

Systematische Entwicklung und Optimierung
chromatographischer Methoden in einem
Bioprozess zur Herstellung von Malariavakzinen
nach dem *Quality by Design*-Konzept

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation

von

Jessica Thiesing-Paul, M.Sc.
geboren am 24. März 1982 in Stade

2017

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferentin: Prof. Dr. Ursula Rinas

Tag der Promotion: 28.09.2016

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2012 bis Mai 2016 im Forschungs- und Transferzentrum für Bioprocess- und Analysetechnik (FTZ BPAT) der Hochschule für Angewandte Wissenschaften unter der Leitung von Herrn Prof. Dr.-Ing. Reiner Luttmann und Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen angefertigt.

Ich möchte die nachfolgenden Zeilen dazu nutzen meinen besonderen Dank all denjenigen auszusprechen, die mich in dieser Zeit unterstützt und begleitet haben.

Allen voran möchte ich Frau Prof. Dr. Cornelissen für die Betreuung meiner Promotionsarbeit an der HAW Hamburg danken. Herrn Prof. Dr.-Ing Luttmann möchte ich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe des FTZ BPAT sowie für die Bereitstellung der Bioprocess- und Chromatographie-Anlagen danken. Meinen Dank möchte ich ebenfalls meinem Doktorvater an der Leibniz Universität Hannover, Prof. Dr. Scheper, sowie meiner Prüfungskommission, Frau Prof. Dr. Ursula Rinas und Herr Prof. Jürgen Alves, aussprechen.

Des Weiteren möchte ich noch allen Professoren und Mitarbeitern der HAW Hamburg für das mir entgegen gebrachte Vertrauen danken. Ihre Unterstützung und Förderung während meiner insgesamt 10-jährigen studentischen Laufbahn haben einen Großteil zu meiner persönlichen und fachlichen Entwicklung beigetragen. Danke für diese schöne Zeit!

Ich möchte mich auf diesem Wege auch bei allen Doktoranden der HAW Hamburg bedanken, die mich auf meinem Weg begleitet haben. Allen voran danke ich Domme und Björn für die ausdauernden, eloquenten, fachlichen und sozialen Konversationen. Sanni, dir danke ich für dein immer offenes Ohr und die unvergesslichen Tanzeinlagen. Janni, danke für die stets offenen Diskussionen und Sven, dir danke ich für die super Zusammenarbeit am integrierten Bioprocess. Ich wünsche allen eine erfolgreiche berufliche und private Entwicklung!

An der vorliegenden Arbeit haben insgesamt 16 Master- und Bachelor-Studierende mitgewirkt. Ich möchte hier allen für die jederzeit gute Zusammenarbeit danken. Allen voran möchte ich Arthur für die kooperative Entwicklung des Gesamtkonzeptes danken. Deine Masterarbeit war der Ausgangspunkt für die weitere Entwicklung meines Projektes. Für die harte Arbeit bei der Durchführung des integrierten Bioprocesses sowie für die daraus resultierenden Ergebnisse danke ich ganz besonders Sonja, Sarah, Miriam, Janko und Alina. Ihr ward ein tolles Team und ich möchte die Zeit mit Euch nicht missen.

Den Laboringenieuren Ha-Pe und Uli möchte ich für die Hilfestellung bei der Umsetzung technisch anspruchsvoller Aufgaben im Labor danken. Ohne Euch wäre der Prozess nur halb so gut gelaufen.

Meinen besonderen Dank möchte ich Kirsten, Larissa und Anja für die jederzeit offenen Worte aussprechen. Der Austausch mit Euch hat mir gezeigt, dass ich nicht alleine vor einem Riesen Berg voller Fragezeichen stehe. Ich hoffe wir halten auch weiterhin engen Kontakt und können unsere Erfahrungen an andere weitergeben.

Für die finanzielle Unterstützung sowie die mir ermöglichte Teilnahme am Qualifizierungsprogramm Führungskompetenzen möchte ich Pro Exzellenzia danken. Durch dieses Programm der Hansestadt Hamburg konnte ich mich auch über den Tellerrand hinaus mit anderen Doktorandinnen im Bereich MINT austauschen.

Danken möchte ich ebenfalls der FAZIT-Stiftung für die Kostenübernahme für die Kongressreise nach Boston zur PREP 2014. Ohne diese finanzielle Unterstützung wäre für mich diese Reise nicht möglich gewesen.

Abschließend möchte ich noch meiner meiner Familie für die Unterstützung und Motivation auch in schwierigen Zeiten danken. Ihr seid mein ein und alles und es ist schön zu wissen, dass egal was kommt, Ihr für mich da seid. Danke dafür!

Ganz besonders möchte ich auch meinem Mann David für seine ausdauernde Unterstützung und liebevollen Worte danken. Ich werde die Diskussionsabende auf unserem Balkon nicht vergessen. Du hast mich auch in verzweifelten Phasen immer wieder motiviert diese Arbeit abzuschließen. Danke, dass Du nie an mir gezweifelt hast!

*„Man muß an seine Berufung glauben und alles daransetzen,
sein Ziel zu erreichen.“*

(Marie Curie, 1867-1934)

Kurzfassung

Jessica Thiesing-Paul

Systematische Entwicklung und Optimierung chromatographischer Methoden in einem Bioprozess zur Herstellung von Malariavakzinen nach dem *Quality by Design*-Konzept

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wird eine Strategie zur Entwicklung und Optimierung der chromatographischen Methoden eines integrierten Bioprozesses auf der Basis des *Quality by Design*-Ansatzes vorgestellt.

Als Produkte des Herstellungsprozesses dienten zwei Varianten eines Malariavakzin-Kandidaten (P-D1M1 und D1M1-His). Die Fusionsproteine bestehend aus jeweils zwei Oberflächenproteinen des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* wurden in Stabilitätsstudien unter verschiedenen Milleubedingungen mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung untersucht. Die Ergebnisse der durchgeführten Studien werden in Bezug auf proteolytische Aktivitäten analysiert und diskutiert.

Der zu Beginn der Arbeit etablierte Herstellungsprozess mit den Teilschritten (a) Expression der Zielproteine mit der Hefe *Pichia pastoris*, (b) Primärreinigung durch *Expanded Bed Adsorption* Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie und (c) anschließende Feinreinigung durch Größenausschlusschromatographie wurde um den Prozessschritt der Ultra/Diafiltration erweitert.

Anhand der Immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie wird die Strategie zur Entwicklung und Optimierung der chromatographischen Methode in *downscale*-Experimenten nach dem *Quality by Design*-Konzept vorgestellt. Im Fokus des Konzeptes steht die Anwendung der statistischen Versuchsplanung und damit die mathematische Beschreibung der Zusammenhänge definierter Einflussfaktoren auf die Gütekriterien des Produktes sowie des Prozesses.

Der strategische Ansatz wurde bei der Neuentwicklung einer zusätzlichen multi-modalen chromatographischen Aufarbeitung des Zielproteins P-D1M1 erprobt und in den hier vorgestellten Herstellungsprozess skaliert.

Schlüsselwörter:

Chromatographie, Optimierung, Malariavakzine, Quality by Design, statistische Versuchsplanung, integrierter Bioprozess

Abstract

Jessica Thiesing-Paul

Systematic optimization of chromatographic methods in a bioprocess to produce Malaria vaccine candidates: A Quality by Design approach

The present work describes a strategy for the development and optimization of chromatographic methods of an integrated bioprocess on the basis of the Quality by Design approach.

Two variants of a Malaria vaccine candidate (P-D1M1 and D1M1-His) were used in the manufacturing process. The fusion proteins consist of two surface proteins of the Malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Protein stability was investigated systematically under specific conditions using Design of Experiments. Results of these studies are analyzed and discussed in terms of proteolytic activities.

An ultra/diafiltration step was integrated in the existing bioprocess with the partial steps (a) expression of the target protein using the yeast *Pichia pastoris*, (b) primary capture by expanded bed adsorption immobilized metal ion affinity chromatography and (c) subsequent purification via size exclusion chromatography.

A Quality by Design-conceived strategy for development and optimization of immobilized metal ion affinity chromatography in downscale experiments is presented. Focus of this concept is the use of Design of Experiments and thus the mathematical description of the relationships among defined influencing factors with impact on the product and process quality criteria.

The strategic approach was tested in development and optimization procedure of an additional multimodal chromatographic purification of the target protein P-D1M1. Afterwards this method was applied for the production process of the target protein.

Keywords:

Chromatography, Optimization, Malaria vaccines, Quality by Design, Design of Experiments, integrated Bioprocess

Inhalt

1. Einleitung	1
2. Zielsetzung der Arbeit	2
3. Theoretische Grundlagen	3
3.1 Die Malariavakzine	3
3.1.1 Herausforderungen bei der Entwicklung eines Malariavakzins	3
3.1.2 Die Zielproteine – Varianten eines Malariavakzinkandidaten	6
3.2 Der integrierte Bioprozess	11
3.2.1 Gesamtkonzept des integrierten Bioprozesses	11
3.2.2 Expression sekretorischer Proteine mit <i>Pichia pastoris</i>	12
3.2.3 Konzepte zur Aufarbeitung sekretorischer Proteine	15
3.2.4 Proteinaufreinigung mit Hilfe chromatographischer Methoden	17
3.2.4.1 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)	18
3.2.4.2 Multimodale Chromatographie (MMC)	20
3.2.4.3 Größenausschlusschromatographie (SEC)	21
3.2.4.4 Wahl eines geeigneten Adsorbentmaterials	25
3.3 Das <i>Quality by Design</i> -Prinzip	28
3.3.1 Hintergrund und Motivation	28
3.3.2 Konzept des <i>Quality by Design</i> -Ansatzes	29
3.3.3 Prozessentwicklungsstrategien	31
4. Material und Methoden	32
4.1 Quantitative Analysemethoden	32
4.1.1 Kolorimetrische Gesamtproteinbestimmung	32
4.1.2 Gesamtproteinbestimmung mit UV-Vis-Spektroskopie	32
4.1.3 Densitometrische SDS-PAGE-Analyse	33
4.1.4 Berechnung der Zielproteinkonzentration	33

4.2 Qualitative Analysemethoden	34
4.2.1 Analytische SE-HPLC.....	34
4.2.2 Nachweis proteolytischer Aktivität durch Zymographie	34
4.3 Anwendung des QbD-Konzeptes im integrierten Bioprozess	35
4.3.1 Vorgehensweise bei der Implementierung	35
4.3.2 Grundlagen der statistischen Versuchsplanung (SVP).....	37
4.4 Stabilitätsstudien der Malariavakzinkandidaten	42
4.5 Analyse der Bindungskapazität eines Adsorbers.....	46
4.5.1 Aufnahme von Adsorptionsisothermen.....	46
4.5.2 Aufnahme von Durchbruchskurven	48
4.5.3 Untersuchte Adsorbermaterialien	49
4.6 Zweistufige Aufreinigungsmethode zur Prozessoptimierung	51
4.7 Systematische Optimierung der chromatographischen Methoden.....	53
4.7.1 Definition der Gütekriterien.....	53
4.7.2 Scouting möglicher Einflussfaktoren.....	53
4.7.3 Wahl des Regressionsmodells und Versuchsplans.....	56
4.7.4 Durchführung der Experimente.....	57
4.7.5 Rohdatenanalyse.....	58
4.7.6 Regressionsanalyse	58
4.7.7 Prüfung der Gültigkeit des Modells.....	60
4.8 <i>Downscale</i> -Methode der IMAC	60
4.9 Arbeiten im integrierten Bioprozess	61
4.9.1 Erweiterung der Prozessanlage.....	61
4.9.2 Produktionsprozess zur Herstellung von P-D1M1	63
4.9.3 Produktionsprozess zur Herstellung von D1M1-His	64

5. Ergebnisse und Diskussion	65
5.1 Stabilitätsbetrachtung der Zielproteine	65
5.1.1 Proteolytische Spaltung im Kulturüberstand	65
5.1.2 Stabilität in wässrigen Puffersystemen.....	72
5.1.3 Zusammenfassung und der <i>Product Design Space</i>	81
5.2 Untersuchung der IMAC im <i>downscale</i> -Verfahren	82
5.2.1 Analyse der statischen und dynamischen Bindungskapazität.....	82
5.2.2 Optimierungspotential der IMAC	85
5.2.3 Ermittlung des optimalen Arbeitspunktes mit Hilfe der SVP	88
5.2.4 Proteolytische Aktivität nach Cu ²⁺ - und Ni ²⁺ -IMAC.....	99
5.2.5 Zusammenfassung und der <i>Process Design Space</i> der IMAC	105
5.3 Entwicklung einer weiteren chromatographischen P-D1M1-Aufarbeitung ..	106
5.3.1 Auswahl der chromatographischen Methode und des Materials	106
5.3.2 Optimierungspotential der MMC	108
5.3.3 Auslegung des Arbeitspunktes der MMC mit Hilfe der SVP	111
5.3.4 Zusammenfassung des <i>Process Design Space</i> der MMC	117
5.4 Produktion der Malariaimpfung im integrierten Bioprozess	118
5.4.1 Herstellung von P-D1M1	118
5.4.2 Herstellung von D1M1-His	121
5.4.3 Vergleich und Diskussion der Herstellungskampagnen	124
6. Zusammenfassung und Ausblick	128
7. Anhang	130
7.1 Zusammenfassung der Ausgangsmaterialien	130
7.2 Kultivierungen zur Herstellung der Ausgangsmaterialien	131
7.3 Ermittelte Parameter der Adsorptionsisothermen.....	132
7.4 Rohdaten der SVP-Analyse der chromatographischen Methoden	133
8. Literatur	136

Abkürzungen

AMA	:=	<i>Apical Membrane Antigen</i>
BB	:=	Bindungspuffer (<i>buffer binding</i>)
BE	:=	Elutionspuffer (<i>buffer elution</i>)
CF-UF	:=	<i>Crossflow-Ultrafiltration</i>
CP	:=	<i>Center Point</i>
CPP	:=	<i>Critical Process Parameter</i>
CQA	:=	<i>Critical Quality Attribute</i>
CV	:=	Säulenvolumen (<i>column volume</i>)
DBK	:=	Durchbruchskurve
DiCo	:=	<i>Diversity Covering</i>
EBA	:=	<i>Expanded Bed Adsorption</i>
ER	:=	Endoplasmatisches Retikulum
FDA	:=	<i>Food and Drug Administration</i>
ICH	:=	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IDA	:=	Iminodiessigsäure
IQR	:=	Interquartilabstand
IMAC	:=	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
MMC	:=	Multimodale Chromatographie
MSP	:=	<i>Merozoite Surface Protein</i>
MWCO	:=	<i>Molecular weight cut-off</i>
NTA	:=	Nitrilotriessigsäure
NV	:=	Normalverteilung
PAT	:=	<i>Process Analytical Technology</i>
<i>Pf</i>	:=	<i>Plasmodium falciparum</i>
QbD	:=	<i>Quality by Design</i>
QTPP	:=	<i>Quality Target Product Profile</i>
RFB	:=	<i>Repeated Fed-Batch</i>
SEC	:=	Größenausschlusschromatographie (<i>size exclusion chromatography</i>)
SVP	:=	Statistische Versuchsplanung
WHO	:=	<i>World Health Organisation</i>

Nomenklatur

A_{280}	:=	Absorption bei 280 nm	[AU]
$a_{i,j,0}$:=	Normierter und skaliertes Regressionskoeffizient	[-]
A_K	:=	Absorption bei 280 nm im Teilsystem K	[AU]
$b_{i,j,0}$:=	Physikalischer Regressionskoeffizient	[div]
B_{IK}	:=	Bandenvolumen des Proteins I aus dem Teilsystem K	[-]
c_{IK}	:=	Konzentration des Proteins I im Teilsystem K	[gl ⁻¹]
c_I^*	:=	Konzentration des Proteins I im Gleichgewicht der Reaktion	[gl ⁻¹]
c_{XK}	:=	Konzentration der Komponente X im Teilsystem K	[mol ⁻¹]
d_K	:=	Durchmesser des Teilsystems K	[cm]
f_c	:=	Faktor für die Effizienz einer Trennsäule	[-]
F_{LK}	:=	Lineare Flussrate im Teilsystem K	[mlmin ⁻¹]
F_{VK}	:=	Volumetrische Flussrate im Teilsystem K	[cmh ⁻¹]
H	:=	Theoretische Bodenhöhe	[mm]
k_1	:=	Assoziationsrate	[mgml ⁻¹]
k_2	:=	Dissoziationsrate	[mgml ⁻¹]
K_D	:=	Dissoziationskonstante	[mgml ⁻¹]
L	:=	Trennsäulenlänge	[mm]
m_{IK}	:=	Masse des Proteins I im Teilsystem K	[mg]
MV	:=	Modellvalidität	[-]
MW_I	:=	Molekulargewicht der Proteins I	[kDa]
n_X	:=	Anzahl der Komponente X	[-]
N	:=	Anzahl der theoretischen Böden	[-]
pH_K	:=	pH-Wert im Teilsystem K	[-]
pI_I	:=	Isoelektrischer Punkt des Proteins I	[-]
P_{IK}	:=	Reinheit des Proteins I im Teilsystem K	[%]
p_K	:=	Druck im Teilsystem K	[bar]
Q^2	:=	Vorhersagegüte	[%]
Q_I	:=	Bindungskapazität des Proteins I	[mgml ⁻¹]
Q_I^*	:=	Bindungskapazität des Proteins I im Gleichgewicht der Reaktion	[mgml ⁻¹]
R^2	:=	Bestimmtheitsmaß	[-]
R_I	:=	Wiederfindung des Proteins I	[%]
RP	:=	Reproduzierbarkeit	[-]

X		Nomenklatur
s	:=	Standardabweichung [div]
V_K	:=	Volumen des Teilsystems K [ml]
$X_{i,j}$:=	Normierter und skaliertes Einflussfaktor [-]
$x_{i,j}$:=	Physikalischer Einflussfaktor [div]
Y_{IK}	:=	Ausbeute des Proteins I im Teilsystem K [%]
y_m	:=	Regressionsfunktion des Gütekriteriums m [-]
ε_{280}	:=	Extinktionskoeffizient bei 280 nm [$M^{-1}cm^{-1}$]
ϑ_K	:=	Temperatur im Teilsystem K [$^{\circ}C$]
σ_K	:=	Leitfähigkeit im Teilsystem K [$mScm^{-1}$]

Teilsysteme

C	:=	Chromatographie
col	:=	Chromatographische Säule (<i>column</i>)
D	:=	Konditionierung
E	:=	<i>Capture</i> durch EBA IMAC
e1C	:=	Eluatsfraktion 1 der zweistufigen Chromatographie
e2C	:=	Eluatsfraktion 2 der zweistufigen Chromatographie
F	:=	Expression im Bioreaktor
KV	:=	Küvette
L	:=	Flüssigphase
m	:=	Mobile Phase
M	:=	Medienphase
s	:=	Stationäre Phase
Sa	:=	Probe
Sy	:=	System
TMU	:=	Transmembrandruck der Ultra/Diafiltration
U	:=	Ultra/Diafiltration

Proteine

P1	:=	Zielprotein P-D1M1
P2	:=	Spaltprodukt D1M1 aus P-D1M1
P3	:=	Zielprotein D1M1-His
P4	:=	Spaltprodukt D1 aus D1M1-His
Ptot	:=	Gesamtprotein

Komponenten

AA	:=	Aminosäure
AA ⁻	:=	Negativ geladene Aminosäure
AA ⁺	:=	Positiv geladene Aminosäure
His	:=	Histidin
Imi	:=	Imidazol
MeSO ₄	:=	Metallsulfat
Salt	:=	Eingesetztes Salz
SS	:=	Cystin
Trp	:=	Tryptophan
Tyr	:=	Tyrosin

Indizes

0	:=	Startzeitpunkt
Brad	:=	Bradford
cal	:=	Kalkuliert, berechnet
dyn	:=	Dynamisch
i,j	:=	Zahlenindex, Laufvariable
max	:=	Maximal
min	:=	Minimal
N _j	:=	Nummer des Experimentes j
norm	:=	Normiert
stat	:=	Statisch
UV	:=	UV-Vis-Spektroskopie

1 Einleitung

Die biotechnologische Herstellung von Pharmazeutika hat in den vergangenen Jahren eine rasante Entwicklung erfahren. Die Anzahl an zugelassenen Biopharmazeutika in Deutschland stieg in den letzten zehn Jahren um 46 % auf 226 Präparate biotechnologischer Herkunft. Der erzielte Umsatz der Unternehmungen im Jahr 2014 steigerte sich auf 7.5 Milliarden Euro. Diese Entwicklung zeichnet sich noch deutlicher in der Anzahl an Biopharmazeutika ab, die sich in der Pipeline der pharmazeutischen Industrie befinden. Die Anzahl erhöhte sich im selben Zeitraum um 136 % auf 604 Arzneimittel biotechnologischer Herkunft. Hinter der Wirkstoffgruppe der monoklonalen Antikörper mit einem Anteil von 59.1 % stellen Impfstoffe mit 18.7 % eine vielversprechende Wirkstoffgruppe dar. (Lücke et al., 2015)

Bei den Herstellungsverfahren ist die biopharmazeutische Industrie zunehmend abhängig von Innovationen und Veränderungen, um den kommerziellen Ansprüchen einer höheren Produktivität, einer verbesserter Qualität und einem geringeren Kostenaufwand zu begegnen (Gottschalk et al., 2012). Um diesen wachsenden marktbedingten Anforderungen gerecht zu werden, zeichnete sich in den letzten Jahren ein grundlegender Paradigmenwechsel der regulatorischen Behörden, wie der *Food and Drug Administration*, ab.

Seit der Gründung der *Quality by Design/Process Analytical Technology*-Initiative im Jahr 2004 unterstützt die *Food and Drug Administration* die Umsetzung des ganzheitlichen *Quality by Design*-Konzeptes bei der Entwicklung von Biopharmazeutika (Beaver und Ferreira, 2014). Im Vordergrund dieser Vorgehensweise steht die Qualität des herzustellenden Produktes und damit die Sicherheit des Patienten (US Food and Drug Administration, 2009a). Der Ansatz nach *Quality by Design* soll zu einem verbesserten Produkt- und Herstellungsverständnis führen. Die Umsetzung des Konzeptes in der industriellen Forschung und Entwicklung von Biopharmazeutika erfordert einen erhöhten Ressourcenaufwand (Rathore und Winkle, 2009), weshalb die Einführung des Konzeptes einen langwierigen Prozess darstellt.

Die Fortschritte der biotechnologischen Industrie in der Produktivitätssteigerung sind enorm. In den vergangenen 25 Jahren konnte die Produktivität der Expression rekombinanter Proteine durch die Entwicklungen im *upstream*-Bereich um das 20-fache gesteigert werden (Hacker et al., 2009). Dieser Trend konnte jedoch nicht im *downstream*-Sektor umgesetzt werden, so dass dieser heute das Nadelöhr eines Herstellungsprozesses darstellt.

Innerhalb des *downstream*-Sektors stellt die Aufarbeitung mit Hilfe chromatographischer Methoden einen der größten Kostenfaktoren dar (Gottschalk, 2013). Insbesondere hohe Investitionskosten für chromatographische Medien sowie der benötigte zeitliche Aufwand, die für die Methoden- und Prozessentwicklung aufgewendet werden müssen, erzeugen eine hohe finanzielle Belastung. Die Auswahl einer geeigneten Methode, sowie eines geeigneten Materials ist aufgrund der enormen Vielfalt der auf dem Markt angebotenen Materialien hoch komplex und umfangreich.

Als ein geeignetes Hilfsmittel für die Beschreibung der Produktqualität sowie der Prozessquantität kann die statistische Versuchsplanung genutzt werden. Durch die multivariate Analyse können Zusammenhänge der Eingangsgrößen sowie Interaktionen zwischen den Einflussfaktoren identifiziert und quantifiziert werden (Eriksson et al., 2008).

Die strategische Vorgehensweise nach dem *Quality by Design*-Konzept sowie die Anwendung der statistischen Versuchsplanung schon in frühen Phasen der Forschung und Entwicklung könnte zu einer Reduktion des Zeit- und Kostenaufwandes führen und das Produkt- und Prozessverständnis erhöhen.

Mit dieser Arbeit soll ein Beitrag zur Anwendungsmöglichkeit des Konzeptes im wissenschaftlichen Umfeld geleistet werden und die Aktualität dieses Ansatzes hervorheben.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung der Arbeit umfasste die Entwicklung und Erprobung einer Strategie zur Optimierung chromatographischer Methoden nach dem *Quality by Design*-Konzept. Im Fokus stand dabei der im Forschungs- und Transferzentrum Bioprozess- und Analysetechnik entwickelte integrierte Bioprozess zur Herstellung von Malaria-vakzin-kandidaten.

Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der strategischen Entwicklung und Optimierung der chromatographischen Methoden des Bioprozesses mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung. Die sinnvolle Verkettung von Produktqualität und Prozessquantität standen dabei im Vordergrund der Untersuchungen.

Ausgangspunkt der Arbeit war eine Betrachtung des bestehenden Prozessablaufes. Abhängig von der Prozessanalyse konnten Prozessschritte ersetzt oder sinnvoll ergänzt werden.

Aufgrund in der Vergangenheit auftretender Instabilitäten der hergestellten Malaria-vakzin-Kandidaten und im Hinblick der zentralen Rolle der Produktqualität nach dem *Quality by Design*-Prinzip wurde ein weiterer Fokus auf die Identifikation möglicher kritischer Verunreinigungen aus dem *up-* oder *downstream*-Bereich des Bioprozesses gelegt. Innerhalb dieser Untersuchungen stellte die Erprobung der statistischen Versuchsplanung für Stabilitätsstudien einen weiteren Arbeitspunkt dar.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Die Malariavakzine

3.1.1 Herausforderungen bei der Entwicklung eines Malariavakzins

In den vergangenen Jahrzehnten ist die Bekämpfung der Tropenkrankheit Malaria immer weiter in den Vordergrund gerückt. Derzeitig stehen weltweit 3.2 Milliarden Menschen unter dem Risiko, an Malaria zu erkranken. In 2013 wurden weltweit 198 Millionen Infektionen mit Malaria von der World Health Organisation (WHO) registriert. Ein tödlicher Verlauf der Infektion durch den Erreger *Plasmodium* wurde in 584 Tausend Fällen verzeichnet. Von diesen Todesfällen wurden 90 % in den afrikanischen Regionen erfasst, wobei in 78 % der Fälle Kinder unter fünf Jahren betroffen waren. (World Health Organisation, 2014)

Für den Menschen sind die Plasmodienspezies *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* und *P. knowlesi* infektiös (Richards und Beeson, 2009). Schätzungen gehen davon aus, dass die Infektion mit *P. falciparum* die Haupttodesursache bei Kindern unter fünf Jahren darstellt (Elliott und Beeson, 2008). Zwischen den Jahren 2000 und 2014 konnten Erfolge durch klassische Bekämpfungsstrategien, wie beispielsweise den Einsatz von Insektiziden, Expositions- und/oder medikamentöse Prophylaxe beim Rückgang der Neuinfektionen erzielt werden.

Die vermehrte Anwendung von Insektiziden bei der Bekämpfung des Malariaüberträgers, der Anopheles-Mücke, führte jedoch zur Ausbildung von Resistenzen. Ein Beispiel hierfür ist die Resistenzbildung gegenüber der meist verwendeten Insektizidklasse, den Pyrethroiden, welche auf Moskitonetze aufgetragen werden (Expositionsprophylaxe). In 53 von 65 an die WHO berichtenden Staaten wurden seit 2010 Resistenzen gegenüber den Pyrethroiden nachgewiesen. Die WHO empfiehlt dennoch die Verwendung dieser Insektizidklasse und eine weitere Überwachung der Resistenzausbildungen. (World Health Organisation, 2014)

Als Erstlinienbehandlung bei auftretenden Symptomen von *Malaria tropica* wird von der WHO eine Artemisinin-basierte Kombinationstherapie empfohlen. Diese Therapie führt zu einem 100- bis 1000-fachen Rückgang der Parasitenzahl und somit zu einem schnellen Rückgang der Symptome (UNAIDS, 2010). Der rasante Anstieg dieser Therapieform führte jedoch ebenfalls zu einer Resistenzbildung des Erregers gegenüber Artemisinin und deren Derivaten (Dondorp et al., 2009).

Eine medikamentöse Vorsorgebehandlung und/oder Mitnahme eines Notfallmedikamentes wird für Reisende in gefährdete Malariagebiete von der WHO empfohlen. Die Auswahl der Medikamente für die Prophylaxe richtet sich dabei nach der jeweiligen Erregerempfindlichkeit (Resistenzen) innerhalb der zu bereisenden Region (Privates Tropeninstitut Dr. Gontard, 2015).

Medikamente zur Malariaphylaxe werden in zwei Gruppen eingeteilt. Während die eine Wirkstoffgruppe die Erreger abtötet, dämmt die andere Wirkstoffgruppe die Vermehrung des Erregers ein. Das momentan wirksamste Medikament zur Chemo-prophylaxe gegen *Malaria tropica* ist Malarone.

Malarone ist ein Kombipräparat aus beiden Wirkstoffklassen und enthält die Wirkstoffe Atovaquon und Proguanil. Aufgrund seines breiten Wirkspektrums und den geringen Nebenwirkungen kann das Medikament als Prophylaxe- oder Notfallmedikament verwendet werden. (Pharmazeutische Zeitung online, 2015)

Eine weitere Strategie zur Bekämpfung der Malaria ist die Entwicklung von Impfstoffen. Aufgrund des komplexen Entwicklungszyklus (Abb. 3.1) mit den unterschiedlichen Erscheinungsformen des Erregers ist die Entwicklung eines effektiven Impfstoff-kandidaten erschwert (Good et al., 1998). Malariavakzine werden in die drei Gruppen *pre-erythrocytic*, *blood-stage* und *transmission-blocking* Vakzine unterteilt (PATH Malaria Vaccine Initiative, 2015). Eine Strategie zur effektiven Immunisierung soll durch den Einsatz eines multivalenten Impfstoffes garantiert werden (Doolan und Hoffman, 1997).

Derzeit ist noch kein Impfstoff von der *Food and Drug Administration* (FDA) oder *European Medicines Agency* (EMA) zugelassen. Der am weitesten entwickelte und vielversprechendste Kandidat ist RTS,S (Gordon et al., 1995). RTS,S ist ein Malariavakzin, das die Vermehrung des Erregers in der *pre-erythrocytic* Phase verhindert. Er besteht zu 25 % aus einem Oberflächenprotein der sporozoiten Form des Erregers *P. falciparum* sowie zu 75 % aus dem Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg). Die Impfung mit dem Wirkstoff führte in Studien zu einer humoralen- sowie zellulären Immunantwort (Fazekas, 2011). Dem Impfstoff wird als Adjuvants zur Verstärkung der Immunreaktion eine Squalen-in-Wasser-Emulsion, bestehend aus monophosphoril Lipid A und Saponin aus der Rinde von *Quillaja saponaria*, zugesetzt (Agnandji et al., 2011). Diese Kombination (RTS,S/AS01) zeigte in der klinischen Phase III einen zufriedenstellenden Rückgang von ca. 50 % der schweren Erkrankung bei Kindern unter fünf Jahren. Bei Erwachsenen zeigte die Impfung nur eine geringe Effektivität. Das Antikörperlevel gegen *blood-stage* Antigene in RTS,S geimpften Kindern ist ebenfalls gering (Bejon et al., 2011). In Bezug auf die Entwicklung eines multivalenten Impfstoffes ist die Kombination dieses *pre-erythrocytic* Impfstoffes mit einem *blood-stage* Vakzin von hoher Bedeutung und könnte das Risiko einer komplizierten Malariaerkrankung reduzieren.

Die Resistenzbildung des Erregers stellt bei der Bekämpfung und Behandlung eine große Herausforderung dar und kann mit dem heutigen Wissensstand nicht verhindert sondern lediglich durch Verwendung andersartiger Insektizide oder Therapeutika eingedämmt werden. Aktuell stehen jedoch keine effektiven Ersatzstoffe zur Verfügung, so dass vielfältige Resistenzen in Kauf genommen werden müssen.

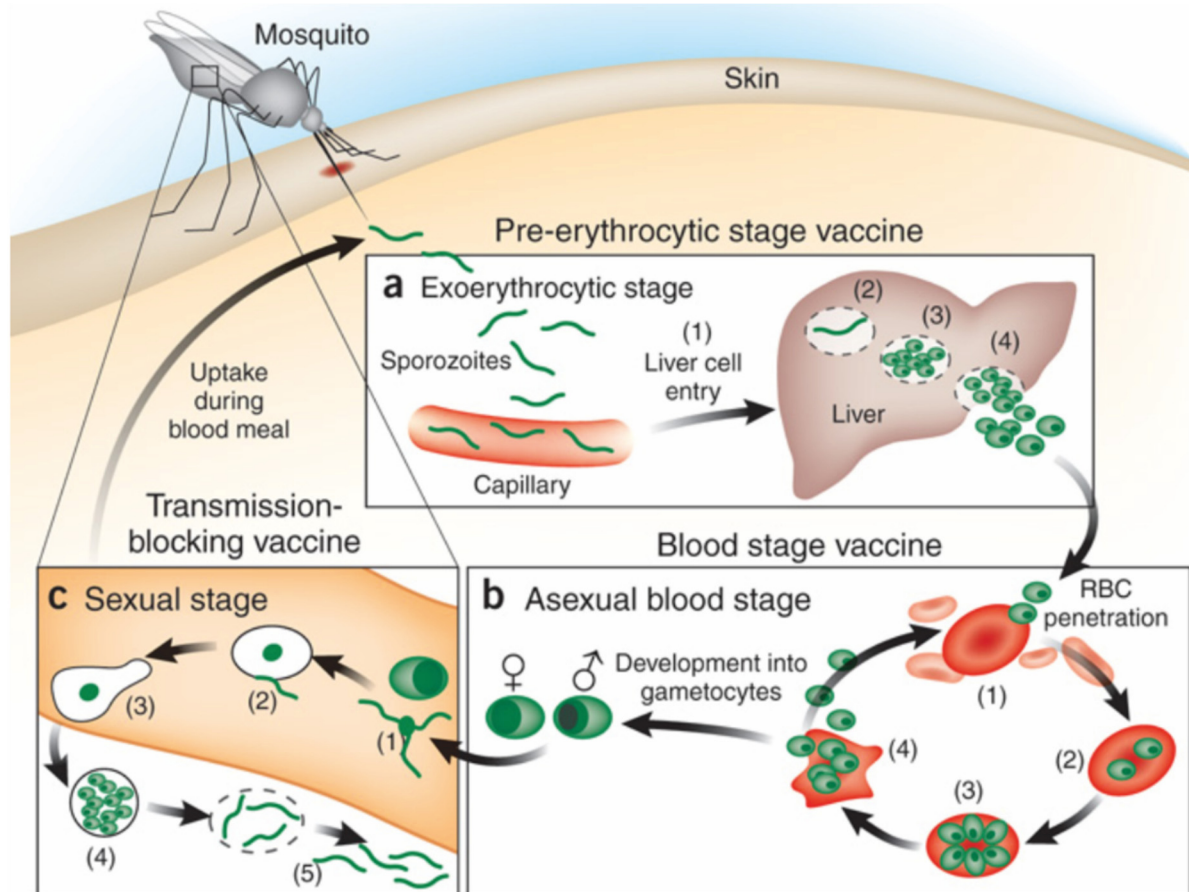


Abb. 3.1: Lebenszyklus des Malariaerregers *Plasmodium*. **a** Mit dem Stich einer weiblichen Anopheles Mücke wird der Erreger in seiner sporoziten Form in den Blutkreislauf des Menschen übertragen. Durch den Blutstrom gelangen die Sporoziten in die Leber (1). Hier reifen (2) und vermehren (3) sie sich klinisch unbemerkt und bilden Schizonten aus. Innerhalb der Schizonten bildet sich die merozoite Form des Erregers, die wiederum in den Blutkreislauf entlassen wird (4). Während der *blood-stage* **b** des Erregers, dringen die Merozoiten in die Erythrozyten (1, *RBC penetration*) ein, reifen (2) und vermehren (3) sich dort, um anschließend die Blutzellen von innen heraus zu zerstören (4). Hierbei können 20 bis 32 neue Merozoiten gebildet werden, die den Zyklus neu beginnen können (4 zu 1). In den Erythrozyten beginnen einige Merozoiten sich in eine sexuelle Form umzuwandeln, den Gametozyten. Diese Form des Erregers gelangt dann durch einen weiteren Stich in eine weitere Anopheles Mücke. **c** Im Darm der Mücke kann sich durch die Befruchtung einer weiblichen Gametozyte durch eine männliche (2) eine Zygote (3) ausbilden. Nach zwei bis drei Wochen Entwicklungszeit (4) werden bis zu 1000 neue Sporoziten freigesetzt (5) und wandern zur Speicheldrüse der Mücke. (Wang et al., 2009; Engwerda und Good, 2008)

Gegenwärtig ist eine Anzahl an *blood-stage* Vakzinen in klinischen Phasen, die als Oberflächenantigene der Merozoiten identifiziert wurden (Arama und Troye-Blomberg, 2014; World Health Organisation, 2015). Zu diesen potentiellen Malariavakzinen gehören die *Diversity Covering* (DiCo)-Proteine des Oberflächenproteins *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen (*PfAMA1*) sowie das *Merozoite Surface Protein* (MSP1). Eine Variante der DiCo-Proteine befindet sich derzeit in einer Sicherheits- und Immunogenitätsstudie der klinischen Phase Ib (U.S. National Institutes of Health, 2014). Varianten des MSP1 wurden in Kombination mit weiteren Oberflächenproteinen erfolgreich in klinischen Studien getestet (Schwartz et al., 2012).

Beide Proteine sind auf den Merozoiten in der asexuellen *blood-stage* Phase des Erregers lokalisiert (Richards und Beeson, 2009; Cowman und Crabb, 2006). AMA1 ist zudem als Oberflächenprotein der Sporozoiten identifiziert und ist möglicherweise auch an der Invasion der Leberzellen beteiligt (Silvie et al., 2004). MSP1 konnte ebenfalls bei der Vermehrung des Parasiten in der Leber nachgewiesen werden (Szarfman, 1988). Durch die Lokalisation der Proteine in mehreren Entwicklungsstadien des Plasmodiums wird diesen Antigenen ein hohes Potential für einen möglichen Impfstoff zugesprochen (Remarque et al., 2008a; Holder, 2009).

3.1.2 Die Zielproteine – Varianten eines Malariavakzinkandidaten

Die Zielproteine dieser Arbeit sind Fusionsproteine aus Varianten der Oberflächenproteine *PfAMA1* und MSP1. In nativer Form sind beide Proteine polymorph. MSP1 tritt in nativer Form in zwei Varianten auf (Tanabe et al., 1987). Die 19 kDa C-terminale Region des nativen MSP1-Proteins ist hoch konserviert, sodass nur vier bis sechs Aminosäuren variabel sind. *PfAMA1* unterliegt einem starken Polymorphismus (Takala und Plowe, 2009). Über 15 % der Aminosäuren können variieren, ohne die Funktion des Proteins beim Eindringen in die Blutzellen zu beeinflussen (Remarque et al., 2008b).

Um diese natürliche Variabilität in der Aminosäuresequenz abzudecken, wurden drei DiCo-*PfAMA1*-Proteine (D1, D2 und D3) vom *Biomedical Primate Research Center* (BPRC) in den Niederlanden entwickelt (Remarque et al., 2008b). Diese DiCo-*PfAMA1*-Proteine wurden mit zwei Varianten der 19 kDa C-terminalen Region des MSP1 (MSP1₁₉) (Variante M1 und M2) fusioniert und in *P. pastoris* KM71H transformiert. Die vereinfachte schematische Darstellung der entwickelten Multikomponentenvakzine sowie deren Domänenstruktur und Bezeichnung sind in Abb. 3.2 dargestellt.

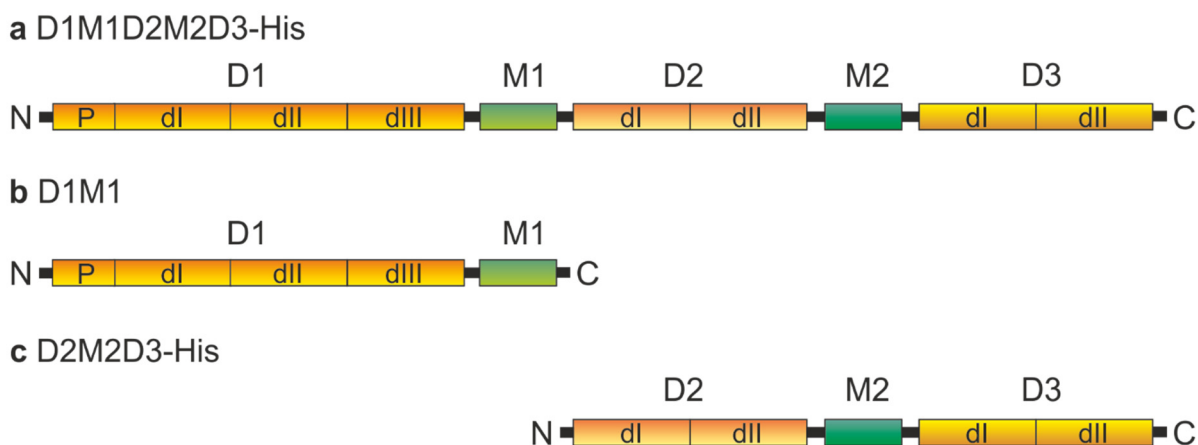


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der vom BPRC entwickelten Multikomponentenvakzine. a D1M1D2M2D3-His, b D1M1 und c D2M2D3-His. (Martens, 2014)

Eine Immunisierung mit verschiedenen Varianten der DiCo-MSP1₁₉-Proteine führte in präklinischen Studien zu einer erhöhten Antikörperproduktion sowie zu einer Inhibierung des Wachstums und/oder der Erythrozyteninvasion der Plasmodien durch die produzierten Antikörper. (Faber et al., 2013)

Die Kombination der drei DiCo-Varianten mit den zwei MSP1₁₉-Varianten führt zu dem in Abb. 3.2 a gezeigten Fusionsprotein und wurde zunächst als möglicher Impfstoff favorisiert. Untersuchungen der Arbeitsgruppe Faber et al. zeigten jedoch mehrere Nachteile. Zum einen konnte das Protein mit einem Molekulargewicht von 150 kDa nicht in geeigneten Mengen mit dem verwendeten Expressionssystem *P. pastoris* hergestellt werden und zum anderen zeigten präklinische Studien ein schlechteres immunologisches Profil als die Kombination der kleineren Fusionsproteine D1M1 und D2M2D3 (Abb. 3.2 b und c).

Für eine Charakterisierung der Fusionsproteine bietet sich zunächst die Betrachtung des natürlichen Eindringprozesses in die Erythrozyten an.

Das Oberflächenprotein *PfAMA1* unterliegt beim Invasionsprozess der Merozoiten in die Erythrozyten einem natürlichen proteolytischen Spaltprozess. Bei dieser Biosynthese wird die Prodomäne (P) des Vorläuferproteins abgespalten (Narum und Thomas, 1994) und die so entstandene Ektodomäne einer weiteren Prozessierung unterworfen (Howell et al., 2001). Die Sekundärstruktur der Ektodomäne des *PfAMA1*-Proteins führt zur Bildung von drei Unterdomänen (dI, dII und dIII), die durch acht Disulfidbrückenbindungen definiert werden (Hodder et al., 1996). In Domäne I besitzt das Protein eine hydrophobe Tasche, welche die Merozoiten befähigt, mit dem Membranprotein RON2 der Erythrozyten zu interagieren und so die Invasion ermöglicht (Srinivasan et al., 2011; Lamarque et al., 2011; Bai et al., 2005).

Ebenfalls bei dem Invasionsprozess beteiligt ist das MSP1. Abb. 3.3 zeigt die natürliche Prozessierung der Pro-Sequenz bis zum hoch konservierten MSP1₁₉-Fragment.

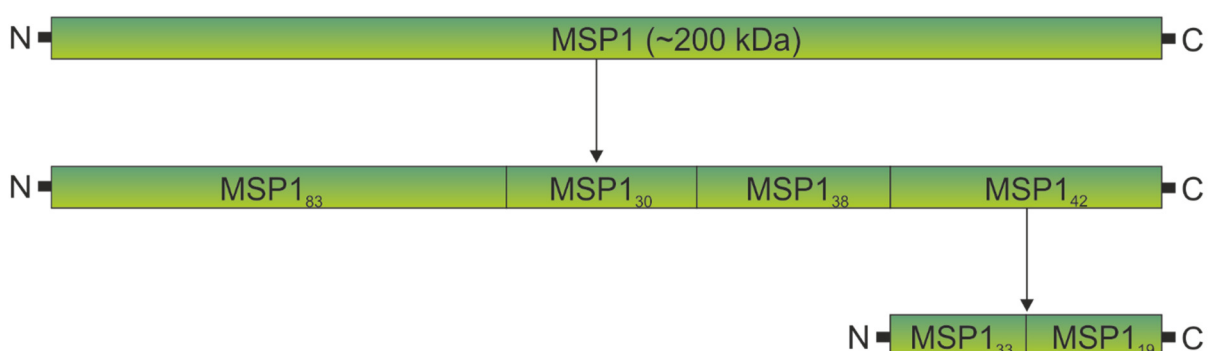


Abb. 3.3: Prozessierung des Vorläuferproteins MSP1. Im ersten Schritt der Prozessierung wird MSP1 in vier Polypeptidketten mit einem apparenten Molekulargewicht von 83, 30, 38 und 42 kDa gespalten. Im zweiten Schritt der Prozessierung wird das MSP1₄₂ in die Fragmente MSP1₃₃ und MSP1₁₉ aufgetrennt. (Garman et al., 2003)

Der erste Schritt der Prozessierung erfolgt bei der Freisetzung der Merozoiten aus infizierten Erythrozyten. Dabei wird das Vorläuferprotein MSP1 mit einem Molekulargewicht von 180-225 kDa in vier Polypeptidketten (83, 20, 38 und 42 kDa) gespalten, die durch nicht kovalente Bindung zusammengehalten werden (Holder et al., 1987; Holder et al., 1992; McBride und Heidrich, 1987).

Die zweite Prozessierung erfolgt bei der Invasion der Merozoiten in die Erythrozyten. Hierbei wird das MSP1₄₂ in MSP1₃₃ und MSP1₁₉ überführt. MSP1₃₃ wird während des Eindringvorgangs von der Oberfläche der Merozoiten abgespalten. MSP1₁₉ verbleibt eingebettet in der Merozoitenmembran. (Blackman et al., 1991; Blackman und Holder, 1992; Blackman et al., 1990)

MSP1₁₉ besteht aus zwei dem epidermalen Wachstumsfaktor ähnlichen Domänen (Morgan et al., 1999). Diese Domänen werden durch jeweils sechs hochkonservierte Cystein-Reste definiert. Zudem besitzt das Protein am N- und C-Terminus eine hydrophobe Region, wodurch das Molekül in der Zellmembran verankert ist (Garman et al., 2003).

Bei der Entwicklung von Fusionsproteinen ist die Erhaltung der nativ vorliegenden Strukturelemente von hoher Bedeutung. So müssen bei der Fusion der hier verwendeten Proteine die Epitope invasions-inhibitorischer Antikörper erhalten bleiben, um die Effektivität des Impfstoffkandidaten zu garantieren. Der Vorteil der Fusionsstrategie ist die Kostenreduktion und die Minimierung des Zeitaufwandes für die Produktion sowie der Aufreinigung des Impfstoffes. Abb. 3.4 zeigt die vereinfachte Oberflächen- und Domänenstruktur von *Pf*AMA1 und *Pf*MSP1₁₉.

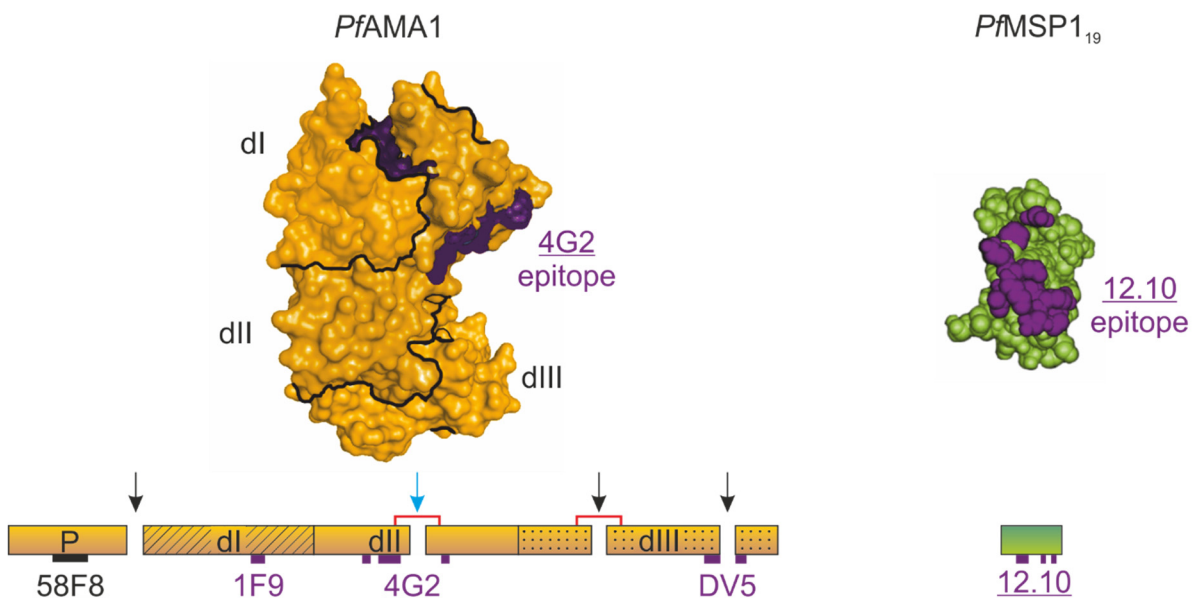


Abb. 3.4: Oberflächen- und Domänenstruktur von *Pf*AMA1 und *Pf*MSP1₁₉. Die Oberflächenstruktur zeigt in violett abgesetzt die Epitope invasions-inhibitorischer Antikörper. Die proteolytischen Spaltstellen werden in der Domänenstruktur durch Pfeile gekennzeichnet. Zusätzlich werden die Regionen und Bezeichnungen der Antikörper dargestellt. (Martens, 2014)

Die Zielproteine der vorliegenden Arbeit sind in Abb. 3.5 dargestellt. Es handelt sich hierbei um zwei Varianten des zuvor beschriebenen Fusionsproteins D1M1. P-D1M1 besteht aus vier Domänen der DiCo1-Variante (P, dl, dll und dIII) des *PfAMA1* kombiniert mit der Variante M1 des MSP1₁₉. D1M1-His enthält ebenfalls die Domänen dl, dll und dIII der DiCo1-Variante, wobei in diesem Fall auf die Prodomäne (P) verzichtet wurde und anstelle dessen ein His₆-tag am C-terminalen Ende eingefügt wurde.



Abb. 3.5: Domänenstruktur der Zielproteine. a P-D1M1 b D1M1-His

Für die Entwicklung chromatographischer Prozesse sind die bindungsspezifischen biochemischen Eigenschaften der aufzureinigenden Proteine näher zu betrachten. Tab. 3.1 fasst hierfür die charakteristischen Merkmale der Fusionsproteine P-D1M1 und D1M1-His zusammen.

Tab. 3.1: Charakteristische Merkmale der Zielproteine P-D1M1 und D1M1-His

Charakteristik	P-D1M1	D1M1-His
Molekulargewicht (MW)	71.5 kDa	62.7 kDa
theoretischer pI-Wert (pI)	5.2	5.7
Anzahl Aminosäuren (n _{AA})	619	546
Anzahl negativ geladener Aminosäuren (n _{AA-})	106	89
Anzahl positiv geladener Aminosäuren (n _{AA+})	78	74
Anzahl Histidine (n _{His})	20	18
Extinktionskoeffizient (ϵ_{280})	82305 M ⁻¹ cm ⁻¹	64885 M ⁻¹ cm ⁻¹

Alle aufgeführten Charakteristika wurden mit Hilfe der Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins mit dem Online-Service ExPasy, ProtParam Tool ermittelt. Die jeweilige Berechnungsgrundlage kann unter www.expasy.org/protparam/ eingesehen werden.

D1M1-His besitzt aufgrund der fehlenden Prodomäne ein um 8.8 kDa geringeres Molekulargewicht gegenüber dem Fusionsprotein P-D1M1 mit 71.5 kDa. Die Abweichung des pI-Wertes um 0.5 begründet sich durch das geringere Verhältnis von negativ zu positiv geladenen Aminosäuren von 1.20 des D1M1-His-Proteins zu dem Malariavakzinkandidaten P-D1M1 mit einem Verhältnis von 1.36. Die Anzahl der Histidine in der Primärstruktur der Fusionsproteine unterscheidet sich um zwei Aminosäuren. Der berechnete molare Extinktionskoeffizient besitzt eine Differenz von 17420 M⁻¹cm⁻¹. Zusätzlich zu den in Tab. 3.6 aufgeführten Charakteristika besitzen beide Malariavakzinkandidaten drei definierte hydrophobe Regionen.

Die charakteristischen Eigenschaften der Zielproteine sind für die Wahl einer geeigneten chromatographischen Aufreinigung sowie analytischen Methode von hoher Bedeutung und werden daher bei der Beschreibung der verwendeten Methoden erneut aufgegriffen.

Bei der biotechnologischen Produktion wird das Protein unterschiedlichen äußeren Bedingungen ausgesetzt, beginnend mit der Expression im Fermenter bis hin zu den unterschiedlichen Milieus der chromatographischen Aufreinigung. Ein wichtiger Bestandteil bei der Entwicklung einer Strategie zur Optimierung chromatographischer Prozesse nach dem QbD-Konzept ist daher die Betrachtung des Einflusses der Milieubedingungen auf die Zielproteine.

Das Zielprotein P-D1M1 wurde bereits in einer Stabilitätsstudie der Arbeitsgruppe Faber et al. (2013) als das Fusionsprotein mit der geringsten Stabilität beschrieben. In dieser Studie wurden vier Varianten der DiCo-Proteine untersucht (M1-His, P-D1M1, D2M2D3-His und D1M1D2M2D3-His). Das Zielprotein P-D1M1 stellte dabei das einzige Fusionsprotein mit der AMA1 Prodomäne (P) dar. Alle Proteine wurden für die Studie mit Hilfe der immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt und durch Ultrafiltration mit einem *Molecular weight cut-off* (MWCO) von 10 kDa in PBS pH 7.4 überführt. Als mögliche Erklärung der Instabilität des Zielproteins P-D1M1 wurde die ineffektive Abreicherung der proteolytischen Aktivität durch die Aufreinigung mit Cu²⁺-IMAC im Gegensatz zur Ni²⁺-IMAC diskutiert.

Untersuchungen zur Stabilität der Zielproteine P-D1M1 und D1M1-His sind zudem in der Dissertation von Martens (2014) veröffentlicht. Bei den Resultaten wurde deutlich, dass beide Zielproteine einer proteolytischen Spaltung im Kulturüberstand unterliegen. Im Vergleich zeigte die P-D1M1-Variante eine wesentlich ausgeprägtere proteolytische Degradation als das D1M1-His-Protein.

Diese Untersuchungen verdeutlichen den Einfluss der Milieubedingungen auf die Malaria-vakzinkandidaten P-D1M1 und D1M1-His und zeigen das wissenschaftliche Potential einer weiteren Betrachtung.

3.2 Der integrierte Bioprozess

3.2.1 Gesamtkonzept des integrierten Bioprozesses

Das Konzept des in dieser Arbeit untersuchten integrierten Bioprozesses ist in nachfolgender Abb. 3.6 dargestellt.

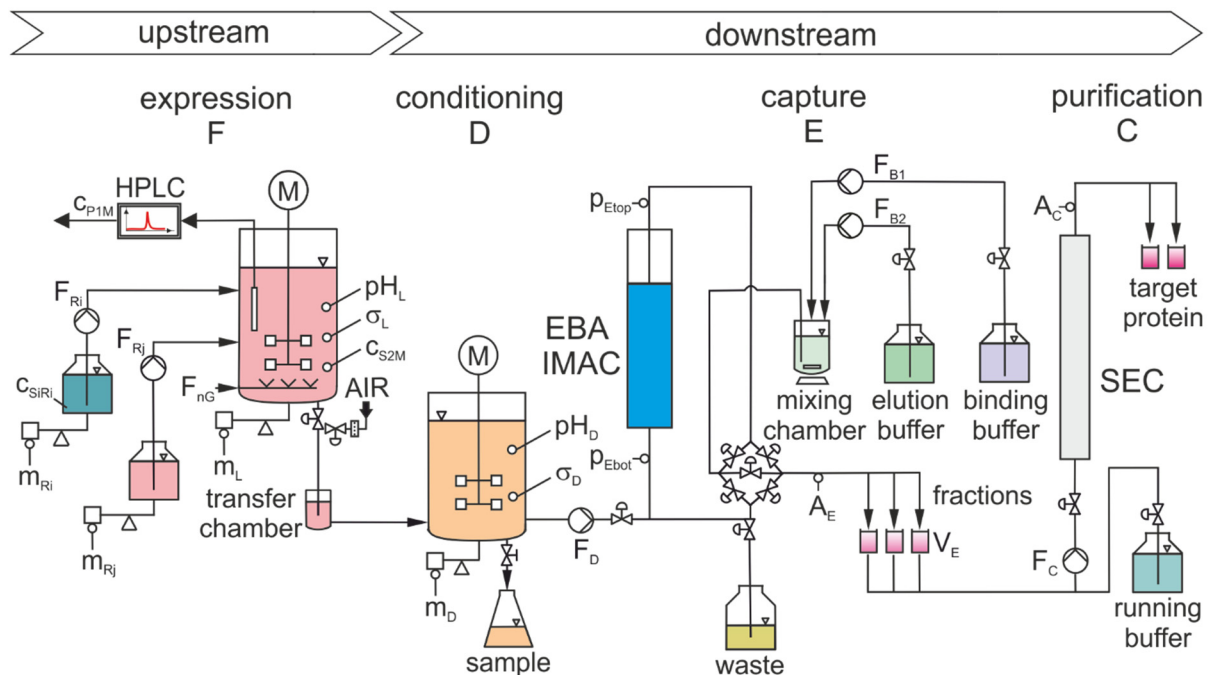


Abb. 3.6: Darstellung des integrierten Bioprozesses. Die Zielproteine werden im Bioreaktor von dem eingesetzten Hostsystem *Pichia pastoris* exprimiert und in das Medium sekretiert (*expression*, F). Eine Atline-HPLC ermöglicht die Überwachung des Zielproteingehaltes während der Kultivierung. Die Kulturbrühe wird beim Erntevorgang durch eine sterilisierbare Transferleitung in den Konditionierungstank überführt (*conditioning*, D). In dem Konditionierungstank können geeignete Bedingungen für die darauf folgende Primärreinigung durch EBA IMAC eingestellt werden (*capture*, E). Die Eluatsfraktion der Primärreinigung wird durch eine SEC feingereinigt (*purification*, C).

Für die zyklische Expression des sensitiven Malariavakzinkandidaten P-D1M1 mit *P. pastoris* wurde in der Dissertation von Martens (2014) eine *Repeated Fed-Batch* (RFB)-Strategie entwickelt und erfolgreich im Prozess angewandt. Die Kultivierungsstrategie beginnt mit einer *batch*- und *fed-batch*-Phase auf Glycerol. Anschließend wird durch Zugabe des Induktors Methanol die Expression des Zielproteins eingeleitet. Nach einer Produktionsphase von zwölf Stunden wird der Reaktor über eine sterile Transferleitung in den Konditionierungstank teilentleert. Daraufhin folgt die Zugabe von frischem Medium in den Reaktor. Hier beginnt eine erneute *fed-batch*-Phase auf Glycerol und darauf folgend abermals eine Produktionsphase auf Methanol. Diese RFB-Strategie konnte wiederholt mit bis zu sechs aufeinanderfolgende Zyklen reproduzierbar durchgeführt werden (Borchert 2015).

Parallel zur Expression des Zielproteins im Fermenter erfolgt die Aufbereitung der Zellbrühe im Konditionierungstank. Die Zellbrühe wird mit Bindungspuffer (BB) auf die spezifischen Bedingungen für die nachfolgende *Expanded Bed Adsorption* Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (EBA IMAC) eingestellt.

Gleichzeitig wird die Säule ebenfalls mit dem BB im *upflow*-Betrieb equilibriert. Nach der Stabilisierung des expandierten Bettes wird die konditionierte Zellbrühe auf die Säule appliziert. Anschließend werden restliche Zellen und leicht gebundene Substanzen durch einen Waschschrift mit BB aus dem Säulenbett entfernt.

Die Elution des Zielproteins mit Elutionspuffer (BE) erfolgt im *downflow*-Betrieb nachdem das Absorptionssignal des Detektors A_E stabil verläuft. Die Elutionsfraktion wird darauf folgend durch eine *Size Exclusion Chromatography* (SEC) feingereinigt.

Die Entwicklung und Optimierung des P-D1M1 *capture*-Schrittes mit EBA IMAC ist in den Arbeiten von Martens et al. (2011) und Borchert et al. (2013, 2015) veröffentlicht und bilden den Grundstein der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen.

3.2.2 Expression sekretorischer Proteine mit *Pichia pastoris*

Die methylo trope Hefe *Pichia pastoris*, neu klassifiziert auch *Komagataella pastoris*, hat sich in den vergangenen 40 Jahren zu einem der meist genutzten Systeme zur heterologen Proteinexpression entwickelt (Ahmad et al., 2014; Cereghino und Cregg, 2000). Neben Expressionssystemen wie *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* gehört *P. pastoris* zu den am besten charakterisierten Organismen (De Schutter et al., 2009; Mattanovich et al., 2009).

P. pastoris kombiniert die Vorteile pro- und eukaryotischer Zellen. Dazu gehören die einfache, kostengünstige Kultivierbarkeit sowie die Möglichkeit, Proteine mit eingeschränkten posttranslationalen Modifikationen herzustellen. Ein weiterer Vorteil ist die Sekretion heterolog hergestellter Proteine in das Medium, was eine vereinfachte Aufreinigung ermöglicht (Cregg et al., 1993).

Der Durchbruch bei der kommerziellen Anwendung von *P. pastoris* als Expressionssystem rekombinanter Biopharmazeutika konnte im Jahr 2009 mit der Zulassung des Wirkstoffes Ecallantid (Markenname: Kalbitor™) durch die FDA erreicht werden (FDA, 2014). Meehl und Stadheim (2014) geben eine Zusammenfassung der zurzeit in der Entwicklung oder klinischen Studien befindlichen Biopharmazeutika, die mit Hefeexpressionssystemen produziert werden.

Kritisch zu betrachten sind bei all den Fortschritten der Entwicklung die schon früh dokumentierten Probleme bei der Produktion sekretorischer Proteine. Hierzu zählen die Degradation der Zielproteine im Medium sowie geringe Raum-Zeit-Produktausbeuten. (Clare et al., 1991; Brierley, 1998)

Ein Beispiel für die Degradation von rekombinant produziertem *Ovine interferone- τ* im Medium konnte nach Sinha et al. auf die Aktivität vakuoler Proteasen zurückgeführt werden (Sinha et al., 2004).

Allgemein werden die in Hefen vorkommenden Proteasen in drei Gruppen gegliedert. Abhängig von ihrer Lokalisation in der Zelle werden sie in cytosolisches Proteasom, vakuole Proteasen und Proteasen des sekretorischen Weges eingeteilt (Jones, 1991). Eine Zusammenfassung der bekannten *P. pastoris*-Proteasen nach Zhang et al. (2007) mit Referenzen sind Tab. 3.2 zu entnehmen.

Strategien zur Minimierung der proteolytischen Degradation des Zielproteins beinhalten den Einsatz Protease-defizienter Stämme (Gleeson et al., 1998) oder von Proteaseinhibitoren (Gustavsson et al., 2001), die Zugabe von komplexen Substraten zum Medium (Clare et al., 1991) oder die Änderung von Prozessparametern, wie des pH-Wertes und/oder der Temperatur (Jahic et al., 2003a; Jahic et al., 2003b; Curvers et al., 2001).

Ein Grund für die Produktion mit geringen Raum-Zeit-Ausbeuten kann nach Puxbaum et al. (2015) eine Überexpression des Zielproteins sein. Dies kann zur Fehlfaltung der Proteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) führen. Die Anhäufung fehlgefalteter Proteine im ER führt zu erhöhtem Stress der Zellen. Die Zellen aktivieren zur Regulation des Stresses einen Mechanismus, der als *Unfolded Protein Response* bezeichnet wird. Durch diesen Mechanismus wird die Transkriptions- und Translationsrate des Zielproteins verringert. Gleichzeitig wird die Expression von Faktoren beschleunigt, die zum Abbau des fehlgefalteten Proteins durch den ER-assoziierten Degradations-Prozess beitragen. Des Weiteren wird die Synthese von Chaperonen zur korrekten Faltung der Proteine erhöht.

Ziel dieser Qualitätskontrollmechanismen ist die Regulation des Proteinbiosyntheseapparates. Schlägt dieser Versuch jedoch fehl, kann der Mechanismus zur Apoptose der Zellen führen. Durch den Zelltod können intrazelluläre Proteasen in das Medium freigesetzt werden und so ebenfalls zur erhöhten Degradation des Zielproteins führen. (Gasser et al., 2008; Patil und Walter, 2001; Ellgaard et al., 1999)

In den Arbeiten von Martens (2014) sowie Fricke (2015) wurden Fermentationsstrategien für eine Expression der Malariavakzinkandidaten mit maximaler Raum-Zeit-Produktausbeute entwickelt. Die Prozessparameter pH-Wert und Temperatur wurden mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung (SVP) optimiert und ein geeigneter Arbeitspunkt definiert. Der proteolytische Abbau der Malariavakzinkandidaten konnte dadurch minimiert, jedoch nicht vollkommen unterdrückt werden.

Weitere Stabilitätsbetrachtungen des Malariavakzinkandidaten D1M1-His vorliegend im Kulturüberstand im Vergleich zu aufgereinigtem D1M1-His (durch Ni²⁺-IMAC) in frischem Medium deuteten auf das Vorliegen von Proteasen in der Kulturbrühe hin (vgl. Martens 2014).

Teile dieser Arbeit beschäftigen sich daher mit der weiterführenden Untersuchung der proteolytischen Aktivität im Kulturüberstand und der Abreicherung von Proteasen durch den *capture*-Schritt mit Hilfe der IMAC.

Tab. 3.2: Zusammenstellung bekannter von *P. pastoris* gebildeter Proteasen nach Zhang et al. (2007)

Protease	Exopeptidase		Endopeptidase	Klassifizierung	MW [kDa]	Referenz
	C-term	N-term				
cytosolisches Proteasom*					> 500	(Hilt und Wolf, 1992)
vakuole Proteasen						
Proteinase A			x	Aspartat	42	(van den Hazel et al., 1996)
Proteinase B			x	Serin	31-33	(Moehle et al., 1987)
Carboxypeptidase Y	x			Serin	61-69	(Maeda et al., 2004)
Aminopeptidase Y		x		Metallo-(Co ²⁺)	70	(Yasuhara et al., 1994; Nishizawa et al., 1994)
Carboxypeptidase S	x			Metallo-(Zn ²⁺)	73-77	(Sporman et al., 1991)
Aminopeptidase I		x		Metallo-(Zn ²⁺)	640	(Metz und Röhm, 1976)
Aminopeptidase Co		x		Metallo-(Co ²⁺)	100	(Achstetter et al., 1984)
Dipeptidyl Amino-peptidase B		x		Serin	120	(Roberts et al., 1989)
Proteasen des sekretorischen Weges						
Signal Peptidase Komplex				5 Einheiten	12-25	(Shelness et al., 1993; Greenburg und Blobel, 1994)
Kex2			x	Serin	120	(Wilcox und Fuller, 1991; Germain et al., 1992)
Kex1	x			Serin	113	(Cooper und Bussey, 1989; Boehm et al., 1999)
Dipeptidyl Amino-peptidase A		x		Serin	107	(Nothwehr et al., 1993; Roberts et al., 1992; Hopkins et al., 2014)
Yeast Aspartyl Protease III			x	Aspartat	160	(Ash et al., 1995)

*Multiprotease Komplex

3.2.3 Konzepte zur Aufarbeitung sekretorischer Proteine

Die Aufreinigung von Proteinen nimmt einen hohen Stellenwert bei der industriellen Herstellung von Biopharmazeutika ein. Der Reinigungsprozess, das sogenannte *downstream processing*, eines pharmazeutisch wirksamen Proteins kann bis zu 90 % der Gesamtkosten des Prozesses ausmachen (Gottschalk, 2013).

Für die Aufreinigung eines Biopharmazeutikums werden in der Regel mehr als ein Prozessschritt benötigt, damit die gewünschte Qualität des Produktes garantiert werden kann. Eine typische Aufreinigungsstrategie eines sekretorischen Proteins ist schematisch in Abb. 3.7 a gezeigt.

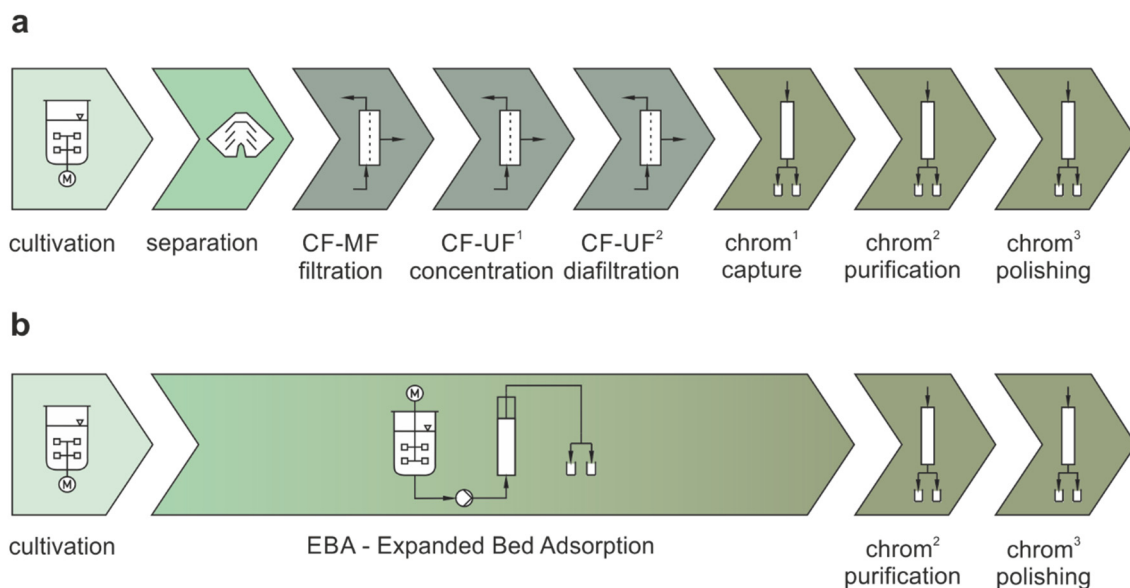


Abb. 3.7: Schematische Darstellung der Aufreinigungsschritte eines sekretorischen Proteins.
a Nach der Kultivierung werden die Zellen mit Hilfe eines Separators und einer anschließenden Crossflow-Mikrofiltration (CF-MF) abgetrennt. Das Permeat kann durch Crossflow-Ultrafiltration (CF-UF) aufkonzentriert und in den geeigneten Puffer für den nachfolgenden chromatographischen Schritt überführt werden. In der ersten chromatographischen Aufreinigung, dem *capture*, wird das Zielprotein isoliert, konzentriert und stabilisiert. Der zweite chromatographische Schritt (*purification*) dient der weiteren Reduktion von Verunreinigungen. Im letzten Schritt, dem *polishing*, wird die benötigte Reinheit des Produktes erreicht und das Protein in ein stabiles Puffersystem überführt. **b** Das Zielprotein wird direkt aus der Fermentationsbrühe über ein integriertes Verfahren, der EBA-Chromatographie, weiter aufgereinigt. Anschließend können weiterführende chromatographische Aufreinigungsschritte folgen. (Borchert 2015)

Die sinnvolle Verkettung sowie die Kombination von Prozessschritten stehen im Fokus der heutigen *downstream*-Prozessentwicklung. Eine präparative Technik zur direkten Aufarbeitung sekretorischer Proteine aus Kulturbrühen ist die EBA-Chromatographie.

Eine Studie ergab einen ökonomischen Vorteil der EBA-Chromatographie gegenüber dem eines üblichen Protein *capture* von 50 %. Die Nachteile einer derartigen Aufarbeitungsstrategie sind jedoch hohe Anschaffungskosten des Equipments sowie geringe Standzeiten der Säulenmaterialien für die Aufarbeitung mit einer EBA-Chromatographie. (Walter and Feuser, 2003)

Das Prinzip der EBA-Chromatographie basiert auf einem fluidisierten Bett aus speziell hergestellten Säulenmaterialien. Diese Materialien bestehen aus einem dichten Kern, z. B. aus Quarz (STREAMLINE, GE Healthcare) und besitzen eine breite Partikelgrößenverteilung. Ein gezieltes Anströmen von unten (*upflow*-Betrieb) ermöglicht eine Expansion des sonst dicht gepackten Bettes, so dass Zellen und Zellbruchstücke widerstandsreduziert das Bett durchdringen können. Gleichzeitig kann das Produkt mit dem Säulenmaterial in Wechselwirkung treten und dadurch die Separation erreicht werden (Anspach et al., 1999).

Die meist genutzte Technik zur Separation von Proteinen ist jedoch die Festbettsäulenchromatographie. Dabei befindet sich die stationäre Phase fest gepackt in einem zylindrischen Rohr. Der Nachteil dieser Chromatographie ist die vorhergehende Klärung des aufzuarbeitenden Materials. Da bei einem biotechnologischen Herstellungsprozess zunächst die Zellen aus der Kultivierungsbrühe abgetrennt werden müssen ist bei dieser Art der chromatographischen Aufreinigung immer mindestens ein Separationsschritt einzuplanen (Janson, 2011).

Am Forschungs- und Transferzentrum Bioprozess- und Analysetechnik finden in zwei unabhängigen Bioprozessanlagen beide beschriebenen Aufarbeitungskonzepte Anwendung.

Der in Abb. 3.7 a beschriebene Ablauf zur Aufarbeitung sekretorischer Proteine wird in der industriell orientierten integrierten *Scale-down* Pilotanlage – Biolnt angewendet. Mit Hilfe des Prozesses wurde der Malariavakzinkandidat D1M1-His produziert und Ergebnisse der Herstellungskampagnen veröffentlicht (Luttmann 2015, Borchert 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde das aufgereinigte Produkt als Ausgangsmaterial für Stabilitätsstudien des Proteins in wässrigen Puffersystemen verwendet.

Die Aufarbeitung nach dem in Abb. 3.7 b dargestellten Konzept findet in dem in dieser Arbeit beschriebenen integrierten Bioprozess Anwendung. Eine vertiefte Beschreibung der Entwicklung und Optimierung des *capture*-Schrittes mit Hilfe der EBA ist den Veröffentlichungen von Borchert et al. (2013, 2015) zu entnehmen. Die errungenen Erkenntnisse dieser Arbeiten bilden den Grundstein für die Erweiterung des Produktionsprozesses innerhalb der vorliegenden Arbeit.

3.2.4 Proteinaufreinigung mit Hilfe chromatographischer Methoden

Der Begriff „Chromatographie“ wurde erstmals von dem russischen Botaniker Michail Semjonowitsch Tswett verwendet. Im Jahr 1906 veröffentlichte er zwei Berichte an die deutsche botanische Gesellschaft unter den Titeln: „*Physikalische-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen*“ und „*Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls*“. In diesen Veröffentlichungen beschreibt er die Trennung eines Chlorophyll-Gemisches mit Hilfe des von ihm entdeckten Fest-Flüssig-Trennverfahrens (Tswett, 1906a; Tswett, 1906b).

Das Prinzip der Chromatographie basiert auf der Verteilung von Molekülen eines Substanzgemisches zwischen einer stationären Phase und einer mobilen Phase mit einer bestimmten Fließrichtung. Durch die unterschiedlichen Stoffeigenschaften werden die Substanzen durch Adsorptive- und/oder Verteilungsvorgänge räumlich und zeitlich voneinander getrennt.

Heute wird sich dieses Prinzip in verschiedenen Bereichen der Naturwissenschaften zunutze gemacht. Hierzu zählen insbesondere Techniken der präparativen Aufarbeitung und der analytischen Quali- und Quantifizierung von Biopharmazeutika. (Engelhardt und Rohrschneider, 1995; Scopes, 2013)

Die präparativ genutzten chromatographischen Methoden und die dazugehörigen Eigenschaften der Proteine fasst Tab. 3.3 zusammen.

Tab. 3.3: Zusammenfassung präparativ genutzter chromatographischer Methoden mit Abkürzungen und Zuordnung zu den Proteineigenschaften

Methode	Abkürzung	Proteineigenschaft
Affinitätschromatographie*	AC	spezifische Ligandenbindung
Immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie	IMAC	Metallionenbindung
Ionenaustauschchromatographie	IEXC	Oberflächenladung
Hydrophobe Interaktionschromatographie	HIC	Hydrophobizität
Multimodale Chromatographie	MMC	Oberflächenladung, Hydrophobizität und weitere möglich
Größenausschlusschromatographie	SEC	Molekülgröße
Chromatofokusing*	CF	isoelektrischer Punkt

* Wird innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht weiter behandelt.

Im nachfolgenden Abschnitt wird der theoretische Hintergrund der in dieser Arbeit verwendeten Methoden der Chromatographie vorgestellt. Eine schematische Darstellung der Methoden ist Abb. 3.8 zu entnehmen.

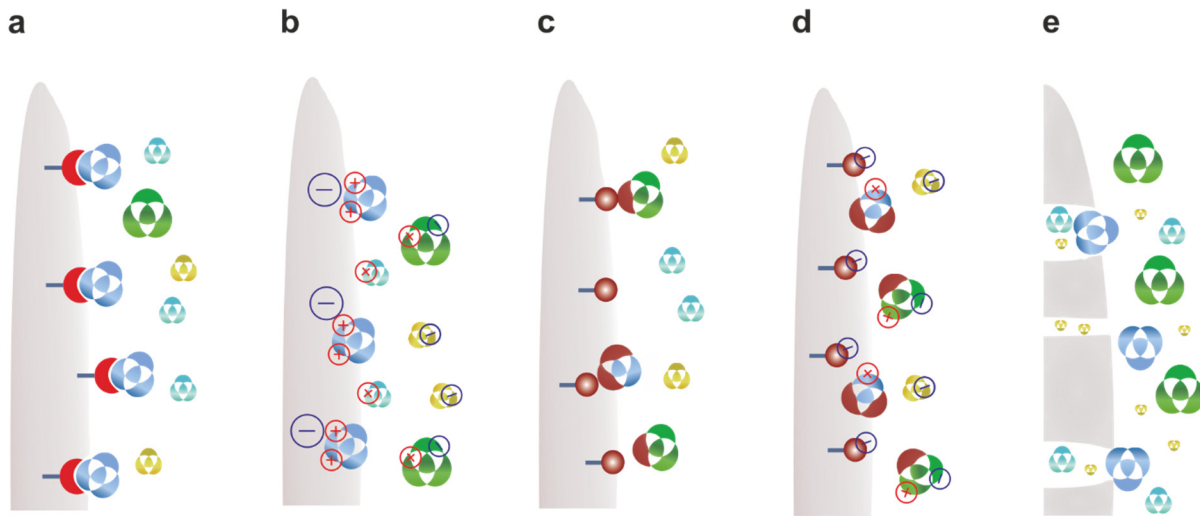


Abb. 3.8: Schematische Darstellung der chromatographischen Trennmethode.

- a Affinitätschromatographie
- b Ionenaustauschchromatographie
- c Hydrophobe Interaktionschromatographie
- d Multimodale Chromatographie, Kombination aus b und c
- e Größenausschlusschromatographie

3.2.4.1 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die erste Veröffentlichung zum Thema Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) erschien im Jahre 1975 in der Zeitschrift „Nature“ durch die Arbeitsgruppe um Porath et al. In dieser Veröffentlichung wurde die Verwendung von immobilisierten Kupfer- und Zinkionen zur Proteinfractionierung aus menschlichem Serum beschrieben. Bis heute sind einige hundert Veröffentlichungen erschienen, in denen die IMAC als hochselektive präparative, wie auch analytische chromatographische Methode für die Isolierung von Proteinen aus komplexen biologischen Gemischen beschrieben wird.

Das Trennprinzip beruht auf der Affinität von Übergangsmetallen wie Kupfer Cu^{2+} , Nickel Ni^{2+} , Zink Zn^{2+} und Kobalt Co^{2+} mit oberflächenständigen Aminosäureresten der Proteine. Die höchste Affinität zu den Übergangsmetallen besitzen Histidinreste. Die Koordination sowie die Anzahl der Histidine an der Oberfläche des Proteins sind entscheidende Faktoren für die Stärke der Bindung. Geringere Affinitäten weisen neben Histidinresten ebenfalls Cystein-, Tryptophan- und Phenylalaninreste auf. (Block et al., 2011; Gaberc-Porekar und Menart, 2001)

Die Metallionen werden an kovalent gebundene Komplexbildner, meist Iminodiessigsäure (IDA) oder Nitrilotriessigsäure (NTA), der Chromatographieträger immobilisiert. Zur Ausbildung einer Chelatbindung werden die freien Elektronenpaare der N-, S- und O-Atome des Chelators als Elektronenpaardonatoren genutzt. Das Metallion wird koordinativ gebunden und wirkt somit als Elektronenpaarakzeptor. Die freien Bindungsstellen des Zentralatoms adsorbieren meist Wassermoleküle. Diese können jedoch durch Proteinmoleküle mit höheren Bindungsaffinitäten verdrängt werden. Die Bindung ist im Gegensatz zur klassischen Affinitätschromatographie unspezifisch und kann aufgrund der geringen Selektivität ausschließlich als eine Gruppenseparationstechnik aufgefasst werden. (Block et al., 2011; Gaberc-Porekar und Menart, 2001)

Zu Beginn der IMAC-Historie wurden hauptsächlich Proteine und Peptide mit natürlich auftretenden Histidinresten an der Proteinoberfläche isoliert. Ende der 80er Jahre wurde von Hochuli et al. (1987) Ni-NTA als geeignetes Chromatographieträgermaterial für die selektive Aufreinigung von Proteinen mit mehreren aufeinanderfolgenden Histidinresten entdeckt. In der Natur ist die Abfolge von mehreren Histidinen in der Primärstruktur von Proteinen sehr ungewöhnlich. Dieses Phänomen sollte seinen Nutzen finden, indem rekombinanten Proteinen ein künstlicher Histidinschwanz (His-tag) an den N- oder C-Terminus in der Gensequenz angefügt wird. Beide Anwendungen, native und künstliche Form der His-Abfolge des Proteins haben Vor- und Nachteile, welche in Tab. 3.4 zusammengefasst sind. (Gaberc-Porekar und Menart, 2005)

Tab. 3.4: Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile nativer und künstlicher Histidin-Abfolgen

His-Abfolge	Vorteil	Nachteil
nativ	keine Modifikation nötig	unspezifische Bindung möglich geringe Bindungskapazität
künstlich	höhere Spezifität vereinfachte Aufreinigung höhere Bindungskapazität	Abtrennung des Tags nötig Einfluss auf Struktur oder Aktivität möglich

Die Methode der Cu²⁺-IMAC wurde bereits als Protein *capture* bei der Produktion der *pfAMA1*-Ektodomäne für klinische Studien unter cGMP-Bedingungen verwendet (Faber et al., 2008). Die Zielproteine dieser Arbeit sind Abkömmlinge des AMA1-Proteins und besitzen daher vermutlich ähnliche Bindungseigenschaften. Dem Protein P-D1M1 wurde zusätzlich eine native, Histidin-reiche Prodomäne angefügt, in der acht von den 20 Histidinen der Primärsequenz lokalisiert sind. D1M1-His wurde anstelle der Prodomäne sechs aufeinander folgende Histidine (His₆-Tag) am C-Terminus angefügt, was die Möglichkeit einer Aufreinigung mit Ni²⁺-IMAC eröffnet.

3.2.4.2 Multimodale Chromatographie (MMC)

Anfang der 1970er Jahre wurde von der Arbeitsgruppe Yon et al. die Verwendung multimodaler Liganden zur Aufreinigung von Proteinen beschrieben. In den letzten Jahrzehnten stieg der Bedarf an neuartigen stationären Phasen durch die Produktivitätssteigerung im *upstream*-Bereich stark an. Der limitierende Schritt bei der Produktion von Biopharmazeutika ist heutzutage im *downstream*-Bereich und hier vor allem im Bereich der chromatographischen Aufreinigung zu finden (Gottschalk, 2013). Multimodale Chromatographieträger könnten somit eine Möglichkeit bieten, die Aufreinigung von Proteinen effizienter zu gestalten.

Die multimodale oder mixed-mode Chromatographie (MMC) zeichnet sich durch die Kombination von mindestens zwei Interaktionsformen des Zielproteins mit dem Liganden der stationären Phase aus. Die kommerziell am häufigsten verwendete Kombination für die präparative Aufreinigung ist die Verknüpfung der hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkung (Abb. 3.8 d). Im Gegensatz zu den „klassischen“ Methoden, bei denen ausschließlich eine Interaktionsform dominiert und sekundäre Wechselwirkungen minimiert werden, können multimodale Liganden auf unterschiedliche Weise im chromatographischen Prozess genutzt werden. (Kallberg et al., 2012; Zhao et al., 2009)

Ein Beispiel und wohl das bekannteste ist die Verwendung von MMC-Materialien für die Aufreinigung von Antikörpern. Die Aufreinigungsstrategie für Antikörper beinhaltet als *capture* eine Protein A-Affinitätschromatographie. Dieser Schritt ist hochselektiv und effektiv, birgt aber auch einen enormen Kostenaufwand für die Anschaffung des Säulenmaterials. Durch das sogenannte Ausbluten der Säule, d. h. den Verlust an Liganden, wird die Bindungskapazität stark reduziert, wodurch die Anzahl an durchzuführenden Aufreinigungen begrenzt wird. Die Verwendung von MMC-Materialien könnte hier eine Alternative bieten. Verschiedene MMC-Materialien zeigen eine ähnliche Bindungskapazität wie Protein A-Affinitätsträger. Ein weiterer Vorteil kann die Variabilität der Elutionsbedingungen sein. Zur Elution der Antikörper an Protein A-Trägern wird ein niedriger pH-Wert verwendet. Diese Bedingungen führen zur Aggregation der Antikörper und machen somit einen weiteren Abtrennungsschritt der Aggregate unabdingbar. (Maria et al., 2015; Zhang et al., 2015)

Weitere publizierte Anwendungsgebiete sind die Aufreinigung von Proteinen (Hamilton et al., 2000; Kaleas et al., 2010), Peptiden (Gilar et al., 2008) oder Nukleinsäuren (McLaughlin, 1989).

Das Trennprinzip in der multimodalen Chromatographie ist variabel und wird im wesentlichen von den Eigenschaften der stationären Phase, den Proteincharakteristika und den äußeren Bedingungen, wie dem pH-Wert, der Leitfähigkeit und der Art des verwendeten Salzes bestimmt. Durch die Variabilität der Interaktion des Zielproteins mit dem Liganden der stationären Phase können diese Materialien flexibel eingesetzt werden.

Die Zielproteine besitzen drei definierte hydrophobe Regionen (vgl. Kap. 3.1.2), wodurch eine Aufreinigung mit HIC möglich ist. Diese Methode kam bereits als weitere Aufreinigungsstufe nach Cu^{2+} -IMAC zur Herstellung der *pfAMA1*-Ektodomäne für klinische Studien unter cGMP-Bedingungen zum Einsatz (Faber et al., 2008).

Zusätzlich zu den hydrophoben Regionen besteht P-D1M1 in seiner Primärsequenz aus 17.1 % negativ geladener Aminosäuren (Asp, Glu) und zu 12.6 % aus positiv geladenen Aminosäuren (Arg, Lys). Diese Differenz äußert sich in einem theoretischen isoelektrischen Punkt pI von 5.2. D1M1-His enthält 16.3 % negativ und 13.5 % positiv geladene Aminosäuren. Der theoretische pI -Wert des Proteins beträgt 5.7 (vgl. Tab. 3.1). Beide Zielproteine sind somit befähigt hydrophobe- wie auch elektrostatische Wechselwirkungen einzugehen.

Die Art der Interaktionen zwischen dem Zielprotein und dem Adsorbermaterial ist nur im geringen Maße abschätzbar. Aus diesem Grund ist die Anwendung von Screening-Methoden für diese Art der Chromatographieträger unabdingbar. (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2013)

3.2.4.3 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die Trennung nach der Molekülgröße, genauer nach dem hydrodynamischen Volumens eines Moleküls ist seit den 1940er Jahren bekannt. Der Durchbruch dieser Methode kam jedoch erst 1959 mit der Einführung Dextran-basierter Medien mit einer definierten Porengröße (Porath and Flodin, 1959). Heutige Säulenmaterialien bestehen aus einer porösen Matrix aus sphärischen Partikeln. Die verwendeten Materialien besitzen eine hohe physikalische und chemische Stabilität und sind inert, d. h. sie besitzen keine reaktiven oder adsorptiven Eigenschaften gegenüber den Substanzen der mobilen Phase.

Das Trennungsprinzip beruht alleinig auf Konvektion und Diffusion der Substanzen in das Porensystem der stationären Phase. Substanzen, die größer sind als die Ausschlussgrenze, sind nicht in der Lage in das Porensystem einzudringen und werden mit dem Totvolumen der Trennsäule eluiert. Kleinere Moleküle dringen in die Poren ein, nutzen daher ein größeres Volumen und werden dadurch zeitlich und räumlich voneinander getrennt. (Engels and Lottspeich, 2012)

Die Methode der Größenausschlusschromatographie (SEC) wird vielfältig zur Analyse oder Aufreinigung von Proteinen genutzt. Sie kann sowohl als selektive analytische und präparative Methode zur Hochleistungsfractionierung wie auch als eine effiziente Gruppenseparationstechnik angewendet werden. Die Gruppentrennung findet häufig als Methode zur Entsalzung bzw. zum Pufferaustausch Anwendung.

Die SEC unterscheidet sich im Gegensatz zu den Methoden der sogenannten adsorptiven Chromatographie durch die nichtbindenden Eigenschaften der stationären Phase zu den Zielsubstanzen. Die Trenneffizienz der SEC wird daher ausschließlich von physikalischen Bedingungen bestimmt. Das applizierbare Probenvolumen ist der einflussreichste Faktor für die Trennleistung der Methode. Die Auflösung kann durch die Verringerung der Flussrate optimiert werden. Als Richtwerte für das maximal applizierbare Probenvolumen wird für die Hochleistungsfraktionierung mit 5 % des Säulenvolumens (CV) und für eine effiziente Gruppenseparation mit 30 % CV angegeben. (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2000; Janson, 2011)

Durch eine Feinreinigung mit Hilfe der SEC können hohe Selektivitäten erreicht werden. In der industriellen Anwendung als Hochfraktionierungsmethode ist eine Begrenzung des applizierbaren Probevolumens jedoch als kritisch zu bewerten. In dem vorgestellten integrierten Bioprozess besitzt die erhaltene Eluatsfraktion aus der EBA IMAC ein Volumen von 800-1000 ml. Die verwendete chromatographische Säule der SEC weist ein Volumen von 120 ml auf, was einer maximal applizierbaren Menge von 6 ml entspricht. Eine im FTZ BPAT durchgeführte Optimierungsuntersuchung führte bei einem Probenaufgabevolumen von 5 ml und einer Fließmittelgeschwindigkeit von 2.1 mlmin^{-1} zu einer robusten Aufarbeitungsmethode (Voß, 2012). Die Aufreinigung des gesamten Eluatvolumens würde damit ca. 180 chromatographischen Läufen mit einem Zeitaufwand von ca. 10 Tagen bei den verwendeten Säulendimensionen (zwei XK 16/40 Säulen in Reihe geschaltet) erfordern.

Diese Hochrechnung zeigt die Ineffizienz der SEC für die Anwendung im industriellen Maßstab. Trotz schlechter Bilanzen werden industrielle SEC-Prozesse entsprechend skaliert. Bei der Maßstabsvergrößerung wird die Trennstrecke konstant gehalten und der Durchmesser der Trennsäule verbreitert. Eine Verdopplung des Säulendurchmessers erzielt das vierfache des Säulenvolumen ($V \sim d^2$). Das bedeutet einen enormen Anstieg der Materialkosten. Für Forschungszwecke wird die SEC zur Feinreinigung in vielen Bereichen genutzt. Einem Einsatz in kalkulierte Produktionen sind dieser Methode jedoch Grenzen gesetzt.

Ein vielversprechendes Potential zur Steigerung der Effizienz industrieller chromatographischer Prozesse bieten kontinuierliche und quasikontinuierliche Aufarbeitungsverfahren (Jungbauer, 2013). Tab. 3.5 fasst hierzu mögliche Techniken zusammen.

Tab. 3.5: Techniken der kontinuierlichen und quasikontinuierlichen Chromatographie

Technik	englische Bezeichnung	Abkürzung
Annulare Chromatographie	<i>Continuous Annular Chromatography</i>	CAC
Gegenstromverfahren	<i>Countercurrent Chromatography</i>	CCC
Simuliertes bewegtes Bett	<i>Simulated Moving Bed</i>	SMB
Multisäulen-Lösungsmittelgradient	<i>Multicolumn Solvent Gradient Purification Process</i>	MCSGP

Als einzige Technik ist die annulare Chromatographie ein reales kontinuierliches Aufbereitungsverfahren. Bei diesem Verfahren ist das Trägermaterial in einem konzentrischen Ringspalt gepackt, der sich um die eigene Achse dreht. Das Säulenbett im Ringspalt wird kontinuierlich von mobiler Phase durchströmt und rotiert langsam ($< 1 \text{ h}^{-1}$) an verschiedenen Einlasselemente vorbei. An einer Position wird kontinuierlich Probe appliziert. Die Trennung des Substanzgemisches erfolgt dann abhängig von der Interaktion mit der stationären Phase, der Länge des Säulenbettes, der Fließmittelgeschwindigkeit und der Drehgeschwindigkeit des Ringspalt. Jede Komponente beschreibt bei dem Weg durch das Säulenbett eine spiralförmige Bahn und kann so bei einer definierten Winkellage in einen Fraktions-sammler geleitet werden. (Carta und Jungbauer, 2010; Chmiel, 2011; Jungbauer, 2013)

Beispiele für die Anwendung der CAC sind die Aufarbeitung von *green fluorescent protein* (Uretschläger et al., 2001) oder die Reduzierung unerwünschter Aggregate in einem Antikörper Aufreinigungsprozess (Buchacher et al., 2001) mit Hilfe SEC.

Zu den Gegenstromverfahren zählt das sogenannte *True Moving Bed*-Verfahren. Bei diesem Verfahren wird die stationäre Phase gegenläufig zur mobilen Phase durch eine Trennsäule geführt. Die Zufuhr des Substanzgemisches erfolgt kontinuierlich in der Mitte der Säule. Komponenten, die stärker mit der stationären Phase interagieren, werden mit dem Adsorber aus der Säule ausgetragen. Weniger stark interagierende Komponenten werden von der mobilen Phase ausgetragen. (Carta und Jungbauer, 2010)

Anwendung findet das TMB-Verfahren hauptsächlich bei der Isolierung von Naturstoffen wie den Flavonoiden, wobei als stationäre und mobile Phase zwei nicht ineinander mischbare Flüssigkeiten verwendet werden (Academic, 2014). Für die Aufarbeitung von Biopharmazeutika spielt das TMB-Verfahren eine untergeordnete Rolle, da die stationäre Phase in den meisten Fällen nicht fließfähig ist.

Für die Aufarbeitung von Biomolekülen wird das sogenannte *Simulated Moving Bed*-Verfahren verwendet. Bei diesem Verfahren befindet sich die stationäre Phase fest gepackt in mindestens drei Säulen, die in einer Kreisschaltung angeordnet sind. Durch Schalten von Ventilen in Fließrichtung der mobilen Phase wird die gegenläufige Bewegung der stationären Phase simuliert. Ursprünglich wurde dieses Verfahren für die Auftrennung binärer Substanzgemische entwickelt. Durch den Einsatz von mehr als vier Säulen kann mit dieser Technik auch eine Multikomponententrennung erreicht werden, was für biopharmazeutische Herstellungsprozesse einen großen Vorteil darstellt. (Carta und Jungbauer, 2010; Kessler, 2012; Chmiel, 2011)

SMB-Verfahren sind ideal mit der Methode der SEC als Gruppenseparationstechnik zu verwenden (Hashimoto et al., 1988). Beispiele hierfür sind die Entsalzung von Plasmiden (Paredes et al., 2005) und die Umpufferung von Influenzaviren (Kalbfuss et al., 2008). Der Vorteil bei der Verwendung des SE-SMB-Verfahrens ist eine geringe Verdünnung des Produktes im Vergleich zum *batch*-Aufarbeitsverfahren. Der Nachteil des SMB-Verfahrens ist die Umsetzung eines Gradientenprofils, welches in IEXC oder HIC-Prozessen eingesetzt wird. Forschung und Entwicklungen in der Richtung zeigen die Möglichkeit der Anwendung von Gradienten-SMB (Antos and Seidel-Morgenstern, 2001; Ziomek et al., 2005), jedoch ist der experimentelle Aufwand hierfür enorm. Aus diesem Grund wird immer häufiger auf die Möglichkeit der Prozesssimulation zurückgegriffen, wodurch das Wissen über mögliche Anwendungspotentiale des SMB-Verfahrens erhöht wird (Li et al., 2007 und 2008).

Eine weitere Entwicklung eines kontinuierlichen chromatographischen Verfahrens mit vereinfachter Umsetzung eines Gradientenprofils ist der Arbeitsgruppe um Morbidelli et al. gelungen. Der sogenannte *Multicolumn Solvent Gradient Purification Process* kombiniert das Gegenstromverfahren mit der Recycling Chromatographie, wobei die Randfraktionen eines Peaks erneut aufgearbeitet werden (Müller-Späth et al., 2008; Aumann und Morbidelli, 2007).

Generell besitzen alle Verfahren der kontinuierlichen Chromatographie den Vorteil der erhöhten Produktivität gegenüber den klassischen *batch*-Verfahren. Kritisch zu betrachten sind jedoch der erhöhte technische Aufwand sowie die verminderte Prozessflexibilität. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde daher auf die Entwicklung eines kontinuierlichen SE-Prozesses verzichtet und der Fokus auf eine Erweiterung des Prozesses durch Integration einer Ultra-/Diafiltration und die Neuentwicklung einer weiteren chromatographischen Aufreinigungsmethode gelegt.

3.2.4.4 Wahl eines geeigneten Adsorbentmaterials

Die Aufarbeitung durch die Verwendung chromatographischer Methoden stellt eines der größten Kostenfaktoren bei der Produktentwicklung und -herstellung dar. Insbesondere hohe Investitionskosten für chromatographische Medien sowie der zeitliche Aufwand für Methoden- und Prozessentwicklung erzeugen eine hohe finanzielle Belastung und sollten nach Möglichkeit auf ein Minimum reduziert werden. Die Auswahl an geeigneten Methoden sowie eines adäquaten Materials ist aufgrund der enormen Vielfalt der auf dem Markt angebotenen Materialien hoch komplex und umfangreich.

Ein Ansatz zur Entwicklung chromatographischer Methoden im μl -Maßstab ist die Anwendung von Adsorptionsstudien zur Ermittlung spezifischer Bindungskapazitäten. Bei diesem Vorgehen wird das dynamische chromatographische System in ein miniaturisiertes statisches System überführt und die Reaktion zwischen dem Zielprotein P_i und dem Liganden der stationären Phase L im Gleichgewicht,



betrachtet. Im Equilibrium ergibt sich die Dissoziationskonstante K_D ,

$$K_D = \frac{k_2}{k_1} = \frac{[P_i][L]}{[P_i L]}, \quad (3.2)$$

als Quotient der Dissoziationsrate k_2 und der Assoziationsrate k_1 . Die Gleichgewichtskonzentration eines angelagerten Proteins $Q_{P_i}^*$,

$$Q_{P_i}^* = f(c_{P_i}^*), \quad (3.3)$$

an der stationären Phase stellt eine Funktion der Proteinkonzentration in Lösung $c_{P_i}^*$ dar.

Im statischen System kann der Adsorptionsprozess eines Einphasensystems nach Langmuir (1916) als Änderung der Bindungskapazität Q_{P_i} über die Zeit t ,

$$\frac{dQ_{P_i}}{dt} = k_1 \cdot c_{P_i} \cdot (Q_{P_{i\max}} - Q_{P_i}(t)) - k_2 \cdot Q_{P_i}(t), \quad (3.4)$$

beschrieben werden. Im Gleichgewicht der Reaktion,

$$\frac{dQ_{P_i}}{dt} = 0, \quad (3.5)$$

ergibt sich für die statische Bindungskapazität $Q_{P_{i_stat}}^*$,

$$Q_{P_{i_stat}}^* = \frac{Q_{P_{i\max_stat}} \cdot c_{P_i}^*}{K_D + c_{P_i}^*}, \quad (3.6)$$

eine hyperbolische Funktion mit den Parametern maximale statische Bindungskapazität $Q_{P_{i\max_stat}}$ und der Dissoziationskonstante K_D .

Eine Charakterisierung der Bindungskapazität im dynamischen System ist durch die Aufnahme einer Durchbruchkurve (DBK) möglich. Abb. 3.9 zeigt exemplarisch die DBK eines IEXC-Adsorbermaterials mit dem Modellprotein Lysozym.

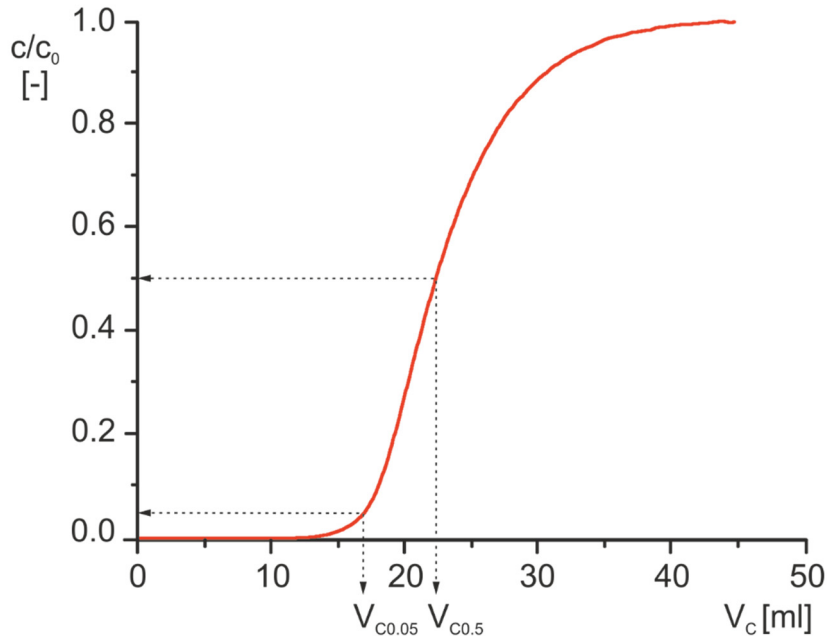


Abb. 3.9: Exemplarische Darstellung einer Durchbruchkurve. Die aufgetragene Substanz wird zunächst vollständig adsorbiert ($c/c_0 = 0$), bis mit einer weiteren Erhöhung des angegebenen Volumens V_c die Substratkonzentration am Säulenausgang steigt. Mit weiter steigendem Auftragsvolumen entspricht die Substratkonzentration am Ausgang der in der aufgegebenen Lösung ($c/c_0 = 1$).

Aus der DBK können neben dem Verlauf (Steilheit, Position, Symmetrie) charakteristische Kenngrößen ermittelt werden. Die maximale Bindungskapazität des dynamischen Systems $Q_{P_{\text{imax_dyn}}}$,

$$Q_{P_{\text{imax_dyn}}} = \frac{V_{C0.5} \cdot c_{P_{i0}}}{V_{\text{col}}} = \frac{m_{P_{i0.5}}}{V_{\text{col}}}, \quad (3.7)$$

wird aus dem Volumen bei 50 % Durchbruch $V_{C0.5}$ der Eingangskonzentration $c_{P_{i0}}$ bezogen auf das Säulenvolumen V_{col} ermittelt. Bei symmetrischem Verlauf der DBK entspricht dieser Punkt der statischen Bindungskapazität im Gleichgewicht der Reaktion $Q_{P_{\text{imax_stat}}}$.

Eine für den ökonomischen Aspekt des chromatographischen Prozesses wichtige Kenngröße ist die dynamische Bindungskapazität $Q_{P_{i0.05_dyn}}$,

$$Q_{P_{i0.05_dyn}} = \frac{V_{C0.05} \cdot c_{P_{i0}}}{V_{\text{col}}} = \frac{m_{P_{i0.05}}}{V_{\text{col}}}, \quad (3.8)$$

bei 5 % Durchbruch. Diese errechnet sich aus der Masse des Zielproteins bei 5 % Durchbruch $m_{P_{i0.05}}$ und dem Säulenvolumen V_{col} .

Neben thermodynamischen und konzentrationsabhängigen Einflüssen wird die dynamische Bindungskapazität von den physikalischen Eigenschaften der Adsorbermatrix (Partikelgröße, Porendurchmesser), der Fließmittelgeschwindigkeit und der Reaktionsgeschwindigkeit beeinflusst.

Der Zusammenhang zwischen der dynamischen Bindungskapazität $Q_{Pi0.05_dyn}$ und der maximalen Bindungskapazität des dynamischen Systems Q_{Pimax_dyn} kann mit Hilfe des Faktors f_c ,

$$f_c(N) = f_c\left(\frac{L}{H}\right) = \frac{Q_{Pi0.05_dyn}}{Q_{Pimax_dyn}}, \quad (3.9)$$

beschrieben werden. Der Faktor f_c stellt eine Funktion der Anzahl theoretischer Böden N dar und ist damit direkt mit der Trennsäulenlänge L und der theoretischen Bodenhöhe H verknüpft. Dieser Faktor trifft eine Aussage zur Effizienz der Trennsäule.

Die Bindungskapazität stellt innerhalb dieser Arbeit das Auswahlkriterium für die Eignung des Adsorbermaterials dar. Tab. 3.6 zeigt eine Gegenüberstellung der vorgestellten Methoden in Hinblick auf deren experimentellen Aufwand und Anforderungen.

Tab. 3.6: Gegenüberstellung der Methoden zur Bestimmung von Bindungskapazitäten

	Adsorptionsisotherme	Durchbruchskurve
Apparativer Aufwand	gering	hoch
Zeitlicher Aufwand	mittel parallele Ansätze möglich	mittel
Analytik	Offline-Methode nötig	Online-UV-Signal
Proteinmasse	gering	hoch
Ergebnisse	Q_{Pimax_stat} und K_D	Q_{Pimax_dyn} , $Q_{Pi0.05_dyn}$ und f_c

Die Bestimmung von Bindungskapazitäten mit Hilfe von Adsorptionsisothermen besteht durch einen vergleichbar geringen Aufwand, Möglichkeiten paralleler Experimente sowie der geringen benötigten Proteinmasse. Nachteile dieser Methode sind die erforderliche Offline-Analytik sowie die alleinige Betrachtung eines statischen Systems im Gleichgewicht der Reaktion.

Der Vorteil bei der Aufnahme von Durchbruchkurven ist die direkte Betrachtung des dynamischen Systems. Für eine detaillierte Beurteilung der Effizienz verschiedener Adsorbermaterialien ist die Ermittlung der Parameter dynamische Bindungskapazität $Q_{Pi0.05}$ und des Faktors f_c aus der Durchbruchskurve nötig. Nachteile dieser Methode sind der hohe apparative Aufwand und der hohe Bedarf an Proteinlösung.

Unter dem Blickwinkel der Entwicklung chromatographischer Methoden nach dem *Quality by Design*-Konzept sind die wissenschaftlichen Erkenntnisse, die aus beiden vorgestellten Methoden gewonnen werden, unabdingbar für die Prozessentwicklung und werden daher im Verlauf der Arbeit näher betrachtet.

3.3 Das *Quality by Design*-Prinzip

3.3.1 Hintergrund und Motivation

Seit Beginn des 21. Jahrhunderts vollzieht sich ein grundlegender Wandel in der Vorgehensweise zur Erforschung neuer Wirkstoffe und der Entwicklung entsprechender Herstellungsprozesse. Das Ziel der sogenannten *Quality by Design/Process Analytical Technology* (QbD/PAT)-Initiative ist, die bis dahin üblichen starren, empirisch ermittelten Kontrollmechanismen durch ganzheitlich und wissenschaftlich begründete Konzepte zu ersetzen, die auf einem tiefer gehenden Prozessverständnis basieren.

Durch veraltete Protokolle bei Revisionsverfahren wurde die Implementierung neuartiger Technologien in bestehende Produktionsverfahren verzögert und somit der technologische Fortschritt verhindert. Selbst minimale Änderungen an Prozessparametern unterlagen einem Zulassungsverfahren der Behörde, was einen enormen Zeit- und Kostenaufwand für die Hersteller bedeutete.

Im September 2003 veröffentlichte *The Wall Street Journal* zu diesem Thema einen Beitrag mit dem Titel „*New Prescription for Drug Makers: Update the Plants*“ (Abboud und Hensley, 2003). In diesem Artikel beschrieben die Autoren die veralteten Herstellungstechniken der Pharmaindustrie und verglichen diese mit den derzeitigen modernen Methoden der Lebensmittelindustrie. Das vermehrte Auftreten von Arzneimittelrückrufen der *Food and Drug Administration* (FDA) aufgrund mangelnder Produktqualität führte zu einem Umdenken bei Herstellern und Zulassungsbehörden.

Im Jahr 2004 veröffentlichte die FDA unter dem Titel „*Pharmaceutical cGMPs for the 21st Century: A Risk Based Approach*“ ihre QbD/PAT-Initiative. In den folgenden Jahren wurden Leitfäden zum *Pharmaceutical Development* ICH Q8 (US Food and Drug Administration, 2009b), zum *Quality Risk Management* ICH Q9 (US Food and Drug Administration, 2005), zum *Pharmaceutical Quality System* ICH Q10 (US Food and Drug Administration, 2008) und zum *Development and Manufacture of Drug Substances* ICH Q11 (US Food and Drug Administration, 2011) veröffentlicht. Abb. 3.10 veranschaulicht die Chronik der Einführung des QbD-Konzeptes.

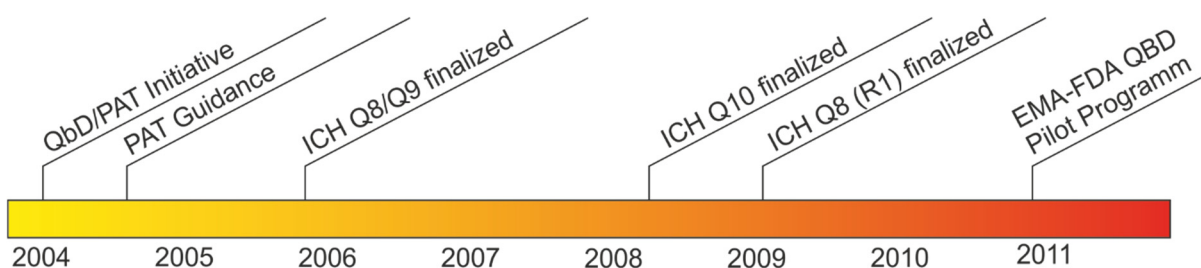


Abb. 3.10: Chronik der Einführung des QbD-Konzeptes. Oberhalb der Zeitleiste sind die von der FDA gegründeten Initiativen sowie die veröffentlichten Leitfäden dargestellt. (Moore, 2013)

3.3.2 Konzept des *Quality by Design*-Ansatzes

Quality by Design ist in der ICH Q8 *Guideline* als ein systematischer und auf wissenschaftlichen Erkenntnissen basierender Entwicklungsansatz von Arzneistoffen beschrieben. Im Mittelpunkt des Konzeptes steht die Qualität des Endproduktes und damit die Sicherheit des Patienten.

Das Konzept basiert auf einem gesteigerten Produkt- und Prozessverständnis, wodurch der Prozess kontrollierbar wird. Eine vereinfachte Darstellung des Konzeptes ist Abb. 3.11 zu entnehmen.

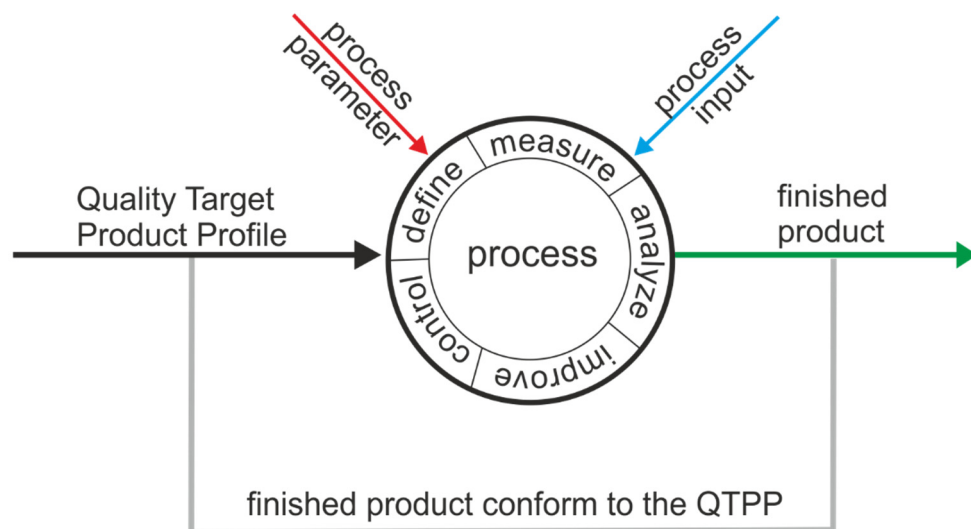


Abb. 3.11: Darstellung des QbD-Konzeptes. Die zu erfüllenden Eigenschaften des Zielproduktes sind in dem *Quality Target Product Profile* – QTPP definiert. Der Prozess wird von Eingangsparametern und -variablen beeinflusst und ist definier-, erfass- und analysierbar. Eine kontinuierliche Verbesserung des Prozesses sowie eine geeignete Kontrollstrategie werden angestrebt. Das fertige Produkt muss den Anforderungen des QTPP entsprechen.

In einem Qualitätsprofil des Zielproduktes (*Quality Target Product Profile* – QTPP) werden die zu erfüllenden Eigenschaften des Arzneistoffes definiert. Das Endprodukt muss diesen definierten Qualitätskriterien des QTPP entsprechen.

Der Prozess wird von Parametern sowie Eingangsvariablen beeinflusst. Dieser Einfluss wird durch systematische Untersuchungen während der Prozessentwicklung betrachtet. Die gezielte Analyse führt zu einem definierten, erfass- und analysierbaren Prozess, der innerhalb definierter Grenzen kontrollierbar ist und innerhalb des Produktionsablaufes kontinuierlich beeinflusst und verbessert werden kann.

Das Konzept kann in sieben Schritte unterteilt werden.

1. Erstellung des QTPP

Das QTPP beinhaltet eine vorausblickende Zusammenfassung von Qualitätsmerkmalen des Pharmazeutikums, die idealerweise erfüllt werden müssen, um die Qualität des Produktes unter Berücksichtigung der Sicherheit und Wirksamkeit des Arzneistoffes zu gewährleisten (US Food and Drug Administration, 2007).

2. Identifizierung der CQA

Ein kritisches Qualitätskriterium (*Critical Quality Attribute* – CQA) ist definiert als eine physikalische, chemische, biologische oder mikrobiologische Eigenschaft eines Wirkstoffes, die innerhalb geeigneter Grenzen, Regionen oder Verteilungen vorliegt und dadurch die geforderte Produktqualität sicherstellt.

3. Definition des *Product Design Space*

Der *Product Design Space* ist eine theoretisch und praktisch zu belegende Betrachtung sowie Bewertung möglicher Einflussfaktoren, wie Prozessparametern oder Eingangsvariablen, auf die kritischen Qualitätsmerkmale des Produktes unter Verwendung von Methoden der SVP und der Risikoanalyse. Hier entsteht eine multidimensionale Kombination und Interaktion substanzbezogener Eingangsvariablen und Prozessparameter, deren Einfluss auf die finale Produktqualität nachgewiesen werden konnte. Prozessparameter, die einen nachgewiesenen Einfluss auf die Qualität besitzen werden im QbD-Umfeld als kritische Prozessparameter (*Critical Process Parameter* – CPP) bezeichnet.

4. Definition des *Process Design Space*

Der *Process Design Space* ist eine Beschreibung der multidimensionalen Kombination von Einflussparametern auf die Leistung des Prozesses sowie die Qualität des Produktes. Ziel dieser Designstudien, die zumeist mit Hilfe der SVP sowie mit der Etablierung passender *scaledown*-Modelle durchgeführt werden, ist die Erhöhung des Prozessverständnisses.

5. Definition einer Kontrollstrategie

Eine Kontrollstrategie ist eine geplante und strukturierte Zusammenstellung einzelner Prüfmaßnahmen, die sich aufgrund des Produkt- und Prozessverständnisses ergeben und die Leistungsfähigkeit des Prozesses sowie die resultierende Produktqualität evaluieren.

6. Prozessvalidierung und Dokumentation

Dieser Punkt umfasst die Überprüfung der definierten Bereiche des *Design Space* durch die Anwendung geeigneter Strategien. Anschließend können die Dokumente bei der zuständigen Zulassungsbehörde eingereicht werden.

7. Prozessüberwachung und -modifikationen

Die Prozessüberwachung beinhaltet die kontinuierliche Kontrolle der definierten CQAs im Herstellungsprozess. Eine Modifikation innerhalb der definierten *Design Space* bedarf keiner erneuten Revision oder Zulassung bei der Behörde.

Die Anwendung des Konzeptes in den bestehenden integrierten Bioprozess zur Herstellung von Malariavakzinen ist ein wesentlicher Teil dieser Arbeit. Im Besonderen die Umsetzung in der Entwicklung chromatographischer Methoden wird hierbei betrachtet.

3.3.3 Prozessentwicklungsstrategien

Die Zulassungsbehörden der Vereinigten Staaten von Amerika sowie von Europa, FDA und EMA, fördern die Implementierung des QbD-Konzeptes bei der Neuzulassung bzw. Neuauslegung von Produktionsprozessen zur Herstellung von Biopharmazeutika. Insbesondere die Umsetzung des Konzeptes in den frühen Phasen der Produkt- und Prozessentwicklung soll dabei das Zulassungsverfahren beschleunigen und zu effektiveren Herstellungsverfahren führen. Die Entwicklung einer geeigneten Strategie ist hierfür von hoher Bedeutung.

Allgemein können Prozessentwicklungsstrategien in drei Ansätze unterteilt werden.

1. Heuristisch- oder wissensbasiert
2. Algorithmisch- oder modellbasiert
3. Experimentell

Der heuristische- oder wissensbasierte Ansatz ist stark abhängig von dem Wissen und den Fähigkeiten einzelner Personen oder eines Personenkreises. Ergebnisse werden basierend auf Erfahrungen abgeschätzt. Bei dieser Vorgehensweise kann das Resultat stark von der optimalen Lösung abweichen.

Das Vorgehen nach dem algorithmischen- oder modellbasierten Entwicklungsansatz bedingt das fundamentale Verständnis des jeweiligen Prozessschrittes. Bei diesem Ansatz werden mathematische Modelle und Computersimulationen verwendet, um Lösungen zu prognostizieren und diese im Idealfall zu optimieren.

Der experimentelle Entwicklungsansatz nutzt die aus Untersuchungen erzeugten Daten, um eine optimale Lösung zu ermitteln. Abhängig von der Fragestellung werden die Experimente geplant, durchgeführt und ausgewertet.

Die QbD-Initiative unterstützt die Implementierung des experimentellen- und modellbasierten Entwicklungsansatzes in der pharmazeutischen Industrie. Mit Hilfe dieser Strategien soll das Produkt- und Prozessverständnis maximiert und gleichzeitig Transparenz für die Zulassungsbehörden geschaffen werden.

Die Prozessentwicklungsstrategie am Forschungs- und Transferzentrum Bioprozess- und Analysetechnik ist dem experimentellen- und modellbasierten Ansatz zuzuordnen. Vorangegangene Arbeiten beschäftigten sich im Schwerpunkt mit der Analyse und Optimierung des Fermentationsprozesses der Malariavakzine. Der Fokus bei der experimentellen Prozessentwicklung wurde dabei auf die Anwendung der SVP gelegt.

Mit der vorliegenden Arbeit wird die Anwendung der SVP auf den Bereich der chromatographischen Aufreinigung erweitert. Das ganzheitliche QbD-Konzept wird als übergeordnet angesehen, wobei die SVP als Hilfsmittel zur mathematischen Beschreibung des Prozesses verwendet wird.

4 Material und Methoden

4.1 Quantitative Analysemethoden

4.1.1 Kolorimetrische Gesamtproteinbestimmung

Die kolorimetrische Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration $c_{\text{Ptot_Brad}}$ erfolgte mit Hilfe des Quick Start™ Bradford Protein Assay der Fa. Bio-Rad, München. Die Bindung des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau G-250 führte zu einer Absorptionsverschiebung des entstehenden farbigen Komplexes von 465 auf 595 nm. Die Messung erfolgte in einem Mikroplattenphotometer (Sunrise™) der Fa. Tecan, Schweiz in einer Dreifachbestimmung.

4.1.2 Gesamtproteinbestimmung mit UV-Vis-Spektroskopie

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration $c_{\text{Ptot_UV}}$ wurde das Spektralphotometer Tecan Infinite® M200 Pro (Tecan, Schweiz) mit der zugehörigen Messsoftware i-control™ v 1.8 verwendet. Die genutzte Küvette aus Quarzglas (Suprasil® QS, 100 µl) des Herstellers Hellma Analytics, Müllheim, besaß eine Schichtdicke d_c von 1 cm. Zur Ermittlung der Absorption bei 280 nm A_{280} wurde ein Wellenlängenscan von 230-700 nm mit einer Schrittweite von 2 nm durchgeführt.

Die Gesamtproteinkonzentration $c_{\text{Ptot_UV}}$,

$$c_{\text{Ptot_UV}} = \frac{A_{280} \cdot MW_I}{\epsilon_{280} \cdot d_{\text{KV}}}, \quad (4.1)$$

wurde aus dem Produkt der Absorption A_{280} und dem Molekulargewicht des Zielproteins MW_I bezogen auf das Produkt des Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} ,

$$\epsilon_{280} = n_{\text{Trp}} \cdot 5500 + n_{\text{Tyr}} \cdot 1490 + n_{\text{SS}} \cdot 125, \quad (4.2)$$

berechnet aus der Anzahl der Tryptophane n_{Trp} , Tyrosine n_{Tyr} und Cystine n_{SS} im Proteinmolekül und der Schichtdicke der verwendeten Küvette d_{KV} ermittelt (Pace et al., 1995).

4.1.3 Densitometrische SDS-PAGE-Analyse

Die densitometrische Analyse der Zielprodukte erfolgte durch eine nicht-reduzierende oder reduzierende SDS-PAGE (Criterion™ TGX™ Precast Gel, 4-15 %, Bio-Rad, München). Als Reduktionsmittel wurden dem 4-fach XT Sample Buffer (Bio-Rad, München) 8 % (v/v) Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe) zugesetzt. Drei Volumenanteile der Probe wurden mit einem Volumenanteil Probenpuffer gemischt und 10 min bei 70 °C erhitzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 150 V für 45 min.

Als Proteinmarker wurde ein PageRuler™ Unstained der Fa. Thermo Scientific, Karlsruhe verwendet. Nach einer Coomassie-Färbung mit anschließender Entfärbeprozedur erfolgte die densitometrische Auswertung mit Hilfe der Software TotalLab Quant, UK oder der Software Image Lab™, Bio-Rad, München.

Die Reinheit des Zielproteins P_{Pi} ,

$$P_{Pi} = \frac{B_{Pi}}{B_{Ptot}} \cdot 100 \% , \quad (4.3)$$

wurde durch das Verhältnis des Bandenvolumens der Zielproteinbande B_{Pi} bezogen auf das Gesamtbandenvolumen B_{Ptot} kalkuliert.

4.1.4 Berechnung der Zielproteinkonzentration

Die Konzentration eines Zielproteins c_{Pi} ,

$$c_{Pi} = c_{Ptot} \cdot P_{Pi} , \quad (4.4)$$

wurde durch die Multiplikation der ermittelten Gesamtproteinkonzentration c_{Ptot} und der densitometrisch bestimmten Produktreinheit P_{Pi} berechnet.

4.2 Qualitative Analysemethoden

4.2.1 Analytische SE-HPLC

Zur Analyse der qualitativen Bewertung der Zusammensetzung wurde ein HPLC-System der Fa. VWR International, Darmstadt verwendet. Das System (LaChrom) bestand aus einem Interface (D-7000), dem Pumpenmodul (L-7100), einem Säulenofen (L-7360), einem Autosampler (L-7250) und einem Dioden Array Detektor (DAD, L-7455).

Als stationäre Phase wurde eine TSKgel® Super SW2000 Säule verwendet. Die mittlere Partikelgröße betrug 4 µm und die mittlere Porengröße 125 Å. Die Säule besaß einen Innendurchmesser von 4.6 mm und eine Länge von 30 cm. Der Kalibrierbereich der Säule wird für globuläre Proteine im Bereich von 5-150 kDa angegeben (Tosoh Bioscience, 2015).

4.2.2 Nachweis proteolytischer Aktivität durch Zymographie

Die proteolytische Aktivität wurde mit Hilfe von Zymogramm Gelen (Criterion™ Zymogram Precast Gels) der Fa. Bio-Rad, München nachgewiesen. Zur Anwendung kamen Gele mit 10 % Gelatine, Trennbereich von 30-150 kDa, sowie 12.5 % Casein, Trennbereich 20-120 kDa, als immobilisierte Substrate zum Einsatz. Ein Volumenanteil der Proben wurde mit einem Volumenanteil Zymogramm Sample Buffer (Bio-Rad, München) vermischt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 125 V für 90 min. Nach der Auftrennung wurden die Gele für 30 min in Renaturierungspuffer (Bio-Rad, München) und anschließend über Nacht bei 37 °C in Entwicklungspuffer (Bio-Rad, München) inkubiert. Die Färbung erfolgte mit 0.5 % Brilliant-Blau R-250 (Roth, Karlsruhe) in 40 % Methanol (Roth, Karlsruhe) und 10 % Essigsäure (Roth, Karlsruhe) bis farblose Banden gegenüber blauen Hintergrund erkennbar waren (30-60 min).

4.3 Anwendung des QbD-Konzeptes im integrierten Bioprozess

4.3.1 Vorgehensweise bei der Implementierung

Das QbD-Konzept umfasst den gesamten Lebenszyklus eines pharmazeutisch wirksamen Arzneistoffes beginnend in den frühen Stadien der Forschung über die Markteinführung bis zum Vertrieb des Produktes. Aufgrund der sich in frühen Phasen der Produkt- und Prozessentwicklung befindlichen Zielproteine dieser Arbeit wurde die Implementierung des QbD-Ansatzes zur Erstellung eines *Product- und Process Design Space* fokussiert.

Der Ausgangspunkt des QbD-Konzeptes ist die Erstellung eines QTPP der Zielproteine. Innerhalb der Arbeit wurde hierzu die Stabilität von P-D1M1 und D1M1-His als ein CQA betrachtet. Die Prozessanalyse sowie die Entwicklung und Optimierung der chromatographischen Methoden des Bioprozesses bauen aus diesem Grund stets auf der Stabilitätsbetrachtung der Proteine auf.

Die Untersuchung der Stabilität erfolgte mit Hilfe der densitometrischen Erfassung des Bandenprofils aus der SDS-PAGE-Analyse sowie durch die Betrachtung der chromatographischen Auftrennung nach *Size Exclusion-HPLC*. Durch die in vorangegangenen Arbeiten beschriebene mögliche proteolytische Degradation der Zielproteine wurde die Methode der Zymographie zum Nachweis von Proteasen herangezogen.

Mit Hilfe dieser Methoden wurde die Stabilität der Zielproteine in systematisch durchgeführten Studien analysiert. In den Experimenten wurden einerseits die Einflüsse des Expressionssystems *P. pastoris* und andererseits die von Prozessparametern der Chromatographie auf die Stabilität der Zielproteine mit Hilfe der SVP untersucht. Mit dem Ziel das Produktverständnis zu erhöhen, wurde aus den Resultaten der *Product Design Space* gebildet.

Sowohl in dem vorgestellten integrierten Bioprozess zur Herstellung von Malariavakzinen als auch in der Produktion der *pfAMA1*-Ektodomäne für klinische Studien unter cGMP-Bedingungen (Faber et al., 2008) findet der primäre Aufreinigungsschritt mit Hilfe der IMAC statt. Aufgrund dieser Tatsache wurde eine Steigerung des Prozessverständnisses durch die in der Arbeit durchgeführten *downscale*-Untersuchungen angestrebt.

Zur Identifizierung und Charakterisierung geeigneter Adsorbentmaterialien der IMAC wurden Bindungsstudien mit den Zielproteinen durchgeführt. Hierfür wurden zum einen Adsorptionsisothermen im statischen System und zum anderen Durchbruchkurven im dynamischen System aufgenommen. Die Ergebnisse der Methoden wurden analysiert und anschließend evaluiert.

Mit einem ausgewählten Adsorbermaterial der IMAC wurde für die Zielproteine P-D1M1 und D1M1-His jeweils eine Optimierungskampagne nach dem SVP-Konzept, bestehend aus Screening, Optimierung und Robustheitstest durchgeführt. Für eine effiziente Durchführung der Experimente wurde eine zweistufige Aufreinigungsmethode entwickelt. Zusätzlich wurden *downscale*-Experimente zur Stabilitätsanalyse der Zielproteine nach der Aufreinigung mit IMAC durchgeführt. Die Resultate wurden in einem *Process Design Space* zusammengefasst und abschließend beurteilt.

Abb. 4.1 veranschaulicht die Vorgehensweise zur Analyse und Optimierung der chromatographischen Methoden des integrierten Bioprozesses.

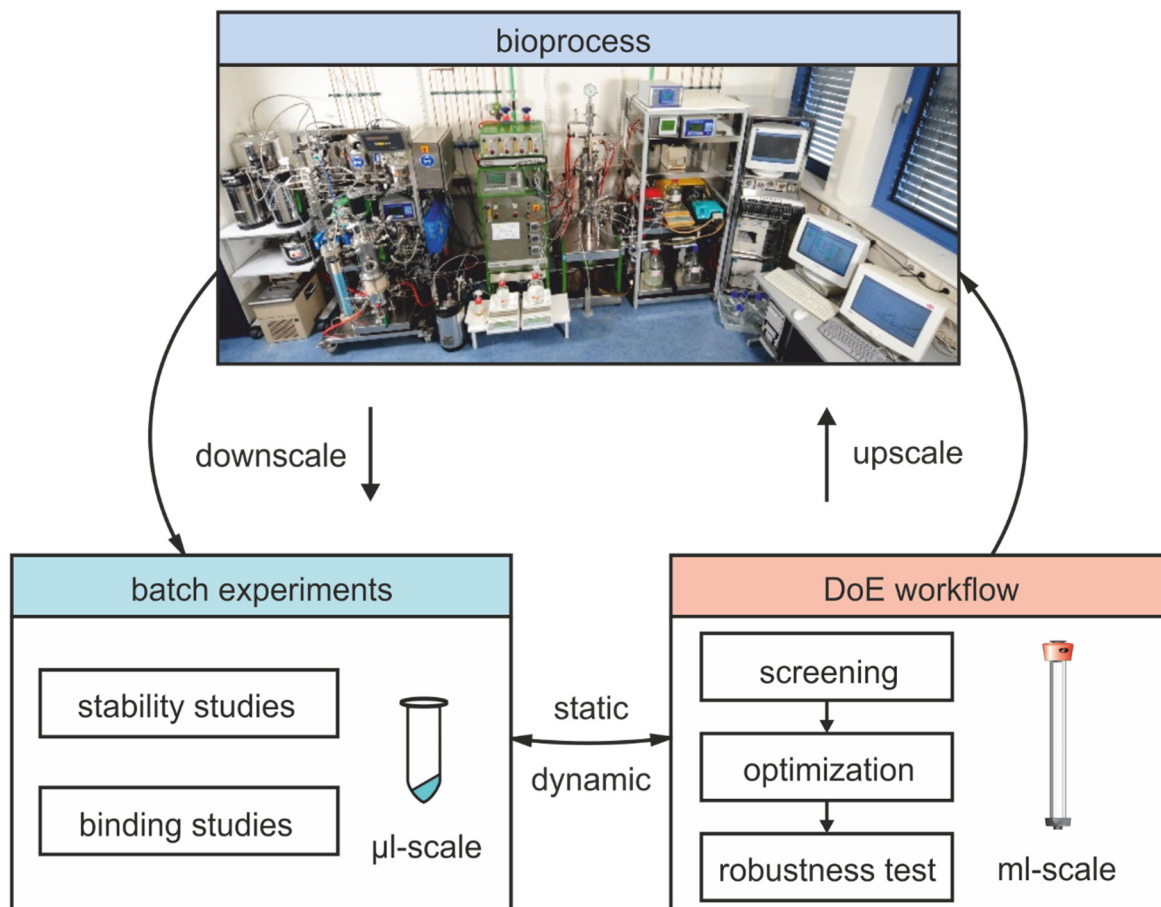


Abb. 4.1: Konzept zur Analyse und Optimierung des integrierten Bioprozesses. Die Darstellung veranschaulicht die Vorgehensweise zur Analyse der Zielprodukte und zur Optimierung der chromatographischen Methoden. In *downscale batch*-Experimenten wurden Stabilitätsuntersuchungen der Zielprodukte sowie Bindungsstudien der Zielproteine mit unterschiedlichen Adsorbermaterialien durchgeführt. Die Ergebnisse aus den Bindungsstudien im statischen System wurden genutzt, um eine Vorauswahl eines adäquaten Adsorbers zu treffen. Mit dem ausgewählten Adsorber wurde eine Optimierungskampagne nach dem Arbeitsablauf der SVP (*Design of Experiments* – DoE) im dynamischen System durchlaufen. Die Resultate der Optimierungsprozedur wurden in den Prozess übertragen und abschließend analysiert.

Mit dem Fokus auf die Proteinstabilität sowie der Effizienz des Prozesses wurde ein Konzentrierungs- und Diafiltrationsschritt nach der primären Reinigung durch eine IMAC in den Prozessablauf integriert.

Die Neuentwicklung einer zusätzlichen chromatographischen Aufarbeitung nach dem Konzentrierungsschritt wurde für das Zielprotein P-D1M1 auf gleicherweise nach dem in Abb. 4.1 veranschaulichten Konzept durchgeführt.

Aufbauend auf der Stabilitätsstudie des Proteins und der Analyse spezifischer Bindungskapazitäten im μl -Maßstab wurde hier ebenfalls eine Optimierungsprozedur nach dem SVP-Ansatz durchgeführt. Abschließend wurde der *Process Design Space* der Methode formuliert und bewertet.

Der erweiterte integrierte Bioprozess wurde erprobt und bezüglich der Produktqualität und Prozessquantität analysiert.

Der durch die statistische Versuchsplanung generierte Informationsgehalt ermöglichte sowohl eine präzise als auch logische Auslegung und Beurteilung der durchgeführten Experimente. Die SVP-Methode ist daher Thema des nachfolgenden Unterkapitels.

4.3.2 Grundlagen der statistischen Versuchsplanung (SVP)

Die SVP basiert auf dem Konzept der simultanen Variation möglicher Einflussfaktoren $X_{i,j}$ auf die Gütekriterien y_m des betrachteten Systems m . Durch diesen Ansatz kann ein vergleichsweise hoher Erkenntnisgewinn gegenüber den konventionellen Methoden der Optimierung über das Systemverhalten bei geringem experimentellen und dadurch auch zeitlichem Aufwand erlangt werden (Siebertz et al., 2010).

Aus den einzelnen Messergebnissen kann durch *multiple linear regression* eine Regressionsfunktion y_m ,

$$y_m = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i \cdot X_i + \sum_{1 \leq i < j} a_{ij} \cdot X_i \cdot X_j + \sum_{i=1}^n a_{ii} \cdot X_i^2 + \varepsilon, \quad (4.5)$$

bestimmt werden, die im gesamten Versuchsraum Gültigkeit besitzt. Die erstellte Regressionsfunktion y_m kann dabei aus linearen, Interaktions- und quadratischen Modellanteilen bestehen. Mit Hilfe dieses mathematischen Modells ist es möglich, für eine beliebige Faktorkombination einen numerischen Wert der Systemantwort zu berechnen und somit Aussagen über zukünftig durchgeführte Experimente treffen zu können (Eriksson et al., 2008).

Die systematische Vorgehensweise nach dem SVP-Ansatz kann in folgende sieben Schritte unterteilt werden.

1. Definition der Gütekriterien

Die Definition eines Gütekriteriums ist abhängig von der Art des zu optimierenden Objektes. Für die Beurteilung der Qualität eines pharmazeutischen Produktes sind die nach QbD zu definierenden kritischen Merkmale CQAs der Produkte als Gütekriterien festzulegen. Die Beurteilung eines Produktionsprozesses kann anhand von Kennzahlen wie beispielsweise der Wiederfindung in chromatographischen Prozessen erfolgen.

2. Scouting von möglichen Einflussfaktoren

Einflussfaktoren sind unabhängige, kontrolliert einzustellende, variable oder konstante Größen, die möglicherweise einen Einfluss auf die definierten Gütekriterien besitzen. In der industriellen Praxis erfolgt die Festlegung möglicher Einflussfaktoren anhand einer ausführlichen Risikoanalyse nach *ICH Q9 Quality Risk Management* (US Food and Drug Administration, 2005). Innerhalb dieser Arbeit wurden mögliche Einflussfaktoren aus Literaturquellen oder Erfahrungen aus vorangegangenen Arbeiten bezogen. Anschließend erfolgte eine Beurteilung des möglichen Einflusses auf die definierten Gütekriterien.

3. Wahl des Regressionsmodells und Versuchsplanes

Das zu verfolgende Ziel der Untersuchung definiert die Wahl des Regressionsmodells und des dazugehörigen Versuchsplanes. Tab. 4.1 fasst die zu verfolgenden Ziele des jeweiligen strategischen Schrittes einer Optimierungskampagne nach dem Ansatz der SVP zusammen.

Tab. 4.1: Strategische Schritte und Ziele der Optimierung mit Hilfe der SVP

Schritt	Ziel der Untersuchung	Modell	Versuchsplan*
Screening	Identifikation signifikanter Faktoren, Verkleinerung des Untersuchungsbereiches	linear oder interagierend	teilkfaktoriell
Optimierung	Bestimmung eines optimalen Arbeitspunktes bzw. Arbeitsbereiches	quadratisch oder kubisch	vollfaktoriell oder zentral zusammengesetzt
Robustheitstest	Ermittlung der Beständigkeit des Systems gegenüber geringen Schwankungen der Einstellungen signifikanter Faktoren	linear oder interagierend	vollfaktoriell oder teilkfaktoriell

*Anwendung bei quantitativen Einflussfaktoren

Die Schritte einer Optimierungsprozedur können abhängig von dem Vorwissen über das zu optimierende System sowohl aufeinander aufbauend oder voneinander unabhängig betrachtet werden.

Die Einstellungsbereiche der physikalischen Einflussfaktoren X_i werden für die Bildung eines Regressionsmodells auf den Wertebereich von -1 bis +1 normiert.

Die normierten Faktoren x_i ,

$$x_i = \frac{2 X_i - X_{i\max} - X_{i\min}}{X_{i\max} - X_{i\min}}, \quad (4.6)$$

ergeben sich aus der maximalen Faktoreinstellung $X_{i\max}$ und der minimalen Faktoreinstellung $X_{i\min}$ des jeweiligen Einflussfaktors X_i .

Die Normierung hat zur Folge, dass ein symmetrischer Untersuchungsraum erzeugt wird, in dem alle Faktoren auf einen identischen Einflussbereich beschränkt werden. Abb. 4.2 zeigt die in Tab. 4.1 genannten Versuchsdesigns mit den drei quantitativ erfassbaren Einflussfaktoren x_1 , x_2 und x_3 .

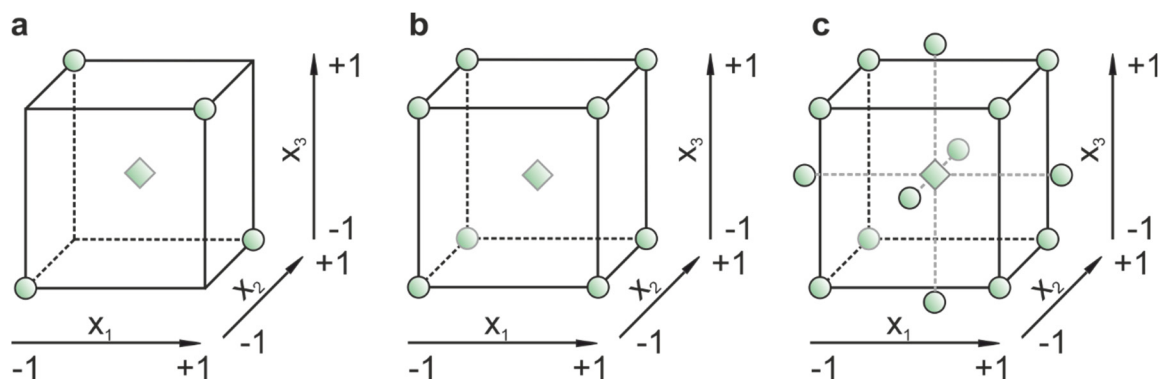


Abb. 4.2: Versuchsdesigns mit drei normierten, quantitativen Einflussfaktoren. Die Darstellung zeigt **a** einen teilfaktoriellen, **b** einen vollfaktoriellen und **c** einen zentral zusammengesetzten Versuchsplan. Kreise verdeutlichen ein durchzuführendes Experiment. Die Rautendarstellung symbolisiert drei Versuche mit mittleren Faktoreinstellungen im Mittelpunkt des Kubus, die *Center Point* (CP)-Experimente genannt werden.

Abb. 4.2 a und b zeigen einen teilfaktoriellen bzw. vollfaktoriellen Versuchsplan. Bei diesem Design stellen die Eckpunkte des Würfels die Faktoreinstellungen der durchzuführenden Experimente dar. Der im Mittelpunkt des Würfels liegende Versuchspunkt wird als *Center Point* (CP) bezeichnet und schließt drei Versuche mit identischen Einstellungen ein. Abb. 4.2 c zeigt einen zentral zusammengesetzten Versuchsplan. Dieser Versuchsplan schließt zusätzliche Versuche im Mittelpunkt der Würfelflächen ein. Durch diese Experimente nimmt die Überbestimmtheit des Versuchsplanes zu und ermöglicht dadurch die Bestimmung quadratischer Modellterme.

4. Durchführung der Experimente

Die durch den Versuchsplan vorgegebenen Experimente werden durchgeführt.

5. Rohdatenanalyse

Die Voraussetzung für eine statistische Analyse der Experimente ist eine Normalverteilung (NV) der Messwerte. Zur Überprüfung eines Datensatzes auf NV können graphische Hilfsmittel wie Histogramme, das Wahrscheinlichkeitsnetz oder der Box-Plot verwendet werden. Ergänzend zur graphischen Beurteilung der Messwertverteilung ist die Bewertung durch ein mathematisches Testverfahren zu bestätigen. Für die Überprüfung kleinerer Stichproben ($n < 50$) bietet sich der Shapiro-Wilk-Test oder auch W-Test an. Ist keine NV gegeben, so ist eine Transformation der Daten vorzunehmen und die Prüfung auf NV erneut durchzuführen (Eriksson et al., 2008).

Im nächsten Schritt der Rohdatenanalyse sind die Daten einem Ausreißertest zu unterziehen. Ein geeignetes Verfahren bei geringen Stichprobenumfang ($n \geq 3$) ist hierfür der Grubbs-Test (Grubbs, 1969). Die Voraussetzung der Anwendung dieses Testverfahren ist eine vorliegende NV der Messwerte.

6. Regressionsanalyse

Der empirische Zusammenhang zwischen den definierten Einflussfaktoren $x_{i,j}$ und der Systemantwort y_m ,

$$y_m = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i \cdot x_i + \sum_{1 \leq i < j}^n b_{ij} \cdot x_i \cdot x_j + \sum_{i=1}^n b_{ii} \cdot x_i^2 + \varepsilon, \quad (4.7)$$

kann über die Lösung eines linearen Gleichungssystems mit Hilfe der abgeschätzten Regressionskoeffizienten b_i beschrieben werden. Die erzeugten Modelle beinhalten zunächst alle Einflussfaktoren des Versuchsplanes. Eine Anpassung des Modells an ausschließlich signifikante Faktoren ist für die Aussagekraft des Modells unumgänglich. Ein Einflussfaktor x_i kann als nicht signifikant bewertet werden, wenn sein durch die Varianzanalyse bestimmter Vertrauensbereich größer ist als sein eigentlicher Einfluss. Bei der Anpassung eines Modells ist schrittweise vorzugehen, da die Entfernung eines Terms zu der Erstellung eines neuen Modells führt. Auch die „Hierarchie der Modellterme“ sollte gewahrt bleiben. Zunächst wird das Modell um nicht signifikante, höhere Modellterme, wie quadratische oder Wechselwirkungsterme bereinigt. Ist ein nicht signifikanter Einzelfaktor an einem signifikanten, höheren Term beteiligt, muss auch der Einzelfaktor bei der Modellbildung berücksichtigt werden (Siebertz et al., 2010).

7. Prüfung auf Gültigkeit des Modells

Die Beurteilung der Güte des aufgestellten Modells erfolgt anhand von Kenngrößen, die auf der Basis der Varianzanalyse gebildet werden. Tab. 4.2 fasst die Kenngrößen und deren minimale Anforderungen an ein geeignetes Modell zur Beschreibung des Systemverhaltens zusammen.

Tab. 4.2: Kenngrößen zur Beurteilung von Regressionsmodellen (Eriksson et al., 2008)

Kenngröße	Bezeichnung	minimal Anforderung
R^2	Bestimmtheitsmaß	> 0.50
Q^2	Vorhersagegüte	> 0.50
R^2-Q^2	Differenz zwischen R^2 und Q^2	< 0.30
MV	Modellvalidität	> 0.25
RP	Reproduzierbarkeit	> 0.50

Nachfolgend wird eine kurze Erläuterung der Kenngrößen gegeben.

R^2 – Bestimmtheitsmaß

Der R^2 -Wert ist ein Maß für die Anpassungsgüte der Rohdaten an das verwendete Regressionsmodell. Der Wertebereich erstreckt sich von 0 bis 1, wobei 1 ein perfektes Modell und 0 ein nicht anpassbares Modell widerspiegelt.

Q^2 – Güte der Voraussagung

Die Güte der Voraussagung stellt ein Maß für die Vorhersagbarkeit experimenteller Ergebnisse mit Hilfe des erstellten Modells dar. Der Wertebereich der Vorhersagegüte liegt zwischen $-\infty$ und 1.

Für eine gute Vorhersagegüte des Modells sollte die Differenz zwischen R^2 und Q^2 nicht größer als 0.3 betragen.

MV – Modellvalidität

Die Modellvalidität gibt in einem Wertebereich zwischen $-\infty$ und 1 an, in welchem Maß das gewählte Modell für die Beschreibung des Systemverhaltens geeignet ist.

RP – Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit erlaubt Aussagen hinsichtlich der Wiederholbarkeit der Experimente. Der Wertebereich, in dem sich die Reproduzierbarkeit bewegen kann, wird mit 0 bis 1 angegeben.

(Eriksson et al., 2008)

4.4 Stabilitätsstudien der Malariavakzinkandidaten

Für die Analyse der Proteinstabilität in Kulturüberstand wurde die Fermentationsbrühe aus den Kultivierungen mit der internen Kennzeichnung JJJ1315 und JJJ1415 bei 19500 g für 30 min zentrifugiert. Je 1 ml des erhaltenen Überstandes wurde aliquotiert und bei 23 °C sowie bei 30 °C inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 0, 1, 2, 3 d erfolgte die Analyse mit Hilfe der SDS-PAGE, SE-HPLC und Zymographie.

Die Analyse der Stabilität in wässrigen Puffersystemen erfolgte systematisch nach dem in Kap. 4.3.2 vorgestellten SVP-Konzept.

1. Definition des Gütekriteriums

Die Stabilität der Zielprodukte wurde als CQA definiert. Als messbare Größe der Stabilität wurde die Wiederfindung R_{Pi} ,

$$R_{Pi} = \frac{P_{PiNj}}{P_{Pi_0}} \cdot 100 \%, \quad (4.8)$$

zur Beurteilung der Stabilität bestimmt. Die Berechnung der Produktwiederfindung erfolgt aus dem Verhältnis der Produktreinheit P_{Pi} nach Inkubation in den spezifischen Bedingungen des jeweiligen SVP-Experimentes N_j und der Produktreinheit vor Inkubation P_{Pi_0} .

2. Scouting möglicher Einflussfaktoren

Das Scouting möglicher Einflussfaktoren erfolgte anhand experimenteller Erfahrungen und Literaturrecherche. Martens et al. konnte eine erhöhte Stabilität der Zielproteine in einem pH-Wert-Bereich von 5-7.5 in Kulturüberstand nachweisen. Der Einstellungsbereich des möglichen Einflussfaktors pH-Wert der Flüssigphase pH_L wurde daher in einem Bereich von 4-9 gewählt. Die pH-Werte unterhalb von 4 und oberhalb von 9 wurden ausgeschlossen, da die Vermutung bestand, dass extremere pH-Werte zu einem rasanten Abbau führen und somit eine statistische Auswertung unbrauchbar machen.

Die Salzkonzentration der Flüssigphase c_{saltL} wurde als weiterer Einflussfaktor definiert. Die Zugabe von Salzen kann eine Stabilisierung oder eine Destabilisierung von Proteinen zur Folge haben. Der Grund hierfür liegt in der Verstärkung oder Abschwächung des hydrophoben Effektes durch chaotrope oder kosmotrope Salze (Tanford, 1970; Timasheff, 1993).

Der Einfluss der Lagertemperatur ϑ_L auf die Stabilität von Proteinen ist vielfach beschrieben und wird innerhalb dieser Studie als der Faktor mit dem größten Einfluss eingeschätzt (Wang, 1999; Scalley und Baker, 1997).

Die gewählten Einstellungsbereiche der Faktoren sind in Tab. 4.3 zusammengefasst. Darüber hinaus wurde eine Risikobewertung vorgenommen, um die Stärke des Einflusspotentials im Vorwege abzuschätzen.

Tab. 4.3: Einflussfaktoren und Einstellungsbereiche der Stabilitätsbetrachtung

Einflussfaktor	Min	Max	Risikobewertung*
pH-Wert (pH _L)	4.0	9.0	+
Salzkonzentration (C _{SaltL})	0.1 M	1.0 M	++
Lagertemperatur (ϑ _L)	5 °C	45 °C	+++

*Bewertungssystem:

+	schwacher Einfluss
++	mittlerer Einfluss
+++	starker Einfluss

3. Wahl des Regressionsmodells und Versuchsplanes

Für die Untersuchung wurde ein zentral zusammengesetzter Versuchsplan verwendet (vgl. Abb. 4.2 c). Aus Vorversuchen wurde ermittelt, dass ein quadratischer Einfluss eines oder mehrerer Faktoren vorliegt und daher ein Regressionsmodell höherer Ordnung für die Beschreibung der Stabilität notwendig ist (Dukart, 2013).

4. Durchführung der Experimente

Das Ausgangsmaterial wurde mit Hilfe einer 5 ml HiTrap™ Desalting Säule (GE Healthcare, Deutschland) in die spezifischen Bedingungen des jeweiligen Experimentes überführt. Allen hierzu verwendeten Puffersystemen wurde 20 mM NaH₂PO₄ (Roth, Karlsruhe) zugesetzt. Die pH-Werte der jeweiligen Puffersysteme wurden mit 25 % Salzsäure (Roth, Karlsruhe) bzw. 1 M Natronlauge (Roth, Karlsruhe) eingestellt. Anschließend folgte die Vakuumfiltration der Pufferlösungen (0.45 µm).

Jeweils 750 µl der umgepufferten Proteinlösungen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 5, 25 und 45 °C inkubiert. Eine Probennahme erfolgte jeweils nach 0, 24, 48 und 132 h. Anschließend erfolgte die densitometrische SDS-PAGE-Analyse nach Kap. 4.1.3.

5. Rohdatenanalyse

Die gewonnenen Rohdaten wurden zunächst in einem Boxplot dargestellt und die Streuung der Messwerte anhand des Interquartilabstandes (IQR) beurteilt. Abb. 4.3 zeigt eine Darstellung der verwendeten Boxplot-Einstellungen.

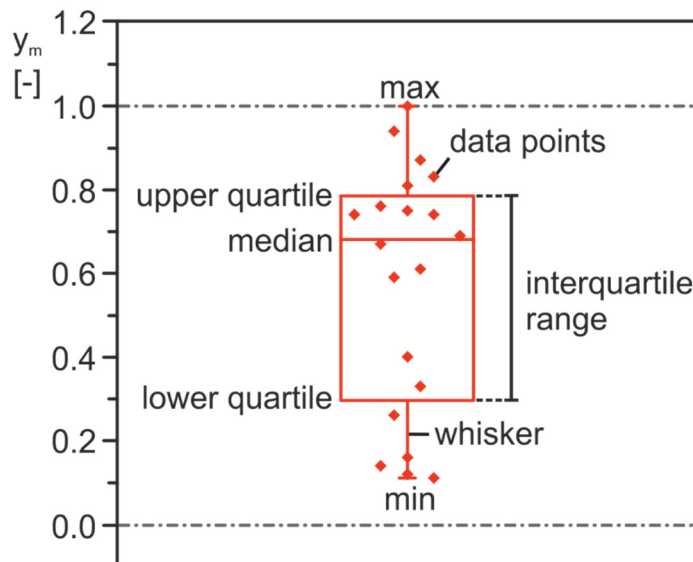


Abb. 4.3: Boxplot einer Messdatenreihe mit dem Gütekriterium y_m . Einzelne Messdaten werden als Raute dargestellt. Die Box wird abgegrenzt von dem unteren sowie oberen Quartil und kennzeichnet den Wertebereich in dem 50 % der Messwerte liegen (Interquartilabstand). Die Whisker kennzeichnen das Minimum und Maximum der Messwertverteilung.

Zusätzlich zur graphischen Prüfung der Messwerte wurden die Datensätze mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Testverfahrens auf eine vorliegende NV geprüft (Shapiro and Wilk, 1965). Anschließend erfolgte die Untersuchung der Datensätze auf Ausreißer mit dem Grubbs-Test (Grubbs, 1969). Das Signifikanzniveau für die angewendeten Testverfahren wurde auf 5 % festgelegt.

Beide Testverfahren wurden in der vorangegangenen Dissertation von Ellert (2015) zur Rohdatenanalyse von Experimenten der statistischen Versuchsplanung verwendet. Innerhalb dieser Arbeit wurden die theoretischen Grundlagen der Testverfahren erörtert, weshalb hier nur auf diese Arbeit verwiesen wird.

Für die Durchführung der genannten Testverfahren wurde die Software OriginPro 2015, OriginLab, USA verwendet.

6. Regressionsanalyse

Aus den Rohdaten wurde die Regressionsfunktion der Wiederfindung R_{Pi} ,

$$\begin{aligned} R_{Pi} = & a_0 + a_1 \cdot pH_L + a_2 \cdot c_{SaltL} + a_3 \cdot \vartheta_L \\ & + a_{11} \cdot pH_L^2 + a_{22} \cdot c_{SaltL}^2 + a_{33} \cdot \vartheta_L^2 \\ & + a_{12} \cdot pH_L \cdot c_{SaltL} + a_{13} \cdot pH_L \cdot \vartheta_L + a_{23} \cdot c_{SaltL} \cdot \vartheta_L, \end{aligned} \quad (4.9)$$

erstellt und die Regressionskoeffizienten nach Kap. 4.2.3 ermittelt.

7. Prüfung der Gültigkeit des Modells

Die Prüfung auf Gültigkeit des erstellten Modells erfolgte anhand der ermittelten Kenngrößen zusammengefasst in Tab. 4.2. Die Berechnungen der Kenngrößen sind ausführlich in den Arbeiten von Fricke (2015) und Ellert (2015) veröffentlicht und werden daher nicht weiter erörtert.

Die Versuchsplanung sowie die Regressionsanalyse wurde mit Hilfe der SVP-Software MODDE[®] 10 der Fa. Umetrics, Schweden durchgeführt.

4.5 Analyse der Bindungskapazität eines Adsorbers

4.5.1 Aufnahme von Adsorptionsisothermen

Die experimentelle Vorgehensweise zur Aufnahme von Adsorptionsisothermen ist in Abb. 4.4 dargestellt.

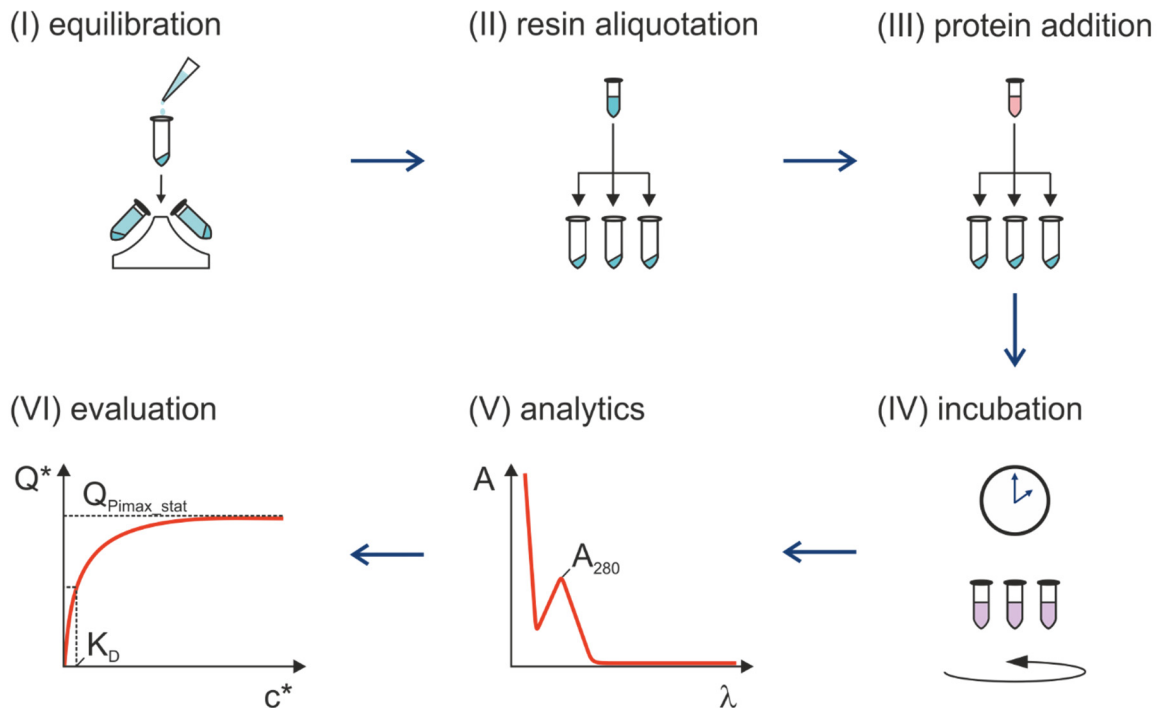


Abb. 4.4: Experimentelle Vorgehensweise zur Aufnahme von Adsorptionsisothermen. Im ersten Schritt wurden die Adsorbentmaterialien mit BB equilibriert (I). Anschließend wurden 10 μl des Materials aliquotiert (II). Zu den Ansätzen wurden 200 μl Proteinlösung gegeben (III) und bis zum Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes bei konstanter Durchmischung inkubiert (IV). Der Überstand wurde mit Hilfe der UV-Vis-Spektroskopie analysiert und die Gleichgewichtskonzentration in Lösung c^* ermittelt (V). Die statische maximale Bindungskapazität $Q_{P_{\text{imax_stat}}}$ und die Dissoziationskonstante K_D wurden mit Hilfe einer Annäherungsfunktion bestimmt (VI).

Für die Bestimmung der IMAC-Isothermen wurden zunächst 500 μl Adsorbentmaterial in einem 2 ml Mikroreaktionsgefäß vorgelegt und dreimal mit je 1 ml der jeweiligen Metallsulfat-Lösung ($c_{\text{MeSO}_4} = 0.1 \text{ M}$) inkubiert. Überschüssige Metallionen wurden durch dreimaliges Waschen mit 1 ml 50 mM Acetatpuffer pH 5.0 entfernt.

Die Equilibrierung der Adsorbentmaterialien erfolgte dreimalig mit je 1 ml des jeweiligen Bindungspuffers. Eine Durchmischung der Ansätze wurde durch das Schütteln bei 1500 rpm mit einem Vibrax VKR Basic der Fa. IKA, Staufen erreicht. Die Inkubationszeit aller Schritte betrug 5 min. Die Suspension wurde durch einen Zentrifugations-schritt bei 3500 g (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Wesseling) separiert und der Überstand verworfen.

Nach der Equilibrierung wurde der BB entfernt und jeweils 10 μl des Adsorbermaterials in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Adsorptionsvorgang wurde durch die Zugabe von 200 μl der jeweiligen Proteinlösung gestartet. Die Inkubation erfolgte bei 1500 rpm (Abb. 4.4).

Die Bestimmung der spezifischen Parameter maximale Bindungskapazität $Q_{P_{i\max}}$ und der Dissoziationskonstante K_D setzt das Reaktionsgleichgewicht voraus. Die hierzu benötigte Inkubationszeit wurde durch eine Analyse des Reaktionsgleichgewichtes ermittelt. Beispielhaft ist diese Untersuchung in Abb. 4.5 anhand der Analyse des Reaktionsgleichgewichtes des Zielproteins D1M1-His am Adsorber Chelating Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare, Schweden) mit immobilisierten Ni^{2+} -Ionen gezeigt.

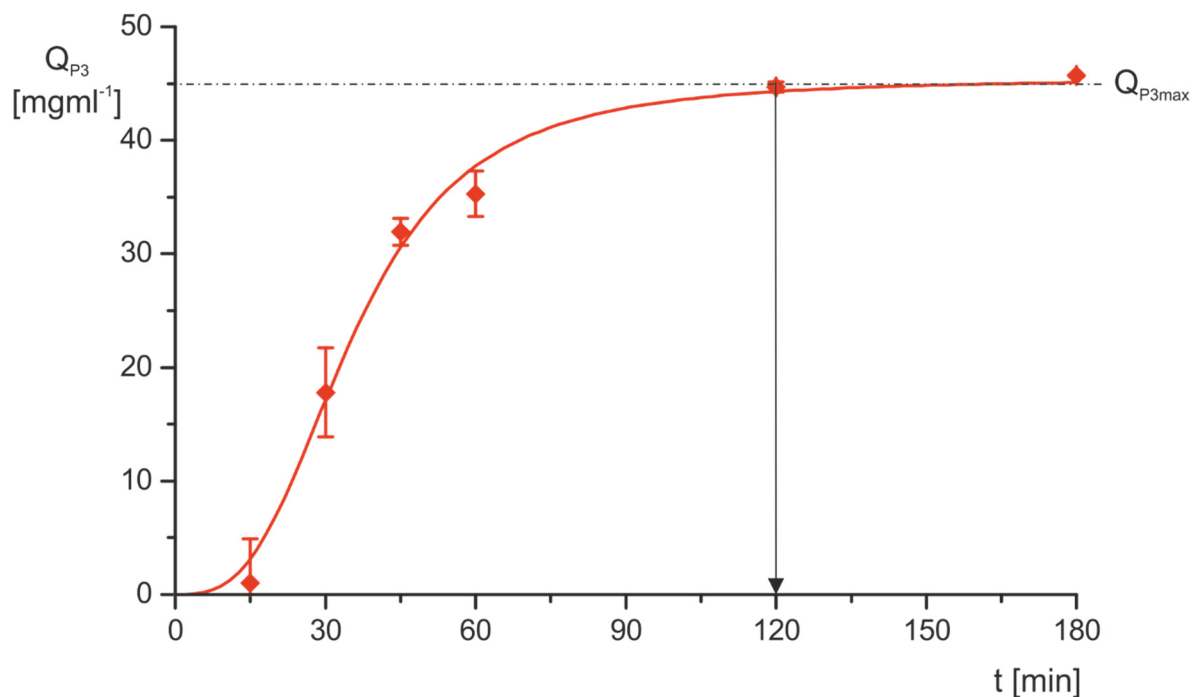


Abb. 4.5: Reaktionskinetik des Zielproteins D1M1-His am Adsorber Chelating Sepharose™ Fast Flow. Das Diagramm zeigt die berechneten Bindungskapazitäten des Zielproteins D1M1-His Q_{P_3} am Adsorber Chelating Sepharose™ Fast Flow mit immobilisierten Ni^{2+} -Ionen. Die gestrichelte Linie verdeutlicht die maximale Bindungskapazität des Zielproteins D1M1-His $Q_{P_{3\max}}$. Der schwarze Pfeil kennzeichnet die definierte Inkubationszeit von 120 min.

In regelmäßigen Zeitabständen wurde die Reaktion abgebrochen und die Regressionsfunktion Q_{P_i} ,

$$Q_{P_i}(t) = \frac{Q_{P_{i\max}} \cdot t^n}{K_D^n + t^n}, \quad (4.10)$$

bestimmt. Der Zeitpunkt zum Erreichen eines asymptotischen Verlaufes wurde als Inkubationszeit der Ansätze zur Aufnahme der jeweiligen Isothermen festgelegt.

Nach der Inkubation wurden die Suspensionen erneut bei 3500 g zentrifugiert und der Überstand auf die Gesamtproteinkonzentration mit Hilfe der UV-Vis-Spektroskopie untersucht. Bei allen Ansätzen wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Für die Berechnung der statischen Bindungskapazität wird die Masse des Reaktionsansatzes m_{Sy} ,

$$m_{Sy} = V_{Sy} \cdot c_{Pi} = V_m \cdot c_{Pi}^* + V_s \cdot Q_{Pi}^*, \quad (4.11)$$

bilanziert. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die equilibrierte stationäre Phase einen vernachlässigbaren Anteil der mobilen Phase enthält.

Aufgelöst nach der statischen Bindungskapazität Q_{Pi}^* ,

$$Q_{Pi}^* = (c_{Pi} - c_{Pi}^*) \cdot \frac{V_m}{V_s}, \quad (4.12)$$

des Proteins Pi am Adsorbentmaterial ergibt sich eine vereinfachte Berechnung.

Die berechnete statische Bindungskapazität der jeweiligen Experimente wird gegen die Gleichgewichtsproteinkonzentration aufgetragen und mit Hilfe der Langmuir-Isotherme nach Gl. (3.6) eine Regressionsfunktion mit den Parametern maximale Bindungskapazität Q_{Pimax_stat} und Dissoziationskonstante K_D bestimmt. Die Auswertung der Experimente erfolgte mit der Software OriginPro 2015, OriginLab, USA.

4.5.2 Aufnahme von Durchbruchkurven

Zur Aufnahme von Durchbruchkurven wurde das Chromatographiesystem ÄKTA™avant 150 mit der dazugehörigen Software Unicorn™ 6 der Fa. GE Healthcare, Schweden eingesetzt. Die verwendeten Säulen besitzen ein Volumen von 1 ml (= 1 CV).

Für die Aufnahme der Durchbruchkurven der IMAC wurde der Adsorber in einem ersten Schritt mit 5 CV 0.1 M Nickelsulfat-Lösung in 50 mM Acetatpuffer pH 5.0 beladen. Ungebundene Metallionen wurden mit 5 CV 50 mM Acetatpuffer pH 5.0 ausgewaschen. Anschließend erfolgte die Equilibrierung mit dem BB (500 mM NaCl, 20 mM NaH₂PO₄, 10 mM Imidazol) für 5 CV. Die Flussrate des Systems betrug 1 mlmin⁻¹.

Die Proteinlösung wurde mit Hilfe eines Desalting-Schrittes in den BB überführt. Anschließend wurde die Lösung solange auf die Säule appliziert, bis die gemessene Absorption A_{280} ein Plateau erreichte.

Die Rohdaten des Absorptionssignals wurden mit Hilfe der Software OriginPro 2015, OriginLab, USA ausgewertet. Die Daten der Absorption A_{280} wurden zur Darstellung auf einen Wertebereich von null bis eins normiert und gegen das Säulenvolumen V_C dargestellt.

Die maximale Bindungskapazität des dynamischen Systems Q_{Pimax_dyn} , die dynamische Bindungskapazität $Q_{Pi0.05_dyn}$ und der Faktor f_c wurden nach der Beschreibung in Kap. 3.2.4.4 ermittelt.

4.5.3 Untersuchte Adsorbermaterialien

In der vorliegenden Arbeit wurden Adsorbermaterialien der IMAC, IEXC und MMC hinsichtlich ihrer spezifischen Bindungskapazitäten zu den Zielproteinen P-D1M1 und D1M1-His untersucht. Tab. 4.4 fasst die Adsorber, die Liganden Struktur sowie die Interaktionsformen der Zielproteine mit dem Liganden der stationären Phase zusammen.

Tab. 4.4: Untersuchte Adsorbermaterialien – Ligandenstruktur und Interaktionsform

Adsorbermaterial	Ligandenstruktur	Interaktionsform
IMAC		
Chelating Sepharose™ Fast Flow		koordinative Metallchelate-Bindung
STREAMLINE™ Chelating		
IMAC Sepharose™ Fast Flow		koordinative Metallchelate-Bindung
Ni Sepharose™ 6 Fast Flow		
IEXC		
Capto™ Q und Q ImpRes		stark elektrostatisch
Capto™ DEAE		schwach elektrostatisch
MMC		
Capto™ adhere		stark elektrostatisch hydrophobe WW H-Brücken

Das Trägermaterial der analysierten IMAC-Adsorber Chelating Sepharose™ Fast Flow, IMAC Sepharose™ Fast Flow und Ni Sepharose™ 6 Fast Flow besteht aus quervernetzter Agarose. Die durchschnittliche Partikelgröße der Adsorber beträgt 90 µm.

Die Matrix des Adsorbers STREAMLINE™ Chelating ist speziell für die Anwendung in der EBA-Chromatographie entwickelt. Die Partikel bestehen aus einem Quarzkern umgeben von quervernetzter Agarose. Das Material besitzt eine Partikelgrößenverteilung von 100-300 µm. Diese Matriceigenschaften ermöglichen das Ausbilden eines stabilen fluidisierten Säulenbetts in der EBA.

Die Liganden der Adsorber Chelating Sepharose™ Fast Flow und STREAMLINE™ Chelating bestehen aus IDA, deren drei verfügbare freie Elektronenpaare eine koordinative Chelat-Bindung ermöglichen. Aus diesem Grund wird dieser auch als drei-zähliger Ligand bezeichnet.

Zu dem Liganden der Adsorber IMAC Sepharose™ Fast Flow und Ni Sepharose™ 6 Fast Flow wurden vom Hersteller keine näheren Angaben gemacht. Auf Nachfrage wurde lediglich eine Verwandtschaft mit dem vierzähligen Liganden NTA bestätigt.

Die Matrix der verwendeten Adsorber (Capto™) besteht aus hochvernetzter Agarose mit Dextranen als Oberflächenextender (GE Healthcare Inc., 2012). Der Ligand des Q- und Q ImpRes-Adsorbers beinhaltet eine positiv geladene quartäre Ammoniumgruppe ($pK_s > 13$), die als starker Anionenaustauscher wirkt. Die durchschnittliche Partikelgröße des Q-Adsorbers beträgt 90 µm und die des Q ImpRes-Adsorbers 40 µm.

Der DEAE-Adsorber besitzt die funktionelle Gruppe Diethylaminoethyl (pK_s 9-9.5). Die eingehenden elektrostatischen Wechselwirkungen mit Anionen sind gegenüber der quartären Ammoniumgruppe als schwächer einzuschätzen. Die durchschnittliche Partikelgröße des DEAE-Adsorbers beträgt 90 µm.

Das verwendete Adsorbermaterial adhere ist ein starker multimodaler Anionenaustauscher. Die quartäre Ammoniumgruppe ist gekoppelt mit einer Phenylgruppe für hydrophobe Interaktionen und einer Hydroxylgruppe für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindung. Die durchschnittliche Partikelgröße des adhere-Adsorbers beträgt ebenfalls 90 µm.

4.6 Zweistufige Aufreinigungsmethode zur Prozessoptimierung

Für die Prozessoptimierung wurde eine zweistufige Aufreinigungsmethode mit Hilfe des chromatographischen Systems ÄKTA™avant 150 entwickelt (Dukart, 2013). Die Automatisierung der Methode erfolgte mit Hilfe der Software Unicorn™ 6.1. (GE Healthcare, Schweden)

Abb. 4.6 zeigt das Fließschema der entwickelten Methode.

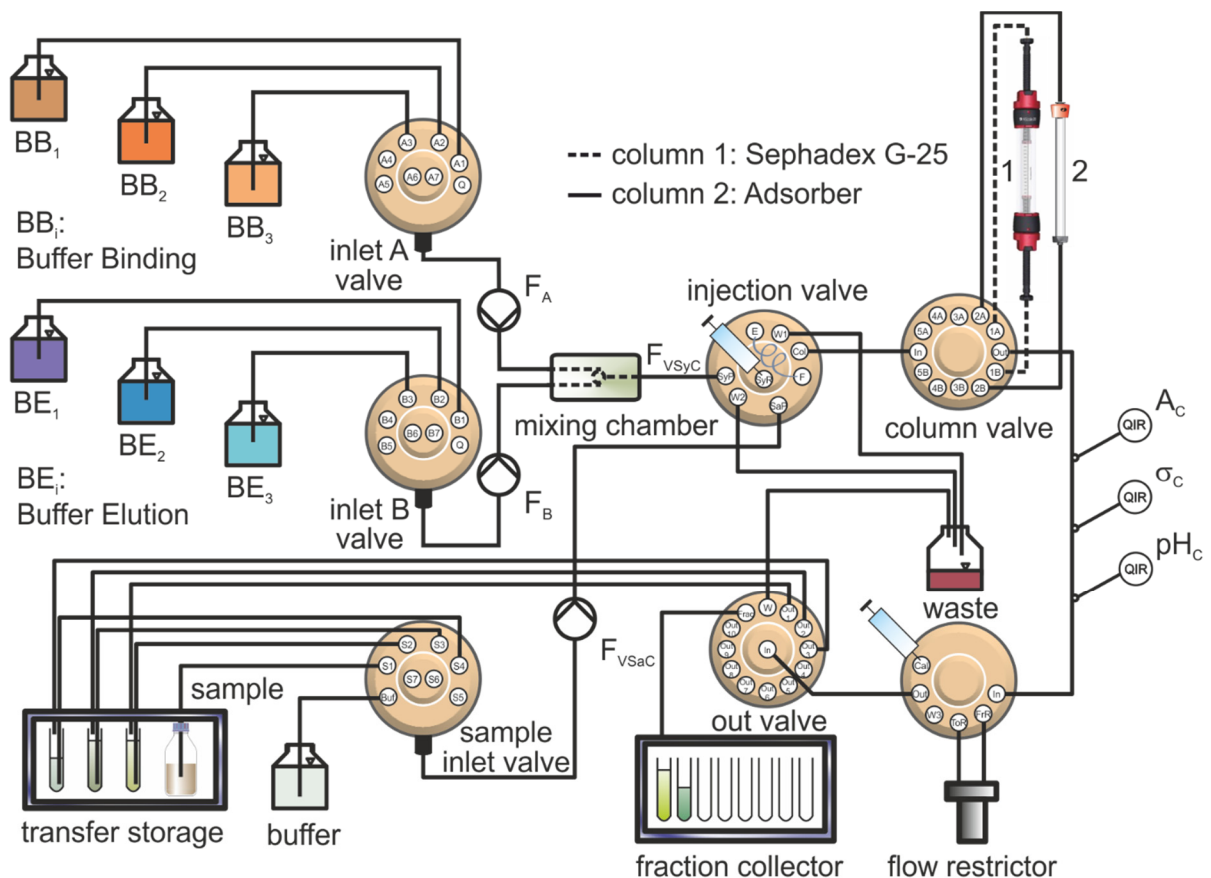


Abb. 4.6: Fließbild der verwendeten Kombinationsmethode. Die Probe (20 ml) wird in Säule 1 (HiScale 26/20) mit Hilfe von Sephadex G-25 (CV = 107 ml) in die spezifischen Bindungsbedingungen überführt. Das Eluat (27 ml) wird über das Auslassventill in ein 10 °C gekühltes 50 ml Falcon Röhrchen fraktioniert. Mit Hilfe des Probeneingangsventils werden 22 ml der Proteinfraction über die Säule 2 (Tricorn 10/100) mit dem Adsorbermaterial (CV = 9.5 ml) aufgereinigt. Die Eluatsfraction wird in einem 10 °C gekühlten Fraktionssammler aufgefangen.

Die Ausgangsprobe (20 ml) wird zunächst über eine HiScale 26/20 Säule mit Hilfe von Sephadex G-25 (CV = 107 ml) in die spezifischen Bindungsbedingungen der zu optimierenden chromatographischen Methode umgepuffert. Das Eluat des Entsalzungsschrittes (27 ml) wird durch das Auslassventill in ein 50 ml Falcon Röhrchen des 10 °C gekühlten Transferreservoirs fraktioniert. Mit Hilfe des Probeneingangsventill werden anschließend 22 ml der Proteinfraction mit einer Tricorn 10/100 Säule, gefüllt mit dem Adsorbermaterial (CV = 9.5 ml), aufgereinigt.

Ein Chromatogramm der zweistufigen Aufreinigung ist anhand der Kombination von Entsalzung und IMAC in Abb. 4.7 zu sehen.

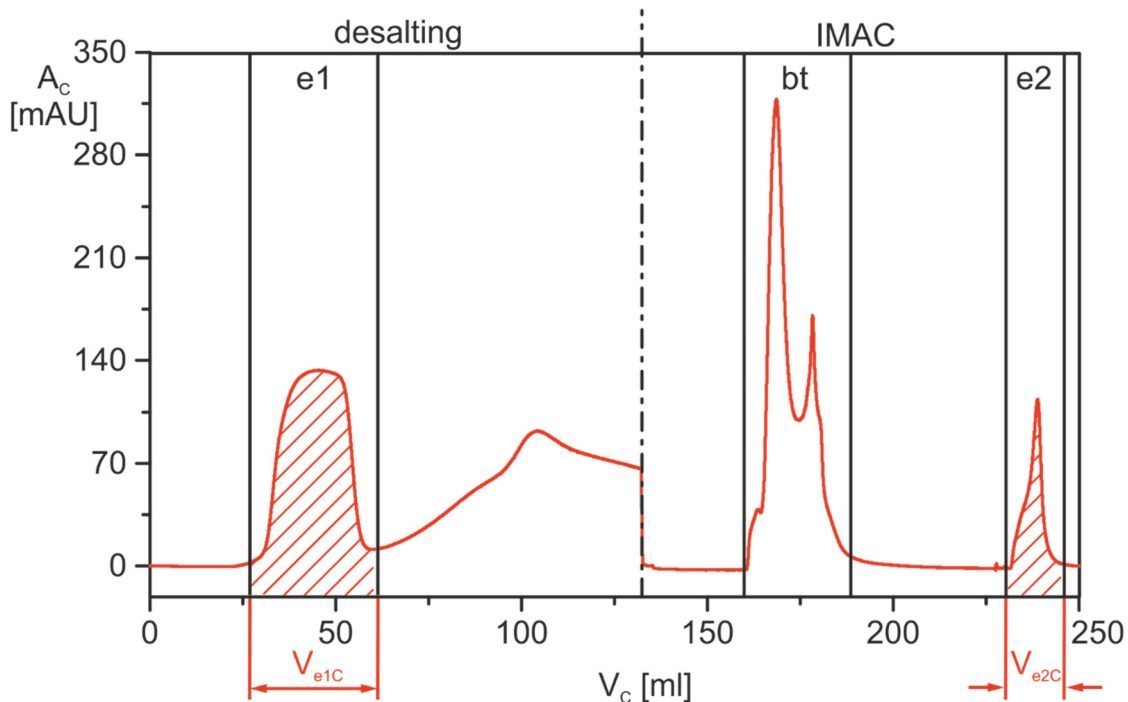


Abb. 4.7: Beispiel Chromatogramm der Kombinationsmethode aus Entsalzung und IMAC. Gezeigt ist der Prozessgrößenverlauf der Absorption A_c gegen das durchlaufende Volumen des chromatographischen Systems V_c . Die Eluatsfraktionen des Entsalzungsschrittes (e1), der IMAC (e2) sowie die Durchbruchfraktion der IMAC (bt) sind abgegrenzt dargestellt. Das Volumen der Eluatsfraktionen V_{e1C} und V_{e2C} sind gestreift gekennzeichnet.

Das Chromatogramm zeigt den Verlauf der Absorption A_c in Abhängigkeit des durchlaufenden Volumens des chromatographischen Systems V_c . Zu Beginn wird die Absorption auf einen Nullwert eingestellt und die Probe appliziert. Die Basislinie bleibt konstant bis Moleküle der Probe mit einer molaren Masse > 5 kDa die Trennsäule 1 verlassen. Dieses Volumen V_{e1C} wurde in das Transferreservoir fraktioniert während die kleinere Moleküle aus der Säule ausgespült wurden und die Absorptionserhöhung im Bereich von 60 bis 130 ml erzeugen.

Bei einem Volumen von 130 ml wurde die Trennsäule 2 in das System geschaltet und ein Teil des Eluatvolumens V_{e1C} erneut appliziert. Die Basislinie bleibt konstant bis zum Durchbruch ungebundener Moleküle (bt) ab einem Volumen von 160 ml. Nach Applikation der Eluatsfraktion e1 wurde das Laufmittel auf BB umgestellt und so restliche ungebundene Moleküle aus der Säule entfernt. Die Absorption zeigt in dieser Phase (V_c 180-230 ml) einen Rückgang bis zum Erreichen der Basislinie. Anschließend steigt die Absorption aufgrund der Umstellung des Laufmittels auf BE. Die erhaltene Eluatsfraktion e2 mit dem Volumen V_{e2C} wurde bis zur weiterführenden Analyse im Fraktionssammler gekühlt gelagert. Das vorgestellte System und die Programmierung erlauben eine automatisierte Abfolge von bis zu sechs chromatographischen Läufen und wurde in dieser Arbeit für die Optimierungsprozeduren der IMAC und MMC verwendet.

4.7 Systematische Optimierung der chromatographischen Methoden

4.7.1 Definition der Gütekriterien

Die Beurteilung der Chromatographie erfolgte anhand der Qualitätskriterien Reinheit des Zielproteins in der Eluatsfraktion e2 P_{Pie2C} sowie der Ausbeute der chromatographischen Aufreinigung Y_{PiC} .

Die Reinheit P_{Pie2C} ,

$$P_{Pie2C} = \frac{B_{Pie2C}}{\sum_{i=1}^n B_{Pie2C}}, \quad (4.13)$$

des Produktes P_i in der Eluatsfraktion e2 wurde aus dem Bandenvolumen des Zielproteins B_{Pie2C} bezogen auf das Gesamtbandenvolumen der SDS-PAGE-Analyse bestimmt.

Die Ausbeute des chromatographischen Prozesses Y_{PiC} ,

$$Y_{PiC} = \frac{m_{Pie2C}}{m_{Pie1C}} = \frac{c_{Ptote2C} \cdot P_{Pie2C} \cdot V_{e2C}}{c_{Ptote1C} \cdot P_{Pie1C} \cdot V_{e1C}}, \quad (4.14)$$

wurde aus dem Verhältnis der Produktmasse in der Eluatsfraktion e2 m_{Pie2C} in Bezug zu der Masse des Zielproduktes in der Fraktion e1 m_{Pie1C} ermittelt. Die jeweiligen Massen m_{PiK} wurden durch Analyse der Gesamtproteinkonzentration c_{PtotkC} mit Hilfe des Bradford Protein Assay, der densitometrisch bestimmten Reinheit P_{PiK} und des Volumens V_{kC} der jeweiligen Eluatsfraktionen e1 und e2 bestimmt.

4.7.2 Scouting möglicher Einflussfaktoren

Das Scouting möglicher Einflussfaktoren ist abhängig von der zu optimierenden chromatographischen Methode und wird zunächst für die IMAC und anschließend für die MMC beschrieben. Abschließend werden die Faktoreinstellungsbereiche der Optimierungsprozeduren und eine Risikobewertung der jeweiligen Faktoren tabellarisch zusammengefasst.

IMAC

Nach Janson et al. (2011) wird die IMAC durch den pH-Wert, durch die Art des Puffers und durch die Ionenstärke beeinflusst. Aufgrund experimenteller Erfahrungen in der Arbeitsgruppe wurde sich auf die Verwendung eines Phosphatpuffersystems beschränkt. Der Einfluss der Ionenstärke wurde mit Hilfe der Zugabe von Natriumchlorid untersucht.

Die Konzentration des kompetitiven Agens Imidazol im BB der IMAC c_{Imie1C} kann zu einer Verbesserung der Produktreinheit aber auch gleichzeitig zu einer drastischen Abnahme der Ausbeute führen.

Die Flussrate bei Probenaufgabe F_{VSaC} beeinflusst die Kontaktzeit zwischen Protein und Adsorber. Bei schnell ablaufenden Reaktionen verliert die Flussrate an Einfluss auf das System. Eine Optimierung der Methode hinsichtlich der Zeit ist durch die Verwendung höherer Flussraten bei der Equilibrierung, dem Waschen der Säule nach Probenaufgabe und der Elution F_{VSYC} möglich. Dieser Faktor wird in der Optimierungsprozedur des Zielproteins P-D1M1 betrachtet.

Den größten Kostenfaktor bei der Verwendung der IMAC stellt neben dem Säulenmaterial der Zusatz von Imidazol zur mobilen Phase dar (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2007). Der Zusatz von 250 mM Imidazol für den Elutionspuffer der IMAC c_{Imie2C} wird aus diesem Grund in der Optimierung des Zielproteins D1M1-His analysiert.

Die gewählten Faktoreinstellungsbereiche und die Risikobewertung der Faktoren für die Optimierungsprozeduren der Zielproteine P-D1M1 und D1M1-His werden in Tab. 4.5 zusammengefasst dargestellt.

Tab. 4.5: Faktoreinstellungsbereiche und Risikobewertung – IMAC

Einflussfaktor	Min	Max	Risikobewertung*
P-D1M1			
pH-Wert (pH _C)	6.0	8.5	++
Salzkonzentration (c_{NaClC})	0.5	0.9 M	+
Imidazolkonzentration (c_{Imie1C})	0.0	20.0 mM	+++
Flussrate Probe (F_{VSaC})	0.5	2.5 mlmin ⁻¹	++
Flussrate System (F_{VSYC})	0.5	2.5 mlmin ⁻¹	+
D1M1-His			
pH-Wert (pH _C)	5.5	9.5	++
Salzkonzentration (c_{NaClC})	0.1	1.0 M	+
Imidazolkonzentration Bindung (c_{Imie1C})	5.0	40.0 mM	+++
Flussrate Probe (F_{VSaC})	0.5	5.0 mlmin ⁻¹	++
Imidazolkonzentration Elution (c_{Imie2C})	100.0	250.0 mM	+

*Bewertungssystem: + schwacher Einfluss
 ++ mittlerer Einfluss
 +++ starker Einfluss

MMC

Der pH-Wert des Bindungspuffers pH_{e1C} besitzt einen starken Einfluss auf die Ladung des Adsorbermaterials. Gleichzeitig beeinflusst der pH-Wert die Oberflächenladung des Proteins. Der Einstellungsbereich wurde um den pK_s des verwendeten Puffersystems TRIS/HCl von 8.2 gewählt.

Die Salzkonzentration c_{NaCl} besitzt einen starken Einfluss auf den hydrophoben Effekt und somit auf die hydrophobe Interaktion des Proteins mit dem Adsorber. Eine häufig verwendete Konzentration an Natriumchlorid ist eine Zugabe von 1 M. Der untersuchte Bereich wurde im Screening daher auf einen Bereich von 0-1.5 M ausgeweitet.

Die Elution erfolgte durch Absenkung des pH-Wertes, wodurch eine Verstärkung der positiven Ladung am Stickstoffatom der quartären Ammoniumgruppe induziert wird. Gleichzeitig ändert sich die Oberflächenladung des Zielproteins P-D1M1, da der pH-Wert unterhalb des pI -Wertes liegt. Die Folge ist eine elektrostatische Abstoßung zwischen dem Liganden und dem Protein. Sobald die elektrostatische Anziehungskraft die hydrophoben Wechselwirkungen übertrifft, löst sich das Protein vom Liganden des Adsobers. Als Puffersystem wurde ein Acetatpuffer mit einem pK_s von 4.75 gewählt. Der Untersuchungsbereich des pH-Wertes des Elutionspuffers pH_{e2C} wurde auf 3.5-5.0 festgelegt.

Zusätzlich wurden die Flussrate bei Probenaufgabe F_{Vsac} sowie die Flussrate bei Equilibrierung, Waschen und Elution F_{VsyC} in einem Bereich von 2.0-8.0 $mlmin^{-1}$ untersucht.

In Tab. 4.6 werden die Faktoreinstellungsbereiche sowie die Risikobewertung der untersuchten Faktoren des durchgeführten Screenings dargestellt.

Tab. 4.6: Faktoreinstellungsbereiche und Risikobewertung – MMC

Einflussfaktor	Min	Max	Risikobewertung*
P-D1M1			
pH-Wert Bindung (pH_{e1C})	7.2	8.5	+++
Salzkonzentration (c_{NaCl})	0.0	1.5 M	+++
pH-Wert Elution (pH_{e2C})	3.5	5.0	++
Flussrate Probe (F_{Vsac})	2.0	8.0 $mlmin^{-1}$	++
Flussrate System (F_{VsyC})	2.0	8.0 $mlmin^{-1}$	+

*Bewertungssystem: + schwacher Einfluss
 ++ mittlerer Einfluss
 +++ starker Einfluss

4.7.3 Wahl des Regressionsmodells und Versuchsplans

Der Ablaufplan der Optimierungsprozeduren ist in Abb. 4.8 dargestellt.

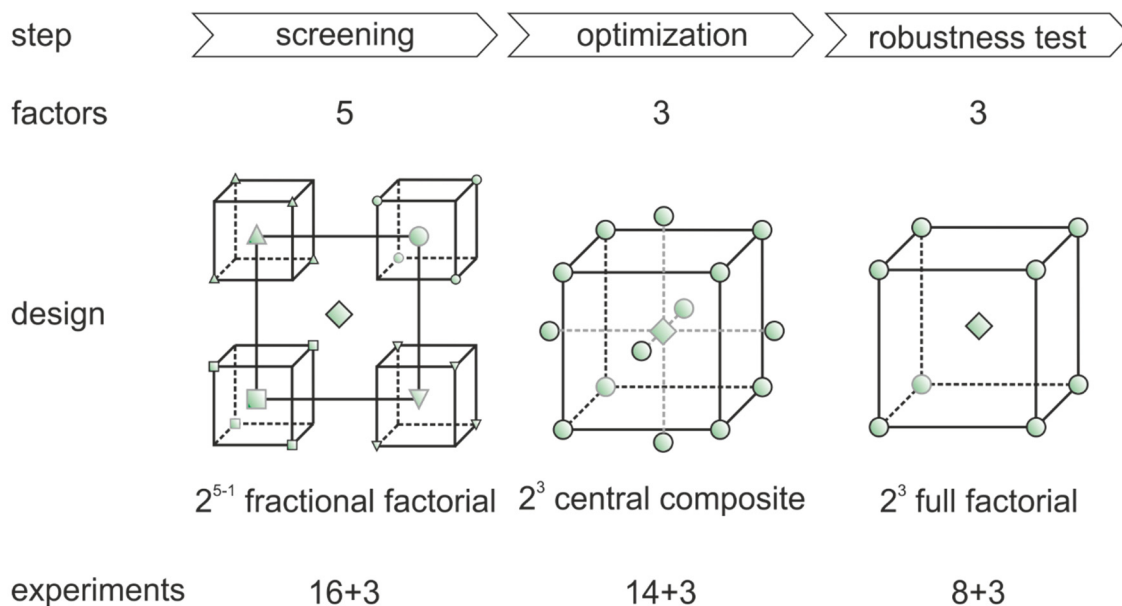


Abb. 4.8: Ablaufplan einer Optimierungsprozedur. Gezeigt werden die Schritte der Optimierungsprozedur – Screening, Optimierung, Robustheitstest – die Anzahl der Faktoren, der verwendete Versuchsplan sowie die Summe der durchzuführenden Experimente des jeweiligen Schrittes.

Die definierten Faktoren aus Kap. 4.7.2 wurden in einem Screening mit Hilfe eines 2^{5-1} teilfaktoriellen Versuchsplan untersucht. Die Anzahl der sich aus dem Versuchsplan ergebenden Experimente betrug 19 chromatographische Läufe. Die Verwendung eines teilfaktoriellen Versuchsplanes ermöglichte die Ermittlung signifikanter Einflussfaktoren.

Anschließend wurde die Anzahl der Faktoren reduziert und der Faktoreinstellungsbereich verkleinert. In der Optimierung wurde ein zentral zusammengesetzter Versuchsplan verwendet. Die Anzahl der durchzuführenden Experimente ist abhängig von der Quantität der verbleibenden Faktoren und beträgt bei drei Faktoren 17 Versuchsläufe. Mit Hilfe des verwendeten Versuchsplanes konnten Interaktionen sowie quadratische Einflüsse von Einzelfaktoren identifiziert werden.

Abschließend wurde ein Robustheitstest mit einem vollfaktoriellen Versuchsplan durchgeführt, wobei bei drei Faktoren 11 chromatographische Läufe durchgeführt wurden. Durch diese Untersuchung konnte die Validität des definierten Arbeitspunktes aus der Optimierung bestätigt werden.

Die Schritte der Optimierungsprozedur wurden aufeinander aufbauend durchgeführt. Nach jedem Schritt wurde die Rohdaten- und Regressionsanalyse durchgeführt und das erstellte Modell beurteilt (Kap. 4.7.5-4.7.7).

4.7.4 Durchführung der Experimente

Für die Optimierungsprozeduren wurde die in Kap. 4.6 beschriebene zweistufige chromatographische Methode verwendet. Das Untersuchungsmaterial sowie die Zusammensetzungen der BB und BE werden abhängig von der chromatographischen Methode beschrieben.

IMAC

Das Ausgangsmaterial des Zielproteins P-D1M1 wurde in der Fermentation SJ1912 hergestellt. Die Gesamtproteinkonzentration $c_{\text{Ptot_Brad}}$ des Fermentationsüberstandes lag bei 0.31 mgml^{-1} . Die Zielproteinkonzentration c_{P1} , ausgehend von einer Reinheit P_{P1} von 35 %, betrug 0.11 mgml^{-1} .

Die Optimierungsprozedur des Zielproteins D1M1-His wurde mit Material der Kultivierung JL1513 durchgeführt. Die Gesamtproteinkonzentration $c_{\text{Ptot_Brad}}$ wurde mit 0.37 mgml^{-1} ermittelt. Die Reinheit von D1M1-His P_{P3} betrug 69 %, wodurch sich eine Zielproteinkonzentration c_{P3} von 0.26 mgml^{-1} ergab.

Der für die IMAC verwendete BB, bestehend aus 20 mM NaH_2PO_4 (Roth, Karlsruhe) wurde die entsprechend den Experimenten vorgegebene Konzentration an Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe) und Imidazol (Merck, Darmstadt) zugesetzt.

Als BE wurde ebenfalls ein 20 mM NaH_2PO_4 Puffer (Roth, Karlsruhe) mit korrespondierenden Konzentrationen an Natriumchlorid und Imidazol genutzt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 25 % Salzsäure (Roth, Karlsruhe), bzw. 1 M Natronlauge (Roth, Karlsruhe) eingestellt.

MMC

Das verwendete EBA- Cu^{2+} -IMAC Eluat stammte aus den Kampagnen des integrierten Bioprozesses mit der Bezeichnung FS0813 und FS0913. Das Untersuchungsmaterial des Zielproteins P-D1M1 wurde mit Hilfe einer Ultra-/Diafiltration mit einem MWCO von 30 kDa auf eine Gesamtproteinkonzentration $c_{\text{Ptot_Brad}}$ von 0.7 gl^{-1} konzentriert. Ausgehend von einer Produktreinheit P_{P1} von 49 % betrug die Zielproteinkonzentration c_{P1} 0.34 gl^{-1} .

Als BB des multimodalen Ionenaustauschers wurde ein 50 mM Tris-Puffer (Roth, Karlsruhe) verwendet. Der pH-Wert wurde nach Experimentenvorgabe mit 25 % Salzsäure (Roth, Karlsruhe), bzw. 1 M Natronlauge (Roth, Karlsruhe) eingestellt. Zusätzlich wurde dem BB die entsprechende Konzentration an Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe) zugesetzt.

Zur Elution wurde ein 100 mM Natriumacetat Puffer (Roth, Karlsruhe), dessen pH-Wert mit 25 % Essigsäure (Roth, Karlsruhe), bzw. 1 M Natronlauge (Roth, Karlsruhe) dem Experiment entsprechend eingestellt wurde, verwendet.

4.7.5 Rohdatenanalyse

Die Rohdatenanalyse erfolgte mit Hilfe der Boxplot-Darstellung (vgl. Abb. 4.3), dem Shapiro-Wilk-Testverfahren sowie dem Ausreißer-Test nach Grubbs. Das Signifikanzniveau der Testverfahren wurde auf 5 % festgelegt.

Zur Analyse wurde die Software OriginPro 2015 der Fa. OriginLab, USA verwendet.

4.7.6 Regressionsanalyse

Die Regressionsanalyse wurde mit Hilfe der SVP-Software MODDE® 10 der Fa. Umetrics, Schweden durchgeführt. Zur Identifikation signifikanter Einflussfaktoren wurde das Koeffizientendiagramm verwendet. Abb. 4.9 veranschaulicht den Einfluss der Modellfaktoren auf das Gütekriterium Wiederfindung Y_{P3C} aus dem Screening der IMAC-Aufreinigung des Zielproteins D1M1-His.

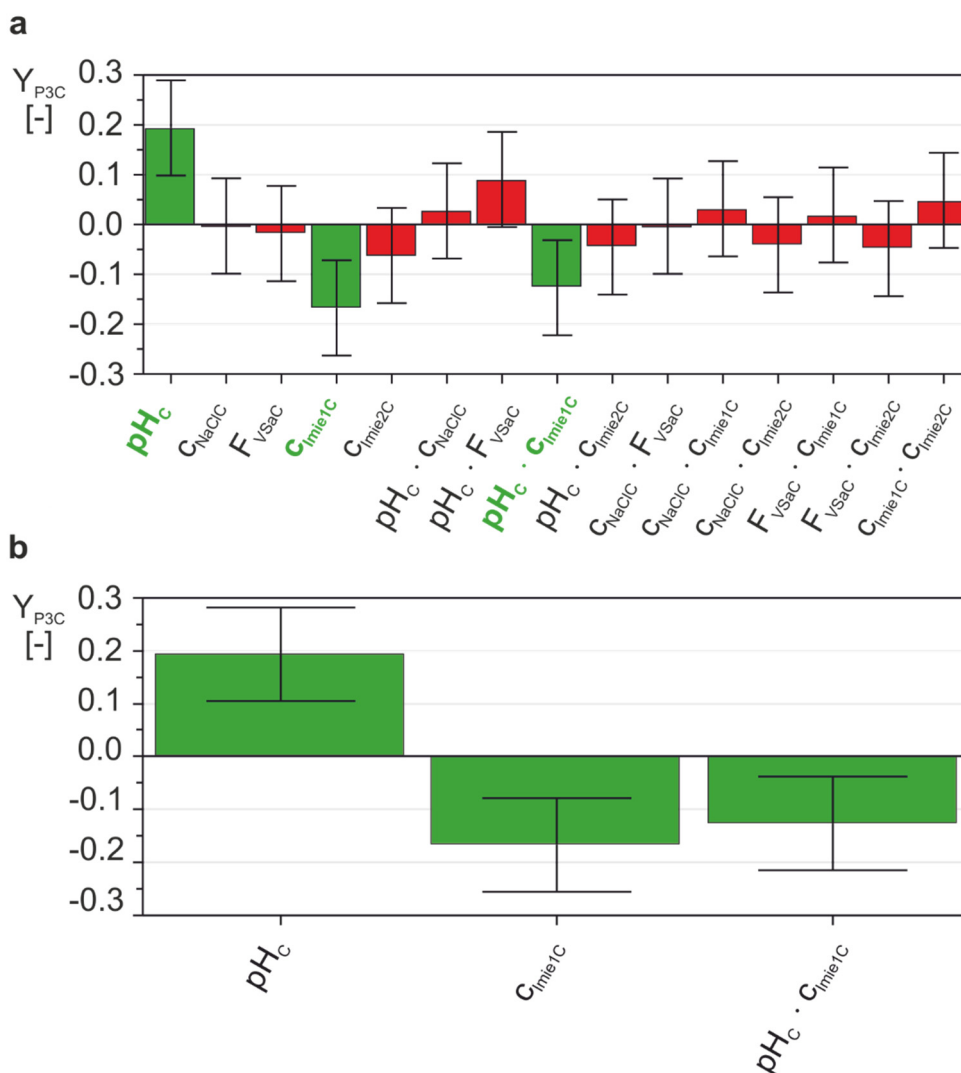


Abb. 4.9: Koeffizientendiagramm eines Interaktionsmodells. Die Abbildung zeigt die Einflussfaktoren des Interaktionsmodells aus der Optimierungsprozedur der IMAC-Screening-Experimente des Zielproteins D1M1-His. **a** Das Modell beinhaltet alle Modellterme. **b** nicht signifikante Terme wurden aus dem Modell entfernt. **rot:** nicht signifikanter Modellterm; **grün:** signifikanter Modellterm. Konfidenzniveau: 95 %

In dem Koeffizientendiagramm werden die numerischen Werte der auf den normierten Faktorraum skalierten und zentrierten Regressionskoeffizienten des Modells dargestellt. Die numerischen Werte stellen den Effekt des Terms auf das Gütekriterium dar, der erreicht wird, wenn der Faktor von der Stufe null auf eins angehoben wird und die weiteren Faktoren den Wert null annehmen. Diese Darstellungsweise ermöglicht eine vergleichende Interpretation der Einflussstärke und -richtung der einzelnen Effekte. Der aufgetragene Fehlerbalken bei einem Konfidenzniveau von 95 % entspricht der Signifikanzgrenze.

Zusätzlich sind in Abb. 4.9 a die Terme des Interaktionsmodells aus dem teilfaktoriellen Screening gezeigt, bevor das Modell angepasst wurde. Abb. 4.9 b zeigt das Modell mit ausschließlich signifikanten Modelltermen.

Mit Hilfe der aufgestellten Screeningmodelle wurde eine Abschätzung des Einflusses der jeweiligen Faktoren nach dem in Tab. 4.7 gezeigten Bewertungssystem durchgeführt.

Tab. 4.7: Bewertungssystem der Signifikanz kritischer Einflüsseffekte

Einfluss	Signifikanz	Zeichen	Gütekriterium
positiv	gering	+	> 0.2
	mittel	++	> 0.1
	stark	+++	> 0.0
negativ	gering	-	< 0.0
	mittel	--	< -0.1
	stark	---	< -0.2
nicht signifikant*		x	

* Modellterme die aufgrund einer Interaktion oder eines quadratischen Einflusses im Modell verbleiben mussten, wurden bewertet.

Anhand der erstellten Interaktionsmodelle wurden Spezifikationen zur simultanen Maximierung der definierten Gütekriterien festgelegt. Mit Hilfe der Optimizer-Funktion der Software MODDE® 10 wurde ein geeigneter Arbeitspunkt nach der Nelder-Mead-Simplex-methode bestimmt (Nelder und Mead, 1965). Der berechnete optimale Arbeitspunkt wurde für die anschließende Optimierung nötigen Eingrenzung des Untersuchungsbereiches als ein Versuchspunkt definiert. Der reduzierte Faktoreinstellungsbereich der Optimierung wurde aus den zu erreichenden Spezifikationen der Gütekriterien abgeleitet. Abschließend wurde eine Risikobewertung der kritischen Prozessparameter anhand der Signifikanz der Effekte durchgeführt.

Die Regressionsanalyse für die Optimierung erfolgte analog der des Screenings. Nicht signifikante Terme wurden mit Hilfe des Koeffizientendiagramms identifiziert und sukzessiv aus dem Modell entfernt. Der verwendete zentral zusammengesetzte Versuchsplan ermöglichte die Analyse sowohl von Faktorinteraktionen sowie quadratischen Einflüssen. Mit Hilfe der erstellten Optimierungsmodelle wurden erneut Spezifikationen für die simultane Maximierung der Gütekriterien definiert und der optimale Arbeitspunkt bestimmt.

Der ermittelte optimale Arbeitspunkt wurde als CP des Robustheitstests definiert. Der Faktoreinstellungsbereich wurde für den Robustheitstest weiter reduziert. Die Untersuchung der Validität des optimalen Arbeitspunktes im Robustheitstest erfolgte ebenfalls anhand des Koeffizientendiagramms. Der Effekt der Faktoränderung auf das Gütekriterium konnte als nicht signifikant bewertet werden, wenn das Fehlerintervall den Wert des Gütekriteriums umfasste oder das Konfidenzintervall den Wert null einschloss. Der Effekt konnte dann als zufällig auftretend und der Arbeitspunkt als robust bewertet werden.

4.7.7 Prüfung der Gültigkeit des Modells

Die Beurteilung der erstellten Modelle erfolgte anhand der in Tab. 4.2 aufgeführten Kenngrößen. Die Berechnungen der Kenngrößen sind ausführlich in den Arbeiten von Fricke (2015) und Ellert (2015) veröffentlicht und werden daher nicht weiter erörtert.

4.8 Downscale-Methode der IMAC

Als chromatographisches System wurde ein ÄKTATMavant 150 mit der dazugehörigen Software UnicornTM 6.1 (GE Healthcare, Schweden) verwendet. Die zur Aufreinigung verwendete Säule (HiTrap Chelating HP, GE Healthcare, Schweden) mit einem Säulenvolumen von 1 ml wurde zunächst mit 5 CV mit BB equilibriert. Anschließend wurden 40 CV des Fermentationsüberstandes auf die Säule appliziert. Das Waschen der Säule erfolgte mit mind. 10 CV. Die darauf folgende Elution wurde in vier Stufen (25, 45, 65 und 100 % BE) mit jeweils 5 CV durchgeführt. Die Flussrate betrug jeweils 1 mlmin⁻¹.

Die Ausgangsmaterialien wurden in den Kultivierungen JJJ1315 (P-D1M1) und JJJ1415 (D1M1-His) hergestellt (vgl. Anhang).

Aufgrund der Optimierungsergebnisse bestand der BB für das Zielprotein P-D1M1 aus 20 mM NaH₂PO₄ (Roth, Karlsruhe), 700 mM Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe) und 13 mM Imidazol (Merck, Darmstadt). Der pH-Wert wurde mit 1 M Natronlauge (Roth, Karlsruhe) auf 6.4 eingestellt.

Für das Zielprotein D1M1-His wurde dem 20 mM Phosphatpuffer 400 mM Natriumchlorid und 12 mM Imidazol zugesetzt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 1 M Natronlauge auf 8.5.

Der BE bestand aus dem jeweiligen BB mit Zusatz von 100 mM Imidazol. Für die Aufreinigung des Zielproteins P-D1M1 wurde der pH-Wert mit 1 M Natronlauge auf 7.25 und für das Protein D1M1-His auf 8.5 eingestellt.

Dem Fermentationsüberstand wurde dem BB korrespondierende Konzentration an Imidazol zugesetzt und der pH-Wert entsprechend eingestellt.

4.9 Arbeiten im integrierten Bioprozess

4.9.1 Erweiterung der Prozessanlage

Die bestehende Prozessanlage des integrierten Bioprozesses wurde durch die Einbindung eines KwickTM Lab packet der Fa. GE Healthcare erweitert. Zusätzlich wurde das Chromatographiesystem ÄKTATMavant 150 Fa. GE Healthcare für eine weitere chromatographische Aufreinigung in den Prozessablauf integriert.

Die Automatisierung des Prozesses wurde über die Prozessleitsoftware MFCS/win realisiert. In S88-Rezepten wurden die Automatisierungsstrukturen des *up-* und *downstream-*Bereiches miteinander verknüpft, sodass der Bioprozess vollautomatisch ablaufen konnte. Die Automatisierung der Chromatographie erfolgte mit Hilfe der Software UnicornTM 6 der Fa. GE Healthcare, Schweden.

Die Prozessschritte Expression im Bioreaktor (F), Konditionierung der Kulturbrühe (D) für die nachfolgende Primärreinigung sowie das *capture* durch EBA IMAC (E) wurden aus dem bestehenden Prozess übernommen (vgl. Kap. 3.2.1).

In dem Prozessschritt der Konzentrierung (U) wurde das Eluat der EBA IMAC in den zuvor gereinigten Konditionierungstank fraktioniert. Anschließend erfolgte automatisiert die *batch-*weise Konzentrierung und Umpufferung mit Hilfe einer KwickTM Lab Ultrafiltrationsmembran mit einem MWCO von 10 kDa und einer Membranfläche von 100 cm².

Abschließend erfolgte die chromatographische Aufreinigung des Retentats (C). Die Eluatsfraktion wurde mit Hilfe des kühlbaren Fraktionssammlers des ÄKTATMavant Systems aufgefangen und für weitere Analysen bereitgestellt.

Eine Darstellung des erweiterten Bioprozesses mit den vorgestellten Prozessschritten ist Abb. 4.10 zu entnehmen. Die Abbildung veranschaulicht das Fließschema des Gesamtprozesses zur Herstellung des Zielproteins P-D1M1. Der in dieser Arbeit vorgestellte Prozess zur Herstellung von D1M1-His endet nach dem Prozessschritt der Konzentrierung (U).

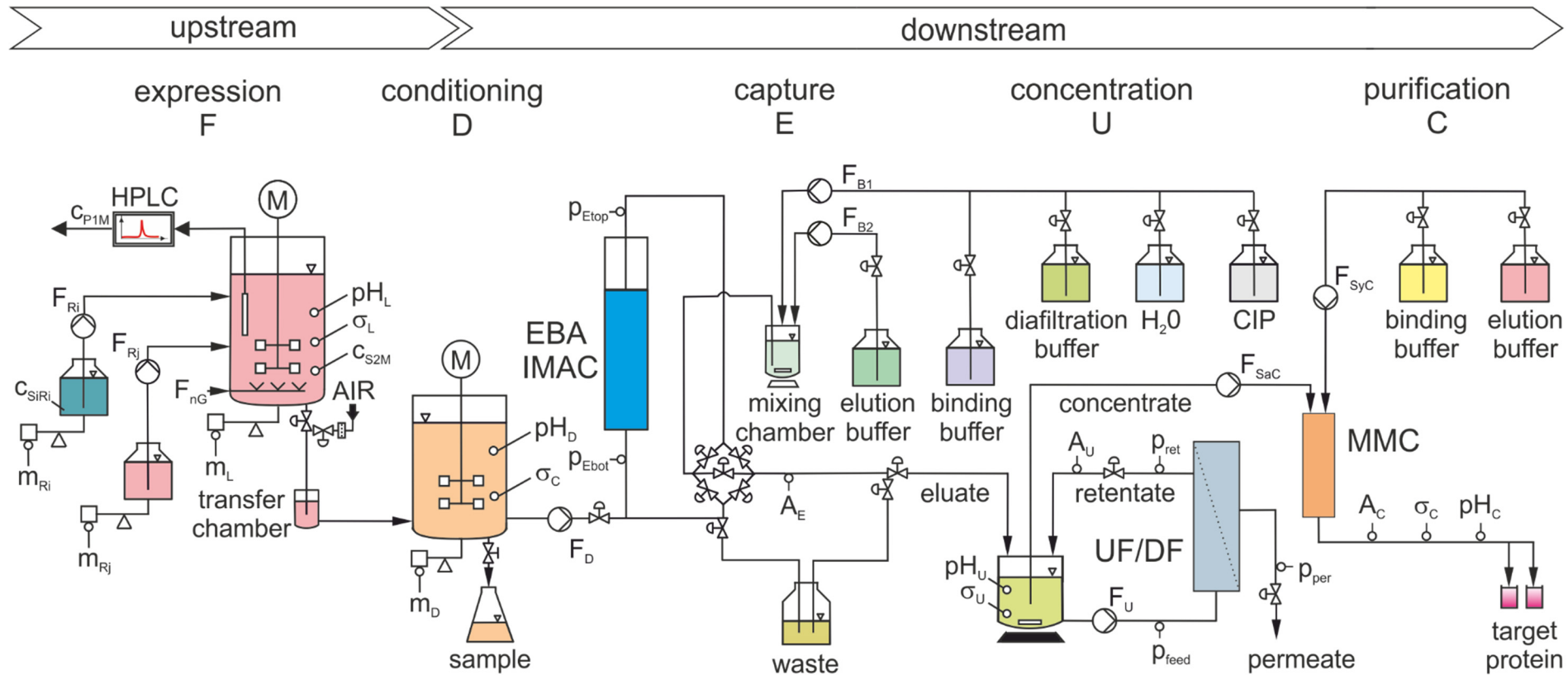


Abb. 4.10: Darstellung des erweiterten integrierten Bioprozesses. Der Prozess bestehend aus den Teilschritten Expression im Bioreaktor (F), Konditionierung der Kulturbrühe (D) und Protein *capture* mit Hilfe EBA IMAC (E) wurde durch eine Konzentrierung und Umpufferung durch UF/DF (U) und eine chromatographische Aufreinigung des Zielproteins P-D1M1 über MMC (C) erweitert.

4.9.2 Produktionsprozess zur Herstellung von P-D1M1

Das Zielprotein P-D1M1 wurde in dem Bioreaktor Biostat® ED5 von dem eingesetzten Hostsystem *P. pastoris* KM71H (Gensequenz P-D1M1) exprimiert und in das Medium sekretiert. Eine Atline-HPLC ermöglichte die Überwachung der Proteinexpression durch die Detektion von P-D1M1 mit Hilfe Cu²⁺-IMAC nach Martens (2014). Nach Beendigung der Produktionsphase im Bioreaktor wurden 2.6 l des Reaktorinhaltes über eine sterilisierbare Transferleitung in den Konditionierungstank überführt. Im Konditionierungstank wurde die Zellbrühe auf eine Zelldichte c_{XL} von 20 gl⁻¹ mit Verdünnungspuffer der EBA IMAC (0.5 M NaCl, 20 mM NaH₂PO₄·2 H₂O, 0.06 mM Tween, pH 6.8) verdünnt. Anschließend wurden manuell 5.6 mM Imidazol zugefügt und der pH-Wert auf 6.8 mit 2 M NaOH eingestellt.

Parallel zur Verdünnung der Kulturbrühe wurde die EBA IMAC mit BB (0.5 M NaCl, 20 mM NaH₂PO₄·2 H₂O, 5.6 mM Imidazol, pH 6.8) im *upflow*-Betrieb equilibriert. Nach Abschluss der Equilibrierungsphase wurden, ebenfalls im *upflow*-Betrieb, 6 l konditionierte Kulturbrühe mit einer linearen Flussrate F_{LD} von 200 cmh⁻¹ auf die Säule (STREAMLINE 50, Adsorber: STREAMLINE Chelating Cu²⁺ beladen) appliziert. Anschließend erfolgte mit BB das Auswaschen leicht gebundener Substanzen sowie von Zellen und Zellbruchstücken aus dem expandierten Säulenbett. Die Elution wurde nach Erreichen der Basislinie manuell gestartet und erfolgte im *downflow*-Betrieb mit BE (0.5 M NaCl, 20 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O, 100 mM Imidazol, pH 7.4).

Nach dem dritten Diafiltrationsschritt folgte die Konzentrierung des Retentats auf 130 g. Nachfolgend wurde das Retentat auf die zuvor mit Diafiltrationspuffer equilibrierten chromatographischen Säule (HiScale™ 16/20, Adsorber: Cpto™ adhere) appliziert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift zur Entfernung von leicht gebundenen Proteinen über 12 CV, bis die Absorption A_c einen Wert < 5 mAU annahm. Die Elution der gebundenen Proteine wurde durch das Umschalten auf 100 mM Acetatpuffer pH 3.9 erreicht.

Die Kultivierung von P-D1M1 erfolgte zyklisch mit Hilfe der nach Martens (2014) entwickelten RFB-Strategie über eine Fermentationsdauer von 111 h. Der *start-up* (su) wurde mit einer *batch*-Phase auf Glycerol begonnen. Anschließend erfolgte eine *fed-batch*-Phase auf Glycerol bis zu einer Zelldichte c_{XL} von 30 gl⁻¹. Die Expression von P-D1M1 wurde darauf folgend durch Umstellung des Substrates von Glycerol auf Methanol induziert. Nach einer Produktionsphase von 18 h wurde, wie beschrieben, ein Teil des Reaktorinhaltes in den Konditionierungstank überführt und das restlich verbliebende Volumen der Kulturbrühe (ca. 1.4 l) mit *refresh*-Medium auf ein Arbeitsvolumen von 4 l verdünnt.

Ein Zyklus der Fermentation startete nach dem ersten Erntevorgang mit einer erneuten *fed-batch*-Phase auf Glycerol bis zu einer Zelldichte c_{XL} von 30 gl⁻¹. Auf diese Phase erfolgte eine erneute Induktion der Expression durch Umstellung des Substrates auf Methanol für 18 h. Alle 24 h konnte so ein Teil des Reaktorinhaltes geerntet und aufgearbeitet werden, während parallel ein neuer Zyklus im Reaktor begann. Die Anzahl der durchgeführten Zyklen betrug drei (c1, c2 und c3).

4.9.3 Produktionsprozess zur Herstellung von D1M1-His

Der Produktionsprozess des Proteins D1M1-His erfolgte ebenfalls mit dem erweiterten integrierten Bioprozess (Abb. 4.10) und analog zu P-D1M1. Für das Produkt D1M1-His wurde innerhalb dieser Arbeit auf eine weitere Aufarbeitung des Proteins verzichtet, so dass die Aufreinigung nach dem Prozessschritt der UF/DF beendet wurde.

Die Kultivierung des *P. pastoris* Stammes KM71H (Gensequenz D1M1-His) erfolgte zyklisch über 111 h. Der Prozess bestand aus einem *start-up* (su) mit *batch*- und *fed-batch*-Phase auf Glycerol und einer 18-stündigen Produktionsphase auf dem Substrat Methanol. Anschließend folgten drei Zyklen (c1, c2 und c3) mit jeweils einer 6-stündigen *fed-batch*-Phase auf Glycerol und einer 18-stündigen Produktionsphase auf Methanol. Nach der Produktionsphase im Bioreaktor wurden 2.6 l des Reaktorinhaltes über die sterilisierbare Transferleitung in den Konditionierungstank überführt. Im Konditionierungstank wurde die Zellbrühe auf eine Zelldichte c_{XL} von 20 g l^{-1} mit EBA Ni²⁺-IMAC Puffer (0.5 M NaCl, 20 mM NaH₂PO₄·2 H₂O, 0.06 mM Tween, pH 7.4) verdünnt. Anschließend wurden manuell 10.0 mM Imidazol zugefügt und der pH-Wert mit 2 M NaOH auf 7.4 eingestellt.

Zeitgleich mit der Verdünnung der Kulturbrühe im Konditionierungstank wurde die EBA IMAC mit BB (0.5 M NaCl, 20 mM NaH₂PO₄·2 H₂O, 10.0 mM Imidazol, pH 7.4) im *upflow*-Betrieb equilibriert. Sechs Liter der konditionierten Kulturbrühe wurde nach Abschluss der Equilibrierung mit einer linearen Flussrate F_{LD} von 200 cm h^{-1} auf die Säule (STREAMLINE 50, Adsorber: STREAMLINE Chelating Ni²⁺ beladen) appliziert. Nach Abschluss des Auswaschens leicht gebundener Proteine sowie Zellen und Zellbruchstücken mit BB wurde die Elution (0.5 M NaCl, 20 mM NaH₂PO₄·2 H₂O, 100 mM Imidazol, pH 7.4) im *downflow*-Betrieb gestartet.

Die Eluatsfraktion mit einer Masse m_D von ca. 800 g wurde in den Konditionierungstank überführt und mit Diafiltrationspuffer (0.73 M NaCl, 50 mM Tris, pH 7.85) auf ca. 1000 g verdünnt. Die Umpufferung des Eluats in Diafiltrationspuffer erfolgte *batchweise* in drei Schritten bei einer Fließgeschwindigkeit F_U von 80 ml min^{-1} und einem Transmembrandruck p_{TMU} von 1.5 bar.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Stabilitätsbetrachtung der Zielproteine

5.1.1 Proteolytische Spaltung im Kulturüberstand

Aufgrund der zentralen Rolle der Produktqualität nach dem QbD-Konzept und der in vorangegangenen Arbeiten aufgetretenen Instabilität der Zielproteine wird zunächst die Stabilität der Produkte in Kulturüberstand betrachtet.

Das Ziel dieser Untersuchungen liegt in der Erhöhung des Produktverständnisses. Durch eine gezielte Analyse können Einflüsse kritischer Verunreinigungen aus der Kultivierung sowie der Einfluss von Faktoren wie der Umgebungstemperatur oder Lagerdauer identifiziert werden. Die Entwicklung einer geeigneten Nachweismethode zur quantitativen- und qualitativen Erfassung der Stabilität als CQA der Malariavakzinkandidaten steht hierbei ebenso im Vordergrund wie die Identifikation möglicher proteolytischer Aktivität in den Kulturüberständen.

Abb. 5.1 a zeigt die SDS-PAGE-Analyse des Kulturüberstandes der P-D1M1 Fermentation nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

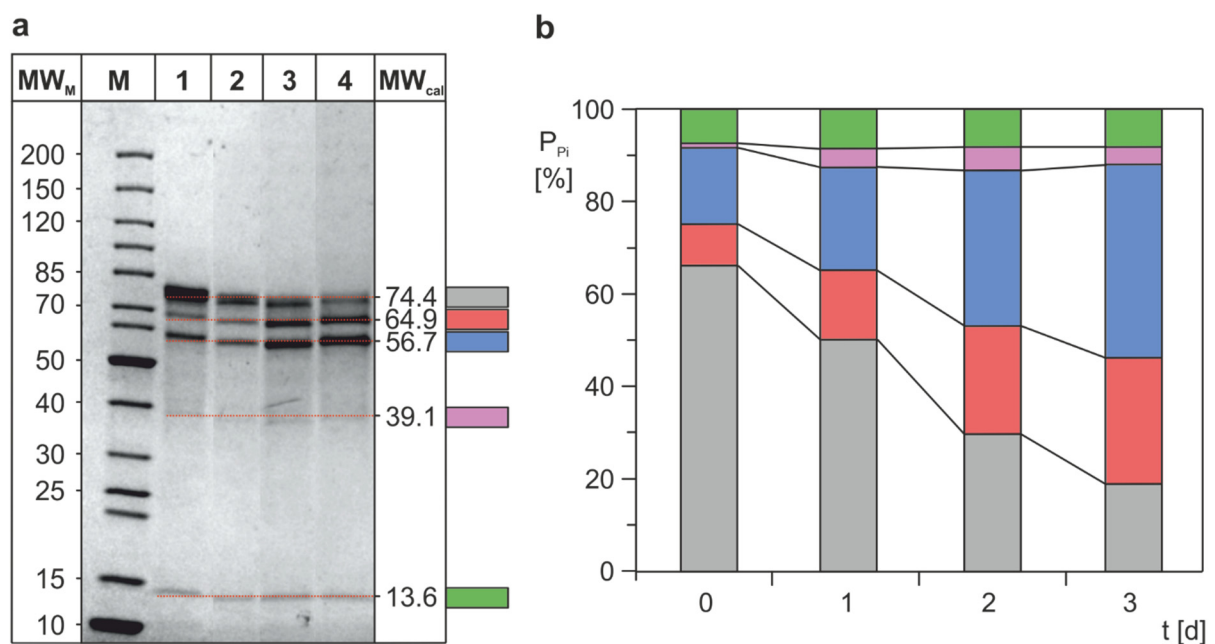


Abb. 5.1: Spezifischer Abbau des Zielproteins P-D1M1 im Kulturüberstand. **a** nicht reduzierte SDS-PAGE des Kulturüberstandes der Fermentation JJJ1315 nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei Raumtemperatur (23 °C). **MW_M** Molekulargewicht des Proteinmarkers in kDa, **M** Marker, **1** Kulturüberstand nach 0 h Inkubation, **2** Kulturüberstand nach 1 d Inkubation, **3** Kulturüberstand nach 2 d Inkubation, **4** Kulturüberstand nach 3 d Inkubation, **MW_{cal}** kalkuliertes Molekulargewicht anhand des Proteinmarkers in kDa **b** Darstellung des prozentualen Abbaus definierter Banden aus der SDS-PAGE-Analyse. In grau dargestellt ist das Protein mit einem **MW_{cal}** von 74.4 kDa, in rot das Protein mit 64.9 kDa, in blau besitzt das Protein ein **MW_{cal}** von 56.7, lila farbend gekennzeichnet ist das Protein mit einem **MW_{cal}** von 39.1 und grün zeigt das Protein mit einem **MW_{cal}** von 13.6 kDa. (Auswertungssoftware der SDS-PAGE: Image Lab™, Bio-Rad, München)

Deutlich zu erkennen sind drei Banden bei einem kalkulierten Molekulargewicht MW_{cal} von 74.4, 64.9 und 56.7 kDa. Die Bande bei einem MW_{cal} von 74.4 kDa entspricht dem Zielprotein P-D1M1 mit einem Molekulargewicht von 71.5 kDa. Das Protein mit einem MW_{cal} von 64.9 kDa stellt mit hoher Wahrscheinlichkeit das Spaltprodukt D1M1 ohne Prodomäne (definiert als P2) dar.

Bei der dritten deutlich zu erkennende Bande mit einem MW_{cal} von 56.7 kDa ist anzunehmen, dass ein Teil der Prodomäne P sowie der M1-Variante abgespalten wurde (vgl. Martens, 2014). Den beiden schwachen Proteinbanden mit den kalkulierten Molekulargewichten von 39.1 und 13.6 kDa kann kein Spaltprodukt des Zielproteins zugeordnet werden.

Abb. 5.1 b veranschaulicht die Ergebnisse der densitometrischen SDS-PAGE-Auswertung. Dem gezeigten Säulendiagramm kann deutlich der Abbau des Zielproteins P-D1M1 (grau) bei gleichzeitiger Zunahme der Spaltproduktbanden (rot, blau) über den Inkubationszeitraum von drei Tagen entnommen werden. Der prozentuale Gesamtanteil der Produktbanden (inkl. Spaltprodukte) beträgt $89 \pm 3 \%$. Den beiden in der SDS-PAGE (Abb. 5.1 a) schwach zu erkennenden Banden bei einem MW_{cal} von 39.1 und 13.6 kDa ist ein prozentualer Gesamtanteil von $12 \pm 3 \%$ zuzuordnen.

Da der Gesamtanteil an Zielproduktbanden unter den experimentellen Bedingungen über die Inkubationsdauer konstant bleibt, ist anzunehmen, dass der Abbau des Zielproduktes P-D1M1 in die Spaltprodukte spezifisch verläuft. Die nicht einem Spaltprodukt des Zielproteins zuzuordnenden Nebenbanden werden als ein Hinweis für eine Verunreinigung gedeutet.

Abb. 5.2 a veranschaulicht die SDS-PAGE-Analyse des Kulturüberstandes der Fermentation des Zielproduktes D1M1-His. Die dominierende Bande bei einem MW_{cal} von 58.8 kDa ist dem Zielprotein D1M1-His zuzuordnen (definiert als P3). Als Spaltprodukt P4, bei dem das M1 inkl. His-Tag abgespalten wurde, konnte das Protein mit einem MW_{cal} von 41.3 kDa identifiziert werden (vgl. Martens, 2014, Kap. 4.3).

Zusätzlich sind schwache Nebenbanden in der SDS-PAGE zu erkennen. Zur quantitativen Auswertung wurde die Nebenbande bei einem MW_{cal} von 75.6 kDa definiert. Der Grund für diese Betrachtung ist die Inkonsistenz der Nebenbanden nach vollzogenem Abbau des Zielproteins nach zwei bzw. drei Tagen Inkubationsdauer. Bei der schwachen Bande mit einem MW_{cal} von 75.6 kDa handelt es sich möglicherweise um ein zelleigenes, intern gebildetes Protein. Das Protein konnte in der Arbeit von Martens (2014) vermehrt in der SDS-PAGE-Analyse von Zellaufschlussproben identifiziert werden, besitzt jedoch keine Reaktivität mit invasions-inhibitorischen Antikörpern (vgl. Martens, 2014, Kap. 4.5).

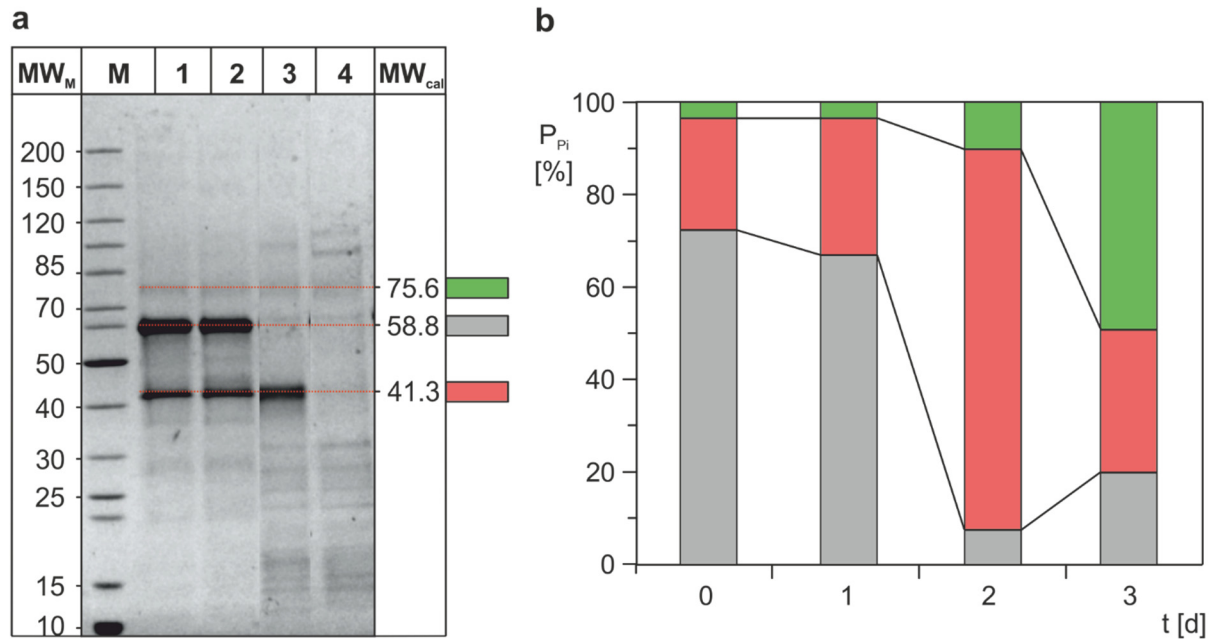


Abb. 5.2: Spezifischer Abbau des Zielproteins D1M1-His im Kulturüberstand. **a** SDS-PAGE des Kulturüberstandes der Fermentation JJJ1415 nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei 30 °C. **MW_M** Molekulargewicht des Proteinmarkers in kDa, **M** Marker, **1** Kulturüberstand nach 0 h Inkubation, **2** Kulturüberstand nach 1 d Inkubation, **3** Kulturüberstand nach 2 d Inkubation, **4** Kulturüberstand nach 3 d Inkubation, **MW_{cal}** kalkuliertes Molekulargewicht anhand des Proteinmarkers in kDa **b** Darstellung des prozentualen Abbaus definierter Banden aus der SDS-PAGE. In blau dargestellt ist das Protein mit einem MW_{cal} von 75.6 kDa, in schwarz das Protein mit 58.8 kDa und in rot besitzt das Protein ein MW_{cal} von 41.3 kDa. (Auswertungssoftware der SDS-PAGE: Image Lab™, Bio-Rad, München)

Das Säulendiagramm (Abb. 5.2 b) zeigt den prozentualen Abbau des Zielproteins D1M1-His. Dabei wird deutlich, dass der Methode der quantitativen Betrachtung des Proteinabbaus mit Hilfe densitometrischer SDS-PAGE-Auswertung Grenzen gesetzt sind. Bei einem nicht spezifischen oder vollständigen Abbau einer definierten Zielproduktbande kann der prozentuale Anteil nicht korrekt erfasst werden, was aus der prozentualen Zunahme der Zielproduktbande nach 3 d Inkubation ersichtlich wird.

Zur qualitativen Bewertung der Proteinzusammensetzung im Kulturüberstand wurde die Hochleistungsfraktionierung durch SE-HPLC verwendet. Abb. 5.3 zeigt die Chromatogramme und SDS-PAGE-Analysen der Kulturüberstände.

Der Kulturüberstand aus der P-D1M1-Fermentation zeigt bei einer Inkubationstemperatur von 23 °C in den Chromatogrammen nur geringfügige Änderungen über den Inkubationszeitraum von drei Tagen (Abb. 5.3 a). Die Auswertung der SDS-PAGE veranschaulicht hingegen eine Möglichkeit der quantitativen Erfassung des Proteinabbaus (vgl. Abb. 5.1).

5 Ergebnisse und Diskussion

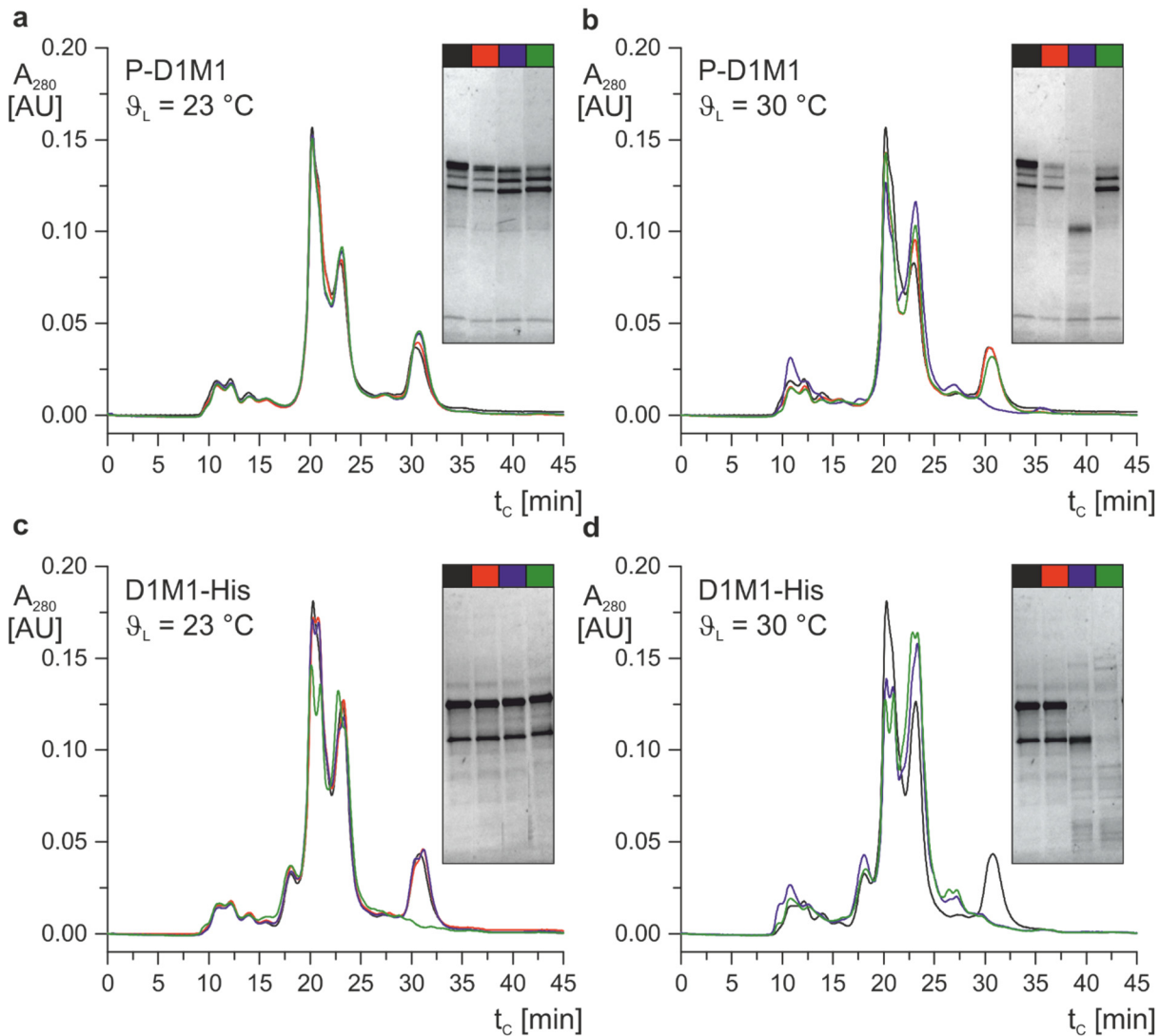


Abb. 5.3: Qualitative Betrachtung der Abbauprodukte durch SE-HPLC. Dargestellt sind die Chromatogramme und SDS-PAGE-Ergebnisse der Kulturüberstände nach unterschiedlichen Inkubationszeiten und -temperaturen. Schwarz steht für die Ausgangsprobe bei $t_0 = 0$ h Inkubation, rot für 1 d, blau für 2 d und grün zeigt die Probe mit einer Inkubationsdauer von 3 d. **a und b** zeigen den Kulturüberstand aus der Fermentation JJJ1315, wobei **a** bei einer Temperatur ϑ_L von 23°C und **b** bei einer Temperatur von $\vartheta_L = 30^\circ\text{C}$ inkubiert wurde. Die Chromatogramme **c und d** zeigen den Kulturüberstand aus der Kultivierung JJJ1415, wobei **c** ebenfalls bei einer Temperatur ϑ_L von 23°C und **d** bei einer Temperatur von $\vartheta_L = 30^\circ\text{C}$ inkubiert wurde. Fließmittel: 20 mM Phosphatpuffer pH 7.4, 700 mM NaCl; Flussrate: 0.2 mlmin^{-1}

Die Inkubation bei einer Temperatur von 30°C führt zu einem unspezifischen Abbau des Zielproduktes P-D1M1. Auffallend bei der Betrachtung des P-D1M1-Abbaus nach zwei Tagen Inkubation und einer Temperatur von 30°C ist das Verschwinden des Peaks bei einer Retentionszeit von 30.5 min. Gleichzeitig erhöht sich die Absorption des Peaks bei einer Retentionszeit von 10.7 min (Abb. 5.3 b, blau).

Eine Inkubation des Kulturüberstandes der D1M1-His-Fermentation bei 23 °C führte in der SDS-PAGE-Analyse ebenfalls nur zu geringfügigen Abweichungen (Abb. 5.3 c). Im Chromatogramm hingegen ist jedoch nach drei Tagen Inkubation (grün) der Rückgang der Absorption bei einer Retentionszeit von 30.5 min zu erkennen. Gleichzeitig weist das Chromatogramm eine geringe Erhöhung der Absorption bei einer Retentionszeit von 9.7 min auf.

Nach der Inkubation bei 30 °C (Abb. 5.3 d) zeigt sich eine Absorptionsabnahme bei einer Retentionszeit von 30.5 min und eine gleichzeitige Absorptionszunahme bei 9.7, 10.7 und 18 min.

In beiden Überstandsproben der Kultivierungen ist der Peak bei einer Retentionszeit von 30.5 min nachweisbar. Das Volumen der mobilen Phase der chromatographischen Säule beträgt 5 ml, was einer Retentionszeit der mobilen Phase bei einer Flussrate von 0.2 mlmin⁻¹ von 25 min entspricht. Daraus lässt sich schließen, dass das bei 30.5 min zurückgehaltene Molekül eine Interaktion mit der stationären Phase eingeht. Zudem scheint das Molekül an dem Abbau der Zielproteine P-D1M1 und D1M1-His beteiligt zu sein.

Diese Vermutung kann mit einer Betrachtung der Peakveränderung im Chromatogramm und der Verfolgung des Proteinabbaus in der SDS-PAGE begründet werden. Bei Verschwinden des Peaks im Chromatogramm wird augenscheinlich die Intensität der Zielproteinbande im Chromatogramm geringer.

Zusammenfassend kann die SE-HPLC als eine geeignete Methode zur qualitativen Stabilitätsbetrachtung der Zielproteine angesehen werden. Veränderungen im Chromatogramm zeigen eine Kompatibilität zu den Ergebnissen aus der SDS-PAGE-Analyse. Darüberhinaus zeigt sich in den Chromatogrammen ein weitaus komplexeres und umfangreicheres Bild in der Zusammensetzung der Kulturüberstände als die Interpretation der SDS-PAGE-Ergebnisse ergeben würden. Gründe für diese Interpretationsunterschiede können (i) eine geringe Nachweisgrenze der Coomassie-Färbemethode von 50-100 ng/Bande oder (ii) die Probenvorbereitung bei der SDS-PAGE-Analyse sein.

Die Nachweisgrenze der SDS-PAGE-Analyse könnte durch die Anwendung einer Silberfärbung auf 0.1-1 ng/Bande verringert werden und dadurch eine komplexere Zusammensetzung des Kulturüberstandes verdeutlichen. Hierbei ist zu beachten, dass eine quantitative Auswertung mit Hilfe der Densitometrie bei einer Silberfärbung dann nicht mehr möglich wäre.

Bei der Probenvorbereitung für die SDS-PAGE-Analyse werden die in Lösung befindlichen Proteine thermisch denaturiert und anschließend eine äußere Ladung durch Anlagerung von SDS-Molekülen erzeugt. Diese Veränderung der nativ in Lösung befindlichen Proteine kann zu einer Vereinheitlichung von Proteinmolekülen führen. Im Gegensatz hierzu wird die Probe bei der SE-HPLC keiner Vorbereitung unterzogen, d. h. die Probe wird direkt der Trennung nach dem hydrodynamischen Volumen unterzogen.

Eine Identifikation der einzelnen Fraktionen der SE-HPLC wird innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt. Die Methode diente ausschließlich der Betrachtung von Veränderungen in der Zusammensetzung der untersuchten Proben.

Abb. 5.4 zeigt die SDS-PAGE-Analyse der Kulturüberstände mit dazugehörigem Zymogramm.

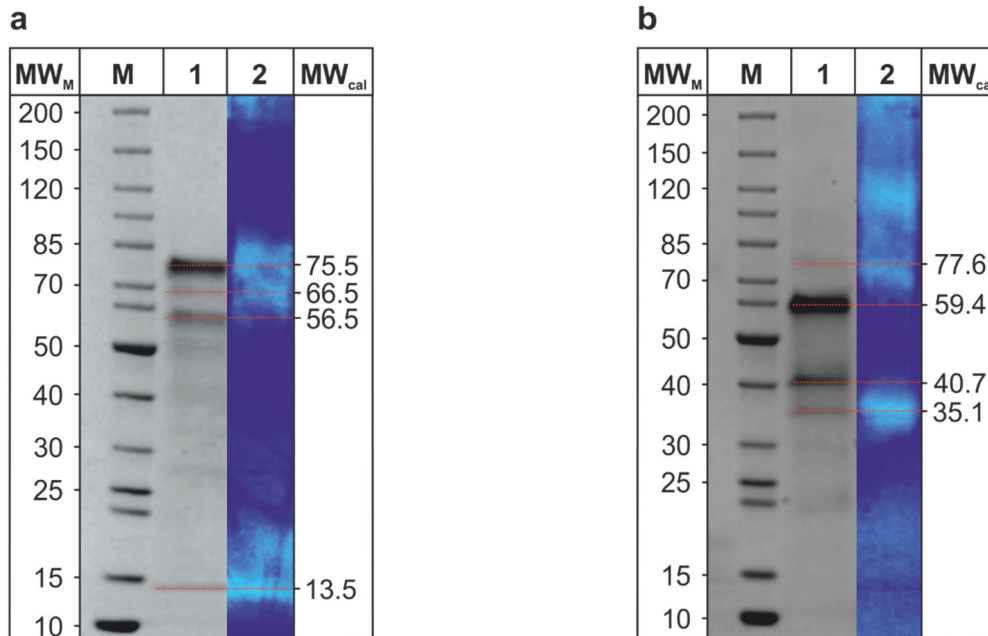


Abb. 5.4: Qualitativer Nachweis der proteolytischen Aktivität in Kulturüberstand. Darstellung der SDS-PAGE und des dazugehörigen Zymogrammgels. **MW_M** Molekulargewicht des Proteinmarkers in kDa, **M** Marker, **1** Kulturüberstand, **2** 10 % Gelatine Zymogrammgel des Kulturüberstandes, **MW_{cal}** kalkuliertes Molekulargewicht anhand des Proteinmarkers in kDa. **a** Kulturüberstand der P-D1M1 Fermentation **b** Kulturüberstand der D1M1-His Fermentation. (Auswertungssoftware der SDS-PAGE: Image Lab™, Bio-Rad, München)

Deutlich zu erkennen ist die unterschiedliche Zusammensetzung der Proteasen in den Zymogrammgelen. Abb. 5.4 a zeigt eine proteolytische Aktivität im Bereich von 76 und 13.5 kDa. In dem Zymogramm des D1M1-His-haltigen Kulturüberstandes ist eine eindeutige proteolytische Aktivität mit einem MW_{cal} von 110, 77 und 35 kDa nachzuweisen (Abb. 5.4 b). Alle Proben zeigen in einem parallel bearbeiteten 12.5 %igen Casein-Gel keine Aktivität (Ergebnis nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der Zymographie verdeutlichen, dass trotz identischer Kultivierungsbedingungen und Medienbestandteile die Zusammensetzung der Proteasen im Kulturüberstand unterschiedlich erscheint. Nach Faber et al. (2013) schwankt die Stabilität der Proteine stark zwischen unterschiedlichen Kultivierungen, was ebenfalls für die Inkonsistenz der Proteasen in den Kulturüberständen sprechen würde.

Als kritisch einzustufen ist die proteolytische Aktivität bei 70 kDa in dem P-D1M1-haltigen Kulturüberstand. Das Zielprodukt besitzt in der SDS-PAGE ein ähnliches Laufverhalten wie die Protease. Dies resultiert in der Vermutung, dass die Bande der Protease unterhalb der Zielproteinbande liegen könnte und diese mittels SDS-PAGE nicht erfasst werden kann.

In der SE-HPLC-Analyse könnte diese Protease ein Grund für die Veränderungen des Chromatogramms sein. Das Zymogramm zeigt lediglich die proteolytische Aktivität mit einem MW_{cal} von 76 kDa in beiden Kulturüberständen. In den Chromatogrammen bestand die Vermutung, dass der Peak bei $t_c = 30.5$ min mit einem Proteinabbau in Verbindung steht. Dieser Peak erscheint ebenfalls in beiden Kulturüberständen und wird aus diesem Grund als ein Indiz für das Vorkommen proteolytischer Aktivität gewertet.

Die mit einem MW_{cal} von 13.5 kDa vorliegende proteolytische Aktivität im P-D1M1-haltigem Kulturüberstand ist einer schwachen Bande in der SDS-PAGE zuzuordnen. In dem Zymogramm des Kulturüberstandes der D1M1-His Fermentation entspricht die proteolytische Aktivität bei 110 kDa keiner Proteinbande in der SDS-PAGE oder einem Peak in der SE-HPLC. Die proteolytische Aktivität bei einem MW_{cal} von 35.1 kDa ist identisch mit einer schwachen Bande in der SDS-PAGE.

Als Ergebnis der Stabilitätsbetrachtung der Zielproteine P-D1M1 und D1M1-His kann zusammengefasst werden, dass eine Quantifizierung des Proteinabbaus durch densitometrische SDS-PAGE-Auswertung möglich sein kann. Die Stabilität der Zielproteine kann mit Hilfe dieser Methode als kritisches Qualitätsmerkmal (CQA) erfasst werden. Bei der Anwendung der Methode sind die Inkubationszeiten und -temperaturen so zu wählen, dass kein kompletter Abbau einer definierten Proteinbande erfolgt.

Die Analyse mit Hilfe der SE-HPLC kann für eine Betrachtung des Fortschrittes des proteolytischen Abbaus genutzt werden. Die proteolytische Aktivität in den Kulturüberständen der Fermentationen konnte nachgewiesen werden, wobei einzelne am Abbau beteiligte Proteasen nicht eindeutig identifiziert werden konnten. Dennoch können Proteasen als kritische Verunreinigungen identifiziert werden.

Das nachfolgende Kapitel betrachtet weiterführend die Stabilität der Zielproteine anhand des definierten CQA in wässrigen Puffersystemen nach dem Ansatz der SVP.

5.1.2 Stabilität in wässrigen Puffersystemen

Das Wissen über den Einfluss von Prozessparametern auf die Stabilität der Zielproteine in wässrigen Puffersystemen steht im Vordergrund der folgenden Untersuchungen. Während des *downstream*-Prozesses werden die Zielproteine in wässrige Puffersysteme mit unterschiedlichen pH-Werten und Salzkonzentrationen überführt. Der Einfluss dieser Parameter sowie der Einfluss der Lagertemperatur und -dauer auf die Stabilität können beträchtlich sein und sollen durch die Anwendung der statistischen Versuchsplanung quantitativ erfasst werden.

Im folgenden Abschnitt werden zwei Stabilitätsstudien der Zielproteine P-D1M1 und D1M1-His vorgestellt. Zu der jeweiligen Studie werden Ergebnisse ausgewählter SDS-PAGE-Analysen gezeigt und interpretiert. Anschließend folgt die Evaluation der Rohdaten, die Modellbildung mit Hilfe der SVP und die Interpretation der Ergebnisse.

Abb. 5.5 veranschaulicht die Stabilität des Zielproteins P-D1M1 in unterschiedlichen Milieubedingungen anhand der SDS-PAGE-Analyse.

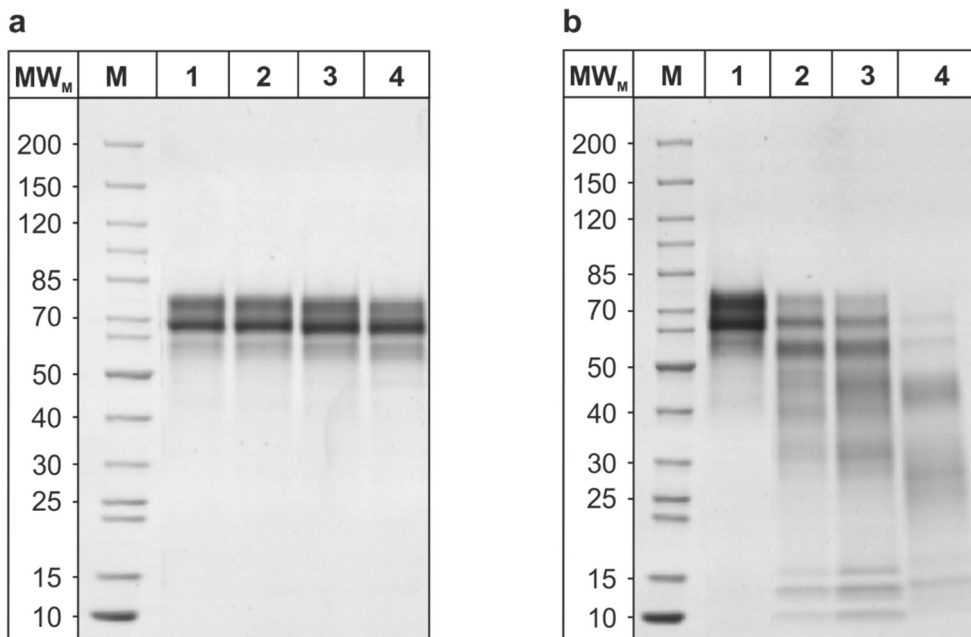


Abb. 5.5: Positiv- und Negativbeispiel der Stabilität des Zielproteins P-D1M1 in wässrigen Puffersystemen. Dargestellt sind die SDS-PAGE-Resultate des Experimentes **a** N4 und **b** N5; **M** Marker, **1** Probe nach 0 h Inkubation, **2** Probe nach 24 h Inkubation, **3** Probe nach 48 h Inkubation, **4** Probe nach 132 h Inkubation.

Der pH-Wert des Experimentes N4 wurde auf 9.0 und die Salzkonzentration auf 1.0 M eingestellt (Abb. 5.5 a). Die Lagertemperatur des Experimentes betrug 5 °C. Über die Inkubationsdauer von 132 h nahm die Wiederfindung um 6.9 % ab.

Als Negativbeispiel zeigt Abb. 5.5 b das SDS-PAGE-Resultat des Experimentes N5. Die Lagertemperatur des Versuches betrug 45 °C, der pH-Wert 4.0 und die Salzkonzentration 0.1 M. Bei diesen Faktoreinstellungen traten erhebliche Degradationseffekte auf. Die Wiederfindung nahm innerhalb der Inkubationszeit von 132 h um 96 % ab.

Diese augenscheinlich erkennbare Degradation des Zielproduktes zeigt den Einfluss der gewählten Faktoren Lagertemperatur, pH-Wert und Salzkonzentration. Die Wahl der Faktoreinstellungsbereiche (vgl. Tab. 4.3) und der Inkubationsdauer scheint für eine quantitative Erfassung der Stabilität von P-D1M1 geeignet zu sein.

Für die Anwendung der SVP ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von hoher Bedeutung. Abb. 5.6 veranschaulicht hierzu die SDS-PAGE-Analyse der CP-Experimente.

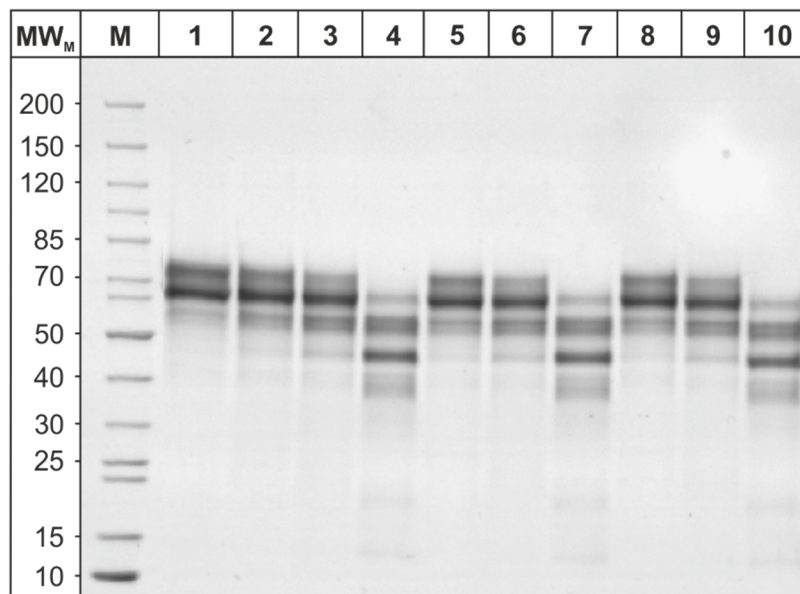


Abb. 5.6: Reproduzierbarkeit der Stabilitätsstudie des Zielproteins P-D1M1 in wässrigen Puffersystemen. Abgebildet sind die SDS-PAGE-Ergebnisse der CP-Experimente N15-17. **M** Marker, **1** Probe nach 0 h Inkubation, **2** N15 nach 24 h Inkubation, **3** N15 nach 48 h Inkubation, **4** N15 nach 132 h Inkubation, **5** N16 nach 24 h Inkubation, **6** N16 nach 48 h Inkubation, **7** N16 nach 132 h Inkubation, **8** N17 nach 24 h Inkubation, **9** N17 nach 48 h Inkubation, **10** N17 nach 132 h Inkubation.

Die CP-Experimente wurden bei einer Lagertemperatur von 25 °C, einem pH-Wert von 6.5 und einer Salzkonzentration von 0.55 M durchgeführt. Das Degradationsmuster der SDS-PAGE-Analyse zeigt ein identisches Abbauverhalten während der drei Versuche. Der Mittelwert der Wiederfindung beträgt nach einer Inkubationszeit von 24 h 89.0 ± 2.2 %, nach 48 h 82.1 ± 1.4 % und nach 132 h Inkubationsdauer 30.9 ± 4.4 %. Innerhalb von 132 h nahm die Wiederfindung R_{P1+2} um 58.1 % ab.

Tab. 5.1 fasst die Faktoreinstellungen und Ergebnisse der Stabilitätsstudie des Zielproteins P-D1M1 zusammen.

Tab. 5.1: Faktoreinstellungen und Ergebnisse der P-D1M1-Stabilitätsstudie

N _j	Faktoreinstellung			Wiederfindung R _{P1+2}		
	pH _L [-]	C _{SaltL} [M]	ϑ _L [°C]	24 h	48 h	132 h
N1	4.0	0.10	5	90.9	75.3	40.3
N2	9.0	0.10	5	94.2	92.9	72.8
N3	4.0	1.00	5	97.4	93.5	71.4
N4	9.0	1.00	5	100.7	93.1	93.1
N5	4.0	0.10	45	38.3	21.5	4.0
N6	9.0	0.10	45	86.4	81.1	34.1
N7	4.0	1.00	45	48.0	34.0	19.5
N8	9.0	1.00	45	95.6	87.9	43.3
N9	4.0	0.55	25	75.6	65.4	0.0
N10	9.0	0.55	25	97.9	92.2	10.2
N11	6.5	0.10	25	0.0	0.0	0.0
N12	6.5	1.00	25	91.4	91.4	66.0
N13	6.5	0.55	5	104.5	97.9	84.7
N14	6.5	0.55	45	83.3	72.8	50.3
N15	6.5	0.55	25	90.5	82.0	31.3
N16	6.5	0.55	25	86.5	80.7	35.1
N17	6.5	0.55	25	90.1	83.5	26.3

Kennzeichnung: grün: Positivbeispiel rot: Negativbeispiel
 blau: Beispiele für den Nachweis der Reproduzierbarkeit
 grau: Experiment für die statistische Auswertung ausgeschlossen

Für die densitometrische Auswertung wurden die Banden der SDS-PAGE-Analyse bei einem MW_{cal} von 74.4 kDa und 64.9 kDa zu der Produktreinheit P_{P1+2} zusammengefasst. Dieses Vorgehen ermöglichte eine quantitative Betrachtung des gesamten Degradationsprozesses. Die Reinheit der Ausgangsproben P_{P1+2_0} betrug im Mittel 77.6 ± 1.9 %. Die Wiederfindung R_{P1+2} wurde nach Gl. (4.8) berechnet.

Abb. 5.7 zeigt das Ergebnis der CP-Experimente der Stabilitätsstudie des Zielproteins D1M1-His.

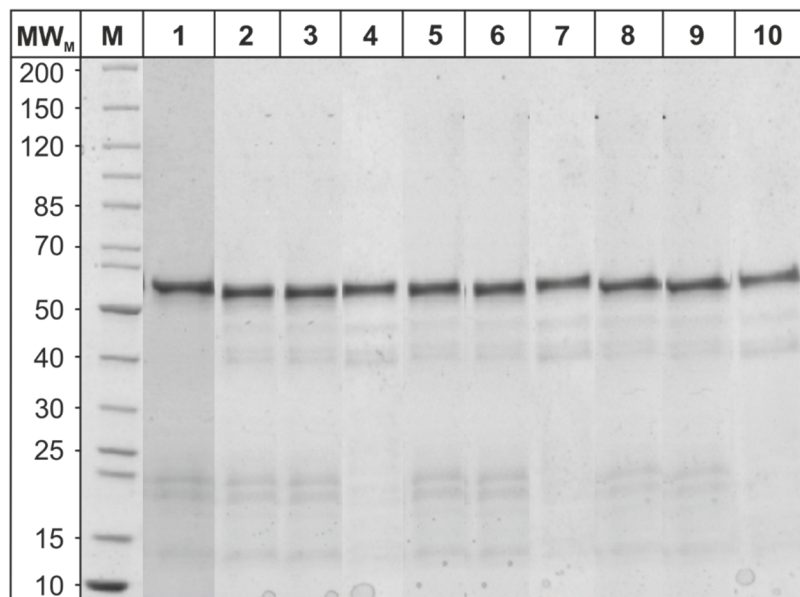


Abb. 5.7: Reproduzierbarkeit der Stabilitätsstudie des Zielproteins D1M1-His in wässrigen Puffersystemen. Abgebildet sind die SDS-PAGE-Ergebnisse der CP-Experimente N15-17. **M** Marker, **1** Probe nach 0 h Inkubation, **2** N15 nach 24 h Inkubation, **3** N15 nach 48 h Inkubation, **4** N15 nach 132 h Inkubation, **5** N16 nach 24 h Inkubation, **6** N16 nach 48 h Inkubation, **7** N16 nach 132 h Inkubation, **8** N17 nach 24 h Inkubation, **9** N17 nach 48 h Inkubation, **10** N17 nach 132 h Inkubation.

Im Gegensatz zum Zielprotein P-D1M1 zeigt D1M1-His bei den unterschiedlichen Milieubedingungen kein spezifisches Degradationsmuster in der SDS-PAGE-Analyse der CP-Experimente. Einzig die schwachen Banden im Bereich von 10 bis 20 kDa sind nach einer Inkubationszeit von 132 h reproduzierbar nicht mehr sichtbar.

Die densitometrische Analyse ergibt nach einer Inkubationsdauer von 24 h einen Mittelwert von 102.6 ± 0.5 %, nach 48 h von 94.7 ± 2.3 % und nach 132 h von 87.2 ± 0.4 %. Insgesamt nahm die Wiederfindung innerhalb einer Inkubationsdauer von 132 h um 15.5 % ab.

Tab. 5.2 fasst die verwendeten Faktoreinstellungen sowie die Ergebnisse der densitometrischen SDS-PAGE-Analyse zusammen.

Tab. 5.2: Faktoreinstellungen und Ergebnisse der D1M1-His-Stabilitätsstudie

N _j	Faktoreinstellung			Wiederfindung R _{P3}		
	pH _L [-]	C _{SaltL} [M]	ϑ _L [°C]	24 h	48 h	132 h
N1	4.0	0.10	5	97.9	89.1	98.1
N2	9.0	0.10	5	94.1	82.8	0.0
N3	4.0	1.00	5	101.1	89.0	98.4
N4	9.0	1.00	5	100.0	86.0	94.7
N5	4.0	0.10	45	95.2	82.1	98.2
N6	9.0	0.10	45	93.8	88.6	100.4
N7	4.0	1.00	45	97.0	82.0	89.7
N8	9.0	1.00	45	98.9	83.6	95.9
N9	4.0	0.55	25	91.9	88.3	75.4
N10	9.0	0.55	25	107.2	95.9	0.0
N11	6.5	0.10	25	0.0	0.0	0.0
N12	6.5	1.00	25	102.8	79.0	90.4
N13	6.5	0.55	5	102.2	94.2	100.5
N14	6.5	0.55	45	103.9	94.5	94.0
N15	6.5	0.55	25	103.1	94.9	86.8
N16	6.5	0.55	25	102.1	92.4	87.1
N17	6.5	0.55	25	102.5	97.0	87.5

Kennzeichnung: blau: Beispiele für den Nachweis der Reproduzierbarkeit
 grau: Experiment für die statistische Auswertung ausgeschlossen

Für die Auswertung des Zielproduktes D1M1-His wurde die Produktbande bei einem MW_{cal} von 58.8 kDa betrachtet. Die Reinheit der Ausgangsproben P_{P3_0} wurde mit 90.8 ± 3.2 % bestimmt und die Wiederfindung nach Gl. (4.8) berechnet.

Die erhaltenen sechs Datensätze der Wiederfindung aus den Stabilitätsstudien wurden der statistischen Rohdatenanalyse nach Kap. 4.4 unterzogen.

Der Boxplot in Abb. 5.8 verdeutlicht die Streuung der Messdaten innerhalb der Datensätze anhand des Interquartilabstandes (IQR).

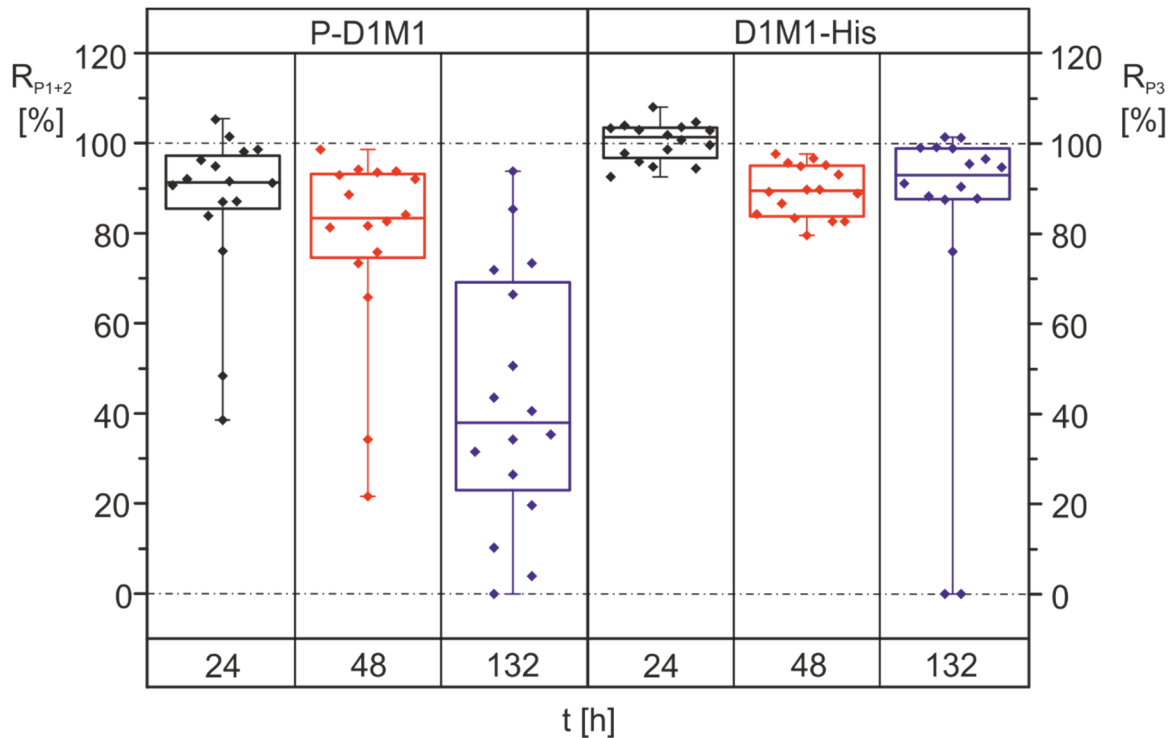


Abb. 5.8: Boxplot der Datensätze aus den Stabilitätsstudien. Die Abbildung veranschaulicht die Ergebnisse der Wiederfindung zu den gewählten Inkubationszeiten von 24 h (schwarz), 48 h (rot) und 132 h (blau).

Die Streuung der Datensätze des Zielproteins P-D1M1 und damit der Wiederfindung R_{P1+2} nimmt von 24 bis 132 h von 11.7 auf 45.8 % zu. Innerhalb der Rohdatensätze der Wiederfindung des Zielproduktes D1M1-His R_{P3} ist der Streubereich mit maximal 11.2 % nach einer Inkubationsdauer von 132 h um das vier-fache geringer.

Tab. 5.3 fasst die Ergebnisse der statistischen Rohdatenanalyse zusammen.

Tab. 5.3: Zusammenfassung der statistischen Rohdatenanalyse der Stabilitätsprüfung

Datensatz		NV	Ausreißer	Median [%]	IQR [%]
R_{P1+2}	24 h	nein	-	90.7	11.7
	48 h	nein	-	82.8	18.5
	132 h	ja	nein	37.7	45.8
R_{P3}	24 h	ja	nein	100.6	6.6
	48 h	ja	nein	88.8	11.2
	132	nein	-	92.2	11.2

Der Shapiro-Wilk-Test ergibt bei den Datensätzen der Wiederfindung des Zielproduktes P-D1M1 nach einer Inkubationszeit von 132 h und für die Wiederfindung von D1M1-His nach einer Inkubationsdauer von 24 und 48 h eine Normalverteilung (NV). Die Anwendung des Grubbs-Tests konnte keinen signifikanten Ausreißer innerhalb der normalverteilten Datensätze identifizieren.

Die Regressionsanalyse wurde für das Produkt P-D1M1 mit dem normalverteilten Datensatz nach einer Inkubationsdauer von 132 h durchgeführt und auf die weiteren Datensätze übertragen.

Tab. 5.4 fasst die physikalischen Koeffizienten sowie die Gütekriterien der erstellten Modelle zusammen.

Tab. 5.4: Ergebnisse der Modellbildung für die Stabilität des Zielproteins P-D1M1

Modellfaktoren		Modell der Wiederfindung R_{P1+2} nach		
		24 h	48 h	132 h
physikalische Koeffizienten	a_0	66.366 %	36.504 %	-130.396 %
	a_1	9.960 %	16.754 %	71.942 %
	a_2	41.574 %M ⁻¹	25.296 %M ⁻¹	-62.053 %M ⁻¹
	a_3	-2.388 %°C ⁻¹	-2.171 %°C ⁻¹	-4.813 %°C ⁻¹
	a_{11}	-0.811 %	-1.267 %	-5.169 %
	a_{22}	-29.136 %(M ²) ⁻¹	-12.469 %(M ²) ⁻¹	77.037 %(M ²) ⁻¹
	a_{33}	0.005 %(°C ²) ⁻¹	-0.003 %(°C ²) ⁻¹	0.075 %(°C ²) ⁻¹
	a_{13}	0.223 %°C ⁻¹	0.241 %°C ⁻¹	-0.001 %°C ⁻¹
Gütekriterien	R^2	0.987	0.973	0.964
	Q^2	0.942	0.858	0.826
	R^2-Q^2	0.045	0.115	0.138
	MV	0.772	0.303	0.651
	RP	0.985	0.996	0.976

Die Übertragung des erstellten Modells nach einer Inkubationsdauer von 132 h auf die Datensätze nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 h zeigen ein unterschiedliches Systemverhalten. Eine Prüfung auf Gültigkeit der Modelle für das Degradationsverhalten des Zielproteins P-D1M1 fiel positiv aus, da die ermittelten Kenngrößen (vgl. Tab. 4.2) den aufgeführten Anforderungen entsprechen.

Die Interaktionen zwischen pH-Wert und Salzkonzentration sowie zwischen Salzkonzentration und Lagertemperatur zeigen keinen Einfluss auf die Wiederfindung. Lediglich der Interaktionsterm zwischen dem pH-Wert und der Lagertemperatur mit einem Regressionskoeffizienten a_{13} von 0.223 bzw. 0.241 %°C⁻¹ bei einer Inkubationsdauer von 24 und 48 h ist von hoher Bedeutung und darf in diesen Modellen nicht vernachlässigt werden.

Abb. 5.9 zeigt den jeweiligen Konturenverlauf der in Tab. 5.4 dargestellten Modelle und veranschaulicht damit das Degradationsverhalten des Zielproteins P-D1M1 in den spezifischen Lagerbedingungen.

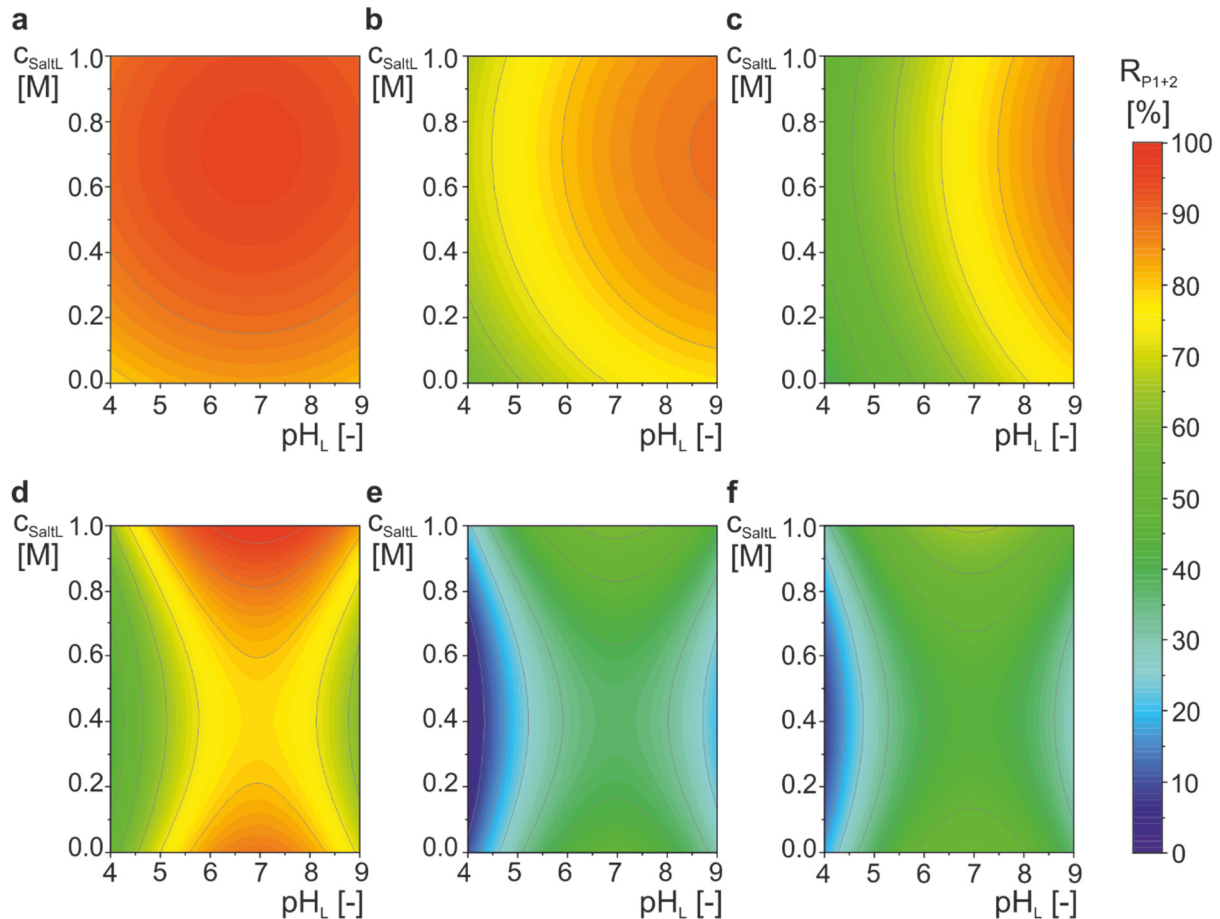


Abb. 5.9: Konturenverläufe der Wiederfindung R_{P1+2} für das Zielprotein P-D1M1. **a** zeigt das Modell nach einer Inkubationszeit von 24 h bei einer Lagertemperatur von 5 °C, **b** nach 24 h und 25 °C, **c** nach 24 h und 45 °C, **d** nach 132 h und 5 °C, **e** nach 132 h und 25 °C, **f** nach 132 h und 45 °C.

Die Konturenverläufe zeigen den Abbau des Zielproduktes anhand des farblichen Verlaufes. Augenscheinlich ist die Degradation des Malariavakzinkandidaten P-D1M1 stark abhängig von der Lagertemperatur sowie der Inkubationsdauer. Eine vollständige Vermeidung der Abbaureaktion ist innerhalb des Versuchsraumes nicht möglich.

Hohe Temperaturen resultieren in einem beschleunigten Abbau des Zielproteins. Eine Stabilisierung des Produktes scheint nach 24 h Inkubation ab einem pH-Wert $pH_L > 7$ und einer Salzkonzentration $C_{SaltL} > 0.4$ M möglich zu sein.

Bei einer Inkubationsdauer von 132 h ist ein stabilisierend wirkender pH-Wert zwischen 6 und 8 erkennbar, wobei Salzkonzentrationen $C_{SaltL} < 0.2$ M oder $C_{SaltL} > 0.7$ M scheinbar zu einer Stabilisierung führen (Abb. 5.9 d-f).

Eine Regressionsanalyse für das Zielprotein D1M1-His ist aufgrund der geringen Varianz in den Rohdaten der Wiederfindung R_{P3} nicht möglich (vgl. Abb. 5.8 und Tab. 5.3, IQR). Eine Übertragung des P-D1M1-Modells auf die Datensätze der D1M1-His-Stabilität resultierte in nicht validen Modellen. Die Gütekriterien der Modellbewertung nach Tab. 4.2 wurden nicht erfüllt. Eine Vermutung hierfür ist der nicht spezifische und geringe Produktabbau des Zielproteins D1M1-His, was für die Stabilität des Malariavakzinkandidaten spricht.

Die Resultate sprechen dafür, dass eine Modellbildung für das Degradationsverhalten des Zielproteins P-D1M1 möglich ist. Das Zielprotein P-D1M1 unterliegt einer starken, spezifischen Degradation, wohingegen der Abbau des Zielproteins D1M1-His nur im geringen Maße und unspezifisch erfolgt.

Diese Unterschiede im Degradationsverhalten können möglicherweise durch eine nähere Betrachtung der Ausgangsmaterialien der Proteine erklärt werden. Das Zielprotein P-D1M1 wurde nach der Kultivierung durch Cu^{2+} -IMAC aufgereinigt. Die Aufreinigung des Zielproteins D1M1-His hingegen erfolgte mit Ni^{2+} -IMAC. Die Erkenntnis nach Faber et al. (2013), dass mit Cu^{2+} -IMAC eine ineffektive Abreicherung der Proteasen erfolgt, könnte daher auch hier zutreffen. Für eine tiefer reichende Untersuchung wird diese These in Kap. 5.2.4 weiter diskutiert. Trifft diese Annahme zu und der Abbau von P-D1M1 ist proteolytisch bedingt, so ist der Degradationsgrad mit der Proteaseaktivität gleichzusetzen. Diese Erkenntnis würde wiederum bedeuten, dass eine Aufreinigung der Protease mit Cu^{2+} -IMAC möglich ist und die Protease einen pH-Bereich $5.5 > \text{pH}_L > 8.5$ bevorzugt. Dieses Resultat würde ebenfalls die Ergebnisse von Martens (2014) bestätigen, in der die Wiederfindung des Zielproteins D1M1-His ebenfalls untersucht wurde. Nach 72-stündiger Inkubation in frischem Medium sowie in Kulturüberstand wurde für eine Stabilisierung ein pH-Bereich von $5.5 < \text{pH}_L < 7.5$ identifiziert.

Abschließend ist zusammenzufassen, dass die SVP für eine Anwendung bei der Durchführung und Auswertung von Stabilitätsstudien geeignet ist. Eine Voraussetzung für die Modellbildung ist eine messbare Degradation des zu untersuchenden Produktes. Wie dargelegt, ist eine quantitativ erfassbare Varianz des Gütekriteriums nötig, um eine statistische Auswertung durchzuführen. Daher sind die Wahl des Faktoreinstellungsbereiches sowie die Definition eines oder mehrerer geeigneter CQAs als Schlüsselemente einer erfolgreichen Studie anzusehen.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Malariavakzinkandidaten zeigte sich ein vorteilhaftes Stabilitätsprofil des Proteins D1M1-His in wässrigen Puffersystemen, wobei der Grund für diesen Vorteil weitere Untersuchungen bedarf.

5.1.3 Zusammenfassung und der *Product Design Space*

Die Stabilität der herzustellenden Proteine spielt in der Entwicklung eines geeigneten Reinigungsprozesses nach dem QbD-Konzept eine übergeordnete Rolle. Das Wissen über mögliche Einflüsse äußerer Faktoren, wie Prozess- und Lagertemperaturen oder der Lagerdauer sowie den Einfluss von Prozessparametern wie pH-Wert oder Salzkonzentration auf die Stabilität der Proteine, ist grundlegend für eine optimale Prozessauslegung.

Für die vereinfachte Betrachtung der Ergebnisse aus den Stabilitätsstudien stellt Tab. 5.5 die kritischen Einflussfaktoren auf die Stabilität der Zielproteine P-D1M1 und D1M1-His dar.

Tab. 5.5: Kritische Einflussfaktoren auf die Stabilität der Zielproteine

Einflussfaktor	Erkenntnis
Proteasen	unterschiedliche Proteasen in den Kulturüberständen nachweisbar
pH-Wert	pH-Bereich zwischen 5.5 und 8.5 stabilisierend
Salzkonzentration	Salzkonzentrationen ≥ 0.7 stabilisierend
Lagertemperatur	5 °C stabilisierend
Lagerdauer	nur geringe Standzeiten möglich

Die Stabilitätsbetrachtung der Zielproteine P-D1M1 und D1M1-His zeigte eine ausgeprägte Degradation in den Kulturüberständen. Nachgewiesen werden konnten proteolytische Aktivitäten in unterschiedlichen Molekulargewichtsbereichen der Zymogrammgele. Das Degradationsverhalten kann quantitativ mit Hilfe der SDS-PAGE-Analyse sowie qualitativ mit der SE-HPLC erfasst werden. Die Proteaseaktivität in den Kulturüberständen wird als überaus kritisch eingestuft. Für die Prozessentwicklung, genauer für das Protein-*capture*, bedeutet dies die Entwicklung eines zügigen Aufarbeitungsverfahrens mit einem effektiven Abreicherungs-schritt der Proteasen.

Für die Prozessparameter pH-Wert und Salzkonzentration wurde ein stabilisierender Bereich identifiziert (Tab. 5.5). Innerhalb dieses Bereiches kann eine Degradation der Proteine durch mögliche Proteasen minimiert werden. Der Abbau kann jedoch nicht vollständig vermieden werden, weshalb die Entwicklung einer geeigneten Primärreinigung von übergeordneter Bedeutung ist.

Zur gezielten Minimierung proteolytischer Degradation sind in dem Gesamtprozess möglichst geringe Temperaturen zu wählen. Längere Standzeiten sind zu vermeiden, weshalb ein reibungsloser Prozessablauf von hoher Bedeutung ist.

5.2 Untersuchung der IMAC im *downscale*-Verfahren

5.2.1 Analyse der statischen und dynamischen Bindungskapazität

Die Vorauswahl eines adäquaten Adsorbentmaterials und eines geeigneten Metallchelate-Komplexes wurde durch Bindungsstudien der Zielproteine erreicht. Eine Adsorptionsstudie des Zielproteins D1M1-His (P3) an verschiedenen Adsorbentmaterialien der IMAC mit unterschiedlichen immobilisierten Metallionen ist in Abb. 5.10 dargestellt.

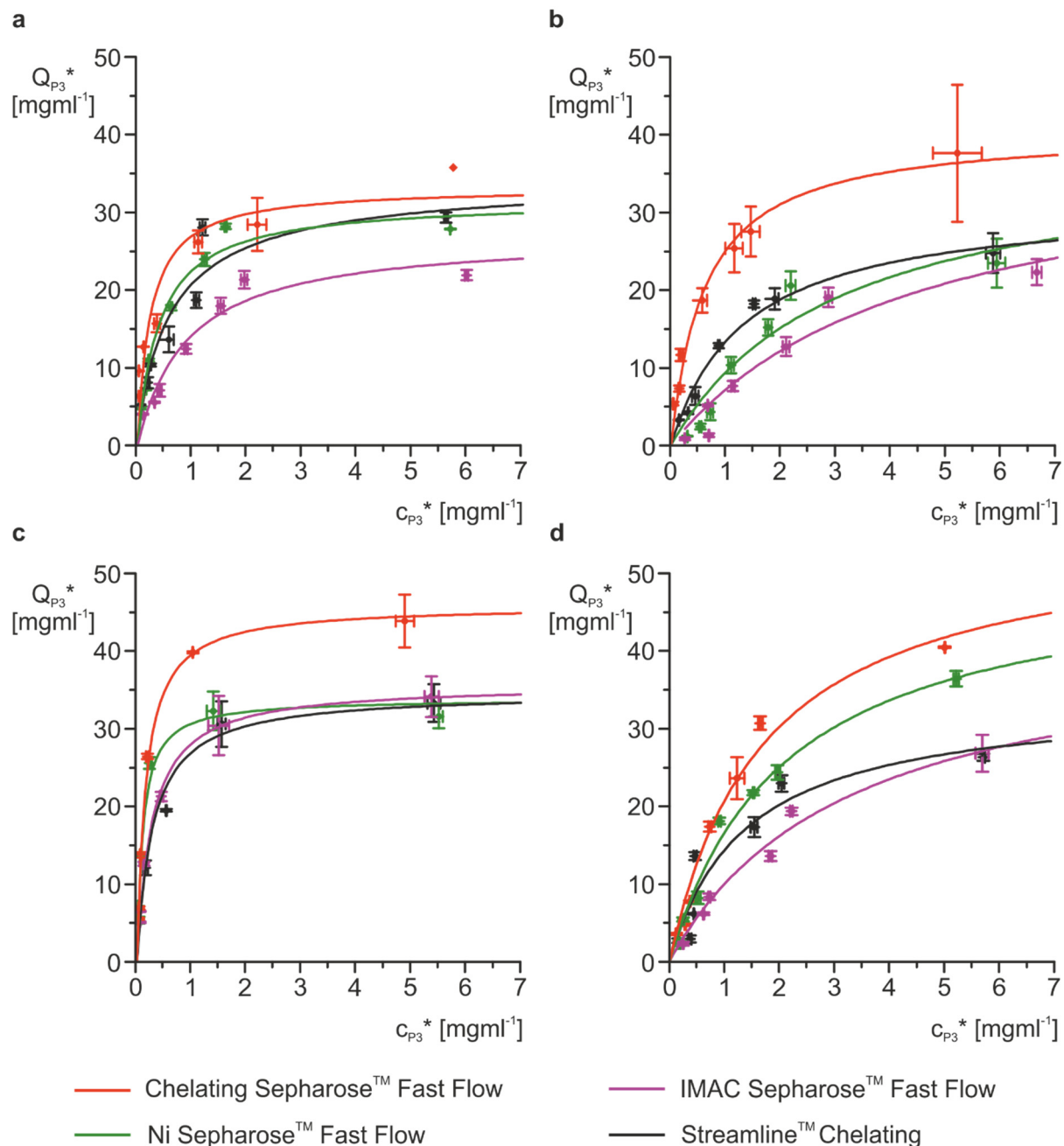


Abb. 5.10: Adsorptionsisothermen des Zielproteins D1M1-His an unterschiedlichen Metallchelate-Komplexen. Die Farben unterscheiden die Adsorptionsisothermen an den unterschiedlichen Adsorbentmaterialien und immobilisierten Metallionen. rot - Chelating Sepharose™ Fast Flow, grün - Ni Sepharose™ Fast Flow, lila - IMAC Sepharose™ Fast Flow, schwarz - Streamline™ Chelating. a Co^{2+} -Ionen, b Cu^{2+} -Ionen, c Ni^{2+} -Ionen, d Zn^{2+} -Ionen.

Die iterativ bestimmten Regressionsfunktionen nach Gl. (3.6) zeigen zunächst einen starken Anstieg im Anfangsbereich und verlaufen anschließend asymptotisch bis eine Annäherung an ein Plateau erfolgt. Besonders im Steigungsverhalten zeigen die Isothermen starke Unterschiede, was numerisch durch den Parameter K_D ausgedrückt wird (vgl. Anhang 7.3). Innerhalb identischer Metallionen zeigen die Isothermen einen vergleichbaren Verlauf. Dieses Verhalten lässt vermuten, dass die Bindungsaffinität des Zielproteins stark von dem verwendeten Metallchelate-Komplex abhängig ist.

Kobalt- und Nickelchelate (Abb. 5.10 a und c) zeigen eine ausgeprägte, asymptotische Annäherung an ein Plateau. Die kalkulierten Werte der Dissoziationskonstante K_D sind vergleichbar gering, d. h. die Bindungsaffinität zwischen dem Metallchelate-Komplex und dem Zielprodukt ist als hoch einzuschätzen.

Die Regressionsfunktionen der Kupfer- und Zinkchelate (Abb. 5.10 b und d) weisen keine klare Annäherung an ein Plateau auf, wodurch die ermittelten Werte der maximalen Bindungskapazität Q_{P3max_stat} höher erscheinen. Die Bindungsaffinität scheint aufgrund der erhöhten Dissoziationskonstante K_D jedoch geringer zu sein.

Für eine Vorauswahl des Adsorbentmaterials sind die Parameter maximale Bindungskapazität Q_{P3max_stat} sowie die Dissoziationskonstante K_D zu betrachten. Das Material Chelating Sepharose™ Fast Flow (rot) zeigt mit den verwendeten Metallchelaten aus Kobalt Co^{2+} , Kupfer Cu^{2+} , Nickel Ni^{2+} und Zink Zn^{2+} die höchste maximale Bindungskapazität. Die geringste Dissoziationskonstante und damit scheinbar die höchste Bindungsaffinität zum Zielprotein D1M1-His besitzt der IDA- Ni^{2+} -Komplex des genannten Adsorbenters (Abb. 5.10 c, rot).

Für einen Methodenvergleich zwischen der statischen und dynamischen Bestimmung der maximalen Bindungskapazität zeigt Tab. 5.6 eine Gegenüberstellung der ermittelten Bindungskapazitäten.

Tab. 5.6: Gegenüberstellung der ermittelten maximalen Bindungskapazitäten

Adsorbentmaterial	Q_{P3max_stat}	Q_{P3max_dyn}	$\frac{Q_{P3max_dyn}}{Q_{P3max_stat}}$
Chelating Sepharose™	45.8 mgml ⁻¹	41.5 mgml ⁻¹	0.906
Ni Sepharose™	33.7 mgml ⁻¹	28.3 mgml ⁻¹	0.840

Die Ergebnisse ergaben eine Abweichung von 9.4 bzw. 16 % zwischen der statisch und dynamisch ermittelten maximalen Bindungskapazität. Diese Differenzen resultieren mit hoher Wahrscheinlichkeit aus dem behinderten Massentransport in das Porensystem des Adsorbenters im dynamischen System. Im statischen System kann durch den Massentransport in das Porensystem des Adsorbentmaterials eine höhere Konzentration des Proteins an den Liganden der stationären Phase binden.

Abb. 5.11 zeigt die Durchbruchkurven des Zielproteins D1M1-His an den Adsorbentien Chelating Sepharose™ Fast Flow (rot) und Ni Sepharose™ Fast Flow (grün) mit immobilisierten Ni²⁺-Ionen.

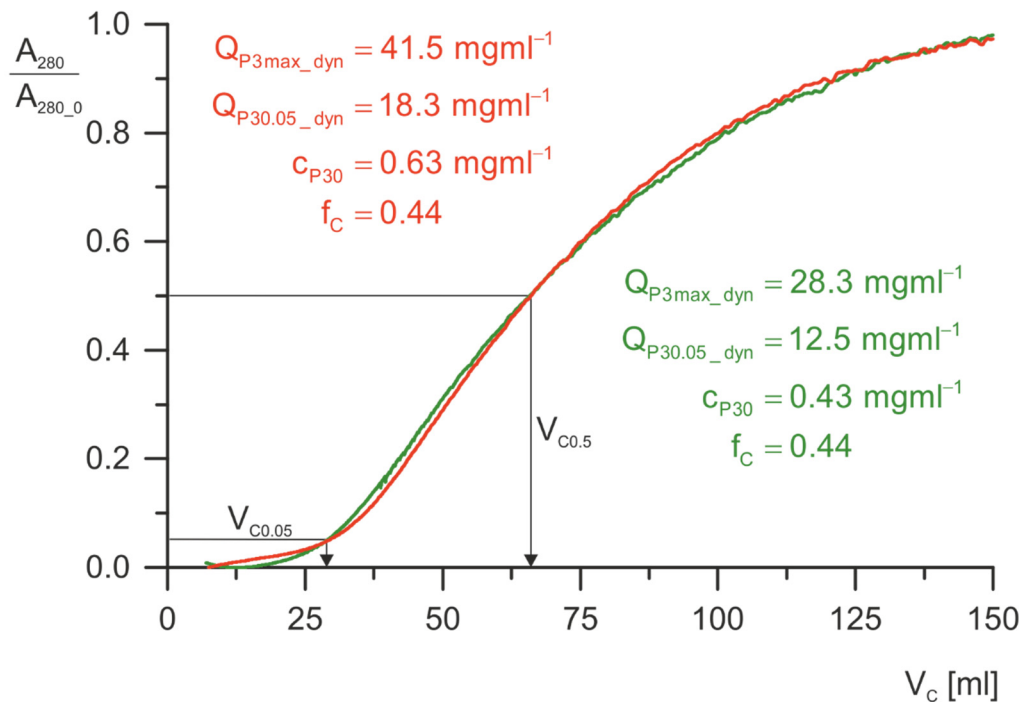


Abb. 5.11: Durchbruchkurven des Zielproteins D1M1-His an Adsorbentien der Ni²⁺-IMAC. rot - zeigt die DBK des Zielproteins D1M1-His an Chelating Sepharose™ Fast Flow, grün - an Ni Sepharose™ Fast Flow, bei einer Flussrate $F_{V_{SYC}}$ von 1 mlmin⁻¹.

Beide Graphen zeigen einen ähnlichen sigmoidalen Verlauf. Die berechnete maximale Bindungskapazität des dynamischen Systems Q_{P3max_dyn} nach Gl. (3.7) sowie die dynamische Bindungskapazität bei 5 % Durchbruch $Q_{P30.05_dyn}$ nach Gl. (3.8) resultieren in einem Unterschied von 32 %. Diese Differenz kann durch die Verwendung unterschiedlicher Proteinkonzentrationen der Ausgangslösungen c_{P3_0} begründet werden. Die Trennsäuleneffizienz ist mit dem Faktor f_C von 0.44 als identisch zu bewerten.

Die Ergebnisse der Bindungsstudie des Zielproteins D1M1-His ergaben einen Vorteil der IMAC-Aufreinigung mit Hilfe des Adsorbentmaterials Chelating Sepharose™ Fast Flow in Kombination mit immobilisierten Ni²⁺-Ionen. Eine Untersuchung der statischen maximalen Bindungskapazität des Zielproteins P-D1M1 mit verschiedenen Adsorbentmaterialien und immobilisierten Cu²⁺-Ionen resultierte ebenfalls in einer vorteilhaften Aufreinigung mit Hilfe von Chelating Sepharose™ Fast Flow.

Für die Optimierungsprozedur der IMAC nach Kap. 4.7 wurde aus diesem Grund Chelating Sepharose™ Fast Flow als ein geeignetes Adsorbentmaterial ausgewählt. Für die Aufreinigung des Zielproteins P-D1M1 wurden Cu²⁺-Ionen und für das Zielprotein D1M1-His wurden Ni²⁺-Ionen immobilisiert.

5.2.2 Optimierungspotential der IMAC

Das Optimierungspotential der IMAC-Aufreinigung durch die Variation der Einflussfaktoren ist anhand der definierten Qualitätskriterien quantifizierbar. Abb. 5.12 zeigt hierzu die Chromatogramme und SDS-PAGE-Analyse ausgewählter Screening-Experimente der Optimierungsprozeduren.

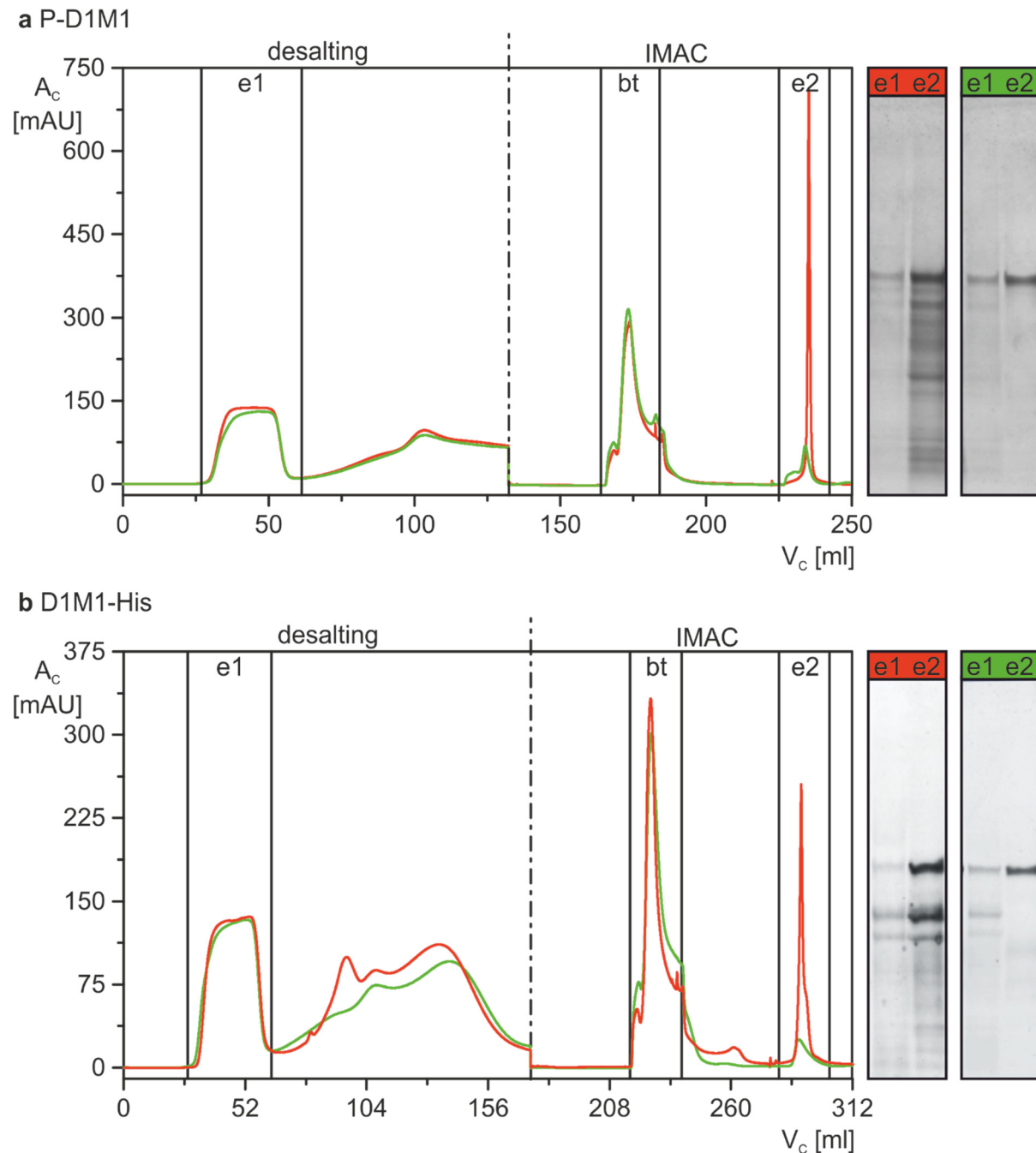


Abb. 5.12: Chromatogramme ausgewählter Screening-Experimente. **a** zeigt den Absorptionsverlauf des Versuches N12 (rot) und N13 (grün) der Screening-Experimente zur Optimierung der Bindung des Zielproteins P-D1M1 an Chelating Sepharose™ Fast Flow mit immobilisierten Cu^{2+} -Ionen. **b** veranschaulicht die Chromatogramme der Experimente N4 (rot) und N15 (grün) der Versuchsläufe des Screenings zur Optimierung der Bindung des Zielproteins D1M1-His an Chelating Sepharose™ Fast Flow mit immobilisierten Ni^{2+} -Ionen.

Die Abbildung zeigt den Verlauf des Absorptionssignals A_c sowie die SDS-PAGE-Analyse der Eluatsfraktionen e1 und e2. Versuchsläufe mit geeigneten Faktoreinstellungen der IMAC-Aufreinigung sind grün gekennzeichnet. Das Chromatogramm mit ungeeigneten Faktoreinstellungen der IMAC ist rot dargestellt. Abb. 5.12 a veranschaulicht Experimente der P-D1M1-Aufreinigung und Abb. 5.12 b die Chromatogramme der D1M1-His-Aufreinigung.

Tab. 5.7 fasst die Parameter und Ergebnisse der Gütekriterien nach Gl. (4.14) und Gl. (4.15) der in Abb. 5.12 dargestellten Experimente zusammen.

Tab. 5.7: Faktoreinstellungen und Gütekriterien ausgewählter IMAC-Experimente

Faktor	Einstellung		P_{Pie2C}	Y_{PIC}	P_{Pie2C}	Y_{PIC}	
Abb. 5.12 a.	N12	N13	N12		N13		
P-D1M1	pH _c	8.5	6	38.0*	67.0*	82.0*	91.0*
	C _{NaClC}	0.9	0.5 M				
	C _{Imie1C}	0	20 mM				
	F _{V_{SaC}}	2.5	2.5 mlmin ⁻¹				
	F _{V_{SyC}}	0.5	0.5 mlmin ⁻¹				
Abb. 5.12 b.	N4	N15	N4		N15		
D1M1-His	pH _c	9.5	5.5	47.7*	79.8*	90.1*	24.7*
	C _{NaClC}	1.0	1.0 M				
	C _{Imie1C}	5	40 mM				
	F _{V_{SaC}}	5.0	5.0 mlmin ⁻¹				
	C _{Imie2C}	250	100 mM				

* Angaben in %

In den Chromatogrammen ist deutlich eine Absorptionserhöhung bei einem Volumen von 40 ml zu erkennen. Die SDS-PAGE-Ergebnisse dieser Fraktionen (e1) zeigen lediglich schwache Proteinbanden. Ab einem Volumen von 60 ml eluieren niedermolekulare Substanzen von der Desalting-Säule und erzeugen eine Erhöhung des Absorptionssignals bis zur Beendigung der Methode bei einem Volumen von a 132 ml bzw. b 174 ml. Von dem genannten Volumen an wird die IMAC-Säule mit BB equilibriert. Anschließend erfolgt die Probenaufgabe des Eluates e1, wodurch die Absorptionserhöhung bei einem Volumen von a 174 ml bzw. b 225 ml erzeugt wird. Diese Erhöhung resultiert vermutlich durch ungebundene Proteine in der Eluatsfraktion e1 und wird im Chromatogramm als Durchbruch (bt) gekennzeichnet. Nachfolgend wird die Säule mit BB gewaschen, wodurch schwach oder unspezifisch gebundene Proteine aus der Säule entfernt werden. Um die Elution der gebundenen Proteine einzuleiten, wurde eine isokratische Elution mit BE ab einem Volumen von a 227 ml bzw. b 285 ml induziert.

Die Intensität der Absorptionserhöhung der Eluatsfraktion e2 bei einem Volumen von a 235 ml bzw. b 290 ml zeigt ausgeprägte Unterschiede. Bei der Elution des Zielproteins P-D1M1 ist ein Unterschied der Absorptionsmaxima um Faktor 7 erkennbar (Abb. 5.12 a). Die SDS-PAGE-Analyse der Eluatsfraktionen e2 des in rot gekennzeichneten Chromatogramms verdeutlicht die starke Verunreinigung dieser Fraktion.

Die Betrachtung der Eluatsfraktion e2 des Zielproteins D1M1-His führt zu einer Differenz in den Absorptionsmaxima von Faktor 9. Die Verunreinigungen sind ebenfalls in der dazugehörigen SDS-PAGE-Analyse deutlich zu erkennen.

Im Gegensatz zu den Eluaten e2 der in rot gekennzeichneten Chromatogramme zeigen die in grün gehaltenen Eluate e2 nur geringe Nebenbanden in der SDS-PAGE. Dieses Ergebnis zeigt sich ebenfalls in der densitometrischen Bestimmung der Produktreinheit P_{Pie2C} (vgl. Tab. 5.7).

Die Produktreinheit konnte durch Variation der Faktoren von a 38.0 auf 82.0 % bzw. b 47.7 auf 90.1 % erhöht werden. Die Ausbeute Y_{P1C} des Zielproteins P-D1M1 wurde durch die gewählten Faktoreinstellungen ebenfalls positiv beeinflusst. Ein Anstieg von 67.0 auf 91.0 % konnte nachgewiesen werden. Bei der Ausbeute des Produktes D1M1-His Y_{P3C} kam es zu einer Reduktion von 79.8 auf 24.7 %.

Die präsentierten Ergebnisse zeigen das Optimierungspotential der chromatographischen Aufreinigung durch die gewählten Variationen der Faktoreinstellungen zusammengefasst in Tab. 5.7.

Die Identifikation kritischer Einflussfaktoren der IMAC-Aufreinigung sowie die mathematische Beschreibung der Faktoreinflüsse auf die Qualitätskriterien und die damit verbundene Ermittlung eines optimalen Arbeitspunktes nach Kap. 4.7 werden im nachfolgenden Kapitel vorgestellt.

5.2.3 Ermittlung des optimalen Arbeitspunktes mit Hilfe der SVP

Die Ermittlung kritischer Prozessparameter sowie die Bestimmung eines optimalen Arbeitspunktes der chromatographischen Aufreinigung mit Hilfe der IMAC stehen im Mittelpunkt des vorliegenden Kapitels.

Im Folgenden werden für die Zielproteine P-D1M1 und D1M1-His jeweils eine Optimierungsprozedur mit einem Screening nach kritischen Prozessparametern, eine Optimierung mit Ermittlung des optimalen Arbeitspunktes sowie ein Robustheitstest zur Validierung des festgelegten Arbeitspunktes nach Kap. 4.7 vorgestellt.

Zu Beginn der Analyse steht die Prüfung der Rohdaten. Die ermittelten Qualitätskriterien Reinheit des Produktes $P_{P_{1e2C}}$ und Ausbeute des Prozesses $Y_{P_{1C}}$ werden auf Eignung für eine statistische Analyse betrachtet.

Der in Abb. 5.13 gezeigte Boxplot demonstriert die Streuung der kalkulierten Qualitätskriterien Reinheit des Zielproduktes P-D1M1 (schwarz) und Ausbeute der Aufreinigung (rot) der Teilschritte Screening, Optimierung und Robustheitstest der Optimierungsprozedur.

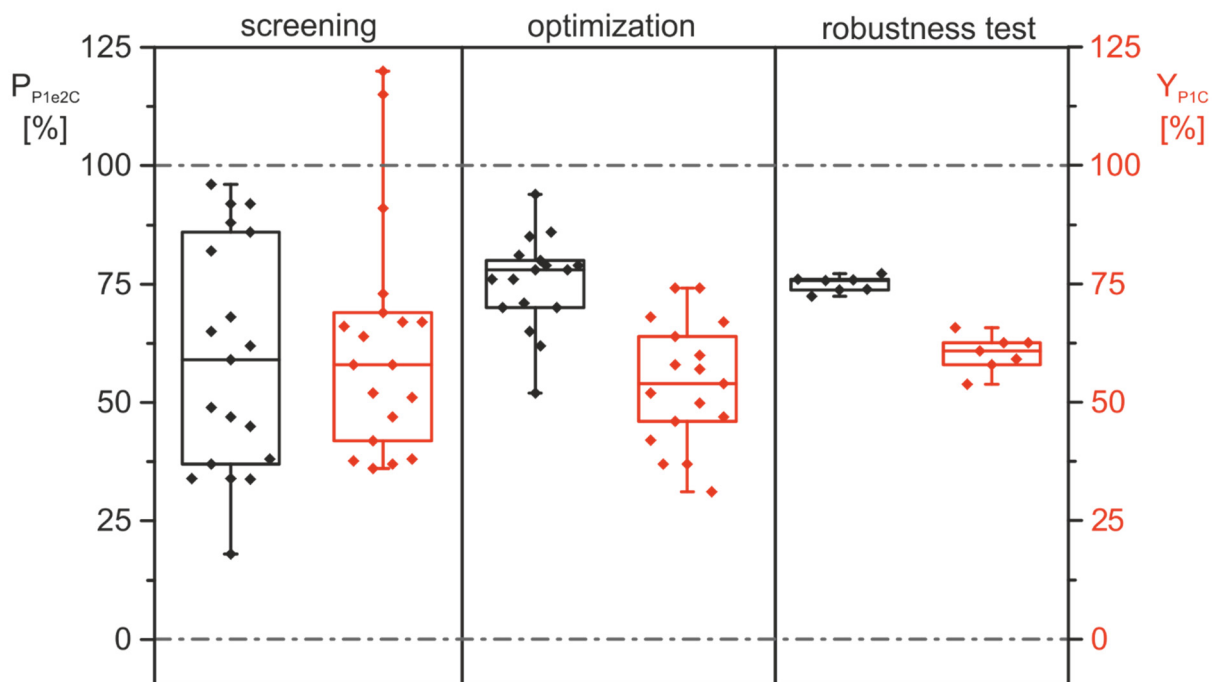


Abb. 5.13: Boxplot der Rohdaten aus der IMAC-Optimierungsprozedur von P-D1M1. Die Abbildung veranschaulicht die Streuung der Ergebnisse der Qualitätskriterien Reinheit des Zielproteins P-D1M1 $P_{P_{1e2C}}$ (schwarz) und der Ausbeute $Y_{P_{1C}}$ (rot) für die durchgeführten Schritte Screening, Optimierung und Robustheitstest.

Der dargestellte Boxplot zeigt die Messwertverteilung der Datensätze des Screenings, der Optimierung und des Robustheitstestes. Bei der Interpretation ist zu beachten, dass die Schritte der Optimierungsprozedur aufeinander aufbauend durchgeführt wurden. Nach jedem Schritt der Prozedur erfolgten eine Regressionsanalyse sowie eine Beurteilung der erstellten Modelle.

Tab. 5.8 fasst die Rohdatenanalyse der Optimierungsprozedur für das Zielprotein P-D1M1 zusammen.

Tab. 5.8: Rohdatenanalyse – Optimierungsprozedur IMAC des Zielproteins P-D1M1

Datensatz	Gütekriterium	NV	Ausreißer	Median [%]	IQR [%]
Screening	Reinheit	ja	nein	59.0	49.0
	Ausbeute	nein	-	59.0	27.1
Optimierung	Reinheit	ja	nein	78.0	10.0
	Ausbeute	ja	nein	54.0	18.0
Robustheitstest	Reinheit	ja	nein	75.7	2.4
	Ausbeute	ja	nein	57.9	4.7

Der generierte IQR sinkt im Verlaufe der Prozedur vom Screening mit 49.0 bzw. 27.1 % über die Optimierung mit 10.0 bzw. 18.0 % bis hin zum Robustheitstest mit 2.4 bzw. 4.7 %. Der Grund für die geringer werdende Streuung der Messwerte ist die Einschränkung des Untersuchungsraumes vom Screening über die Optimierung zum Robustheitstest. Die Übersicht der Boxplots verdeutlicht darüber hinaus die Tendenz der Qualitätskriterien zum oberen Quartil der Experimente des Screenings, was einer geeigneten Auslegung der Optimierungsprozedur und damit des IMAC-Prozesses entspricht. Mit Ausnahme des Datensatzes der Ausbeute aus dem Screening lagen die Messwerte normalverteilt vor. In den Datensätzen konnte zudem kein Ausreißer identifiziert werden.

Die Rohdatenanalyse der Aufreinigung des Zielproteins D1M1-His durch Ni²⁺-IMAC wird in Tab. 5.9 dargestellt.

Tab. 5.9: Rohdatenanalyse – Optimierungsprozedur IMAC des Zielproteins D1M1-His

Datensatz	Gütekriterium	NV	Ausreißer	Median [%]	IQR [%]
Screening	Reinheit	nein	-	77.7	28.5
	Ausbeute	ja	nein	48.9	42.5
Optimierung	Reinheit	nein	-	86.8	4.9
	Ausbeute	ja	ja / N7	46.3	9.4
Robustheitstest	Reinheit	ja	nein	87.0	3.1
	Ausbeute	ja	nein	65.5	7.0

Die Messwertverteilung veranschaulicht der Boxplot der Datensätze aus dem Screening, der Optimierung und des Robustheitstestes der D1M1-His-Aufreinigung in Abb. 5.14.

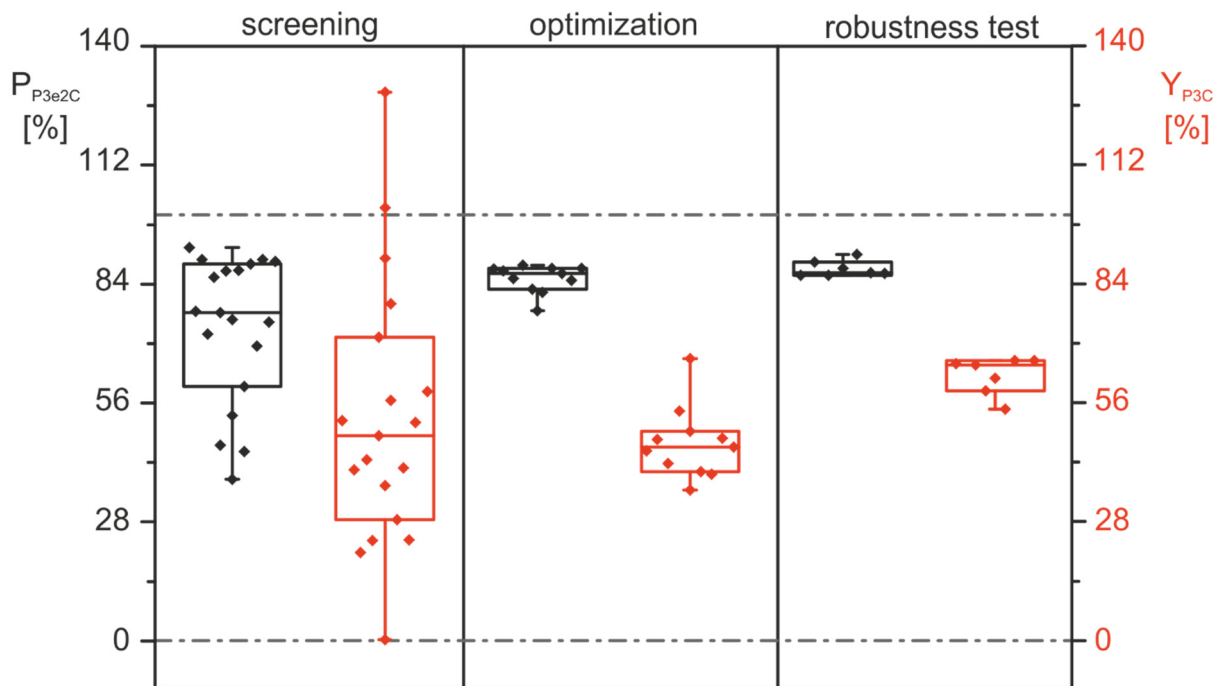


Abb. 5.14: Boxplot der Rohdaten aus der IMAC-Optimierungsprozedur von D1M1-His. Die Abbildung veranschaulicht die Streuung der Ergebnisse der Qualitätskriterien Reinheit des Zielproteins D1M1-His P_{P3e2C} (schwarz) und der Ausbeute Y_{P3C} (rot) für die durchgeführten Schritte Screening, Optimierung und Robustheitstest.

Aufgrund der Einschränkung des Versuchsraumes nimmt die Streuung der Messwerte vom Screening, mit einem IQR von 28 bzw. 42.5 %, zur Optimierung mit 4.9 bzw. 9.4 % stark ab. Die Datensätze der Produktreinheit und der Ausbeute zeigen eine Optimierung der Qualitätskriterien in Richtung des oberen Quartils der Screening-Experimente, was ebenfalls für eine geeignete Auslegung der Experimente und des Aufreinigungsprozesses spricht.

Eine NV der Messwerte innerhalb der Datensätze der Reinheit des Screenings sowie der Optimierung war nicht gegeben. Zudem ist eine Häufung der Messwerte an den Grenzen des oberen Quartils der Produktreinheit zu erkennen. Dies kann gleichermaßen als ein Indiz für nicht normalverteilte Messwerte gewertet werden. Das Ergebnis der Ausreißerprüfung nach Grubbs identifizierte in dem Datensatz der Ausbeute in der Optimierung einen Ausreißer. Das Experiment N7 wurde dennoch in der Modellbildung verwendet, da hiermit eine Verbesserung der Modellgüte erzielt werden konnte.

Die Regressionsanalyse nach Kap. 4.7.6 wurde mit normalverteilten Datensätzen durchgeführt. Die erstellten Modelle wurden anschließend auf die nicht normalverteilten Datensätze projiziert.

Abb. 5.15 zeigt die Konturenverläufe der erstellten Interaktionsmodelle im definierten Versuchsraum der Screening-Experimente.

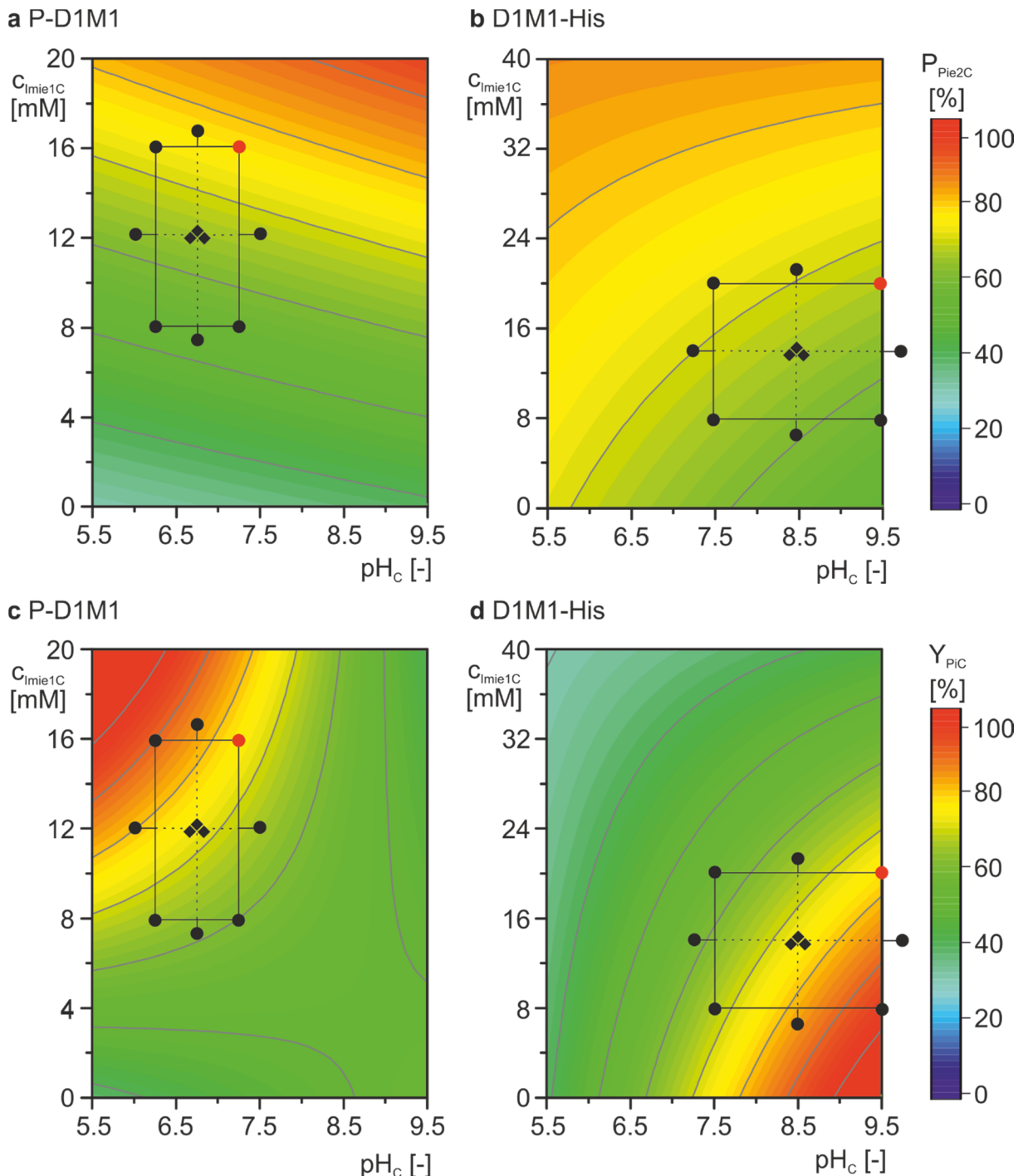


Abb. 5.15: Konturenverlauf der IMAC Screeningmodelle mit Auslegung des Optimierungsgebietes. Konturenverläufe der erstellten Screeningmodelle des Gütekriteriums **a** Produktreinheit P-D1M1 P_{Pie2C} , **b** Produktreinheit D1M1-His P_{P3e2C} , **c** Ausbeute des Zielproteins P-D1M1 Y_{P1C} sowie **d** D1M1-His Ausbeute Y_{P3C} . Das schwarze Rechteck begrenzt den Faktoreinstellungsbereich der Optimierung. Schwarze Kreise stellen die Experimente der Optimierung dar. Der rote Kreis kennzeichnet die mit der Optimizer-Funktion ermittelten optimalen Faktoreinstellungen. Die Rauten markieren die Faktoreinstellungen der CP-Experimente der Optimierung. Zur Visualisierung der Konturplots des Produktes P-D1M1 wurde die Flussrate bei Probenaufnahme F_{VSaC} und des Systems F_{VSYC} auf 1 mlmin^{-1} festgelegt.

Ein lineares bzw. Interaktionsmodell ist einzig in der Lage, Tendenzen in Richtung optimaler Faktoreinstellungen aufzuzeigen.

Der Konturverlauf der Produktreinheit (Abb. 5.15 a und b) zeigt eine Erhöhung der Reinheit bei Verwendung einer höheren Imidazolkonzentrationen $c_{\text{Imidazole}}$. Tendenziell begünstigt ein höherer pH-Wert die Reinheit des Zielproteins P-D1M1. Im Gegensatz dazu scheint die Reinheit von D1M1-His bei geringeren pH-Werten erhöht zu sein.

In dem gewählten Versuchsraum von 0 bis 20 mM verbessert eine höhere Konzentration an Imidazol die Ausbeute von P-D1M1. Eine geringe Imidazolkonzentration im Untersuchungsbereich von 5 bis 40 mM steigert dahingegen die Ausbeute des Proteins D1M1-His.

Eine erhöhte Ausbeute an P-D1M1 kann bei niedrigem pH-Wert erreicht werden. Im Unterschied hierzu scheint eine Steigerung der Ausbeute von D1M1-His bei höherem pH-Wert möglich zu sein (Abb. 5.15 c und d).

Der in Abb. 5.15 rot gekennzeichnete Datenpunkt zeigt die berechneten optimalen Faktoreinstellungen nach der Nelder-Mead-Simplexmethode anhand der erstellten Screeningmodelle. Diese Methode ist besonders zur Optimierung mehrerer Gütekriterien geeignet, da eine Optimierung in diesem Fall immer einen Kompromiss darstellt. Diese ermittelten Faktoreinstellungen wurden bei der Auslegung der Optimierung als das Experiment mit den normierten Faktoreinstellungen +1 und +1 festgelegt.

Tab. 5.10 fasst die Kenngrößen der Beurteilung der Screeningmodelle zusammen.

Tab. 5.10: Kenngrößen der IMAC-Screeningmodelle

Kenngröße	P-D1M1		D1M1-His	
	Reinheit	Ausbeute	Reinheit	Ausbeute
R^2	0.955	0.958	0.390	0.761
Q^2	0.869	0.903	0.156	0.601
R^2-Q^2	0.086	0.054	0.234	0.161
MV	0.559	0.812	-0.071	0.672
RP	0.985	0.959	0.989	0.899

Die Anforderungen an ein geeignetes Modell nach Tab. 4.2 werden mit Ausnahme der D1M1-His-Reinheit erfüllt. Das erstellte lineare Modell der Produktreinheit von D1M1-His kann die Realität nicht ausreichend beschreiben. Auffällig bei der Regressionsanalyse des Modells ist die verbesserte Güte bei Addition eines quadratischen Terms der Imidazolkonzentration oder des pH-Wertes. Der Einfluss könnte durch die Erweiterung des teilfaktoriellen Versuchsplanes zu einem zentral zusammengesetzten Versuchsdesign weiter untersucht werden. Die Screeningmodelle werden in dieser Arbeit jedoch ausschließlich für die Identifikation und Bewertung kritischer Prozessparameter sowie für eine Einschränkung des Versuchsraumes verwendet. Aus diesem Grund wurde eine weitere Analyse des Modells ausgeschlossen.

Die Bewertung der Faktor-Signifikanz der P-D1M1 Aufreinigung nach Tab. 4.7 fasst Tab. 5.11 zusammen.

Tab. 5.11: Signifikanz der untersuchten Faktoren auf die Gütekriterien von P-D1M1

Gütekriterium	Faktor	Einzelfaktor	Interaktion	
		Signifikanz	Term	Signifikanz
Reinheit P_{P1e2C}	pH _C	+	x	x
	c _{NaClC}	x	x	x
	c _{Imie1C}	+++	c _{Imie1C} ·F _{Vsac}	-
	F _{Vsac}	-		
	F _{Vsyc}	+	F _{Vsyc} ·F _{Vsac}	+
Ausbeute Y_{P1C}	pH _C	-	pH _C ·c _{Imie1C}	--
	c _{NaClC}	x	x	x
	c _{Imie1C}	++	c _{Imie1C} ·F _{Vsac}	--
	F _{Vsac}	-		
	F _{Vsyc}	x	x	x

Die Imidazolkonzentration c_{Imie1C} konnte als Faktor mit der höchsten Signifikanz identifiziert werden. Eine Erhöhung der Konzentration wirkte sich positiv auf beide Qualitätskriterien aus. Zusätzlich konnte der Erhöhung des pH-Wertes pH_C eine Signifikanz zugeschrieben werden.

Die Flussrate bei Probenaufgabe F_{Vsac} besaß einen negativen Einfluss mit geringer Signifikanz auf beide Gütekriterien. Die Flussrate bei Equilibrierung, Waschen und Elution F_{Vsyc} wirkte sich dahingegen ausschließlich schwach, positiv auf die Reinheit aus.

Durch die Verwendung eines teilfaktoriellen Versuchsplanes konnte die Interaktion der Faktoren Imidazolkonzentration und Flussrate bei Probenaufgabe $c_{Imie1C} \cdot F_{Vsac}$ mit einem geringen bis mittleren, negativen Einfluss auf die Reinheit von P-D1M1 sowie auf die Ausbeute des IMAC-Prozesses nachgewiesen werden. Die Interaktion der Flussrate bei Probenaufgabe und des Systems $F_{Vsyc} \cdot F_{Vsac}$ besaß einen schwach, positiven Effekt auf die Produktreinheit. Ein negativer Einfluss der Interaktion des pH-Wertes und der Imidazolkonzentration $pH_C \cdot c_{Imie1C}$ auf die Ausbeute mit einer mittleren Signifikanz konnte nachgewiesen werden.

Ein Einfluss der Salzkonzentration c_{NaClC} im Untersuchungsbereich der Screening-Experimente konnte ausgeschlossen werden.

Tab. 5.12 fasst die Bewertung der Einflussfaktoren für die IMAC Aufreinigung des Zielproteins D1M1-His zusammen.

Tab. 5.12: Signifikanz der untersuchten Faktoren auf die Gütekriterien von D1M1-His

Gütekriterium	Faktor	Einzelfaktor	Interaktion	
		Signifikanz	Term	Signifikanz
Reinheit P_{P3e2C}	pH _C	-	X	X
	C _{NaClC}	X	X	X
	C _{Imie1C}	++	X	X
	F _{VSaC}	X	X	X
	C _{Imie2C}	X	X	X
Ausbeute Y_{P3C}	pH _C	++	pH _C ·C _{Imie1C}	--
	C _{NaClC}	X	X	X
	C _{Imie1C}	--	X	X
	F _{VSaC}	X	X	X
	C _{Imie2C}	X	X	X

Als positiver Einflussfaktor mit einer mittleren Signifikanz auf die Reinheit des Zielproteins D1M1-His wurde ebenfalls die Imidazolkonzentration c_{Imie1C} identifiziert. Auf die Ausbeute des Produktes D1M1-His konnte zusätzlich ein positiver Einfluss des pH-Wertes pH_C mit einer mittleren Signifikanz sowie ein negativer Einfluss der Interaktion zwischen dem pH-Wert und der Imidazolkonzentration $pH_C \cdot c_{Imie1C}$ mit einer gering einzuschätzenden Signifikanz nachgewiesen werden.

Der Einfluss der Salzkonzentration c_{NaClC} konnte ausgeschlossen werden und wurde aus diesem Grund in der Optimierungsphase nicht weiter betrachtet.

Die Einschränkung des Versuchsraumes sowie die Ermittlung der optimalen Faktoreinstellung erfolgten anhand der erstellten Screeningmodelle mit einer minimalen Anforderung an die Reinheit sowie Ausbeute von 60 %. Die sich daraus ergebenden Faktoreinstellungsbereiche der Optimierung sowie eine Risikobewertung der kritischen Prozessparameter sind in Tab. 5.13 zusammengefasst.

Aufgrund des nur geringfügigen Einflusses der System-Flussrate wurde eine konstante Fließmittelgeschwindigkeit von 1.5 mlmin^{-1} für die Optimierungsversuche festgelegt. Die Salzkonzentration c_{NaClC} wurde zur Stabilisierung des Proteins auf den geforderten Minimalwert von 0.7 M eingestellt (vgl. Tab. 5.5).

Die Experimente der Optimierung des Zielproteins D1M1-His wurden bei einer konstanten Flussrate von 5 mlmin^{-1} durchgeführt. Durch die Anwendung der maximal möglichen Flussrate konnte die Aufreinigung um den Faktor 10 in Bezug auf den Minimalwert von 0.5 mlmin^{-1} beschleunigt werden.

Die Salzkonzentration c_{NaCl} wurde zur Stabilisierung auf 0.4 M eingestellt. Eine Kostenminimierung konnte durch die Reduktion der Imidazolkonzentration im Elutionspuffer c_{Imie2C} auf 100 mM erreicht werden. Tab. 5.13 fasst die Einstellungsbereiche der kritischen Einflussfaktoren sowie die Risikobewertung des Einflusses der Faktoren zusammen.

Tab. 5.13: Faktoreinstellungsbereiche und Risikobewertung – IMAC-Optimierung

Einflussfaktor	Min	Max	Risikobewertung*
P-D1M1			
pH-Wert (pH_C)	6.25	7.25	++
Imidazolkonzentration (c_{Imie1C})	8	16 mM	+++
Flussrate Probe (F_{VSaC})	0.5	1.0 mlmin^{-1}	+
D1M1-His			
pH-Wert (pH_C)	5.5	9.5	++
Imidazolkonzentration Bindung (c_{Imie1C})	5.0	40.0 mM	++

*Bewertungssystem: + schwacher Einfluss
 ++ mittlerer Einfluss
 +++ starker Einfluss

Die Experimente der Optimierung wurden nach Kap. 4.7.4 mit dem in Kap. 4.7.3 vorgestellten Versuchsplan durchgeführt. Anschließend erfolgte die Rohdatendatenanalyse der Datensätze (vgl. Abb. 5.15 und 5.16, Tab. 5.8 und 5.9).

Das erstellte Regressionsmodell der Reinheit des Zielproteins P-D1M1 P_{P1e2C} ,

$$P_{\text{P1e2C}} = -3.470 + 0.606 \cdot \text{pH}_C + 0.132 \cdot c_{\text{Imie1C}} + 2.400 \cdot F_{\text{VSaC}} - 0.370 \cdot \text{pH}_C \cdot F_{\text{VSaC}} - 0.017 \cdot \text{pH}_C \cdot c_{\text{Imie1C}}, \quad (5.1)$$

spiegelt den linearen Einfluss der Faktoren pH-Wert, Imidazolkonzentration und Flussrate bei Probenaufgabe wieder. In dem verkleinerten Untersuchungsraum zeigt sich zudem eine Interaktion des pH-Wertes mit der Flussrate und der Imidazolkonzentration. Der Interaktionsterm der Flussrate und Imidazolkonzentration besitzt in dem eingeschränkten Versuchsraum keine Signifikanz.

Die P-D1M1 Ausbeute Y_{P1C} ,

$$Y_{\text{P1C}} = -5.290 + 1.486 \cdot \text{pH}_C + 0.312 \cdot c_{\text{Imie1C}} + 0.589 \cdot F_{\text{VSaC}} - 0.344 \cdot \text{pH}_C \cdot F_{\text{VSaC}} - 0.020 \cdot \text{pH}_C \cdot c_{\text{Imie1C}} - 0.061 \cdot F_{\text{VSaC}} \cdot c_{\text{Imie1C}} - 1.486 \cdot \text{pH}_C^2 - 0.006 \cdot c_{\text{Imie1C}}^2 + 0.676 \cdot F_{\text{VSaC}}^2, \quad (5.2)$$

kann durch die linearen und quadratischen Einflüsse des pH-Wertes, der Imidazolkonzentration und der Flussrate bei Probenaufgabe sowie den Interaktionstermen der Flussrate mit dem pH-Wert und der Imidazolkonzentration sowie der Interaktion des pH-Wertes mit der Imidazolkonzentration beschrieben werden.

Das erstellte Regressionsmodell der D1M1-His Reinheit P_{P3e2C} ,

$$P_{P3e2C} = 0.676 + 0.002 \cdot \text{pH}_C + 0.024 \cdot c_{\text{Imie1C}} - 0.001 \cdot c_{\text{Imie1C}}^2, \quad (5.3)$$

beschreibt den linearen Einfluss der Imidazolkonzentration und des pH-Wertes sowie einen quadratischen Zusammenhang der Imidazolkonzentration.

Die Ausbeute von D1M1-His Y_{P3C} ,

$$Y_{P3C} = -2.393 + 0.771 \cdot \text{pH}_C - 0.050 \cdot c_{\text{Imie1C}} - 0.045 \cdot \text{pH}_C^2 - 0.002 \cdot c_{\text{Imie1C}}^2, \quad (5.4)$$

wird durch die linearen und quadratischen Terme des pH-Wertes und der Imidazolkonzentration beschrieben.

Abb. 5.16 zeigt die *response surface*- und *sweet spot*-Plots der vorgestellten Modelle der Optimierung.

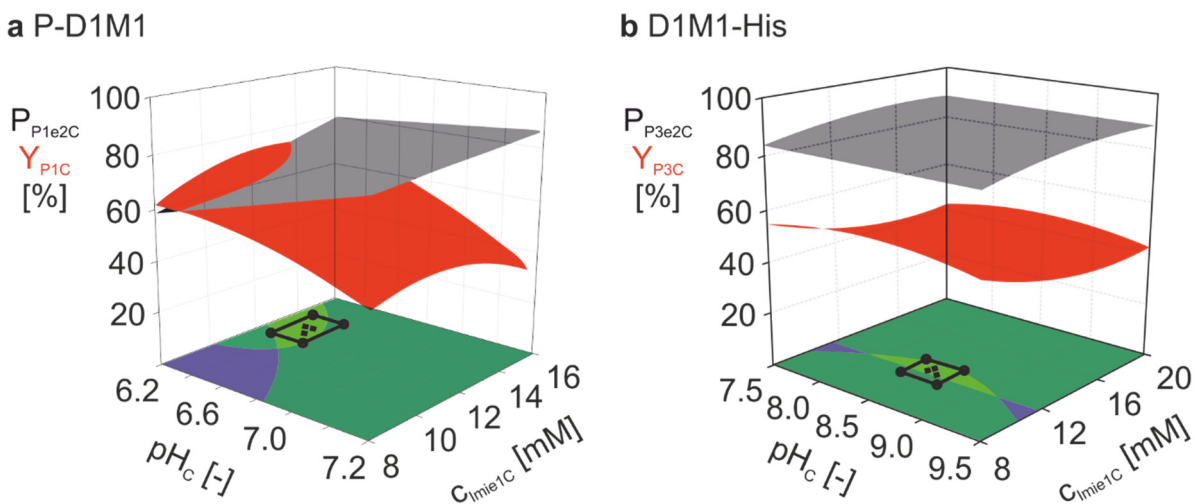


Abb. 5.16: Response surface- und sweet spot-Plot der Optimierung zur Aufreinigung der Zielproteine P-D1M1 und D1M1-His mit Hilfe der IMAC. a zeigt die Optimierung des Zielproteins P-D1M1. b veranschaulicht die Resultate der Optimierung des Produktes D1M1-His. In schwarz dargestellt ist die Produktreinheit P_{P1e2C} . Die rote Fläche zeigt die Ausbeute des Prozesses Y_{P1C} . In der x-y-Ebene ist der *sweet spot*-Plot zu erkennen. Die in blau gekennzeichnete Fläche veranschaulicht den Bereich, in dem keines der Optimierungskriterien erfüllt ist. Dunkelgrün demonstriert den Bereich, in dem ein Kriterium erfüllt wird. In dem hellgrün gekennzeichneten Bereich werden beide Optimierungskriterien erfüllt. Optimierungskriterien: a. $P_{P1e2C} > 70 \%$, $Y_{P1C} > 70 \%$; b. $P_{P3e2C} > 86 \%$, $Y_{P3C} > 48 \%$. Das schwarze Rechteck begrenzt den Faktoreinstellungsbereich des Robustheitstestes. Schwarze Kreise stellen die Experimente des Robustheitstestes dar. Die Flussrate bei Probenaufgabe F_{VSaC} wurde für die Darstellung a. auf 0.75 mlmin^{-1} festgelegt.

Die Überschneidungsfläche der Qualitätskriterien der IMAC Aufreinigung von P-D1M1 ist deutlich zu erkennen (Abb. 5.16 a.). Der gegenläufige Verlauf der Qualitätskriterien zeichnet sich hingegen bei der Aufreinigung des Produktes D1M1-His nur im geringen Maße ab.

Die Kenngrößen zur Beurteilung der Optimierungsmodelle fasst Tab. 5.14 zusammen.

Tab. 5.14: Kenngrößen der IMAC-Optimierungsmodelle

Kenngröße	P-D1M1		D1M1-His	
	Reinheit	Ausbeute	Reinheit	Ausbeute
R ²	0.894	0.968	0.930	0.957
Q ²	0.736	0.770	0.845	0.817
R ² -Q ²	0.158	0.198	0.085	0.140
MV	0.700	0.629	0.353	0.691
RP	0.935	0.975	0.991	0.966

Die Anforderungen an ein geeignetes Modell nach Tab. 4.2 werden im vollen Umfang erfüllt. Die erstellten Modelle können somit für eine präzise Voraussage weiterer Experimente genutzt werden.

Für die Ermittlung optimaler Faktoreinstellungen zur Aufreinigung von P-D1M1 wurden die Optimierungskriterien Produktreinheit $P_{P1e2C} > 70\%$ und Ausbeute $Y_{P1C} > 70\%$ festgelegt. Die Optimierungskriterien der Aufreinigung von D1M1-His wurden für die Produktreinheit R_{P3e2C} mit $> 48\%$ und mit $> 86\%$ für die Ausbeute Y_{P3C} gewählt. Innerhalb des sich daraus resultierenden Bereiches befindet sich das ermittelte Optimum der Faktoreinstellungen (Abb. 5.16, hellgrüner Bereich).

Die mit der Optimizer-Funktion bestimmten Faktoreinstellungen der kritischen Prozessparameter sowie die Einstellungen der nicht signifikanten Faktoren sind in Tab. 5.15 zusammengefasst.

Tab. 5.15: Faktoreinstellungen des optimalen Arbeitspunktes der IMAC-Aufreinigung

Einflussfaktor	Optimum
P-D1M1	
pH-Wert (pH _C)	6.4
Imidazolkonzentration (C _{Imie1C})	13 mM
Flussrate Probe (F _{Vsac})	0.75 mlmin ⁻¹
Salzkonzentration (C _{NaClC})	0.7 M
Flussrate System (F _{Vsyc})	1.5 mlmin ⁻¹
D1M1-His	
pH-Wert (pH _C)	8.5
Imidazolkonzentration Bindung (C _{Imie1C})	12 mM
Salzkonzentration (C _{NaClC})	0.40 M
Flussrate Probe (F _{Vsac})	5.00 mlmin ⁻¹
Imidazolkonzentration Elution (C _{Imie2C})	100 mM

Die Faktoreinstellungen des optimalen Arbeitspunktes wurden als CP-Experimente des Robustheitstestes festgelegt. Innerhalb des Robustheitstestes wurde der pH-Wert um ± 0.1 Einheiten und die Imidazolkonzentration C_{Imie1C} um ± 1 mM variiert.

Im Untersuchungsbereich des Robustheitstestes ergab sich kein signifikanter Einfluss der Faktoren auf die Qualitätskriterien des Prozesses. Der Streuungsbereich ist anhand des IQR als gering zu bewerten (vgl. Tab. 5.8 und 5.9). Innerhalb des definierten Bereiches kann daher eine robuste Aufreinigung der Zielproteine P-D1M1 und D1M1-His gewährleistet werden.

Gesamt betrachtet ist der Einfluss der Faktoren im Untersuchungsbereich der Aufreinigung von D1M1-His mit Ni^{2+} -IMAC im Gegensatz zur Cu^{2+} -IMAC Aufreinigung von P-D1M1 als gering einzuschätzen. Dieses Verhalten zeigt sich in der Boxplot-Darstellung anhand der geringen Streuung der Messwerte sowie in der Signifikanz-Analyse der Einflussfaktor anhand der Screeningmodelle.

Mit Hilfe der Optimierungsprozedur konnte die Reinheit von P-D1M1 auf 75.7 ± 2.4 % und die Ausbeute der Cu^{2+} -IMAC auf 57.9 ± 4.7 % gesteigert werden. Die optimierte Aufreinigung durch Ni^{2+} -IMAC führte zu einer Reinheit von D1M1-His von 87.0 ± 3.1 % und zu einer Ausbeute von 65.5 ± 7.0 %.

5.2.4 Proteolytische Aktivität nach Cu^{2+} - und Ni^{2+} -IMAC

Die Stabilitätsbetrachtungen der Zielproteine zeigten ein unterschiedliches Degradationsverhalten in den Kulturüberständen und in wässrigen Puffersystemen (Kap. 5.1). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der Grund für die Stabilität des Proteins D1M1-His auf der Verwendung unterschiedlicher Metallchelate-Komplexe beruht.

Auf dieser Grundlage wurde der jeweilige Kulturüberstand mit Zielprotein einer Aufreinigung durch die in Kap. 4.8 beschriebene *downscale*-IMAC mit jeweils komplexierten Cu^{2+} - und Ni^{2+} -Ionen unterzogen. Anschließend erfolgte die Analyse der Eluatsfraktionen mit SDS-PAGE, Zymographie und SE-HPLC.

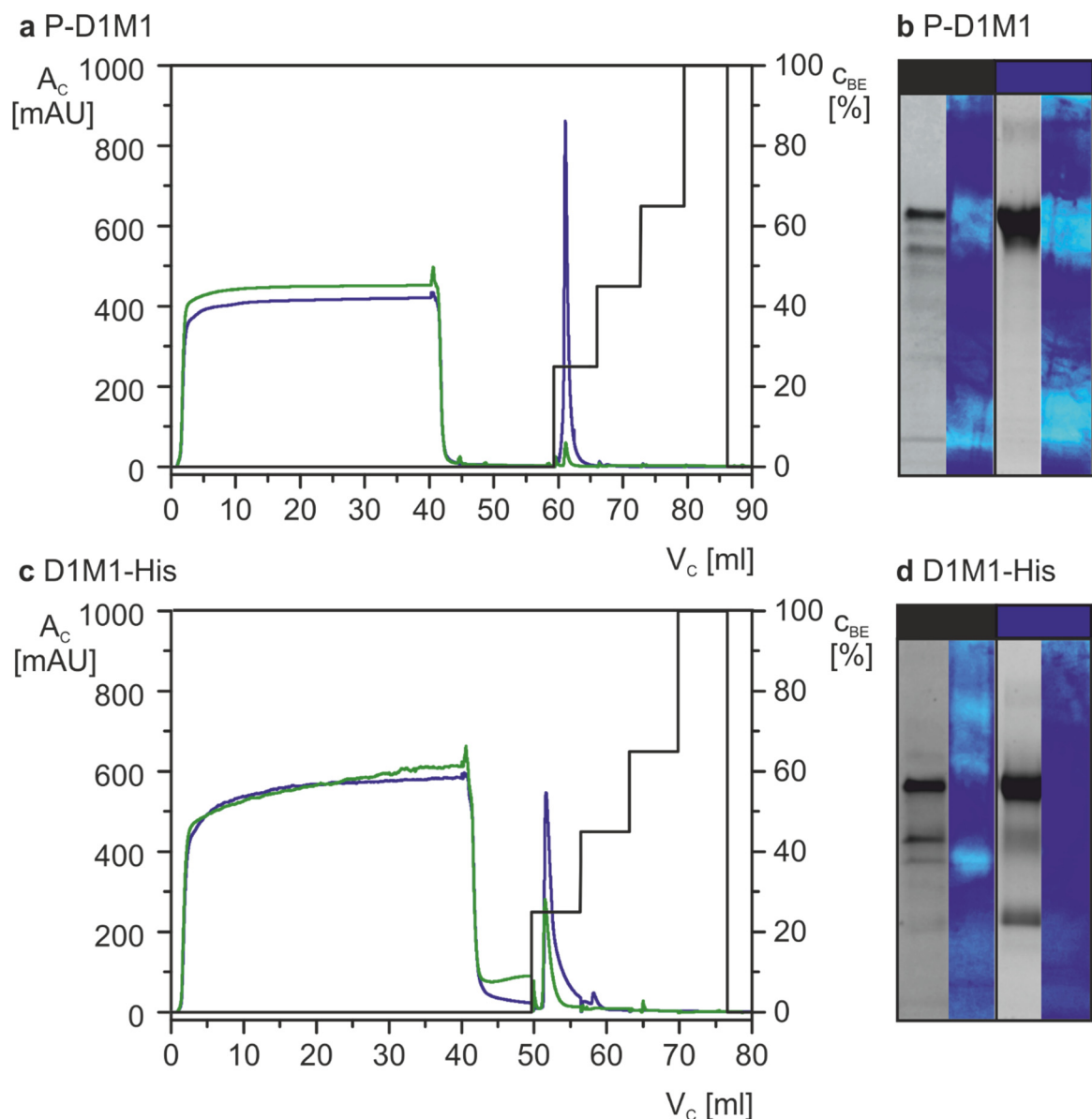


Abb. 5.17: P-D1M1 und D1M1-His-Aufreinigung mit Cu^{2+} - bzw. Ni^{2+} -IMAC und Analyse der Eluatsfraktionen. **a** P-D1M1-Aufreinigung durch IMAC mit immobilisierten Cu^{2+} -Ionen (blau) und Ni^{2+} -Ionen (grün). **b** SDS-PAGE und Zymogramm der Ausgangsprobe P-D1M1 (schwarz) und der Eluatsfraktion der Cu^{2+} -IMAC (blau). **c** D1M1-His-Aufreinigung durch IMAC mit immobilisierten Cu^{2+} -Ionen (blau) und Ni^{2+} -Ionen (grün). **d** SDS-PAGE und Zymogramm der Ausgangsprobe D1M1-His (schwarz) und der Eluatsfraktion der Cu^{2+} -IMAC (blau).

Abb. 5.17 a zeigt das Chromatogramm der Aufreinigung des Proteins P-D1M1 mit immobilisierten Cu^{2+} -Ionen (blau) und Ni^{2+} -Ionen (grün). Die Absorptionserhöhung bei Aufgabe der Ausgangsprobe in dem Volumenbereich von 2 ml bis 40 ml resultiert aus ungebundenen Substanzen des Kulturüberstandes. Die Differenz der maximalen Höhe beträgt 32 mAU. Der Abfall des Absorptionssignals ab einem Volumen von 40 ml bis 45 ml folgt aus der Umstellung der Fließmittels auf BB. In dieser Phase werden unspezifisch gebundene Proteine aus der Säule ausgewaschen. Ab einem Volumen von 60 ml wurde die Stufenelution (25 %, 45 %, 65 % und 100 % BE) für jeweils 5 CV durchgeführt. Deutlich ist der Absorptionspeak der Cu^{2+} -IMAC (blau) bei einem Volumen V_c von 61.4 ml mit einer maximalen Höhe von 862 mAU zu erkennen. Der Elutionspeak der Ni^{2+} -IMAC (grün) ist mit einer maximalen Höhe von 60 mAU um den Faktor 14 geringer.

Die Differenz kann durch die lokale Anordnung der zur Bindung nötigen Aminosäurereste an der Oberfläche von P-D1M1 erklärt werden (vgl. Kap. 3.2.4.1). Eine Bindung an Ni^{2+} -Chelatkomplexen erfordert eine Abfolge von mind. zwei aufeinanderfolgenden Histidinen in der Primärstruktur des Proteins. Die Aminosäuresequenz von P-D1M1 weist 20 Histidine auf, wovon acht in der Prodomäne des Proteins lokalisiert sind. Dabei liegen die Histidine der Prodomäne jedoch nicht in direkter Abfolge vor, so dass eine Bindung an Ni^{2+} -Chelatkomplexen als unwahrscheinlich zu betrachten ist. Die Bindung geringer Mengen kann entweder durch unspezifische Wechselwirkungen mit dem Adsorbentmaterial oder durch nicht korrekte Faltung des Proteins und damit der Lokalisation zweier Histidine an der Oberfläche des Proteins erklärt werden.

Die SDS-PAGE-Analyse der Ausgangsprobe und der Eluatsfraktion der Cu^{2+} -IMAC weisen eine deutlich zu erkennende Bande bei einem MW_{cal} von 76 kDa auf (Abb. 5.17 b). Die Zymogrammgele der Proben weisen zwei deutlich zu erkennende Bereiche mit proteolytischer Aktivität auf. Die Intensität scheint in der Eluatsfraktion gegenüber der Ausgangsprobe erhöht zu sein, was für eine gleichzeitige Bindung und damit Aufkonzentrierung der Proteasen spricht.

Abb. 5.17 c veranschaulicht das Chromatogramm der D1M1-His-Aufreinigung mit immobilisierten Cu^{2+} -Ionen (blau) und Ni^{2+} -Ionen (grün). Der Durchbruch bei einem Volumen von 2 bis 40 ml zeigt einen identischen Verlauf im Anfangsbereich. Bei einem Volumen von 22 ml steigt die Absorption der Ni^{2+} -IMAC weiter leicht an, wohingegen die Absorption der Cu^{2+} -IMAC leicht abflacht. Das Auswaschen unspezifisch gebundener Proteine wurde für 10 CV mit BB durchgeführt. Die Stufenelution wurde bei einem Volumen von 50 ml eingeleitet. Der Elutionspeak bei einer Konzentration des Elutionspuffers von 25 % zeigt einen Unterschied in der maximalen Höhe von 289 mAU. Auffällig bei dem Elutionspeak der Cu^{2+} -IMAC ist das starke Tailing. Ein Grund für dieses Verhalten könnte eine Überladung der Säule sein.

Die SDS-PAGE- und Zymographie-Ergebnisse zeigen die Ausgangsprobe und die Eluatsfraktion der Cu^{2+} -IMAC (Abb. 5.17 d.). Die Ausgangsprobe zeigt in der SDS-PAGE eine Bande bei einem MW_{cal} von 59.4 kDa. In der Eluatsfraktion liegt diese Bande deutlich aufkonzentriert vor. Zusätzlich wird eine Proteinbande bei einem MW_{cal} von 24.5 kDa sichtbar, die in der Ausgangsprobe nur schwach erkennbar vorliegt.

Die Molekulargewichtsbereiche der proteolytischen Aktivität zeigen in den Zymogrammgelelen der Kulturüberstände deutliche Unterschiede. In der Eluatsfraktion des Kulturüberstandes der P-D1M1-Fermentation kann eine proteolytische Aktivität im MW-Bereich der Ausgangsprobe nachgewiesen werden. Das Zymogramm der Eluatsfraktion aus der Cu^{2+} -IMAC des D1M1-His-Kulturüberstandes zeigt dagegen keine proteolytische Aktivität. Proteasen scheinen hier keine Bindung mit dem Adsorbiermaterial einzugehen. In beiden Fällen zeigt die Ni^{2+} -IMAC-Eluatsfraktion in den Zymogrammgelelen keine Aktivität (Daten nicht gezeigt). Das unterschiedliche Bindungsverhalten der Proteasen spricht für die Existenz unterschiedlicher Proteasen in den Kulturüberständen.

Die SE-HPLC-Ergebnisse der Ausgangsproben (Abb. 5.18, schwarz) zeigen den typischen Verlauf des Absorptionssignals der in Kap. 5.1.1 gezeigten Kulturüberstände vor Inkubation (vgl. Abb. 5.3 a und b, schwarz).

Abb. 5.18 veranschaulicht die Analyse des Durchbruchs und der Eluatsfraktionen der Aufreinigung des P-D1M1-Kulturüberstandes. Die Chromatogramme der Eluatsfraktionen zeigen einen Absorptionspeak bei einer Retentionszeit von 13.1 min. Die maximale Höhe der Peaks unterscheidet sich zwischen der Cu^{2+} - und Ni^{2+} -IMAC um Faktor 20. Ein Vergleich mit den Ergebnissen aus der SDS-PAGE-Analyse ermöglicht die Zuordnung des Peaks zum Zielprotein P-D1M1.

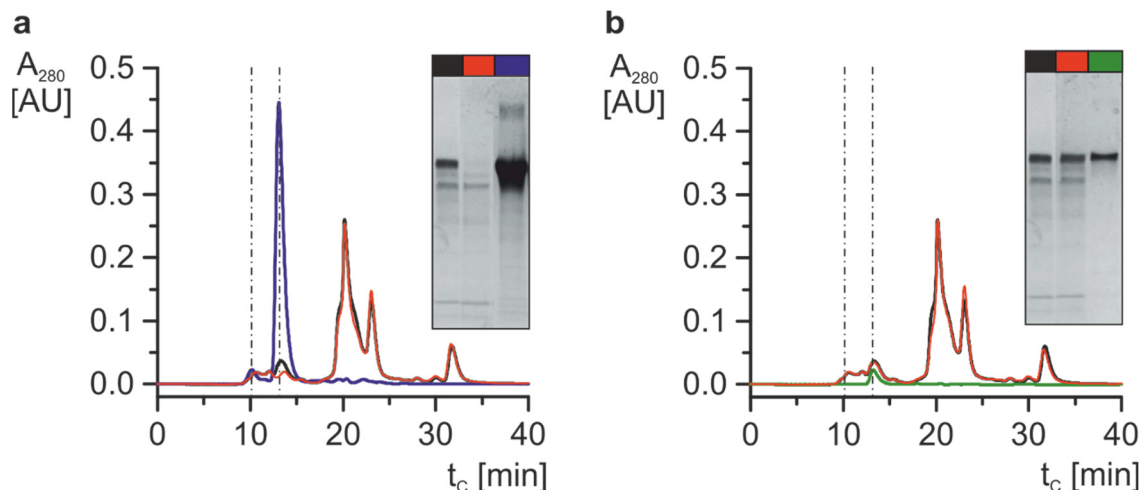


Abb. 5.18: SE-HPLC- und SDS-PAGE-Analyse der P-D1M1-Aufreinigung mit Hilfe der *downscale*-IMAC. Chromatogramme des Fermentationüberstandes JJJ1315 (schwarz), des Durchbruchs bei Probenaufgabe (rot) und der Eluatsfraktion (blau, grün). P-D1M1 Aufreinigung mit Hilfe der **a** Cu^{2+} -IMAC (blau), **b** Ni^{2+} -IMAC (grün).

Das Zymogramm zeigt in dem MW-Bereich des Zielproteins eindeutige proteolytische Aktivität, weshalb angenommen werden kann, dass der Absorptionspeak aus der Kombination der Absorption des Zielproteins und einer Protease resultiert. Zusätzlich weist das Chromatogramm der Cu²⁺-IMAC-Eluatsfraktion einen Peak bei einer Retentionszeit von 10.2 min mit einer maximalen Höhe von 0.0213 AU auf. Dieser Peak kann nicht eindeutig einer Proteinbande in der SDS-PAGE zugeordnet werden. Das Protein, welches diesen Absorptionspeak verursacht, muss ein Molekulargewicht > 80 kDa besitzen, da die Retentionszeit in der SE-HPLC um 2.9 min kürzer als die des Zielproteins P-D1M1 ist. In der SDS-PAGE ist eine Bande mit geringer Intensität bei einem kalkulierten Molekulargewicht von 156.9 kDa nachzuweisen. Diese Bande kann ein Hinweis auf eine Dimerisierung des Zielproteins sein, da diese Bande in der reduzierten SDS-PAGE nicht sichtbar ist (Daten nicht gezeigt). In dem Chromatogramm der Ni²⁺-IMAC ist dieser Peak nicht nachweisbar.

Für eine weitere Untersuchung des nicht identifizierten Peaks im Chromatogramm wurden EBA Cu²⁺-IMAC-Eluate, in denen nachweislich eine Degradation des Zielproduktes stattfand, mit Hilfe einer Ultra-/Diafiltration (MWCO = 30 kDa) um den Faktor 10 aufkonzentriert und in den BB der *downscale*-IMAC überführt. Das so erhaltene Ausgangsmaterial wurde erneut mit Cu²⁺- und Ni²⁺-IMAC aufgereinigt und mit SDS-PAGE, Zymographie und SE-HPLC analysiert.

Abb. 5.19 a veranschaulicht die Aufreinigung der degradierten Ausgangslösung mit immobilisierten Cu²⁺-Ionen (blau) und Ni²⁺-Ionen (grün). Die Durchbruchspeaks bei einem Aufgabevolumen von 4 bis 40 ml unterscheiden sich in ihrer maximalen Höhe um 39 mAU. Die Absorptionserhöhung im Anfangsbereich des Durchbruchs der Ni²⁺-IMAC (grün) um ein Volumen von 2 ml ist auf einen verbleibenden Rest an BB im Schlauch der Probenpumpe zurückzuführen. Deutlich zu erkennen ist der Elutionspeak der Cu²⁺-IMAC bei einem Volumen V_C von 52 ml. Die Peakform entspricht keiner Gauß-Verteilung, weshalb die Vermutung besteht, dass mehrere Substanzen mit unterschiedlichen Bindungsverhalten diese Absorptionsänderung verursacht haben. Die isokratische Elution führte zu keiner Absorptionsänderung bei einem Volumen von 50 bis 60 ml.

Die SDS-PAGE-Analyse (Abb. 5.19 b) zeigt die nicht reduzierte und reduzierte Form der Ausgangsprobe sowie der Eluatsfraktion der Cu²⁺-IMAC. Diese zeigen ein unterschiedliches Proteinmuster. Die Banden der nicht reduzierten Form sind klar gegenüber den Banden der reduzierten Probe abgegrenzt. Dieses Verhalten spricht für eine Ausbildung von definierten Sekundärstrukturen über Disulfid-Brückenbindungen. In der nicht reduzierten SDS-PAGE der Eluatsfraktion ist keine Proteinbande zu identifizieren. Die reduzierte Form hingegen zeigt eine klar definierte Bande bei einem MW_{cal} von 13.9 kDa. In diesem MW-Bereich ist ebenfalls eine ausgeprägte proteolytische Aktivität im Eluat der Cu²⁺-IMAC nachweisbar. Zusätzlich liegt in dem MW-Bereich um 40 kDa und 70 kDa proteolytische Aktivität vor.

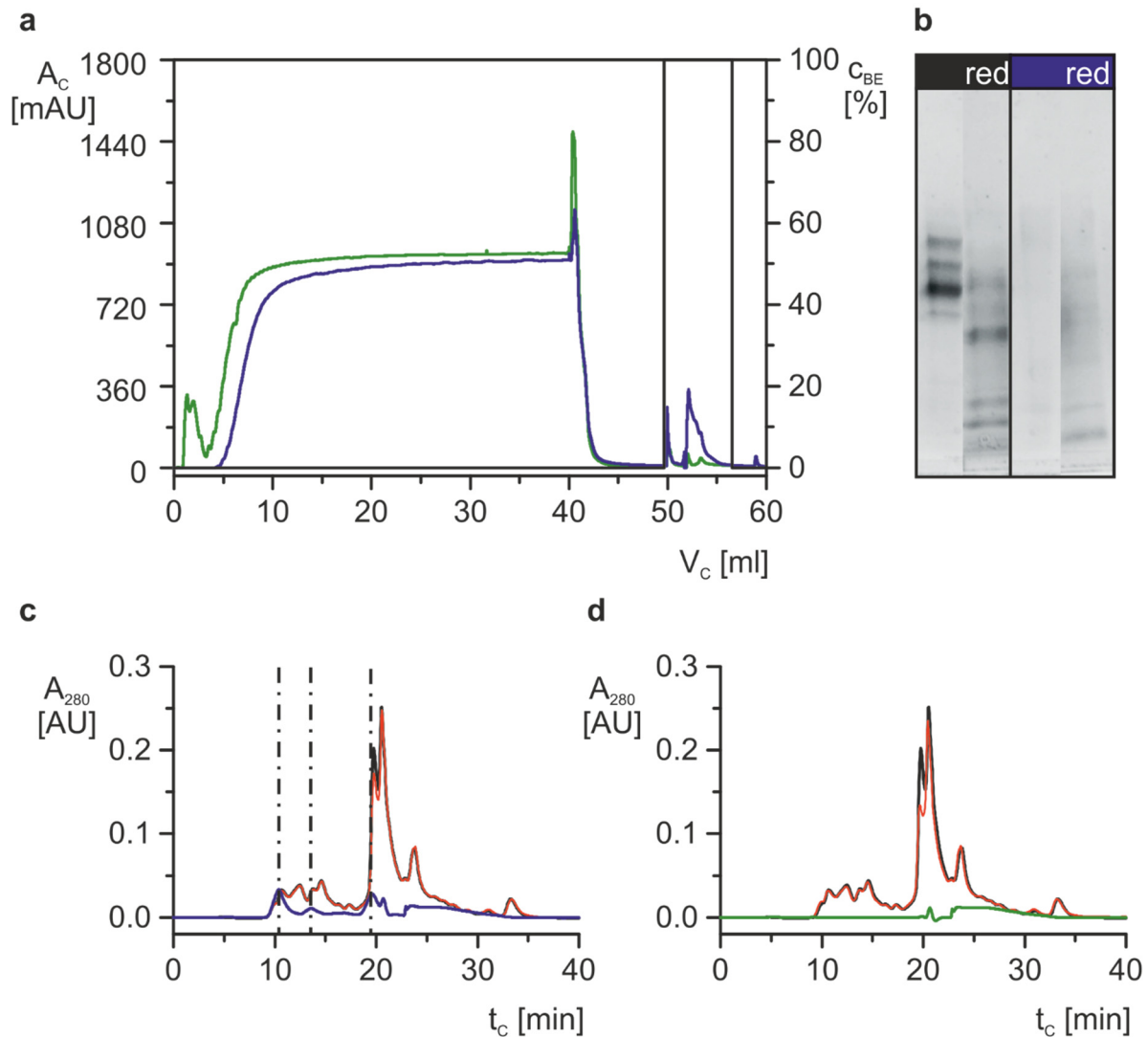


Abb. 5.19: Aufreinigung degradiertes P-D1M1-Lösung und Analyse der Aufreinigungsschritte durch SDS-PAGE und SE-HPLC. **a** zeigt die Chromatogramme der Aufreinigung mit Hilfe Cu^{2+} -IMAC (blau) und Ni^{2+} -IMAC (grün). **b** SDS-PAGE-Analyse der degradierten, aufkonzentrierten P-D1M1-Ausgangslösung und der Eluatsfraktion der Cu^{2+} -IMAC. r: Proben mit 2 % Mercaptoethanol reduziert **c** SE-HPLC-Analyse der Cu^{2+} -IMAC, **d** SE-HPLC-Analyse der Ni^{2+} -IMAC. Die SE-HPLC-Chromatogramme zeigen die Ausgangslösung (schwarz), den Durchbruch bei Probenaufnahme (rot), das Eluat der Cu^{2+} -IMAC (blau) und das Eluat der Ni^{2+} -IMAC (grün).

Die SE-HPLC-Chromatogramme des Durchbruchs (Abb. 5.19 c und d, rot) besitzen annähernd einen identischen Verlauf wie die Chromatogramme der Ausgangsproben (schwarz). Die Eluatsfraktion der Cu²⁺-IMAC (blau) zeigt drei eindeutig zu identifizierende Peaks bei einer Retentionszeit von 10.3, 13.7 und 19.7 min. In der Eluatsfraktion der Ni²⁺-IMAC (grün) ist hingegen kein Absorptionspeak ersichtlich.

Abschließend kann durch die gezeigten Analysen gezeigt werden, dass proteolytische Aktivität in der Elutionsfraktion der Cu²⁺-IMAC nachweisbar ist. Die verursachenden Proteasen binden ausschließlich an einen Cu²⁺-IDA-Komplex und gehen keine Bindung mit Ni²⁺-IDA-Komplexen ein. Daraus ist abzuleiten, dass diese Proteasen mindestens eine oberflächenständige, bindungsfähige Aminosäure besitzen.

Boden et al. (1998) beschreiben die Anwendung der Cu²⁺-IMAC in Verbindung mit molekularer Modellierung zur Lokalisation von Histidinresten an der Oberfläche von Serinproteasen. Serinproteasen zeichnen sich durch eine katalytische Triade mit einer Abfolge der Aminosäuren Histidin, Serin und Asparaginsäure aus (Iván et al., 2009), wodurch eine Bindung an den Cu²⁺-IDA-Komplex wahrscheinlich ist.

Eine weitere Einschränkung der von *P. pastoris* gebildeten Proteasen nach Tab. 3.2 ist auf der Basis der innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Analysen nicht möglich. Aufgrund dessen können sowohl vakuole Proteasen oder Proteasen des sekretorischen Weges für die Degradation der Zielproteine verantwortlich sein.

Abschließend kann dennoch festgehalten werden, dass aufgrund der ineffektiven Anreicherung der proteolytischen Aktivität mit Hilfe Cu²⁺-IMAC eine weiterführende Aufreinigung des Zielproteins P-D1M1 zwingend erforderlich ist. Das nachfolgende Kap. 5.3 beschreibt folglich die Entwicklung und Optimierung einer weiteren chromatographischen Aufreinigung nach dem *capture*-Schritt durch Cu²⁺-IMAC.

5.2.5 Zusammenfassung und der *Process Design Space* der IMAC

Innerhalb des Kapitels 5.2 wurden zunächst Methoden zur Bestimmung von Bindungskapazitäten miteinander verglichen. Die Aufnahme von Adsorptionsisothermen wurde durch den vergleichbar geringen apparativen sowie zeitlichen Aufwand zur Vorauswahl der chromatographischen Methode sowie für die Einschränkung der Materialenauswahl favorisiert.

Aus den experimentell bestimmten Adsorptionsisothermen wurden die Bindungskapazitäten und die Dissoziationskonstanten ermittelt. Diese Kriterien wurden zur Auswahl eines geeigneten Adsorbentmaterials verwendet. Innerhalb der untersuchten Materialien konnte Chelating Sepharose™ Fast Flow als ideales Adsorbens zur IMAC-Aufreinigung beider Zielproteine identifiziert werden. Als geeignete Ionen zur P-D1M1-Aufreinigung wurde Cu^{2+} und für D1M1-His Ni^{2+} identifiziert.

Mit Hilfe der Optimierungsprozedur nach Kap. 4.7 wurden durch das Screening die kritischen Prozessparameter Imidazolkonzentration und pH-Wert des Bindungspuffers sowie die Flussrate bei Probenaufgabe identifiziert. Der Einfluss auf die Gütekriterien wurde bewertet (vgl. Tab. 5.12).

Die Optimierung führte zu den in Tab. 5.14 zusammengefassten Prozessbedingungen. Mit Hilfe der ermittelten Parametereinstellungen konnte in dem Robustheitstest der Aufreinigung von P-D1M1 eine Produktreinheit P_{P1C} von $75.7 \pm 2.4 \%$ bei einer gleichzeitigen Ausbeute Y_{P1C} von $57.9 \pm 4.7\%$ erreicht werden. Unter den optimalen Prozessbedingungen der D1M1-His-Aufreinigung ergaben sich eine Produktreinheit P_{P3C} von $87.0 \pm 3.1 \%$ bei einer Ausbeute Y_{P3C} von $65.5 \pm 7.0 \%$.

Weiterführende Untersuchungen zur Abreicherung der proteolytische Aktivität nach erfolgter Aufreinigung durch Cu^{2+} - und Ni^{2+} -IMAC führten zu dem Ergebnis, dass die Proteasen in dem Fermentationsüberstand der P-D1M1-Produktion nachweislich an den Adsorber mit immobilisierten Cu^{2+} -Ionen binden. Die Proteasen des Kulturüberstandes der D1M1-His-Produktion binden dahingegen nicht an Chelating Sepharose™ Fast Flow mit immobilisierten Cu^{2+} - oder Ni^{2+} -Ionen.

Abschließend ist zu beurteilen, dass die Aufreinigung mit Hilfe Cu^{2+} -IMAC als kritisch zu betrachten ist, da die in der Kulturbrühe vorhandenen Proteasen durch diesen chromatographischen Schritt simultan mit dem Zielprodukt aufkonzentriert werden. Die Verwendung von Ni^{2+} -Ionen ist in dem Falle der Aufreinigung von P-D1M1 nicht möglich, da die Koordination der Histidinreste an der Oberfläche des Proteins nicht gegeben ist. Ein zügig durchzuführender weiterer Aufreinigungsschritt für das Zielprotein P-D1M1 ist aus diesem Grund unabdingbar und ist Gegenstand des nachfolgenden Kapitels.

5.3 Entwicklung einer weiteren chromatographischen P-D1M1-Aufarbeitung

5.3.1 Auswahl der chromatographischen Methode und des Materials

Die Charakterisierung des Zielproteins P-D1M1 zeigte die Möglichkeit der Aufarbeitung mit Hilfe der IEXC und MMC (vgl. Kap. 3.1.2). Aufgrund der Aktualität des multimodalen Ansatzes in chromatographischen Prozessen wurde in dieser Arbeit ein Vergleich zwischen der Anwendung eines typischen Ionenaustauschermaterials zu einem multimodalen Ionenaustauschermaterial angestrebt.

Ein auf das Zielprotein P-D1M1 stabilisierend wirkender pH-Wert wurde innerhalb des Kap. 5.1 ermittelt und zwischen 5.5 und 8.5 festgelegt (vgl. Tab. 5.5). Die Oberflächenladung des Proteins in dem Stabilitätsbereich ist somit negativ und damit einer Aufreinigung durch eine Anionenaustauschchromatographie (AIEXC) zugänglich.

Für die Entwicklung einer zusätzlichen chromatographischen Aufarbeitungsmethode des Zielproteins standen damit die in Tab. 4.4 dargestellten AIEXC- und MMC-Adsorber zur Auswahl.

Die Materialien wurden in einer Adsorptionsstudie hinsichtlich ihrer spezifischen Bindungskapazität an Zielprotein mit Hilfe von Langmuir-Isothermen nach Kap. 4.5.1 untersucht.

Abb. 5.20 veranschaulicht den Verlauf der aufgenommenen Adsorptionsisothermen.

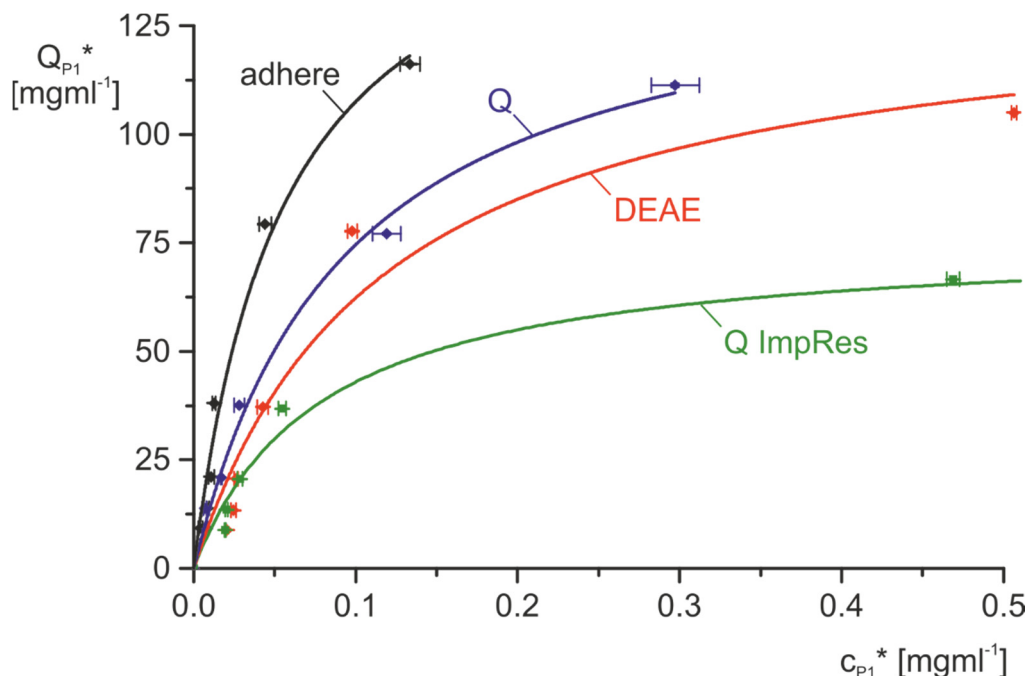


Abb. 5.20: Adsorptionsisotherme des Zielproteins P-D1M1 an unterschiedlichen AIEXC- und MMC-Materialien. Die Farben unterscheiden die verwendeten Adsorbentmaterialien. schwarz - Capto™ adhere, blau - Capto™ Q, rot - Capto™ DEAE, grün - Capto™ Q ImpRes.

Die ermittelten Parameter maximale Bindungskapazität des Zielproteins P-D1M1 Q_{P1max_stat} und die Dissoziationskonstante K_D sind in Tab. 5.16 zusammengefasst.

Tab. 5.16: Kalkulierte Parameter der Adsorption von P-D1M1 an AIEX-Adsorbentien

Adsorber	Q_{P1max_stat}	\pm	S_{QP1max_stat}	K_D	\pm	S_{K_D}
Q ImpRes	73.4	\pm	3.7 mgml ⁻¹	0.078	\pm	0.013 mgml ⁻¹
Q	143.7	\pm	8.1 mgml ⁻¹	0.093	\pm	0.013 mgml ⁻¹
DEAE	133.9	\pm	18.2 mgml ⁻¹	0.115	\pm	0.037 mgml ⁻¹
adhere	167.3	\pm	18.1 mgml ⁻¹	0.056	\pm	0.013 mgml ⁻¹

Die Isothermen der Adsorbentien Q und Q ImpRes zeigen einen stark unterschiedlichen Verlauf, was sich in den kalkulierten Parametern numerisch erfassen lässt. Wahrscheinlich resultiert dieses Ergebnis aus einer geringeren Ligandendichte an der Oberfläche des Q ImpRes-Adsorbentien. Nach Herstellerangaben (GE Healthcare Inc., 2014) beträgt die kalkulierte dynamische Bindungskapazität bei 10 % Durchbruch von Q ImpRes ca. 50 % der dynamischen Bindungskapazität des Q-Adsorbentien. Ein zusätzlicher Hinweis für diese Vermutung ist die Angabe einer abweichenden Ionenkapazität von 1.5 $\mu\text{mol Cl}^- \text{ml}^{-1}$ Medium.

Die maximale Bindungskapazität des Adsorbentien DEAE ist um 9.8 mgml⁻¹ geringer als die Bindungskapazität des Q-Adsorbentien. Kritisch zu betrachten ist die Überlappung der Fehlerintervalle der Regressionsfunktionen, weshalb die absoluten Werte nicht direkt miteinander vergleichbar sind. Nach Herstellerangaben beträgt die Abweichung der Ionenkapazität der Adsorbentien 0.13 mmol $\text{Cl}^- \text{ml}^{-1}$ Medium. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die Ligandendichte bei identischer Matrix höher ist. Diese höhere Ligandendichte führt wahrscheinlich zu einer ähnlichen maximalen Bindungskapazität bei den gewählten Bindungsbedingungen (50 mM TRIS, pH 7.5).

Der multimodale Adsorbentien adhere besitzt im Vergleich zu den weiteren Adsorbentien die höchste maximale Bindungskapazität und die geringste Dissoziationskonstante K_D . Der exakte Verlauf der Regressionsfunktion ist in dem untersuchten Bereich nicht nachzuweisen. Die Ionenkapazität ist mit 0.09-0.12 mmol $\text{Cl}^- \text{ml}^{-1}$ Medium um 7.5 $\mu\text{mol Cl}^- \text{ml}^{-1}$ Medium geringer als die Ionenkapazität des Q-Adsorbentien. Die Art der Interaktion des Adsorbentien mit dem Zielprotein P-D1M1 beruht nicht allein auf elektrostatischen Wechselwirkungen jedoch wird bei geringen Salzkonzentrationen diese Interaktion bevorzugt. Der Ligand des Adsorbentien scheint zudem die höchste Bindungsaffinität zum Zielprotein zu besitzen, was durch den geringen K_D -Wert bestätigt wird.

Die Entwicklung multimodaler Liganden zur Aufarbeitung von Bioprodukten hat in den letzten Jahren stark zugenommen, weshalb eine Untersuchung im wissenschaftlichen Fokus der derzeitigen Forschung steht. Für die Entwicklung einer zusätzlichen chromatographischen Aufreinigungsmethode für das Zielprotein P-D1M1 könnte die Verwendung des Adsorbers adhere von Vorteil sein. Das parallele Vorliegen hydrophober Regionen sowie ausgeprägter Oberflächenladungen in der Struktur von P-D1M1 deuten auf ein hohes Potential für die Ausbildung beider Interaktionsformen hin.

Nachfolgendes Kapitel veranschaulicht das Anwendungs- und Optimierungspotential des multimodalen Adsorbers adhere anhand der Variation definierter Faktoreinstellungen und den damit zusammenhängenden Einfluss auf die Gütekriterien des chromatographischen Prozesses.

5.3.2 Optimierungspotential der MMC

Das Potential der Optimierung kann anhand der quantitativ erfassbaren Gütekriterien nachgewiesen werden. Abb. 5.21 veranschaulicht dazu die Chromatogramme und SDS-PAGE-Analyse unterschiedlicher Experimente der MMC-Optimierungsprozedur nach Kap. 4.7.

Dargestellt ist der Absorptionsverlauf A_c (rot), der Verlauf des pH-Wertes pH_c (blau) und der Signalverlauf der Leitfähigkeit σ_c (grün). Die Faktoreinstellungen sowie die ermittelten Gütekriterien der in Abb. 5.21 gezeigten chromatographischen Läufe werden in Tab. 5.17 zusammengefasst.

Zunächst wird die Reproduzierbarkeit der Experimente betrachtet. Die Wiederholbarkeit der chromatographischen Läufe wird in Abb. 5.21 a durch den Verlauf der Chromatogramme der CP-Versuche veranschaulicht. In den durchgeführten Wiederholungsexperimenten der Optimierung ergab sich eine Produktreinheit P_{P1e2C} von $43.3 \pm 1.2 \%$ und eine Ausbeute Y_{P1C} von $68.3 \pm 2.8 \%$. Der identische Verlauf der Chromatogramme sowie die geringe Standardabweichung der ermittelten Gütekriterien weisen dabei auf eine hohe Reproduzierbarkeit der Experimente hin.

Abb. 5.21 b und c veranschaulichen Experimente mit unterschiedlichen Faktoreinstellungen (vgl. Tab. 5.17). Der Durchbruch (bt) sowie der Elutionspeak des multimodalen Ionenaustausches (e2) zeigen bei den gewählten Bedingungen einen unterschiedlichen Verlauf der Chromatogramme. Der Einfluss auf das Qualitätskriterium der Produktreinheit wird anhand der densitometrischen Analyse verdeutlicht.

Abb. 5.21 b zeigt das Experiment N8 der Optimierung mit Hilfe des zentral zusammengesetzten Versuchsplans. Die densitometrische Analyse ergab eine Reinheit von 42.0 %. Der geringe Absorptionsanstieg auf 14 mAU im Durchbruch sowie der hohe Elutionspeak e2 mit 957 mAU spiegeln eine Wiederfindung von 66.0 % wieder.

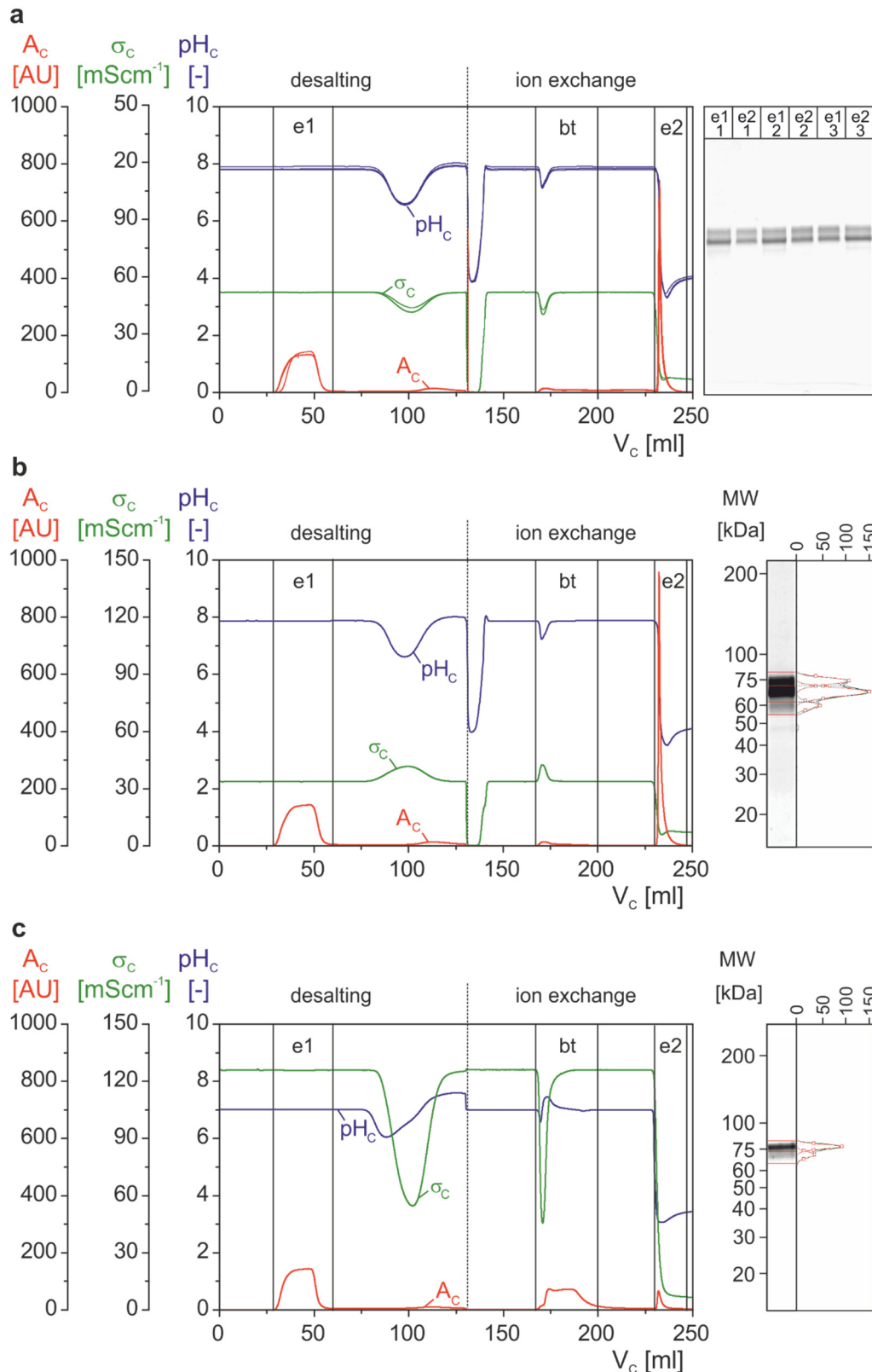


Abb. 5.21: Chromatogramme ausgewählter Versuchsläufe der MMC-Optimierung. **a** zeigt die Chromatogramme der CP-Versuche der Optimierung N9-N11. Die dazugehörige SDS-PAGE-Analyse zeigt das Bandenmuster der Eluatsfraktion des Desaltings e1 und des MMC-Eluats e2. **b** Verlauf der Chromatographie des Experimentes N8 der Optimierung mit densitometrischer Auswertung der Eluatsfraktion e2. **c** Chromatogramm des Experimentes N1 aus dem Screening mit densitometrischer SDS-PAGE-Analyse der Eluatsfraktion e2. (Auswertungssoftware: TotalLab Quant, UK)

Tab. 5.17: Faktoreinstellungen und Gütekriterien ausgewählter MMC Experimente

	Faktor	Einstellung	P_{P1e2C}	Y_{P1C}
Abb. 5.21 a.				
CP-Experimente Exp. Nr. 9-11 Optimierung	pH_{e1C}	7.85		
	c_{NaClC}	0.60 M	44.0 %	65.3 %
	pH_{e2C}	4.00	44.0 %	70.8 %
	$F_{V_{SaC}}$	8.0 mlmin ⁻¹	42.0 %	68.7 %
	$F_{V_{SyC}}$	8.0 mlmin ⁻¹		
Abb. 5.21 b.				
Exp. Nr. 8 Optimierung	pH_{e1C}	7.85		
	c_{NaClC}	0.60 M		
	pH_{e2C}	4.29	42.0 %	66.0 %
	$F_{V_{SaC}}$	8.0 mlmin ⁻¹		
	$F_{V_{SyC}}$	8.0 mlmin ⁻¹		
Abb. 5.21 c.				
Exp. Nr. 1 Screening	pH_{e1C}	7.85		
	c_{NaClC}	0.40 M		
	pH_{e2C}	3.80	82.0 %	9.5 %
	$F_{V_{SaC}}$	8.0 mlmin ⁻¹		
	$F_{V_{SyC}}$	8.0 mlmin ⁻¹		

Abb. 5.21 c zeigt das Experiment N1 des Screenings mit Hilfe eines teilfaktoriellen Versuchsplans. Die Reinheit des Zielproduktes wurde hierbei mit 82.0 % ermittelt. Innerhalb des Durchbruches (bt) ist ein Absorptionsanstieg auf 70 mAU deutlich zu erkennen. Der Elutionspeak mit einem Maximum von 67 mAU ist hierbei um Faktor 14 geringer als bei dem Optimierungslauf 8, was zu einer Wiederfindung des Zielproteins von 9.5 % führt.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass die Variation der untersuchten Faktoren im Untersuchungsbereich einen deutlichen Einfluss auf die chromatographische Aufreinigung zeigen. Der Einfluss lässt sich zudem in den Qualitätskriterien quantitativ erfassen.

Aufschlüsse über den Zusammenhang des Einflusses einzelner Faktoren sowie deren Interaktionen und quadratischen Zusammenhänge können daher im nachfolgenden Kapitel unter Verwendung der SVP näher analysiert werden.

5.3.3 Auslegung des Arbeitspunktes der MMC mit Hilfe der SVP

Die robuste Auslegung eines optimalen Arbeitspunktes sowie die Identifikation kritischer Prozessparameter der multimodalen Aufreinigung des Zielprotein P-D1M1 mit dem Adsorbens adhere ist Gegenstand des vorliegenden Kapitels.

Hierzu wurde zunächst ein teilfaktorielles Screening durchgeführt. Mit Hilfe dieser Untersuchung wurden kritische Prozessparameter identifiziert. Anschließend erfolgte die Auslegung des Arbeitspunktes durch die Optimierung mit einem zentral zusammengesetzten Versuchsplan. Abschließend wurde der definierte Arbeitspunkt in einem Robustheitstest mit Hilfe eines vollfaktoriellen Versuchsplans validiert. Die Untersuchungen erfolgten systematisch nach Kap. 4.7.

Abb. 5.22 verdeutlicht die Streuung der kalkulierten Qualitätskriterien Produktreinheit P_{P1e2C} und Ausbeute Y_{P1C} der Teilschritte Screening, Optimierung und Robustheitstest der Optimierungsprozedur.

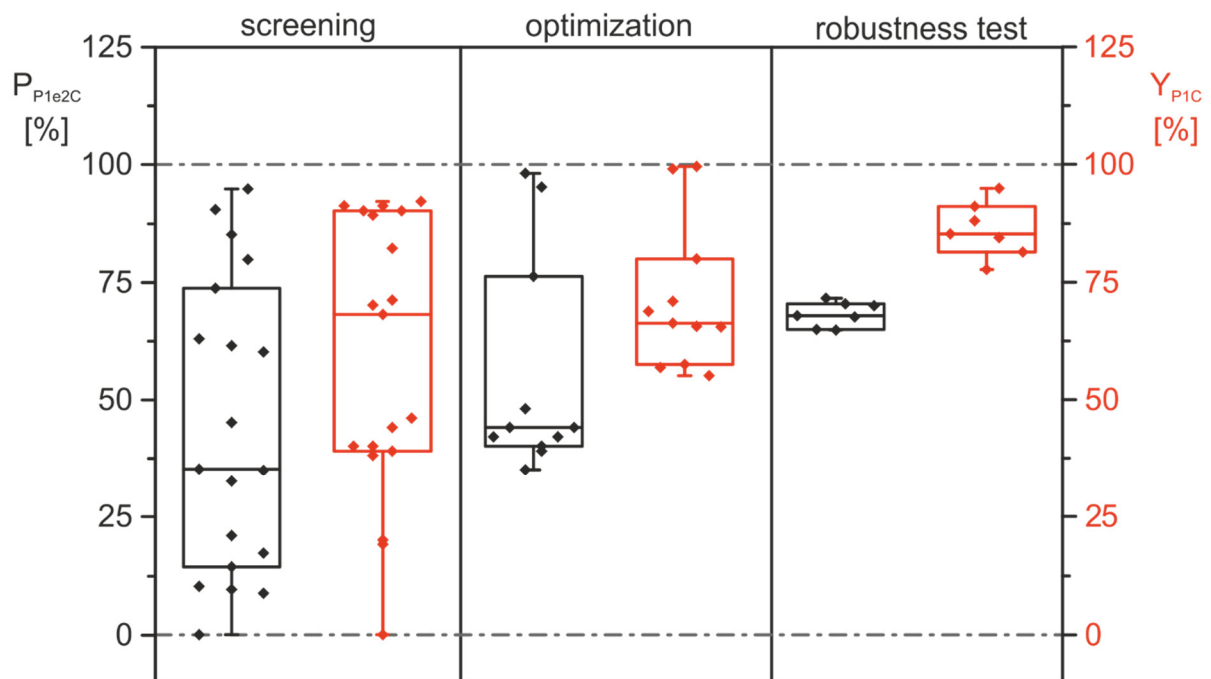


Abb. 5.22: Boxplot der Rohdaten aus der MMC-Optimierungsprozedur des Produktes P-D1M1. Die Abbildung zeigt die Streuung der Ergebnisse der Qualitätskriterien Reinheit des Produktes P_{P1e2C} (schwarz) und der Ausbeute des Prozesses Y_{P1C} (rot) für die durchgeführten Schritte Screening, Optimierung und Robustheitstest. Einzelne Ergebnisse werden in der jeweiligen Farbe als Raute dargestellt. Die Box zeigt das untere, mittlere und obere Quartil. Die Whisker kennzeichnen das Minimum und Maximum der Messwertverteilung.

Begründet durch die konzeptbedingte Verkleinerung des Versuchsraumes nimmt die Streuung der Messwerte vom Screening über die Optimierung zum Robustheitstest mit einem IQR von 59.3 % bzw. 51.0 % bis 5.4 % bzw. 9.7 % deutlich ab. Eine erfolgreiche Auslegung des Arbeitspunktes wird durch die Steigerung des Median der Qualitätskriterien Reinheit und Ausbeute des Produktes P-D1M1 von 35.1 % bzw. 68 % hin zu 67.7 % bzw. 85 % verdeutlicht.

Tab. 5.18 fasst die Rohdatenanalyse der MMC-Optimierungsprozedur zusammen.

Tab. 5.18: Rohdatenanalyse – MMC-Optimierungsprozedur des Zielproteins P-D1M1

Datensatz	Gütekriterium	NV	Ausreißer	Median [%]	IQR [%]
Screening	Reinheit	ja	nein	35.1	59.3
	Ausbeute	nein	-	68.0	51.0
Optimierung	Reinheit	nein	-	44.0	36.0
	Ausbeute	nein	-	66.1	22.4
Robustheitstest	Reinheit	ja	nein	67.7	5.4
	Ausbeute	ja	nein	85.1	9.7

Die Prüfung auf NV wurde bei den Datensätzen der Ausbeute aus dem Screening und den Datensätzen der Produktreinheit sowie der Ausbeute aus der Optimierungsprozedur zurückgewiesen. Der Boxplot in Abb. 5.23 verdeutlicht die unsymmetrische Verteilung der Messwerte in diesen Datensätzen durch die asymmetrische Länge der Whisker. Der Ausreißer-Test nach Grubbs ergab in den normalverteilten Datensätzen keinen Ausreißer.

Zur Modellbildung des Screenings wurde der normalverteilte Datensatz der Produktreinheit verwendet und das Modell anschließend auf die Ausbeute projiziert. Der Konturenverlauf der erstellten Screeningmodelle wird in Abb. 5.23 veranschaulicht.

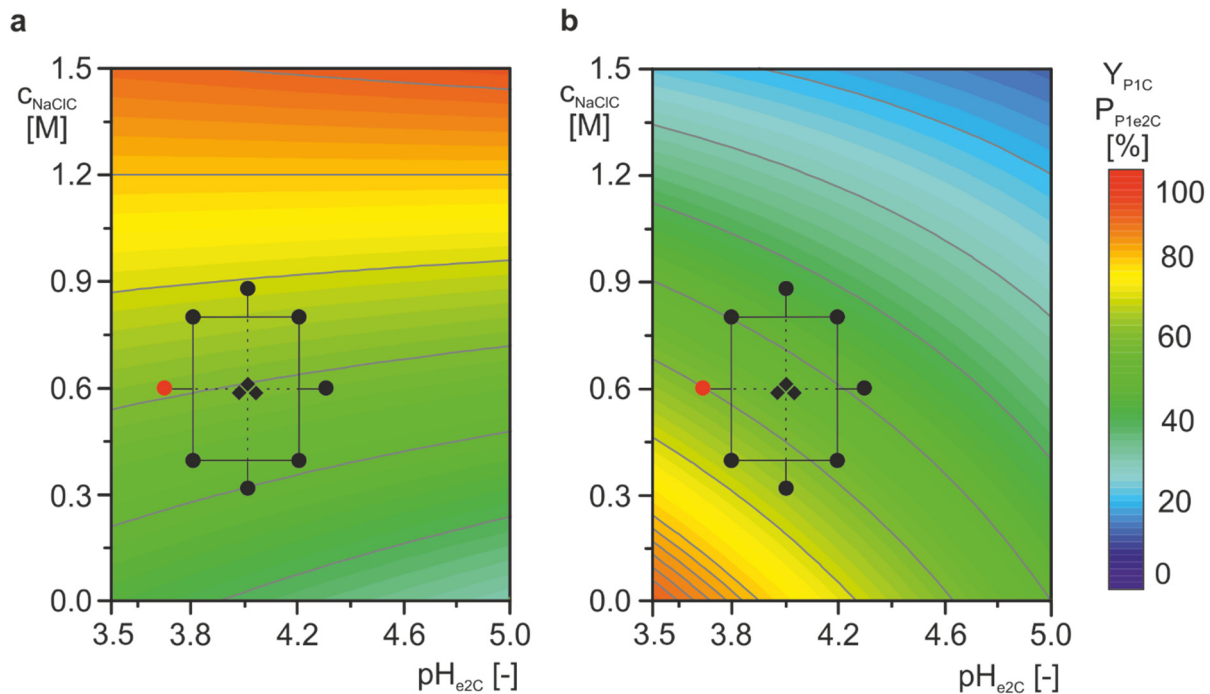


Abb. 5.23: Konturenverlauf der Interaktionsmodelle für die Aufreinigung des Zielproteins P-D1M1 mit Hilfe der MMC mit Auslegung des Optimierungsbereiches.

Gezeigt ist der Konturenverlauf der erstellten Screeningmodelle.

a Produktreinheit P_{P1e2C} ; **b** Ausbeute Y_{P1C} .

Tab. 5.19 fasst die identifizierten Einflussfaktoren sowie die Bewertung und somit die Einstufung der untersuchten Faktoren der Screeningmodelle nach Kap. 4.7.6 zusammen.

Tab. 5.19: Identifizierung und Bewertung der Einflussfaktoren auf die Qualitätskriterien

Gütekriterium	Faktor	Einzelfaktor	Interaktion	Signifikanz
		Signifikanz	Term	
Reinheit P_{P1e2C}	pH_{e1C}	x	x	x
	c_{NaClC}	+++	$c_{NaClC} \cdot pH_{e2C}$	+
	pH_{e2C}	-		
	$F_{V_{SaC}}$	x	x	x
	$F_{V_{SyC}}$	x	x	x
Ausbeute Y_{P1C}	pH_{e1C}	x	x	x
	c_{NaClC}	---	$c_{NaClC} \cdot pH_{e2C}$	+
	pH_{e2C}	--		
	$F_{V_{SaC}}$	x	x	x
	$F_{V_{SyC}}$	x	x	x

Die Auswertung des Screeningmodells der Produktreinheit P_{P1e2C} wies auf eine hohe Signifikanz des Einflussfaktors Salzkonzentration c_{NaClC} hin. Dabei wirkte sich eine Erhöhung positiv auf die Reinheit des Produktes aus. Die Interaktion zwischen der Salzkonzentration und dem pH-Wert der Elution $c_{NaClC} \cdot pH_{e2C}$ zeigte bei einer Erhöhung ebenfalls einen sich auf die Produktreinheit positiv auswirkenden Effekt mit einer geringen Signifikanz. Der pH-Wert bei Elution pH_{e2C} besaß einen schwachen, negativen Einfluss auf die Produktreinheit hin.

Eine Erhöhung der Salzkonzentration c_{NaClC} wirkte sich negativ auf die Ausbeute von P-D1M1 aus. Die Interaktion zwischen der Salzkonzentration und dem pH-Wert der Elution $c_{NaClC} \cdot pH_{e2C}$ zeigte identische Auswirkungen auf die Ausbeute Y_{P1C} , wie auf die Produktreinheit P_{P1e2C} . Zusätzlich besaß der pH-Wert der Elution pH_{e2C} einen negativen Einfluss mit mittlerer Signifikanz.

Als kritische Prozessparameter konnten somit der pH-Wert der Elution pH_{e2C} sowie die Salzkonzentration c_{NaClC} der Bindung und deren Interaktion $pH_{e2C} \cdot c_{NaClC}$ identifiziert werden.

Der Parameter mit dem stärksten Einfluss auf beide Gütekriterien war die Natriumchloridkonzentration c_{NaClC} . Wahrscheinlich wurde durch die Verstärkung des hydrophoben Effektes die Bindung des Nebenproduktes P2 verringert und damit die Reinheit des Produktes erhöht. Dies führte zudem gleichzeitig zu einer drastischen Verringerung der Ausbeute Y_{P1C} .

Der pH-Wert der Bindung pH_{e1C} besaß keinen signifikanten Einfluss auf die Gütekriterien des Prozesses. Weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass die ionischen Wechselwirkungen der quartären Ammoniumgruppe im Gegensatz zu den hydrophoben Wechselwirkungen des Phenylrings bei der Interaktion des Zielproteins P-D1M1 mit dem Liganden der stationären Phase eine untergeordnete Rolle spielte. Die bevorzugte Interaktion scheint daher die hydrophobe Interaktion zwischen Adsorber und Zielprotein zu sein.

Die nicht signifikanten Parameter wurden für die Optimierung auf konstante Bedingungen eingestellt. Der pH-Wert der Bindung pH_{e1C} wurde auf 7.85 festgelegt, um eine ausreichende Pufferkapazität zu gewährleisten.

Die Flussraten der Probenaufnahme F_{vsac} und die Flussrate des Systems F_{vsyc} besitzen ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Gütekriterien des Prozesses. Für diese Parameter wurde aufgrund des zu minimierenden Zeitaufwandes eine Flussrate von 8 mlmin^{-1} gewählt.

Für die Auslegung des Faktoreinstellungsbereiches der Optimierung wurden die Spezifikationen der Gütekriterien Reinheit P_{P1e2C} und Wiederfindung Y_{P1C} von $> 40\%$ definiert. Die festgelegten Spezifikationen der zu optimierenden Kriterien sind abhängig von dem Anwendungsbereich der Methode. Die Auslegung könnte sowohl auf einen möglichst geringen Verlust für einen Zwischenreinigungsschritt oder eine möglichst hohe Reinheit für eine Feinreinigung erfolgen. Das Ziel der hier verfolgten Optimierung ist die gleichzeitige Maximierung der Reinheit und Wiederfindung.

Mit Hilfe der Optimizer-Funktion wurden die Parametereinstellungen pH-Wert der Elution pH_{e2C} von 3.74 und Natriumchloridkonzentration C_{NaClC} 0.57 M zum Erreichen einer Reinheit P_{P1e2C} und einer gleichzeitigen Ausbeute Y_{P1C} von 60 % ermittelt. Dieser Punkt entspricht dem Sternpunkt des CCC-Designs mit einem zentrierten und skalierten Abstand zum Centerpoint von $2^{0.5}$. Der CP des Optimierungsdesigns wurde auf einen pH-Wert der Elution pH_{eC} von 4.0 und eine Natriumchloridkonzentration C_{NaClC} von 0.6 M festgelegt.

Tab. 5.20 fasst den gewählten Faktoreinstellungsbereich der kritischen Einflussfaktoren für die nachfolgende Optimierung zusammen.

Tab. 5.20: Faktoreinstellungsbereiche und Risikobewertung – MMC-Optimierung

Einflussfaktor	Min	Max	
P-D1M1			
Salzkonzentration (C_{NaClC})	0.4	0.8	M
pH-Wert Elution (pH_{e2C})	3.8	4.2	

Die Optimierungsexperimente wurden nach Kap. 4.7.4 durchgeführt und anschließend die Rohdatenanalyse vorgenommen (vgl. Abb. 5.22 und Tab. 5.18).

Aufgrund der rechtsschiefen Verteilung wurden die Datensätze der Qualitätskriterien aus der Optimierung logarithmisch transformiert und erneut auf eine NV geprüft. Die Transformation des Datensatzes der Ausbeute führte bei einem Signifikanzniveau von 5 % zu einer NV. Die Rohdaten des Datensatzes der Reinheit entsprechen selbst bei einem Signifikanzniveau von 10 % keiner NV.

Die Modellbildung der Optimierung erfolgte mit den logarithmisch transformierten und nicht transformierten Datensätzen. Die kalkulierten Kenngrößen der erstellten Modelle nach Tab. 3.2 sind in Tab. 5.21 aufgeführt.

Tab. 5.21: Modellvergleich nach logarithmischer Transformation – Optimierung MMC

Kenngröße	Anforderung	Datensatz		log. Datensatz	
		Reinheit	Ausbeute	Reinheit	Ausbeute
R ²	> 0.50	0.973	0.970	0.964	0.974
Q ²	> 0.50	0.938	0.880	0.913	0.905
R ² -Q ²	< 0.30	0.035	0.09	0.051	0.069
MV	> 0.25	0.308	0.715	0.408	0.795
RP	> 0.50	0.997	0.974	0.994	0.967

Die Modellbildung führte ausschließlich zu Modellen, bei denen die minimalen Anforderungen der Kenngrößen erfüllt werden. Der Unterschied zwischen den Modellen der transformierten und nicht transformierten Daten ist einzig an der Modelvalidität (MV) auszumachen, wobei die Anforderungen an ein valides Modell dennoch gegeben sind. Die geringen Werte mit 0.308 und 0.408 der MV bei den Modellen der Reinheit kann auf die nicht vorliegende NV zurückgeführt werden. Die Modellbildung der transformierten Daten führt bei der Differenz des Bestimmtheitsmaßes und der Güte der Voraussage R²-Q² zu einer Verschlechterung des Modells um 30 %, weshalb das Modell der nicht transformierten Daten für die weitere Auslegung des Prozesses verwendet wurde.

Das aus dem nicht transformierten Datensatz erstellte Regressionsmodell der Produktreinheit P_{P1e2C},

$$\begin{aligned}
 P_{P1e2C} = & - 2.023 + 2.968 \cdot c_{NaClC} + 0.906 \cdot pH_{e2C} \\
 & - 1.313 \cdot pH_{e2C} \cdot c_{NaClC} + 1.240 \cdot c_{NaClC}^2,
 \end{aligned}
 \tag{5.5}$$

beschreibt den linearen Einfluss der kritischen Prozessparameter Natriumchloridkonzentration im BB und pH-Wert des BE. Zudem besitzt das Modell einen Interaktionsterm sowie einen quadratischen Term der Salzkonzentration.

Die Ausbeute des Prozesses Y_{P1C} ,

$$Y_{P1C} = 0.898 - 2.558 \cdot c_{NaClC} + 3.023 \cdot c_{NaClC}^2, \quad (5.6)$$

kann einzig durch den linearen und quadratischen Term der Salzkonzentration im BB mathematisch abgebildet werden.

Abb. 5.24 zeigt den *response surface*- und *sweet spot*-Plot des erstellten Modells aus den nicht transformierten Datensätzen.

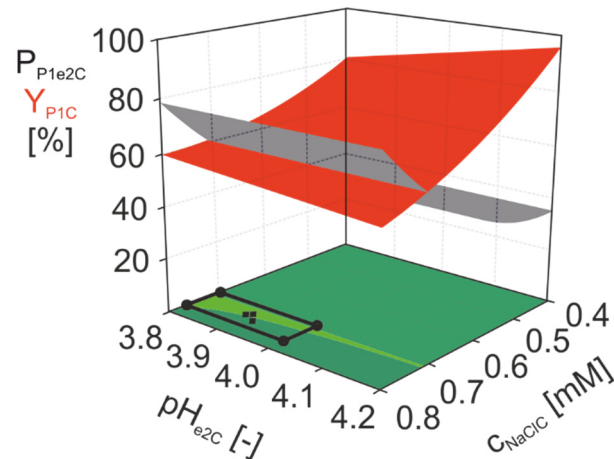


Abb. 5.24: Response surface- und sweet spot-Plot der Optimierung zur Aufreinigung des Zielproteins P-D1M1 mit Hilfe der MMC. Die Abbildung veranschaulicht die Modelle der Optimierung des Zielproteins P-D1M1. In schwarz dargestellt ist die Produktreinheit P_{P1e2C} . Die rote Fläche zeigt die Ausbeute des Prozesses Y_{P1C} . In der x-y-Ebene ist der *sweet spot*-Plot zu erkennen. Dunkelgrün zeigt den Bereich in dem ein Kriterium erfüllt wird. In hellgrün gekennzeichnet ist der Bereich, in dem beide Kriterien erfüllt werden. Optimierungskriterien: $P_{P1e2C} > 60\%$, $Y_{P1C} > 60\%$. Das schwarze Rechteck begrenzt den Faktoreinstellungsbereich des Robustheitstestes. Schwarze Kreise stellen die Experimente des Robustheitstestes dar.

Abb. 5.24 veranschaulicht den ausgeprägten gegenläufigen Verlauf der erstellten Regressionsmodelle der Qualitätskriterien Reinheit des Proteins P-D1M1 P_{P1e2C} und Ausbeute Y_{P1C} . Des Weiteren veranschaulicht der *sweet spot* Plot die Überschneidungsfläche der Gütekriterien bei einer minimalen Produktreinheit und Ausbeute von 60 %.

Für die Festlegung des Arbeitspunktes wurden die Optimierungskriterien Produktreinheit P_{P1e2C} und Ausbeute Y_{P1C} größer 50 % festgelegt. Der Arbeitspunkt wurde erneut durch die Anwendung der Optimizer-Funktion bestimmt.

Die ermittelte Salzkonzentration c_{NaClC} beträgt im Arbeitspunkt 0.73 M und der pH-Wert der Elution pH_{e2C} 3.9. Die durch das Modell kalkulierten Qualitätskriterien im Arbeitspunkt Produktreinheit P_{P1e2C} und Ausbeute Y_{P1C} betragen 64.1 bzw. 60.0 %.

Die Faktoreinstellungen des optimalen Arbeitspunktes wurden als CP-Experimente des Robustheitstestes festgelegt. Der pH-Wert pH_{e2C} wurde mit einer Varianz von ± 0.1 und die Salzkonzentration c_{NaClC} mit ± 0.03 M untersucht. Die Ergebnisse führten zu einer Produktreinheit P_{P1e2C} von 67.7 ± 5.4 % und einer Ausbeute Y_{P1C} von 85.1 ± 9.7 % (vgl. Abb. 5.22 und Tab. 5.18).

5.3.4 Zusammenfassung des *Process Design Space* der MMC

Aufgrund der unzureichenden Selektivität der Aufreinigung mit Hilfe Cu^{2+} -IMAC wurde ein zusätzlicher chromatographischer Aufarbeitungsschritt für P-D1M1 entwickelt und optimiert. Dabei wurde das strategische Entwicklungskonzept nach Kap. 4.3.1 erprobt.

Hierzu wurde zu Beginn die Auswahl der Methode auf den Bereich der Ionenaustauschchromatographie beschränkt. Die Eigenschaften des Zielproteins und die Einschränkung des pH-Wert-Bereiches aus der Stabilitätsstudie führten zu der Untersuchung von Anionenaustauscher-Adsorbermaterialien. Zusätzlich wurde die Anwendbarkeit des multimodalen Adsorbers Capto™ adhere untersucht. Die Ergebnisse der Adsorptionsstudie zeigten ein hohes Potential für eine multimodale chromatographische Aufarbeitung des Zielproteins P-D1M1.

Die möglichen Einflussfaktoren nach Kap. 4.7.2 wurden in einem Screening auf die Signifikanz bezüglich des Einflusses auf die Gütekriterien untersucht. Als kritische Einflussfaktoren konnte die Natriumchloridkonzentration c_{NaClC} des Bindungspuffers sowie der pH-Wert der Elution pH_{e2C} identifiziert werden. Die hydrophobe Interaktion konnte somit als bevorzugte Interaktionsform des Zielproteins mit dem Liganden der stationären Phase bestimmt werden. Die Optimierung in einem eingeschränkten Faktoreinstellungsbereich ermöglichte die Erstellung eines geeigneten Modells für die Auslegung des Arbeitspunktes. Die ermittelten Faktoreinstellungen für eine simultane Maximierung der Gütekriterien der Produktreinheit und der Ausbeute wurden in einem Robustheitstest mit einem vollfaktoriellen Versuchsdesign validiert und führten zu einer Reinheit von 67.7 ± 5.4 % bei einer gleichzeitigen Ausbeute von 85.1 ± 9.7 %.

Tab. 5.22 fasst die ermittelten Faktoreinstellungen der variablen Prozessparameter zusammen.

Tab. 5.22: Faktoreinstellungen des Arbeitspunktes der MMC-Aufreinigung von P-D1M1

Einflussfaktor	Optimum
pH-Wert Bindung (pH_{e1C})	7.85
Salzkonzentration (c_{NaClC})	0.73 M
pH-Wert Elution (pH_{e2C})	3.90
Flussrate Probe (F_{vSaC})	8.0 mlmin ⁻¹
Flussrate System (F_{vSyC})	8.0 mlmin ⁻¹

5.4 Produktion der Malariavakzine im integrierten Bioprozess

5.4.1 Herstellung von P-D1M1

Die Herstellung des Zielproteins P-D1M1 erfolgte mit Hilfe des erweiterten integrierten Bioprozesses (vgl. Kap. 4.9.1 und 4.9.2).

Abb. 5.27 zeigt den ersten Zyklus (c1) des Gesamtprozesses zur Produktion des Zielproteins. Die Darstellung veranschaulicht die Expression des Zielproteins (F), die Elution der EBA Cu^{2+} -IMAC (E), den Prozessschritt der UF/DF (U) und die Elution der multimodalen Chromatographie (C).

In der Produktionsphase der Kultivierung steigt das Signal der Zelldichte c_{XLturb} von anfänglich 20 auf 60 gl^{-1} . Der pO_2 wurde bei Erreichen seines Sollwertes von 25 % über die Rührerdrehzahl aufrecht erhalten. Die Temperatur der Flüssigphase ϑ_{L} wurde während der Expression auf $22 \text{ }^\circ\text{C}$ und der pH-Wert pH_{L} auf 5.6 geregelt. Die Zunahme der Proteinkonzentration wird durch die Darstellung des normierten Absorptionssignals der Atline-HPLC $A_{\text{P1M}_{\text{norm}}}$ veranschaulicht.

Während der Elution der EBA IMAC steigt das Absorptionssignal A_{E} auf ein Maximum von 0.372 AU. Der Beginn der Fraktionierung des Eluats wird durch den Anstieg des Signals der Masse des Konditionierungstanks m_{D} gekennzeichnet.

In der Phase der UF/DF fällt das Massesignal in dem jeweiligen Konzentrierungsschritt von 1000 g auf ca. 130 g linear ab. Der Transmembrandruck p_{TMU} steigt in den Konzentrierungsschritten von anfänglich im Schnitt 1.6 bar auf ca. 1.7 bar an. Eine erfolgreiche Umpufferung des EBA IMAC-Eluates in den Diafiltrationspuffer wird durch die Annäherung der Messwerte der Leitfähigkeit σ_{U} und des pH-Wertes pH_{U} an ihre Sollwerte gekennzeichnet. Die Konzentrierung der Proteine im Retentat wird durch die Darstellung des Absorptionssignals A_{U} verdeutlicht.

Im Verlauf der MMC-Elution steigt das Absorptionssignal A_{C} auf ein Maximum von 1.846 AU. Gleichzeitig mit dem Anstieg des Absorptionssignals A_{C} nimmt der pH-Wert pH_{C} von 8.00 auf 3.96 und die Leitfähigkeit σ_{C} von 68.0 auf 7.7 ab.

Zusätzlich zum Prozessverlauf zeigt die Abbildung die SDS-PAGE-Analyse des Kulturüberstandes am Ende der Produktionsphase, der Eluatsfraktion der EBA IMAC, der Retentatfraktion der UF/DF und das Bandenprofil der Eluatsfraktion nach MMC-Aufreinigung. Für die densitometrische SDS-PAGE-Auswertung der Proben bezüglich der Reinheit des Zielproteins P-D1M1 wurden die applizierte Gesamtproteinmassen auf $4 \mu\text{g}$ konstant gehalten.

5. Ergebnisse und Diskussion

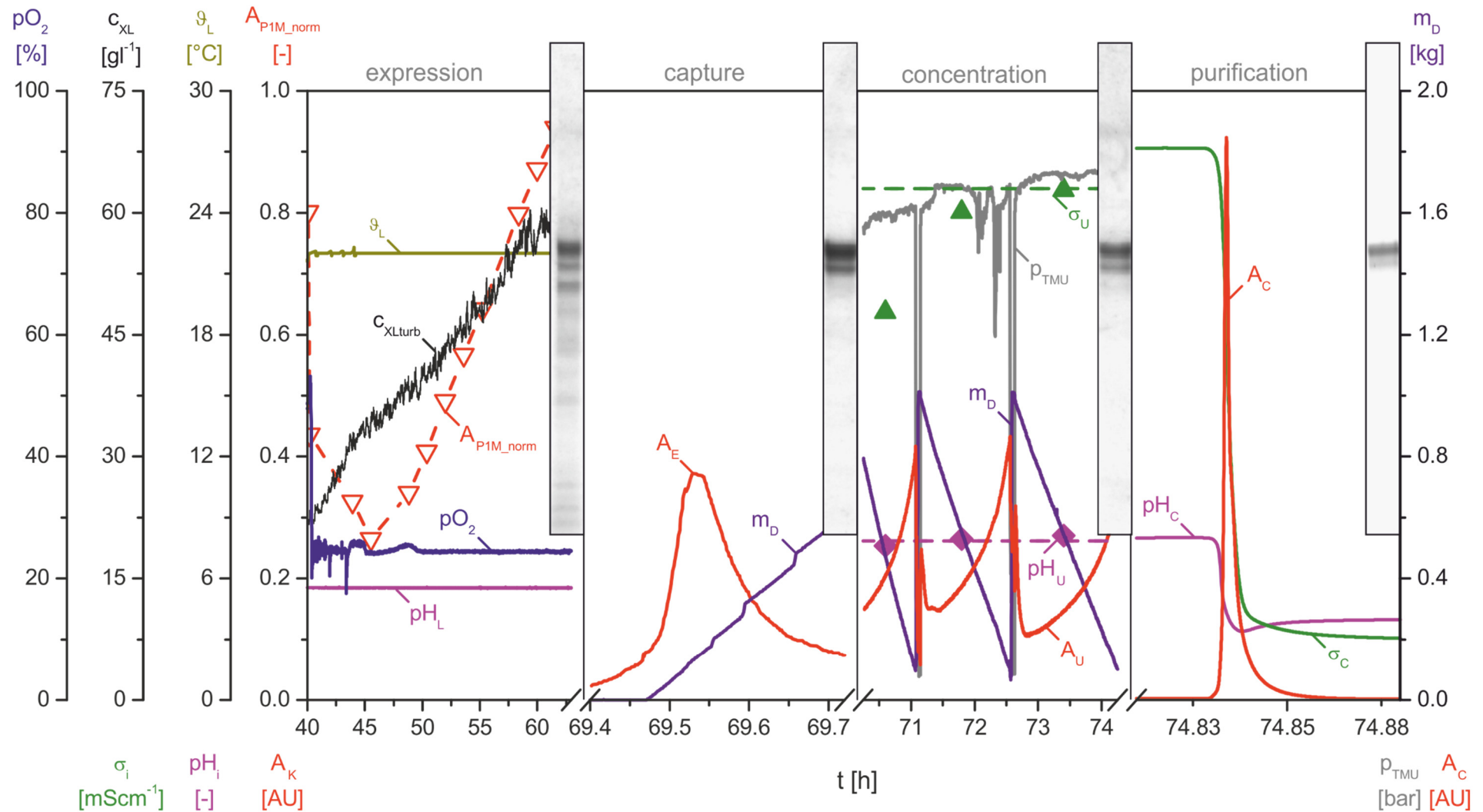


Abb. 5.25: Darstellung des Gesamtprozesses zur Herstellung des Zielproteins P-D1M1. Abgebildet sind die Prozessvariablen und die SDS-PAGE-Gele der Proteinexpression (F), dem Protein *capture* mit Hilfe EBA Cu^{2+} -IMAC (E), der UF/DF (U) und der Aufreinigung via MMC (C) des ersten Herstellungszyklus (c1).

Die Auswertung der Qualitätskriterien des Herstellungsprozesses ist grafisch in Abb. 5.26 dargestellt. Gezeigt werden die Ergebnisse der Ausbeute Y_{P1} des *start-up* (su) sowie der Produktionszyklen eins bis drei (c1-c3) der Prozessschritte Proteinexpression (F), *capture* (E), UF/DF (U) und der chromatographischen Aufreinigung durch MMC (C).

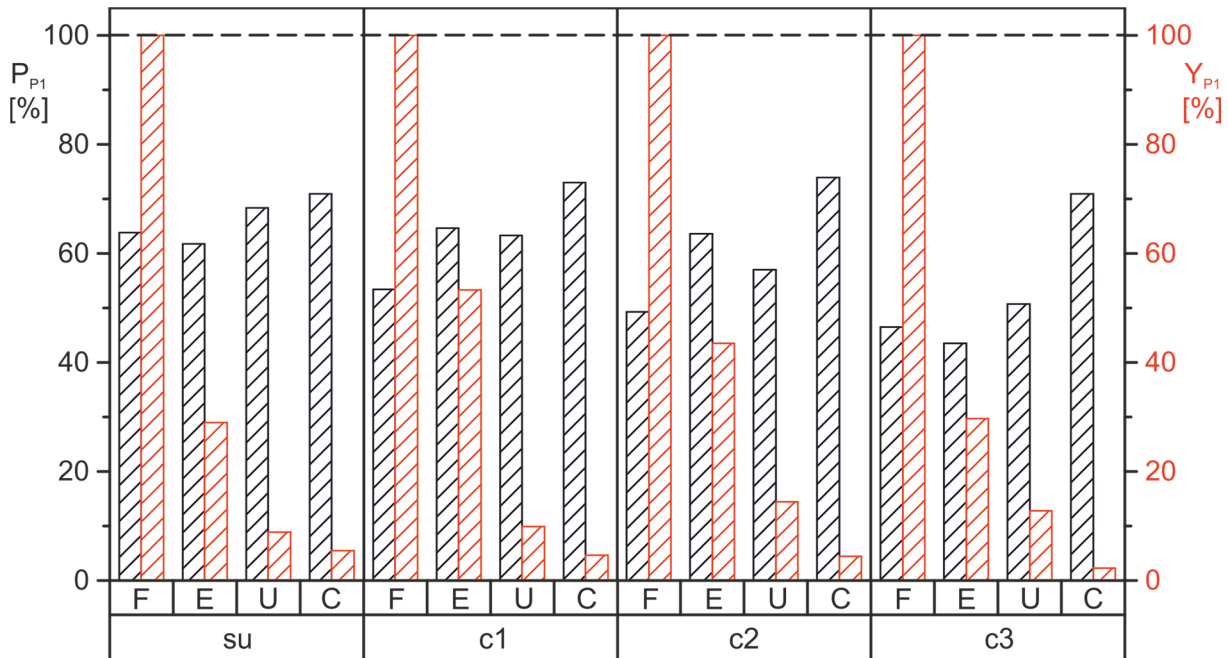


Abb. 5.26: Qualitätskriterien des Herstellungsprozesses von P-D1M1. Darstellung der Reinheit des Produktes P_{P1} (schwarz) und der Ausbeute des Prozesses Y_{P1} (rot) der jeweiligen Prozessschritte Proteinexpression (F), *capture* (E), UF/DF (U) und der chromatographischen Aufreinigung (C) des *start-up* (su) und der darauf folgenden Zyklen c1-c3 des erweiterten integrierten Bioprozesses.

Die Bestimmung der Produktreinheit P_{P1} erfolgte nach Gl. (4.3) mit Hilfe densitometrischer SDS-PAGE-Analyse.

Die Berechnung der Ausbeute Y_{P1} wurde analog zu der Bestimmung nach Gl. (4.15) durchgeführt. Dabei wurde die Ausbeute Y_{P1} in Bezug auf die applizierte Masse des Zielproteins in dem verdünnten Kulturüberstand berechnet, weshalb die Wiederfindung der Proteinproduktion 100 % entspricht.

Deutlich zu erkennen ist die beträchtliche Abnahme der Ausbeute Y_{P1} über die Prozessschritte innerhalb der Zyklen (c1-c3) und des *start-up* (su). Die mittlere Ausbeute des *capture*-Schrittes durch EBA IMAC betrug 38.9 ± 11.7 %. Im Prozessschritt der UF/DF wurde eine Ausbeute von 11.5 ± 2.6 % erreicht. Nach der MMC-Aufreinigung entsprach die Ausbeute 4.2 ± 1.4 %.

Die Reinheit des Produktes P-D1M1 betrug nach der Fermentation 53.2 ± 7.6 %. Die Aufreinigung mit Hilfe EBA IMAC steigert die P-D1M1 Reinheit auf 58.4 ± 10.0 %. Nach der UF/DF wurde eine Reinheit von 59.9 ± 7.6 % bestimmt. Die abschließende MMC-Aufreinigung führte zu einer Steigerung der Reinheit auf 72.3 ± 1.5 %.

5.4.2 Herstellung von D1M1-His

Der Produktionsprozess des Zielproteins D1M1-His wurde mit Hilfe des erweiterten integrierten Bioprozesses nach Kap. 4.9.1 und 4.9.3 durchgeführt. Für das Zielprotein D1M1-His wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit auf die Entwicklung einer zusätzlichen chromatographischen Aufreinigung verzichtet, so dass der *downstream*-Prozess nach dem Prozessschritt der UF/DF beendet wurde. Die Anwendung der MMC als weitere chromatographische Aufreinigungsmethode wurde untersucht und wird in Kap. 5.4.3 diskutiert.

Abb. 5.27 veranschaulicht den Prozessgrößenverlauf der Proteinexpression (F), der Elution der EBA Ni²⁺-IMAC (E) und die drei UF/DF-Schritte des zweiten Zyklus des Herstellungsprozesses von D1M1-His.

Die Expression des Zielproteins D1M1-His im Bioreaktor erfolgte unter analogen verfahrenstechnischen Bedingungen der P-D1M1-Produktion. Der pO₂ wurde im Verlauf des Prozesses über die Rührerdrehzahl auf 25 % geregelt. In der Produktionsphase der Kultivierung steigt die Zelldichte auf 60 gl⁻¹. Die Detektion der Zunahme der Proteinkonzentration im Medium wurde online anhand des Absorptionssignals A_{P1M} der Ni²⁺-IMAC mit einstufiger Elution nach Martens (2014) verfolgt und in der Abbildung normiert dargestellt.

In der Elutionsphase der EBA IMAC steigt das Absorptionssignal A_E auf ein Maximum von 0.270 AU. Anschließend fällt das Absorptionssignal langsam ab. Die Fraktionierung des Eluats in den Konditionierungstank wird durch den Anstieg des Massesignals m_D gekennzeichnet.

Im Verlauf der UF/DF fällt das Signal der Masse des Konditionierungstanks m_D in dem jeweiligen Konzentrierungsschritt von 1000 g auf ca. 130 g linear ab. Der Transmembrandruck p_{TMU} schwankt in den Konzentrierungsschritten um 1.5 bar. Eine erfolgreiche Umpufferung des EBA IMAC-Eluates in den Diafiltrationspuffer wird durch die Annäherung der Messwerte der Leitfähigkeit σ_U und des pH-Wertes pH_U an ihre Sollwerte σ_{Uw} bzw. pH_{Uw} verdeutlicht. Die Konzentrierung der Proteine im Retentat wird durch die Darstellung des Absorptionssignals A_U ersichtlich.

Des Weiteren wird in Abb. 5.27 die SDS-PAGE-Analyse des Kulturüberstandes nach erfolgter Expression, die Eluatsfraktion der EBA IMAC sowie das Bandenprofil des Retentates der UF/DF veranschaulicht. Für die durchgeführte densitometrische SDS-PAGE-Analyse der Proben bezüglich der Reinheit des Zielproteins D1M1-His wurde die applizierte Gesamtproteinmassen auf 4 µg konstant gehalten.

5 Ergebnisse und Diskussion

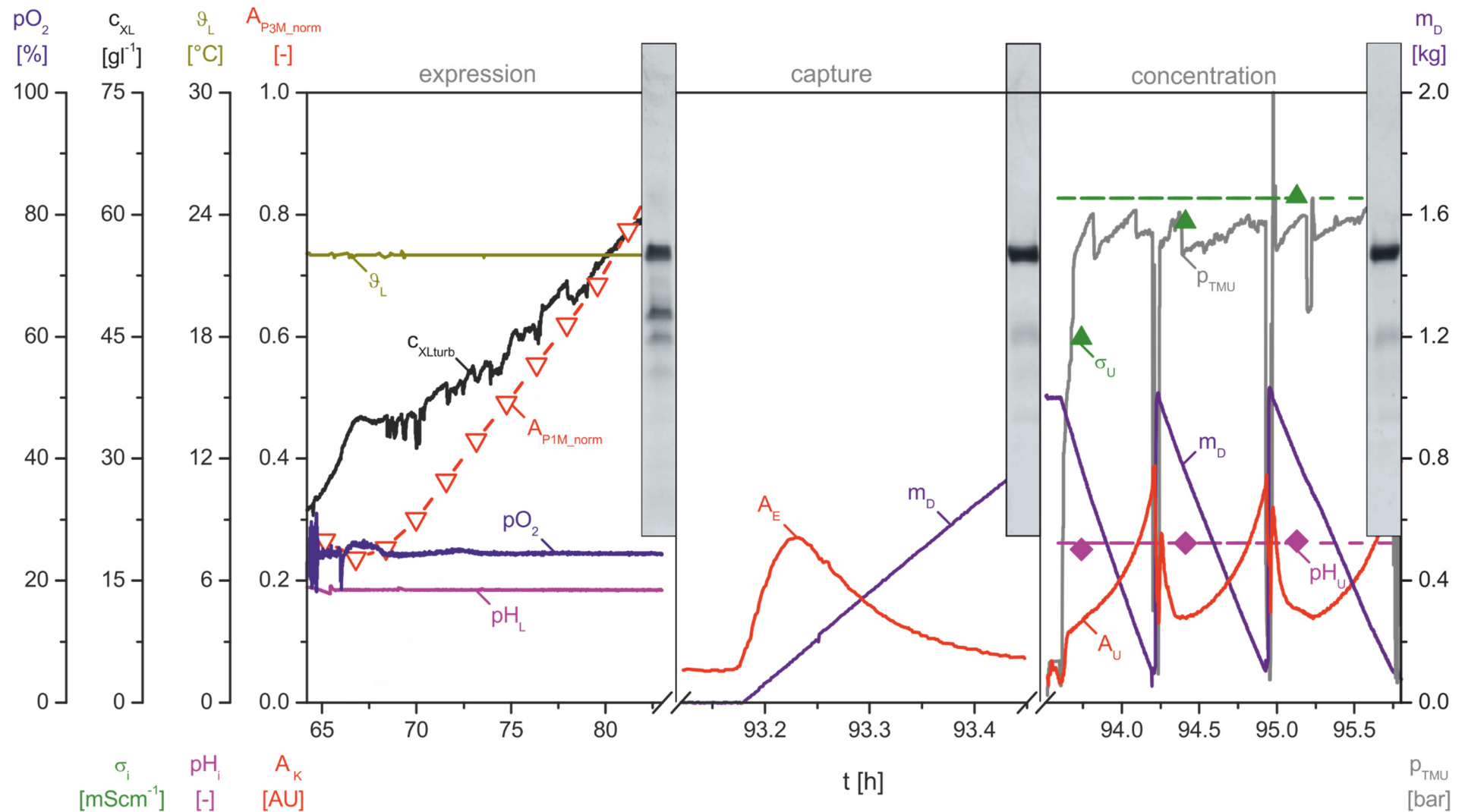


Abb. 5.27: Darstellung des Gesamtprozesses zur Herstellung des Zielproteins D1M1-His. Abgebildet sind die Prozessvariablen und die SDS-PAGE-Bandenprofile der Proteinexpression (F), dem Protein *capture* mit Hilfe EBA Ni^{2+} -IMAC (E) und der UF/DF (U) des zweiten Herstellungszyklus (c2).

Abb. 5.28 veranschaulicht die Ergebnisse der Qualitätskriterien Reinheit des Produktes D1M1-His P_{P_3} sowie der Ausbeute Y_{P_3} des Herstellungsprozesses. Dargestellt sind der *start-up* (su) sowie die Zyklen eins bis drei (c1-c3) der Prozessschritte Proteinexpression (F), *capture* (E) und UF/DF (U).

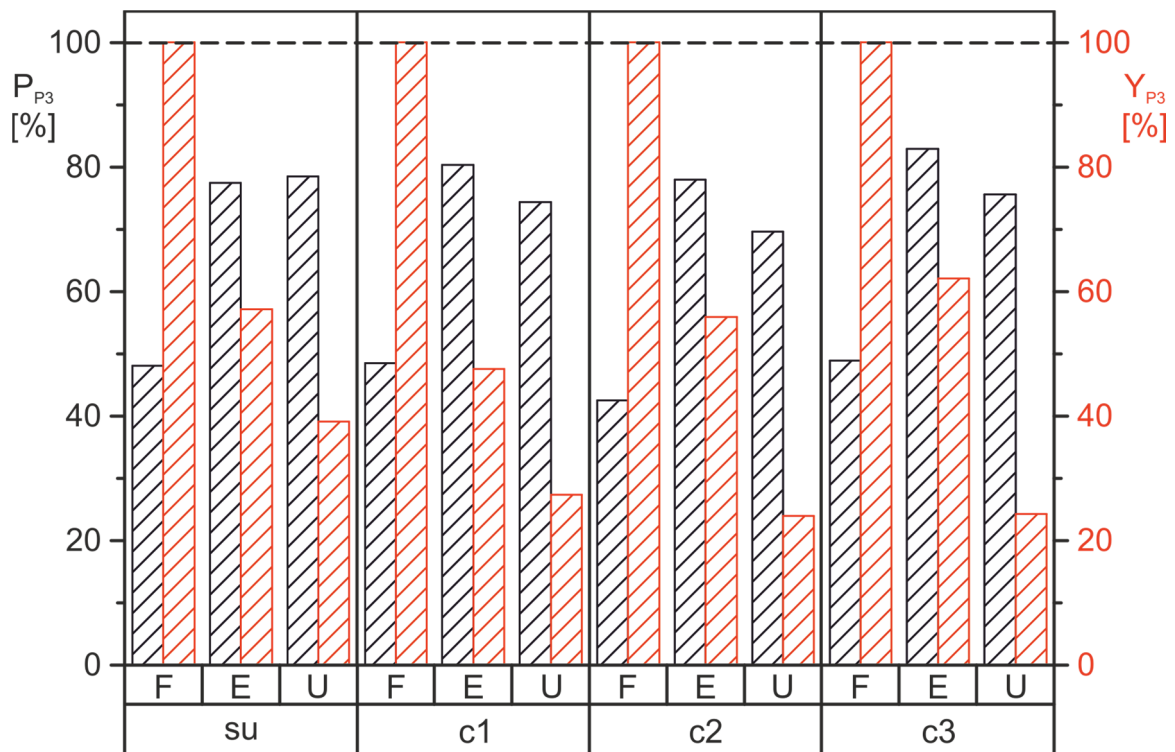


Abb. 5.28: Qualitätskriterien des Herstellungsprozesses von D1M1-His. Darstellung der Reinheit des Produktes P_{P_3} (schwarz) und der Ausbeute des Prozesses Y_{P_3} (rot) der jeweiligen Prozessschritte Proteinexpression (F), *capture* (E) und UF/DF (U) des *start-up* (su) und der darauf folgenden Zyklen c1-c3 des erweiterten integrierten Bioprozesses.

Die Bestimmung der Produktreinheit P_{P_3} erfolgte nach Gl. (4.3) durch die in Kap. 4.1.3 beschriebene densitometrische SDS-PAGE-Analyse. Die Berechnung der Ausbeute Y_{P_3} wurde nach Gl. (4.15) durchgeführt. Dabei wurde die Ausbeute des Zielproteins in Bezug auf die applizierte Masse in dem verdünnten Kulturüberstand kalkuliert.

Abb. 5.28 verdeutlicht die Abnahme der Ausbeute Y_{P_3} über die Prozessschritte innerhalb der Zyklen c1-c3 und des *start-up* (su). Im *capture* mit Hilfe der EBA Ni^{2+} -IMAC beträgt die mittlere Ausbeute Y_{P_3} 55.7 ± 6.1 %. Im Prozessschritt der UF/DF wurde eine Ausbeute von 28.7 ± 7.1 % erreicht.

Die Reinheit des Produktes D1M1-His beträgt nach der Fermentation 45.0 ± 3.0 %. Die Aufreinigung mit Hilfe der EBA IMAC steigerte die Reinheit auf 79.7 ± 2.5 %. Nach der UF/DF wurde eine Reinheit von 74.6 ± 3.7 % erreicht.

5.4.3 Vergleich und Diskussion der Herstellungskampagnen

Die Produktion der Zielproteine P-D1M1 und D1M1-His im erweiterten integrierten Bioprozess bestand aus den Prozessschritten Proteinexpression (F), dem *capture* mit Hilfe der EBA IMAC (E) sowie einer Konzentrierung und Diafiltration (U).

Die Prozessbedingungen während der Fermentation wurden identisch gewählt, wodurch eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben ist. Für das *capture* des Zielproteins P-D1M1 mit Hilfe EBA IMAC wurden Cu^{2+} -Ionen und für die Aufreinigung von D1M1-His Ni^{2+} -Ionen am Adsorber immobilisiert. Die optimalen Bedingungen zur Konzentrierung und Diafiltration wurde in der Masterarbeit von Schreiber (2013) mit Hilfe eines Scoutings des Transmembrandrucks ermittelt und im Herstellungsprozess angewandt.

Abb. 5.29 zeigt die Mittelwerte der Qualitätskriterien des Herstellungsprozesses des *start-up* (su) und der Zyklen c1-c3. Die ermittelte Standardabweichung der Produktreinheit P_{Pi} und der Ausbeute Y_{Pi} wird durch eingefügte Fehlerbalken veranschaulicht.

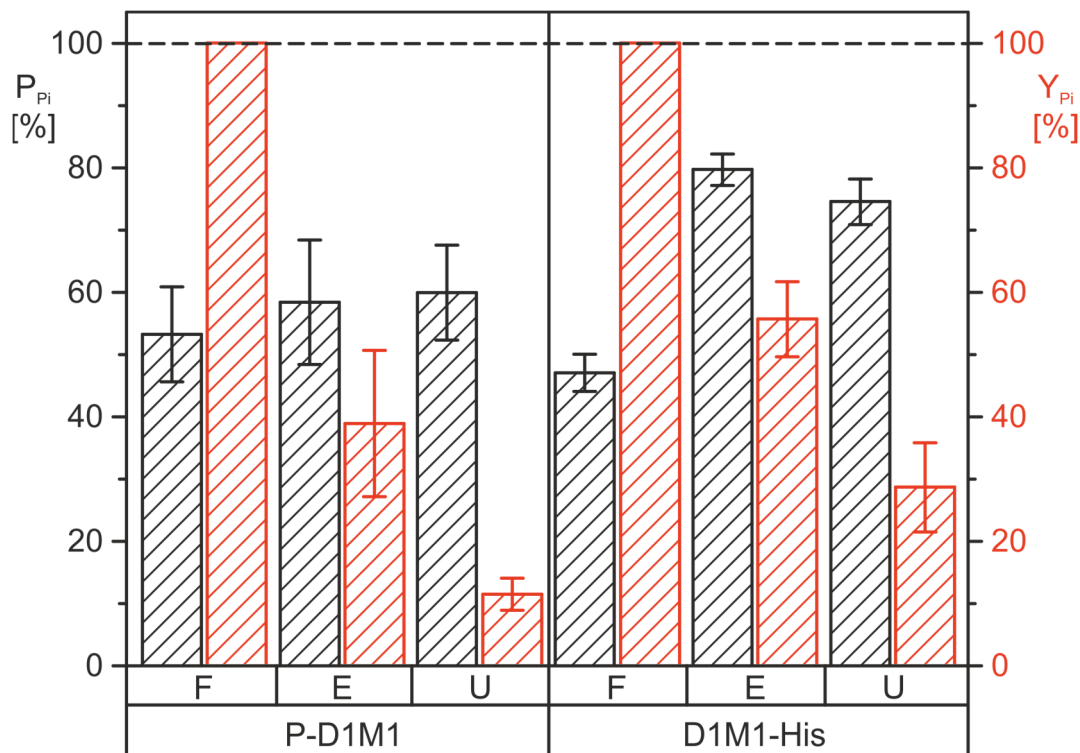


Abb. 5.29: Vergleich der Qualitätskriterien der Herstellungsprozesse. Darstellung der Produktreinheit P_{Pi} (schwarz) und der Produktausbeute Y_{Pi} (rot) der jeweiligen Prozessschritte Proteinproduktion (F), *capture* (E) und UF/DF (U) des erweiterten integrierten Bioprozesses mit ermittelter Standardabweichung.

Deutlich erkennbar ist der hohe Ausbeuteverlust von 61.1 ± 11.7 % bei dem Cu^{2+} -IMAC-*capture* von P-D1M1 sowie 44.3 ± 6.1 % bei der D1M1-His Primärreinigung durch Ni^{2+} -IMAC. Die Ausbeute des Konzentrierungs- und Diafiltrationsschrittes betrug 11.5 ± 2.6 % für P-D1M1 und 28.7 ± 7.1 % für D1M1-His in Bezug auf die in der Fermentation hergestellte Masse an Zielprotein.

Die Reproduzierbarkeit der jeweiligen Prozessschritte wird durch die aufgetragenen Fehlerbalken verdeutlicht. Die Produktion von P-D1M1 scheint gegenüber der Herstellung von D1M1-His höheren Schwankungen zu unterliegen.

Deutlich werden diese Differenzen bei der Betrachtung der Reinheit des Zielproteins P-D1M1 in der SDS-PAGE-Analyse dargestellt in Abb. 5.30.

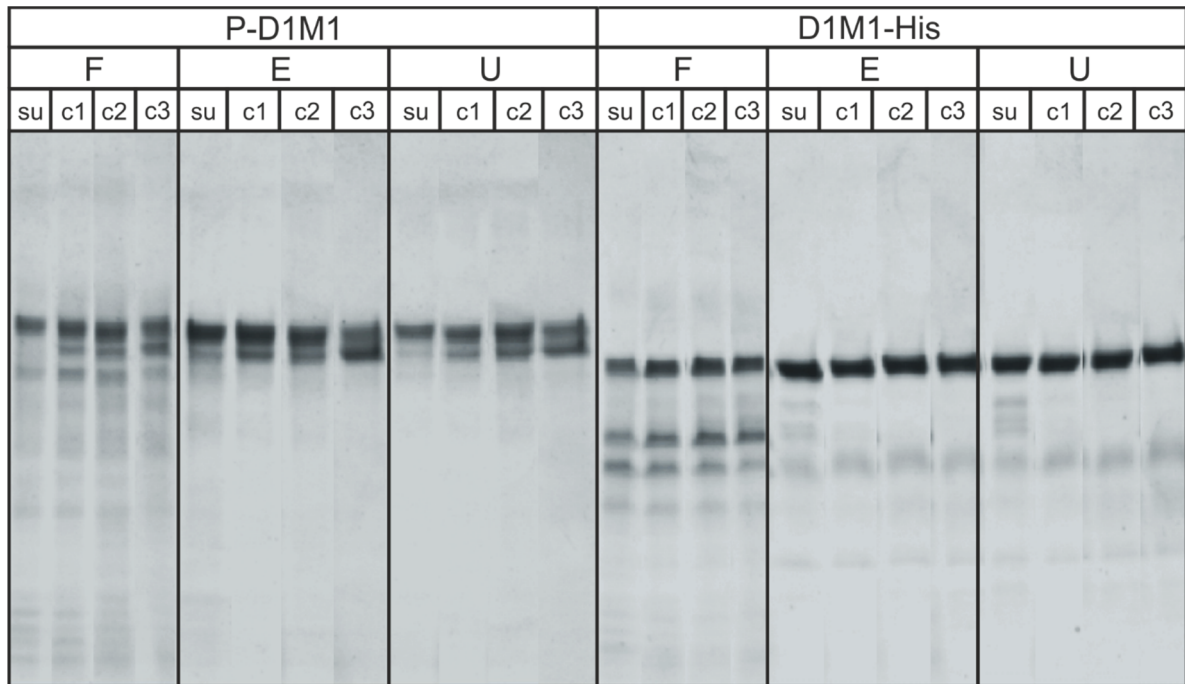


Abb. 5.30: SDS-PAGE-Analyse des erweiterten integrierten Bioprozesses. Bandenprofile der Prozessschritte Proteinexpression (F), *capture* (E) und UF/DF (U) des *start-up* (su) sowie der jeweiligen Zyklen c1-c3 der Produktion der Zielproteine P-D1M1 und D1M1-His.

Das Bandenprofil des Kulturüberstandes am Ende der Expression von P-D1M1 zeigt deutlich die Zunahme des Proteins P2 (P-D1M1 ohne Prodomäne) mit einem Molekulargewicht von 64.9 kDa (vgl. Abb. 5.1). Dieses Ergebnis ist ebenfalls in den Eluatsfraktionen der Cu^{2+} -IMAC (E) sowie in den Retentatproben (U) des Herstellungsprozesses zu sehen. Die Zunahme der Abspaltung der Prodomäne von P-D1M1 weist auf einen Anstieg der proteolytischen Aktivität in den Zyklen des Herstellungsprozesses hin. Weiterführende Untersuchungen der Kultivierungen in der Bachelorarbeit von Lucks (2013) zeigten zudem eine Abnahme der Stoffwechselaktivität über die Produktionszyklen. Der Grund hierfür wurde innerhalb dieser Arbeit in der sinkenden Vitalität der Zellen gesehen, konnte abschließend jedoch nicht bewiesen werden.

Die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analyse des Herstellungsprozesses von D1M1-His zeigen über die Produktionszyklen keine ausgeprägten Änderungen im Bandenprofil. Dieses wird ebenfalls durch die ermittelte Standardabweichung der Reinheitsbestimmung deutlich.

Einzig im *start-up* (su) sind schwache Banden im MW-Bereich von 50 kDa ersichtlich. Das Ergebnis der Untersuchung von zyklischen Kultivierungen ergab ebenfalls einen Rückgang der Stoffwechselaktivität. Insgesamt betrachtet brachte die Produktion von D1M1-His höhere Produktionsraten, Produktausbeuten und Endkonzentrationen des Zielproteins als die P-D1M1-Produktion (Lucks, 2013).

Die Optimierung der Prozessbedingungen des *capture* mit Hilfe EBA Cu²⁺-IMAC zur Aufreinigung von P-D1M1 wurde in den Arbeiten von Borchert et al. (2013, 2015) veröffentlicht und in der vorgestellten Herstellungskampagne angewandt. In der Optimierungsprozedur wurden die Imidazolkonzentration sowie der pH-Wert des Bindungspuffers als kritische Prozessparameter identifiziert. Diese Parameter konnten ebenfalls in der in Kap. 5.2.3 vorgestellten Optimierungsprozedur der Festbett-Cu²⁺-IMAC identifiziert werden. Zusätzlich wurde der Parameter Fließrate bei Probenaufgabe als kritisch eingestuft. Dieser Parameter wurde in der EBA Cu²⁺-IMAC Optimierung als nicht signifikant identifiziert und daher auf eine konstante lineare Flussrate von 200 cmh⁻¹ eingestellt. Die ermittelte lineare Flussrate in Kap. 5.2.3 entspricht 45 cmh⁻¹.

Nach Borchert et al. (2015) konnte in dem optimierten Prozess eine Ausbeute von 50.6 % mit einer Reinheit von 87.3 % erreicht werden. Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte dahingegen lediglich eine Ausbeute von 38.9 ± 11.7 % mit einer Reinheit von 58.4 ± 10.0 % erzielt werden. Ein Grund für die hohe Abweichung der Produktreinheit ist die unterschiedliche Definition des Zielproduktes. In den Arbeiten von Borchert et al. (2013, 2015) wurden die Proteine P1 (P-D1M1) und P2 (D1M1) als Zielprodukte definiert. Das Zielprotein der vorliegenden Arbeit ist ausschließlich das Protein P-D1M1 (P1). Ein Grund für die Abweichung der Ausbeute von 11.7 % könnte die Applikation eines höheren Volumens an konditionierter Zellsuspension sein. In der Optimierungsprozedur nach Borchert et al. (2015) wurde ein Volumen von 5 l und in der vorgestellten Produktionskampagne ein Volumen von 6 l auf die Säule appliziert. Sollte die Bindungskapazität des Adsorbers erreicht worden sein, könnte dies zu einem erhöhten Durchbruch an Zielprotein geführt haben.

Auffällig bei der Aufreinigung von P-D1M1 mit Hilfe Cu²⁺-IMAC ist die simultane Bindung der Proteine P1 und P2. Die Prodomäne wurde dem Fusionsprotein P1 zur vereinfachten Aufreinigung mit Hilfe einer IMAC zugefügt, besitzt jedoch keine immunologische Relevanz (Howell et al., 2001). Die Bindung an Cu²⁺-IMAC scheint jedoch nicht ausschließlich an den Histidinen der Prodomäne statt zu finden sondern ebenfalls an oberflächenständigen, bindungsfähigen Aminosäuren des D1M1-Fusionsproteins.

Die Aufreinigung von D1M1-His mit Hilfe Ni²⁺-IMAC führte zu einer Produktreinheit von 79.7 ± 2.5 % und einer Ausbeute von 55.7 ± 6.1 %. In der Optimierung der Festbett-Ni²⁺-IMAC (Kap. 5.2.3) wurden die Parameter Imidazolkonzentration und der pH-Wert als kritische Prozessparameter identifiziert. Im durchgeführten Robustheitstest konnte eine Reinheit von 87.0 ± 3.1 % und eine Ausbeute von 65.5 ± 7.0 % erreicht werden.

Die Imidazolkonzentration im Produktionsprozess betrug 10 mM, die optimale Konzentration wurde mit 12 mM kalkuliert. Dieser Faktor besitzt den größten Einfluss auf die Qualitätskriterien. Die Abweichung von 2 mM könnte daher für die Abweichung in der Produktreinheit und Ausbeute von 7.3 % und 9.8 % verantwortlich sein. Ausgehend von der in der Arbeit vorgestellten Festbett-Ni²⁺-IMAC könnte eine weitere Optimierung nach dem Konzept von Borchert et al. (2013, 2015) in der EBA zu einer Steigerung der Reinheit und Ausbeute des Zielproteins D1M1-His führen.

In dem Prozessschritt der Konzentrierung und des Pufferaustausches mit Hilfe der UF/DF (U) wurde eine Ausbeute von 39.4 % für P-D1M1 und 51.9 % für D1M1-His erreicht. Diese geringen Ausbeuten könnten durch das Totvolumen der Prozessanlage oder der Adhäsion der Proteine an die Membran verursacht worden sein. Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Wiederfindung könnte ein Produktrückgewinnungsschritt sein.

Der Produktionsprozess führte nach dem Schritt der UF/DF zu einer Ausbeute für P-D1M1 von 11.5 ± 2.6 % und für D1M1-His von 28.7 ± 7.1 %. Die Produktreinheit konnte für P-D1M1 auf 59.9 ± 7.6 % und für das Zielprotein D1M1-His auf 74.6 ± 3.7 % gesteigert werden.

Die entwickelte weitere chromatographische Aufreinigung mit Hilfe der MMC führte zu einer Abreicherung des Proteins P2 (D1M1) in der Eluatsfraktion und somit zu einer Steigerung der Reinheit des Zielproduktes P-D1M1 auf 72.3 ± 1.5 %. Die Ausbeute des Gesamtprozesses nach der chromatographischen Aufreinigung betrug 4.2 ± 1.4 %. Die Ausbeute des Aufreinigungsschrittes der MMC fiel von anfänglich 61.8 % im *start-up* bis auf 18.0 % im dritten Produktionszyklus stark ab. Dieses Ergebnis könnte aufgrund der inkonsistenten Zusammensetzung der Proteine P1 und P2 des Ausgangsmaterials resultieren (vgl. Abb. 5.30). Vermutlich kann durch eine Erhöhung des Anteils an D1M1 ein erhöhter Durchbruch an P-D1M1 durch Belegung der Bindungsstellen mit D1M1 erfolgen. Die Bindung an den multimodalen Ionenaustauscher adhere scheint unter den gewählten Bedingungen hauptsächlich über die Prodomäne zu erfolgen. Diese Vermutung wird zu dem Hinweis der geringen Bindung an D1M1 durch die ebenfalls nur geringe Adsorption des Proteins D1M1-His unterstützt (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt betrachtet ist der Herstellungsprozess für D1M1-His reproduzierbarer als die Produktion von P-D1M1. Die erzielten Produktreinheiten und Ausbeuten sind als gering einzuordnen. Ein Grund hierfür könnte die in Kap. 5.1 diskutierte Instabilität der Zielprodukte im Kulturüberstand durch proteolytische Aktivität sein. Bei dem *capture* von P-D1M1 mit Hilfe der EBA Cu²⁺-IMAC kommt die ungenügende Abreicherung der Proteasen (Kap. 5.2.4) hinzu, wodurch der Herstellungsprozess hohen Schwankungen unterliegt.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Strategie zur Entwicklung und Optimierung der chromatographischen Methoden zur Aufarbeitung der Malariavakzinkandidaten P-D1M1 und D1M1-His nach dem *Quality by Design*-Konzept erarbeitet und erprobt.

Mit Hinblick auf die Qualität der Produkte wurden Stabilitätsstudien der Zielproteine im Kulturüberstand und in wässrigen Puffersystemen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine ausgeprägte Degradation der Malariavakzinkandidaten im Kulturüberstand. Unterschiedliche Proteasen konnten durch Zymographie nachgewiesen werden. Für die Stabilitätsbetrachtung der Zielproteine in wässrigen Puffersystemen wurde die Anwendung der statistischen Versuchsplanung erprobt. Eine Modellbildung konnte für den Malariavakzinkandidaten P-D1M1 durchgeführt werden und zeigte den zu erwartenden signifikanten Einfluss der Lagertemperatur und -dauer auf die Produktstabilität im Untersuchungszeitraum von sechs Tagen. Zusätzlich konnte der Einfluss des pH-Wertes und der Salzkonzentration auf die Degradation von P-D1M1 nachgewiesen werden. Eine Modellbildung für D1M1-His war aufgrund der erwiesenen Stabilität des Zielproteins im Untersuchungsbereich nicht möglich. Abschließend kann die statistische Versuchsplanung als eine geeignete Methode zur Planung und Auswertung von Stabilitätsstudien beurteilt werden. Abhängig vom zur Verfügung stehenden Methodenspektrum können die in dieser Arbeit vorgestellten Studien erweitert werden. Die Herausforderung bei dem Einsatz der Methode liegt in der Auslegung der Faktoreinstellungsbereiche.

Für die Erprobung der konzipierten Strategie zur Entwicklung und Optimierung der chromatographischen Methoden wurde die im integrierten Bioprozess angewendete Methode der immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie in *downscale*-Experimenten analysiert. Dabei wurde die Anwendungsmöglichkeit von statischen und dynamischen Adsorptionsstudien zur Ermittlung der Bindungskapazität untersucht. Die Methode der Aufnahme von Adsorptionsisothermen im statischen System stellte sich hierbei als vorteilhaft heraus. Vorteile für eine Vorauswahl der chromatographischen Methode sowie eines adäquaten Materials kann, zusätzlich zu den hier geleisteten Arbeiten, die Anwendung von Hochdurchsatzmethoden unter Verwendung der statistischen Versuchsplanung bringen. Die Prozessoptimierung erfolgte mit den Zielproteinen P-D1M1 und D1M1-His. Eine Optimierungsprozedur bestand aus einem teilfaktoriellen Screening, einer Optimierung mit einem zentral zusammengesetzten Versuchsplan in einem eingeschränkten Untersuchungsraum und einem abschließenden vollfaktoriellen Robustheitstest. Mit Hilfe der Modelle aus der Optimierung konnte ein geeigneter Arbeitspunkt identifiziert werden. Die Optimierungsprozedur führte bei der Aufreinigung von P-D1M1 zu einer Produktreinheit von $75.7 \pm 2.4 \%$ und einer Ausbeute von $60.4 \pm 4.7 \%$. Für den Malariavakzinkandidaten D1M1-His ergab sich eine Produktreinheit von $87.0 \pm 3.1 \%$ und eine Ausbeute von $65.5 \pm 7.0 \%$.

Abschließend zu den Untersuchungen der Aufreinigung mit Hilfe der Immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie wurden Experimente zur Abreicherung der proteolytischen Aktivität vorgestellt. Das Ergebnis war, dass Proteasen in dem Kulturüberstand der P-D1M1-Produktion an den Adsorber mit immobilisierten Cu^{2+} -Ionen binden. Die Proteasen der D1M1-His-Produktion gingen dagegen keine Bindung ein.

Der im Forschungs- und Transferzentrum Bioprocess- und Analysetechnik bestehende integrierte Bioprocess zur zyklischen Produktion extrazellulärer Proteine wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit um den Prozessschritt der *Crossflow*-Ultrafiltration erweitert.

Aufgrund der unzureichenden Selektivität der Aufreinigung durch Cu^{2+} -IMAC wurde ein zusätzlicher chromatographischer Aufarbeitungsschritt für P-D1M1 nach erfolgter Konzentrierung durch *Crossflow*-Ultrafiltration entwickelt und optimiert. Der multimodale Adsorber adhere zeigte in der durchgeführten Adsorptionsstudie mit $167.3 \pm 18.1 \text{ mgml}^{-1}$ die höchste Bindungskapazität. In dem durchgeführten Screening der Optimierungsprozedur wurden die kritischen Einflüsse der Natriumchloridkonzentration bei Bindung und des pH-Wertes der Elution ermittelt. Die hydrophobe Interaktion konnte als bevorzugte Interaktionsform identifiziert werden. Die Optimierung ermöglichte die Erstellung eines geeigneten Modells für die Auslegung des Arbeitspunktes. Die ermittelten Faktoreinstellungen für eine simultane Maximierung der Gütekriterien Produktreinheit und -ausbeute wurden in einem Robustheitstest validiert und führten zu einer Reinheit von $67.7 \pm 5.4 \%$ und einer Ausbeute von $85.1 \pm 9.7 \%$. Der multimodale Aufreinigungsschritt wurde in den Ablauf des sequentiellen Prozesses integriert.

In dieser Arbeit wurde für die Zielproteine P-D1M1 und D1M1-His jeweils eine Herstellungskampagne mit einem *start-up* und drei aufeinander folgenden Zyklen des integrierten Bioprocesses vorgestellt und diskutiert. Der Produktionsprozess führte zu einer Produktreinheit von $59.9 \pm 7.6 \%$ für P-D1M1 und $74.6 \pm 3.7 \%$ für D1M1-His. Die Ausbeute der Produktion nach erfolgter Konzentrierung und Umpufferung mit Hilfe der *Crossflow*-Ultrafiltration betrug für P-D1M1 $11.5 \pm 2.6 \%$ und für D1M1-His $28.7 \pm 7.1 \%$. Die Anwendung der multimodalen Aufreinigung von P-D1M1 führte in der zyklischen Produktion zu einer Reinheit von $72.3 \pm 1.5 \%$. Die Ausbeute des Gesamtprozesses nach dem chromatographischen Schritt betrug $4.2 \pm 1.4 \%$.

Schlussendlich kann mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein strategisches Vorgehen bei der Entwicklung und Optimierung chromatographischer Methoden von hoher Bedeutung ist. Insbesondere die Anwendung der statistischen Versuchsplanung im frühen Stadium der Prozessentwicklung mit der spezifischen Sicht auf die Qualität des Produktes hat sich hierbei als vorteilhaft erwiesen.

7 Anhang

7.1 Zusammenfassung der Ausgangsmaterialien

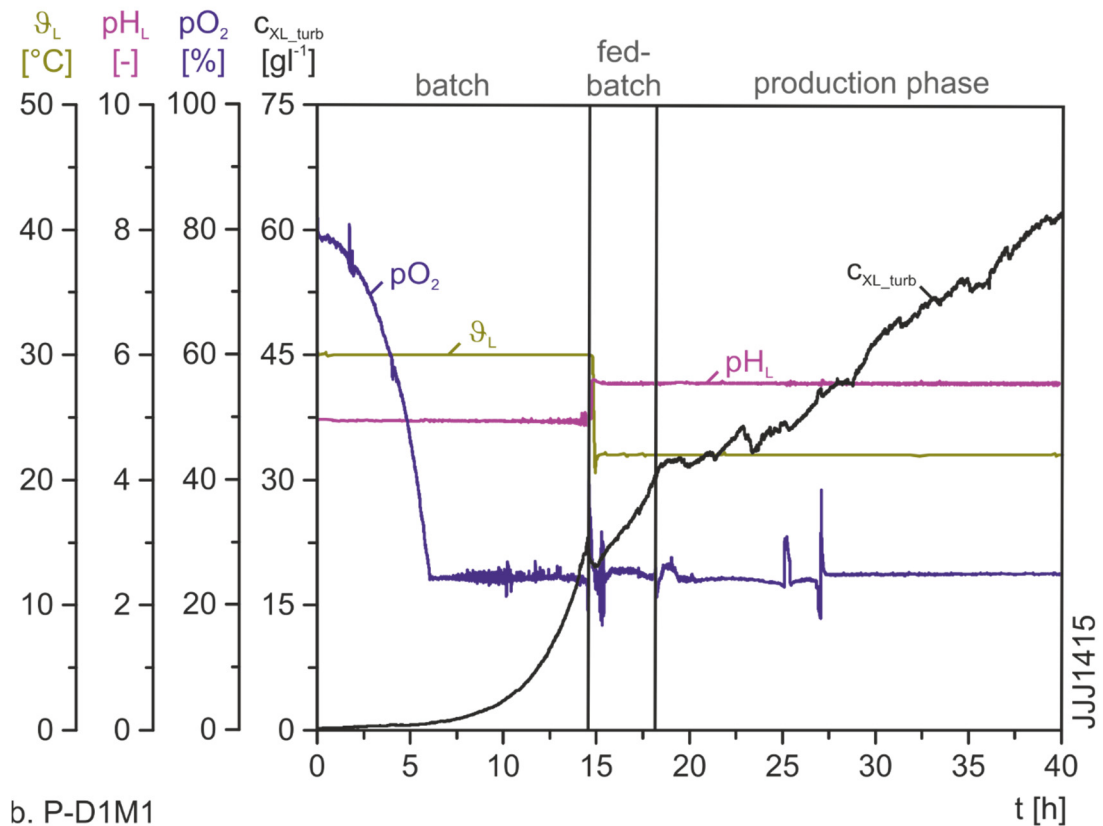
Die Herkunft der innerhalb dieser Arbeit verwendeten Ausgangsmaterialien ist nachfolgend tabellarisch dargestellt.

Tab. 7.1: Tabellarische Zusammenfassung der Fermentationen zur Produktion der Ausgangsmaterialien

Kennzeichnung	Produkt	Strategie	Verwendung
JJJ1415	D1M1-His	<i>batch</i> und <i>fed-batch</i> auf Glycerol, Produktionsphase auf Methanol	Kulturüberstand für Stabilitätsstudien in Kap. 5.1.1
JL1513	D1M1-His	RFB-Strategie, <i>start-up</i> (su) und Zyklus 1 (c1)	Kulturüberstand für IMAC-Optimierungsprozedur in Kap. 5.2.3
FS0913	P-D1M1	RFB-Strategie, <i>start-up</i> (su) und 6 Zyklen (c1-c6)	Cu ²⁺ -EBA IMAC-Eluat für MMC-Optimierungsprozedur in Kap. 5.3.3.
FS0813	P-D1M1	RFB-Strategie, <i>start-up</i> (su) und 6 Zyklen (c1-c6)	Kulturüberstand für IMAC-Optimierungsprozedur in Kap. 5.2.3
SJ1912	P-D1M1	RFB-Strategie, <i>start-up</i> (su) und 6 Zyklen (c1-c6)	Kulturüberstand für IMAC-Optimierungsprozedur in Kap. 5.2.3

7.2 Kultivierungen zur Herstellung der Ausgangsmaterialien

a. D1M1-His



b. P-D1M1

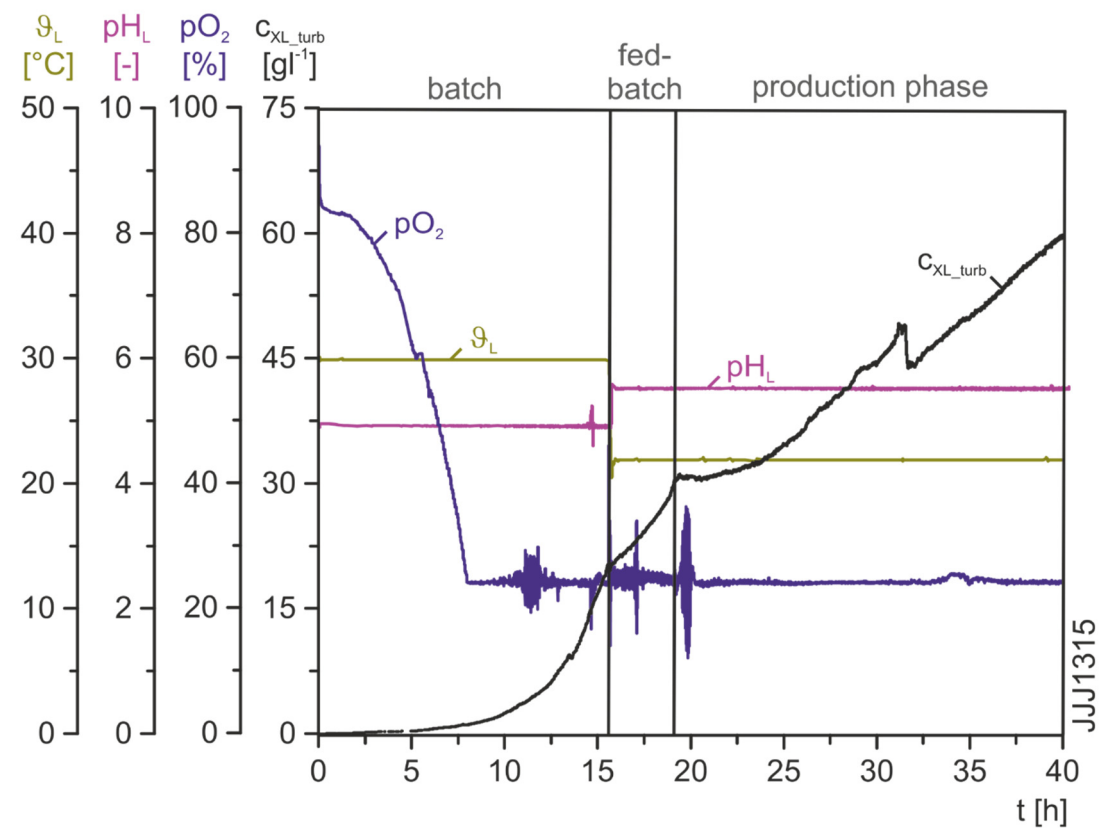


Abb. 7.1: Prozessgrößenverlauf der Fermentationen a. JJJ1415 und b. JJJ1315.

7.3 Ermittelte Parameter der Adsorptionsisothermen

Tab. 7.2: Ermittelte Parameter der Adsoption von D1M1-His an IMAC-Adsorbentien mit unterschiedlichen immobilisierten Metallionen

Adsorbermaterial	Metallion	Q_{P3max_stat}	\pm	S_{QP3max}	K_D	\pm	S_{KD}
Chelating Sepharose™ Fast Flow	Co ²⁺	33.3	\pm	3.6 mgml ⁻¹	0.23	\pm	0.11 mgml ⁻¹
	Cu ²⁺	40.8	\pm	2.8 mgml ⁻¹	0.62	\pm	0.12 mgml ⁻¹
	Ni ²⁺	45.8	\pm	1.3 mgml ⁻¹	0.16	\pm	0.02 mgml ⁻¹
	Zn ²⁺	55.8	\pm	5.4 mgml ⁻¹	1.71	\pm	0.39 mgml ⁻¹
Ni Sepharose™ Fast Flow	Co ²⁺	31.6	\pm	1.8 mgml ⁻¹	0.40	\pm	0.08 mgml ⁻¹
	Cu ²⁺	38.3	\pm	10.5 mgml ⁻¹	3.05	\pm	1.58 mgml ⁻¹
	Ni ²⁺	33.7	\pm	1.9 mgml ⁻¹	0.10	\pm	0.02 mgml ⁻¹
	Zn ²⁺	51.1	\pm	4.4 mgml ⁻¹	2.10	\pm	0.38 mgml ⁻¹
IMAC Sepharose™ Fast Flow	Co ²⁺	27.2	\pm	2.7 mgml ⁻¹	0.90	\pm	0.24 mgml ⁻¹
	Cu ²⁺	39.8	\pm	11.3 mgml ⁻¹	4.50	\pm	2.28 mgml ⁻¹
	Ni ²⁺	35.6	\pm	0.8 mgml ⁻¹	0.27	\pm	0.02 mgml ⁻¹
	Zn ²⁺	42.83	\pm	5.9 mgml ⁻¹	3.35	\pm	0.87 mgml ⁻¹
Streamline™ Chelating	Co ²⁺	34.6	\pm	9.5 mgml ⁻¹	0.62	\pm	0.49 mgml ⁻¹
	Cu ²⁺	31.5	\pm	2.4 mgml ⁻¹	1.34	\pm	0.24 mgml ⁻¹
	Ni ²⁺	34.6	\pm	3.1 mgml ⁻¹	0.29	\pm	0.10 mgml ⁻¹
	Zn ²⁺	33.9	\pm	6.2 mgml ⁻¹	1.38	\pm	0.61 mgml ⁻¹

7.4 Rohdaten der SVP-Analyse der chromatographischen Methoden

Tab. 7.3: Rohdaten der SVP-Analyse der IMAC-Aufreinigung von P-D1M1

Exp. Nr. [Nj]	Einflussfaktoren					Gütekriterien	
	pH _c [-]	C _{NaClC} [M]	C _{Imie1C} [mM]	F _{VsAc} [mlmin ⁻¹]	F _{VsYc} [mlmin ⁻¹]	P _{P1e2C} [%]	Y _{P1C} [%]
Screening							
N1	6.00	0.5	0.00	0.50	2.50	34.0	37.0
N2	8.50	0.5	0.00	0.50	0.50	37.0	47.0
N3	6.00	0.9	0.00	0.50	0.50	18.0	36.0
N4	8.50	0.9	0.00	0.50	2.50	33.8	38.0
N5	6.00	0.5	20.00	0.50	0.50	92.0	115.0
N6	8.50	0.5	20.00	0.50	2.50	96.0	69.0
N7	6.00	0.9	20.00	0.50	2.50	88.0	120.0
N8	8.50	0.9	20.00	0.50	0.50	92.0	58.0
N9	6.00	0.5	0.00	2.50	0.50	34.0	51.9
N10	8.50	0.5	0.00	2.50	2.50	47.0	64.0
N11	6.00	0.9	0.00	2.50	2.50	49.0	51.1
N12	8.50	0.9	0.00	2.50	0.50	38.0	67.0
N13	6.00	0.5	20.00	2.50	2.50	82.0	91.0
N14	8.50	0.5	20.00	2.50	0.50	68.0	42.0
N15	6.00	0.9	20.00	2.50	0.50	45.0	73.0
N16	8.50	0.9	20.00	2.50	2.50	86.0	37.7
N17	7.25	0.7	10.00	1.50	1.50	65.0	66.0
N18	7.25	0.7	10.00	1.50	1.50	62.0	67.0
N19	7.25	0.7	10.00	1.50	1.50	59.0	58.0
Optimierung							
N1	6.25		8.00	0.50		52.0	57.0
N2	6.25		8.00	1.00		62.0	58.0
N3	6.25		16.00	0.50		80.0	74.2
N4	6.25		16.00	1.00		78.0	49.9
N5	7.25		8.00	0.50		85.0	37.0
N6	7.25		8.00	1.00		71.0	54.0
N7	7.25		16.00	0.50		94.0	37.0
N8	7.25		16.00	1.00		79.0	31.1
N9	6.75		12.00	0.40		76.0	52.0
N10	6.75		12.00	1.10		70.0	60.0
N11	6.75		6.34	0.75		70.0	46.0
N12	6.75		17.66	0.75		86.0	47.0
N13	6.04		12.00	0.75		65.0	74.2
N14	7.46		12.00	0.75		78.0	42.0
N15	6.75		12.00	0.75		76.0	64.0
N16	6.75		12.00	0.75		79.0	67.0
N17	6.75		12.00	0.75		81.0	68.0
Robustheitstest							
N1	6.50		12.00	0.70		73.7	62.6
N2	6.30		12.00	0.80		75.7	57.9
N3	6.30		14.00	0.70		75.9	53.9
N4	6.50		14.00	0.80		72.4	60.9
N5	6.40		13.00	0.75		73.9	62.6
N6	6.40		13.00	0.75		76.0	59.2
N7	6.40		13.00	0.75		77.2	65.8

Tab. 7.4: Rohdaten der SVP-Analyse der IMAC-Aufreinigung von D1M1-His

Exp. Nr. [Nj]	Einflussfaktoren					Gütekriterien	
	pH _c [-]	C _{NaClC} [M]	F _{VsAc} [mlmin ⁻¹]	C _{Imie1C} [mM]	C _{Imie2C} [mM]	P _{P3e2C} [%]	Y _{P3C} [%]
Screening							
N1	5.50	0.10	0.50	5.0	250	76.0	57.2
N2	9.50	0.10	0.50	5.0	100	53.6	102.1
N3	5.50	1.00	0.50	5.0	100	87.6	48.9
N4	9.50	1.00	0.50	5.0	250	46.7	79.8
N5	5.50	0.10	5.00	5.0	100	77.7	37.3
N6	9.50	0.10	5.00	5.0	250	60.5	90.3
N7	5.50	1.00	5.00	5.0	250	38.8	1.4
N8	9.50	1.00	5.00	5.0	100	45.2	129.1
N9	5.50	0.10	0.50	40.0	100	72.7	24.5
N10	9.50	0.10	0.50	40.0	250	69.9	29.4
N11	5.50	1.00	0.50	40.0	250	87.4	41.4
N12	9.50	1.00	0.50	40.0	100	89.0	43.4
N13	5.50	0.10	5.00	40.0	250	78.0	21.7
N14	9.50	0.10	5.00	40.0	100	85.9	52.0
N15	5.50	1.00	5.00	40.0	100	90.1	24.7
N16	9.50	1.00	5.00	40.0	250	75.5	41.0
N17	7.50	0.55	2.75	22.5	175	90.0	59.3
N18	7.50	0.55	2.75	22.5	175	89.6	52.5
N19	7.50	0.55	2.75	22.5	175	92.9	71.9
Optimierung							
N1	7.50			8.0		82.4	49.9
N2	9.50			8.0		83.1	54.7
N3	7.50			20.0		88.0	40.5
N4	9.50			20.0		88.7	42.4
N5	7.09			14.0		86.8	40.0
N6	9.92			14.0		85.7	36.2
N7	8.50			5.5		78.1	66.9
N8	8.50			22.5		85.2	48.0
N9	8.50			14.0		87.4	48.4
N10	8.50			14.0		88.0	45.4
N11	8.50			14.0		87.8	46.3
N12	7.50			8.0		82.4	49.9
N13	9.50			8.0		83.1	54.7
N14	7.50			20.0		88.0	40.5
N15	9.50			20.0		88.7	42.4
N16	7.09			14.0		86.8	40.0
N17	9.92			14.0		85.7	36.2
Robustheitstest							
N1	8.40			11.0		88.0	55.2
N2	8.40			13.0		86.4	62.4
N3	8.60			11.0		91.2	65.5
N4	8.60			13.0		89.5	66.4
N5	8.50			12.0		87.0	59.4
N6	8.50			12.0		86.4	65.7
N7	8.50			12.0		86.8	66.5

Tab. 7.5: Rohdaten der SVP-Analyse der MMC-Aufreinigung von P-D1M1

Exp. Nr. [Nj]	Einflussfaktoren					Gütekriterien	
	F _{Vsac} [mlmin ⁻¹]	F _{Vsyc} [mlmin ⁻¹]	pH _{e2C} [-]	pH _{e1C} [-]	C _{NaClC} [M]	P _{P1e2C} [%]	Y _{P1C} [%]
Screening							
N1	2.0	2.0	3.50	7.20	1.50	9.5	82.0
N2	8.0	2.0	3.50	7.20	0.00	94.6	44.0
N3	2.0	8.0	3.50	7.20	0.00	79.6	40.0
N4	8.0	8.0	3.50	7.20	1.50	14.3	91.0
N5	2.0	2.0	5.00	7.20	0.00	73.6	39.0
N6	8.0	2.0	5.00	7.20	1.50	10.2	90.0
N7	2.0	8.0	5.00	7.20	1.50	0.0	0.0
N8	8.0	8.0	5.00	7.20	0.00	45.0	38.0
N9	2.0	2.0	3.50	8.50	0.00	85.0	46.0
N10	8.0	2.0	3.50	8.50	1.50	32.4	89.0
N11	2.0	8.0	3.50	8.50	1.50	20.9	90.0
N12	8.0	8.0	3.50	8.50	0.00	90.2	40.0
N13	2.0	2.0	5.00	8.50	1.50	17.2	91.0
N14	8.0	2.0	5.00	8.50	0.00	35.0	20.0
N15	2.0	8.0	5.00	8.50	0.00	34.9	19.0
N16	8.0	8.0	5.00	8.50	1.50	8.7	92.0
N17	5.0	5.0	4.25	7.85	0.75	61.4	68.0
N18	5.0	5.0	4.25	7.85	0.75	62.8	71.0
N19	5.0	5.0	4.25	7.85	0.75	60.0	70.0
Optimierung							
N1			3.80		0.40	39.0	79.8
N2			3.80		0.80	95.0	57.4
N3			4.20		0.40	40.0	99.5
N4			4.20		0.80	76.0	56.7
N5			4.00		0.32	35.0	98.8
N6			4.00		0.88	98.0	55.0
N7			3.72		0.60	48.0	65.4
N8			4.28		0.60	42.0	66.1
N9			4.00		0.60	44.0	65.3
N10			4.00		0.60	44.0	70.8
N11			4.00		0.60	42.0	68.7
N12			3.80		0.40	39.0	79.8
N13			3.80		0.80	95.0	57.4
N14			4.20		0.40	40.0	99.5
N15			4.20		0.80	76.0	56.7
N16			4.00		0.32	35.0	98.8
N17			4.00		0.88	98.0	55.0
Robustheitstest							
N1			3.80		0.70	64.7	84.3
N2			4.00		0.70	70.2	94.7
N3			3.80		0.76	64.8	87.9
N4			4.00		0.76	67.4	77.5
N5			3.90		0.73	71.4	90.9
N6			3.90		0.73	67.7	81.2
N7			3.90		0.73	69.8	85.1

8 Literatur

Abboud, L. und Hensley, S.: *New prescription for drug makers: update the plants*, The Wall Street Journal, 2003, 3.

Academic: *Gegenstromverteilungschromatographie*, URL: <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/2312854/Gegenstromverteilungschromatographie>, Zugriff: Juli 2015.

Agnandji, S. T.; Lell, B.; Soulanoudjingar, S. S.; Fernandes, J. F.; Abossolo, B. P.; Conzelmann, C. et al.: *First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children*, N. Engl. J. Med., 2011, 365, 1863-1875.

Ahmad, M.; Hirz, M.; Pichler, H.; Schwab, H.: *Protein expression in Pichia pastoris: recent achievements and perspectives for heterologous protein production*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2014, 98, 5301-5317.

Anspach, F. B.; Curbelo, D.; Hartmann, R.; Garke, G.; Deckwer, W.: *Expanded-bed chromatography in primary protein purification*, Journal of Chromatography A, 1999, 865, 129-144.

Antos, D. und Seidel-Morgenstern, A.: *Application of gradients in the simulated moving bed process*, Chemical Engineering Science, 2001, 56, 6667-6682.

Arama, C. und Troye-Blomberg, M.: *The path of malaria vaccine development: challenges and perspectives*, J. Intern. Med., 2014, 275, 456-466.

Aumann, L. und Morbidelli, M.: *A continuous multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP) process*, Biotechnol. Bioeng., 2007, 98, 1043-1055.

Bai, T.; Becker, M.; Gupta, A.; Strike, P.; Murphy, V. J.; Anders, R. F. et al.: *Structure of AMA1 from Plasmodium falciparum reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2005, 102, 12736-12741.

Beaver, L. A. und Ferreira, G.: *Practical Regulatory and QbD Tools to Bring Biomolecules to Market and Keep Them There*, Workshop, Prep, 2014.

Bejon, P.; Cook, J.; Bergmann-Leitner, E.; Olotu, A.; Lusingu, J.; Mwacharo, J. et al.: *Effect of the pre-erythrocytic candidate malaria vaccine RTS,S/AS01E on blood stage immunity in young children*, J. Infect. Dis., 2011, 204, 9-18.

Blackman, M. J. und Holder, A. A.: *Secondary processing of the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 (MSP1) by a calcium-dependent membrane-bound serine protease: shedding of MSP1 33 as a noncovalently associated complex with other fragments of the MSP1*, Mol. Biochem. Parasitol., 1992, 50, 307-315.

- Blackman, M. J.; Ling, I. T.; Nicholls, S. C.; Holder, A. A.: *Proteolytic processing of the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains*, Mol. Biochem. Parasitol., 1991, 49, 29-33.
- Blackman, M. J.; Heidrich, H. G.; Donachie, S.; McBride, J. S.; Holder, A. A.: *A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies*, J. Exp. Med., 1990, 172, 379-382.
- Block, H.; Maertens, B.; Spriestersbach, A.; Brinker, N.; Kubicek, J.; Fabis, R. et al.: *Reprint of: immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review*, Protein Expr. Purif., 2011.
- Borchert, S.-O.; Paul, J.; Schuetzmeier, F.; Voß, T.; Luttmann, R.; Cornelissen, G.: *Development of an Integrated Bioprocess for Production of Potential Malaria Vaccines with Pichia pastoris*, Preprints of the 12th IFAC Symposium on Computer Applications in Biotechnology, 2013, 12, 6-11.
- Borchert, S.-O.; Voss, T.; Schuetzmeier, F.; Paul, J.; Cornelissen, G.; Luttmann, R.: *Development and monitoring of an integrated bioprocess for production of a potential malaria vaccine with Pichia pastoris*, J. Process Control, 2015, 35, 113-126.
- Brierley, R. A.: *Secretion of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-I)*, Methods Mol. Biol., 1998, 103, 149-177.
- Buchacher, A.; Iberer, G.; Jungbauer, A.; Schwinn, H.; Josic, D.: *Continuous removal of protein aggregates by annular chromatography*, Biotechnol. Prog., 2001, 17, 140-149.
- Carta, G. und Jungbauer, A.: *Protein Chromatography: Process Development and Scale-Up*, Weinheim, John Wiley & Sons, 1, 2011.
- Cereghino, J. L. und Cregg, J. M.: *Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*, FEMS Microbiol. Rev., 2000, 24,45-66.
- Chmiel, H.: *Bioprozesstechnik*, Springer-Verlag, 2011.
- Clare, J. J.; Romanes, M. A.; Rayment, F. B.; Rowedder, J. E.; Smith, M. A.; Payne, M. M. et al.: *Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using Pichia pastoris strains containing multiple gene copies*, Gene, 1991, 105, 205-212.
- Cowman, A. F. und Crabb, B. S.: *Invasion of red blood cells by malaria parasites*, Cell, 2006, 124, 755-766.
- Cregg, J. M.; Vedvick, T. S.; Raschke, W. C.: *Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in Pichia pastoris*, Bio/Technology, 1993, 11, 905-910.

- Curvers, S.; Brixius, P.; Klauser, T.; Thommes, J.; Weuster-Botz, D.; Takors, R. et al.: *Human Chymotrypsinogen B Production with Pichia pastoris by Integrated Development of Fermentation and Downstream Processing. Part 1. Fermentation*, Biotechnol. Prog., 2001, 17, 495-502.
- De Schutter, K.; Lin, Y.; Tiels, P.; Van Hecke, A.; Glinka, S.; Weber-Lehmann, J. et al.: *Genome sequence of the recombinant protein production host Pichia pastoris*, Nat. Biotechnol., 2009, 27, 561-566.
- Dondorp, A. M.; Nosten, F.; Yi, P.; Das, D.; Phyto, A. P.; Tarning, J. et al.: *Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Malaria*, N. Engl. J. Med., 2009, 361, 455-467.
- Doolan, D. L. und Hoffman, S. L.: *Multi-gene vaccination against malaria: a multistage, multi-immune response approach*, Parasitology Today, 1997, 13, 171-178.
- Dukart, A.: *Implementierung von Quality by Design zur Optimierung chromatographischer Prozesse am Beispiel biopharmazeutischer Proteine*, Masterthesis, HAW Hamburg, 2013.
- Ellgaard, L.; Molinari, M.; Helenius, A.: *Setting the standards: quality control in the secretory pathway*, Science, 1999, 286, 1882-1888.
- Elliott, S. R. und Beeson, J. G.: *Estimating the Burden of Global Mortality in Children Aged <5 Years by Pathogen-Specific Causes*, Clin. Infect. Dis., 2008, 46, 1794-1795.
- Engelhardt, H. und Rohrschneider, L.: *Deutsche chromatographische Grundbegriffe zur IUPAC-Nomenklatur*, 1995.
- Engels, J. W. und Lottspeich, F.: *Bioanalytik*, Springer, 2012.
- Engwerda, C. R. und Good, M. F.: *Disarming the malaria parasite*, Nat. Med., 2008, 14, 912-913.
- Eriksson, L.; Johansson, E.; Kettaneh-Wold, N.; Wikström, C.; Wold, S.: *Design of experiments: principles and applications*, Umeå, MKS Umetrics AB, 2008.
- Faber, B. W.; Remarque, E. J.; Kocken, C. H.; Cheront, P.; Cingolani, D.; Xhonneux, F. et al.: *Production, quality control, stability and pharmacotoxicity of cGMP-produced Plasmodium falciparum AMA1 FVO strain ectodomain expressed in Pichia pastoris*, Vaccine, 2008, 26, 6143-6150.
- Faber, B. W.; Younis, S.; Remarque, E. J.; Rodriguez Garcia, R.; Riasat, V.; Walraven, V. et al.: *Diversity covering AMA1-MSP119 fusion proteins as malaria vaccines*, Infect. Immun., 2013, 81, 1479-1490.
- Fazekas, B.: *An eradicating vaccine for Plasmodium falciparum: Possibility or Pipe-dream?*, Cambridge Medicine Journal, 2011.

FDA: KALBITOR® (*ecallantide*), URL: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DrugSafety/UCM192722.pdf>, Zugriff: Juli 2015.

Gaberc-Porekar, V. und Menart, V.: *Potential for using histidine tags in purification of proteins at large scale*, Chem. Eng. Technol., 2005, 28, 1306-1314.

Gaberc-Porekar, V. und Menart, V.: *Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography*, J. Biochem. Biophys. Methods, 2001, 49, 335-360.

Garman, S. C.; Simcoke, W. N.; Stowers, A. W.; Garboczi, D. N.: *Structure of the C-terminal domains of merozoite surface protein-1 from Plasmodium knowlesi reveals a novel histidine binding site*, J. Biol. Chem., 2003, 278, 7264-7269.

Gasser, B.; Saloheimo, M.; Rinas, U.; Dragosits, M.; Rodriguez-Carmona, E.; Baumann, K. et al.: *Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview*, Microb. Cell. Fact., 2008, 7, 11-2859-7-11.

GE Healthcare Bio-Sciences AB: *Multimodal Chromatography*, 2013.

GE Healthcare Bio-Sciences AB: *Affinity Chromatography: Principles and Methods*, 2007.

GE Healthcare Bio-Sciences AB: *Size Exclusion Chromatography: Principles and Methods*, 2000.

GE Healthcare Inc.: *Capto Qimp*, Data file 28-9837-63 AD, 2014.

GE Healthcare Inc.: *Capto adhere*, Instructions 28-9064-05 AC, 2012.

Gilar, M.; Yu, Y.; Ahn, J.; Fournier, J.; Gebler, J. C.: *Mixed-mode chromatography for fractionation of peptides, phosphopeptides, and sialylated glycopeptides*, Journal of Chromatography A, 2008, 1191, 162-170.

Gleeson, M. A.; White, C. E.; Meininger, D. P.; Komives, E. A.: *Generation of protease-deficient strains and their use in heterologous protein expression*, 1998, 81-94.

Good, M. F.; Kaslow, D. C.; Miller, L. H.: *Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine*, Annu. Rev. Immunol., 1998, 16, 57-87.

Gordon, D. M.; McGovern, T. W.; Krzych, U.; Cohen, J. C.; Schneider, I.; LaChance, R. et al.: *Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine*, J. Infect. Dis., 1995, 171, 1576-1585.

Gottschalk, U.: *The Future of Downstream Processing*, URL: <http://www.biopharminternational.com/future-downstream-processing-2013?id=&pageID=1&sk=&date=>, Zugriff: Dezember 2015.

- Gottschalk, U.; Brorson, K.; Shukla, A. A.: *The need for innovation in biomanufacturing*, Nat. Biotechnol., 2012, 30, 489-492.
- Gustavsson, M.; Lehtio, J.; Denman, S.; Teeri, T. T.; Hult, K.; Martinelle, M.: *Stable linker peptides for a cellulose-binding domain-lipase fusion protein expressed in Pichia pastoris*, Protein Eng., 2001, 14, 711-715.
- Hacker, D. L.; De Jesus, M.; Wurm, F. M.: *25 years of recombinant proteins from reactor-grown cells – where do we go from here?*, Biotechnol. Adv., 2009, 27, 1023-1027.
- Hamilton, G. E.; Luechau, F.; Burton, S. C.; Lyddiatt, A.: *Development of a mixed mode adsorption process for the direct product sequestration of an extracellular protease from microbial batch cultures*, J. Biotechnol., 2000, 79, 103-115.
- Hashimoto, K.; Adachi, S.; Shirai, Y.: *Continuous desalting of proteins with a simulated moving-bed adsorber*. Agric. Biol. Chem., 1988, 52, 2161-2167.
- Hodder, A. N.; Crewther, P. E.; Matthew, M. L.; Reid, G. E.; Moritz, R. L.; Simpson, R. J. et al.: *The disulfide bond structure of Plasmodium apical membrane antigen-1*, J. Biol. Chem., 1996, 271, 29446-29452.
- Holder, A.: *The carboxy-terminus of merozoite surface protein 1: structure, specific antibodies and immunity to malaria*, Parasitology, 2009, 136, 1445-1456.
- Holder, A.; Sandhu, J.; Hillman, Y.; Davey, L. S.; Nicholls, S.; Cooper, H. et al.: *Processing of the precursor to the major merozoite surface antigens of Plasmodium falciparum*, Parasitology, 1987, 94, 199-208.
- Holder, A. A.; Blackman, M. J.; Burghaus, P. A.; Chappel, J. A.; Ling, I. T.; McCallum-Deighton, N. et al.: *A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function*, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1992, 87, 37-42.
- Howell, S. A.; Withers-Martinez, C.; Kocken, C. H.; Thomas, A. W.; Blackman, M. J.: *Proteolytic processing and primary structure of Plasmodium falciparum apical membrane antigen-1*, J. Biol. Chem., 2001, 276, 31311-31320.
- Iván, G.; Szabadka, Z.; Ördög, R.; Grolmusz, V.; Náray-Szabó, G.: *Four spatial points that define enzyme families*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2009, 383, 417-420.
- Jahic, M.; Gustavsson, M.; Jansen, A.; Martinelle, M.; Enfors, S.O.: *Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in Pichia pastoris fed-batch processes*, J. Biotechnol., 2003a, 102, 45-53.
- Jahic, M.; Wallberg, F.; Bollok, M.; Garcia, P.; Enfors, S. O.: *Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in Pichia pastoris bioreactor cultures*, Microb. Cell. Fact., 2003b, 2, 6.

Janson, J.: *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications*, Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, 2011.

Jones, E. W.: *Three proteolytic systems in the yeast Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem., 1991, 266, 7963-7966.

Jungbauer, A.: *Continuous downstream processing of biopharmaceuticals*, Trends Biotechnol., 2013, 31, 479-492.

Kalbfuss, B.; Flockerzi, D.; Seidel-Morgenstern, A.; Reichl, U.: *Size-exclusion chromatography as a linear transfer system: Purification of human influenza virus as an example*, Journal of Chromatography B, 2008, 873, 102-112.

Kaleas, K. A.; Schmelzer, C. H.; Pizarro, S. A.: *Industrial case study: Evaluation of a mixed-mode resin for selective capture of a human growth factor recombinantly expressed in E. coli*, Journal of Chromatography A, 2010, 1217, 235-242.

Kallberg, K.; Johansson, H.; Bulow, L.: *Multimodal chromatography: an efficient tool in downstream processing of proteins*, Biotechnology journal, 2012, 7, 1485-1495.

Kessler, R. W.: *Prozessanalytik: Strategien und Fallbeispiele aus der industriellen Praxis*, John Wiley & Sons, 2012.

Lamarque, M.; Besteiro, S.; Papoin, J.; Roques, M.; Vulliez-Le Normand, B.; Morlon-Guyot, J. et al.: *The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites*, PLoS pathogens, 2011, 7.

Li, P.; Xiu, G.; Rodrigues, A. E.: *Proteins separation and purification by salt gradient ion-exchange SMB*, AIChE J., 2007, 53, 2419-2431.

Li, P.; Yu, J.; Xiu, G.; Rodrigues, A. E.: *Separation Region and Strategies for Proteins Separation by Salt Gradient Ion-Exchange SMB*, Sep. Sci. Technol., 2008, 43, 11-28.

Lücke, J. et al.: *Medizinische Biotechnologie in Deutschland 2005 - 2015 - 2025: Bedeutung für Patienten, Gesellschaft und Standort*, vfa bio, 10. Biotech-Report, 2015.

Luttmann, R.; Borchert, S.-O.; Mueller, C.; Loegering, K.; Aupert, F.; Weyand, S. et al.: *Sequential/parallel production of potential Malaria vaccines – A direct way from single batch to quasi-continuous integrated production*, J. Biotechnol., 2015, 213, 83-96.

Maria, S.; Joucla, G.; Garbay, B.; Dieryck, W.; Lomenech, A.; Santarelli, X. et al.: *Purification process of recombinant monoclonal antibodies with mixed mode chromatography*, Journal of Chromatography A, 2015, 1393, 57-64.

Martens, S.: *Analyse und Synthese von zyklischen Herstellungsprozessen artifizieller Diversity Covering (DiCo) Malariavakzinkandidaten*, Dissertation, Universität Hannover, 2014.

- Mattanovich, D.; Graf, A.; Stadlmann, J.; Dragosits, M.; Redl, A.; Maurer, M. et al.: *Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host Pichia pastoris*, *Microb. Cell. Fact.*, 2009, 8, 1.
- McBride, J. S. und Heidrich, H.: *Fragments of the polymorphic Mr 185 000 glycoprotein from the surface of isolated Plasmodium falciparum merozoites form an antigenic complex*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1987, 23, 71-84.
- McLaughlin, L. W.: *Mixed-mode chromatography of nucleic acids*, *Chem. Rev.*, 1989, 89, 309-319.
- Moore, C. M. V.: *Präsentation: A Regulatory Perspective on the Current and Future State of Pharmaceutical Quality*, URL: <http://www.fda.gov/downloads/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/UCM359267.pdf>, Zugriff: August 2015.
- Morgan, W. D.; Birdsall, B.; Frenkiel, T. A.; Gradwell, M. G.; Burghaus, P. A.; Syed, S. E. et al.: *Solution structure of an EGF module pair from the Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1*, *J. Mol. Biol.*, 1999, 289, 113-122.
- Müller-Späth, T.; Aumann, L.; Melter, L.; Ströhlein, G.; Morbidelli, M.: *Chromatographic separation of three monoclonal antibody variants using multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP)*, *Biotechnol. Bioeng.*, 2008, 100, 1166-1177.
- Narum, D. L. und Thomas, A. W.: *Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of Plasmodium falciparum merozoites*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1994, 67, 59-68.
- Nelder, J. A. und Mead, R.: *A simplex method for function minimization*, *The computer journal*, 1965, 7, 308-313.
- Pace, C. N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G.; Gray, T.: *How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein*, *Protein Sci.*, 1995, 4, 2411-2423.
- Paredes, G.; Makart, S.; Stadler, J.; Mazzotti, M.: *Simulated moving bed operation for size exclusion plasmid purification*, *Chem. Eng. Technol.*, 2005, 28, 1335-1345.
- PATH Malaria Vaccine Initiative: URL: <http://www.malariavaccine.org/malvac-approaches.php>, Zugriff: Januar 2015.
- Patil, C. und Walter, P.: *Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals*, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2001, 13, 349-355.
- Pharmazeutische Zeitung online: *Malaria: Lebensrettende Prophylaxe und Therapie*, URL: <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/?id=33154>, Zugriff: Juni 2015.

Porath, J. und Flodin, P.: *Gel filtration: a method for desalting and group separation*, Nature, 1959, 183, 1657-1659.

Privates Tropeninstitut Dr. Gontard: *Tropeninstitut - Schutz vor Malaria - Prophylaxe - Standby*, URL: <http://tropeninstitut.de/malaria/schutz.php>, Zugriff: Juni 2015.

Rathore, A. S. und Winkle, H.: *Quality by design for biopharmaceuticals*, Nat. Biotechnol., 2009, 27, 26-34.

Remarque, E. J.; Faber, B. W.; Kocken, C. H.; Thomas, A. W.: *Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review*, Trends Parasitol., 2008a, 24, 74-84.

Remarque, E. J.; Faber, B. W.; Kocken, C. H.; Thomas, A. W.: *A diversity-covering approach to immunization with Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 induces broader allelic recognition and growth inhibition responses in rabbits*, Infect. Immun., 2008b, 76, 2660-2670.

Richards, J. S. und Beeson, J. G.: *The future for blood-stage vaccines against malaria*, Immunol. Cell Biol., 2009, 87, 377-390.

Scalley, M. L. und Baker, D.: *Protein folding kinetics exhibit an Arrhenius temperature dependence when corrected for the temperature dependence of protein stability*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1997, 94, 10636-10640.

Schwartz, L.; Brown, G. V.; Genton, B.; Moorthy, V. S.: *A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table*, Malaria Journal, 2012.

Scopes, R. K.: *Protein purification: principles and practice*, Springer Science & Business Media, 2013.

Shapiro, S. S. und Wilk, M. B.: *An analysis of variance test for normality (complete samples)*, Biometrika, 1965, 591-611.

Siebertz, K.; van Bebber, D. T.; Hochkirchen, T.: *Statistische Versuchsplanung: Design of Experiments (DoE)*, Springer-Verlag, 2010.

Silvie, O.; Franetich, J. F.; Charrin, S.; Mueller, M. S.; Siau, A.; Bodescot, M. et al.: *A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by Plasmodium falciparum sporozoites*, J. Biol. Chem., 2004, 279, 9490-9496.

Sinha, J.; Plantz, B. A.; Inan, M.; Meagher, M.: *Causes of Proteolytic Degradation of Secreted Recombinant Proteins Produced in methylotrophic Yeast Pichia pastoris: Case Study With Recombinant Ovine Interferon-T*, Biotechnology and bioengineering, 2005, 89, 102-112.

Srinivasan, P.; Beatty, W. L.; Diouf, A.; Herrera, R.; Ambroggio, X.; Moch, J. K. et al.: *Binding of Plasmodium merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2011, 108, 13275-13280.

- Szarfman, A.: *Allelic forms of gp195, a major blood-stage antigen of Plasmodium falciparum, are expressed in liver stages*, J. Exp. Med., 1988, 167, 231-236.
- Takala, S. L. und Plowe, C. V.: *Genetic diversity and malaria vaccinedesign, testing and efficacy: preventing and overcoming 'vaccine resistant malaria'*, Parasite Immunol., 2009, 31, 560-573.
- Tanabe, K.; Mackay, M.; Goman, M.; Scaife, J. G.: *Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite Plasmodium falciparum*, J. Mol. Biol., 1987, 195, 273-287.
- Tanford, C.: *Protein denaturation*, Adv. Protein Chem., 1970, 24, 95.
- Timasheff, S. N.: *The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes?*, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 1993, 22, 67-97.
- Tosoh Bioscience: *Operating Conditions and Specifications - TSKgel SuperSW2000*, URL: <http://www.separations.eu.tosohbioscience.com/NR/rdonlyres/CEAC7FE8-105B-4C27-A286-CF23D8A0BBDB/0/DS1156SuperSW2000.pdf>, Zugriff: September 2015.
- Tswett, M.: *Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls*, Ber. Dtsch. Bot. Ges., 1906a, 24, 384-393.
- Tswett, M.: *Physikalisch-chemische Studien über das chlorophyll. Die Adsorptionen*, Ber. Dtsch. Bot. Ges., 1906b, 24, 316-223.
- U.S. National Institutes of Health: *Safety and Immunogenicity of Recombinant Pichia Pastoris AMA1-DiCo Candidate Malaria Vaccine With GLA-SE and Alhydrogel® as Adjuvant in Healthy Malaria Non-Exposed European and Malaria Exposed African Adults*, URL: <https://clinical-trials.gov/ct2/show/NCT02014727>, Zugriff: Mai 2015.
- UNAIDS: *Guidelines for the Treatment of Malaria*, World Health Organization, 2010.
- Uretschläger, A.; Einhauer, A.; Jungbauer, A.: *Continuous separation of green fluorescent protein by annular chromatography*, Journal of Chromatography A, 2001, 908, 243-250.
- US Food and Drug Administration: *ICH Q8 (R2)*, Pharmaceutical development, 2009.
- US Food and Drug Administration: *ICH Q9*, Quality Risk management, 2005.
- US Food and Drug Administration: *ICH Q10*, Pharmaceutical quality system, 2008.
- US Food and Drug Administration: *ICH Q11*, Development and manufacture of drug substances, 2011.

US Food and Drug Administration: *Guidance for Industry and Review Staff Target Product Profile - A Strategic Development Process Tool*, 2007.

Voß, T.: *Optimierung der Feinreinigung mit SEC in einem integrierten Bioprozess*, Projektbericht, HAW Hamburg, 2012.

Walter, J. K.; Feuser, J.: *Novel approach and technology in expanded bed adsorption techniques for primary recovery of proteins at large technical scale*, In *Extended reports from the 4th international conference on expanded bed adsorption*, 2003, 37.

Wang, W.: *Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals*, *Int. J. Pharm.*, 1999, 185, 129-188.

Wang, R.; Smith, J. D.; Kappe, S. H.: *Advances and challenges in malaria vaccine development*, *Expert Rev. Mol. Med.*, 2009, 11, 39.

World Health Organisation: *Tables of malaria vaccine projects globally*, URL: http://www.who.int/immunization/research/development/Rainbow_tables/en/, Zugriff: Januar 2015.

World Health Organisation: *WHO | World Malaria Report 2014*, URL: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/, Zugriff: Januar 2015.

Zhang, C.; Fredericks, D.; Campi, E. M.; Florio, P.; Jespersgaard, C.; Schiødt, C. B. et al.: *Purification of monoclonal antibodies by chemical affinity mixed mode chromatography*, *Separation and Purification Technology*, 2015, 142, 332-339.

Zhao, G.; Dong, X.; Sun, Y.: *Ligands for mixed-mode protein chromatography: principles, characteristics and design*, *J. Biotechnol.*, 2009, 144, 3-11.

Ziomek, G.; Kaspereit, M.; Jeżowski, J.; Seidel-Morgenstern, A.; Antos, D.: *Effect of mobile phase composition on the SMB processes efficiency: Stochastic optimization of isocratic and gradient operation*, *Journal of Chromatography A*, 2005, 1070, 111-124.

Persönliche Angaben

Name Jessica Thiesing-Paul geb. Paul
Geburtsdatum 24. März 1982
Geburtsort Stade
Staatsangehörigkeit deutsch

Werdegang

seit 2012 Promotion an der HAW Hamburg im Forschungs- und Transferzentrum Bioprozess und Analysetechnik (FTZ BPAT) in Kooperation mit dem Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover

2010-2012 Studium M.Sc. Biotechnology, HAW Hamburg

2006-2010 Studium B.Sc. Biotechnologie, HAW Hamburg

2005-2006 Fachoberschule Technik, Winsen (Luhe)

2002-2004 Chemielaborantin in der Qualitätssicherung, Bacardi Deutschland, Buxtehude

1999-2002 Ausbildung zur Chemielaborantin, Veterinärinstitut für Fische und Fischwaren, Cuxhaven

Nebentätigkeiten

2012-2015 Lehrbeauftragte in Physik- und Organische Chemie Praktikum an der HAW Hamburg, Fakultät Life Sciences

2012-2013 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, HAW Hamburg, FTZ BPAT

2007-2012 Tutorin in verschiedenen Fachbereichen der HAW Hamburg, Fakultät Life Sciences

2007-2012 Aushilfskraft als Chemielaborantin in der Qualitätssicherung, Bacardi Deutschland, Buxtehude