungen angepasst werden. EBA-Adsorbentien unterscheiden sich von herkömmlichen Chromatographiebeads dadurch, dass sie einen größeren Durchmesser und ein höheres spezifisches Gewicht aufweisen, was beispielsweise durch Verwendung von Materialien hoher Dichte erreicht werden kann [19-21]. Hierdurch wird sichergestellt, dass die Säule unter adäquaten Flussraten betrieben werden kann, ohne dass das Adsorbens durch die Strömung zum Säulenausgang transportiert wird. Darüber hinaus weisen Expanded Bed Adsorbentien eine definierte Größen- oder Dichteverteilung auf, d.h. innerhalb einer Schüttung gibt es kleinere und größere, bzw. leichtere und schwerere beads. Eine Fluidisierung solcher Medien bewirkt die Ausbildung eines klassifizierten Bettes, welches dadurch charakterisiert ist, dass sich die beads entsprechend ihrer Größe und Dichte in der Säule anordnen (große/schwere im unteren Bereich, kleine/leichte im oberen Bereich der Säule).

Nach Ausbildung eines solchen klassifizierten Bettes weisen die beads eine stark eingeschränkte Mobilität auf, was wiederum eine minimierte Dispersion innerhalb des Bettes zur Folge hat [22, 23]. Der Verteiler muss auf der einen Seite ein flaches Geschwindigkeitsprofil über den Säulenquerschnitt (Kolbenströmung) ausbilden, was eine Grundvoraussetzung für die Ausbildung eines klassifizierten Bettes ist. Auf der anderen Seite dürfen durch den Verteiler keine Partikel aus dem Medium zurückgehalten werden. Während bei gepackten Säulen der axiale Druckabfall über das Bett deutlich zur radialen Verteilung beiträgt, ist dieser bei EBA-Säulen vergleichsweise gering, was die Bedeutung des Verteilers zusätzlich erhöht [16, 24]. Verschiedene Systeme werden in der Literatur beschrieben. Eine Möglichkeit, welche in den ersten kommerziellen Systemen Verwendung fand, ist die Etablierung eines Druckabfalls über horizontale Flussbegrenzer, einer Kombination aus Lochplatten und Edelstahl-Maschen, welche sich zwischen Säuleneingang und Chromatographiebett befinden. Der Lochdurchmesser der Maschen beträgt hierbei 60-70 μm . Neben der Ausbildung einer Kolbenströmung haben derartige Verteiler die Aufgabe, das Adsorbens in der Säule zurückzuhalten, beispielsweise, wenn der Fluss im Laufe des Prozesses umgekehrt oder gestoppt wird. Als nachteilig bei dieser Art der Flüssigkeitsverteilung hat sich gezeigt, dass Zellen zurückgehalten werden können [24, 25]. Eine Alternative zum horizontalen Flussbegrenzer wird als Rotating fluid distribution bezeichnet. Hierbei handelt es sich um eine Einheit aus langsam rotierenden Rohren, welche, ausgehend von einer zentralen Kammer, kleine Bohrungen (3 mm) aufweisen, durch die die Prozesslösung in die Säule unter Ausbildung einer Kolbenströmung eintritt. Mit diesem System sollen die genannten Probleme des horizontalen Flussbegrenzers gelöst werden. Darüber hinaus soll die Möglichkeit einer Verwendung kleinerer Adsorbentien, welche höhere dynamische Bindungskapazitäten aufweisen, eröffnet werden [22, 26].

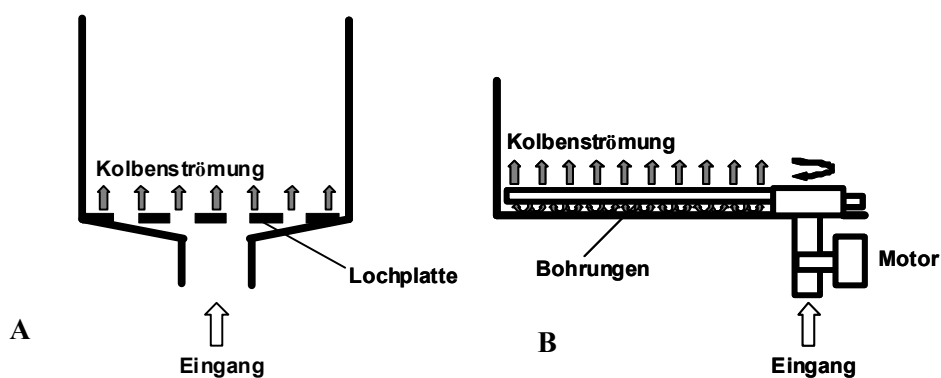


Abbildung 3: EBA-Verteiler. A, horizontaler Flussbegrenzer; B, rotating fluid distribution [16].

Ein breites Spektrum an Applikationen von EBA Technologie mit einer Vielzahl von Zielsubstanzen und biologischen Prozesslösungen wird in der Literatur beschrieben. Eine Auswahl unter Berücksichtigung verschiedener Expressions-Systeme, lautet wie folgt:

- Aufreinigung von humanem Epidermalem Wachstumsfaktor (hEGF) aus *Escherichia coli* Kultur [27]
- Aufreinigung von rekombinantem humanem Serumalbumin (rHSA) aus *Pichia Pastoris* Kultur [28]
- Aufreinigung von Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase aus *Sacharomyces cerevisiae* Homogenat [29]
- Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers aus einer CHO Zellkultur [30]
- Aufreinigung eines monoklonalen Antikörpers aus Hybridoma-Zellkultur [31]

Die Limitierungen, die im Zusammenhang mit der Expanded bed Adsorption genannt werden sind Wechselwirkungen zwischen Adsorbens und Biomasse, welche insbesondere bei Ionenaustauschern auftreten können. Sie haben einen starken Einfluss auf die Hydrodynamik des fluidisierten Bettes. Verstärkte Vermischung, Kanalbildung und die Ausbildung von Totzonen führen in diesem Fall zu einer Verringerung der dynamischen Bindungskapazität, sowie einer Vergrößerung des Elutionsvolumens [13, 23]. Insbesondere bei Hochzelldichte-Fermentationen besteht die Gefahr, dass die stark erhöhte Viskosität und Dichte der Fermentationslösung zu einer ungünstigen Bettexpansion führt, weshalb für derartige Applikationen ein Verdünnungsschritt vor dem Auftrag auf die Säule notwendig ist. Ein maximaler Feuchtmasse-Gehalt von 15% wird daher für EBA-Prozesse empfohlen [32]. Weiterhin wird beschrieben, dass EBA-Prozesse eine relativ langsame Prozessgeschwindigkeit aufweisen [33].

2.2.2 Makroporöse Monolithen

Makroporöse Monolithen entstehen durch Cryo-Polymerisation von Acrylamid. Die Kristalle des Lösungsmittels dienen hierbei als Porogen. Nach dem Schmelzen der Eiskristalle verbleibt eine makroporöse Matrix mit einer durchgehenden Porenstruktur, deren Porengröße mit 10 bis 100 µm angegeben wird. Makroporöse Monolithen werden auch unter dem Namen „supermakroporöse Adsorbentien“ beschrieben [34]. Aufgrund der offenen Porenstruktur von makroporösen Monolithen eignen sie sich prinzipiell zur direkten Adsorption von Biomolekülen aus partikelhaltigen Medien. Mit Kupfer-Iminodiacetat funktionalisierte Cryogele wurden beispielsweise für die Aufreinigung von Antikörperfragmenten aus *Escherichia coli* Homogenaten eingesetzt, ohne der Notwendigkeit eines vorhergehenden Klärungsschrittes [35]. Aufgrund der geringen Oberfläche der supermakroporösen Struktur ist die Bindungskapazität dieser Adsorbentien im Vergleich zu Chromatographiegele gering. Vorteilhaft ist dagegen die weitgehende Unabhängigkeit des Stofftransfers von der Flussrate, weshalb

vergleichsweise hohe Flussraten angewendet werden können. Mögliche Anwendungsfelder für dieses Verfahren liegen in der Online-Analytik von Fermentationsprozessen oder der direkten, schnellen Aufreinigung labiler Produkte aus Fermentationslösungen [6].

2.2.3 Wässrige 2-Phasen Extraktion

Die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln ist in der chemischen Industrie weit verbreitet und die zugrunde liegenden Mechanismen für die Extraktion kleiner Moleküle gut verstanden. In der biotechnologischen Industrie werden Antibiotika aus Fermentationsbrühen mit dieser Methode aufgereinigt. Viele Proteine sind in organischen Lösungsmitteln jedoch nicht löslich und werden durch diese inaktiviert, weshalb in diesem Bereich die wässrige Zwei-Phasen Extraktion zum Einsatz kommt [7]. Das Prinzip der wässrigen Zwei-Phasen Extraktion beruht auf der Ausbildung zweier nicht-mischbarer Phasen, welche sich bilden, wenn zwei inkompatible, hydrophile Polymere oberhalb einer bestimmten Konzentration in Wasser gelöst werden [36]. Ein Beispiel für diese Art der Phasentrennung ist das System Polyethylenglykol (PEG) und Dextran, wobei PEG die sog. leichte Phase und Dextran die schwere Phase bildet. Die Phasentrennung kann alternativ durch Zugabe eines lyotropen Salzes (Phosphat oder Sulfat) zu einer Polymerlösung (PEG in Wasser) erreicht werden (Aussalzeffekt) [32]. Eine dritte Möglichkeit der Phasentrennung basiert auf der Verwendung nicht-ionischer Detergenzien, welche oberhalb einer charakteristischen Temperatur, welche als Cloud-point Temperatur bezeichnet wird, die Phasentrennung durch reversible Hydratisierung polarer Gruppen vollziehen. Der Vorteil detergentbasierter Systeme liegt in der Nutzung einer einzelnen Komponente für die Etablierung einer Phasentrennung. Nachteilig ist, dass dieses Verfahren nur für bestimmte Proteine, nämlich hydrophobe und amphiphile Proteine geeignet ist [37].

Die Anwendung der wässrigen Zwei-Phasen Extraktion auf die Proteinaufreinigung aus partikelhaltigen Lösungen bewirkt eine Anreicherung der festen Bestandteile der Kulturbrühe in der schweren Phase, während Proteine bevorzugt in die leichte Phase transportiert werden. Als Ergebnis erhält man eine Fest-/Flüssig-Trennung, eine Aufkonzentrierung und eine erste Proteinfractionierung in einem Verfahrensschritt. Die wässrige Zwei-Phasen Extraktion zeichnet sich hierbei insbesondere durch Kompatibilität mit hohen Feststoffgehalten der aufzuarbeitenden Fermentationslösungen aus, welche bis zu 50% Feuchtmasse betragen kann [32]. Weitere Vorteile dieses Verfahrens, welche in der Literatur beschrieben werden, sind die Möglichkeit einer kontinuierlichen Prozessführung [38], eine einfache Maßstabsvergrößerung, sowie hohe Aktivitätsausbeuten, welche in den milden Prozessbedingungen (wässriges Medium, moderate Temperaturen) begründet sind. Als hemmend hat sich hingegen der Umstand erwiesen, dass zwar die Phasentrennung in wässrigen Zwei-Phasen Systemen gut verstanden ist, die Proteinverteilung in den Phasen jedoch noch nicht vollständig geklärt ist und sich nur schwer vorhersehen lässt. Bislang existieren nur heuristische Regeln für die Prozessentwicklung, was industrielle Anwendungen behindert bzw. verlangsamt [7].

Ein Vergleich der wässrigen Zwei-Phasen Extraktion mit einer Expanded Bed Adsorption am Beispiel der Aufreinigung von humanem Chymotrypsinogen wurde von Thömmes et al. durchgeführt. Die Extraktion (PEG/Natriumsulfat) ermöglichte hierbei eine direkte Aufreinigung des Produktes aus einer Zellsuspension (50% Feuchtmasse), während für die Prozessierung mit EBA ein Verdünnungsschritt (auf 12,5% Feuchtmasse) obligatorisch war. Im Falle der Extraktion wurde ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt benötigt, indem das Produkt über eine gepackte Säule aus der PEG-Phase zurückgewonnen wurde. Nach diesem Schritt zeigte das Produkt eine vergleichbare Reinheit wie das Eluat des EBA-Verfahrens [32].

2.2.4 Batch-Adsorption

Die Batch-Adsorption beschreibt ein Verfahren, bei dem das Adsorbens vollständig mit der Prozesslösung gemischt und über einen geeigneten Zeitraum gerührt wird [39]. In der Regel wird die Batch-Adsorption dann beendet, wenn sich ein Gleichgewicht zwischen der Suspension und dem Adsorbens eingestellt hat. An den Adsorptions-Schritt schließt sich dann eine Trennung des beladenen Adsorbens von der Suspension an.

Neben einer Kompatibilität für partikelhaltige Medien hat die Batch-Adsorption unter bestimmten Voraussetzungen Vorzüge gegenüber der Prozessierung mit einer Chromatographiesäule. So ist die Möglichkeit einer schnellen Prozessierung großer Volumina gegeben, da bei diesem Verfahren das gesamte Adsorbens in Kontakt mit der Prozesslösung steht. Dieser Vorteil ist für stark verdünnte Lösungen besonders ausgeprägt, deren Prozessierung mit einer Chromatographie-Säule mehrere Stunden in Anspruch nehmen kann. Eine Batch-Adsorption hingegen ist, unabhängig vom Maßstab, in der Regel nach 30 bis 60 Minuten abgeschlossen [40, 41]. Neben dem Faktor Zeit und dem Ziel einer hohen Produktivität ist eine schnelle Adsorption auch für die Stabilität von Proteinen entscheidend, da diese dadurch rasch dem Zugriff von Proteasen entzogen werden können [41-43].

Bedingt durch den Umstand, dass die Batch-Adsorption ein einfacher Gleichgewichtsprozess ist, ergibt sich eine verminderte Bindungscharakteristik [44]. Die daraus resultierende reduzierte Bindungskapazität muss daher durch Verwendung einer größeren Menge Adsorbens ausgeglichen werden. Die Anwendung von Batch-Verfahren ist dadurch in erster Linie auf die Verwendung kostengünstiger Liganden beschränkt [40].

Batch-Adsorptionen lassen sich mit folgendem Ansatz mathematisch beschreiben [45]. Angenommen, das Protein (P) adsorbiert an einer Matrix, welche einen Liganden (L) trägt, so entsteht ein Komplex aus Protein und Ligand (PL):



k_1 : Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion

k_2 : Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion

Die Adsorption des Proteins am Adsorbens kann mit folgender Massenbilanz beschrieben werden:

$$\frac{dq}{dt} = k_1 \cdot c \cdot (q_{\max} - q) - k_2 \cdot q \quad (2)$$

q : Konzentration des Proteins am Adsorbens

c : Konzentration des Proteins in Lösung

q_{\max} : maximale Bindungskapazität des Adsorbens

Im Gleichgewicht vereinfacht sich Gleichung 2 zu:

$$q^* = \frac{q_{\max} \cdot c^*}{(k_d + c^*)} \quad (3)$$

wobei $k_d = k_2/k_1$ die Dissoziationskonstante ist. Der hochgestellte Index * beschreibt jeweils den Gleichgewichtszustand.

Gleichung 3 wird auch als Langmuir-Isotherme bezeichnet. Protein-Adsorbens-Gleichgewichtsreaktionen lassen sich mit diesem Ansatz in der Regel gut beschreiben, auch wenn die Annahmen, auf dem das Modell basiert (Adsorption in einer einzelnen molekularen Schicht, äquivalente Bindungsstellen, reversible Interaktion mit einer Bindungsstelle) für die Adsorption von Proteinen meist nicht zutreffen [33].

Batch-Adsorptionen lassen sich unter Kenntnis der Isotherme, welche für jede Protein/Adsorbens Kombination experimentell bestimmt werden muss, einfach berechnen. Für die Proteinmenge, welche im Laufe einer Adsorption aus der Lösung an das Adsorbens bindet, lässt sich die folgende Massenbilanz aufstellen:

$$c_0 \cdot V + q_0 \cdot v = c^* \cdot V + q^* \cdot v \quad (4)$$

V: Volumen der Proteinlösung

v: Volumen des Adsorbens

tief gestellter Index 0: zum Zeitpunkt t=0

Unter der Voraussetzung, dass die Proteinkonzentration am Adsorbens zum Zeitpunkt t=0, also q_0 , gleich null ist, lässt sich Gleichung 4 wie folgt vereinfachen:

$$c^* = c_0 - \frac{v \cdot q^*}{V} \quad (5)$$

Zusammen mit Gleichung 2 und Einführung der Dissoziationskonstante k_d folgt für den Gleichgewichtszustand:

$$\left(c_0 - \frac{v \cdot q^*}{V}\right) \cdot (q_{\max} - q^*) - K_d \cdot q^* = 0 \quad (6)$$

Auflösung von Gleichung 6 nach q^* und Einsetzen in Gleichung 5 ergibt:

$$c^* = c_0 - \frac{1}{2} \cdot \left(b - \sqrt{b^2 - \frac{4q_{\max} \cdot c_0 \cdot v}{V}}\right) \quad (7)$$

wobei $b = (K_d + c_0 + q_{\max} \cdot v/V)$ ist.

Unter Kenntnis der Adsorptionsisothermen, bzw. der charakteristischen Parameter K_d und q_{\max} kann mit Hilfe von Gleichung 7 für ein bestimmtes Trennproblem (V und c_0) die Gleichgewichtskonzentration des Produktes c^* bei Verwendung einer bestimmten Menge Adsorbens (v) berechnet werden. Aus der Gleichgewichtskonzentration kann dann die Ausbeute einer Adsorption, die bis zum Erreichen des Gleichgewichtes durchgeführt wird, berechnet werden. Üblicherweise wird für einen Prozess eine bestimmte Ausbeute angestrebt. In diesem Fall lässt sich mit Hilfe von Gleichung 7 die Menge Adsorbens v berechnen, welche eingesetzt werden muss, um diese Ausbeute zu erzielen.

Ein Nachteil, der im Zusammenhang mit Batch-Adsorptionsprozessen genannt wird, ist die Schwierigkeit, das Adsorbens nach erfolgter Adsorption aus der Prozesslösung abzutrennen. Bei klassischen Batch-Prozessen werden hierzu Zentrifugen oder spezielle Filter eingesetzt [40]. Neuere Verfahren, welche das Prinzip der Batch-Adsorption nutzen, bieten Lösungsansätze zur effektiven Prozessierung und werden im Folgenden behandelt.

2.2.5 High Gradient Magnetic Separation (HGMS)

High Gradient Magnetic Separation basiert auf dem Einsatz sehr kleiner, nichtporöser superparamagnetischer Adsorbentien. Superparamagnetismus tritt bei sehr kleinen Teilchen ($< 300 \text{ \AA}$) aus ferromagnetischem Material auf und ist dadurch gekennzeichnet, dass die Teilchen auf ein angelegtes magnetisches Feld ansprechen, dabei aber keine permanente Magnetisierung erhalten. Diese Eigenschaft ist Voraussetzung für den Einsatz im HGMS-Verfahren [46, 47].

Die Adsorption wird in einem gerührten Behälter durchgeführt. Aufgrund der geringen Größe des Adsorbens ergibt sich eine große Oberfläche und damit eine hohe Bindungskapazität, während die nichtporöse Struktur einen raschen Stofftransfer (keine Transportlimitierung durch Porendiffusion) ermöglicht. Nach Einstellung des Gleichgewichtes zwischen Adsorbens und Lösung wird das magnetische Adsorbens mit Hilfe eines Magneten gefangen und so von der Beladungslösung separiert. Nach Durchführung von Waschschritten erfolgt die Elution, indem das Adsorbens im Elutionspuffer rezirkuliert wird und anschließend erneut durch den Magneten gefangen und so aus dem Eluat entfernt wird. Eine mechanische Abtrennung des Adsorbens entfällt. Das Verfahren kombiniert die Vorzüge einer schnellen und gut skalierbaren Batch-Adsorption mit einer schnellen Abtrennung des beladenen Adsorbens im magnetischen Feld [15, 33].

HGMS-Verfahren erlauben die Verarbeitung komplexer biologischer Suspensionen, welche Partikel enthalten können. Die Abwesenheit einer Porenstruktur wirkt sich hierbei positiv auf die Kompatibilität mit zellhaltigen Medien aus, da nicht-poröse Adsorbentien weniger stark zu Verblockung (engl. fouling) neigen und leichter zu reinigen sind [48]. Mit diesen Eigenschaften eignet sich das Verfahren prinzipiell für einen integrierten Ansatz der Proteinaufreinigung aus zellhaltigen

Medien. Beispiele für eine erfolgreiche Anwendung sind die Abtrennung von Trypsin aus Pankreatin [15] und die Adsorption von Proteasen aus einer *Bacillus licheniformis* Kultur [49].

Bislang beschränkt sich der kommerzielle Einsatz von HGMS auf den Labormaßstab als analytisches oder diagnostisches Verfahren [50]. Einwände gegenüber einer industriellen Anwendung des Verfahrens bestehen in den hohen Kosten funktionalisierter, superparamagnetischer Adsorbentien. Neue Ansätze zur Herstellung durch Sprühtrocknungsverfahren zeigen Potential zur Kostenreduktion und könnten dazu beitragen, dass HGMS-Verfahren Einzug in die industrielle Aufarbeitung von pharmazeutischen Proteinen erhalten [51, 52].

2.2.6 Suspended Bed Chromatographie (SBC)

Die Suspended Bed Chromatographie basiert ebenfalls auf den Grundzügen der Batch-Adsorption. Nach erfolgter Adsorption im gerührten Reaktor wird das beladene Adsorbens in eine Chromatographiesäule geladen, gewaschen und einer Elution im Durchlaufverfahren unterzogen. In besonderer Ausführung wird die Ansatz-Station der Chromatographiesäule als Batch-Reaktor genutzt und das Adsorbens während der Beladung durch Rezirkulation in Schwebelage gehalten. Eine Filtration nach abgeschlossener Adsorption erfolgt durch die Unterstützungssiebe der Säule, welche das Adsorbens zurückhalten und damit die Abtrennung von der Beladungslösung erlauben [40, 53]. Aufgrund der Beladung im Batch-Modus ist dieses Verfahren ebenfalls geeignet für die direkte Adsorption von Proteinen aus zellhaltigen Medien. Als Beispiel einer erfolgreichen Anwendung ist die Aufreinigung des Enzyms Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase aus dem Homogenat einer *Saccharomyces cerevisiae* Suspension zu nennen [54, 55].

2.3 Integrierte Verfahren mit Membranadsorbern

2.3.1 Membranadsorber

Seit der ersten wissenschaftlichen Veröffentlichung zum Thema Membranchromatographie im Jahr 1986 durch Hou und Mandaro [56] dauerte es einige Jahre, bis Membranadsorber Ende der 1990er Jahre ihren Weg in die Produktion biopharmazeutischer Wirkstoffe fanden [57]. Membranadsorber sind chemisch funktionalisierte, makroporöse Membranen. Ein wesentlicher Unterschied gegenüber herkömmlichen porösen Chromatographiegelten (beads) besteht darin, dass die Poren eines Membranadsorbers konvektiv durchströmt werden, während die Poren von Chromatographiegelten als Sackporen ausgebildet sind und einen diffusiven Stofftransfer in die Porenstruktur (Porendiffusion) erfordern. Bei Membranadsorbern ist der zugrunde liegende Stofftransfer vorwiegend konvektiver

Natur, was bewirkt, dass die dynamische Bindungskapazität in einem weiten Bereich unabhängig von der angewendeten Flussrate ist [58-60]:

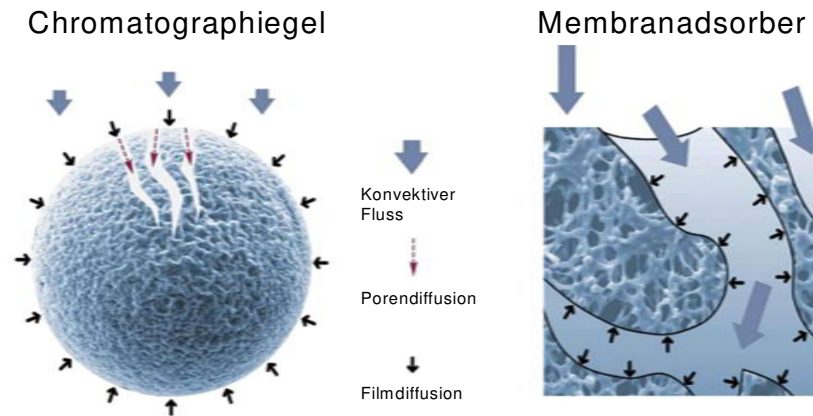


Abbildung 4: Vergleich Stofftransfer in Chromatographiegelen und Membranadsorbern [61].

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften ist der Einsatz von Membranadsorbern dem von Chromatographie-Säulen dann überlegen, wenn große Volumina in kurzer Zeit prozessiert werden müssen, insbesondere dann, wenn die Konzentration des Adsorbenden gering ist. Klassisches Beispiel einer solchen Applikation ist die Kontaminanten-Entfernung (engl. Polishing) mit positiv geladenen Liganden (Anionenaustauscher) am Ende eines Aufreinigungsprozesses. Dieser Schritt wird üblicherweise als flow-through Chromatographie durchgeführt, bei der die Kontaminanten binden, während das Produkt ungebunden durch das Adsorbens läuft [62-66]. Viele der Kontaminanten (z.B. Viren, Endotoxine, DNA, Wirtszellproteine) sind große Biomoleküle mit einem Molekulargewicht von über 10^6 Dalton, welche bei Verwendung von beads aufgrund von Größenausschlusseffekten nur auf deren äußerer Fläche binden und die Bindungskapazität dadurch signifikant senken [67]. Membranadsorber verfügen aufgrund ihrer offenen, makroporösen Membranstruktur über eine weitgehende Unabhängigkeit der Bindungskapazität von der Molekülgröße [68]. Die spezifische Oberfläche einer makroporösen Membran ist im Vergleich zu Chromatographiegelen gering. Durch Einbringen einer Polymerstruktur, die die Membranporen unter Bildung einer drei-dimensionalen Struktur auskleidet, konnte die spezifische Oberfläche und damit die Bindungskapazität von Membranadsorbern erheblich gesteigert werden. Der Prozess des Einbringens einer Polymerstruktur wird als „Pfpfung“ (engl. grafting) bezeichnet [69-71].

Der Einsatz von Membranadsorbern konzentriert sich derzeit vorwiegend auf die Kontaminanten-Entfernung. Membranchromatographische Anwendungen im Bereich des Capturings beschränken sich auf die Aufreinigung von großen Biomolekülen bzw. auf die Adsorption aus verdünnten Lösungen, z.B. bei geringer Konzentration des Produktes in der Kulturbrühe. Beim Capturing bindet das Produkt

an das Adsorbens, während die Verunreinigungen ungebunden durchlaufen und so vom Produkt getrennt werden. Ein Beispiel ist die Proteinaufreinigung aus filtrierter Zellkulturlösung. Durch Implementierung eines Membranadsorbers anstelle einer Chromatographiesäule konnte der Aufreinigungsprozess vereinfacht werden (Wegfall von Aufkonzentrierungsschritten vor dem Produkt-Capture) [72]. Ein weiteres Beispiel ist die Aufreinigung von Influenza-Viren aus Zellkulturbrühen. Gegenüber dem herkömmlichen Säulenprozess konnten Produktivität und Ausbeute gesteigert werden [73].

Aufgrund der Beschaffenheit von Membranadsorbern ergeben sich gegenüber dem Einsatz von Chromatographiegelen neue Möglichkeiten im Bereich der Adsorption aus zellhaltigen Medien. Im Folgenden werden integrierte Verfahren vorgestellt, bei denen Membranadsorber als adsorptive Matrix eingesetzt werden.

2.3.2 Cross-Flow Affinity Filtration (CFAF)

Crossflow-Cassetten werden innerhalb eines Aufarbeitungsschemas als Mikrofilter zur Abtrennung von Partikeln oder als Ultrafilter zur Aufkonzentrierung, zur Diafiltration oder zur Größentrennung von Proteinen eingesetzt. Die Verwendung von Crossflow-Cassetten mit eingebauten makroporösen Affinitätsmembranen wurde mit dem Ziel einer selektiven adsorptiven Proteinaufreinigung aus zellhaltigen Suspensionen erstmals von Krause et al. beschrieben [74]. Die empfohlene Betriebsweise eines CSAF-Systems während der Adsorption erfolgt durch Rezirkulation des Retentats unter Rückführung des Filtrates in den Rezirkulationsbehälter [75].

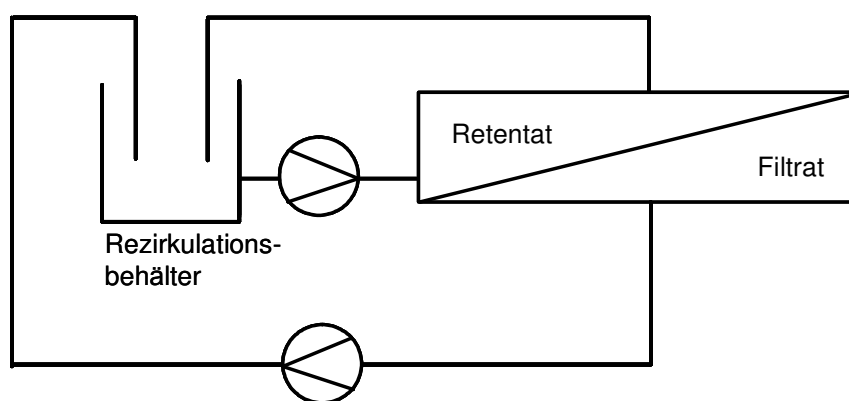


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Adsorptions-Schrittes bei der Cross-Flow Affinity Filtration (CFAF).

Diese Betriebsweise führt dazu, dass die Konzentration der festen Bestandteile im Retentat über die Prozesszeit konstant bleibt, während das Produkt mit fortschreitender Prozesszeit an die Affinitätsmembran bindet und auf diese Weise aus dem Retentat abgereichert wird. Das Verfahren ist bzgl. der Bindungskinetik vergleichbar mit einer Batch-Adsorption und die Abnahme der Konzentration des Zielmoleküls lässt sich mit einer Kinetik erster Ordnung beschreiben. Die Ausnutzung der Gesamtbindungskapazität ist abhängig von der Steilheit der Bindungsisothermen [75]. Ein Nachteil des Verfahrens ist die inhomogene Durchströmung der Membran, die sich aufgrund des Druckabfalls im Strömungskanal beim Crossflow-Betrieb von Membranen zwangsläufig einstellt [9].

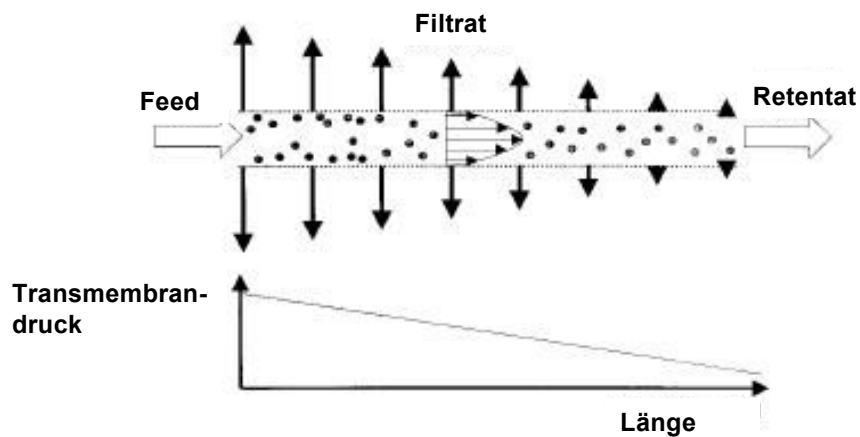


Abbildung 6: Druckabfall im Strömungskanal einer Crossflow-Cassette mit der Folge einer inhomogenen Membranpermeation [9].

Eine inhomogene Durchströmung führt zu ungleichmäßiger Ausnutzung der Membrankapazität über die Länge des Strömungskanals. Durch Rückführung des Filtrats kommt es zwar nicht zu Verlusten aufgrund von verfrühten Durchbrüchen, jedoch wird der Abreicherungsprozess durch die inhomogene Durchströmung der Membran insgesamt verlangsamt. Experimente mit geklärten sowie mit ungeklärten *Escherichia coli* Zellhomogenaten ergaben, dass eine direkte Aufreinigung von Proteinen aus Bakterienhomogenat (10% Feuchtmasse) prinzipiell möglich ist. Im Vergleich zu einer Aufreinigung aus geklärtem Homogenat wurde jedoch eine starke Beeinträchtigung der Modul-Leistung festgestellt. Als Ursache des Leistungsabfalls durch Biomasse wurde zum einen der negative Einfluss von Biomasse auf die Effizienz der Adsorption des Zielmoleküls und zum anderen eine reduzierte Flussrate durch die Membran genannt [76].

2.3.3 Controlled Shear Affinity Filtration (CSAF)

Dieses Verfahren hat seinen Ursprung in der Rotating Disc Filtration. Hierbei handelt es sich um ein dynamisches Filtrationsverfahren, bei dem axial rotierende Elemente zur Erzeugung von Scherkräften eingesetzt werden, um die Deckschicht an der Membran zu minimieren. Gegenüber der Crossflow-Filtration erlaubt dieses Verfahren eine Entkopplung des Einbringens von Scherkräften an der Membranoberfläche und der Kontrolle des transmembranen Differenzdruckes [77]. Mit dem Ziel, die Rotating Disc Filtration auch im Bereich scherempfindlicher Medien (z.B. Zellkulturen) anwenden zu können, wurde der Rotor konisch ausgeführt, was in der Controlled Shear Filtration (CSF) realisiert wurde [78]. Bei der CSAF (Controlled shear affinity filtration) wiederum wird die Filtrationskammer der CSF verwendet, mit der Besonderheit, dass anstelle einer Filtrationsmembran eine adsorptive Membran eingesetzt wird.

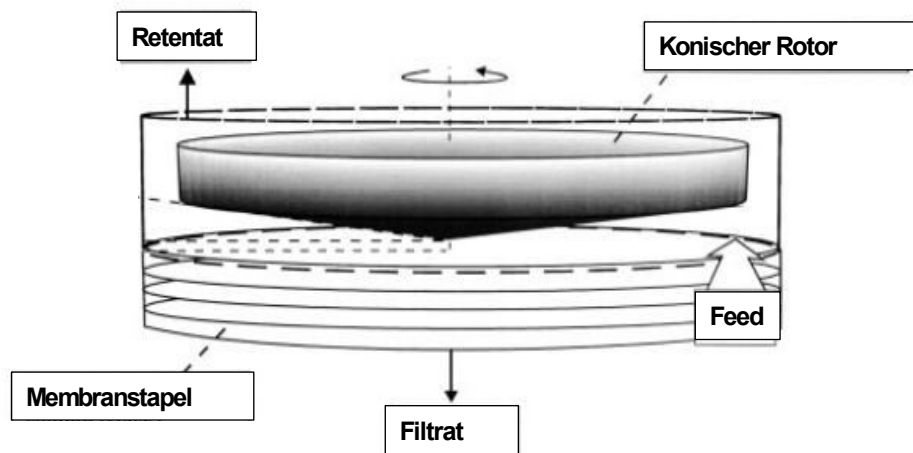


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Aufbau eines Controlled Shear Affinity Filtration (CSAF) Moduls [9].

Dieser Aufbau kann für den integrierten Ansatz einer Proteinaufreinigung aus Zellkulturbrühe eingesetzt werden. Der Fluss durch die adsorptive Membran wird durch Kontrolle des Druckes in der Filtrationskammer erreicht, während der konisch ausgeführte Rotor der Vermeidung von Membranfouling dient ohne dabei die Zellen zu schädigen. Die Maßstabsvergrößerung erfolgt bei diesem Verfahren durch Erhöhung der Membranlagenzahl. Darüber hinaus ist es möglich, die Filtrationskammer so auszuführen, dass zwei Membranstapel an einer Kammer (jeweils oberhalb und unterhalb des Rotors) angeordnet sind, oder indem der Membrandurchmesser erhöht wird. Gegenüber der CFAF bietet dieses Verfahren den Vorteil einer homogenen Durchströmung der Membran [9].

2.3.4 Membranadsorber-Modul zur Aufreinigung von partikelhaltigen Medien

Mit dem Ziel, die Vorzüge der Membranchromatographie zur Aufreinigung von Wertstoffen aus partikelhaltigen Medien zu nutzen, wurde folgender Ansatz, welcher ein Verfahren sowie eine Vorrichtung beinhaltet, gefunden [79]. Der beschriebene Modulaufbau sieht vor, dass die gesamte adsorptiv wirksame äußere Oberfläche des Adsorbens vom Medium tangential überströmt wird. Die Überströmung erfolgt dabei in der Weise, dass an jeweils gegenüberliegenden Punkten der beiden Oberflächenseiten des Adsorbens im Wesentlichen gleiche Druck- bzw. Strömungsgeschwindigkeitsverhältnisse herrschen. Im Gegensatz zu den vorgestellten Verfahren CFAF und CSAF ist hier eine sog. Zwangsdurchströmung (Strömungsführung ohne Umströmungsmöglichkeit im By-Pass) der Membran ausgeschlossen. Für den Aufbau von Modulen werden verschiedene Ausführungsformen vorgeschlagen. Eine bevorzugte Ausführungsform besteht darin, die adsorptive Membran spiralförmig um einen fluiddichten Kern zu wickeln, wobei zwischen den einzelnen Membranlagen tangential durchströmbare Abstandshalter angeordnet sind, die einen definierten Abstand zwischen den Membranlagen erzeugen. Neben der Aufgabe, einen Abstand zwischen den Membranlagen und damit eine Partikelgängigkeit des Moduls zu gewährleisten, dient der Abstandshalter der Erzeugung von Mikroturbulenzen. Diese sollen der Ausbildung laminarer Strömungsverhältnisse an der Membran entgegenwirken, wodurch der Stofftransfer zwischen Medium und adsorptiver Membran gefördert werden soll. Die beschriebene Ausführungsform wird in Abbildung 8 dargestellt:

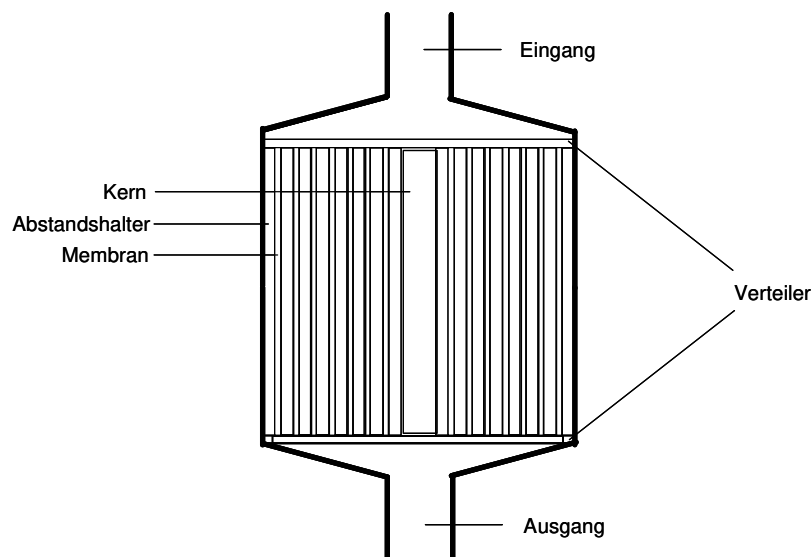


Abbildung 8: Schematische Darstellung (Längsschnitt) eines partikelgängigen Membranadsorber-Moduls.

Zum Betrieb des beschriebenen Moduls werden zwei Betriebsweisen vorgeschlagen. Beim Durchlaufverfahren wird das Medium so lange durch das Modul geführt, bis dessen Bindungskapazität erschöpft ist und die Konzentration des Wertstoffes am Modulausgang ansteigt. Das Rezirkulationsverfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass ein bestimmtes Volumen des Mediums so lange durch das Modul im Kreislauf gefördert wird, bis die erforderliche Bindung des Wertstoffes erreicht ist (Abbildung 9). Rezirkulations- und Durchlaufverfahren sind sowohl auf die Beladung als auch auf die Elution des Moduls anwendbar [79].

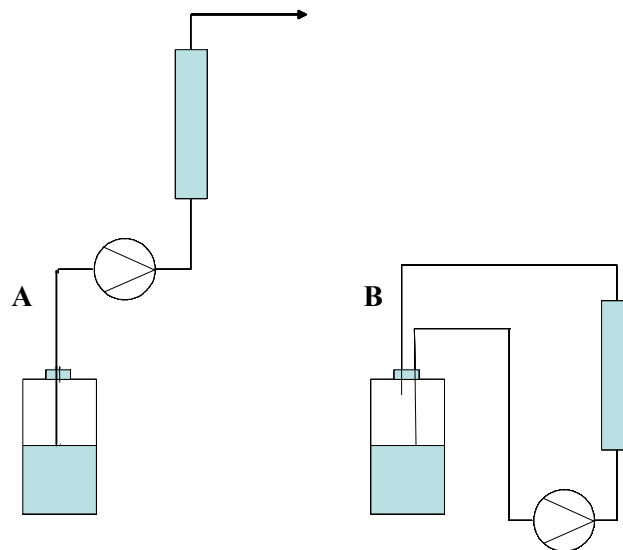


Abbildung 9: (A) Durchlaufverfahren und (B) Rezirkulationsverfahren (nach Thömmes [23]).

In Abbildung 8 lassen sich drei Modulbestandteile identifizieren, die neben der adsorptiven Membran einen möglichen Einfluss auf die Leistung eines Moduls bzgl. Proteinadsorption, Desorption (Elution) und der Partikelgängigkeit haben:

- Abstandshalter
- Verteiler
- Geometrie des Ein- und Ausgangs

Abstandshalter (engl. Spacer) sind ein wesentlicher Bestandteil von Modulen, welche im Bereich der Filtration und hier im Speziellen in der Crossflow-Filtration eingesetzt werden. Die Aufgaben des Abstandshalters sind die Separation der einzelnen Membranlagen und die Verhinderung von Konzentrationspolarisation (Deckschichtbildung) an der Membran. Ein geeigneter Abstandshalter in der Crossflow-Filtration zeigt folgende Merkmale:

Geringe Höhe: Die Verwendung von Abstandshaltern geringer Höhe und die damit verbundene Minimierung des hydraulischen Durchmessers führen zu höheren Scherkräften, wodurch der Stofftransfer gesteigert wird. Durch eine geringe Höhe des Abstandshalters lässt sich darüber hinaus die Packungsdichte eines Moduls erhöhen, da bei gleichem Moduldurchmesser mehr Membran verbaut werden kann. Die Reduzierung der Höhe eines Abstandshalters ist allerdings begrenzt durch eine erhöhte Verblockungsneigung der Module [80].

Geeignete Struktur: Neben der Höhe hat die Struktur eines Abstandshalters einen ausgeprägten Einfluss auf die Modul-Leistung von cross-flow Modulen. Typische kommerziell erhältliche Abstandshalter bestehen aus 2 Schichten von zylindrischen Filamenten, welche eine Leiterstruktur oder eine Diamantstruktur ausbilden. Derartige Abstandshalter, die in der Literatur unter der Bezeichnung „mesh-type“ beschrieben sind, werden durch Extrusionsprozesse hergestellt (Abbildung 10, A). Außerdem finden Abstandshalter Verwendung, die durch Webprozesse hergestellt werden und daher auch als gewebte Abstandshalter bzw. Gewebe bezeichnet werden. Gewebte Abstandshalter bestehen aus zwei Fadensystemen, welche rechtwinklig verkreuzt sind (Abbildung 10, B). Die beschriebenen Basistypen lassen sich weiter unterteilen, je nachdem welche Geometrie zugrunde liegt. Die geometrischen Parameter eines Abstandshalters sind die Maschenweite, der Fadendurchmesser, der Winkel der Fäden zur Flussrichtung des Mediums, sowie dessen Gesamthöhe. Beim Abstandshalter Mesh-Type kann darüber hinaus der Winkel zwischen den Fäden variieren [81].

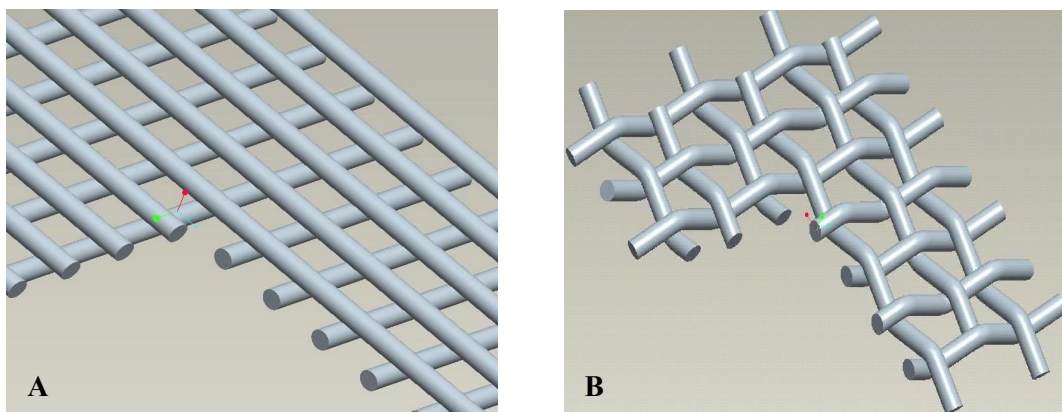


Abbildung 10: Ausführungsformen von Abstandshaltern. A, Mesh-Type; B, Gewebe.

Der Verteiler ist ein essentielles Bauteil von Chromatographieprodukten. Bei Chromatographiesäulen besteht die Notwendigkeit, das einströmende Medium gleichmäßig über den gesamten Säulenquerschnitt zu verteilen. Ein optimaler Verteiler schafft ein flaches Geschwindigkeitsprofil bei gleicher Verweilzeit der einzelnen Stromlinien. Insbesondere bei Säulen mit großem Durchmesser ist die Auslegung des Verteilers ein entscheidendes Kriterium für deren Leistung. Flache, poröse Platten oder nicht-durchlässige Platten mit verzweigten Kanälen bilden die Basis bekannter Verteilersysteme. Üblicherweise befindet sich hinter den Platten ein Hohlraum, der einen schnellen radialen Fluss und damit eine radiale Verteilung des eintretenden Mediums ermöglicht. Bei dicht gepackten Chromatographiesäulen erleichtert der Druckabfall über das Bett die radiale Verteilung, da das einströmende Medium dadurch in die radiale Richtung gezwungen wird [82, 83]. Moderne Verteilersysteme, die eine gleichmäßige Verteilung auch bei geringem Druckabfall über das Bett gewährleisten sollen, beinhalten Verteilerkanäle mit spezifisch gestalteten geometrischen Fraktalen [84]. Die Gestaltung von Verteilern bei partikelgängigen Chromatographieprodukten muss darüber hinaus berücksichtigen, dass durch die integrierten Bauelemente kein Partikel-Rückhalt erfolgen darf (vgl. Kapitel 2.2.1).

Die Geometrie des Ein- und Ausgangs einer Chromatographiesäule nimmt ebenfalls Einfluss auf die Flüssigkeitsverteilung. Pelz et al [85] untersuchten diverse geometrische Ausführungen und deren Einfluss auf die Chromatographieleistung, welche anhand von Verweilzeitverteilungen und Durchbruchkurven beurteilt wurde. Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass die zylindrische Ausführung eine erhebliche Vermischung am Ausgang einer Chromatographiesäule verursacht. Durch eine konische Ausführung kann der Effekt verringert werden. Die besten Resultate wurden durch einen exponentiell gestalteten Trichter erzielt (Abbildung 11).

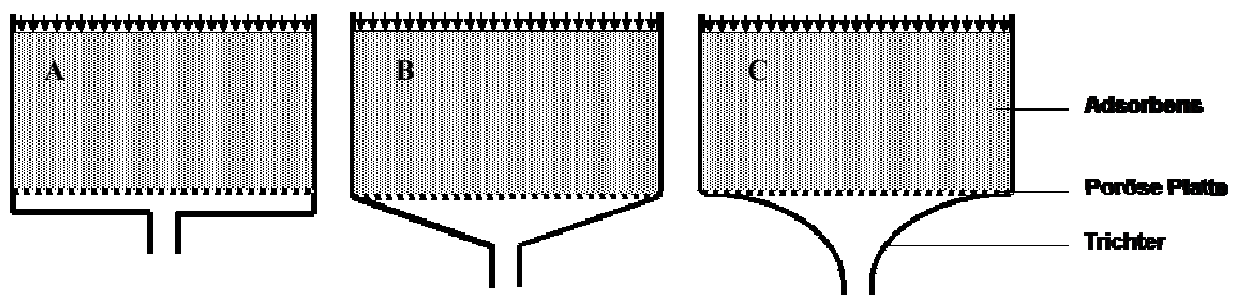


Abbildung 11: Ausführungsformen der Ausgangsgeometrie von Chromatographiesäulen nach Pelz et al. [85]. A, zylindrisch; B, konisch; C, exponentiell.

3 Praktische Arbeiten

3.1 Modulentwicklung

Ein Membranadsorber-Modul zur Aufreinigung partikelhaltiger Medien ist, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, aus verschiedenen Komponenten aufgebaut. Im Folgenden wird der Einfluss einzelner Komponenten des Membranadsorber-Moduls anhand von Modellsystemen untersucht und deren Eignung für eine integrierte Proteinaufreinigung aus partikelhaltigen Medien bewertet. Außerdem wird in diesem Teil der Arbeit die Modulgeometrie als mögliche Einflussgröße auf die Modul-Leistung betrachtet.

3.1.1 Adsorptive Membran

Die entscheidenden Leistungsparameter einer adsorptiven Membran sind die Bindungskapazität und die Permeabilität. Wie in Kapitel 2.3.1 dargelegt wurde, ist es möglich, die spezifische Oberfläche einer Membran durch Einbringen einer dreidimensionalen Polymerstruktur (Pfropfung oder Beschichtung) zu erhöhen, wodurch die Bindungskapazität erheblich gesteigert werden kann [69, 71]. Mit dem Ziel, den Einfluss der Membran auf die Modul-Leistung zu untersuchen, wurden drei starke Anionenaustauschermembranen mit quaternären Ammoniumliganden verwendet, welche sich hinsichtlich des Pfropf-Grades deutlich unterschieden. Membran A wies hierbei den geringsten, Membran C den stärksten Pfropfgrad auf. Ein stärkerer Pfropfgrad wurde durch Erhöhung der Monomerkonzentration im Herstellprozess erreicht. Aus den Membranen A, B und C wurden partikelgängige Membranadsorber-Module gemäß Abbildung 8 auf Seite 22 aufgebaut. Für die Charakterisierung der Membran wurden aus den Randstreifen der Modulwickel Membranstanzlinge entnommen.

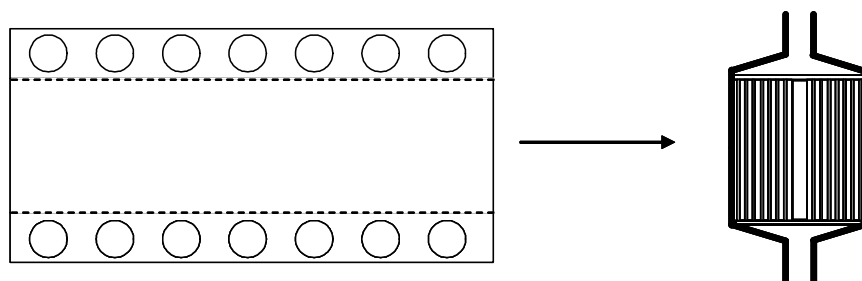


Abbildung 12: Die Entnahme der Membranstanzlinge erfolgte aus dem Randbereich der Membranbahn, aus dem der Wickel gefertigt wurde.

Die Permeabilität der Membranzlinge (Durchmesser: 25 mm) wurde unter Verwendung von Tris-HCl-Puffer durch Messung des Durchflusses bei 1 bar Differenzdruck bestimmt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Pfropfgrad und Permeabilität (P) der verwendeten Membranen A bis C. Die Permeabilität wurde mit Tris-HCl-Puffer bei 1 bar Differenzdruck gemessen

Membran	Pfropfgrad	P [ml/(min*bar*cm ²)]
A	niedrig	118
B	mittel	108
C	hoch	19

Zur Beurteilung der Bindungskapazität wurden Adsorptionsisothermen aufgenommen. Als Modellprotein wurde bovines Serumalbumin (BSA) eingesetzt. BSA hat einen isoelektrischen Punkt von 4,9 [86, 87] und bindet aufgrund seiner negativen Nettoladung bei neutralem pH-Wert an der positiv geladenen Membran. Nach Equilibrierung in Phosphatpuffer wurden die Membranzlinge über Nacht in BSA-Lösungen mit unterschiedlichen Startkonzentrationen geschüttelt. Die Bindungskapazität wurde anschließend aus der Differenz der Gleichgewichtskonzentration am Ende der Adsorption und der jeweiligen Startkonzentration berechnet. Je Membran wurden 3 Bestimmungen durchgeführt, welche als Regressionsisotherme nach Langmuir [88] gemittelt wurden (Abbildung 13, Versuchsdurchführung s. Anhang 2.3.1, Seite 117).

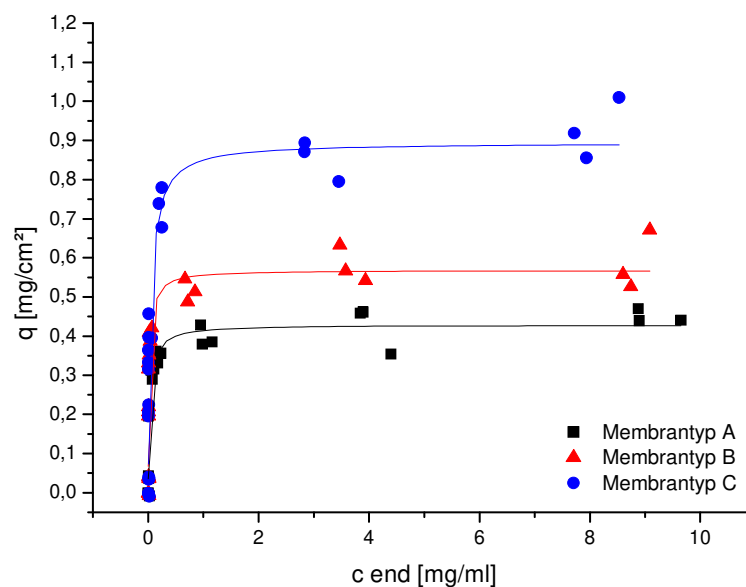


Abbildung 13: Adsorptionsisotherme nach Langmuir von unterschiedlich stark gepfropften Membranen. Membran A (niedriger Pfropfgrad), B (mittlerer Pfropfgrad) und C (hoher Pfropfgrad); c_{end} , Endkonzentration; q , Bindungskapazität.

Die charakteristischen Parameter der Isotherme nach Langmuir sind die maximale Bindungskapazität q_{\max} und die Dissoziationskonstante k_D , welche in Tabelle 2 aufgeführt sind.

Tabelle 2: Isothermenparameter von unterschiedlich stark gepfropften Membranen. k_D , Dissoziationskonstante; q_{\max} , maximale Bindungskapazität.

Membrantyp	Pfropfgrad	k_D [mg/ml]	q_{\max} [mg/cm ²]
A	niedrig	$0,04 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,02$
B	mittel	$0,02 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,04$
C	hoch	$0,05 \pm 0,02$	$0,89 \pm 0,06$

Die untersuchten Membranen weisen signifikante Unterschiede hinsichtlich der Permeabilität (Tabelle 1) und der maximalen Bindungskapazität (Tabelle 2) auf. Membrantyp A (niedriger Pfropfgrad) zeigt eine hohe Permeabilität bei geringer maximaler Bindungskapazität. Membrantyp C zeigt bei einem hohen Pfropfgrad das genau gegenteilige Bild. Die Permeabilität liegt im Vergleich zu den Membranen A und B auf sehr niedrigem Niveau, während die maximale Bindungskapazität die der Membrantypen A und B deutlich übersteigt.

Die beobachteten Unterschiede hinsichtlich der Permeabilität sind auf die gepfropfte Polymerstruktur zurückzuführen, welche die makroporöse Basismembran auskleidet und die geladenen, funktionellen Gruppen trägt. Diese Struktur wird in der Literatur auch als Hydrogel-Schicht bezeichnet und verfügt im Vergleich zu den konvektiven Transportporen der Basismembran über eine feinporigere Struktur. Tatarova et al konnten zeigen, dass die Präsenz dieser Schicht die freie Querschnittsfläche der konvektiven Transportporen im Vergleich zur Basismembran reduziert [89]. Als Folge weisen Membranen, welche durch Pfropfprozesse hergestellt werden, eine geringere Permeabilität auf als die Basismembran, wobei der Effekt mit dem Grad der Pfropfung zunimmt. Die Herstellung einer adsorptiven, gepfropften Membran beinhaltet demnach einen Kompromiss aus Permeabilität und Bindungskapazität.

Das hier beschriebene partikelgängige Membranadsorber-Modul sieht keine Durchströmung, sondern eine Überströmung der Membran vor, was eine Entkopplung der Modulpermeabilität von der Membranpermeabilität bewirkt (vgl. Kapitel 2.3.4). Dadurch wird der Einsatz stark gepfropfter, hochkapazitiver Membranadsorber ohne Einbußen in der Modulpermeabilität ermöglicht. Der Einfluss des Pfropfgrades der Membran auf die Adsorptions-Leistung von partikelgängigen Membranadsorber-Modulen wurde in einem weiteren Experiment betrachtet. Dabei wurde die BSA-Lösung ($c = 0,5$ mg/ml in Phosphatpuffer) nach Equilibrierung mit Phosphatpuffer bei 12 Membranvolumen pro Minute (MV/min) im Rezirkulationsverfahren durch das Modul gefördert. Das Volumen der BSA-Lösung wurde ausgehend von der Membranfläche und einer Proteinbeladung von $0,4$ mg je cm² Membran berechnet. Die BSA-Konzentration im Rezirkulationsbehälter wurde online aufgezeichnet.

Die Auftragung der BSA-Konzentration über der Rezirkulationszeit zeigt für die drei untersuchten Membranen unterschiedliche Verläufe (Abbildung 14).

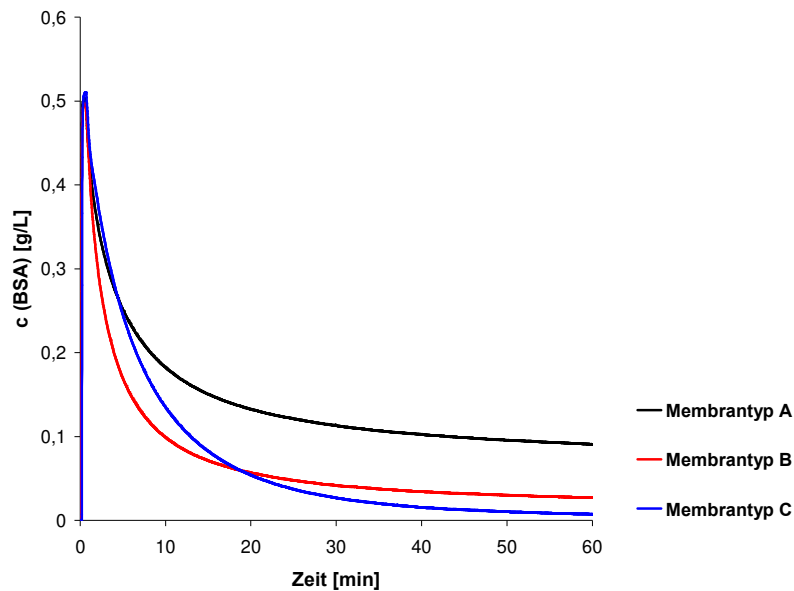


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der BSA-Konzentration im Rezirkulationsbehälter unter Verwendung von Membranen (A-C) mit unterschiedlichem Pfropfgrad. A, niedriger Pfropfgrad; B, mittlerer Pfropfgrad; C, hoher Pfropfgrad; c (BSA), BSA-Konzentration im Rezirkulationsbehälter. Versuchsbedingungen: Proteinbeladung 0,4 mg/cm²; Proteinkonzentration 0,5 mg/ml in Phosphatpuffer; Volumenstrom 12 MV/min; Modulnummern 7030883 (Membrantyp A), 7030983 (Membrantyp B), 7030783 (Membrantyp C).

Die Proteinadsorption erfolgte unter Verwendung von Membrantyp A (niedriger Pfropfgrad) vergleichsweise unvollständig. Die Restkonzentration von BSA betrug nach 60 Minuten 0,09 mg/ml, was 18% der Starkonzentration entsprach. Im Fall des Membrantyps B verblieben 6% des BSA ungebunden im Rezirkulationsbehälter, während bei Membrantyp C noch 2% des BSA in Lösung waren. Die Vollständigkeit der Adsorption wird als Adsorptionseffizienz bezeichnet [43], welche bei konstantem Rezirkulationsvolumen ausgehend von der Start- und der Endkonzentration der Zielsubstanz (hier: BSA) wie folgt berechnet wird.

$$\text{Adsorptionseffizienz} = \frac{(c_{\text{Start}} - c_{\text{end}})}{c_{\text{Start}}} \cdot 100\% \quad (8)$$

c_{start} : Startkonzentration [mg/ml]

c_{end} : Endkonzentration [mg/ml]

Die Adsorptionseffizienz ist im betrachteten Zeitraum von 60 Minuten für den Membrantyp C mit 98% am höchsten und für den Membrantyp A mit 82% am geringsten (Tabelle 3).

Tabelle 3: Einfluss des Pfropfgrades auf die Adsorptionseffizienz. c (BSA), BSA-Konzentration.

Membrantyp	$c(\text{BSA})_{\text{end}}$ [mg/ml]	Adsorptionseffizienz [%]
A	0,09	82
B	0,03	94
C	0,01	98

Vergleicht man die Kurvenverläufe der Membranen B und C miteinander, so fällt weiterhin auf, dass die Konzentrationsabnahme bei Membran B zu Beginn der Rezirkulation deutlich schneller verlief als bei Membran C. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist die bessere Zugänglichkeit der funktionellen Gruppen für die Zielsubstanz BSA bei Membran B. Ein geringerer Pfropfgrad führt demnach dazu, dass die gepfropfte Hydrogel-Schicht dünner und möglicherweise offenporiger ist und dadurch einen leichteren Stofftransfer erlaubt. Die gemessene höhere Permeabilität von Membrantyp B gegenüber Membrantyp C unterstützt die Annahme einer dünneren Hydrogel-Schicht. Der Aspekt der Adsorptionseffizienz im Zusammenhang mit der Bindungsisotherme sowie die Einführung einer Geschwindigkeitskonstanten zur Quantifizierung der Abreicherungs geschwindigkeit im Rezirkulationsverfahren werden im verfahrenstechnischen Teil der Arbeit (Kapitel 3.2.1) erläutert.

Zusammenfassend lässt sich zum Einfluss der adsorptiven Membran auf die Modul-Leistung festhalten, dass sowohl die statische Bindungskapazität als auch die Permeabilität einen Einfluss auf die Leistung des untersuchten Membranadsorber-Moduls haben. Eine Membran mit hohem Pfropfgrad erlaubt aufgrund der höheren maximalen Bindungskapazität eine vollständigere Adsorption der Zielsubstanz. Eine hohe Membranpermeabilität wirkt sich positiv auf die Adsorptionsgeschwindigkeit aus.

3.1.2 Abstandshalter

Bei der Herstellung partikelgängiger Membranadsorber-Module wird die adsorptive Membran zusammen mit einem Abstandshalter um einen fluiddichten Kern gewickelt (s. Kapitel 2.3.4). Der Abstandshalter definiert dadurch den Abstand zweier benachbarter Membranlagen und ist daher potentiell für die Modul-Leistung von Bedeutung. Im Folgenden wurde der Einfluss verschiedener Abstandshalter auf die Modul-Leistung bewertet. Hierzu wurde mit reinen Proteinlösungen gearbeitet, um die Adsorption und das Elutionsprofil beurteilen zu können. Die Auswirkung des Abstandshalters auf den Druckabfall über das Modul sowie dessen Partikelgängigkeit wurde anhand eines Hefe-Modellsystems gemessen. Vier Abstandshalter-Typen wurden im Verlauf der Arbeit näher untersucht (Tabelle 4 und Abbildung 15). Neben den Abstandshalter-Typen Mesh und Gewebe, welche im Bereich der Crossflow-Filtration als Abstandshalter Verwendung finden (siehe auch Abbildung 10, Seite 24), wurde ein Vlies hinsichtlich seiner Eignung als Abstandshalter untersucht. Im Bereich der Aufarbeitung werden vergleichbare Vliese beim Aufbau von Filterkerzen eingesetzt, wo sie als Drainagematerial zwischen den Plissierungen einer Membran Verwendung finden.

Tabelle 4: Charakteristik der untersuchten Abstandshalter. A, Gewebe 0,56 mm; B, Mesh 0,5 mm; C, Mesh 0,24 mm; D, Vlies 0,25 mm; n.d. nicht definiert; Abstandshaltermaterial: Polypropylen.

Abstandshalter	Typ	Höhe [mm]	Fadendurchmesser [mm]	Fadenzahl [cm ⁻¹]
A	Gewebe	0,56	0,26	10
B	Mesh	0,50	0,27	6
C	Mesh	0,24	0,15	5
D	Vlies	0,25	n.d.	n.d.

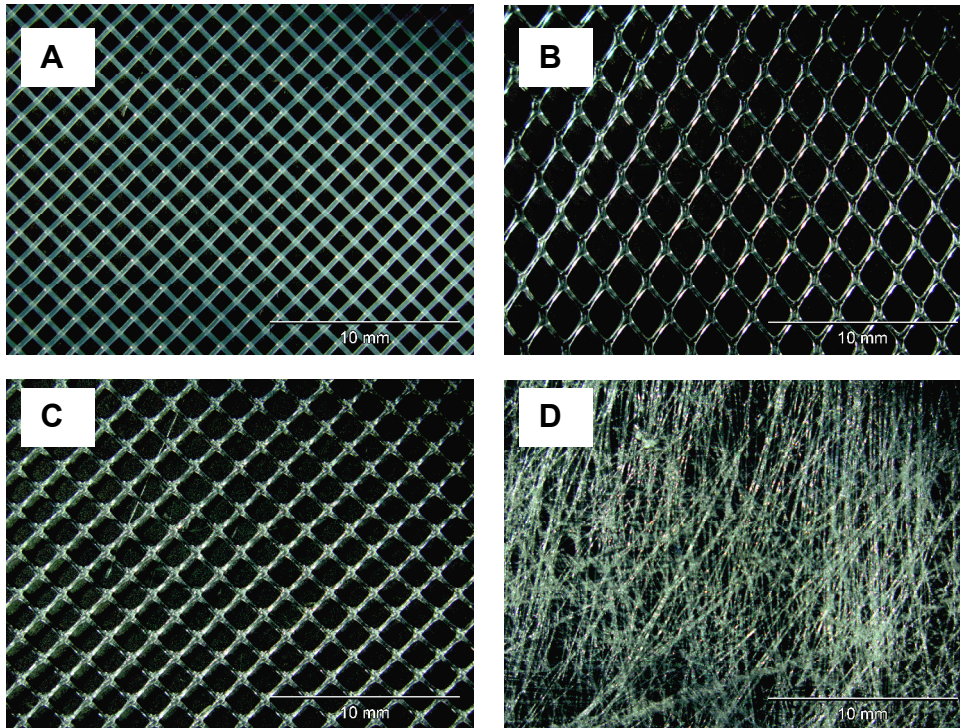


Abbildung 15: mikroskopische Aufnahmen der verwendeten Abstandshalter. A, Gewebe 0,56 mm; B, Mesh 0,5 mm; C, Mesh 0,24 mm; D, Vlies 0,25 mm.

Unter Verwendung der Abstandshalter A bis D wurden partikelgängige Membranadsorber-Module aufgebaut. Kern und Mantelrohr der Module waren jeweils identisch, woraus sich die Konsequenz ergab, dass je nach Höhe des Abstandshalters unterschiedliche Membranflächen verbaut wurden (Modulübersicht s. Anhang 1.7, Seite 109). Dieser Varianz zwischen den Modulen wurde im Versuch Rechnung getragen, indem eine konstante Proteinbeladung von 0,4 mg je cm² Membran gewählt wurde. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer (1M NaCl in Phosphatpuffer) bei 0,3 MV/min. Die Versuche wurden von Franziska Jonas im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt [90].

Der Zusammenhang zwischen der Höhe des Abstandshalters und der Adsorptionsgeschwindigkeit während der Modulbeladung ist in Abbildung 16 graphisch dargestellt. Je höher der Abstandshalter, desto langsamer erfolgte die Adsorption der Zielsubstanz aus dem Rezirkulationsbehälter. Der Einfluss der Struktur des Abstandshalters auf die Adsorptionsgeschwindigkeit im Rezirkulationsverfahren war dagegen deutlich schwächer ausgeprägt, was sich an einer vergleichbaren Adsorptionsgeschwindigkeit der Abstandshalter C und D (gleiche Höhe, unterschiedliche Struktur) zeigte. Der Abstandshalter D (Vlies) bewirkte insgesamt die schnellste Proteinadsorption.

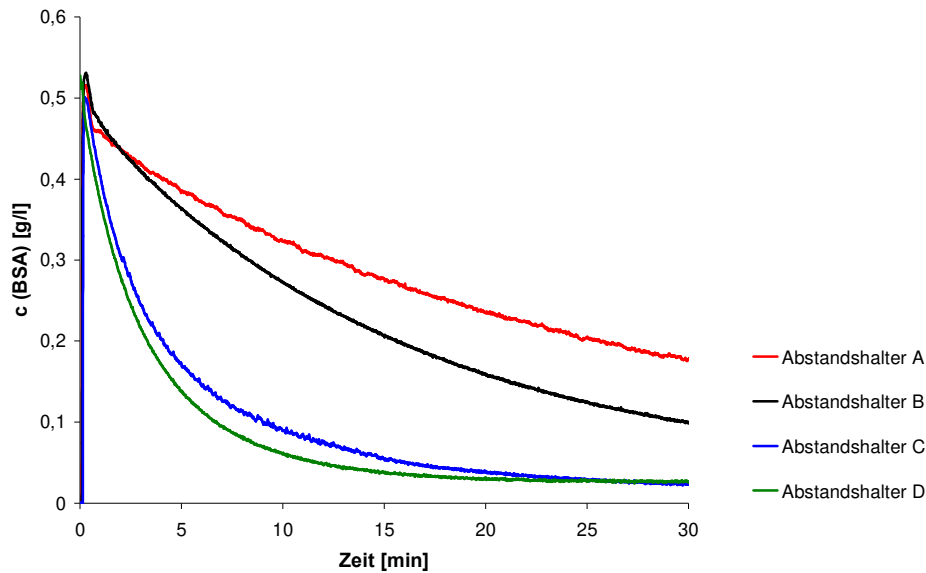


Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der BSA-Konzentration im Rezirkulationsbehälter unter Verwendung von unterschiedlichen Abstandshaltern. A, Gewebe 0,56 mm; B, Mesh 0,5 mm; C, Mesh 0,24 mm; D, Vlies 0,25 mm; c (BSA), BSA-Konzentration im Rezirkulationsbehälter. Versuchsbedingungen: Proteinbeladung 0,4 mg/cm²; Proteinkonzentration 0,5 mg/ml in Phosphatpuffer; Volumenstrom 12 MV/min; Modulnummern 0000033 (Abstandshalter A), 0000035 (Abstandshalter B), 0000055 (Abstandshalter C), 0000046 (Abstandshalter D).

Bei der Elution war der Einfluss der Abstandshalter-Struktur stärker ausgeprägt als bei der Proteinbeladung. Die ungeordnete, dichte Vlies-Struktur des Abstandshalter-Typs D wirkte sich positiv auf die Elution aus. Der Elutionspeak war vergleichsweise schmal und zeigte weniger Bandenverbreiterung als die Abstandshalter A bis C. Ein direkter Einfluss der Höhe des Abstandshalters auf das Ergebnis der Elution wurde nicht festgestellt (Abbildung 17).

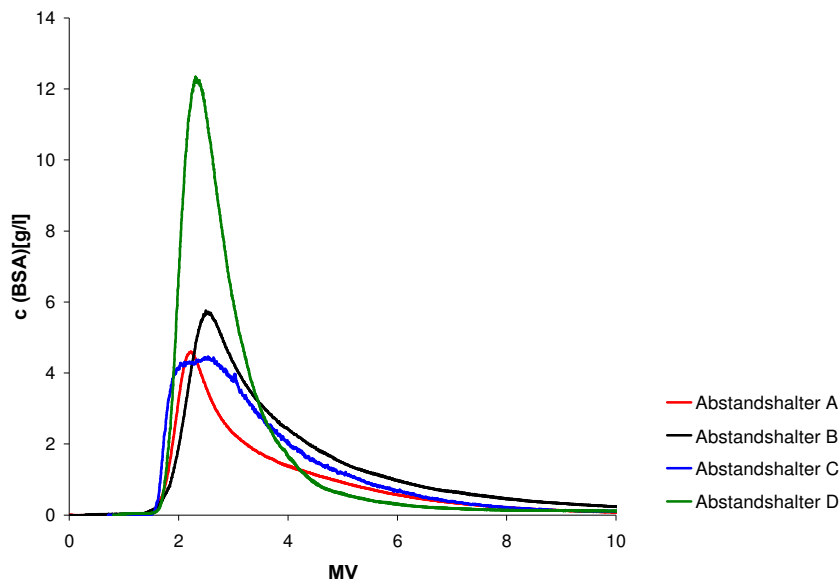


Abbildung 17: Verlauf der BSA-Konzentration während der Elution unter Verwendung von unterschiedlichen Abstandshaltern. A, Gewebe 0,56 mm; B, Mesh 0,5 mm; C, Mesh 0,24 mm; D, Vlies 0,25 mm; c (BSA), BSA-Konzentration am Modulausgang; MV, Membranvolumen. Versuchsbedingungen: Elutionspuffer 1M NaCl in Phosphatpuffer; Volumenstrom 0,3 MV/min; Modulnummern 0000033 (Abstandshalter A), 0000035 (Abstandshalter B), 0000055 (Abstandshalter C), 0000046 (Abstandshalter D).

Die charakteristischen Parameter, die zur Beurteilung der erhaltenen Elutionspeaks bestimmt wurden, sind in Tabelle 5 zusammengefasst (Berechnung des Asymmetriefaktors A_s und der Peak-Breite W_h s. Anhang 2.4.2, Seite 123). Eine geringe Peak-Breite W_h und ein geringer Asymmetriefaktor bei einer hohen maximalen Peak-Konzentration entsprechen hierbei der Zielsetzung einer effektiven Elution, die durch eine vollständige Desorption der Zielsubstanz in einem möglichst geringen Volumen besteht. Abstandshalter D zeigt die höchste Eignung der untersuchten Abstandshalter.

Tabelle 5: Charakteristische Parameter zur Beurteilung der Abstandshalter bei der Elution. c_{\max} : BSA-Konzentration an der peak-Spitze [mg/ml]; W_h , peak-Breite auf halber peak-Höhe [MV]; A_s , Asymmetriefaktor [-].

Abstandshalter	c_{\max} [mg/ml]	W_h [MV]	A_s
A	4,6	1,1	7,0
B	5,7	1,6	5,9
C	4,5	2,2	4,1
D	12,3	1,0	2,7

Ein weiteres Kriterium bei der Bewertung von Abstandshaltern ist deren Fließwiderstand. Ein erhöhter Fließwiderstand bewirkt eine Zunahme des Druckabfalls über das Modul. Die Messung des Differenzdruckes (Differenz aus Eingangs- und Ausgangsdruck) während der Modulbeladung ergab identische Werte für die Abstandshalter A und B, welche mit 60 mbar sehr gering waren (Abbildung 18). Auffällig ist der deutlich höhere Druckabfall im Modul mit Abstandshalter D. Der Druckabfall betrug hier 850 mbar.

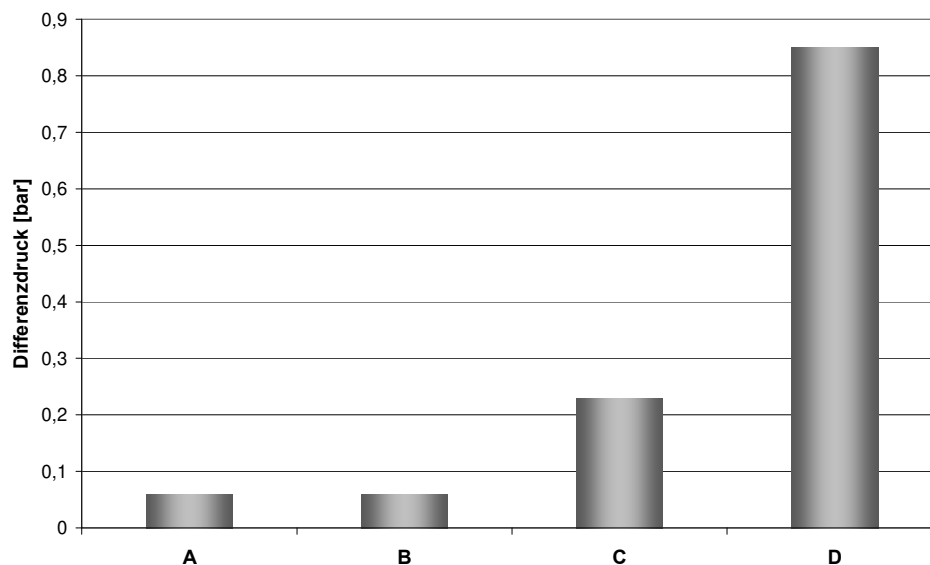


Abbildung 18: Differenzdruck während der Modulbeladung unter Verwendung von unterschiedlichen Abstandshaltern. A, Gewebe 0,56 mm; B, Mesh 0,5 mm; C, Mesh 0,24 mm; D, Vlies 0,25 mm; Versuchsbedingungen: Medium: BSA-Lösung (0,5 mg/ml in Phosphatpuffer); Volumenstrom 12 MV/min; Modulnummern 0000033 (Abstandshalter A), 0000035 (Abstandshalter B), 0000055 (Abstandshalter C), 0000046 (Abstandshalter D).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Vlies-Struktur des Abstandshalters D eine Verbesserung des Stofftransfers bewirkt, welche sich in einer höheren Abreicherungsgeschwindigkeit und einer effektiven Elution widerspiegelt. Auf der anderen Seite wird durch die Verwendung dieses Abstandshalters ein höherer Druckabfall über das Modul bzw. ein höherer Energieeintrag verursacht. Der Kompromiss zwischen Energieeintrag und der Tendenz von Abstandshaltern den Stofftransfer positiv zu beeinflussen ist aus dem Bereich der Crossflow-Filtration bekannt. Die Auswahl eines Abstandshalters beinhaltet hier einen Kompromiss zwischen dem Druckabfall und den damit verbundenen Energiekosten beim Betrieb eines Moduls und der Verbesserung des Stofftransfers zwischen Membran und Medium durch Einbringung von Turbulenzen [91, 92].

Zur Bewertung der Partikelgängigkeit der Abstandshalter wurden die Module über einen Zeitraum von 60 Minuten mit einer Hefesuspension (*Saccharomyces cerevisiae*) im Rezirkulationsverfahren beladen, während die optische Dichte bei 600 nm (OD) im Rezirkulationsbehälter online gemessen

wurde. Die Hefezellen wurden vor dem Versuch mit Phosphatpuffer gewaschen und die OD der Hefesuspension auf einen Wert von 30 eingestellt (Durchführung s. Anhang 2.4.3, Seite 124). Die Parameter Volumenstrom und Rezirkulationsvolumen entsprachen den Parametern der Modulbelastung mit Proteinlösung in Abbildung 16.

Eine Abnahme der Biomassekonzentration lag bei den vier untersuchten Abstandshaltern vor (Abbildung 19). Die Abnahme erfolgte bei den Modulen mit Abstandshalter A, B und D vorwiegend zu Beginn der Messung und blieb im weiteren Verlauf weitgehend konstant. Die Abnahme der Biomassekonzentration unter Verwendung von Abstandshalter C war im Vergleich dazu stärker ausgeprägt und zeigte eine signifikante Abnahme der OD über die gesamte Versuchsdauer.

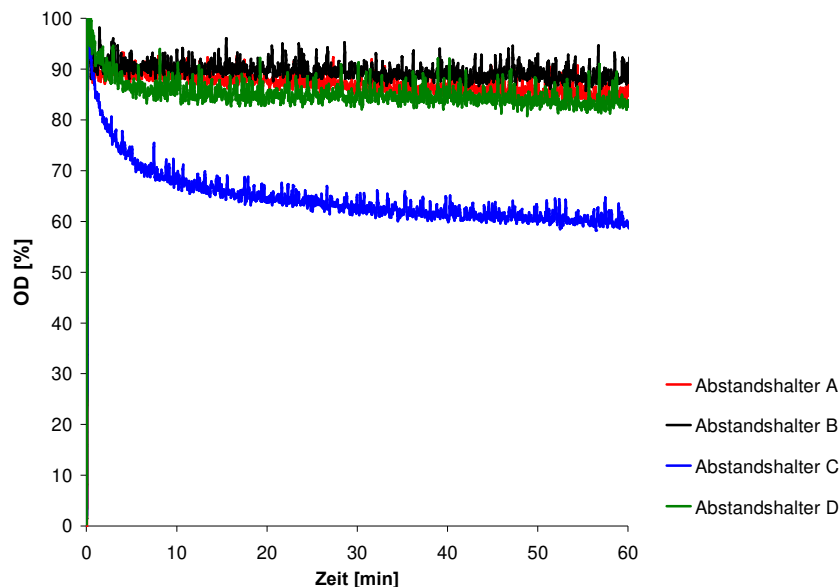


Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf der optischen Dichte im Rezirkulationsbehälter unter Verwendung von unterschiedlichen Abstandshaltern. A, Gewebe 0,56 mm; B, Mesh 0,5 mm; C, Mesh 0,24 mm; D, Vlies 0,25 mm; OD: Optische Dichte in Prozent der Startlösung. Versuchsbedingungen: OD der Startlösung 30; Volumen 0,8 ml/cm²; Volumenstrom 12 MV/min; Modulnummern 0000033 (Abstandshalter A), 0000035 (Abstandshalter B), 0000055 (Abstandshalter C), 0000046 (Abstandshalter D).

Der Einfluss der Biomasse auf die Proteinadsorption wurde untersucht, indem der Hefesuspension (OD 30) BSA in einer Konzentration von 0,5 mg/ml zudosiert wurde. Die erhaltenen Beladungskurven bei einem Volumenstrom von 12 MV/min wurden miteinander verglichen.

Dabei wurde deutlich, dass die Proteinadsorption bei Verwendung der Abstandshalter B und C durch Hefe in der Beladungslösung beeinträchtigt wurde. Die Adsorptionsgeschwindigkeit war hier geringer als im Falle der reinen Proteinlösung (Abbildung 20 unten). Die Module mit den Abstandshaltern A und D zeigten einen identischen Verlauf der Proteinkonzentration, unabhängig davon, ob die

Adsorption aus einer zellhaltigen oder zellfreien Lösung erfolgte. Die Beeinträchtigung der Adsorption bei Abstandshalter C steht im Einklang mit der Beobachtung eines ausgeprägten Biomasserückhaltes. Die Ergebnisse zeigen damit, dass die verwendeten Abstandshalter vom Typ Mesh hinsichtlich der Adsorption aus zellhaltigen Medien weniger geeignet sind, als gewebe bzw. vliesartige Abstandshalter.

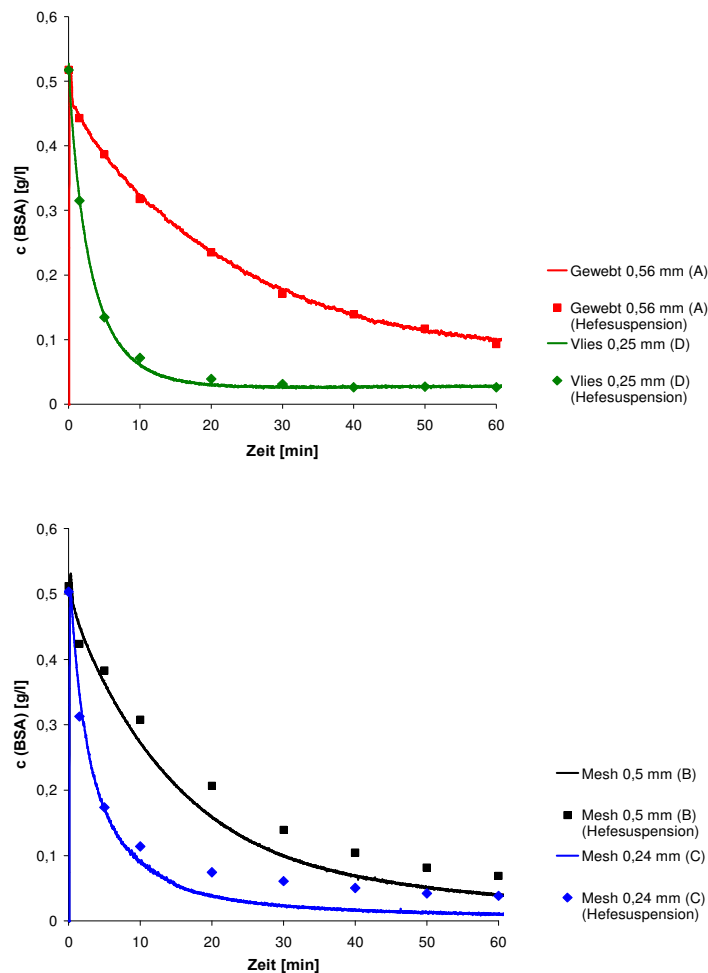


Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf der BSA-Konzentration im Rezirkulationsbehälter unter Verwendung von unterschiedlichen Abstandshaltern. A, Gewebe 0,56 mm; B, Mesh 0,5 mm; C, Mesh 0,24 mm; D, Vlies 0,25 mm; c (BSA), BSA-Konzentration im Rezirkulationsbehälter; durchgezogene Linien = BSA in Phosphatpuffer; Messpunkte = BSA in Hefesuspension
 Versuchsbedingungen: Proteinbeladung 0,4 mg/cm²; Proteinkonzentration 0,5 mg/ml; Volumenstrom 12 MV/min; Modulnummern 0000033 (Abstandshalter A), 0000035 (Abstandshalter B), 0000055 (Abstandshalter C), 0000046 (Abstandshalter D).

Tabelle 6 fasst die Erkenntnisse der Untersuchungen von Abstandshaltern zusammen. Neben den Leistungsparametern des Moduls wurde auch die Verarbeitbarkeit während des Herstellungsprozesses der Module bewertet. Die Abstandshalter wurden ihrer Eignung nach geordnet, wobei der höchste Zahlenwert die höchste Eignung anzeigt. Neben seiner Eignung zur Förderung des Stofftransfers ließ sich Abstandshalter D besonders gut verarbeiten. Abstandshalter A bereitete, bedingt durch die Steifigkeit des Materials, Schwierigkeiten im Wickelprozess, während sich Abstandshalter C unter Zugspannung verformte, was dessen Verarbeitung erschwerte (Modulherstellung, s. Anhang 2.2, Seite 114).

Tabelle 6: Gesamtbewertung der untersuchten Abstandshalter. 1: schlechteste Bewertung, 4: beste Bewertung.

Abstandshalter	Adsorption	Elution	Druckabfall	Partikelgängigkeit	Verarbeitbarkeit
A (Gewebe, 0,56 mm)	1	3	4	4	1
B (Mesh, 0,50 mm)	2	2	4	2	3
C (Mesh, 0,24 mm)	3	1	2	1	2
D (Vlies, 0,25 mm)	4	4	1	3	4

Abstandshalter	Gesamtbewertung
A (Gewebe, 0,56 mm)	13
B (Mesh, 0,50 mm)	13
C (Mesh, 0,24 mm)	9
D (Vlies, 0,25 mm)	16

Abstandshalter D zeigt insgesamt die größte Eignung zum Aufbau partikelgängiger Membranadsorber-Module. Dieser Abstandshalter fördert den Stofftransfer, was sich in einer hohen Adsorptionsgeschwindigkeit und einer effektiven Elution äußert. Die gute Partikelgängigkeit dieses Abstandshalters wurde nicht erwartet, da dieses Material im Vergleich zu den Abstandshaltern A bis C eine sehr hohe Fadendichte aufweist. Die bessere Partikelgängigkeit beruht vermutlich auf der Unregelmäßigkeit dieser Fäden. Im Gegensatz zu dieser unregelmäßigen Struktur stellen die Stege der Abstandshalter vom Typ Mesh (B und C) in Kombination mit einer Membran potentielle Hindernisse für Partikel beim Durchströmen des Moduls dar.

3.1.3 Verteilerplatten

Der Verteiler eines Moduls zur adsorptiven Proteinaufreinigung hat die Aufgabe, ein flaches Geschwindigkeitsprofil über die gesamte Anströmfläche des Adsorbens auszubilden, wodurch eine gleichmäßige Durchströmung erreicht werden soll. Typische Verteiler aus dem Bereich der Säulenchromatographie beinhalten eine Kombination aus porösen Platten bzw. Lochplatten und einem Hohlraum. Die Platte dient hierbei der Erzeugung eines Druckabfalls, welcher zusammen mit dem Hohlraum vor der Platte eine radiale Verteilung gewährleistet. Für Verteilerplatten in Modulen zur Aufreinigung aus partikelhaltigen Medien kommt eine gute Partikeldurchlässigkeit als weitere Anforderung hinzu (siehe auch: Kapitel 2.3.4).

Es wurden zwei Verteilerplatten hinsichtlich ihres Einflusses auf die Modulbeladung, das Elutionsprofil und den Druckabfall getestet. Darüber hinaus wurde der Biomasse-Rückhalt der Systeme untersucht. Als Referenz dienten entsprechende Messungen ohne Verteilerplatte. Die Versuche wurden unter Einsatz einer Vorrichtung durchgeführt, die den Zusammenbau und Wechsel einzelner Modulkomponenten erlaubte (Abbildung 21). Dadurch konnten die gleichen Wickel mit verschiedenen Verteilerplatten kombiniert werden. Die im Rahmen der Untersuchungen verwendeten Wickel wurden mit Abstandshalter D (Vlies) aufgebaut.

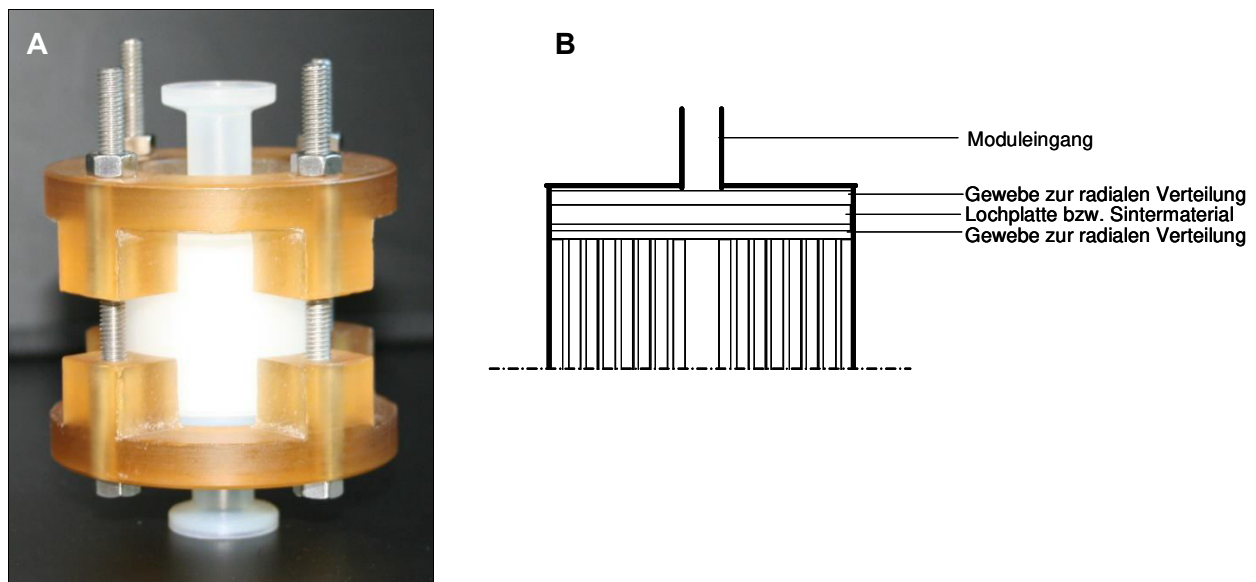


Abbildung 21: (A) Vorrichtung zum Test von Modulkomponenten; (B) Schema des Aufbaus. Unterhalb und oberhalb der Verteilerplatte befand sich je ein Gewebe ($h = 1 \text{ mm}$) zur radialen Verteilung.

Die eingesetzten Verteilerplatten sind in Abbildung 22 dargestellt. Die Porengröße der Sinterplatte aus hydrophilisiertem Polyethylen wird vom Hersteller (Fa. Porex) mit einem Wert von 80 bis 130 μm angegeben wurde (Abbildung 22, A). Die Höhe der Platte beträgt 1,5 mm. Die Lochplatte aus Edelstahl mit PTFE-Beschichtung verfügt über 0,5 mm Bohrungen bei einer Höhe von 0,1 mm (Abbildung 22, B). Durch Einbau zweier Lagen Gewebe ($h = 1 \text{ mm}$) gemäß Abbildung 21, B wurde ein Hohlraum für die radiale Verteilung realisiert. Die Abströmseite des Wickels wurde jeweils identisch zur Anströmseite aufgebaut.

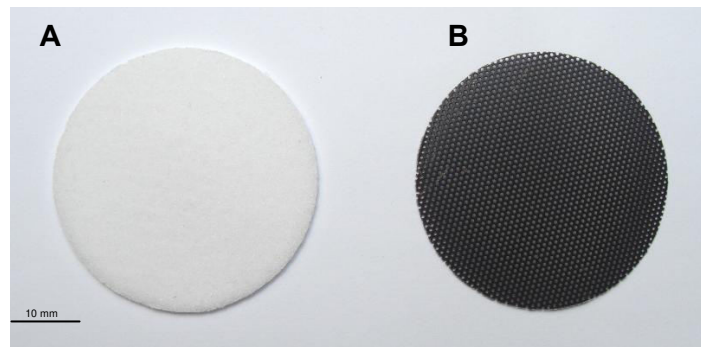


Abbildung 22: (A) Sinterplatte (Porengröße: 80-130 μm ; $h = 1,5 \text{ mm}$); (B) Edelstahllochplatte mit PTFE-Beschichtung (Lochdurchmesser: 0,5 mm, $h = 0,1 \text{ mm}$).

Die Aufnahme der Proteinkonzentration bei der Modulbeladung (Abbildung 23) und während der Elution (Abbildung 24) unter Verwendung verschiedener Verteilerplatten zeigten identische Verläufe. Die getesteten Verteilerplatten trugen nicht dazu bei, die Modul-Leistung zu verbessern.

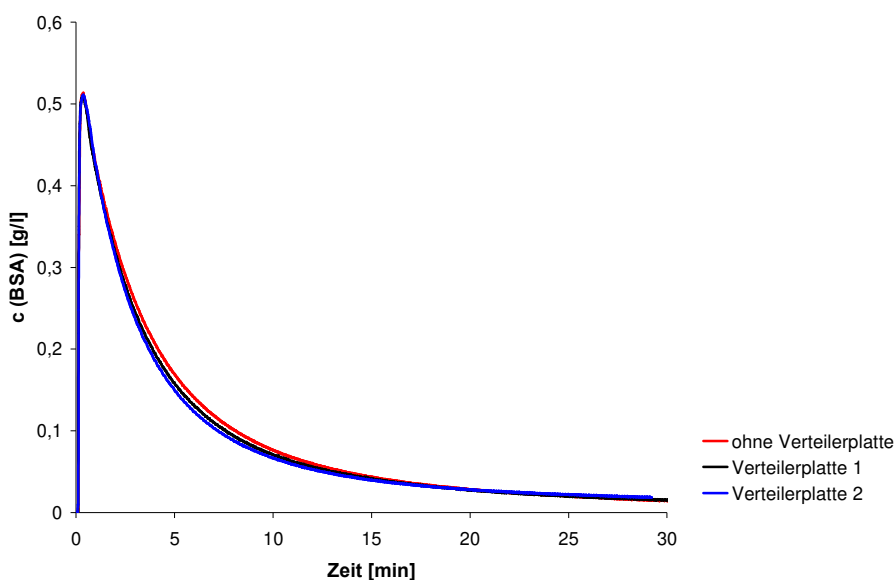


Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der BSA-Konzentration im Rezykulationsbehälter unter Verwendung von Verteilerplatten. Verteilerplatte 1, Edelstahllochplatte mit 0,5 mm Bohrungen; Verteilerplatte 2, Polyethylen-Sinterplatte mit Porengröße 80-130 μm ; c (BSA), BSA-Konzentration im Rezykulationsbehälter. Versuchsbedingungen: Proteinbeladung 0,4 mg/cm^2 ; Proteinkonzentration 0,5 mg/ml in Phosphatpuffer; Volumenstrom 12 ml/min ; Wickelnummer W016.

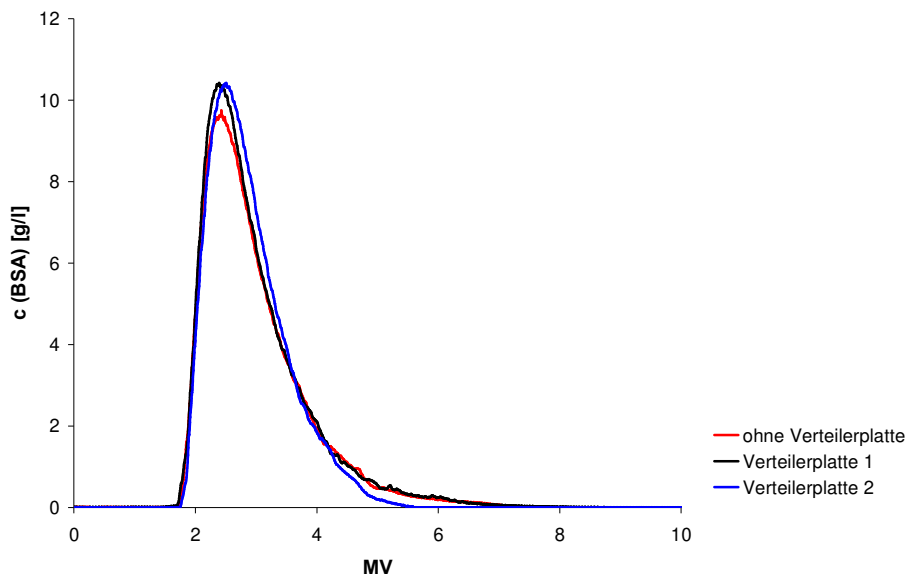


Abbildung 24: Verlauf der BSA-Konzentration während der Elution unter Verwendung von Verteilerplatten. Verteilerplatte 1, Edelstahllochplatte mit 0,5 mm Bohrungen; Verteilerplatte 2, Polyethylen-Sinterplatte mit Porengröße 80-130 μm ; c (BSA), BSA-Konzentration am Modulausgang; MV, Membranvolumen. Versuchsbedingungen: Elutionspuffer 1M NaCl in Phosphatpuffer; Volumenstrom 0,3 MV/min; Wickelnummer W016.

Bedingt durch den zusätzlichen Fließwiderstand der untersuchten Verteilerplatten nahm der Druckabfall über die Module zu, wobei die Sinterplatte (Abbildung 22, A) den höheren Druckabfall generierte (Abbildung 25).

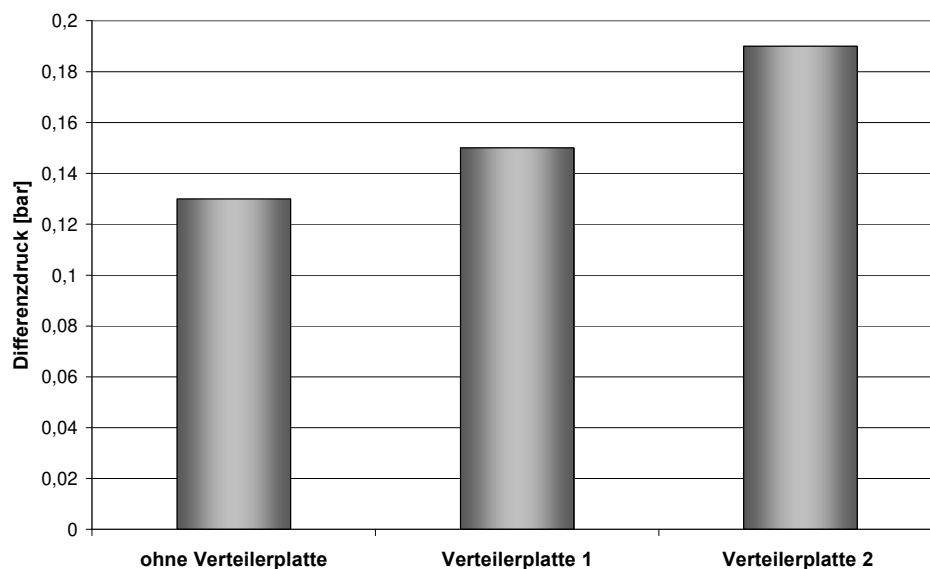


Abbildung 25: Differenzdruck während der Modulbeladung unter Verwendung von Verteilerplatten. Verteilerplatte 1, Edelstahllochplatte mit 0,5 mm Bohrungen; Verteilerplatte 2, Polyethylen-Sinterplatte mit Porengröße 80-130 μm ; Versuchsbedingungen: Medium: BSA-Lösung (0,5 mg/ml in Phosphatpuffer); Volumenstrom 12 MV/min; Wickelnummer W016.

Hinsichtlich des Biomasserückhaltes verhielten sich beide Systeme neutral, d.h. durch die Platten erfolgte kein zusätzlicher Zellrückhalt (Abbildung 26).

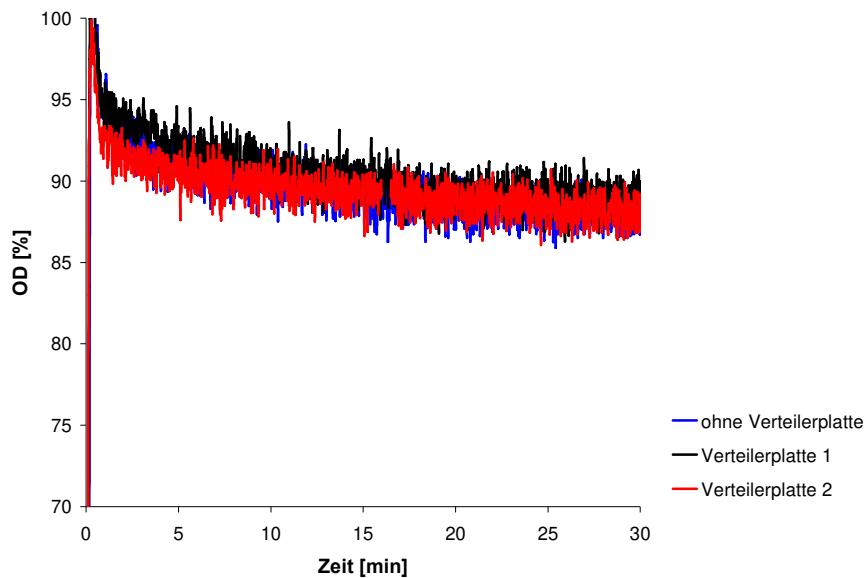


Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der OD im Rezirkulationsbehälter unter Verwendung von Verteilerplatten. Verteilerplatte 1, Edelstahllochplatte mit 0,5 mm Bohrungen; Verteilerplatte 2, Polyethylen-Sinterplatte mit Porengröße 80-130 μm ; OD: Optische Dichte in Prozent der Startlösung bei 600 nm. Versuchsbedingungen: Volumenstrom 12 MV/min; Wickelnummer W016.

Aus den erhaltenen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass der Einsatz von Verteilerplatten bei der untersuchten Geometrie keine Verbesserung der Modul-Leistung bewirkt. Einschränkend wird darauf hingewiesen, dass das Verhältnis zwischen dem Durchmesser des Moduleingangs (9 mm) und dem Wickeldurchmesser (40 mm) lediglich 1:4,4 betrug. In der Literatur werden für Chromatographie-Säulen Werte von 1:50 beschrieben [85]. Es ist anzunehmen, dass mit zunehmendem Verhältnis von Eingangsdurchmesser zum Wickeldurchmesser, beispielsweise beim Aufbau von großformatigen Modulen, der Aspekt der radialen Verteilung an Bedeutung gewinnt. In diesem Fall sollte der Einsatz des partikelgängigen, Druckabfall generierenden Sintermaterials erneut bewertet werden.

3.1.4 Modulgeometrie

Die Bewertung des Einflusses der Modulgeometrie auf die Modul-Leistung beinhaltet die Geometrie des Moduleingangs und des Modulausgangs und das Verhältnis aus Wickeldurchmesser und Wickellänge. Pelz et al. [85] haben am Beispiel von Chromatographiesäulen gezeigt, dass insbesondere eine exponentielle Gestaltung des Modulausgangs zu einer gleichmäßigeren Durchströmung und Reduzierung von Totzonen führt (siehe auch Abbildung 11 auf Seite 25). Die Eignung einer exponentiell verlaufenden Eingangs- und Ausgangsgeometrie bei der Gestaltung der Gehäusegeometrie von partikelgängigen Membranadsorber-Modulen wurde überprüft.

Im Vorfeld zu den Experimenten wurde eine Strömungssimulation durchgeführt, bei der die Strömungsführung der Standardgeometrie des Modulausgangs mit der Strömungsführung einer exponentiell verlaufenden Geometrie verglichen wurde. Hierbei wurde gezeigt, dass unter Einsatz einer exponentiell verlaufenden Ausgangsgeometrie eine bessere Strömungsführung und ein gleichmäßigeres Geschwindigkeitsprofil erreicht werden kann (Abbildung 27).

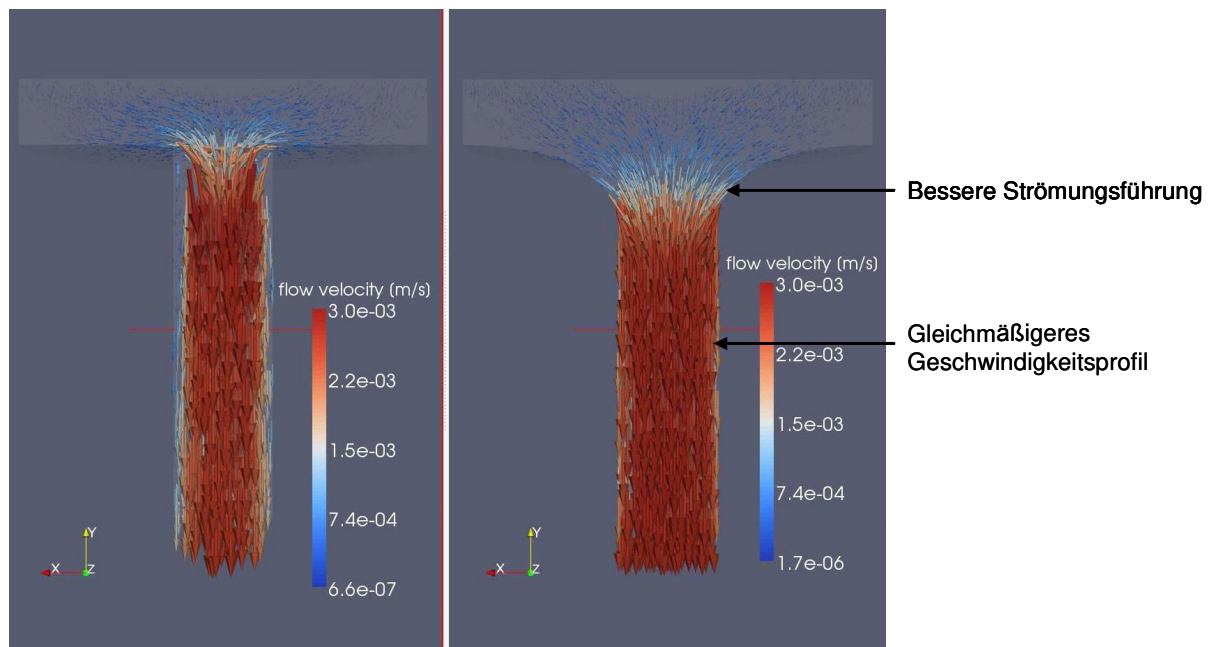


Abbildung 27: CFD-Simulation der Strömungsführung in partikelgängigen Membranadsorber-Modulen unter Verwendung unterschiedlicher Ausgangsgeometrien. Randbedingungen: Modul: 25 ml Membranvolumen; Flussrate: 1 MV/min; wässriges Medium; links: Strömungsführung bei Standardgeometrie des Modulausgangs; rechts: Strömungsführung bei exponentieller Geometrie des Modulausgangs. Die CFD-Berechnung wurde unter Verwendung des Code_Saturne (EDF, France) durchgeführt¹.

¹ Die Berechnung wurde von S. Barbe durchgeführt.

Auf Basis der Ergebnisse der Simulation wurde ein Bauteil mit exponentieller Ausführung (Abbildung 28, rechts) angefertigt und im Versuch mit dem Standard-Bauteil (Abbildung 28, links) verglichen.

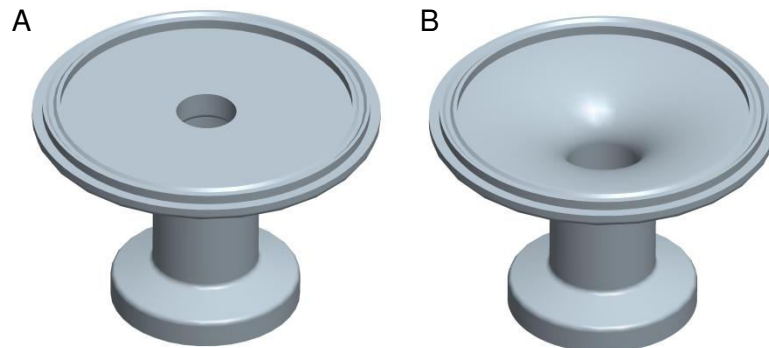


Abbildung 28: Verschiedene Ausführungen des Bauteils Kappe. (A) gerade Ausführung (Standard); (B) exponentielle Ausführung.

Beide Ausführungen wurden mit Hilfe der in Abbildung 21 gezeigten Vorrichtung untersucht, indem auf der Ein- und Ausgangsseite entweder das Standard-Bauteil oder das exponentiell verlaufende Bauteil verwendet wurde. Auf den Einsatz von Verteilerplatten wurde verzichtet. Mit dem Ziel, die Auswirkung einer verbesserten Strömungsführung erfassen zu können, wurden Durchbruchkurven mit Aceton aufgenommen. Aus der Form der Durchbruchkurve der nicht-bindenden Substanz Aceton können Rückschlüsse auf die Strömungsführung innerhalb des Moduls gezogen werden. Im Bereich der Chromatographie werden möglichst steile Durchbruchkurven angestrebt, da diese eine enge Verweilzeitverteilung und damit eine geringe Dispersion anzeigen [93].

Die erhaltenen Durchbruchkurven wiesen identische Verläufe auf (Abbildung 29). Der Durchbruch unter Verwendung der exponentiellen Ausführung erfolgte lediglich verzögert, was am größeren Totvolumen dieses Bauteils lag. In der Simulation wurde nur der Einfluss der Modulgeometrie berücksichtigt, während der Einfluss des Wickels vernachlässigt wurde. Es ist anzunehmen, dass ein Großteil der im Experiment gemessenen Dispersion und damit die Form der Durchbruchkurve auf den Einfluss des Wickels zurückzuführen ist, während der Einfluss der Gehäusegeometrie im Vergleich dazu von untergeordneter Bedeutung ist und daher keinen Einfluss auf das Ergebnis des Experiments hatte.

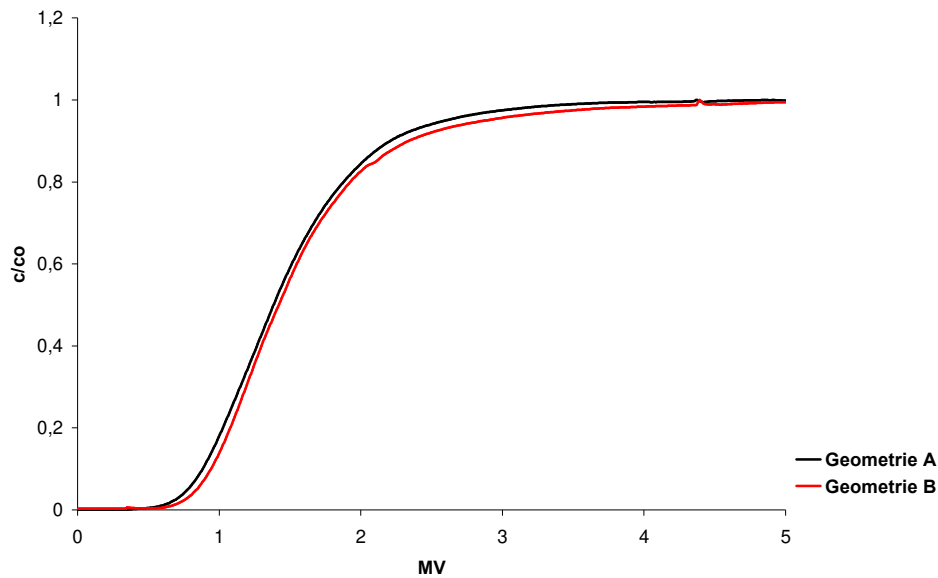


Abbildung 29: Verlauf der Aceton-Konzentration am Modulausgang unter Verwendung von unterschiedlichen Geometrien am Modulein- und Ausgang. Geometrie A, gerade Ausführung (Standard); Geometrie B, exponentielle Ausführung; c : Acetonkonzentration am Modulausgang; c_0 : Acetonkonzentration am Moduleingang. Versuchsbedingungen: Acetonkonzentration 1% in Phosphatpuffer; Volumenstrom 1 MV/min; Wickelnummer W003.

Beladungs- und Elutionsversuche mit proteinhaltigen Lösungen zeigten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen der exponentiellen und der geraden Ausführungsform (Daten nicht gezeigt).

Der Einfluss des Verhältnisses aus Wickeldurchmesser und Wickellänge wurde untersucht, indem Wickel unterschiedlicher Länge (40, 80 und 120 mm) bei gleichem Wickeldurchmesser (40 mm) hergestellt und hinsichtlich ihres Einflusses auf den Druckabfall, die Adsorptionsgeschwindigkeit während der Modulbeladung und das Elutionsprofil charakterisiert wurden.



Abbildung 30: partikelgängige Membranadsorber-Wickel unterschiedlicher Länge: 120 mm, 80 mm, 40 mm; Wickeldurchmesser, 40 mm.

Die Versuche wurden unter Benutzung der in Abbildung 21 gezeigten Vorrichtung durchgeführt. Die unterschiedlichen Membranflächen in den untersuchten Modulen wurden berücksichtigt, indem eine konstante Beladungsmenge von 0,4 mg BSA je cm² Membran bei konstanter Protein-Startkonzentration im Rezirkulationsbehälter realisiert wurde.

Hinsichtlich der Leistung bei Beladung und Elution zeigte die Modullänge keinen signifikanten Einfluss. Sowohl der zeitliche Verlauf der Proteinkonzentration während der Modulbeladung als auch die Elutionsprofile zeigten vergleichbare Resultate (Abbildung 31 und Abbildung 32).

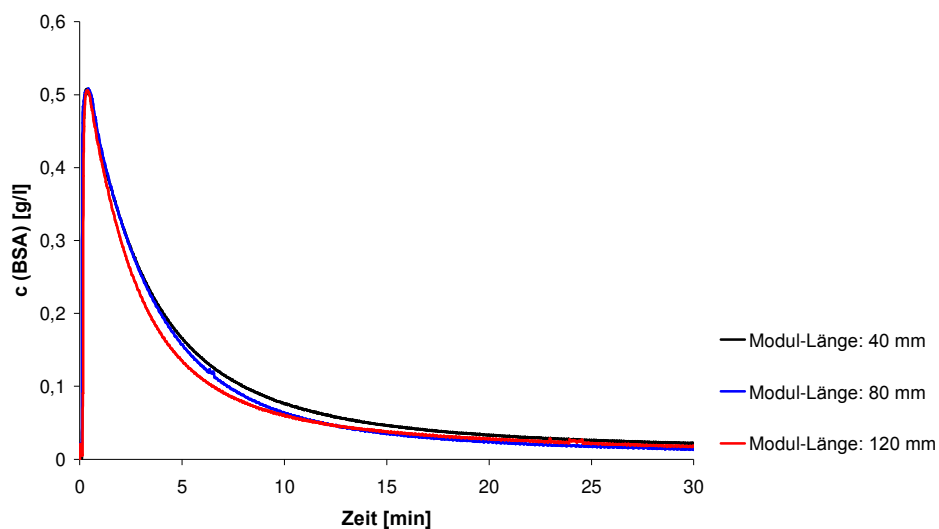


Abbildung 31: Zeitlicher Verlauf der BSA-Konzentration im Rezirkulationsbehälter unter Verwendung von Wickeln unterschiedlicher Länge. c (BSA), BSA-Konzentration im Rezirkulationsbehälter. Versuchsbedingungen: Proteinbeladung 0,4 mg/cm²; Proteinkonzentration 0,5 mg/ml in Phosphatpuffer; Volumenstrom 12 MV/min; Wickelnummer W024 (40 mm), Wickelnummer W022 (80 mm), W026 (120 mm).

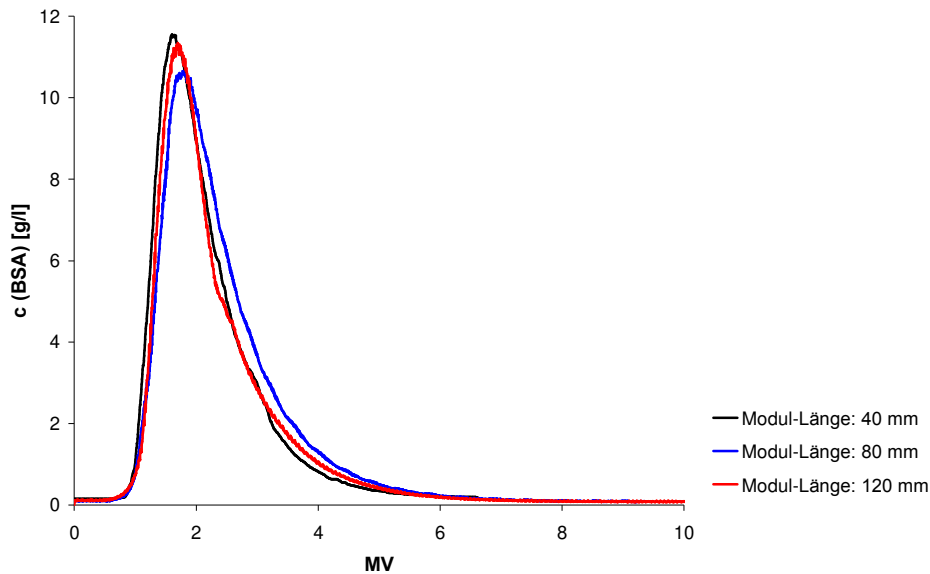


Abbildung 32: Verlauf der BSA-Konzentration während der Elution unter Verwendung von Wickeln unterschiedlicher Länge. c (BSA), BSA-Konzentration am Modulausgang; MV, Membranvolumen. Versuchsbedingungen: Elutionspuffer 1M NaCl in Phosphatpuffer; Volumenstrom 0,3 MV/min; Wickelnummer W024 (40 mm), Wickelnummer W022 (80 mm), Wickelnummer W026 (120 mm).

Die Druck-Fluss Beziehung zeigte hingegen einen deutlichen Einfluss der Modul-Länge auf den Druckabfall. Anzumerken ist, dass die Flussrate in Abhängigkeit vom Membranvolumen gewählt wurde (Einheit des Volumenstroms war Membranvolumen pro Zeit). Eine Verdopplung der Wickel-Länge führt bei einem konstanten Wickeldurchmesser zu einer Verdopplung der Überströmungsgeschwindigkeit. Die Zunahme des Differenzdruckes ist daher eine Folge der Erhöhung der Überströmungsgeschwindigkeit und der Modul-Länge (Abbildung 33).

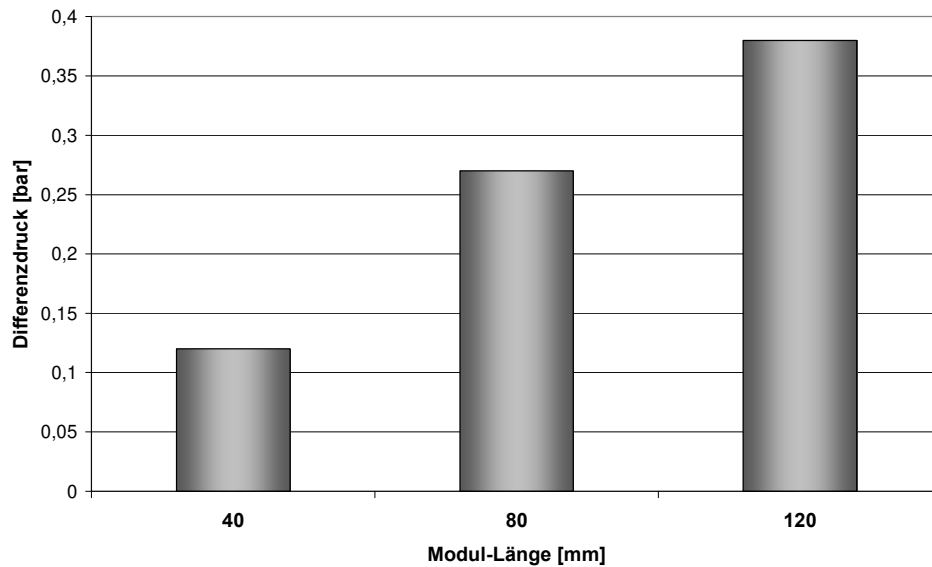


Abbildung 33: Differenzdruck während der Modulbeladung unter Verwendung von Wickeln unterschiedlicher Länge. Versuchsbedingungen: Medium: BSA-Lösung (0,5 mg/ml in Phosphatpuffer); Volumenstrom 12 MV/min; Wickelnummer W024 (40 mm), Wickelnummer W022 (80 mm), Wickelnummer W026 (120 mm).

Fazit Modulentwicklung

In Kapitel 3.1 wurde der Einfluss einzelner Komponenten auf die Modul-Leistung untersucht. Hierbei wurde erkannt, dass die statische Bindungskapazität, welche bei den verwendeten Membranen über den Pfropfgrad gesteuert werden kann, einen direkten Einfluss auf die Adsorptionseffizienz des partikelgängigen Membranadsorber-Moduls hat. Eine Erhöhung des Pfropfgrades bewirkte eine höhere statische Bindungskapazität der Membran und eine höhere Bindungseffizienz der partikelgängigen Membranadsorber-Module. Die Nachteile eines erhöhten Pfropfgrades, die sich im Falle herkömmlicher, durchströmter Membranadsorber in einer Reduktion der Modulpermeabilität äußern, sind aufgrund der Strömungsführung im Modul deutlich geringer. Die Strömungsführung sieht eine Überströmung der Membran vor, wodurch eine Entkopplung der Modulpermeabilität von der Membranpermeabilität erreicht wird. Dadurch wird der Einsatz stark gepfropfter, hochkapazitiver Membranen ohne Einbußen in der Modulpermeabilität ermöglicht.

Die Untersuchung verschiedener Abstandshalter ergab, dass insbesondere flache Abstandshalter eine effektive Adsorption der Zielsubstanz ermöglichen, während für eine konzentrierte Elution zusätzlich die Struktur des Abstandshalters von Bedeutung ist. Es wurde festgestellt, dass ein vliesartiger Abstandhalter neben den Vorteilen einer schnellen Adsorption und effektiven Elution eine gute Partikelgängigkeit zeigte. Lediglich in Bezug auf den erhöhten Energieeintrag, welcher sich in einem vergleichsweise hohen Druckabfall über das Modul äußerte, schnitt dieser Abstandhalter schlechter ab, als extrudierte Materialien (Mesh) oder Gewebe.

Hinsichtlich der Modulgeometrie konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis von Anströmfläche zur Modul-Länge sich weder auf die Adsorptionsgeschwindigkeit noch auf die Elution auswirkte, jedoch einen erhöhten Druckabfall über das Modul verursachte. Eine exponentielle Gestaltung der Modulein- und Ausgänge, sowie die Einführung von Verteilerplatten trugen zu keiner signifikanten Verbesserung der Modul-Leistung bei.

3.2 Einsatzweise

3.2.1 Modulbeladung

Die Modulbeladung kann durch einfache Passage des Mediums durch das Adsorbens im Durchlaufverfahren oder durch Rezirkulation aus einem gerührten Behälter im Rezirkulationsverfahren erfolgen. Beide Verfahren wurden in Kapitel 2.3.4 beschrieben.

Modulbeladung im Durchlaufverfahren

Das Durchlaufverfahren setzt voraus, dass die Zielsubstanz auf ihrer Passage durch das Modul vollständig gebunden wird. Der Anteil ungebundener Zielsubstanz am Modul-Ausgang stellt unerwünschte Verluste dar, was sich in einer schlechten Produktausbeute manifestiert. Die Eignung des Durchlaufverfahrens für den Betrieb von partikelgängigen Membranadsorber-Modulen wurde mit Protein-Lösung (BSA) unter bindenden Bedingungen und Anwendung verschiedener Volumenströme untersucht.

In Abbildung 34 wurde die Konzentration am Modul-Ausgang über der Anzahl der durchlaufenen Membranzolumina (MV) aufgetragen. Ein Teil der Zielsubstanz lief ungebunden durch das Modul. Der Anstieg der Proteinkonzentration am Modul-Ausgang erfolgte hierbei unmittelbar nach Durchlaufen des Modul-Totvolumens und gliederte sich in einen Bereich eines steilen Anstiegs gefolgt von einem Bereich mit geringer, kontinuierlicher Zunahme der Proteinkonzentration. Der Anteil des durchlaufenden Proteins hing hierbei vom angewendeten Volumenstrom ab. Je höher der Volumenstrom, desto höher war die Proteinkonzentration am Modul-Ausgang, d.h. desto unvollständiger verlief die Bindung. Interessanterweise setzte sich dieser Trend nur bis zum untersuchten Volumenstrom von 10 MV/min fort und blieb bei weiterer Steigerung auf 24 MV/min weitgehend konstant. Der Anteil, der vom Modul adsorbiert wurde, betrug unter diesen Bedingungen ca. 50% nach Durchlaufen des Totvolumens und nahm mit fortschreitender Beladung des Moduls kontinuierlich ab.

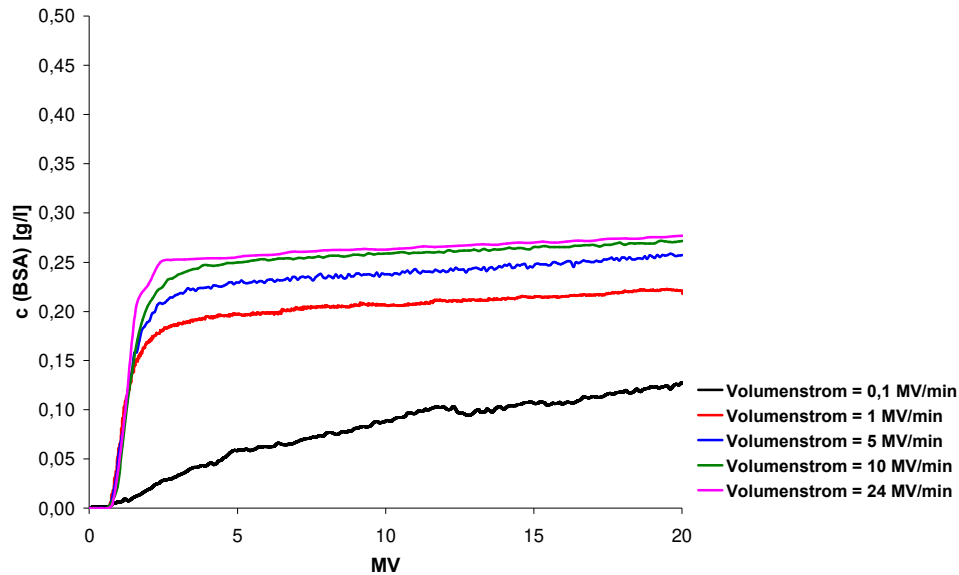


Abbildung 34: Verlauf der BSA-Konzentration während der Modulbeladung im Durchlaufverfahren unter Verwendung von unterschiedlichen Volumenströmen. c (BSA), BSA-Konzentration am Modulausgang; MV, Membranvolumen. Versuchsbedingungen: Proteinkonzentration 0,5 mg/ml in Phosphatpuffer, Modulnummer 7004783#15

Die Ergebnisse zeigen, dass die Adsorption der Zielsubstanz unvollständig verläuft. Da die Adsorption unter bindenden Bedingungen durchgeführt wurde und der Durchbruch der Zielsubstanz bereits zu einem Zeitpunkt erfolgte, an dem die Bindungskapazität des Moduls nicht annähernd ausgeschöpft wurde, ist anzunehmen, dass die Ursache der unvollständigen Adsorption auf den Modulaufbau zurückzuführen ist. Abbildung 35 ist eine schematische Darstellung der Strömungsführung im Modul. Der Modulaufbau sieht eine Überströmung der Membran vor, weshalb der Stofftransport zu den funktionellen Gruppen der Membran neben dem Transport durch die Strömungskanäle (Kanaltransport) einen Transport in das Innere der porösen Membran (Membrantransport) erfordert. Während der Kanaltransport durch Anlegen eines Differenzdruckes über das Modul direkt regelbar ist, fehlt die Möglichkeit einer direkten, kontrollierbaren Einflussnahme auf den Membrantransport. Mit Blick auf Abbildung 35 lässt sich eine Erklärung des beobachteten direkten Durchbruchs nach Durchlaufen des Modultotvolumens herleiten.

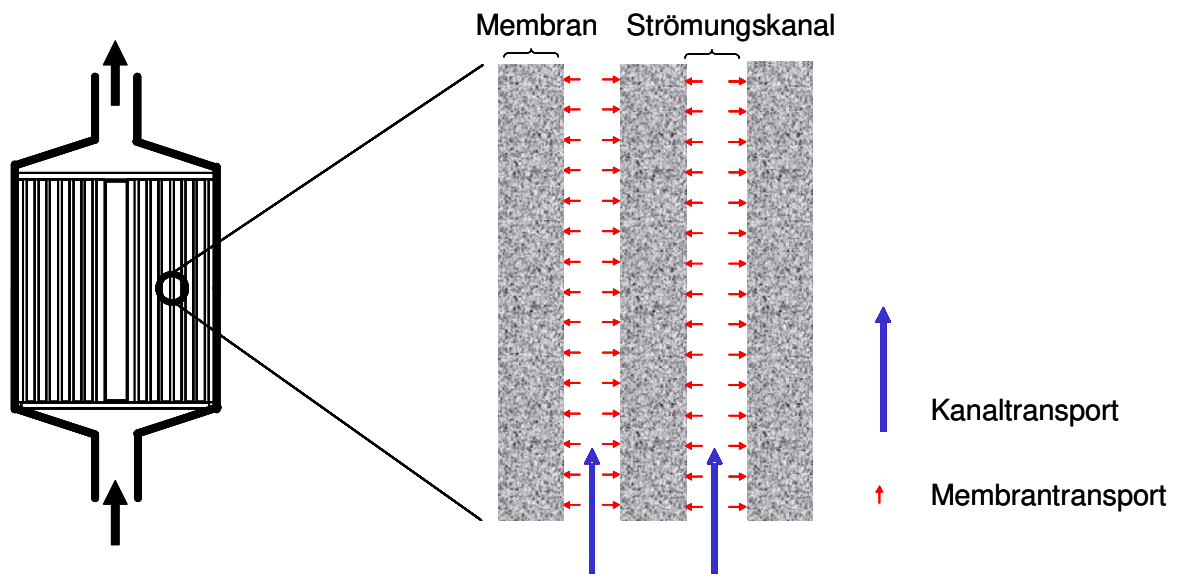


Abbildung 35: Strömungsführung in partikelgängigen Membranadsorber-Modulen (schematische Darstellung)

Die Strömungskanäle, deren Höhe im gezeigten Beispiel (Verwendung von Abstandhalter C) in etwa der Dicke der Membran (250 μm) entspricht, bieten der Zielsubstanz die Möglichkeit, durch das Modul zu strömen, ohne in Interaktion mit den funktionellen Gruppen der Membran zu treten (reiner Kanaltransport). Es ist davon auszugehen, dass der Stofftransport in das Innere der porösen Membran nicht ausreicht, um eine vollständige Adsorption zu gewährleisten, weshalb ein Teil der Zielsubstanz am Modul-Ausgang detektiert wird. Es ist wahrscheinlich, dass zunächst die äußeren Bereiche der adsorptiven Membran, die dem Strömungskanal zugewandt sind, beladen werden, während die Bereiche im Inneren der Membran zeitverzögert erreicht werden. Mit fortschreitender Beladung stehen weniger freie Bindungsplätze zur Verfügung, was den beobachteten, kontinuierlichen Anstieg der Proteinkonzentration am Modul-Ausgang erklärt.

Modulbeladung im Rezirkulationsverfahren

Beim Rezirkulationsverfahren wird das Medium in einem Kreislauf durch das Modul gefördert (Kapitel 2.3.4, Abbildung 9). Das Medium im Rezirkulationsbehälter wird ständig gerührt, um der Ausbildung von Konzentrationsgradienten entgegenzuwirken. Der Anteil des Produktes, welcher bei einer Passage durch das Modul nicht adsorbiert wird, stellt keinen Verlust dar, sondern gelangt zurück in den Rezirkulationsbehälter und kann auf einer der folgenden Passagen durch das Modul adsorbiert werden.

Die Eignung des Rezirkulationsverfahrens für die Modulbeladung wurde unter Anwendung verschiedener Volumenströme untersucht. Die Proteinkonzentration im Rezirkulationsbehälter

wurde durch Aufnahme des UV-Signals bei 280 nm am Moduleingang kontinuierlich gemessen. Sie nimmt beim Rezirkulationsverfahren kontinuierlich ab, bis sich ein Gleichgewichtszustand zwischen Adsorbens und Medium eingestellt hat. Die Adsorption des Zielmoleküls konnte durch Steigerung des Volumenstroms beschleunigt werden (Abbildung 36).

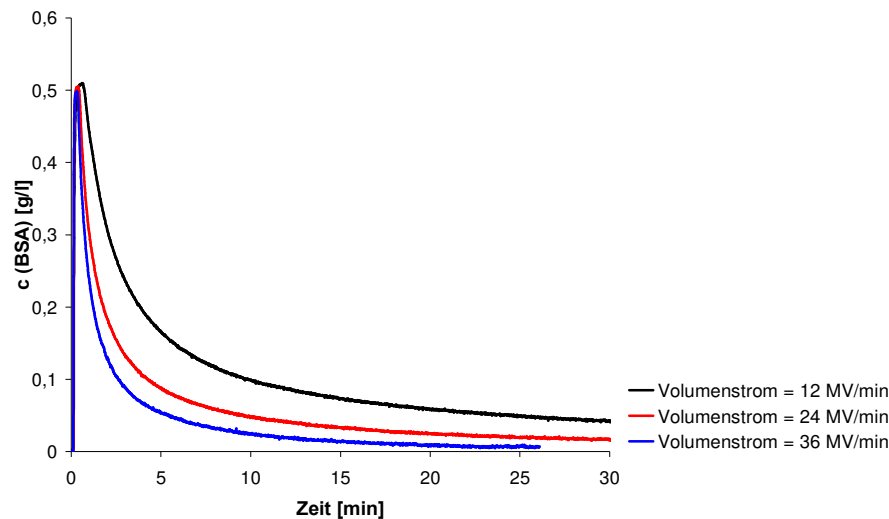


Abbildung 36: Zeitlicher Verlauf der BSA-Konzentration im Rezirkulationsbehälter unter Verwendung von unterschiedlichen Volumenströmen. c (BSA), BSA-Konzentration im Rezirkulationsbehälter. Versuchsbedingungen: Proteinbeladung $0,4 \text{ mg/cm}^2$; Proteinkonzentration $0,5 \text{ mg/ml}$ in Phosphatpuffer; Modulnummer 7004783#2.

Im gezeigten Beispiel wurden jeweils 700 ml rezirkuliert. Demnach wird das gesamte Rezirkulationsvolumen bei einem Volumenstrom von 36 MV/min (entspricht 860 ml/min) in 49 Sekunden einmal vollständig im Kreislauf durch das Modul gefördert. Anders ausgedrückt erreicht man unter Anwendung von 860 ml/min $1,23$ Passagen des Rezirkulationsvolumens in einer Minute. Bei einem Fluss von 287 ml/min (12 MV/min) erreicht man hingegen nur $0,41$ Passagen pro Minute. Die Anzahl der Passagen wurde nach Formel 9 berechnet:

$$N = \frac{\dot{V} \cdot t}{V_{\text{Rezirkulation}}} \quad (9)$$

N : Anzahl der Passagen

t : Zeit [min]

\dot{V} : Volumenstrom [ml/min]

$V_{\text{Rezirkulation}}$: Rezirkulationsvolumen [ml]

Die Protein-Konzentration im Rezirkulationsbehälter zeigte bei Auftragung über der Passagenzahl eine weitgehende Unabhängigkeit vom angewendeten Volumenstrom (Abbildung 37). Demnach entscheidet die Anzahl der Passagen über die Adsorptionseffizienz der Zielsubstanz. Durch Steigerung des Flusses wird die notwendige Anzahl der Passagen für die angestrebte Bindung schneller erreicht, weshalb für einen effektiven Beladungsschritt und mit dem Ziel einer hohen Raum-Zeit-Ausbeute möglichst hohe Volumenströme anzustreben sind. Im Kapitel Modulentwicklung wurde gezeigt, dass der Druckabfall über ein partikelgängiges Membranadsorber-Modul vergleichsweise gering ist (Kapitel 3.1), weshalb der Betrieb von partikelgängigen Membranadsorber-Modulen bei hohen Volumenströmen möglich ist.

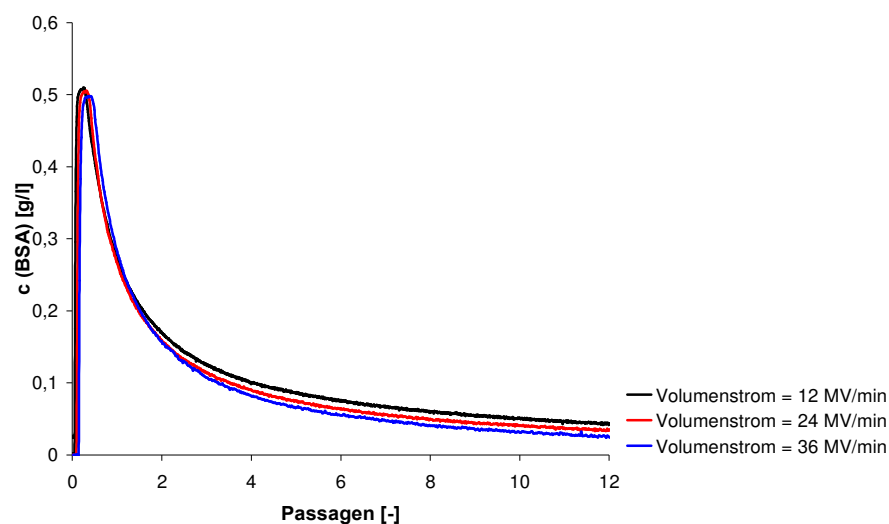


Abbildung 37: Abhängigkeit der BSA-Konzentration im Rezirkulationsbehälter von der Passagenzahl unter Verwendung von unterschiedlichen Volumenströmen. c (BSA), BSA-Konzentration im Rezirkulationsbehälter. Versuchsbedingungen: Proteinbeladung $0,4 \text{ mg/cm}^2$; Proteinkonzentration $0,5 \text{ mg/ml}$ in Phosphatpuffer; Modulnummer 7004783#2.

Das Rezirkulationsverfahren ist hinsichtlich der Bindungskinetik vergleichbar mit einer Batch-Adsorption. Wie im Falle der Batch-Adsorption weisen die Konzentration des Mediums und der Beladungszustand des Adsorbens keine lokalen Unterschiede auf, sofern der Volumenstrom ausreichend hoch gewählt wird. Nußbaumer und Demmer [79] haben festgestellt, dass die zeitliche Konzentrationsabnahme mit großer Näherung durch eine Reaktion erster Ordnung mit einem verbleibenden Restgehalt des Reaktanden (Restkonzentration) beschrieben werden kann:

$$c(t) = a_0 \cdot \exp(-a_1 \cdot t) + a_2 \quad (10)$$

c: Konzentration

a_0 : Differenz aus Startkonzentration und Restkonzentration

a_1 : Geschwindigkeitskonstante

a_2 : Restkonzentration nach Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen Adsorbens und Medium

Die Restkonzentration a_2 in Gleichung 10 entspricht der Konzentration der Zielsubstanz nach Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen Adsorbens und Medium, während a_0 die Differenz aus Startkonzentration und Restkonzentration wiedergibt.

Die Geschwindigkeitskonstante a_1 dient der Beschreibung der Adsorptionsgeschwindigkeit und wurde für die untersuchten Volumenströme aus den Ergebnissen der Modulbeladung (Abbildung 36) auf Basis von Formel 10 mittels nichtlinearer Regression berechnet. Der lineare Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeitskonstanten a_1 und dem angewendeten Volumenstrom steht im Einklang mit dem Ergebnis einer Abhängigkeit der Adsorptionsgeschwindigkeit von der Passagenzahl (Abbildung 38).

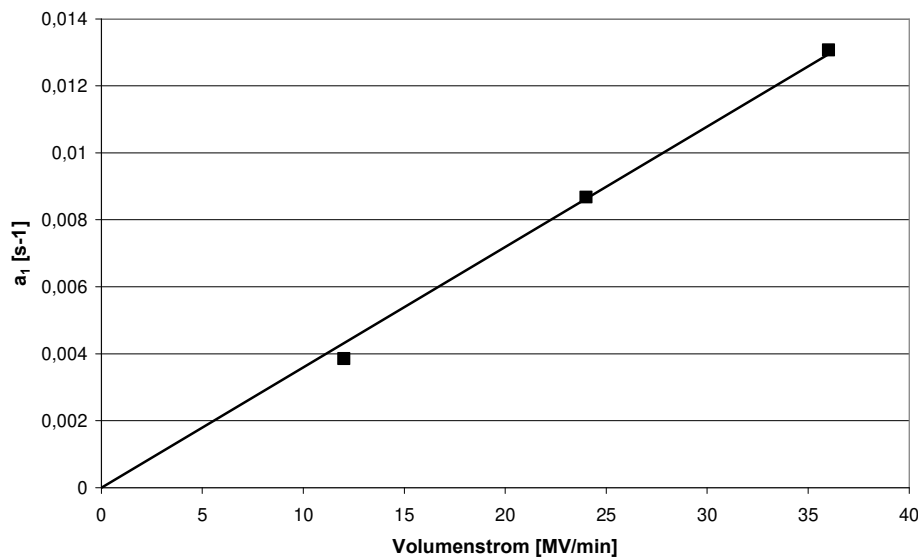


Abbildung 38: Zusammenhang zwischen Volumenstrom und Geschwindigkeitskonstante (a_1). a_1 wurde auf Basis von Formel 10 mittels nichtlinearer Regression aus den Ergebnissen der Modulbeladung bei unterschiedlichen Volumenströmen (Abbildung 36) berechnet.

Für die Auslegung von Prozessen ist die Restkonzentration des Zielmoleküls von großer Bedeutung, welche in Formel 10 durch Parameter a_2 beschrieben ist. Mit Kenntnis der

Restkonzentration kann die Adsorptionseffizienz des Prozesses berechnet werden. Sieht man die Modulbeladung im Rezirkulationsverfahren als Batch-Adsorption an, so ist es theoretisch möglich, bei Kenntnis der Adsorptionsisotherme für ein gegebenes Trennproblem (vorgegebenes Prozessvolumen, vorgegebene Adsorbensmenge und bekannte Startkonzentration der Zielsubstanz) die Restkonzentration a_2 für den Gleichgewichtszustand unter Verwendung von Formel 11 zu berechnen. Die Herleitung von Formel 11 wurde in Kapitel 2.2.4 dargelegt.

$$a_2 = c_0 - \frac{1}{2} \cdot \left(b - \sqrt{b^2 - \frac{4q_{\max} \cdot c_0 \cdot v}{V}} \right) \quad (11)$$

$$b = k_d + c_0 + q_{\max} \cdot \frac{v}{V}$$

a_2 : Restkonzentration

c_0 : Startkonzentration des Proteins in Lösung

V : Volumen der Proteinlösung

v : Volumen des Adsorbens

q_{\max} : maximale Bindungskapazität des Adsorbens

k_d : Dissoziationskonstante

Bei Kenntnis der Restkonzentration a_2 kann die Adsorptionseffizienz berechnet werden. Die Adsorptionseffizienz wurde in Kapitel 3.1 eingeführt. Für die vorliegende Fragestellung wird sie nach Formel 12 berechnet:

$$\text{Adsorptionseffizienz} = \frac{(c_0 - a_2)}{c_0} \cdot 100\% \quad (12)$$

Die Adsorptionseffizienz wurde exemplarisch für die Module aus Kapitel 3.1.1 bestimmt. Die verwendeten Membranen wiesen aufgrund des Herstellprozesses deutliche Unterschiede hinsichtlich der Adsorptionsisotherme auf. Die drei Module wurden bei zwei unterschiedlichen Startkonzentrationen (0,5 und 1 mg/ml) beladen und die Adsorptionseffizienz auf Basis der gemessenen Gleichgewichtskonzentration mit Formel 12 berechnet. Weiterhin wurde die Adsorptionseffizienz alleinig unter Verwendung der bekannten Isothermenparameter maximale Bindungskapazität (q_{\max}) und Dissoziationskonstante (k_d) mit Hilfe von Formel 11 und Formel 12 berechnet.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Adsorptionseffizienz in guter Näherung auf Basis der Isothermenparameter berechnet werden kann (Abbildung 39).

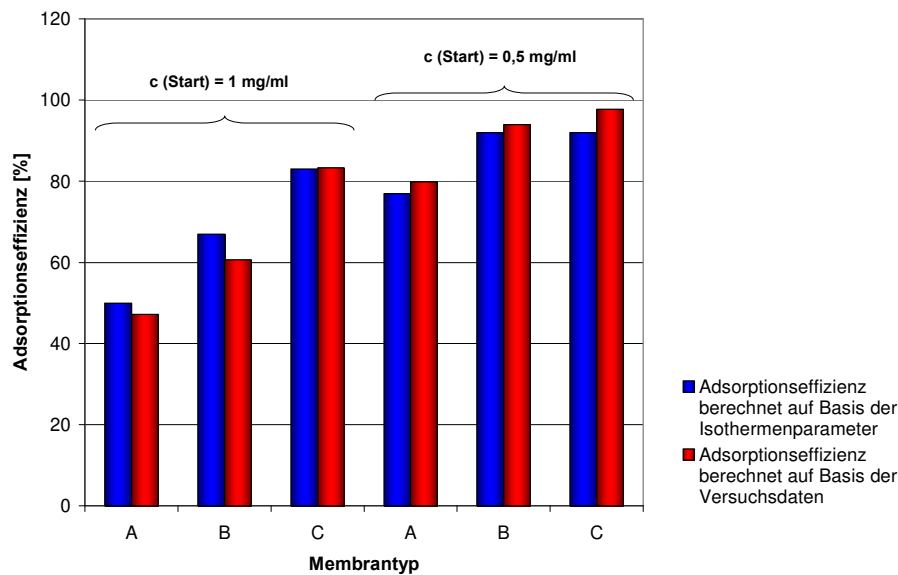


Abbildung 39: Vergleich der Adsorptionseffizienz aus Versuchsdaten mit der Adsorptionseffizienz aus Isothermenparametern. Blaue Säulen, Adsorptionseffizienz berechnet auf Basis der Isothermenparameter; rote Säulen, Adsorptionseffizienz berechnet auf Basis der Versuchsdaten. Die Adsorptionseffizienz wurde für verschiedene Membrantypen (unterschiedlicher Pfropfgrad, siehe Kapitel 3.1.1) bei zwei Startkonzentrationen der Zielsubstanz BSA berechnet. Die Versuchsdaten der Startkonzentration 0,5 mg/ml entstammen Abbildung 14 auf Seite 29. Die Versuchsdaten der Startkonzentration 1 mg/ml befinden sich im Anhang auf Seite 125).

Für die Prozessentwicklung bietet die Kenntnis der Adsorptionsisotherme demnach wichtige Informationen. Auf Basis der Isothermenparameter kann die Restkonzentration der Zielsubstanz und damit die Adsorptionseffizienz für ein gegebenes Trennproblem in guter Näherung berechnet werden. Ebenfalls kann die notwendige Menge Adsorbens für die Bearbeitung eines vorgegebenen Volumens bei einer angestrebten Adsorptionseffizienz berechnet werden. Die ersten Schritte einer Prozessentwicklung sollten daher die Aufnahme einer Adsorptionsisotherme mit der zu adsorbierenden Zielsubstanz beinhalten.

Modulbelastung: Vergleich von Durchlauf- und Rezirkulationsverfahren

Eine erfolgreiche Beladungsstrategie ist durch eine hohe Produktivität und Adsorptionseffizienz gekennzeichnet. Die Produktivität ist hierbei ein Maß für die Produktmenge, welche pro Zeit und Menge Adsorbens (hier: Membranfläche) gewonnen werden kann (Formel 13).

$$P = \frac{V \cdot (c_0 - a_2)}{A \cdot t} \quad (13)$$

P: Produktivität [g/(m²h)]

V: Volumen [l]

c₀: Startkonzentration [g/l]

a₂: Restkonzentration [g/l]

A: Membranfläche [m²]

t: Zeit [h]

Für einen Vergleich der beschriebenen Beladungsvarianten Durchlaufverfahren und Rezirkulationsverfahren wurden die Adsorptionseffizienz und die Produktivität berechnet. Die Berechnung der Adsorptionseffizienz erfolgte gemäß Formel 12, wobei die Restkonzentration a₂ beim Durchlaufverfahren der Konzentration der gesammelten Durchlauffraktion entsprach. Bei der Berechnung der Produktivität wurden die Wasch- und Elutionsschritte (s. Kapitel 3.2.2), die der Modulbelastung nachfolgen, mit einer benötigten Zeit von 10 Minuten berücksichtigt. Es wurde vereinfachend angenommen, dass diese Schritte verlustfrei ablaufen. Für das Durchlaufverfahren wurden drei Volumenströme in die Betrachtung mit einbezogen, da, wie in Abbildung 34 gezeigt, der Anteil des Produktes, welches bei einer Passage durch das Modul gebunden wird, und damit die Adsorptionseffizienz, vom Volumenstrom abhängt. Beim Rezirkulationsverfahren ist die Ausbeute dagegen abhängig von der Rezirkulationsdauer bzw. der Anzahl der Passagen. Es wurden drei Fälle berechnet, bei denen die Rezirkulation durchgeführt wurde, bis 80, 90 bzw. 95 % des Produktes adsorbiert wurden. In allen Fällen wurde mit dem gleichen Volumen und dem gleichen Medium gearbeitet.

Das Rezirkulationsverfahren liefert bei diesem Vergleich bei gleicher Produktivität die höhere Ausbeute (Abbildung 40). Um eine Ausbeute von 80% zu erreichen, darf unter den gewählten Randbedingungen beim Durchlaufverfahren nur ein vergleichsweise geringer Volumenstrom angewendet werden, was eine deutliche Verschlechterung der Produktivität zur Folge hat.

Höhere Volumenströme beim Durchlaufverfahren steigern die Produktivität, allerdings sinkt dadurch die Adsorptionseffizienz deutlich. Bei vergleichbarer Produktivität (10 g pro m² und Stunde) beträgt die Adsorptionseffizienz beim Durchlaufverfahren 49% gegenüber 90% beim Rezirkulationsverfahren.

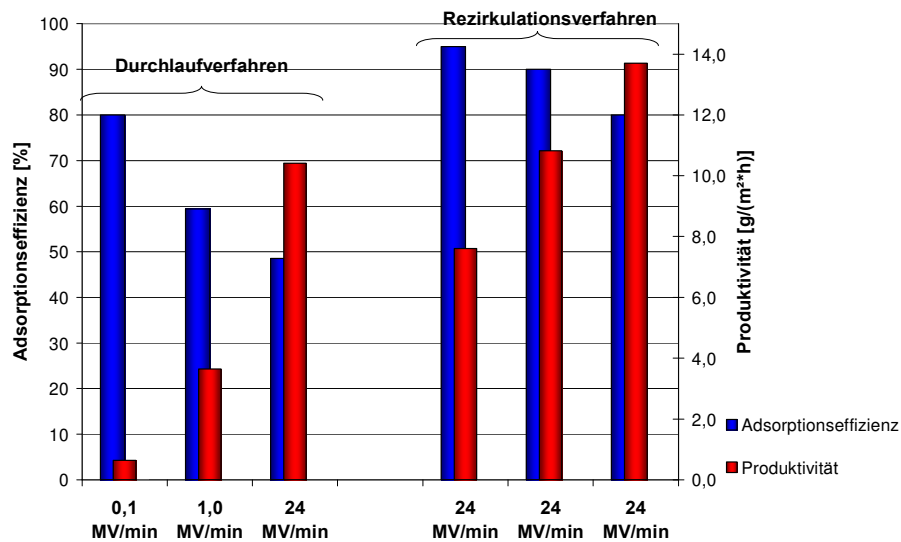


Abbildung 40: Vergleich von Durchlaufverfahren und Rezirkulationsverfahren bei der Modulbeladung bezüglich Adsorptionseffizienz und Produktivität. Blaue Säulen, Adsorptionseffizienz; rote Säulen, Produktivität; MV/min, Membranvolumen pro Minute. Die Berechnung erfolgte auf Basis der Versuchsdaten aus Abbildung 34 und Abbildung 36; Annahmen: Beladungsvolumen 700 ml; Proteinkonzentration 0,5 mg/ml.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Rezirkulationsverfahren für die Modulbeladung von partikelgängigen Membranadsorber-Modulen das bevorzugte Verfahren ist. Das Kernproblem des Durchlaufverfahrens ist, dass bei einmaliger Passage nur ein Teil der Zielsubstanz adsorbiert wird. Dieses Problem kann durch Anwendung geringer Volumenströme zwar reduziert werden, allerdings geht diese Maßnahme auf Kosten der Produktivität des Prozesses. Aufgrund der mehrmaligen Passage des Mediums durch das Modul ist die Adsorptionseffizienz beim Rezirkulationsverfahren höher. Die Notwendigkeit geringer Volumenströme zum Erreichen einer hohen Adsorptionseffizienz besteht hier nicht. Damit eröffnet sich unter Anwendung des Rezirkulationsverfahrens die Möglichkeit, die Produktivität durch Anwendung hoher Volumenströme erheblich zu steigern, ohne Einbußen in der Adsorptionseffizienz. Weitere Vorteile des Rezirkulationsverfahrens bestehen in der einfachen mathematischen Beschreibung und der damit vereinfachten technischen Auslegung von Prozessen. Bei Kenntnis der Isothermenparameter kann die notwendige Menge Adsorbens für eine angestrebte Adsorptionseffizienz auf Basis von Formel 11 auf einfachem Wege berechnet werden. Mögliche Nachteile des Rezirkulationsverfahrens liegen im höheren apparativen Aufwand bei der Übertragung in den Prozessmaßstab. Die Übertragung in den Prozessmaßstab benötigt aufgrund

der erhöhten Volumenströme leistungsstärkere Pumpen und größere Leitungsquerschnitte. Darüber hinaus steht gemäß der Gesetzmäßigkeiten der Batch-Adsorption nur die Trennleistung eines theoretischen Bodens zur Verfügung [94]. Die Kontinuität nahtlos aufeinander folgender Gleichgewichtseinstellungen, wie beim Betrieb einer Chromatographiesäule im Frontalmodus ist im Falle der Batch-Adsorption nicht gegeben, was zur Folge haben kann, dass die nutzbare Kapazität des Adsorbens limitiert wird. Dies gilt für Adsorbentien, die einen flachen Verlauf der Adsorptionsisotherme zeigen, insbesondere bei Prozessen, bei denen eine maximale Ausbeute angestrebt wird. Ein Lösungsansatz besteht in der seriellen Verschaltung mehrerer Batch-Adsorptionsschritte. Ein derartiger Ansatz wird beispielsweise für das HGMS-Verfahren (siehe Kapitel 2.2.5) beschrieben, dem ebenfalls das Prinzip der Batch-Adsorption zugrunde liegt [33].

3.2.2 Wasch- und Elutionsschritte

Waschschritte

Im Bereich der Adsorptionschromatographie dienen Waschschritte der Entfernung von Verunreinigungen, welche nicht oder nur schwach mit dem Adsorbens in Wechselwirkung treten. Bei der integrierten adsorptiven Aufreinigung aus partikelhaltigen Medien dient die Durchführung von Waschschritten darüber hinaus der Entfernung von Zellen, Zellbruchstücken oder Zellinhaltsstoffen. In Kapitel 3.1.2 wurde gezeigt, dass bei der Rezirkulation einer Hefesuspension ein Teil der Biomasse durch das Modul zurückgehalten wurde. Die Ausprägung des Zellrückhaltes wurde hierbei maßgeblich durch den verwendeten Abstandshalter beeinflusst, wobei Abstandshalter C den stärksten Rückhalt zeigte. Für diesen Abstandshalter wurde außerdem festgestellt, dass die Proteinanreicherung aus einer Hefesuspension gegenüber der Anreicherung aus geklärter Lösung verlangsamt war.

Im Rahmen einer Diplomarbeit [90] wurde gefunden, dass der Zellrückhalt beim partikelgängigen Membranadsorber-Modul vorwiegend auf Größenausschlusseffekte an der angeströmten Stirnfläche des Wickels zurückzuführen ist. Es wurde beobachtet, dass sich während der Rezirkulation einer Hefesuspension ($OD = 30$) durch das Modul ein Filterkuchen auf der Anströmfläche des Wickels bildete. Anhand von Schütteltests mit Membranstanzlingen wurde weiterhin gezeigt, dass adsorptive Effekte zum Zellrückhalt beitragen können, jedoch deutlich schwächer ausgeprägt sind, als der auf Größenausschluss basierende Zellrückhalt. Eine Adsorption von Zellen an einer Anionenaustauscher-Membran vom Typ Sartobind Q wurde lediglich unter Verwendung von verdünnten Hefesuspensionen ($OD = 1,5$) nachgewiesen und konnte durch Zugabe von Natrium-Chlorid unterdrückt werden, während unter Verwendung einer negativ geladenen Kationenaustauscher-Membran vom Typ Sartobind S keine Adsorption von Hefezellen beobachtet wurde. Die Adsorption von Zellen an Anionenaustauschern ist bekannt und wird auf die negative Nettoladung der Zellwand bei neutralem pH-Wert des

umgebenden Mediums zurückgeführt [25, 94, 95]. Neben einer Verlangsamung der Abreicherungsgeschwindigkeit hatte der vermehrte Zellrückhalt durch das Modul zur Folge, dass einfache Waschschriffe nicht ausreichten, um die Zellen nach Beendigung des Beladungsschrittes aus dem Modul zu entfernen. Eine Trübung des Eluates durch co-eluierte Hefe wurde neben einer eingeschränkten Adsorptionsleistung des Moduls in Folgeläufen festgestellt.

Mit dem Ziel, Zellen und Zellbruchstücke nach der Modulbeladung mit Hefesuspension möglichst vollständig zu entfernen, wurden verschiedene Waschprotokolle für partikelgängige Membranadsorber-Module untersucht. Dabei wurden der Volumenstrom und die Spülrichtung variiert. Vor dem Waschschriff erfolgte jeweils eine 60 minütige Beladung mit Hefesuspension im Rezirkulationsverfahren. In Abbildung 41 ist die optische Dichte der austretenden Lösung während der nachfolgenden Elution für die betrachteten Fälle des einfachen Waschprotokolls (Volumenstrom und Flussrichtung wurden analog zur Modul-Beladung gewählt; Abbildung 41, schwarzer Kurvenverlauf) und des optimierten Waschprotokolls (entgegen gesetzte Flussrichtung bei fünffachem Volumenstrom gegenüber der Modulbeladung; Abbildung 41, roter Kurvenverlauf) dargestellt. Durch Anwendung des optimierten Waschprotokolls konnten Hefezellen signifikant besser aus dem Modul entfernt werden. Hierdurch konnte ein deutlich besser geklärtes Eluat erreicht werden.

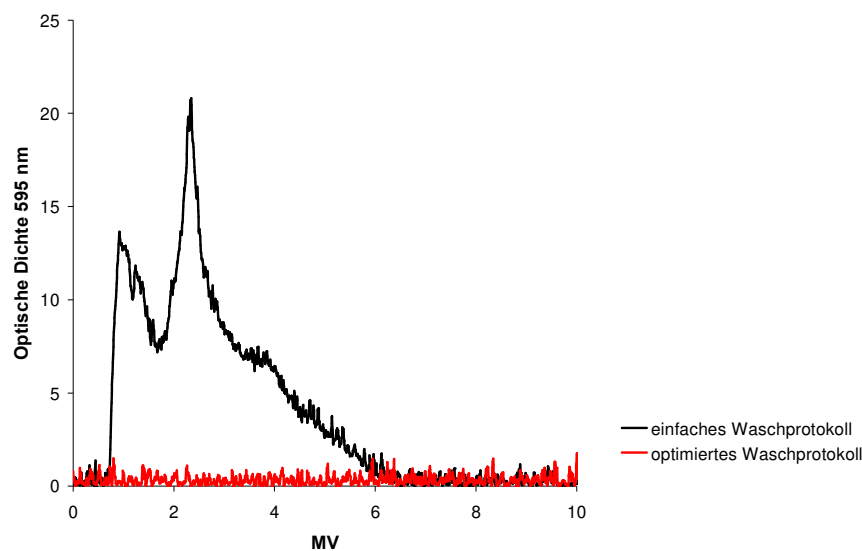


Abbildung 41: Verlauf der optischen Dichte während der Elution nach Durchführung unterschiedlicher Waschprotokolle. Einfaches Waschprotokoll, 12 MV/min im Durchlaufverfahren; optimiertes Waschprotokoll, 60 MV/min im Durchlaufverfahren unter Umkehrung der Flussrichtung; Waschvolumen 15 MV Phosphatpuffer; MV, Membranvolumen. Versuchsbedingungen: Elutionspuffer 1 M NaCl in Phosphatpuffer; Volumenstrom 0,3 MV/min; vor dem Waschschriff erfolgte eine Beladung mit *S. cerevisiae* Suspension (OD 30) über einen Zeitraum von 60 Minuten im Rezirkulationsverfahren bei 12 MV/min; Modulnummer: 06012083#10

Abbildung 42 zeigt die Biomasseverteilung der einzelnen Fraktionen (Beladung, Waschen, Elution) unter Anwendung des optimierten Waschprotokolls. Die Bestimmung der anteiligen Biomasse erfolgte aus der OD und dem Volumen der einzelnen Fraktionen und wurde ins Verhältnis zur Biomasse der Beladungslösung gesetzt. Während der Beladung nahm die Biomasse im Rezirkulationsbehälter um 26% ab. Dieser Anteil der Biomasse konnte durch Verwendung des optimierten Waschprotokolls zu einem großen Teil aus dem Modul entfernt werden, wodurch ein weitgehend geklärtes Eluat erhalten wurde. Die anteilige Biomasse des Eluats betrug 2 % der Biomasse der Beladungslösung.

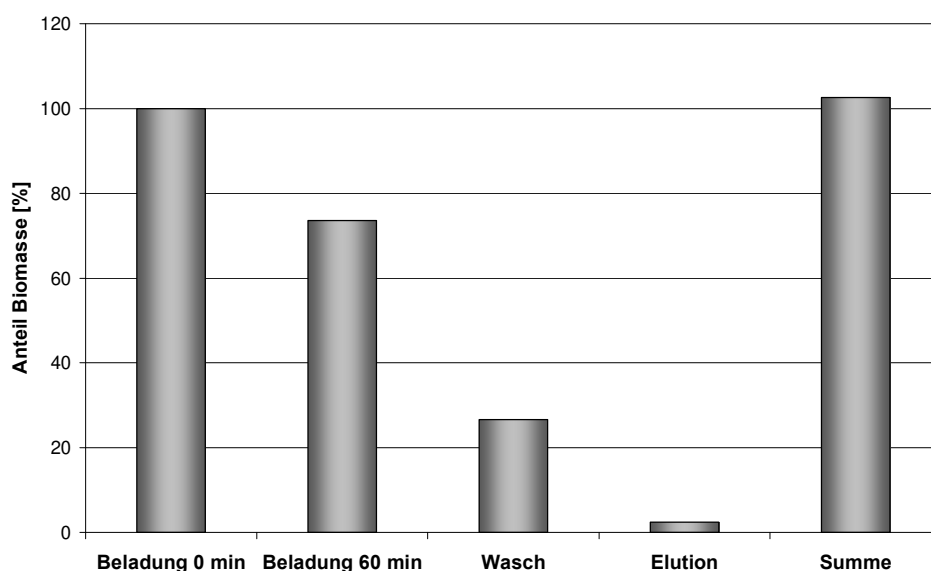


Abbildung 42: Biomasseverteilung der einzelnen Fraktionen (Beladung, Waschen, Elution) unter Anwendung des optimierten Waschprotokolls. Beladung 0 min, Beladungslösung vor der Rezirkulation; Beladung 60 min, Beladungslösung nach 60 Minuten Rezirkulation; Wasch, Waschfraktion; Elution, Elutionsfraktion; Summe, Summe aus Beladung 60 min, Wasch und Elution. Versuchsbedingungen: Beladung mit Hefesuspension OD 30 bei 12 MV/min im Rezirkulationsverfahren; Wasch mit 15 MV Phosphatpuffer bei 60 MV/min unter Umkehrung der Flussrichtung; Elution mit 1M NaCl in Phosphatpuffer bei 0,3 MV/min; Modulnummer: 06012083#10.

Neben einer besseren Klärung des Eluats wurde im Rahmen der Untersuchungen festgestellt, dass die Entfernung von Biomasse nach dem Beladungsschritt dazu beiträgt, die Modul-Leistung in Folgeläufen wiederherzustellen. Die rote Kurve in Abbildung 43 repräsentiert die Proteinadsorption in einem Folgelauf nach einfachem Waschprotokoll, welche gegenüber der ersten Beladung des Moduls mit Biomasse (Abbildung 43, schwarze Kurve) verlangsamt ist. Durch Anwendung des optimierten Waschprotokolls konnte die Modul-Leistung im Folgelauf wieder hergestellt werden (Abbildung 43, blaue Kurve)

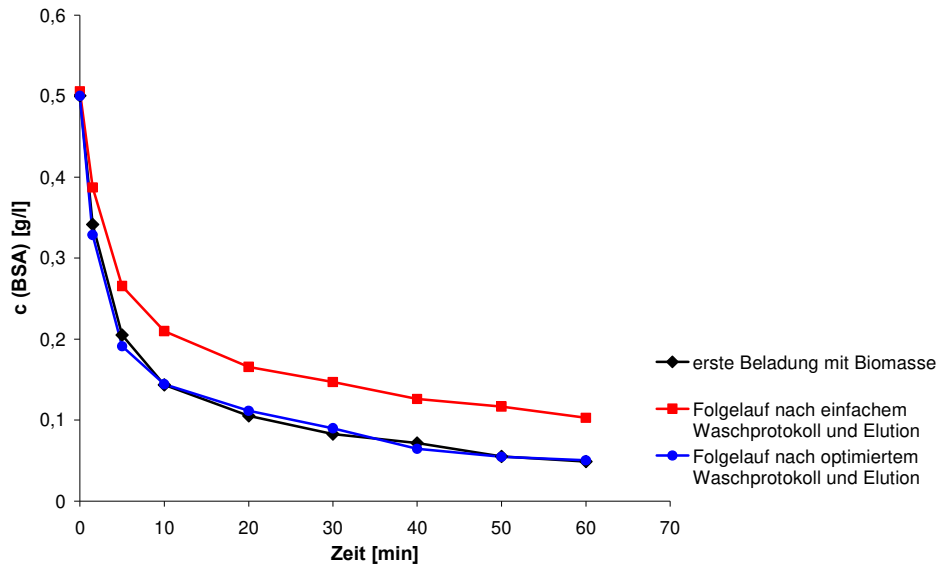


Abbildung 43: Einfluss des Waschprotokolls auf die Adsorptionsgeschwindigkeit in Folgeläufen. c (BSA), BSA-Konzentration im Rezirkulationsbehälter. Versuchsbedingungen: Proteinbeladung $0,4 \text{ mg/cm}^2$; Proteinkonzentration $0,5 \text{ mg/ml}$ in Hefesuspension OD 30; Volumenstrom 12 MV/min ; Modulnummer 06012083#10

Durch Anwendung eines geeigneten Waschprotokolls kann Biomasse, welche im Laufe der Beladung vom partikelgängigen Membranadsorber-Modul zurückgehalten wurde, vor der Elution entfernt werden, wodurch einerseits die Trübung des Eluats reduziert und andererseits die Modul-Leistung in Folgeläufen wiederhergestellt werden kann. Die Versuche unterstreichen damit die Bedeutung eines geeigneten Waschprotokolls für die integrierte Proteinaufreinigung aus partikelhaltigen Medien. In der Literatur werden je nach angewendetem Verfahren verschiedene Strategien benutzt. Bei der Expanded Bed Adsorption (siehe 2.2.1) wird der Volumenstrom aus der Modulbeladung beibehalten, wobei die Flussrichtung zu Beginn des Waschprozesses ebenfalls umgekehrt wird, um Biomasse, welche sich im Verteilersystem befindet, zu entfernen [96]. Waschschrte unter Verwendung von Puffern mit erhöhter Viskosität (z.B. durch Zugabe von Glycerin) konnten im Falle der Expanded Bed Adsorption dazu beitragen, das Waschvolumen zu reduzieren, was auf eine effizientere Entfernung von Partikeln im Falle einer kolbenartigen Strömung zurückgeführt wurde [29]. Waschschrte im HGMS-Verfahren (siehe Kapitel 2.2.5) erfolgen unter Ausnutzung des Prinzips der Rezirkulation, um eine ausreichende Klärung zu erzielen. Nach erfolgtem Waschschrte werden die superparamagnetischen Adsorbentien dabei mit einem Magneten gefangen und der Waschpuffer aus dem Rezirkulations-Kreislauf durch Elutionspuffer ersetzt [33].

Elutionsschritte

Im Anschluss an die Adsorption der Zielsubstanz und die Entfernung ungebundener Komponenten und Partikel in einem folgenden Waschschrift, besteht die Aufgabe darin, das Produkt vollständig und in möglichst aufkonzentrierter Form von der adsorptiven Membran zu eluieren. Der Aufkonzentrierungsfaktor setzt die Konzentration der Zielsubstanz im Eluat ins Verhältnis zur Konzentration im aufzureinigenden Medium und ist eine wichtige Kennziffer bei der Beurteilung von Aufreinigungsprozessen. Für die Elution kommen ebenfalls die bereits betrachteten Verfahren Durchlaufverfahren und Rezirkulationsverfahren in Frage.

Elution im Durchlaufverfahren

Nach Beladung des Moduls mit BSA und Waschen mit Equilibrierungspuffer wurde die Elution im Durchlaufverfahren unter Anwendung diverser Volumenströme durchgeführt. Wie in Abbildung 44 ersichtlich, führte eine Erhöhung des Volumenstroms zu einem flacheren Elutionsprofil und stärkerer Bandenverbreiterung, wobei der Unterschied zwischen den betrachteten Volumenströmen 0,3 und 1 MV/min relativ gering war. Eine Elution bei 10 MV/min führte dagegen zu einem deutlich flacheren Elutionspeak.

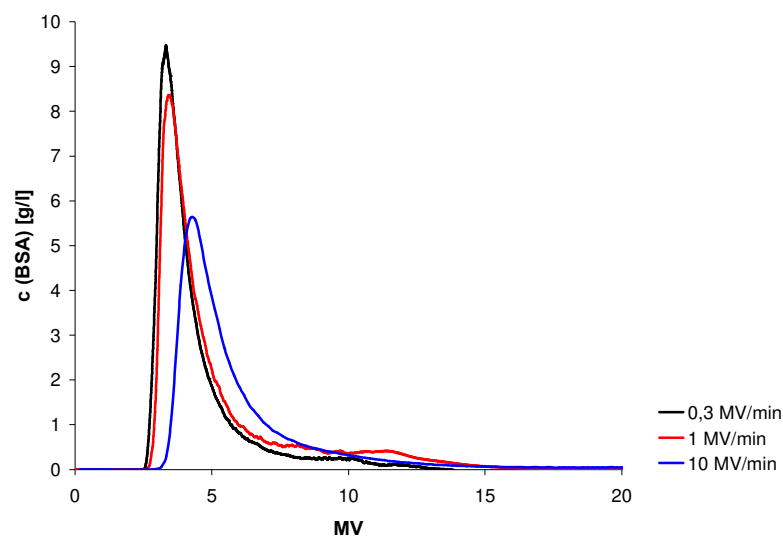


Abbildung 44: Verlauf der BSA-Konzentration während der Elution im Durchlaufverfahren unter Verwendung von unterschiedlichen Volumenströmen. c (BSA), BSA-Konzentration am Modulausgang; MV, Membranvolumen. Versuchsbedingungen: Elutionspuffer 1M NaCl in Phosphatpuffer; Modulnummer 7004783#2.

Die Bewertung der Vollständigkeit der Elution erfolgte anhand der Wiederfindung, welche gemäß Formel 14 berechnet wurde.

$$W = \frac{c_{Eluat} \cdot V_{Eluat} + c_{Wasch} \cdot V_{Wasch}}{V_{Rezirk} \cdot (c_{Start} - c_{Ende})} * 100\% \quad (14)$$

W: Wiederfindung [%]

c_{Eluat} : Protein-Konzentration Eluat [mg/ml]

V_{Eluat} : Volumen Eluat [ml]

c_{Wasch} : Protein-Konzentration Waschfraktion [mg/ml]

V_{Wasch} : Volumen Waschfraktion [ml]

c_{Start} : Protein-Startkonzentration im Rezirkulationsbehälter [mg/ml]

c_{Ende} : Protein-Endkonzentration im Rezirkulationsbehälter [mg/ml]

V_{Rezirk} : Volumen der Beladungslösung im Rezirkulationsbehälter [ml]

Die Wiederfindung unter Anwendung geringer Volumenströme von 0,3 und 1 MV/min war vollständig (99 bzw. 100%), wie die Auswertung in Tabelle 7 zeigt. Unter Anwendung eines Volumenstroms von 10 MV/min betrug die Wiederfindung lediglich 91%. Im Versuch wurde beobachtet, dass die Proteinkonzentration bei diesem Volumenstrom nach Durchlaufen eines Minimums nach etwa 20 Membranvolumen erneut anstieg, was zeigt, dass ein Teil der gebundenen Zielsubstanz nur sehr langsam und in stark verdünnter Form eluiert werden konnte. Die Elution bei 10 MV/min wurde abgebrochen, bevor die Basislinie erreicht wurde (Darstellung des vollständigen Elutionspeaks bei 10 MV/min: Siehe Abbildung 78 im Anhang auf Seite 125).

Tabelle 7: Zusammenhang zwischen dem Volumenstrom bei der Elution im Durchlaufverfahren und der Wiederfindung der Zielsubstanz BSA. Die Berechnung der Wiederfindung erfolgte gemäß Formel 14.

Volumenstrom [MV/min]	Wiederfindung [%]
0,3	100
1,0	99
10	91

Die Versuche zeigen, dass die Anwendung eines geringen Volumenstroms die Elution bei hoher Wiederfindung ermöglicht. Im Vergleich zu konventionellen Chromatographie-Medien ist die beobachtete Bandenverbreiterung beim partikelgängigen Membranadsorber-Modul ausgeprägt. Wird eine Wiederfindung von 100% angestrebt, so geht dies nur unter Hinnahme eines deutlich reduzierten Aufkonzentrierungsfaktors. Der Zusammenhang zwischen Endkonzentration und Aufkonzentrierungsfaktor ist in Abbildung 45 am Beispiel der Elution bei 0,3 MV/min gezeigt. Aufgetragen sind die Proteinkonzentration am Modul-Ausgang, die Proteinkonzentration des Gesamteluats, welche auf Basis des eluierten Proteins und des Elutionsvolumens berechnet wurde, und die Wiederfindung des Proteins. Die Proteinkonzentration des Gesamteluats durchläuft ihr Maximum nach etwa 1,4 MV. Die Konzentration des Gesamteluats beträgt hier 5,9 mg/ml, was bei einer BSA-Konzentration der Startlösung von 0,5 mg/ml einem Aufkonzentrierungsfaktor von 11,8 entspricht. Mit fortschreitender Elution steigt die Wiederfindung, gleichzeitig fällt aber die Konzentration der Proteinlösung im Gesamteluat und damit der Aufkonzentrierungsfaktor. Nach vollständiger Elution (11 MV) beträgt die Konzentration im Gesamteluat 1,4 mg/ml, was einem Aufkonzentrierungsfaktor von 2,8 gegenüber der Startlösung entspricht.

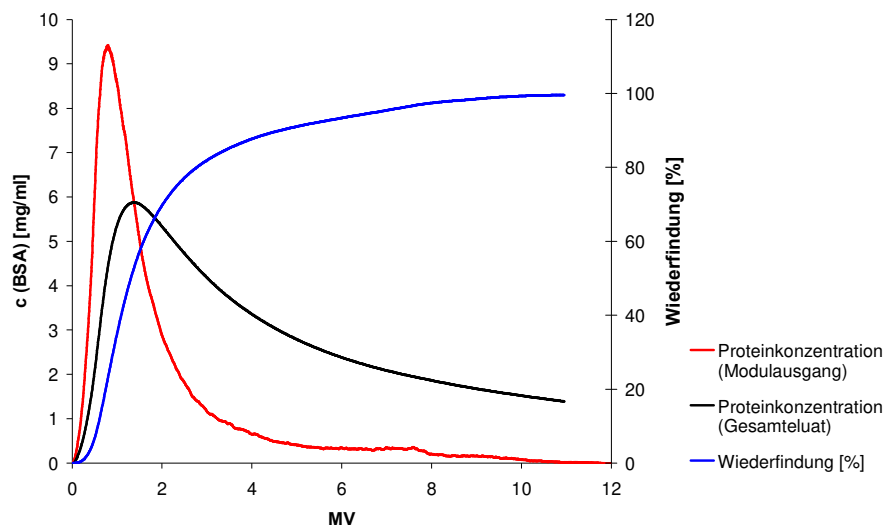


Abbildung 45: Zusammenhang zwischen der Konzentration der Zielsubstanz und der Wiederfindung. c (BSA), BSA-Konzentration am Modulausgang (rote Kurve) und im Gesamteluat (schwarze Kurve); MV, Membranvolumen. Versuchsbedingungen: Elutionspuffer 1M NaCl in Phosphatpuffer; Volumenstrom 0,3 MV/min; Modulnummer 7004783#2

Eine mögliche Lösung, um eine zu starke Verdünnung des Eluats zu vermeiden, ist das Auffangen einer Kernfraktion mit erhöhter Konzentration der Zielsubstanz. Hierdurch kann ein ausreichender Aufkonzentrierungsfaktor unter Hinnahme von akzeptablen Einbußen in der Wiederfindung erreicht werden.

Elution im Rezirkulationsverfahren

Das Rezirkulationsverfahren ist bei der Modulbeladung dem Durchlaufverfahren aufgrund höherer Ausbeuten und gesteigerter Produktivität vorzuziehen (vgl. Kapitel 3.2.1). Im Folgenden wurde untersucht, ob die Anwendung dieses Verfahrens auf die Elution ebenfalls Vorteile bietet. Bei der Elution im Rezirkulationsverfahren wird das Elutionsmittel im Kreislauf durch das Modul gefördert, bis sich ein Gleichgewicht zwischen dem Elutionsmittel und dem Adsorbens einstellt.

Der Einfluss des Volumenstroms auf die Elution im Rezirkulationsverfahren wurde nach Beladung eines Moduls mit BSA und Waschen mit Phosphatpuffer untersucht. Das Volumen des Elutionspuffers im Rezirkulationsbehälter betrug jeweils 200 ml (= 8,3 MV). Analog zu den Rezirkulationsversuchen bei der Modulbeladung wurde die Protein-Konzentration im Rezirkulationsbehälter aufgezeichnet (Abbildung 46). Die Oszillation der Proteinkonzentration, welche bei Volumenströmen größer als 5 MV/min zu Beginn der Elution beobachtet wurde, ist auf mangelnde Vermischung im Rezirkulationsbehälter zurückzuführen. Das Gleichgewicht stellte sich nach einer Rezirkulationszeit von 4 Minuten ein. Die Elution bei 1 MV/min zeigte einen kontinuierlichen Anstieg der Proteinkonzentration. Die Gleichgewichtseinstellung erfolgte hier nach ca. 12 Minuten.

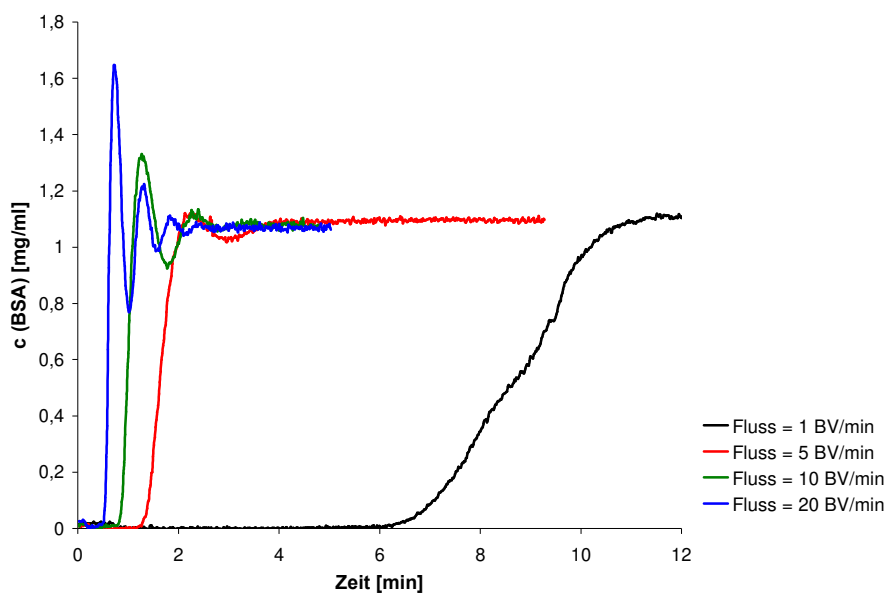


Abbildung 46: Verlauf der BSA-Konzentration während der Elution im Rezirkulationsverfahren unter Verwendung von unterschiedlichen Volumenströmen. c (BSA), BSA-Konzentration am Modulausgang; Versuchsbedingungen: Elutionspuffer 1M NaCl in Phosphatpuffer; Elutionsvolumen 200 ml; Modulnummer 7004783#2

Der Einfluss des Rezirkulationsvolumens auf die Gleichgewichtskonzentration wurde bei konstantem Volumenstrom (5 MV/min) untersucht. Die Einstellung des Gleichgewichts zwischen Elutionspuffer und Adsorbens benötigte ca. 3 Minuten. Bei Reduzierung des Rezirkulationsvolumens nahm die Gleichgewichtskonzentration im Rezirkulationsbehälter zu (Abbildung 47).

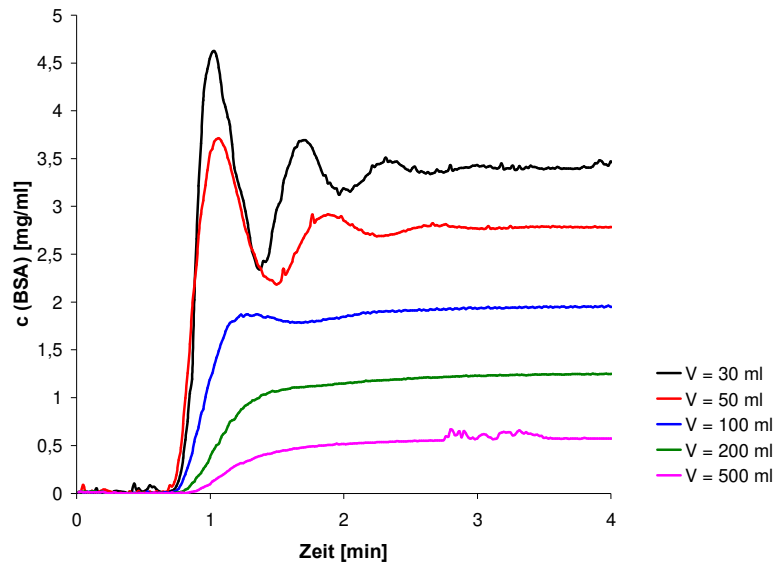


Abbildung 47: Verlauf der BSA-Konzentration während der Elution im Rezirkulationsverfahren unter Verwendung von unterschiedlichen Elutionsvolumen. c (BSA), BSA-Konzentration im Rezirkulationsbehälter; Versuchsbedingungen: Elutionspuffer 1M NaCl in Phosphatpuffer; Volumenstrom 5 MV/min; Modulnummer 7004783#2

Im Anschluss an die Rezirkulation wurde das Volumen, welches sich in den Schläuchen und im Modul befand, in den Rezirkulationsbehälter entleert. Aus dem Volumen und der Konzentration der Lösung wurde die Menge des eluierten Proteins berechnet. Das Gesamteluat (Spalte $V_{\text{Gesamteluat}}$ in Tabelle 8) gibt das Gesamtvolumen wieder, welches sich nach dem Entleeren des Moduls und der Leitungen (ca. 35 ml) in den Rezirkulationsbehälter ergab. Die Wiederfindung wurde mit Hilfe von Formel 14 (siehe Elution im Durchlaufverfahren) berechnet. Die verminderte Wiederfindung bei Verwendung geringer Rezirkulationsvolumina wurde drauf zurückgeführt, dass das Entleeren von Modul und Leitungen nicht vollständig gelang. Die Restmenge der Flüssigkeit in Modul und Leitungen nach Entleerung betrug ca. 30 ml. Gelöstes Protein in diesem Restvolumen stellte Verluste dar, wobei die Auswirkung auf die Wiederfindung mit der Konzentration im Eluat zunahm. Für das Rezirkulationsverfahren ergibt sich damit, wie zuvor für das Durchlaufverfahren beschrieben wurde, ebenfalls ein Kompromiss zwischen Wiederfindung und Aufkonzentrierungsfaktor (Tabelle 8).

Tabelle 8: Zusammenfassung: Einfluss des Rezirkulationsvolumens auf die Konzentration und die Wiederfindung der Zielsubstanz im Gesamteluat.

$V_{\text{Rezirkulationsbehälter}}$ [ml]	$V_{\text{Gesamteluat}}$ [ml]	$c_{\text{Gesamteluat}}$ [mg/ml]	Wiederfindung [%]
30	62	3,4	63
50	85	2,9	73
100	135	2,0	81
200	236	1,2	87
500	540	0,6	96

In Abbildung 48 werden Durchlauf- und Rezirkulationsverfahren hinsichtlich der Kennzahlen Wiederfindung und Aufkonzentrierungsfaktor miteinander verglichen. Aufgetragen sind die Konzentration des Gesamteluats und die Wiederfindung in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen. Bei der Anwendung des Durchlaufverfahrens ergeben sich höhere Konzentrationen bei einer angestrebten Wiederfindungsrate.

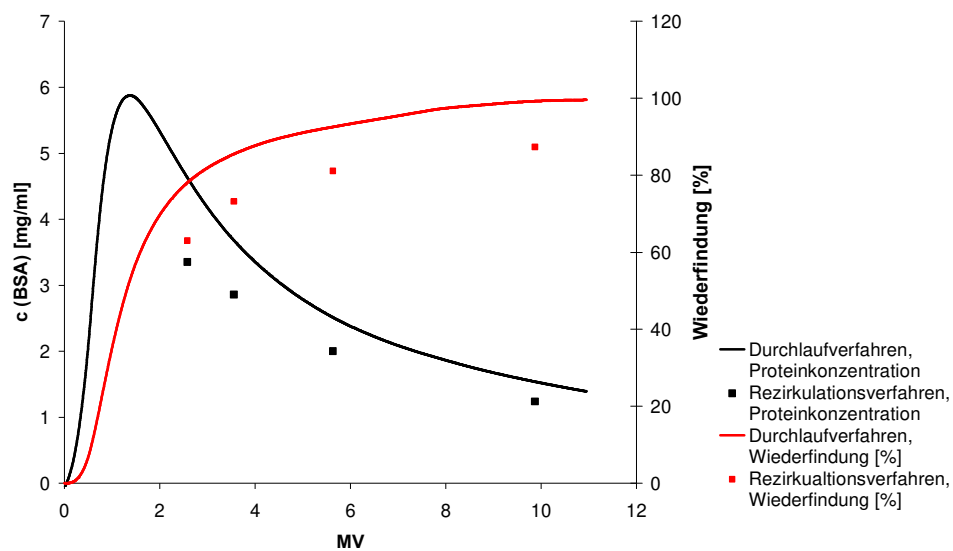


Abbildung 48: Vergleich von Durchlaufverfahren und Rezirkulationsverfahren bei der Elution bezüglich der Konzentration und Wiederfindung der Zielsubstanz. c (BSA), BSA-Konzentration im Gesamteluat; MV, Membranvolumen. Versuchsbedingungen: Elutionspuffer 1M NaCl in Phosphatpuffer; Volumenstrom (Rezirkulationsverfahren) 5 MV/min; Volumenstrom (Durchlaufverfahren) 0,3 MV/min; Modulnummer: 7004783#2

Die Anwendbarkeit des Durchlauf- und des Rezirkulationsverfahrens auf die Elution von partikelgängigen Membranadsorber-Modulen wurde gezeigt. Aufgrund der ausgeprägten Bandenverbreiterung beim Durchlaufverfahren und der Flüssigkeitsrückstände im Modul und im

Chromatographiesystem beim Rezirkulationsverfahren muss bei beiden Varianten ein Kompromiss zwischen Wiederfindung und Aufkonzentrierung gefunden werden. Mögliche Ursachen der Bandenverbreiterung beim Durchlaufverfahren liegen in der Strömungsführung im Modul, welche im Abschnitt 3.2.1 erläutert wurde. Es wurde dargelegt, dass der Stofftransport in die makroporöse Membran (Membrantransport) nicht direkt beeinflusst werden kann. Es ist deshalb davon auszugehen, dass nur ein Teil des Elutionsmittels, welches durch das Modul strömt, einen Stoffaustausch an den funktionellen Gruppen der Membran bewirkt, während der übrige Teil lediglich eine Verdünnung des Eluats verursacht.

Eine Reduzierung des Volumenstromes bei der Elution im Durchlaufverfahren ist im Bereich der Expanded Bed Adsorption gängige Praxis. Lihme et al [97] haben gezeigt, dass die Reduktion des Volumenstroms von 0,25 auf 0,05 Säulenvolumen pro Minute eine Reduktion des Elutionsvolumens von 3 auf 2 Säulenvolumen bewirkte. Eine weitere Maßnahme zur Reduktion des Elutionsvolumens, die im Bereich der Expanded Bed Adsorption Anwendung findet, ist die Reduzierung des Säulentotvolumens vor der Elution durch Umschalten vom Betrieb im expandierten in den gepackten Modus [98]. Die Anwendung des Rezirkulationsverfahrens auf die Elution wird für HGMS-Verfahren beschrieben. In einer Anwendung wurde die Elution durch 3 sukzessive Rezirkulationszyklen durchgeführt. Der erreichte Aufkonzentrierungsfaktor betrug 1,35 bei einer Wiederfindung von 80% [15].

3.2.3 Maßstabsübertragung

Ein zentraler Bestandteil der Verfahrensentwicklung ist die Maßstabsübertragung, beispielsweise vom Labor- in den Pilot- bzw. in den Prozessmaßstab. Im Rahmen einer Maßstabsübertragung ist es üblich, Kenngrößen zu definieren, welche für das durchzuführende Verfahren von übergeordneter Bedeutung sind. In der präparativen Chromatographie ist es üblich, die Maßstabsübertragung bei konstanter mittlerer Verweilzeit und einem konstanten Verhältnis aus Proben- und Adsorbensvolumen durchzuführen. Die mittlere Verweilzeit ist definiert als der Quotient aus Modulvolumen und austretendem Volumenstrom und gibt damit an, wie lange sich ein definiertes Volumenelement im Modul aufhält. Unter der Annahme, dass das Verhältnis aus Adsorbensvolumen und Modulvolumen konstant ist, kann die Maßstabsübertragung durchgeführt werden, indem der Volumenstrom proportional zum Adsorbensvolumen ausgelegt wird.

Dieser Ansatz einer Maßstabsübertragung wurde unter Auswahl einer konstanten Proteinbeladung je Menge Adsorbens für partikelgängige Membranadsorber-Module am Beispiel von drei Baugrößen untersucht (Tabelle 9). Zum Aufbau der Module wurde jeweils der gleiche Abstandshaltertyp (Typ D) und die gleiche Membrancharge vom Typ Sartobind Q verwendet. Basierend auf den Ergebnissen aus Kapitel 3.2.1 und Kapitel 3.2.2 wurde die Modulbeladung im

Rezirkulationsverfahren und die Elution im Durchlaufverfahren durchgeführt. Für die Beladung im Rezirkulationsverfahren ergibt sich aufgrund der proportionalen Erhöhung von Volumenstrom und Beladungsvolumen eine konstante Passagenzahl von 0,4 Passagen pro Minute. In Kapitel 3.2.1 wurde dargelegt, dass die Adsorptionsgeschwindigkeit bei der Beladung im Rezirkulationsverfahren in erster Linie von der Passagenzahl abhängig ist.

Tabelle 9: Versuchsparameter der Maßstabsübertragung. Die Maßstabsübertragung erfolgte durch proportionale Erhöhung des Volumenstroms zum Adsorbensvolumen und durch Definition einer konstanten Proteinbeladung.

Baugröße	I	II	III
Membranvolumen [ml]	3	25	300
Beladung			
Proteinbeladung [mg/cm²]	0,4	0,4	0,4
\dot{V} [MV/min]	12	12	12
[ml/min]	36	300	3600
c, BSA [mg/ml]	0,5	0,5	0,5
V, Beladung [ml]	87	730	8700
Elution			
\dot{V} [MV/min]	1	1	1
[ml/min]	3	25	300

Die Abnahme der Proteinkonzentration im Rezirkulationsbehälter zeigte für die untersuchten Baugrößen eine unterschiedliche Geschwindigkeit, wobei die Übertragung in den größeren Maßstab jeweils mit einer Zunahme der Adsorptionsgeschwindigkeit verbunden war (siehe Abbildung 49). Nach einer Rezirkulationszeit von 50 Minuten näherte sich die Proteinkonzentration einem konstanten Wert an, woraus sich die Konsequenz ergab, dass die Adsorptionseffizienz zu diesem Zeitpunkt für die betrachteten Baugrößen annähernd gleich war (93% bei Baugröße I und 95% bei den Baugrößen II und III).

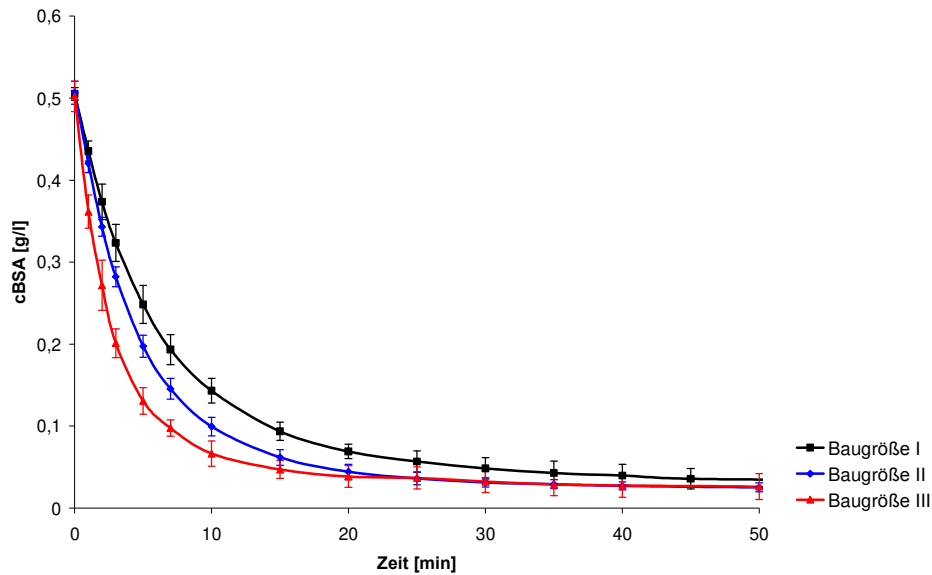


Abbildung 49: Zeitlicher Verlauf der BSA-Konzentration im Rezirkulationsbehälter unter Verwendung von unterschiedlichen Baugrößen. c (BSA), BSA-Konzentration im Rezirkulationsbehälter. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Messung von 5 Modulen \pm Standardabweichung. Versuchsbedingungen: Proteinbeladung $0,4 \text{ mg/cm}^2$; Proteinkonzentration $0,5 \text{ mg/ml}$ in Phosphatpuffer; Volumenstrom 12 MV/min ; Modulnummer 9807263#1-5 (Baugröße I), 9804563#1-5 (Baugröße II), 9804663#1-5 (Baugröße III).

Bei der Bewertung der Elution ist das Elutionsvolumen von übergeordneter Bedeutung. Je geringer das Elutionsvolumen, desto größer der Aufkonzentrierungsfaktor, welcher im Rahmen der Aufarbeitung erreicht werden kann. Das geringste Elutionsvolumen (ca. 4 MV) wurde mit Baugröße III erreicht (Abbildung 50). Ein geringfügig größeres Elutionsvolumen zeigt Baugröße II (ca. $4,5 \text{ MV}$), während die Baugröße (I) mit etwa 6 Membranvolumen ein signifikant größeres Elutionsvolumen aufwies.

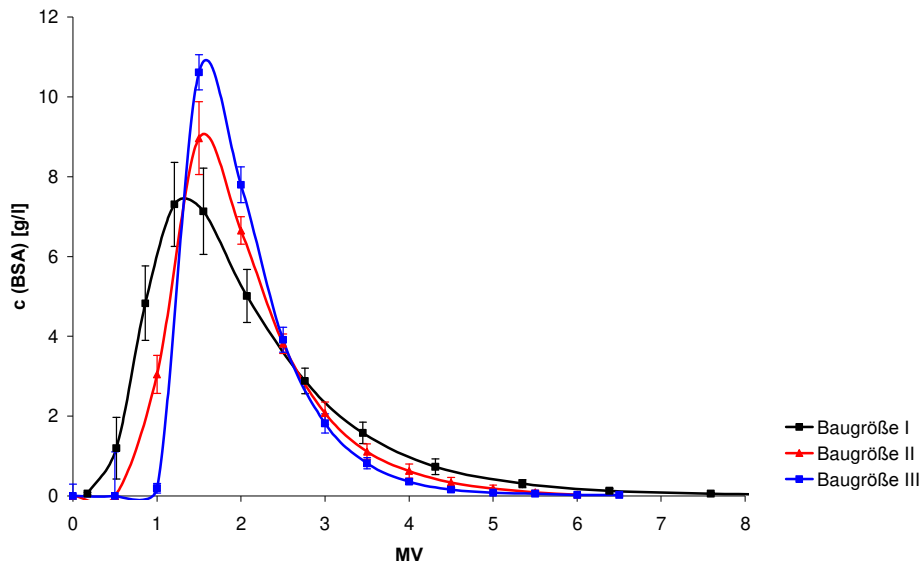


Abbildung 50: Verlauf der BSA-Konzentration während der Elution im Durchlaufverfahren unter Verwendung von unterschiedlichen Baugrößen. c (BSA), BSA-Konzentration am Modulausgang; MV, Membranvolumen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Messung von 5 Modulen \pm Standardabweichung. Versuchsbedingungen: Elutionspuffer 1M NaCl in Phosphatpuffer; Volumenstrom 1 MV/min; Modulnummer 9807263#1-5 (Baugröße I), 9804563#1-5 (Baugröße II), 9804663#1-5 (Baugröße III).

Abbildung 49 und Abbildung 50 zeigen, dass die Gültigkeit der Maßstabsübertragung unter Anwendung einer konstanten mittleren Verweilzeit für die untersuchten Module limitiert ist. Die Modul-Leistung nimmt im Hinblick auf die Adsorption und die Elution im Rahmen der Maßstabsvergrößerung zu, was sich in einer höheren Adsorptionsgeschwindigkeit und einem geringeren Elutionsvolumen zeigt. Die Maßstabsübertragung vom mittleren Format (Baugröße II) auf das größere Format (Baugröße III) zeigt hierbei eine geringere Abweichung als die Übertragung der Baugröße I auf die Baugröße II.

Eine mögliche Ursache der begrenzten Aussagekraft der Ergebnisse des kleinen Formates (Baugröße I) auf die Prozessierung mit größeren Modulen liegt zum einen im Anlagenaufbau. Je kleiner das Format, desto größer ist der Einfluss des Anlagen-Totvolumens auf die erhaltenen Ergebnisse. Bei der Durchführung der Experimente wurde daher angestrebt, das Anlagen-Totvolumen bzw. dessen Einfluss auf die Resultate zu minimieren (Versuchsdurchführung: siehe Anhang 2.4 auf Seite 118). Eine weitere mögliche Ursache ist die Geometrie der untersuchten Module. In der konventionellen Chromatographie ist es üblich, die Bett Höhe im Rahmen der Maßstabsübertragung beizubehalten. Bei Chromatographie-Säulen erfolgt eine Maßstabsvergrößerung daher durch eine Erhöhung des Säulendurchmessers, wobei die Herausforderung darin besteht, eine gleichmäßige Anströmung des gesamten Bettes zu erreichen. Bei der Maßstabsübertragung des partikelgängigen Membranadsorber-Moduls wurde neben dem Durchmesser auch die Modul-Länge verändert (Abbildung 51). Dieses Vorgehen wurde gewählt,

da die Fertigung von Modulen, welche die gleiche Länge wie die Baugröße III aufwiesen, insbesondere beim Aufbau von Laboreinheiten mit geringem Adsorbensvolumen technisch nicht realisierbar war. Darüber hinaus zeigten die Daten aus Kapitel 3.1.4 keinen signifikanten Einfluss der Modul-Länge auf die Modul-Leistung.



Abbildung 51: Maßstabsübertragung. Untersuchte Formate des partikelgängigen Membranadsorber-Moduls (von links nach rechts: Baugröße I, Baugröße II und Baugröße III).

Die Maßstabsübertragung von partikelgängigen Membranadsorber-Modulen ist noch nicht abgeschlossen. Ein Adsorbensvolumen von 300 ml stellt lediglich den derzeitigen Stand der Entwicklung dar. Prozessmodule mit einem Adsorbensvolumen von 20 Litern erscheinen technisch machbar. Parallel zur Entwicklung dieser Module sollten die Untersuchungen zur Maßstabsübertragung fortgeführt werden.

Fazit Einsatzweise

Die Grundlagen der Einsatzweise von partikelgängigen Membranadsorber-Modulen wurden erarbeitet. Die Modulbeladung erfolgt vorzugsweise im Rezirkulationsverfahren unter Anwendung hoher Volumenströme, während die Durchführung der Wasch- und Elutionsschritte idealer Weise im Durchlaufverfahren durchgeführt wird. Der Verlauf der Konzentration der Zielsubstanz während der Modulbeladung im Rezirkulationsverfahren kann mit einer Reaktion erster Ordnung beschrieben werden. Da sich im Laufe der Rezirkulation ein Gleichgewicht zwischen Adsorbens und Medium einstellt, kann bei Kenntnis der Lage der Adsorptionisothermen die Restkonzentration und damit die Adsorptionseffizienz in guter Näherung berechnet werden. Die Aufnahme der Adsorptionisotherme sollte daher in die

Prozessentwicklung integriert werden. Die Umkehrung der Flussrichtung und die Erhöhung des Volumenstroms bei der Anwendung von Waschschrinen tragen dazu bei, Biomasse nach erfolgter Beladung aus dem Modul zu entfernen, damit im folgenden Prozessschritt ein möglichst klares Eluat erhalten werden kann. Es wurde erkannt, dass die erzielte Aufkonzentrierung bei der Elution unter Verwendung eines partikelgängigen Membranadsorbers gegenüber konventionellen Chromatographie-Verfahren geringer ist, was auf die Strömungsführung im Modul zurückgeführt wurde. Die Anwendung geringer Volumenströme und das Sammeln einer Kernfraktion unter Tolerierung reduzierter Ausbeuten wurden als Lösungsansätze genannt. Die Versuche zur Maßstabsübertragung, welche über eine proportionale Steigerung von Volumenstrom und Beladungsvolumen zum verwendeten Adsorbensvolumen durchgeführt wurde, zeigte, dass sich die im kleinen Labormaßstab gewonnen Ergebnisse nur eingeschränkt auf größere Formate übertragen lassen. Es wurde festgestellt, dass die Modul-Leistung hinsichtlich der Adsorptionsgeschwindigkeit und des Aufkonzentrierungsfaktors mit der Modulgröße zunahm.

3.3 Applikationen

Für die biotechnologische Herstellung rekombinanter therapeutischer Proteine sind drei Gruppen von Expressionssystemen etabliert: Bakterien, Hefen und Säugerzellen [99]. Jedes dieser Expressionssysteme stellt besondere Anforderungen an den Aufarbeitungsprozess. Die integrierte Proteinaufreinigung mit partikelgängigen Membranadsorber-Modulen wurde anhand der folgenden Modellsysteme aus den drei genannten Gruppen untersucht.

3.3.1 Integrierte Aufreinigung von humanem Immunglobulin G (hIgG) aus Hybridomzellkulturen

Säugerzellkulturen werden aufgrund ihrer Fähigkeit, humane Glykosylierungsmuster im Rahmen der posttranslationalen Modifikation bilden zu können, für die Herstellung komplexer Proteine (z.B. Antikörper) genutzt, welche ins Medium sekretiert werden. Die Zellzahl am Ende der Kultivierung liegt üblicherweise im Bereich von 5×10^6 bis 5×10^7 Zellen je ml Zellkultur. Die Zellen haben einen Durchmesser von 10 bis 20 μm und sind damit deutlich größer als Hefen oder Bakterien. Im Gegensatz zu Hefen und Bakterien besitzen Säugerzellen keine Zellwand und sind lediglich von einer Membran umschlossen, weshalb sie schereempfindlicher sind. Im Rahmen der Kultivierung von Säugerzellen werden daher besondere Maßnahmen getroffen, um Scherkräfte auf ein Minimum zu reduzieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die integrierte Aufreinigung von humanem Immunglobulin G (hIgG) aus einer Hybridomzellkultur untersucht. Hybridomzellen entstehen durch Fusion von antikörperproduzierenden B-Zellen mit Myelomzellen (Krebszellen) und vereinbaren die Eigenschaften der uneingeschränkten Teilbarkeit der Myelomzellen mit der Fähigkeit der B-Zellen Antikörper zu produzieren [100]. Die Aufreinigung der Antikörper wurde unter Einsatz eines partikelgängigen Membranadsorber-Moduls, welches eine Sartobind Protein A Membran beinhaltet, durchgeführt. Die Aufreinigung von hIgG aus geklärtem Zellkulturmedium unter Einsatz von Sartobind Protein A Membranadsorbern ist in der Literatur beschrieben [101]. Die geringe Expressionsrate der verwendeten Hybridom-Zelllinie (5-8 $\mu\text{g/ml}$) erforderte die Zudosierung von humanem polyklonalem Immunglobulin G (hIgG). Die Arbeiten zur Aufreinigung von hIgG aus einer Säugerzellkultur wurden am Institut für technische Chemie, Hannover zusammen mit Fabienne Anton durchgeführt [102].

Tabelle 10: Aufreinigung von hIgG aus Hybridomzellkulturen mit partikelgängigem Protein A Membranadsorber-Modul (MV = 25 ml) – Versuchsbedingungen.

Beladung (Rezirkulation)	
Volumen [ml]	200
Volumenstrom [ml/min]	250
Volumenstrom [MV/min]	10
Startkonzentration (hIgG) [mg/ml]	0,5
Verhältnis Proteinmenge/Adsorbensvolumen [mg/ml]	4,0
Zellzahl, Start [ml^{-1}]	$9,8 \cdot 10^5$
Waschschritt (Durchlauf)	
Waschpuffer: 0,5 M NaCl 10 mM Kaliumphosphat pH 7,4	
Volumen [ml]	2 x 50
Volumenstrom [ml/min]	50
Volumenstrom [MV/min]	2
Elution (Durchlauf)	
Elutionspuffer: 0,1 M Glycin/HCl pH 2,8	
Volumen [ml]	4 x 50
Volumenstrom [ml/min]	14
Volumenstrom [MV/min]	0,6

Die Konzentration der Zielsubstanz hIgG nahm im Laufe der Rezirkulation kontinuierlich ab und erreichte nach einer Rezirkulationszeit von 40 Minuten einen Wert von 0,034 mg/ml (Abbildung 52, schwarze Kurve). Dies entspricht einer Adsorptionseffizienz von 93%. Der verwendete polyklonale Antikörper hIgG hatte einen IgG₃ Anteil von 5,7%. Es ist bekannt, dass die IgG₃ Fraktion eine geringe Affinität gegenüber Protein A aufweist [103], was den Verbleib einer Restkonzentration im Rezirkulationsvolumen und die unvollständige Adsorption teilweise erklärt. Weiterhin wurde im Versuch eine Abnahme der Zellzahl um 10% beobachtet (Abbildung 52, rote Kurve).

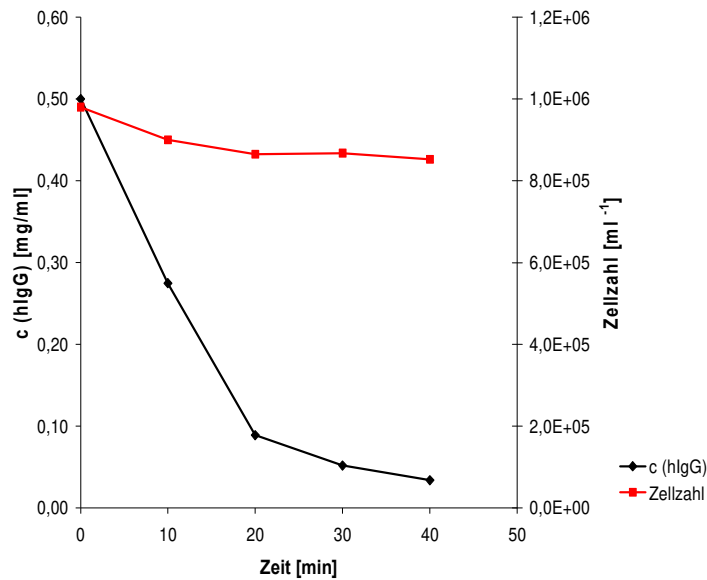


Abbildung 52: Zeitlicher Verlauf der hIgG-Konzentration und der Zellzahl im Rezirkulationsbehälter. c (hIgG), hIgG-Konzentration im Rezirkulationsbehälter. Versuchsbedingungen: siehe Tabelle 10; Modulnummer.: 7009983.

Im Rahmen der Dissertation von Fabienne Anton [102] wurde gezeigt, dass die Laktatdehydrogenase-Aktivität während der Rezirkulation einer Hybridomzellkultur durch das Modul keine signifikante Zunahme zeigte, woraus geschlossen wurde, dass keine ausgeprägte Zelllyse vorlag. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Abnahme der Zellzahl vorwiegend auf mechanischen Rückhalt zwischen Membran und den Stegen des verwendeten Abstandshalters zurückzuführen war. Eine Adsorption der Zellen an den Filamenten des Unterstützungsvlieses der Membran wurde ebenfalls gezeigt. Die Zellen konnten unter Anwendung von Waschschrinen nicht aus dem Modul entfernt werden. Eine Steigerung des Volumenstromes, sowie die Umkehrung der Flussrichtung hatten keinen signifikanten Effekt.

Die Elution erfolgte im Durchlaufverfahren. Die Quantifizierung des hIgG in den Elutionsfraktionen ergab eine Wiederfindung von 88%. Unter Berücksichtigung der Verluste während der Modulbeladung wurde für den Gesamtprozess eine Ausbeute von 77% berechnet. Eine Aufkonzentrierung der Zielsubstanz hIgG wurde im Versuch nicht beobachtet (Abbildung 53), da das Gesamtelutionsvolumen dem Beladungsvolumen entsprach.

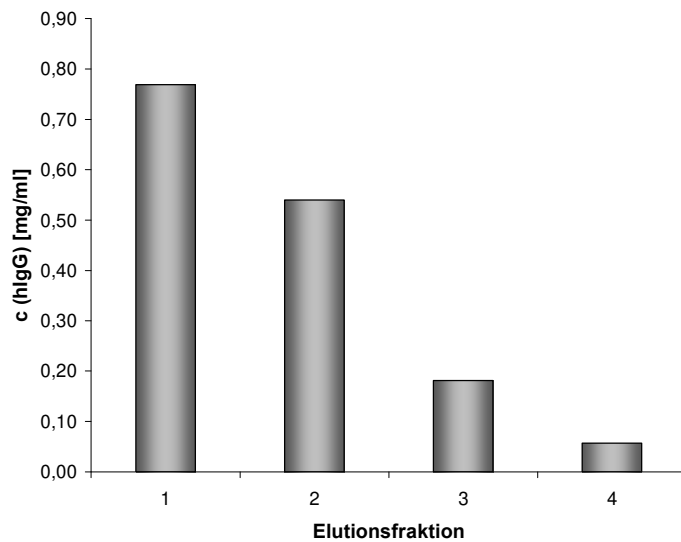


Abbildung 53: hIgG-Konzentration in den Elutionsfraktionen. c (hIgG), hIgG-Konzentration in den Elutionsfraktionen. Versuchsbedingungen: siehe Tabelle 10; Modulnummer.: 7009983.

Die Quantifizierung der Zielsubstanz hIgG erfolgte durch Größenausschlusschromatographie. Die Chromatogramme der Beladungslösung und der ersten Elutionsfraktion zeigen eine effektive Entfernung von Verunreinigungen (Abbildung 54).

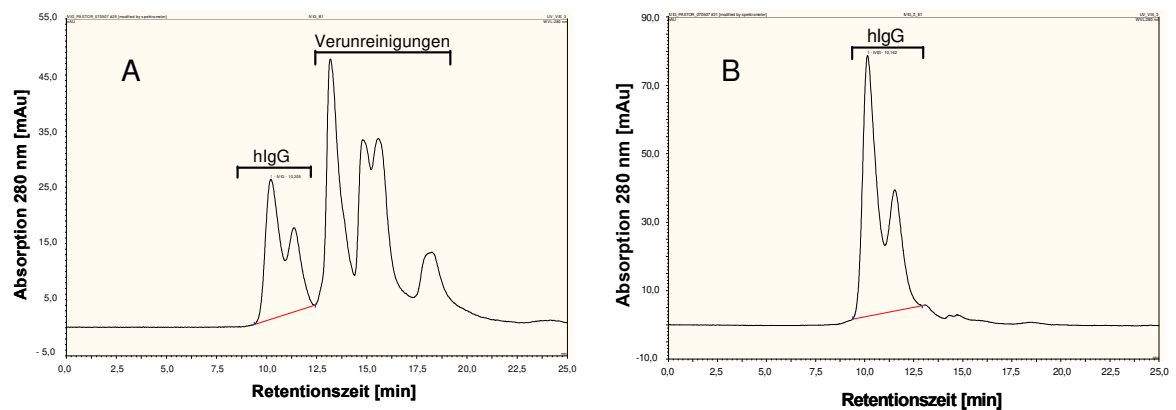


Abbildung 54: (A) HPLC-Chromatogramm der Beladungslösung nach 1 Minute Rezirkulation; (B) HPLC-Chromatogramm der Elutionsfraktion 1. hIgG, Humanes Immunglobulin G. Methode Größenausschlusschromatographie; SEC-Säule: Proteema 300; Laufmittel: 50 mM KPi, 0,3 M NaCl, pH 6,7; Injektionsvolumen: 100 μ l.

Die integrierte Aufreinigung von humanem Immunglobulin G (hIgG) aus einer Hybridomzellkultur wurde unter Einsatz eines partikelgängigen Protein A Membranadsorber-Moduls durchgeführt. Im Laufe des Prozesses wurde keine signifikante Zellschädigung festgestellt und es konnte trotz des beobachteten Zellrückhalts ein klares, zellfreies Eluat erhalten werden. Die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie zeigten eine hohe Spezifität der Bindung. Die Ausbeute des Gesamtprozesses betrug 77% bei einer Wiederfindung von 88% (Tabelle 11).

Tabelle 11: Zusammenfassung: Aufreinigung von hIgG aus Hybridomzellkultur mit partikelgängigem Protein A Membranadsorber-Modul.

c (hIgG), Eluat [mg/ml]	0,39
V, Eluat [ml]	200
m (hIgG), Eluat [mg]	77
Bindungskapazität [mg/ml]	3,1
Ausbeute [%]	77
Wiederfindung [%]	88
Aufkonzentrierungsfaktor	0,8
Klärungsfaktor [%]	100

Typische Ausbeuten im Bereich der Aufarbeitung von Antikörpern unter Einsatz von Protein A Chromatographiesäulen liegen im Bereich von 85 bis 95% [104]. Ähnliche Ausbeuten werden auch für Protein A Expanded Bed Adsorptionsverfahren beschrieben [105]. Ein deutlicher Unterschied gegenüber dem Einsatz des untersuchten Moduls liegt in der Bindungskapazität. Die dynamische Bindungskapazität beträgt für Protein A Expanded Bed Adsorptionsmedien 31 mg je ml Adsorbens [105], während für das Membranadsorber-Modul eine Bindungskapazität von lediglich 3,1 mg je ml Adsorbens aus dem erhaltenen Eluat berechnet wurde. Eine weitere Limitierung des untersuchten Moduls besteht darin, dass im Prozess keine Aufkonzentrierung erreicht wurde. Diese Tatsache ist zum einen auf die geringe Bindungskapazität des Adsorbens und zum anderen auf die Verdünnung bei der Elution zurückzuführen (siehe Kapitel 3.2.2). Die Adsorption von Säugerzellen wurde auch für Expanded Bed Adsorptionsverfahren beschrieben. Insbesondere Hybridom-Zellen stellen eine Herausforderung dar, da diese aufgrund von Zell-Interaktionen Aggregate bilden können und darüber hinaus an Oberflächen jeder Art binden [94].

3.3.2 Integrierte Aufreinigung von HSA aus *Pichia Pastoris* Kulturen

Mikrobielle Expressionssysteme haben gegenüber Säugerzellen den Vorteil höherer Wachstumsraten. Die Kultivierung ist dadurch weniger zeitaufwändig und es werden höhere Zelldichten erreicht. Hefen verfügen über eine Zellwand, welche eine ausgeprägte mechanische Stabilität der Zellen gewährleistet. Sie sind ebenfalls zur posttranslationalen Modifikation befähigt, allerdings weisen nicht alle Proteine exakt humanidentische Glykosylierungsmuster auf. [100]. Für Hefen werden intrazelluläre und extrazelluläre Expressionssysteme beschrieben [106]. Bei der extrazellulären Expression, welche den Regelfall bei Hefen darstellt, werden die Proteine ins Medium sekretiert und können, wie bei Säugerzellkulturen, ohne die Notwendigkeit eines initialen Zellaufschlusses, aufgereinigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *Pichia Pastoris* Stamm GS115/HSA (Invitrogen) verwendet. Der Stamm ist zur extrazellulären Produktion von rekombinantem, humanem Serumalbumin (rHSA) befähigt [107]. Die Kultivierung von *Pichia Pastoris* erfolgte in einem Komplex-Medium unter Einsatz von Methanol als Induktor. Die Expression von rHSA betrug lediglich 35 mg pro Liter und lag damit deutlich unterhalb des Expressionslevels üblicher Produktionsstämme (größer 1 g/l) [108]. Um ein praxisnahes Modellsystem zu erhalten, wurde humanes Serumalbumin (HSA) in einer Konzentration von 1 mg/ml zudosiert. Vorversuche mit konventionellen, durchströmten Membranadsorbern (Format: Sartobind nano 3 mL) unter Einsatz der Membranen Sartobind S und Sartobind Q ergaben eine vergleichbare Bindungskapazität, wobei die Kationenaustauscher-Membran (Sartobind S) eine deutlich höhere Selektivität zeigte und daher für die Versuche zur integrierten Proteinaufreinigung ausgewählt wurde (Daten nicht gezeigt). Die integrierte Aufreinigung von HSA aus *Pichia Pastoris* Kulturen wurde unter Einsatz dieser Membran in einem partikelgängigen Membranadsorber-Modul durchgeführt.

Tabelle 12: Aufreinigung von HSA aus *Pichia Pastoris* Kulturen mit partikelgängigem Sartobind S Membranadsorber-Modul (MV = 3,4 ml) – Versuchsbedingungen.

Beladung (Rezirkulation)	
Volumen [ml]	41
Volumenstrom [ml/min]	41
Volumenstrom [MV/min]	12
Startkonzentration (HSA) [mg/ml]	1,06
Verhältnis Proteinmenge/Adsorbensvolumen [mg/ml]	12,8
OD (Start)	29
Leitfähigkeit [mS/cm] / pH-Wert	6,1 / 4,5
Waschschritt (Durchlauf)	
Waschpuffer: 50 mM NaAc pH 4,5	
Volumen [ml]	81
Volumenstrom [ml/min]	41
Volumenstrom [MV/min]	12
Elution (Durchlauf)	
Elutionspuffer: 25 mM NaAc 500 mM NaCl pH 5,4	
Volumen [ml]	30
Volumenstrom [ml/min]	1
Volumenstrom [MV/min]	0,3

Die Analytik mittels Größenausschlusschromatographie (SEC-Säule: Proteema 300) erlaubte keine Quantifizierung von HSA in der Zellsuspension, da Medienbestandteile zeitgleich mit HSA eluierten (Abbildung 55).

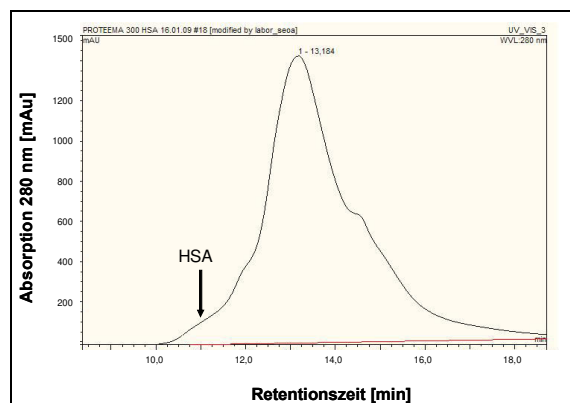


Abbildung 55: HPLC-Chromatogramm der Beladungslösung nach 1 Minute Rezirkulation. Methode Größenausschlusschromatographie; SEC-Säule: Proteema 300; Laufmittel: 50 mM KPi, 0,3 M NaCl, pH 6,7; Injektionsvolumen: 200 µl.

Die HSA-Konzentration während der Beladung wurde durch Vergleich der Bandenintensität über SDS-PAGE abgeschätzt, wobei reines HSA in verschiedenen Konzentrationen als Standard mit auf das Gel aufgetragen wurde. Nach einer Beladungszeit von 45 Minuten sank die HSA-Konzentration auf 0,02 mg/ml woraus sich eine Adsorptionseffizienz von 98% ergab (Abbildung 56).

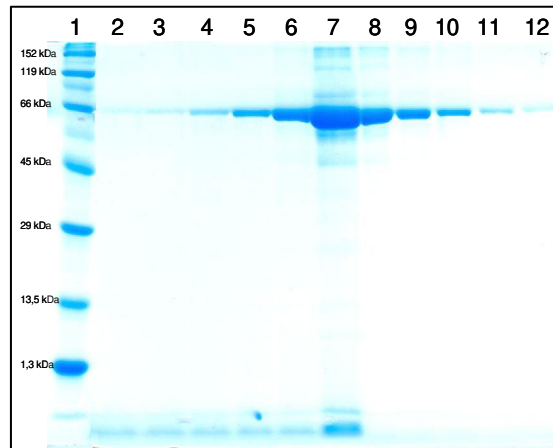


Abbildung 56: Bestimmung der HSA-Konzentration im Rezirkulationsbehälter. 1, Marker; 2, HSA 0,01 mg/ml; 3, HSA 0,02 mg/ml; 4, HSA 0,05 mg/ml; 5, HSA 0,1 mg/ml; 6, HSA 0,2 mg/ml; 7, Beladung $t=0$ min; 8, Beladung $t=10$ min; 9, Beladung $t=20$ min; 10, Beladung $t=30$ min; 11, Beladung $t=40$ min; 12, Beladung $t=45$ min. Methode SDS-PAGE, Gel 12%, Färbung: Coomassie.

Im Laufe der Rezirkulation wurde eine Abnahme der OD von 10% beobachtet. Die optische Dichte der folgenden Waschfraktion betrug 0,5, wobei der Durchlauf am Ende des Waschschrtes optisch klar war (Daten nicht gezeigt). Während der Elution, die wie der Waschschrts im Durchlaufverfahren durchgeführt wurde, zeigte sich ein erneuter Anstieg der optischen Dichte (Abbildung 57, rote Kurve), welche einen ähnlichen Verlauf zeigte, wie die Konzentration der Zielsubstanz (Abbildung 57, schwarze Kurve). Der Elutionspeak hatte einen vergleichsweise flachen Verlauf bei einer ausgeprägten Bandenverbreiterung. Die optische Dichte des gesammelten Eluats betrug 0,5.

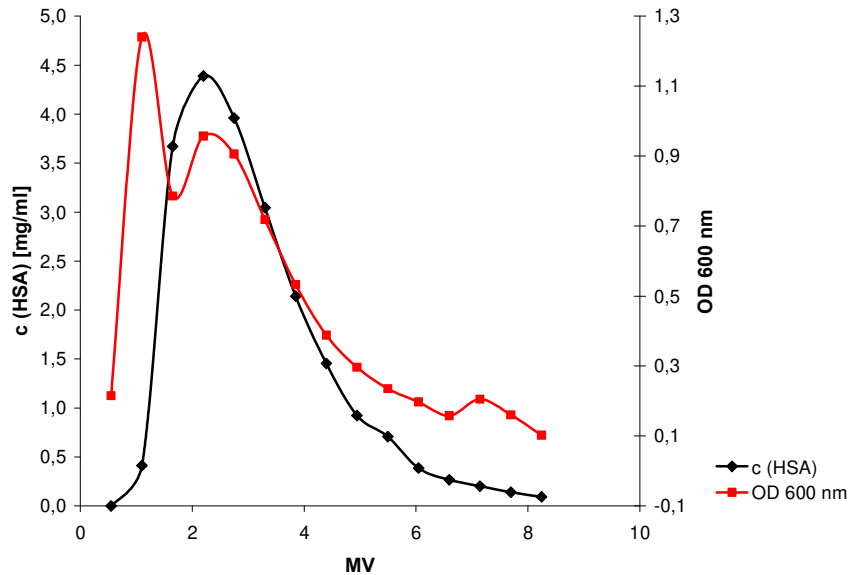


Abbildung 57: Verlauf der HSA-Konzentration und der optischen Dichte während der Elution. c (HSA), HSA-Konzentration am Modulausgang; OD 600 nm, Optische Dichte am Modulausgang; MV, Membranvolumen. Versuchsbedingungen: siehe Tabelle 12; Modulnummer 8046783. Die Bestimmung der HSA-Konzentration im Eluat erfolgte durch Größenausschlusschromatographie (SEC-Säule: Proteema 300; Laufmittel: 50 mM NaPhosphat, 300 mM NaCl, pH 6,6).

Die SEC-Chromatogramme des Eluats zeigten eine deutliche Reduktion der Medienbestandteile gegenüber der Beladungslösung (Beladungslösung siehe Abbildung 55). Dargestellt ist die Elutionsfraktion 4 (Abbildung 58, links) und die Reinsubstanz HSA (Abbildung 58, rechts).

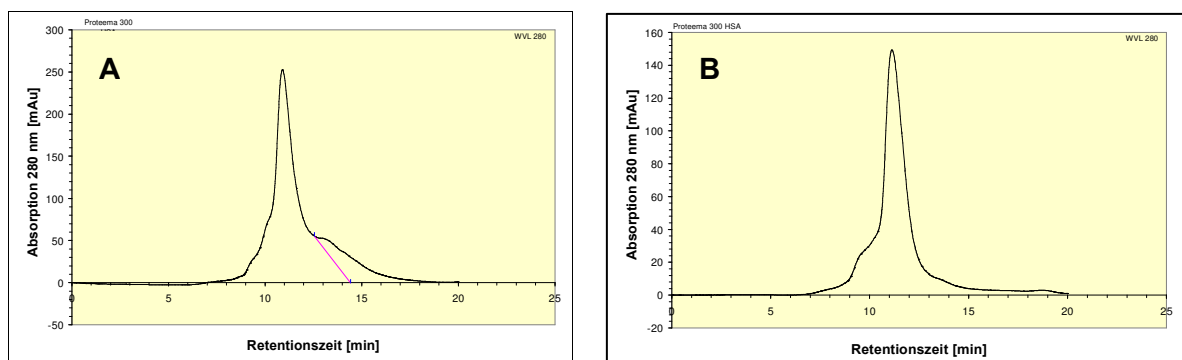


Abbildung 58: (A) HPLC-Chromatogramm der Elutionsfraktion 4; (B) HPLC-Chromatogramm der Reinsubstanz HSA (2 mg/ml). Methode Größenausschlusschromatographie; SEC-Säule: Proteema 300; Laufmittel: 50 mM KPi, 0,3 M NaCl, pH 6,7; Injektionsvolumen: 200 μ l.

Tabelle 13 fasst die erhaltenen Ergebnisse der integrierten Aufreinigung von HSA aus einer *Pichia Pastoris* Kultur zusammen. Der geringe Aufkonzentrationsfaktor von 1,2 hatte seine Ursache in der Bandenverbreiterung des Elutionspeaks (Abbildung 57). Durch ausschließliche Betrachtung der Fraktionen 3 bis 10 ließ sich das Elutionsvolumen um 47% verringern, wodurch der Aufkonzentrationsfaktor auf 2,5 gesteigert werden konnte. Die Ausbeute betrug bei Betrachtung dieser Kernfraktion 78% gegenüber 84% bei Berücksichtigung des Gesamteluats.

Tabelle 13: Zusammenfassung: Aufreinigung von HSA aus *Pichia Pastoris* Kultur mit partikelgängigem Sartobind S Membranadsorber-Modul.

	Gesamteluat	Fraktionen 3 bis 10
c (HSA), Eluat [mg/ml]	1,2	2,1
V, Eluat [ml]	30	16
m (HSA), Eluat [mg]	35,3	32,9
Bindungskapazität [mg/ml]	10,4	9,7
Ausbeute [%]	84	78
Wiederfindung [%]	86	
Aufkonzentrationsfaktor	1,2	2,1
Reinheit [%]		81
Klärungsfaktor [%]	98	98

Auf Basis der Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie konnte eine deutliche Reduktion der Medienbestandteile nachgewiesen werden. Die Reinheit der Kernfraktion des erhaltenen Eluats wurde berechnet, indem die Peak-Fläche von HSA ins Verhältnis zur Gesamtfläche des Elutionspeaks gesetzt wurde und ergab 81%. Der Klärungsfaktor ist ein Maß für die Abnahme der Trübung im Gesamtprozess und wurde berechnet, indem die Trübungsabnahme ins Verhältnis zur Trübung der Startlösung (OD 29) gesetzt wurde. Die Trübung des Eluats betrug 0,5, sowohl für das Gesamteluat als auch für die Kernfraktion, woraus sich ein Klärungsfaktor von 98% ergab.

Die Aufreinigung von rekombinantem HSA (rHSA) aus einer *Pichia Pastoris* Kultur unter Verwendung der Expanded Bed Adsorption wurde von Noda et al [28] beschrieben. Der Prozess lieferte eine Ausbeute von 85% bei einem Aufkonzentrationsfaktor von 2. 16,5 g rHSA konnten in einem Zyklus aus 2,8 Liter einer Zellsuspension unter Verwendung einer Streamline® SP Säule mit einem Adsorbensvolumen von 300 ml aufgereinigt werden, was einer Bindungskapazität von 55 g je ml Adsorbens entspricht.

3.3.3 Integrierte Aufreinigung von GFP-his aus *Escherichia coli* Zelllysaten

Der Vorteil einer schnellen, einfachen Kultivierung gilt auch für bakterielle Expressionssysteme. Der bekannteste Vertreter, *Escherichia coli*, wird auch als „Erste-Wahl Mikroorganismus“ für die Produktion von rekombinanten Proteinen bezeichnet, was, neben der hohen Produktivität, darauf zurückzuführen ist, dass das Darmbakterium gentechnisch sehr gut charakterisiert ist und etablierte Methoden für die gezielte Herstellung rekombinanter Produktionsstämme zur Verfügung stehen [100]. Im Gegensatz zu den erstgenannten Expressionssystemen Hefen und Säugerzellen, sind Bakterien nicht zur posttranslationalen Modifikation befähigt, was ihren Einsatz auf die Herstellung nicht-glykosylierter Proteine und Peptide beschränkt. Die Proteinexpression erfolgt in der Regel intrazellulär, was einen initialen Zellaufschluss erfordert. Die Versuche zur Aufreinigung von GFP (green fluorescent protein) aus *Escherichia coli* Zelllysate wurden von Rahel Bucher, Raphael Berweger und Andrea Moergeli im Rahmen von Diplomarbeiten [109-111] durchgeführt. Es wurde der GFP – exprimierende *Escherichia coli* Stamm JM 109, pKK 233-3 verwendet. Das verwendete Modellprotein GFP verfügt über einen His-tag und ermöglichte damit eine adsorptive Aufreinigung über Metall-Chelat Chromatographie. Aufgrund der Proteinexpression ins Cytoplasma der Zelle war ein initialer Zellaufschluss erforderlich, welcher mittels Ultraschall erfolgte. Mit dem Ziel, die Proteinaufreinigung unabhängig von möglichen Schwankungen im Bereich der Fermentation betrachten zu können, wurde das GFP enthaltende Zelllysate unter Verwendung von Waschpuffer und GFP-freiem Zelllysate in den Versuchen auf eine konstante optische Dichte (Zielwert: OD 18) und eine konstante GFP-his Konzentration (Zielwert: 1 mg/ml) eingestellt. Zur Fermentation GFP-freier Biomasse wurde der E. coli Stamm JM 109, ohne den Vektor für die Herstellung von GFP-his, verwendet. Die Quantifizierung des GFP-his erfolgte über Fluoreszenzmessung. Die Aufnahme einer Adsorptionsisotherme aus geklärtem Zelllysate zeigte eine hohe Affinität von GFP-his an Sartobind IDA – Membranen (IDA = Iminodiacetat), welche in einem vorhergehenden Schritt mit Nickel-Ionen beladen wurden. Die Adsorptionsisotherme nach Langmuir ergab eine maximale Bindungskapazität (q_{\max}) von 49 mg je ml Adsorbens und eine Dissoziationskonstante von 0,04 mg/ml [111]. Im Folgenden wird die integrierte Aufreinigung von GFP-his aus ungeklärtem Zelllysate unter Einsatz von partikelgängigen Membranadsorber-Modulen dargelegt. Der Prozess wurde mit Hilfe von Modulen der Baugröße I (3,2 ml Membranvolumen) entwickelt und im weiteren Verlauf der Arbeiten auf Module der Baugröße II (29 ml Membranvolumen) übertragen. Die Maßstabsübertragung wurde auf Basis der Untersuchungen in Kapitel 3.2.3 durch proportionale Erhöhung von Volumenstrom und Rezirkulationsvolumen zum Adsorbensvolumen durchgeführt. Die Elutionsvolumina (Elution 1 und 2) mussten aufgrund des größeren System-Totvolumens bei der Maßstabsvergrößerung erhöht werden (Tabelle 14).

Tabelle 14: Aufreinigung von GFP-his aus *Escherichia coli* Zelllysaten mit partikelgängigem Sartobind IDA Membranadsorber-Modul – Versuchsbedingungen. Die Versuche erfolgten mit Modulen der Baugröße I und II.

Baugröße	I	II
MV [ml]	3,2	29,0
Beladung (Rezirkulation)		
Volumen [ml]	30	300
Volumenstrom [ml/min]	49	500
Volumenstrom [MV/min]	16	17
Startkonzentration (GFP-his) [mg/ml]	1,03	0,97
Verhältnis Proteinmenge/Adsorbensvolumen [mg/ml]	9,8	10,0
optische Dichte (Start)	18	19
Waschschritt (Durchlauf)		
Waschpuffer: 50 mM Natriumphosphat 300 mM NaCl pH 8,0		
Volumen [ml]	96	980
Volumenstrom [ml/min]	49	500
Volumenstrom [MV/min]	16	17
Elution (Rezirkulation)		
Elutionspuffer: 50 mM Natriumphosphat 300 mM NaCl 750 mM Imidazol pH 8,0		
Volumen [ml]	2 x 10	1 x 160 / 1 x 170
Volumenstrom [ml/min]	49	500
Volumenstrom [MV/min]	16	17

Die GFP-Adsorption war nach einer Rezirkulationsdauer von 40 Minuten für beide untersuchte Baugrößen nahezu vollständig, wobei die Proteinadsorption in beiden Fällen einen sehr ähnlichen zeitlichen Verlauf zeigte. Die Adsorptionseffizienz betrug 98% für die Baugröße I und 99% für die Baugröße II. Im Vergleich zu den vorherigen Applikationen war die Abnahme der optischen Dichte stärker ausgeprägt. Im Laufe der Modulbeladung wurde unter Verwendung des Moduls der Baugröße I eine Abnahme von 18 auf 12,5, festgestellt, was einer Abnahme von 30% entspricht. Bei der Baugröße 29 ml betrug die Abnahme der OD 23% (Abbildung 59).

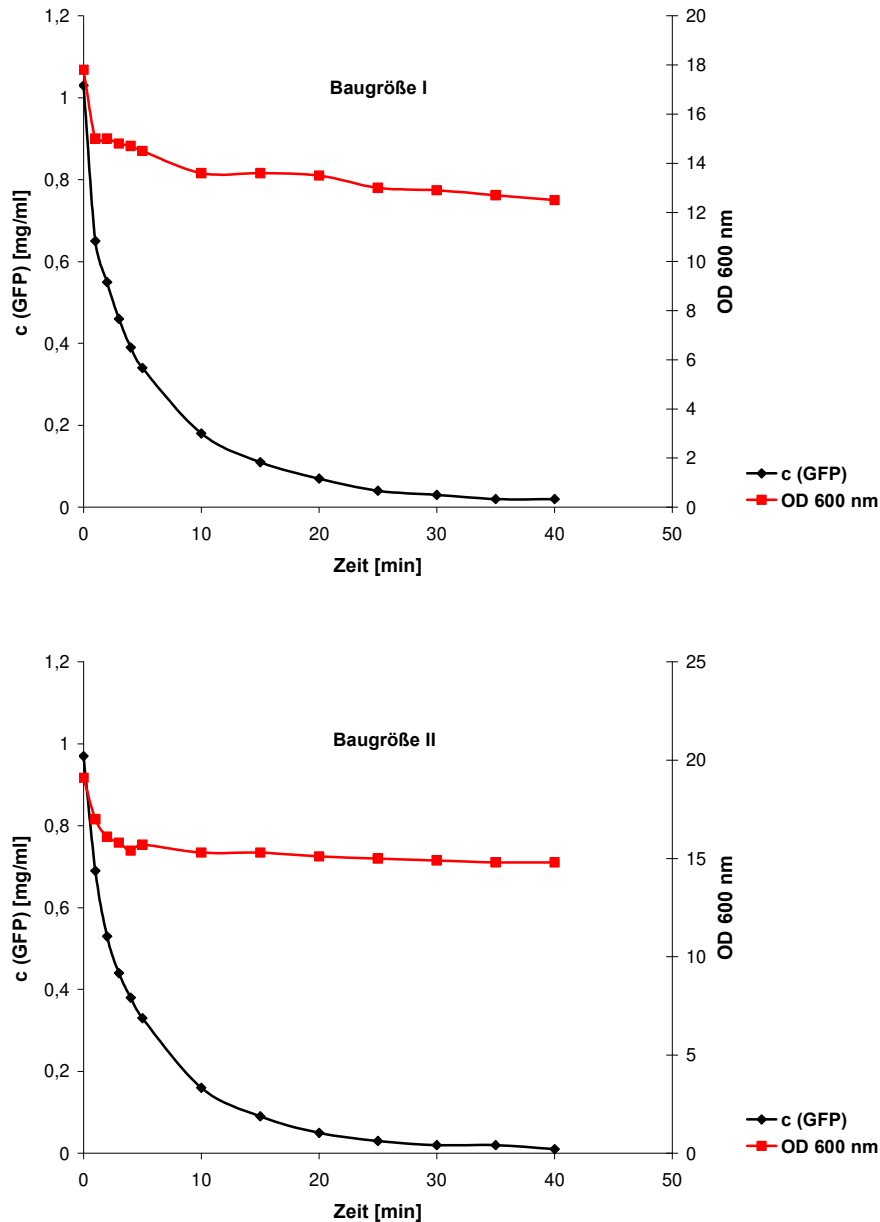


Abbildung 59: Zeitlicher Verlauf der GFP-Konzentration und der optischen Dichte im Rezirkulationsbehälter. Oben, Baugröße I; Unten, Baugröße II. c (GFP), GFP-Konzentration im Rezirkulationsbehälter; OD 600 nm, Optische Dichte im Rezirkulationsbehälter. Versuchsbedingungen: siehe Tabelle 14; Modulnummer 8022083 (Baugröße I); Modulnummer 8025683 (Baugröße II).

Nach erfolgter Beladung im Rezirkulationsverfahren wurden die Module im Durchlaufverfahren gewaschen. Es wurde festgestellt, dass die Trübung nach 60 ml Durchlaufvolumen auf 0,05 abnahm und im weiteren Verlauf des Waschschrittes auf diesem Niveau verblieb (Baugröße I). Ein ähnliches Bild ergab sich für Baugröße II (OD = 0,06 nach 600 ml Waschvolumen).

Die Durchführung der Elution erfolgte im Rezirkulationsverfahren. Die Entscheidung für dieses Verfahren wurde getroffen, da die Elution im Durchlaufverfahren, auch unter Anwendung geringer Flussraten aufgrund ausgeprägter Bandenverbreiterung eine starke Verdünnung des Eluats bewirkte [110]. Die Elution im Rezirkulationsverfahren wurde analog zur Modulbeladung durchgeführt, indem der Elutionspuffer aus dem Rezirkulationsbehälter durch das Modul gefördert wurde, bis sich ein Gleichgewicht zwischen Medium und Adsorbens eingestellt hatte. Nach der Entfernung des Elutionspuffers aus dem Modul wurde mit dem Ziel, die Ausbeute zu erhöhen, eine zweite Elution im Rezirkulationsverfahren unter Einsatz von frischem Elutionspuffer durchgeführt. Abbildung 60 zeigt den Anstieg der GFP-Konzentration im Verlauf der Rezirkulation von Elutionspuffer exemplarisch für die Baugröße I.

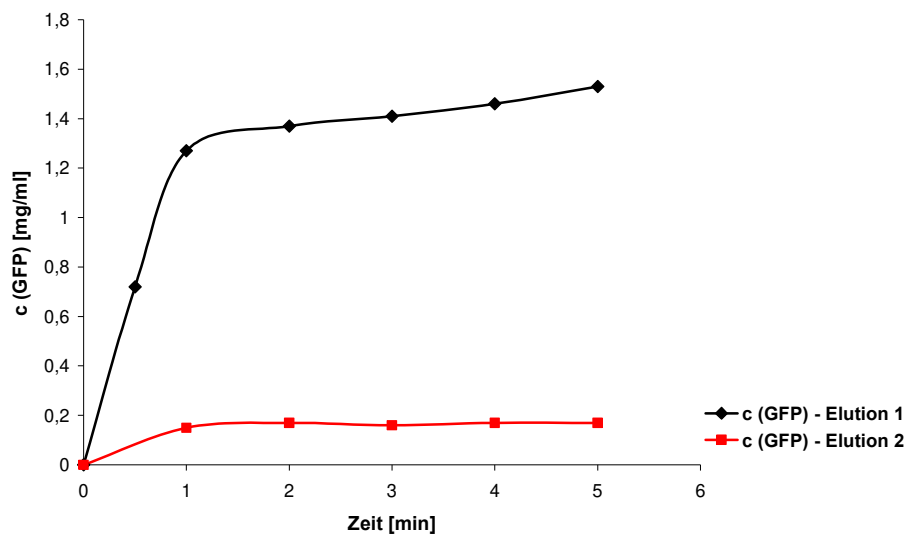


Abbildung 60: Zeitlicher Verlauf der GFP-Konzentration im Rezirkulationsbehälter während der Elution 1 und 2 (Baugröße I). c (GFP), GFP-Konzentration im Rezirkulationsbehälter; Versuchsbedingungen: siehe Tabelle 14; Modulnummer 8022083.

Abbildung 61 gibt einen Eindruck über den Reinigungseffekt, der im Rahmen der integrierten Aufreinigung aus Zelllysate erreicht wurde. Exemplarisch sind die Proben aus der Versuchsreihe der Baugröße I dargestellt. Die im Rahmen der Maßstabsvergrößerung auf Baugröße II erzielte Reinheit war vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Es fällt auf, dass die GFP-Bande (GFP verfügt über ein Molekulargewicht von 26,9 kDa) nach einer Rezirkulationsdauer von 40 Minuten stärker ist, als es die Konzentrationsbestimmung über Fluoreszenzmessung erwarten ließ. Auch Waschfraktion 1 zeigte eine ausgeprägte Bande im Bereich des Molekulargewichts von GFP, obwohl die Menge GFP, die auf das Gel aufgetragen wurde, unterhalb der Nachweisgrenze von Coomassie R-250 (= 0,1 μ g) lag [112]. Die GFP-Konzentration der Waschfraktion betrug gemäß

Fluoreszenzmessung 0,002 mg/ml und ergab bei einem Auftragsvolumen von 10 µl lediglich 0,02 µg. Es wurde angenommen, dass es sich um eine Verunreinigung handelte, welche ein ähnliches Molekulargewicht wie das Produkt GFP-his aufwies [109]. Auf die Angabe der Reinheit wurde aus diesem Grunde in dieser Arbeit verzichtet.

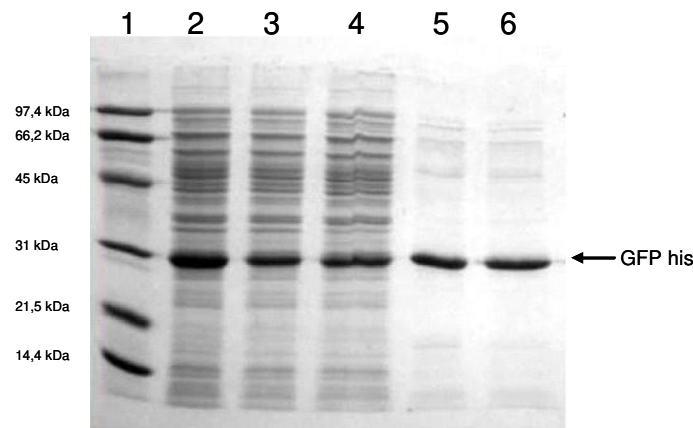


Abbildung 61: SDS-PAGE der Prozess-Fractionen. 1, Marker, 2, Beladung t=0 min; 3, Beladung t=40 min; 4, Waschfraktion 1; 5, Elution 1; 6, Elution 2. Methode SDS-PAGE, Gel 12%, reduzierende Bedingungen, Färbung: Coomassie Brilliant Blue R-250.

Tabelle 15: Zusammenfassung: Aufreinigung von GFP-his aus *Escherichia coli* Zelllysaten mit partikelgängigem Sartobind IDA Membranadsorber-Modul.

Baugröße	I		II	
	Elutionsfraktion 1	Gesamteluat	Elutionsfraktion 1	Gesamteluat
c (GFP), Eluat [mg/ml]	2,0	1,2	1,5	0,8
V, Eluat [ml]	10	20	160	330
m (GFP), Eluat [mg]	19,8	24,6	245	274
Bindungskapazität [mg/ml]	6,2	7,7	8,4	9,4
Ausbeute [%]	64	80	84	94
Wiederfindung [%]		82		95
Aufkonzentrationsfaktor	1,9	1,2	1,6	0,9
Klärungsfaktor [%]	97	98	98	99

Der Versuch der integrierten Proteinaufreinigung von GFP-his aus *Escherichia coli* Zelllysaten unter Einsatz des entwickelten Moduls zeigt die grundsätzliche Machbarkeit des Verfahrens an. Ein weitgehend geklärtes Eluat wurde bei einer Ausbeute von 80% unter Verwendung des Moduls der Baugröße I erhalten (Tabelle 15). Die Maßstabsübertragung um den Faktor 9 zeigte einen ähnlichen zeitlichen Verlauf der GFP-Konzentration während der Modulbeladung und eine vergleichbare Adsorptionseffizienz beider Baugrößen (Abbildung 59). Aufgrund des großen Anlagen-Totvolumens bei Baugröße II musste das Elutionsvolumen überproportional zum

Adsorbensvolumen erhöht werden, woraus ein geringerer Aufkonzentrierungsfaktor resultierte. Gleichzeitig wurde für diese Baugröße eine Steigerung der Ausbeute auf 94% festgestellt (Tabelle 15). Der Zusammenhang zwischen Elutionsvolumen, Ausbeute und Aufkonzentrierungsfaktor für eine Elution im Rezirkulationsverfahren, der darin besteht, dass höhere Volumina zu höheren Ausbeuten und geringerer Aufkonzentrierung führen, wurde in Kapitel 3.2.2 erläutert und lässt sich gut mit den gefundenen Ergebnissen in Einklang bringen.

Die Limitierungen der vorgestellten Applikation bestehen zum einen im bereits genannten Aufkonzentrierungsfaktor, der auch bei alleiniger Betrachtung der ersten, stärker konzentrierten Elutionsfraktion unterhalb von 2 lag. Zum anderen wurde auch bei dieser Applikation ein signifikanter Biomasse-Rückhalt während der Modulbeladung festgestellt.

Fazit Applikationen

Die integrierte Proteinaufreinigung aus partikelhaltigen Medien unter Verwendung von partikelgängigen Membranadsorber-Modulen wurde anhand von drei Modellsystemen bewertet. Die Machbarkeit des Verfahrens konnte unter Anwendung der entwickelten Module gezeigt werden.

Verbesserungspotential besteht zum einen in einer Reduktion des Biomasserückhalts, wodurch eine weitere Verbesserung des Klärungsfaktors erreicht werden kann. Zum anderen wurde gezeigt, dass eines der Ziele der integrierten Proteinaufreinigung, die Aufkonzentrierung der Zielsubstanz, nur teilweise erreicht werden konnte.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die integrierte Aufarbeitung von Bioprozessmedien eröffnet neue Möglichkeiten bei der Herstellung pharmazeutischer Wirkstoffe. Durch Zusammenfassung der ersten Schritte innerhalb eines Aufreinigungsschemas besteht die Möglichkeit, die Produktausbeute zu erhöhen und die Prozesszeit und die Prozesskosten zu senken.

In dieser Arbeit wurde ein Membranadsorber-Modul entwickelt, das die integrierte Aufarbeitung partikelhaltiger Bioprozessmedien ermöglicht. Zunächst wurde der Einfluss einzelner Komponenten des Moduls beleuchtet. Die Untersuchung verschiedener Membranen, die aufgrund ihres unterschiedlichen Pfropfgrades deutliche Unterschiede hinsichtlich der statischen Bindungskapazität aufwiesen, zeigte, dass sich eine erhöhte Bindungskapazität der Membran positiv auf die Adsorptionseffizienz auswirkte, die unter Verwendung entsprechender Module im Prozess erreicht werden konnte. Die Strömungsführung im Modul, welche eine Überströmung der Membran vorsieht, führt zu einer Entkopplung der Modulpermeabilität von der Membranpermeabilität, woraus geschlossen wurde, dass der Einsatz stark gepfropfter Membranen mit hoher Bindungskapazität im entwickelten Modul möglich ist. Die Untersuchung verschiedener Abstandshalter ergab, dass die Verwendung flacher Abstandshalter die Adsorption der Zielsubstanz an der adsorptiven Membran begünstigt. Die Struktur des Abstandshalters trägt darüber hinaus zum Stoffaustausch zwischen Membran und Strömungskanal bei, wobei festgestellt wurde, dass die Struktur besonders unter Anwendung geringer Volumenströme, wie sie bei der Elution angewendet wurden, einen signifikanten Einfluss hatte. Hinsichtlich der Partikelgängigkeit von Abstandshaltern wurde festgestellt, dass die Stege eines extrudierten Abstandshalters potentielle Hindernisse darstellen und bei geringer Höhe des Abstandshalters zu einem vermehrten Biomasse-Rückhalt führen. Überraschenderweise wurde festgestellt, dass Vliese, die beim Aufbau von Filterkerzen als Drainagematerial zwischen den Plissierungen einer Membran Verwendung finden, als Abstandshalter im untersuchten Modul eine geringe Tendenz zur Rückhaltung von Biomasse aufwiesen. Darüber hinaus zeigte der Einsatz dieses Materials eine hohe Adsorptionsgeschwindigkeit und ein schmales Elutionsprofil, was der Zielsetzung des Prozesses entspricht. Einzig der vergleichsweise hohe Druckabfall bei Modulen, die unter Verwendung des Vlies-Abstandshalters aufgebaut wurden, wurde als nachteilig bewertet. Die Geometrie des untersuchten Moduls, sowie die Integration von Verteilerplatten am Modulein- und Ausgang zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Modul-Leistung.

Untersuchungen zur Betriebsweise der entwickelten Module zeigten, dass die Adsorption der Zielsubstanz am effektivsten erfolgt, wenn das Prinzip der Rezirkulation angewendet wird, bei dem das Medium im Kreislauf durch das Modul gefördert wird. Es wurde gezeigt, dass die Adsorptionsgeschwindigkeit bei diesem Verfahren proportional zum angewendeten Volumenstrom ist,

wobei die Anzahl der Passagen über den Grad der Adsorption entscheidet. Die Modulbeladung im Rezirkulationsverfahren sollte daher bei hohen Volumenströmen erfolgen, um eine hohe Produktivität des Prozesses zu gewährleisten. Die Adsorption im Rezirkulationsverfahren ist mit einer Batch-Adsorption vergleichbar, da, ein ausreichend hoher Volumenstrom vorausgesetzt, die Konzentration des Mediums und der Beladungszustand des Adsorbens keine lokalen Unterschiede aufweisen. Es wurde dargelegt, dass die Gesetzmäßigkeiten der Batch-Adsorption für die Modul-Beladung im Rezirkulationsverfahren gelten. Die alleinige Kenntnis der Isothermenparameter ermöglichte die Berechnung der Adsorptionseffizienz in guter Näherung zu den experimentell bestimmten Werten. Die Aufnahme von Adsorptionisothermen sollte ein fester Bestandteil bei der Prozessentwicklung von Adsorptionsschritten im Rezirkulationsverfahren sein, da ihre Kenntnis bei der Auslegung von Prozessen, beispielsweise zur Berechnung der erforderlichen Adsorbens-Menge, notwendig ist.

Als Alternative zum Rezirkulationsverfahren wurde das Durchlaufverfahren untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Anwendung dieses Verfahrens bei der Modulbeladung zu einer geringeren Adsorptionseffizienz führte. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass bei einer Passage des Mediums durch das Modul nur ein Teil des Medium in Wechselwirkung mit den funktionellen Gruppen der Membran tritt, weshalb ein Teil der Zielsubstanz nicht adsorbiert und am Modulausgang detektiert wird. Durch Reduktion des Volumenstromes im Durchlaufverfahren konnte die Adsorptionseffizienz gesteigert werden, allerdings bei gleichzeitigen Einbußen hinsichtlich der Produktivität. Unter Berücksichtigung der Prozessparameter Adsorptionseffizienz und Produktivität wurde gezeigt, dass das Rezirkulationsverfahren beim Betrieb von partikelgängigen Membranadsorber-Modulen dem Durchlaufverfahren vorzuziehen ist.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde gezeigt, dass sich beide Verfahren auch auf die Durchführung der Elution anwenden lassen. Die Zielsetzung besteht hier in der Realisierung möglichst kleiner Elutionsvolumen bei hoher Ausbeute der Zielsubstanz. Das Verhältnis des Elutionsvolumens zum Volumen der Startlösung entscheidet bei gegebener Ausbeute über den Grad der Aufkonzentrierung (Aufkonzentrierungsfaktor), der im Laufe der Aufarbeitung erzielt wird. Das Erreichen eines hohen Aufkonzentrierungsfaktors ist ein wichtiges Ziel der integrierten Proteinaufreinigung. Ein Vergleich der beiden Verfahren zeigte, dass unter Verwendung des Durchlaufverfahrens ein höherer Aufkonzentrierungsfaktor bei vergleichbarer Ausbeute der Zielsubstanz gegenüber dem Rezirkulationsverfahren erreicht werden konnte.

Die Durchführung von Waschschritten, die bei der integrierten chromatographischen Aufarbeitung aus partikelhaltigen Medien die Entfernung von Zellen, Zellinhaltsstoffen und Zellbruchstücken beinhaltet, erfolgte alleinig im Durchlaufverfahren. Es wurde erkannt, dass die Umkehrung der Flussrichtung in Kombination mit einer Erhöhung des Volumenstromes dazu beiträgt, Partikel, die während der Beladung vom Modul zurückgehalten wurden, aus dem Modul zu entfernen, wodurch die Qualität des Eluates hinsichtlich der Trübung verbessert werden konnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Baugrößen partikelgängiger Membranadsorber-Module entwickelt. Die Modul-Leistung hinsichtlich der Adsorptionsgeschwindigkeit, des erreichbaren Aufkonzentrationsfaktors und der Partikelgängigkeit der drei Baugrößen wurde verglichen. Die Betriebsparameter Volumenstrom und Beladungsvolumen wurden unter Verwendung des gleichen Mediums und der gleichen Puffer proportional zum verwendeten Adsorbensvolumen erhöht. Es wurde erkannt, dass die Module der Baugröße I (ca. 3 ml Membranvolumen) die Leistung der größeren Module II und III (25 und 300 ml Membranvolumen) nur eingeschränkt wiedergaben. Neben einer geringeren Adsorptionsgeschwindigkeit wurde für diese Baugröße ein breiteres Elutionsprofil gemessen. Insgesamt nahm die Leistung bei der Maßstabsübertragung hinsichtlich der Adsorptionsgeschwindigkeit und des Aufkonzentrationsfaktors mit der Modul-Größe zu.

Die Funktionalität der entwickelten Module wurde abschließend anhand von Applikationsbeispielen untersucht, die die integrierte Aufreinigung von Proteinen aus unterschiedlichen Bioprozessmedien umfassten. Die Gewinnung einer klaren, zellfreien Fraktion entsprach bei der Aufreinigung von Immunglobulin G aus einer Hybridomzellkultur der Zielsetzung. Bei der Aufreinigung von GFP aus *Escherichia coli* Zellysate und der Aufreinigung von HSA aus einer *Pichia Pastoris* Kultur konnte dagegen keine vollständige Klärung der Elutions-Fraktion erreicht werden. Die Trübung des Eluates wies in beiden Fällen eine Reduktion von 98% gegenüber der Startlösung auf. Ein Reinigungseffekt wurde in allen Applikationsbeispielen gezeigt. Eine Aufkonzentrierung unter Einsatz des partikelgängigen Membranadsorber-Moduls konnte dagegen nur unter Tolerierung von Ausbeuteverlusten bei Betrachtung einer Kernfraktion erreicht werden. Die gemessenen Bindungskapazitäten lagen im Falle der Aufarbeitung von Immunglobulin G und HSA jeweils deutlich unter den gefundenen Literaturwerten für vergleichbare Expanded Bed Adsorptionsverfahren. Die verwendeten Membranen, die im Rahmen der Untersuchungen von Applikationen Verwendung fanden, waren für einen Einsatz in partikelgängigen Membranadsorber-Modulen nicht optimiert.

Eine Möglichkeit zur Weiterentwicklung der beschriebenen Module besteht im Einsatz maßgeschneiderter Membranen. Die Steigerung der Bindungskapazität über einen erhöhten Pflopfgrad stellt hierbei eine Möglichkeit dar. Ein neuer Ansatz, der in der Erhöhung der Bindungskapazität durch Steigerung der spezifischen Oberfläche aufgrund der Ausbildung einer sekundären Porenstruktur besteht, ist Gegenstand aktueller Entwicklungen. Der Einsatz solcher Membranen erscheint für den Einsatz in partikelgängigen Membranadsorber-Modulen sinnvoll. Neben der Membranstruktur besteht auch durch Auswahl maßgeschneiderter Membran-Funktionalitäten die Möglichkeit, die Modul-Leistung zu erhöhen. Im Hinblick auf die Anwendung des Moduls auf die integrierte Aufarbeitung von Bioprozessmedien ist der Einsatz sog. salztoleranter Ionenaustauscher viel versprechend, weil die genannten Medien aufgrund der vorherrschenden Salzkonzentration bei konventionellen Ionenaustauscher-Funktionen eine Herabsetzung der Bindungskapazität bewirken.

Die Entwicklung von Prototypen mit einem Adsorbensvolumen, welches die Bearbeitung partikelhaltiger Medien im Prozessmaßstab erlaubt, wird in Kürze gestartet. Die Realisierung eines Gesamtmembranvolumens von 20 Litern je Modul erscheint technisch machbar.

Literaturverzeichnis

- [1] **Melmer, G.** *Biopharmaceuticals and the industrial Environment* in G. Gellissen (Hg.), *Production of Recombinant Proteins. Novel Microbial and Eucaryotic Systems* (Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2005)
- [2] **Pavlou, A. K., Reichert, J. M.** (2004) Recombinant protein therapeutics - success rates, market trends and values to 2010 *Nat Biotechnol* 22 (12): 1513.
- [3] **Morrow, K. J.** (2009) Overcoming Protein Production Hurdles *Genetic Engineering & Biotechnology News*, Vol. 29.
- [4] **Wurm, F.** (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells *Nature Biotechnol.* 22 (11): 1393.
- [5] **Arunakumari, A.**, Process analysis to identify and alleviate CMO facility constrains to scale up humab manufacturing processes, presented at *Bioprocess International European Conference*, Düsseldorf, 2009.
- [6] **Arvidsson, P., Plieva, F. M., Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Mattiasson, B.** (2003) Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent *J Chromatogr A* 986 (2): 275.
- [7] **Hubbuch, J., Kula, M. R.** (2007) Isolation and Purification of Biotechnological Products *J. Non-Equili. Thermodyn.* 32 99.
- [8] **Schugerl, K., Hubbuch, J.** (2005) Integrated bioprocesses *Curr Opin Microbiol* 8 (3): 294.
- [9] **Vogel, J. H., Anspach, B., Kroner, K. H., Piret, J. M., Haynes, C. A.** (2002) Controlled shear affinity filtration (CSAF): a new technology for integration of cell separation and protein isolation from mammalian cell cultures *Biotechnol Bioeng* 78 (7): 806.
- [10] **Curling, J.** (2007) Process Chromatography: Five Decades of Innovation *BioPharm Int.* 20 (10): 10.
- [11] **Langer, E., Ranck, J.** (2006) Capacity Bottleneck squeezes by downstream processes *BioProcess Int.* 4 (3): 14.
- [12] **Sommerfeld, S., Strube, J.** (2005) Challenges in biotechnology production: Generic process and process optimization for monoclonal antibodies *Chem. Eng. Process* 44 1123.
- [13] **Ameskamp, N., Priesner, C., Lehmann, J., Lutkemeyer, D.** (1999) Pilot scale recovery of monoclonal antibodies by expanded bed ion exchange adsorption *Bioseparation* 8 (1-5): 169.
- [14] **Pertrides, D.** *Bioprocess design and economics* in H. RG (Hg.), *Bioseparations Science and Engineering* (Oxford University Press, New York, 2003)
- [15] **Hubbuch, J. J., Thomas, O. R.** (2002) High-gradient magnetic affinity separation of trypsin from porcine pancreatin *Biotechnol Bioeng* 79 (3): 301.
- [16] **Hubbuch, J., Thommes, J., Kula, M. R.** (2005) Biochemical engineering aspects of expanded bed adsorption *Adv Biochem Eng Biotechnol* 92 101.

-
- [17] **Chase, H. A., Draeger, N. M.** (1992) Affinity purification of proteins using expanded beds *J Chromatogr* 597 (1-2): 129.
- [18] **Draeger, N. M., Chase, H. A.** (1991) Liquid fluidized bed adsorption of protein in the presence of cells *Bioseparation* 2 (2): 67.
- [19] **Griffith, C. M., Morris, J., Robichaud, M., Annen, M. J., McCormick, A. V., Flickinger, M. C.** (1997) Fluidization characteristics of and protein adsorption on fluoride-modified porous zirconium oxide particles *J Chromatogr A* 776 (2): 179.
- [20] **Finette, G. M., Mao, Q. M., Hearn, M. T.** (1996) Studies on the expansion characteristics of fluidized beds with silica-based adsorbents used in protein purification *J Chromatogr A* 743 (1): 57.
- [21] **Mullick, A., Flickinger, M. C.** (1999) Expanded bed adsorption of human serum albumin from very dense *Saccharomyces cerevisiae* suspensions on fluoride-modified zirconia *Biotechnol Bioeng* 65 (3): 282.
- [22] **Karau, A., Benken, C., Thommes, J., Kula, M. R.** (1997) The influence of particle size distribution and operating conditions on the adsorption performance in fluidized beds *Biotechnol Bioeng* 55 (1): 54.
- [23] **Thommes, J.** (1997) Fluidized bed adsorption as a primary recovery step in protein purification *Adv Biochem Eng Biotechnol* 58 185.
- [24] **De Luca, L., Hellenbroich, D., Titchener-Hooker, N. J., Chase, H. A.** (1994) A study of the expansion characteristics and transient behaviour of expanded beds of adsorbent particles suitable for bioseparations *Bioseparation* 4 311.
- [25] **Feuser, J., Walter, J., Kula, M. R., Thommes, J.** (1999) Cell/adsorbent interactions in expanded bed adsorption of proteins *Bioseparation* 8 (1-5): 99.
- [26] **Hubbich, J. J., Heeboll-Nielsen, A., Hobley, T. J., Thomas, O. R.** (2002) A new fluid distribution system for scale-flexible expanded bed adsorption *Biotechnol Bioeng* 78 (1): 35.
- [27] **Lee, Y., Suh, C., Park, S., Lee, E.** (2003) Purification of soluble human epidermal growth factor (hEGF) from recombinant *Escherichia coli* culture broth by using expanded-bed adsorption chromatography. *Biotechnol Appl Biochem.* 38 (1): 9.
- [28] **Noda, M., Sumi, A., Ohmura, T., Yokoyama, K.,** EP 0699687A2, 1996.
- [29] **Chang, Y. K., Chase, H. A.** (1996) Ion exchange purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates using expanded bed adsorption *Biotechnol Bioeng* 49 (2): 204.
- [30] **Batt, B., Yabannavar, V., Singh, V.** (1995) Expanded bed adsorption process for protein recovery from whole mammalian cell culture broth. *Bioseparation* 5 (1): 41.
- [31] **Thommes, J., Bader, A., Halfar, M., Karau, A., Kula, M. R.** (1996) Isolation of monoclonal antibodies from cell containing hybridoma broth using a protein A coated adsorbent in expanded beds *J Chromatogr A* 752 (1-2): 111.
- [32] **Thommes, J., Halfar, M., Gieren, H., Curvers, S., Takors, R., Brunschier, R., Kula, M. R.** (2001) Human chymotrypsinogen B production from *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 2. Protein recovery *Biotechnol Prog* 17 (3): 503.

- [33] **Hubbich, J. J., Matthiesen, D. B., Hobley, T. J., Thomas, O. R.** (2001) High gradient magnetic separation versus expanded bed adsorption: a first principle comparison *Bioseparation* 10 (1-3): 99.
- [34] **Hanora, A., Savina, I., Plieva, F. M., Izumrudov, V. A., Mattiasson, B., Galaev, I. Y.** (2006) Direct capture of plasmid DNA from non-clarified bacterial lysate using polycation-grafted monoliths *J Biotechnol* 123 (3): 343.
- [35] **Dainiak, M., Kumar, A., Plieva, F., Galaev, I., Mattiasson, B.** (2004) Integrated isolation of antibody fragments from microbial cell culture fluids using supermacroporous cryogels. 1045 (1-2): 93.
- [36] **Hustedt, H., Kroner, K. H., Kula, M. R.** *Application of phase partitioning in biotechnology* in H. Walter, D. E. Brooks, D. Fisher (Hg.), Partitioning in Aqueous Two Phase Systems, Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology New York, 1985)
- [37] **Selber, K., Collen, A., Hyytia, T., Penttila, M., Tjerneld, F., Kula, M. R.** (2001) Parameters influencing protein extraction for whole broths in detergent based aqueous two-phase systems *Bioseparation* 10 (4-5): 229.
- [38] **Papamichael, N., H., H.** (1994) Enzyme recovery by continuous crosscurrent extraction *Methods Enzymol.* 228 573.
- [39] **Loebenstein, W. V.** (1962) Batch Adsorption From Solution *J. Res. Natl. Bur. Stand.* 66A (6):
- [40] **Levison, P. R., Hopkins, A. K., Hathi, P., Badger, S. E., Mann, F., Dickson, N., Purdom, G.** (2000) Suspended bed chromatography, a new approach in downstream processing *J Chromatogr A* 890 (1): 45.
- [41] **Sridhar, P.** (1996) Modelling of affinity separation by batch and fixed bed adsorption : a comparative study *Chem. Eng. Technol.* 19 357.
- [42] **O'Shannessy, K., Scoble, J., Scopes, R. K.** (1996) A simple and economical procedure for purification of muscle lactate dehydrogenase by batch dye-ligand adsorption *Bioseparation* 6 (2): 77.
- [43] **Levison, P. R.** *Techniques in Process-Scale Ion-Exchange Chromatography* in G. Ganetsos, P. E. Barker (Hg.), Preparative and Production scale Chromatography 1993)
- [44] **Arnold, F. H., Blanch, H. W., Wilke, C. R.** (1985) Analysis of affinity separations : I: Predicting the performance of affinity adsorbers *Chem. Eng. J.* 30 (2): B9.
- [45] **Chase, H. A.** (1984) Prediction of the performance of preparative affinity chromatography *J Chromatogr* 297 179.
- [46] **Xiao-Dong, T., Bo, X., Yan, S.** (2001) A Novel Magnetic Affinity Support for Protein Adsorption and Purification *Biotechnol. Prog.* 17 134.
- [47] **O'Brien, S. M., Thomas, O. R., Dunnill, P.** (1996) Non-porous magnetic chelator supports for protein recovery by immobilised metal affinity adsorption *J Biotechnol* 50 13.
- [48] **Halling, P. J., Dunnill, P.** (1979) Improved nonporous magnetic supports for immobilized enzymes *Biotechnol Bioeng* 21 (3): 393.
- [49] **Kappler, T., Cerff, M., Ottow, K., Hobley, T., Posten, C.** (2009) In situ magnetic separation for extracellular protein production *Biotechnol Bioeng* 102 (2): 535.

- [50] **Franzreb, M., Siemann-Herzberg, M., Hobley, T. J., Thomas, O. R.** (2006) Protein purification using magnetic adsorbent particles *Appl Microbiol Biotechnol* 70 (5): 505.
- [51] **Banert, T., Peuker, U. A.** (2007) Synthesis of magnetic beads for bio-separation using the solution method *Chem. Eng. Commun.* 194 (6): 707.
- [52] **Kappler, T. E., Hickstein, B., Peuker, U. A., Posten, C.** (2008) Characterization of magnetic ion-exchange composites for protein separation from biosuspensions *J Biosci Bioeng* 105 (6): 579.
- [53] **Quinones-Garcia, I., Rayner, I., Levison, P. R., Dickson, N., Purdom, G.** (2001) Performance comparison of suspended bed and batch contactor chromatography *J Chromatogr A* 908 (1-2): 169.
- [54] **Ling, T. C., Lyddiatt, A., Carmichael, I., Purdom, G., Hathi, P., Levison, P. R.** (2003) Direct enzyme adsorption from an unclarified microbial feedstock using suspended bed chromatography *J Chromatogr A* 989 (1): 109.
- [55] **Ling, T. C., Lyddiatt, A.** (2005) Process intensification of fluidized bed dye-ligand adsorption of G3PDH from unclarified disrupted yeast: a case study of the performance of a high-density steel-agarose pellicular adsorbent *Protein Expr Purif* 42 (1): 160.
- [56] **Hou, K., Mandaro, R.** (1986) Bioseparation by ion exchange cartridge chromatography *BioTechniques* 4 (4): 358.
- [57] **Walter, J. K.** *Strategies and Considerations for Advanced Economy in Downstream Processing of Biopharmaceutical Proteins* in G. Subramanian (Hg.), Bioseparation and Bioprocessing (Wiley-VCH, Weinheim, 1998)
- [58] **Dancette, O. P., Taboureau, J. L., Tournier, E., Charcosset, C., Blond, P.** (1999) Purification of immunoglobulins G by protein A/G affinity membrane chromatography *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 723 (1-2): 61.
- [59] **Knudsen, H. L., Fahrner, R. L., Xu, Y., Norling, L. A., Blank, G. S.** (2001) Membrane ion-exchange chromatography for process-scale antibody purification *J Chromatogr A* 907 (1-2): 145.
- [60] **Ghosh, R.** (2002) Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges *J Chromatogr A* 952 (1-2): 13.
- [61] **Gottschalk, U., Fischer-Fruehholz, S., Reif, O.** (2004) Membrane Adsorbers: A cutting-Edge Process Technology at the Threshold *BioProcess Int.* 2 56.
- [62] **Curtis, S., Lee, K., Blank, G. S., Brorson, K., Xu, Y.** (2003) Generic/matrix evaluation of SV40 clearance by anion exchange chromatography in flow-through mode *Biotechnol Bioeng* 84 (2): 179.
- [63] **Phillips, M., Cormier, J., Ferrence, J., Dowd, C., Kiss, R., Lutz, H., Carter, J.** (2005) Performance of a membrane adsorber for trace impurity removal in biotechnology manufacturing *J Chromatogr A* 1078 (1-2): 74.
- [64] **Zhou, J. X., Solamo, F., Hong, T., Shearer, M., Tressel, T.** (2008) Viral clearance using disposable systems in monoclonal antibody commercial downstream processing *Biotechnol Bioeng* 100 (3): 488.

- [65] **Zhou, J. X., Tressel, T., Gottschalk, U., Solamo, F., Pastor, A., Dermawan, S., Hong, T., Reif, O., Mora, J., Hutchison, F., Murphy, M.** (2006) New Q membrane scale-down model for process-scale antibody purification *J Chromatogr A* 1134 (1-2): 66.
- [66] **Zhou, J. X., Tressel, T., Yang, X., Seewoester, T.** (2008) Implementation of advanced technologies in commercial monoclonal antibody production *Biotechnol J* 3 (9-10): 1185.
- [67] **Karlsson, E., Rydénand, L., Brewer, J.** *Ion Exchange Chromatography* in J. C. Janson, L. Rydén (Hg.), Protein Purification, Principles (VCH, Weinheim, 1989)
- [68] **Thommes, J., Etzel, M.** (2007) Alternatives to chromatographic separations *Biotechnol Prog* 23 (1): 42.
- [69] **Gebauer, K. H., Thommes, J., Kula, M. R.** (1996) Breakthrough performance of high-capacity membrane adsorbents in protein chromatography *Chem. Eng. Sci.* 52 (3): 405.
- [70] **Gebauer, K. H., Thommes, J., Kula, M. R.** (1997) Plasma protein fractionation with advanced membrane adsorbents *Biotechnol Bioeng* 54 (2): 181.
- [71] **Tsuneda, S., Shinano, H., Saito, K., Furusaki, S., Sugo, T.** (1994) Binding of lysozyme onto a cation-exchange microporous membrane containing tentacle-type grafted polymer branches *Biotechnol Prog* 10 (1): 76.
- [72] **Vogel, J.** Industrial Scale Membrane-Chromatography for rapid capture of complex protein drugs from continuous perfusion culture, presented at *Recovery of Biological Products 13*, Quebec, Canada 2008.
- [73] **Opitz, L., Lehmann, S., Reichl, U., Wolff, M. W.** (2009) Sulfated membrane adsorbents for economic pseudo-affinity capture of influenza virus particles *Biotechnol Bioeng* 103 (6): 1144.
- [74] **Krause, S., Kroner, K. H., Deckwer, W. D.** (1991) Comparison of Affinity Membranes and conventional Affinity Matrices with regard to Protein Purification *Biotechnology Techniques* 5 (3): 199.
- [75] **Kroner, K. H.** *Cross-Flow Applications of Affinity Membranes* in J. G. Crespo, K. W. Böddeker (Hg.), Membrane Processes in Separation and Purification (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994)
- [76] **Weissenborn, M., Hutter, B., Singh, M., Beeskow, T. C., Anspach, F. B.** (1997) A study of combined filtration and adsorption on nylon-based dye-affinity membranes: separation of recombinant L-alanine dehydrogenase from crude fermentation broth *Biotechnol Appl Biochem* 25 (Pt 2) 159.
- [77] **Murkes, J., Carlsson, C.** *Crossflow filtration: Theory and practise* in (Hg.), (John Wiley & Sons Ltd, New York, 1988)
- [78] **Vogel, J. H., Kroner, K. H.** (1999) Controlled shear filtration: A novel technique for animal cell separation *Biotechnol Bioeng* 63 (6): 663.
- [79] **Nußbaumer, D., Demmer, W.** Verfahren und Vorrichtung zur adsorptiven Stofftrennung *Patent DE10236664*, 2002.
- [80] **Rautenbach, R.** *Membranverfahren* (Springer-Verlag, Berlin, 1997)
- [81] **Schwinge, J., Neal, P. R., Wiley, D. E., Fletcher, D. F., Fane, A. G.** (2004) Spiral wound modules and spacers: Review and analysis *Journal of Membrane Science* 242 129.

-
- [82] **Yuan, Q. S., Rosenfeld, A., Root, T. W., Klingenberg, D. J., Lightfoot, E. N.** (1999) Flow distribution in chromatographic columns *J. Chrom. A* 831 149.
- [83] **Gebauer, K. H., Luo, X. L., Barton, N. G., Stokes, A. N.** (2003) Efficiency of preparative and process column distribution systems *J Chromatogr A* 1006 (1-2): 45.
- [84] **Kearney, M.** (1999) Control of Fluid Dynamics with Engineered Fractals - Adsorption Process Applications *Chem. Eng. Commun.* 173 43.
- [85] **Pelz, P. F., Spurk, J. H., Mueller, H. D. J.** (1998) Reducing Mixing at the Outlet Bore of a Cylinder *Archive of Applied Mechanics* 395.
- [86] **Ang, W. S., Elimelech, M.** (2007) Protein (BSA) fouling of reverse osmosis membranes: Implications for wastewater reclamation *J. Membrane Sci.* 296 83.
- [87] **Ma, Y. H.** *Adsorption Phenomina in Membrane Systems* in A. J. Burggraaf, L. Cot (Hg.), *Fundamentals of inorganic membrane science and technology* (Elsevier, Amsterdam, New York, 1996)
- [88] **Langmuir, I.** (1916) The constitution and fundamental properties of solids and liquids. part i. solids *J. Am. Chem. Soc.* 38 2221.
- [89] **Tatarova, I., Faber, R., Denoyel, R., Polakovic, M.** (2009) Characterization of pore structure of a strong anion-exchange membrane adsorbent under different buffer and salt concentration conditions *J Chromatogr A* 1216 (6): 941.
- [90] **Jonas, F.** (2007) Untersuchung eines neuartigen Membranadsorbermoduls zur chromatographischen Aufreinigung von Proteinen aus ungeklärten Medien, Diplomarbeit im *Fachbereich Medizintechnik und Biotechnologie*, Fachhochschule Jena.
- [91] **Da Costa, A. R., Fane, A. G., Fell, C. J. D., Franken, A. C. M.** (1991) Optimal channel spacer design for ultrafiltration *J. Membr. Sci.* 62 275.
- [92] **Schwinge, J., Wiley, D. E., Fane, A. G., Guenther, R.** (2000) Characterization of a zigzag spacer for ultrafiltration *J. Membr. Sci.* 172 19.
- [93] **Cazes, J., Scott, R. P. W.** *Chromatography Theory* in (Hg.), *chromatographic Science Series* (Dekker, Inc, New York, 2002)
- [94] **Anspach, F. B., Curbelo, D., Hartmann, R., Garke, G., Deckwer, W. D.** (1999) Expanded-bed chromatography in primary protein purification *J Chromatogr A* 865 (1-2): 129.
- [95] **Thonart, P., Custinne, M., Paquot, M.** (1981) Zeta potential of yeast cells: application in cell immobilization *Enzyme and Microbial Technology* 4 (3): 191.
- [96] **Barnfield Frej, A., Johansson, H., Johansson, S., Leijon, P.** (1997) Expanded bed adsorption at production scale: Scale-up verification, process example and sanitization of column and adsorbent *Bioprocess Engineering* 16 57.
- [97] **Lihme, A., Zafirakos, E., Hansen, M., Olander, M.** (1999) Simplified and more robust EBA processes by elution in expanded bed mode *Bioseparation* 8 (1-5): 93.
- [98] **Hjorth, R.** (1999) Expanded bed adsorption: elution in expanded bed mode *Bioseparation* 8 1.
- [99] **Melmer, G.** *Biopharmaceuticals and the Industrial Environment* in G. Gellissen (Hg.), *Production of Recombinant Proteins. Novel Microbial and Eucaryotic Expression Systems* (Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2005)

-
- [100] **Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espin, J., Corchero, J. L., Vazquez, E., Villaverde, A.** (2009) Microbial factories for recombinant pharmaceuticals *Microb Cell Fact* 8 17.
- [101] **Suck, K., Walter, J., Menzel, F., Tappe, A., Kasper, C., Naumann, C., Zeidler, R., Scheper, T.** (2006) Fast and efficient protein purification using membrane adsorber systems *J Biotechnol* 121 (3): 361.
- [102] **Anton, F.** (2008) Kultivierung von Produktionszelllinien und Entwicklung effizienter Analytik- und Aufreinigungsverfahren für die Zielproteine, Dissertation am Institut für technische Chemie, Leibniz Universität Hannover.
- [103] **Amaral, J., Inganas, M., Cabral, J., Prazeres, D.** (2001) Study on the scale-up of human IgG3 purification using protein A affinity chromatography *Bioseparation* 10 (4-5): 139.
- [104] **Arunakumari, A., Wang, J., Ferreira, G.** (2007) ALTERNATIVES TO PROTEIN A: Improved Downstream Process Design for Human Monoclonal Antibody Production *BioPharm International*
- [105] **Blank, G. S., Zapata, G., Fahrner, R., Milton, M., Yedinak, C., Knudsen, H., Schmelzer, C.** (2001) Expanded bed adsorption in the purification of monoclonal antibodies: a comparison of process alternatives *Bioseparation* 10 (1-3): 65.
- [106] **Graumann, K., Premstaller, A.** (2006) Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems *Biotechnol J* 1 (2): 164.
- [107] **Invitrogen** (2009) Pichia Expression Kit - manual Catalog no. K1710-01
- [108] **Julien, C.** (2006) Production of Humanlike Recombinant Proteins in Pichia pastoris *BioProcess International*, 2006, 22.
- [109] **Mörgeli, A.** (2008) Chromatographie und Scale Up mit Direct Capture Membranadsorbern im Downstream Processing, Diplomarbeit im *Institut für Chemie und Biologische Chemie*, Zürcher Hochschule für angewandte Wissenschaften.
- [110] **Berweger, R.** (2007) Einsatz von Direct Capture Membranadsorbern im Downstream Processing, Diplomarbeit im *Institut für Chemie und Biologische Chemie*, Zürcher Hochschule für angewandte Wissenschaften Winterthur.
- [111] **Bucher, R.** (2006) Aufreinigung von Green Fluorescent Protein (GFPuv-His) mittels Metallchelat-Membranchromatographie, Diplomarbeit im *Institut für Chemie und Biologische Chemie* Zürcher Hochschule für angewandte Wissenschaften Winterthur.
- [112] **Kang, D., Go, Y. S., Suh, M., Kang, C.** (2002) Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis *Bull. Korean Chem. Soc.* 23 (11): 1511.

Verzeichnis der Anhänge

1	Material	104
1.1	Chemikalien	104
1.2	Puffer	105
1.3	Nährmedienbestandteile	105
1.4	Verbrauchsmaterialien	106
1.4.1	Modulbau	106
1.4.2	Charakterisierung	106
1.5	Geräte	107
1.6	Software	108
1.7	Module	109
1.8	Wickeltestvorrichtung	110
2	Methoden	111
2.1	Analytik.....	111
2.1.1	Größenausschlusschromatographie	111
2.1.2	Gelelektrophorese.....	112
2.1.3	UV-Spektroskopie	113
2.2	Modulbau	114
2.3	Membrancharakterisierung.....	117
2.3.1	Aufnahme von Adsorptionsisothermen.....	117
2.4	Modulcharakterisierung	118
2.4.1	Aufnahme von Aceton-Durchbruchkurven an Chromatographieanlage ÄKTA-Explorer	123
2.4.2	Auswertung von Elutionspeaks	123
2.4.3	Herstellung von Biomasse.....	124
2.4.4	Ergänzende Daten	125

Anhang

1 Material

1.1 Chemikalien

Broad range marker für SDS-PAGE Bestellnr. 161-031	BioRad, München
di-Kaliumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Essigsäure >99%	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Lämmli Puffer	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
PAGE blue coomassie	Fermentas, St. Leon-Rot
Salzsäure 32%	Merck, Darmstadt
Tris-Base >99%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris-Glycin Puffer für SDS-PAGE	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin, Fraktion V, protease free, lyophilized) wurde von Kräber GmbH (Ellerbek) bezogen.

Humanes Serumalbumin aus humanem Serum (Bestell-Nr. A 9511) wurde von Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

1.2 Puffer

Der Ansatz aller Pufferlösungen erfolgte unter Verwendung von deionisiertem Wasser.

Phosphatpuffer: 10 mM Kaliumphosphat, pH = 7,0

Die Herstellung des Phosphatpuffers erfolgte unter Verwendung einer 2 M Stammlösung durch Verdünnung im Verhältnis 1:200.

Herstellung der Phosphatpuffer-Stammlösung (2M KPi, pH 7,0):

- 208,5 g di-Kaliumhydrogenphosphat-Dihydrat wurden in 541 g deionisiertem Wasser gelöst (basische Komponente)
- 117 g Kaliumdihydrogenphosphat-Dihydrat wurden in 541 g deionisiertem Wasser gelöst (saure Komponente)
- die saure Komponente wurde zur basischen Komponente zugegeben, bis sich ein pH-Wert von 7,0 einstellte

Tris-Puffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7,2

1.3 Nährmedienbestandteile

Dextrose	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Malzextrakt-Bouillon	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Pepton	Merck, Darmstadt

1.4 Verbrauchsmaterialien

1.4.1 Modulbau

Abstandshalter A (MON PES 800N)	Versaidag, Krefeld
Abstandshalter B (Naltex 14324)	DelStar International, Bristol, England
Abstandshalter C (Naltex 14273)	DelStar International, Bristol, England
Abstandshalter D (Tekton 3121)	Reemay
Deckel F - 3/4", komplett	Sartorius Stedim Plastics, Göttingen
Gewebe zur radialen Verteilung (XN 4410); d=1mm	Conwed Plastics, Genk, Belgien
Kappe, nano	Sartorius Stedim Plastics, Göttingen
Kappe, S, 150	Sartorius Stedim Plastics, Göttingen
Polypropylen Plattenmaterial, diverse Wandstärken	Simona, Kirn
Polypropylen Rohr, diverse Durchmesser	Georg Fischer Deka, Dautphetal
Polypropylen Vollstab, diverse Durchmesser	Simona, Kirn
PTFE-beschichtetes Edelstahl-Lochblech, Lochdurchmesser 0,5 mm, d = 1,0 (Produkt: Filterunterstützung 6980708)	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Sartobind Q Membran	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Satobind S Membran	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Sintermaterial Polyethylen, 80-130 μm , d = 1,5 mm	Porex Technologies, Aachen

1.4.2 Charakterisierung

Sartolab 1L BottleTop 0,2 μm	Sartorius Stedim Biotech
Sterilfilter Minisart 0,2 μm	Sartorius Stedim Biotech

Sterile Einwegware, wie Pipettenspitzen, Schraubdeckelröhrchen, Zentrifugenröhrchen wurden von Firma Roth (Wiesbaden) bezogen.

1.5 Geräte

1 L Schikanekolben	Schott, Mainz
Blockthermostat	Kleinfeld Labortech, Hannover
Criterion Electrophoresis Chamber	BioRad, München
diverse Laborwaagen	Sartorius, Göttingen
Druckaufnehmer aus Sartoflow slice 200	
benchtop System	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Druckaufnehmer Cerebar T	Endress+Hauser, Weil am Rhein
Durchflusssensor	Magflow, Longmont, USA
HPLC-System (Pumpe P580 mit ASI-100	
Autosampler)	Dionex Softron, Germering
Leitfähigkeitssonde Portamess	Knick, Berlin
Magnetrührer RET digi-visc	IKA-Labortechnik, Staufen
Membranpumpe Sartojet	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Messumformer MVD 2555 für Druckaufnehmer	
aus Sartoflow System	Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt
Messumformer OD-Sonde, Modell 612	Wedgewood Technology, San Carlos, USA
Messumformer UV-Sonde, Modell 662	Wedgewood Technology, San Carlos, USA
OD-Sonde 595 nm Modell AF10QEQRNT1C0-C	Wedgewood Technology, San Carlos, USA
Peristaltikpumpe Cyclo II	Roth, Wiesbaden
Peristaltikpumpe ISM596	Ismatec, Glattbrugg, Schweiz
Peristaltikpumpe Meredos TL	Meredos, Göttingen
Peristaltikpumpe Watson Marlow 603SR	Watson Marlow, Rommerskirchen
pH Meter pH 530	WTW, Weilheim
Schüttelinkubator Certomat IS	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
UV/VIS Spektralphotometer Lambda 40	Perkin Elmer, Boston, USA
UV-Sonde 280 nm Modell AF44VEQHNT1c4-C	Wedgewood Technology, San Carlos, USA

1.6 Software

Fit-Programm Beladungskurven Excel basiert	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
HPLC Auswertungssoftware Chromeleon Version 6.80	Dionex Softron, Germering
Modultestsoftware MA Test	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Code_Saturne	Electricité de France, Paris, Frankreich
Origin	Origin Lab Corporation, Northampton, USA

1.7 Module

Sartobind Q

Modulnummer	Membrancharge	Abstandshaltertyp	Membranfläche [cm ²]	Membranzvolumen [ml]
7030783	600643R18M	Naltex 14273	896	24,6
7030883	0701913R02M	Naltex 14273	896	24,6
7030983	0500693R08M	Naltex 14273	888	24,4
0000033	100943 R12B	MON PES 800N	4033	110,8
0000035	100943 R12B	Naltex 14324	4524	124,3
0000046	100943 R12B	Tecton 3121	7794	214,1
0000055	100943 R12B	Naltex 14273	6616	181,8
06012083_10	050300-3 R6M	Naltex 14273	802	22,0
7004783_15	050300-3 R6M	Naltex 14273	864	23,7
7004783_2	050300-3 R6M	Naltex 14273	870	23,9
9804563_1	060109303M	Tecton 3121	916	25,2
9804563_2	060109303M	Tecton 3121	932	25,6
9804563_3	060109303M	Tecton 3121	924	25,4
9804563_4	060109303M	Tecton 3121	936	25,7
9804563_5	060109303M	Tecton 3121	932	25,6
9804663_1	060109303M	Tecton 3121	10508	288,7
9804663_2	060109303M	Tecton 3121	10800	296,7
9804663_3	060109303M	Tecton 3121	10875	298,8
9804663_4	060109303M	Tecton 3121	10950	300,8
9804663_5	060109303M	Tecton 3121	10875	298,8
9807263_1	060109303M	Tecton 3121	106	2,9
9807263_2	060109303M	Tecton 3121	108	3,0
9807263_3	060109303M	Tecton 3121	107	2,9
9807263_4	060109303M	Tecton 3121	110	3,0
9807263_5	060109303M	Tecton 3121	109	3,0
W003	070339317M	Tecton 3120	990	27,2
W004	070339317M	Tecton 3121	1008	27,7
W016	070339317M	Tecton 3121	1000	27,5
W022	070339316M	Tecton 3121	1920	52,7
W024	070339316M	Tecton 3121	1006	27,6
W026	070339316M	Tecton 3121	2784	76,5

Sartobind S

Modulnummer	Membrancharge	Abstandshaltertyp	Membranfläche [cm ²]	Membranvolumen [ml]
8046783	08005907M	Tecton 3121	125	3,4

Sartobind IDA

Modulnummer	Membrancharge	Abstandshaltertyp	Membranfläche [cm ²]	Membranvolumen [ml]
8022083	010094-3 R1B	Tecton 3121	116,5	3,2
8025683	010094-3 R1B	Tecton 3121	1055,6	29

Sartobind Protein A

Modulnummer	Membrancharge	Abstandshaltertyp	Membranfläche [cm ²]	Membranvolumen [ml]
7009983	T411	Naltex 14273	1232	24,64

1.8 Wickeltestvorrichtung

Die Vorrichtung erlaubte die Untersuchung von Wickeln ohne das Erfordernis einer Gehäuseverschweißung. Die Plan geschnittenen Wickel konnten unter Nutzung der Vorrichtung mit verschiedenen Einbauten (z.B. Verteilerplatten) kombiniert und charakterisiert werden. Die Abdichtung zwischen Gehäuserohr und Gehäusekappen erfolgte unter Einsatz von O-Ringen durch Einspannen in der Vorrichtung.

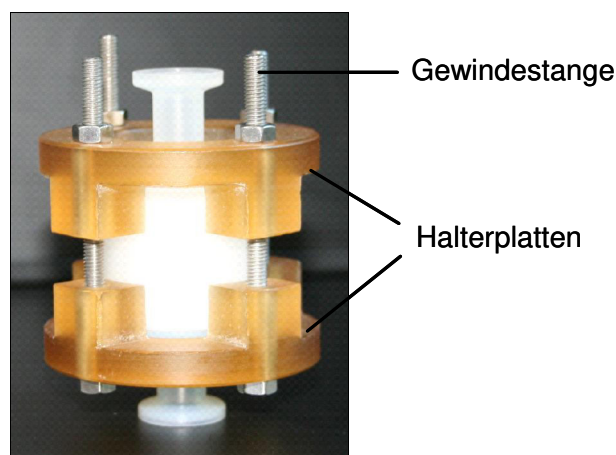


Abbildung 62: Wickeltestvorrichtung mit eingebautem Gehäuserohr und Gehäusekappen. Kappen und Rohr wurden durch Halterplatten und Gewindestangen unter Einsatz von O-Ringen, die sich zwischen Rohr und Kappe befanden, fixiert und abgedichtet

2 Methoden

2.1 Analytik

2.1.1 Größenausschlusschromatographie

Die Quantifizierung von HSA und BSA aus Hefesuspensionen und die Quantifizierung von HSA aus den Wasch- und Elutionsfraktionen der entsprechenden Versuchsreihe erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie unter Verwendung einer Proteema 300 Säule. Gemäß Herstellerangabe verfügt die Säule über einen Trennbereich von 1 bis 1200 kD. Die Proben wurden vor dem Auftrag auf die Säule zentrifugiert und über Minisart 0,2 µm steril filtriert.

HPLC Dionex

Säule: PSS Proteema 300

Pumpensystem: P580

Probennehmer: ASI-100 Automated Sample Injektor

Detektor: UVD 17 OU

Auswertungssoftware: Chromeleon Version 6.80

Laufpuffer: 50 mM NaPi, 0,3 M NaCl, pH 6,6, $\sigma=33$ mS/cm

Probenpuffer: 50 mM NaAc pH 4,5

Reinigungspuffer: 50 mM NaPi, 0,05 % NaN₃

Injektionsvolumen: 20 bis 200 µl

Messzeit: 20 min

Säulenparameter: t= 21 °C, p= 0-80 bar

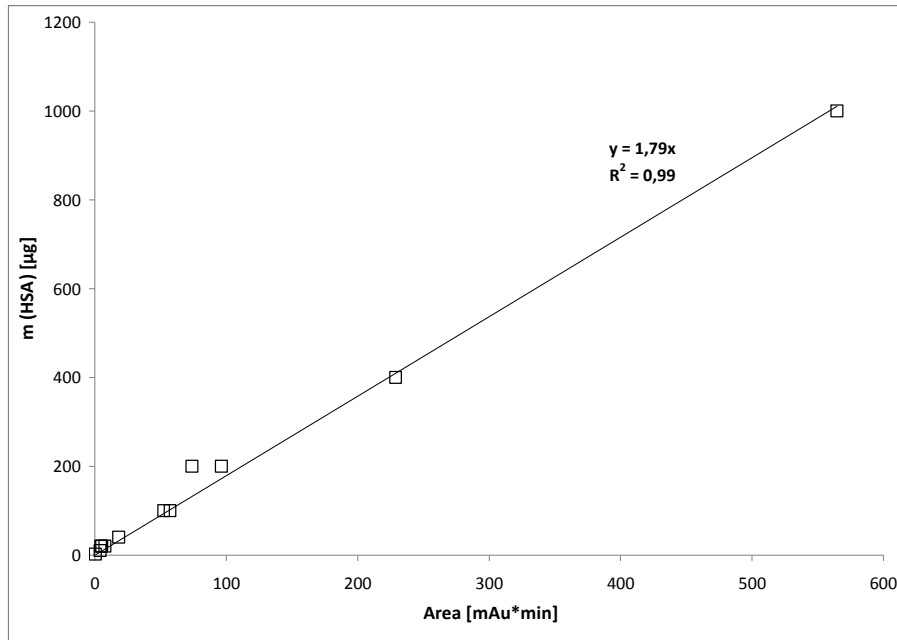


Abbildung 63: Kalibriergerade HSA. HSA-Konzentration 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml und 5 mg/ml in 50 mM NaAc pH 4,5; Laufpuffer 50 mM NaPi, 0,3 M NaCl, pH 6,6

2.1.2 Gelelektrophorese

Die Quantifizierung von HSA aus Hefesuspensionen erfolgte zusätzlich über SDS-PAGE.

Die Bedienung der Elektrophorese-Kammern erfolgte entsprechend der Gerätebeschreibung des Herstellers. Die Herstellung des 12 %igen Polyacrylamidgels erfolgte gemäß Laborprotokoll.

Elektrodenpuffer: Tris-Glycin Puffer

Auftragspuffer: Lämmli-Puffer

20 µl der Probe wurden mit 40 µl Lämmli-Puffer verdünnt und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach Auftrag von 10 µl der erhaltenen Lösung wurden die Proteine bei 200 V über einen Zeitraum von ca. 45 Minuten getrennt. Die Gele wurden mit Coomassie Blau gefärbt.

2.1.3 UV-Spektroskopie

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von optisch klaren einkomponentigen Lösungen erfolgte photometrisch durch Messung der Extinktion bei 280 nm und Umrechnung über das Lambert-Beersche Gesetz. Der Extinktionskoeffizient wurde durch Aufnahme einer Kallibriergeraden bestimmt.

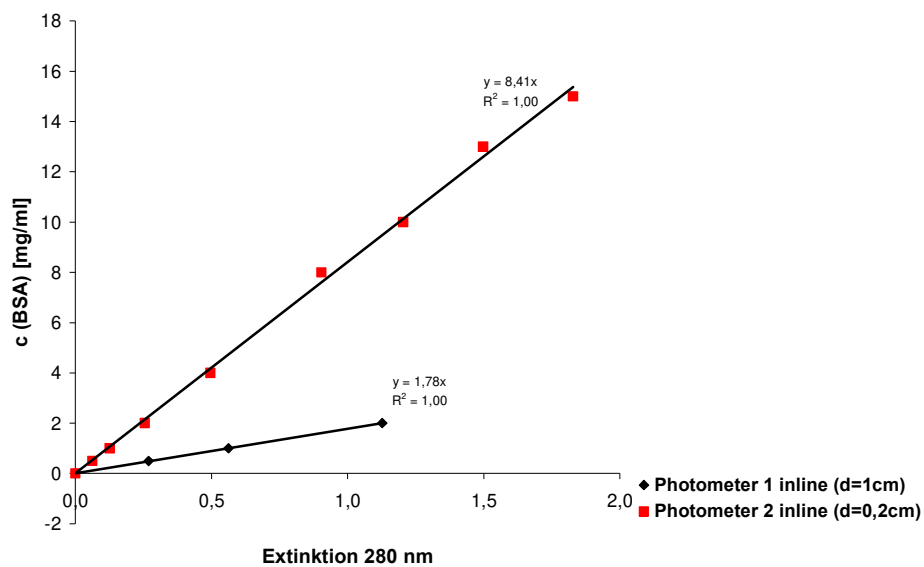


Abbildung 64: Kallibriergerade der online-Photometer (Wedgewood) des Teststandes.

2.2 Modulbau

Exemplarisch wird der Aufbau anhand eines Moduls mit einer Membranfläche von 1,3 m² (350 ml) erläutert. Der Aufbau der Module der untersuchten Baugrößen unterliegt im Wesentlichen dem gleichen Fertigungsablauf, wobei die Änderungen benannt werden. Auf die Darlegung detaillierter Fertigungsparameter wird verzichtet

Die Herstellung der Module gliederte sich in folgende Prozessschritte:

1. Herstellen des Basiswickels:

Der Abstandshalter wurde mit Hilfe eines LötKolbens am Kunststoff-Kern befestigt. Die Membran wurde zwischen Kern und Abstandshalter gelegt. Membran und Abstandshalter wurden bis zum Erreichen des Innendurchmessers des Rohres gemeinsam um den Kern gewickelt, wobei der Kern in eine Kernaufnahme eingespannt wurde und über einen Elektromotor in Rotation versetzt wurde. Die Regelung der Wickelkraft erfolgte über kontrolliertes Bremsen der Vorratsrollen, welche mit Magnetpulverbremsen ausgestattet waren.

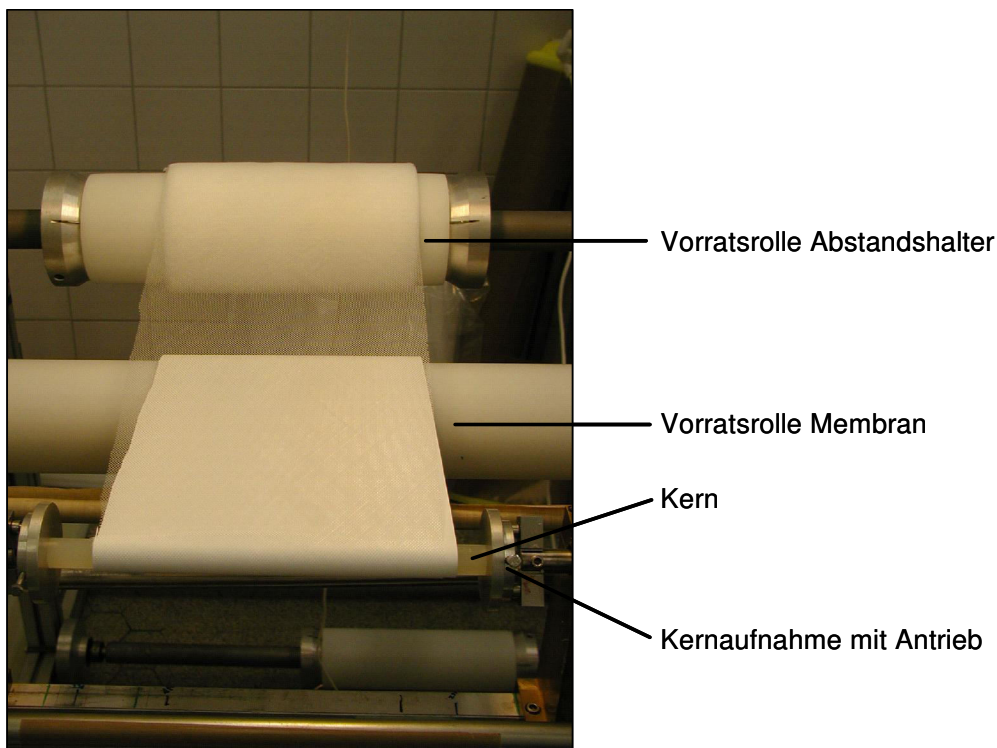


Abbildung 65: Herstellung der Basiswickel.

2. Anpassung des Wickels und Einführen in das Gehäuserohr

Aufgrund der Toleranz des Rohrinnendurchmessers und des Wickels wurde der Außendurchmesser der Wickel beim Einführen in das Rohr durch Zuschneiden von Membran und Abstandshalter an den Innendurchmesser des Rohres angepasst. Die erste Außenlage des Wickels war dabei stets Membranmaterial. Das Einführen des Wickels wurde unter leichter Drehung des Wickels entgegen der Wickelrichtung durchgeführt, um ein „Teleskopieren“ des Wickels zu vermeiden.

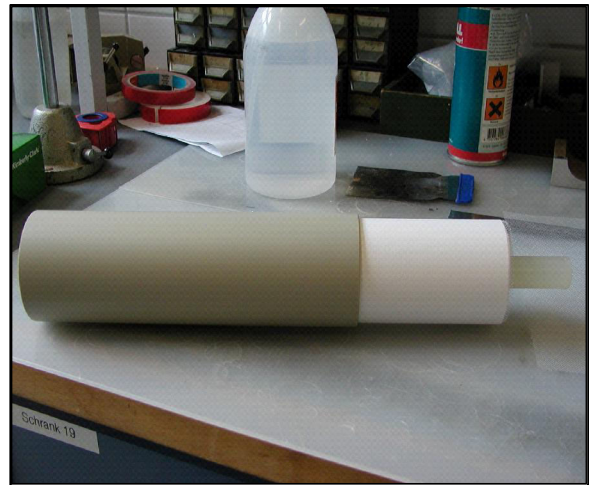
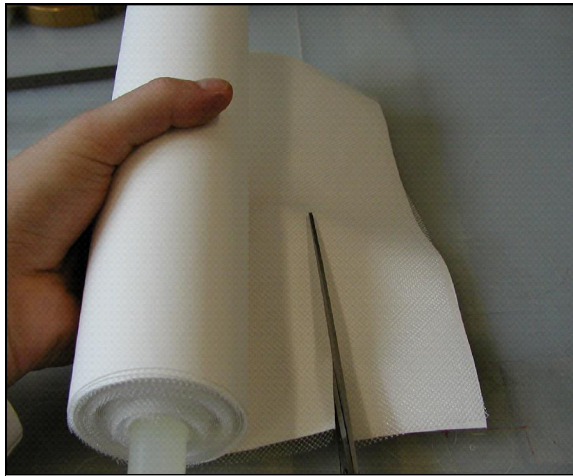


Abbildung 66: Anpassung des Wickels und Einführen in das Gehäuserohr.

3. Planschneiden der Wickelstirnflächen

Das Planschneiden der Wickelstirnflächen stellt sicher, dass Membran und Abstandshalter bündig zueinander liegen. Ein Überstehen der Membran kann bewirken, dass sich diese vor den Abstandshalter legt und dadurch den Strömungskanal verschließt, wodurch das Modul die Eigenschaft der Partikelgängigkeit verliert. Das Überstehen des Abstandshalters kann bewirken, dass sich die Membran unter Einwirkung des strömenden Mediums im Wickel verschiebt. Das Planschneiden wurde unter langsamer Rotation des Wickels entgegen der Wickelrichtung durchgeführt. Der überstehende Kern wurde unter Verwendung einer Bandsäge auf die Länge des Wickels angepasst.

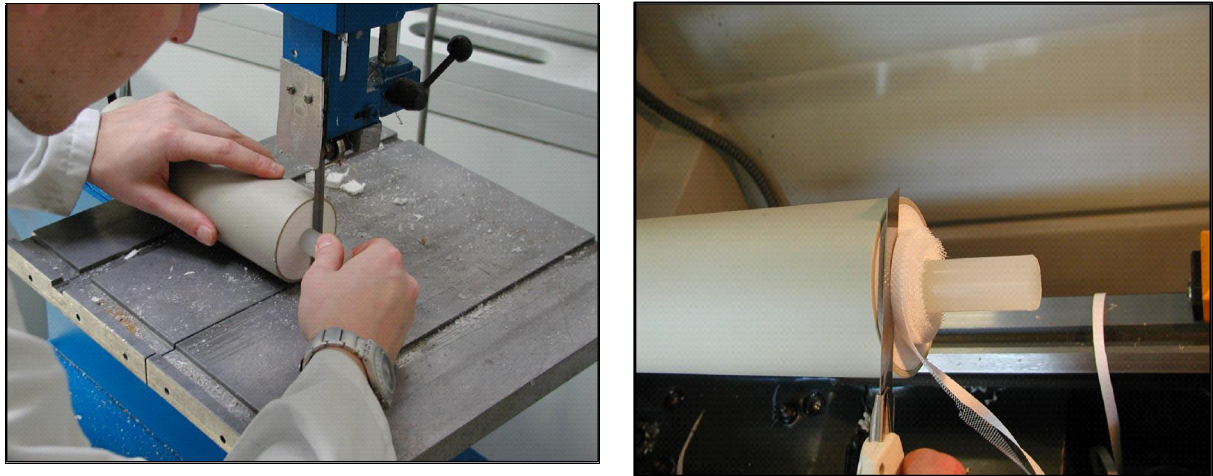


Abbildung 67: Planschneiden der Wickelstirnflächen

4. Capsule bauen

Zwischen Wickelstirnfläche und Gehäusekappe wurden auf der Eingangsseite und der Ausgangsseite des Moduls je 2 Ronden eines Gewebes zur radialen Verteilung (XN4410) gelegt. Gehäusekappe und Gehäuserohr wurden im Heizelement-Stumpfschweißverfahren unter Kontakt von Heizelement und Kunststoffteilen (Kontaktschweißen) händisch verschweißt. Die Güte der Gehäuseverschweißung wurde durch einen Druckhaltetest bei 4 bar geprüft.

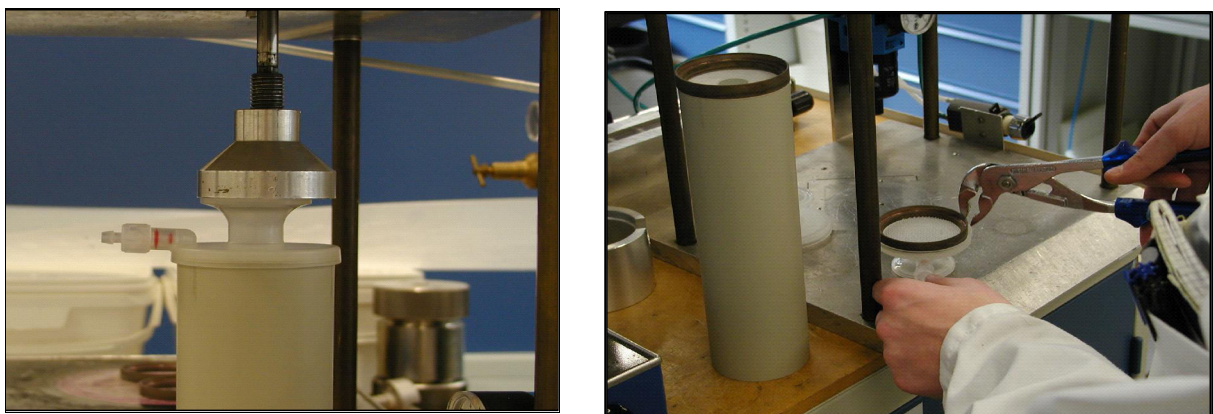


Abbildung 68: Capsule bauen. links: Aufschmelzen der Schweißkonturen des Rohres und der Gehäusekappe; rechts: Fügeprozess, Abkühlen der Schmelze erfolgt unter Anwendung einer definierten Fügekraft.

2.3 Membrancharakterisierung

2.3.1 Aufnahme von Adsorptionsisothermen

Adsorptionsisothermen beschreiben das Gleichgewicht, das zwischen der Konzentration einer Komponente in Lösung und der Konzentration am Adsorbens herrscht. Die Aufnahme der Adsorptionsisothermen erfolgte, indem Membranstanzlinge über Nacht bei Raumtemperatur in BSA-Lösungen unterschiedlicher Startkonzentration geschüttelt wurden. Die Membranbindungskapazität wurde aus der Differenz der Start- und Gleichgewichtskonzentration, welche ins Verhältnis zur Membranfläche gesetzt wurde, berechnet und über der jeweiligen Gleichgewichtskonzentration aufgetragen.

Durchführung:

1. Ausstanzen von Membranronden (25 mm Durchmesser); dies entspricht einer Membranfläche von 4,9 cm²
2. Equilibrierung in Phosphatpuffer: 2 ml des Puffers werden in eine Petrischale gefüllt, die Membran wird auf die Lösung aufgelegt und 20 Minuten vorsichtig geschüttelt
3. Wiederholung von Schritt 2 mit frischem Phosphatpuffer
4. Herstellung von BSA-Lösungen folgender Konzentration durch Verdünnung einer BSA-Stammlösung (10 mg/ml) mit Phosphatpuffer: 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 0,8, 1, 2 und 5 mg/ml
5. Sterilfiltration der Proteinlösungen mit Minisart 0,2 µm und Befüllen der Petrischalen mit je 2 ml
6. Transfer der equilibrierten Membranstanzlinge in die Proteinlösungen unterschiedlicher Konzentration und Adsorption unter vorsichtigem Schütteln über Nacht (parallel: 4 Petrischalen mit den Konzentrationen 0, 0,1, 1 und 10 mg/ml ohne Membran als Kontrolle)
7. Messung der Proteinkonzentration der einzelnen Petrischalen
8. Berechnung der Membranbindungskapazität:

$$q = \frac{(c_{BSA,Start} - c_{BSA,Ende}) \cdot 2ml}{4,9cm^2}$$

q: Membranbindungskapazität [mg/cm²]

$c_{BSA, Start}$: BSA-Konzentration der BSA-Lösung vor der Adsorption

$c_{BSA, Ende}$: BSA-Konzentration der BSA-Lösung nach Einstellung des Gleichgewichts zwischen Lösung und Adsorbens

Je Membran wurden 3 Bestimmungen durchgeführt, welche unter Verwendung des Programms Origin (Origin Lab Corporation) als Regressionsisotherme nach Langmuir gemittelt wurden.

2.4 Modulcharakterisierung

Die Charakterisierung der Module mit einem Membranvolumen von > 10 ml erfolgte mit einem Prüfstand, dessen Fließbild in Abbildung 69 dargestellt ist. Für die Untersuchungen anhand reiner Proteinlösungen wurden Photometer mit einer Wellenlänge von 280 nm verwendet, während für die Untersuchungen mit trüben Suspensionen Photometer mit einer Wellenlänge von 595 nm zur Messung der optischen Dichte (OD) Einsatz fanden. Die Auswahl der Pumpen richtete sich nach der Modulgröße.

Modulgröße, MV [ml]	Pumpe 1	Pumpe 2
10 bis 100	Peristaltikpumpe Watson Marlow 603SR	Peristaltikpumpe Cyclo II
> 100	Membranpumpe Sartojet	Peristaltikpumpe Watson Marlow 603SR

Um den Einfluss des Totvolumens der Anlage zu minimieren, wurden die Lösungen jeweils bis zum Ventil 3 vorgespült. Der Ablauf eines Versuches gliederte sich in folgende Schritte:

1. Spülen mit Elutionspuffer (Volumen ca. 10 MV; Volumenstrom: ca. 5 MV/min; Weg gemäß Abbildung 73)
2. Spülen mit Waschpuffer (Volumen ca. 20 MV; Volumenstrom: ca. 20 MV/min; Weg gemäß Abbildung 72)
3. Beladung: Rezirkulationsverfahren (Weg gemäß Abbildung 71); Durchlaufverfahren (Weg gemäß Abbildung 63): Parameter: siehe Kapitel Experimenteller Teil
4. Spülen mit Waschpuffer im Durchlaufverfahren (sofern nicht anders angegeben: Volumen: 10 MV; Volumenstrom: 12 MV/min (Weg gemäß Abbildung 72))
5. Elution mit Elutionspuffer (sofern nicht anders angegeben: Volumen: bis zu Erreichen der Basislinie; Volumenstrom: 1 MV/min) (Weg gemäß Abbildung 73)

Die Messwerte der Sensoren (siehe Abbildung 69) wurden über die gesamte Versuchszeit vom Programm „Molab_SB“ automatisch aufgezeichnet (Messintervall: 1 Sekunde). Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel. Vor einer Wiederbenutzung von Modulen wurde die Vollständigkeit der Elution anhand der Wiederfindung überprüft.

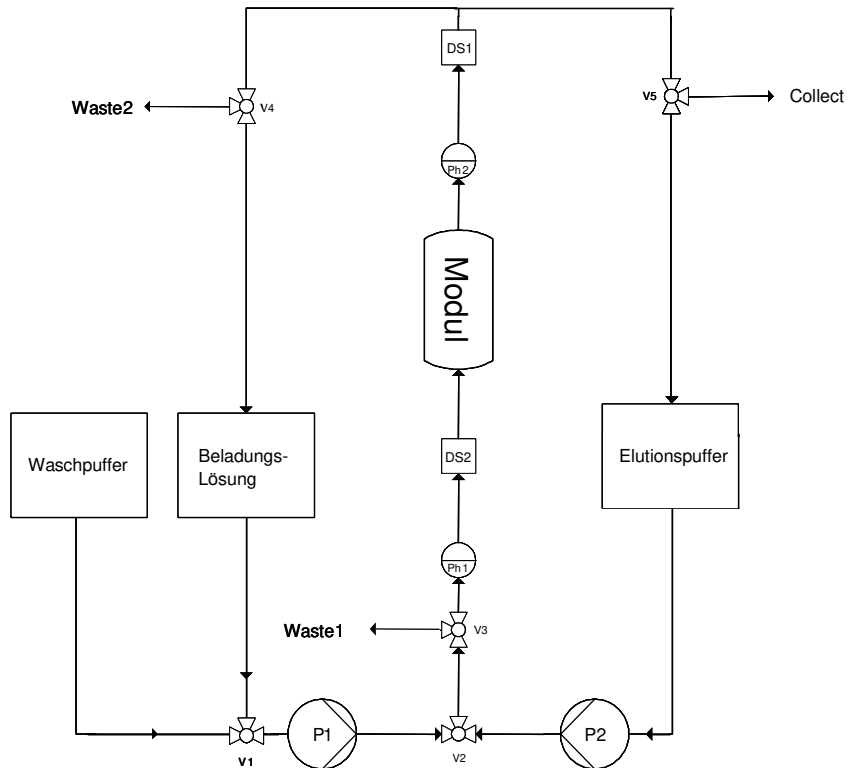


Abbildung 69: Fließbild Prüfstand für partikelgängige Membranadsorber-Module: P1: Pumpe; V: Ventil; Ph: Photometer; DS: Drucksensor

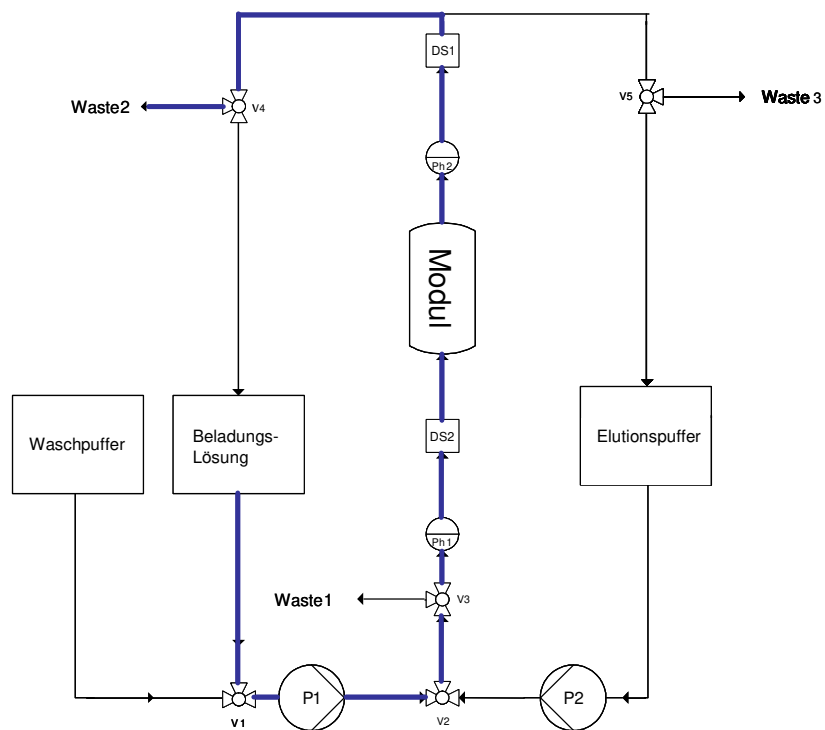


Abbildung 70: Modulbeladung im Durchlaufverfahren

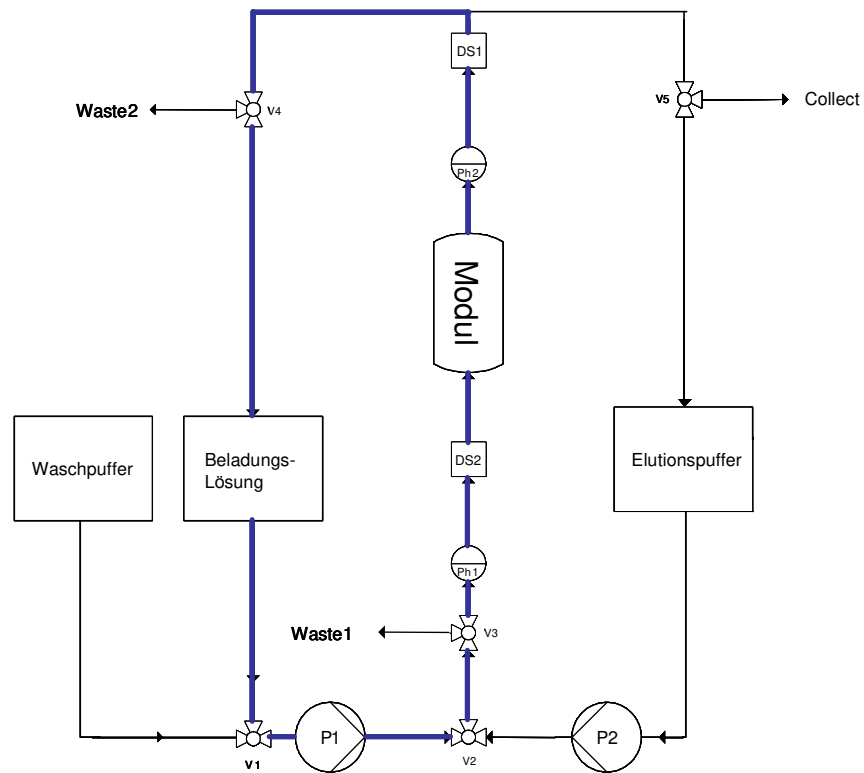


Abbildung 71: Modulbeladung im Rezirkulationsverfahren

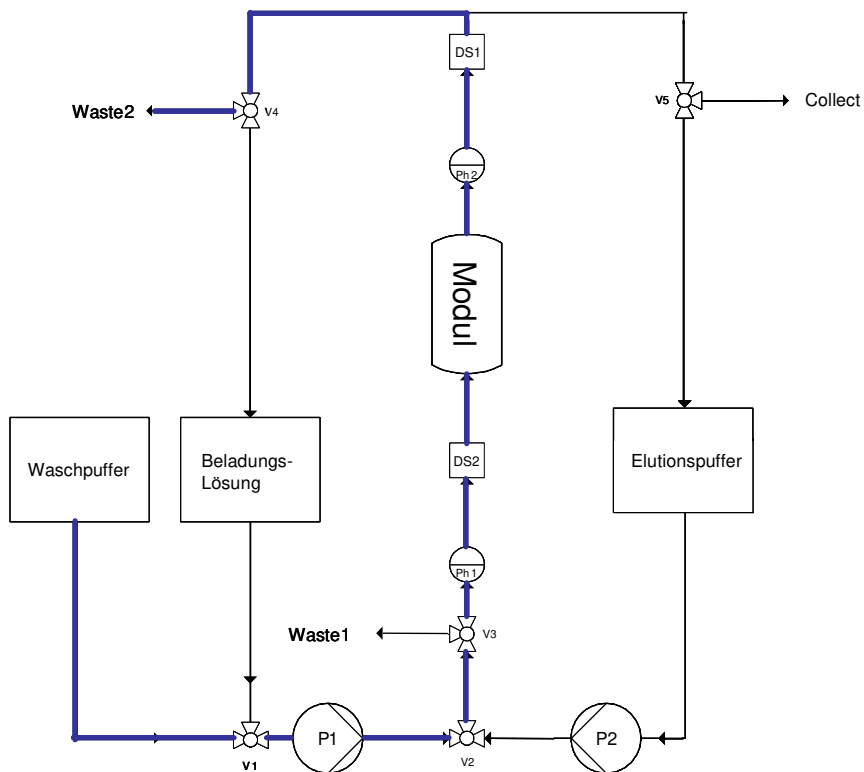


Abbildung 72: Spülen mit Waschpuffer

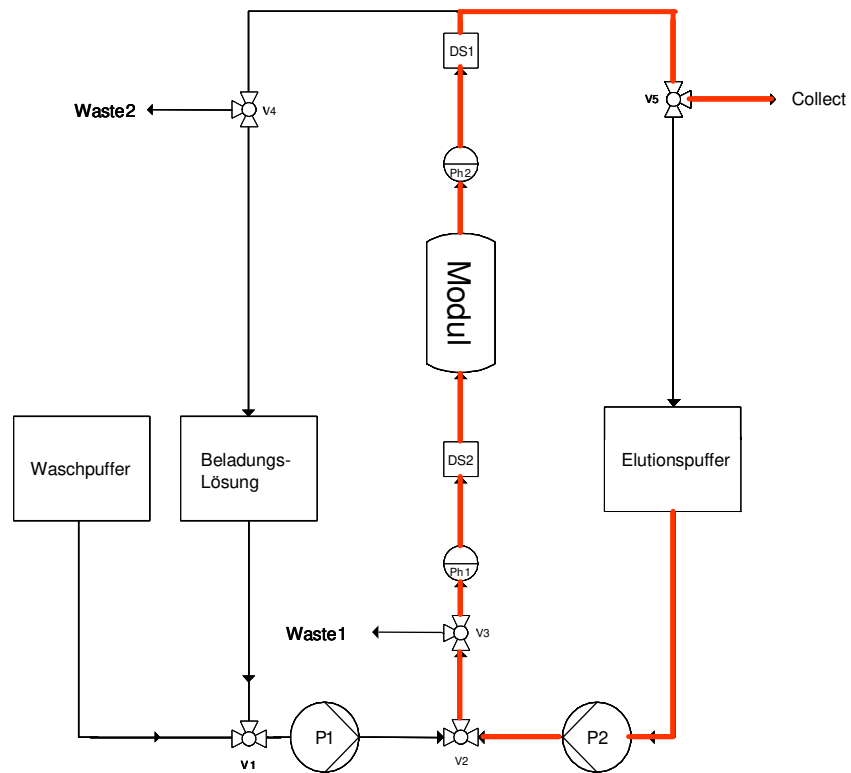


Abbildung 73: Spülen mit Elutionspuffer/Elution

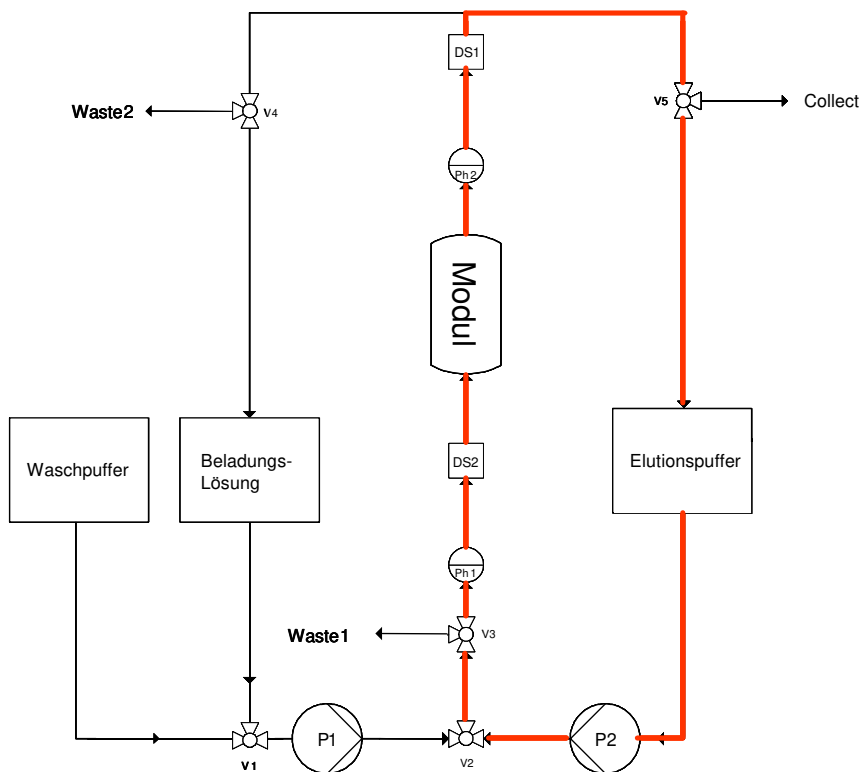


Abbildung 74: Elution im Rezirkulationsverfahren

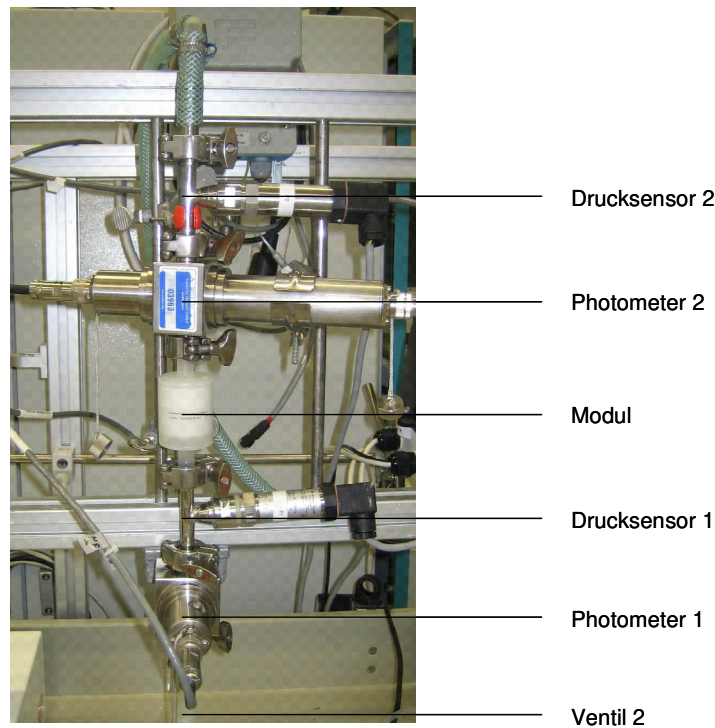


Abbildung 75: Prüfstand für partikelgängige Membranadsorber-Module mit einem Membranvolumen > 10 ml.

Die Charakterisierung der Module mit einem Membranvolumen < 10 ml wurde unter Verwendung von zwei Peristaltikpumpen (Cyclo II und Meredos) und eines Drucksensors durch fraktioniertes Auffangen des Durchlaufes bzw. durch Probenahme aus dem Rezirkulationsbehälter durchgeführt. Die Messung der Proteinkonzentration bzw. der optischen Dichte erfolgte durch Messung der Fraktionen am externen Photometer (UV/VIS Spektralphotometer Lambda 40).

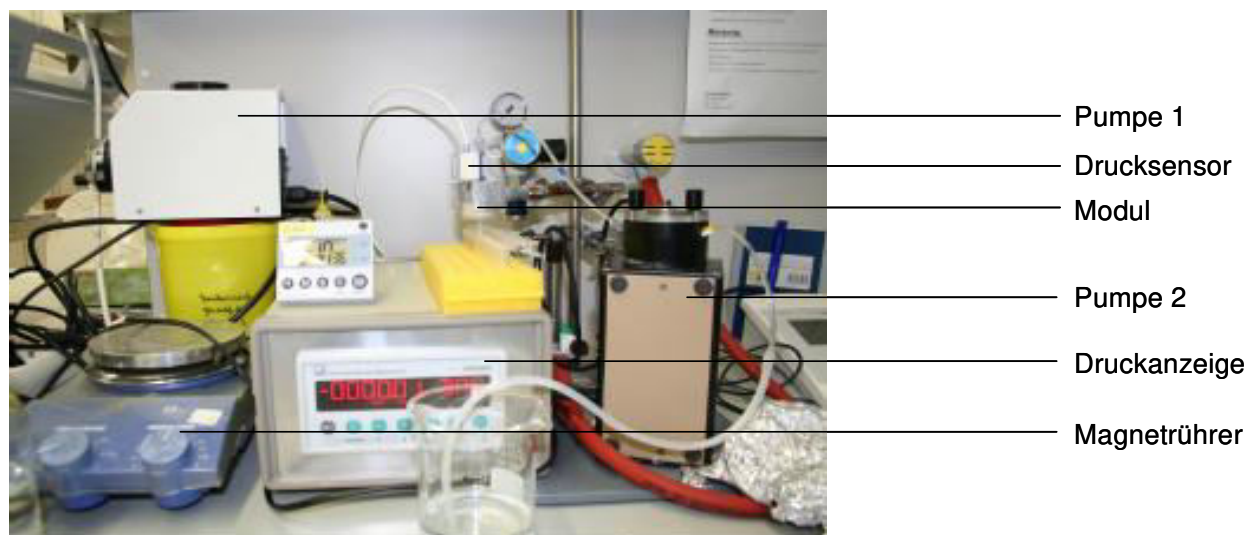


Abbildung 76: Charakterisierung von partikelgängigen Membranadsorbern (MV < 10 ml): Die Abbildung zeigt das fraktionierte Auffangen während der Elution.

2.4.1 Aufnahme von Aceton-Durchbruchkurven an Chromatographieanlage ÄKTA-Explorer

Die Aufnahme der Aceton-Durchbruchkurven erfolgte unter Benutzung der Chromatographieanlage ÄKTA-Explorer, um den Einfluss von Pulsationen der Peristaltik-Pumpen und des Totvolumens der Anlage auf das Messergebnis zu reduzieren. Aufgrund des deutlichen Unterschiedes zwischen dem Durchmesser der Kapillaren der Chromatographieanlage und dem Eingangsquerschnitt der Module wurde ein Drei-Wege-Hahn vor das Modul geschaltet, der das Vorspülen des Aceton-Puffers ermöglichte.

2.4.2 Auswertung von Elutionspeaks

Die Bewertung der Elutionspeaks erfolgte anhand der Peakhöhe, welche der maximalen Proteinkonzentration c_{\max} während der Elution entsprach, der Peakbreite bei halber Peak-Höhe (V_h) und des Asymmetriefaktors A_s . Der Asymmetriefaktor berechnete sich aus dem Quotienten der Parameter b und a . Der Parameter a entsprach der Menge Eluat in Membranvolumen zwischen der Peak-Spitze und 10% der maximalen Peak-Höhe auf der ansteigenden Peak-Seite, während der Parameter b dem analogen Wert auf der abfallenden Peak-Seite entsprach (Abbildung 77).

$$A_s = \frac{b}{a}$$

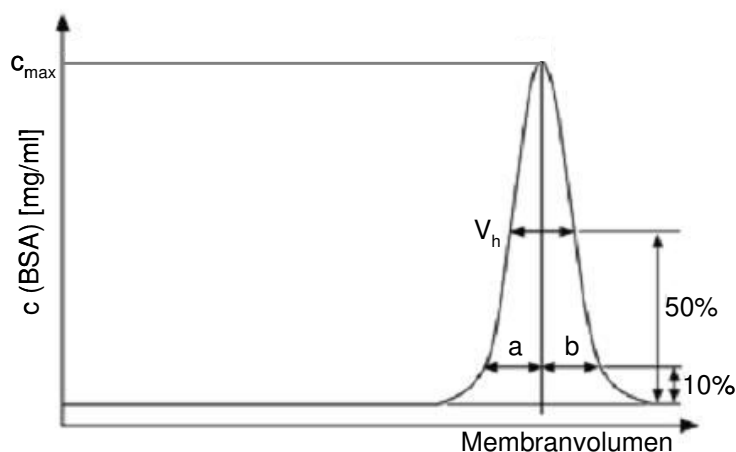


Abbildung 77: Auswertung von Elutionspeaks durch die charakteristischen Parameter c_{\max} , V_h und A_s

2.4.3 Herstellung von Biomasse

Modellsystem 1 – *Saccharomyces cerevisiae* Presshefe

Das Modellsystem diente der Untersuchung der Partikelgängigkeit und zur Klärung des Einflusses von Biomasse auf die Adsorptionsleistung der Module.

Nährmedium: 17 g/l Malzextrakt-Bouillon in dH₂O

2 g Presshefe wurden über Nacht in 500 ml Nährmedium in einem Schikanekolben (1 l) bei 30°C und 150 Upm inkubiert. Die optische Dichte am Ende der Fermentation betrug 10-12.

Mit dem Ziel, den Einfluss von Medienbestandteilen auf das Modellsystem zu unterbinden, wurde die Biomasse über Sartolab Bottle Top Filter abgetrennt, dreimal mit Phosphatpuffer gewaschen und auf die gewünschte OD durch Verdünnung mit Phosphatpuffer eingestellt.

Modellsystem 2 – *Pichia Pastoris* GS115/HSA (Invitrogen, Karlsruhe)

Nährmedium: 20 g Hefeextrakt, 10 g Pepton, 6% (v/v) Dextrose (Wachstumsmedium)

20 g Hefeextrakt, 10 g Pepton, 6% (v/v) Methanol (Expressionsmedium)

Nach Anzucht der Zellen in 200 ml Wachstumsmedium, wurden diese bei 1500 g abzentrifugiert, in 200 ml Expressionsmedium überführt und bei 28°C und 150 Upm über einen Zeitraum von 24 h inkubiert.

2.4.4 Ergänzende Daten

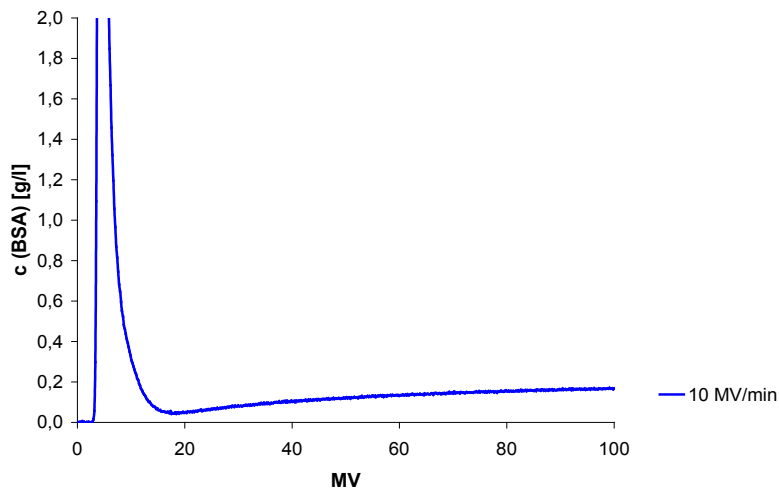


Abbildung 78: Verlauf der BSA-Konzentration während der Elution im Durchlaufverfahren bei 10 MV/min – vollständige Darstellung. c (BSA), BSA-Konzentration am Modulausgang; MV, Membranvolumen. Versuchsbedingungen: Elutionspuffer 1M NaCl in Phosphatpuffer; Modulnummer 7004783#2.

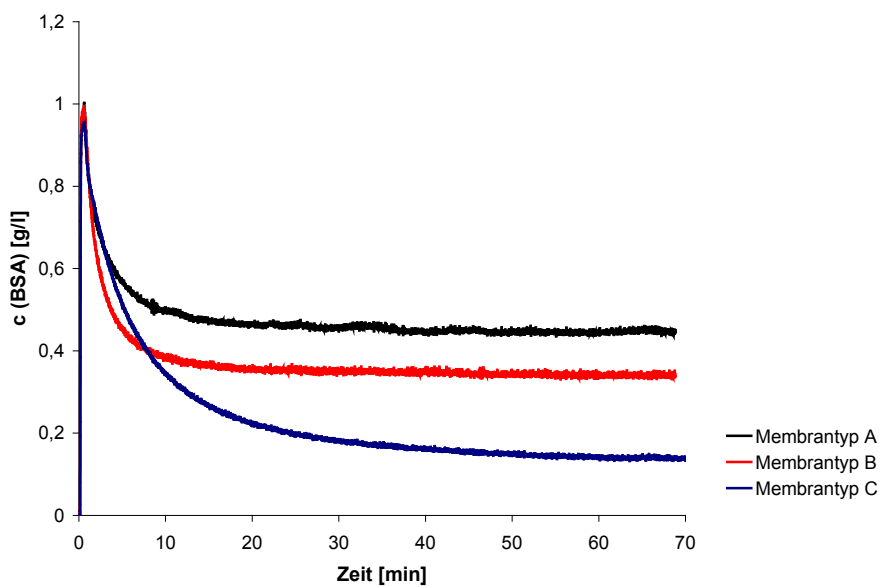


Abbildung 79: Zeitlicher Verlauf der BSA-Konzentration im Rezirkulationsbehälter unter Verwendung von Membranen (A-C) mit unterschiedlichem Pfropfgrad. A, niedriger Pfropfgrad; B, mittlerer Pfropfgrad; C, hoher Pfropfgrad; c (BSA), BSA-Konzentration im Rezirkulationsbehälter. Versuchsbedingungen: Proteinbeladung $0,8 \text{ mg/cm}^2$; Proteinkonzentration 1 mg/ml in Phosphatpuffer; Volumenstrom 12 MV/min ; Modulnummern 7030883 (Membrantyp A), 7030983 (Membrantyp B), 7030783 (Membrantyp C).

Lebenslauf

SCHULISCHE AUSBILDUNG

1984 – 1993
Willibrord – Gymnasium Emmerich
Abschluß: Abitur

WEHRDIENST

Juli 1993 – Juni 1994

BERUFSAUSBILDUNG

Juli 1994 – Februar 1997
Ausbildung zum Brauer und Mälzer
Binding-Brauerei AG, Frankfurt am Main

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

Februar – September 1997
Bierbrauer
Binding-Brauerei AG, Frankfurt am Main

seit November 2003
Wissenschaftlicher Mitarbeiter
Sartorius AG, Göttingen

STUDIUM

Seit Dezember 2005

Promotion

„Membranadsorbermodul zur Aufarbeitung
ungeklärter Bioprozessmedien“

Institut für technische Chemie

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität,
Hannover

Oktober 2003

Diplomarbeit

„Scale up mit Membranadsorbern am Beispiel
von humanem Blutplasma“

Technische Universität, Berlin

Oktober 1997 – Oktober 2003

Studium der Biotechnologie

Technische Universität, Berlin

September 2000 – September 2001

Studium der Biotechnologie

Dongseo University, Pusan, Süd-Korea