

Neue Aufarbeitungsstrategien für biologisch aktive Proteine am  
Beispiel des basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

genehmigte Dissertation

von

Svenja Nicolin Bolten, M.Sc.

2020

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

Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Ursula Rinas  
Institut für Technische Chemie  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 11.03.2020

*„Das Wichtigste ist, dass man nicht aufhört zu fragen.“*

Albert Einstein (1879 – 1955)

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper bedanken. Er hat mir die Möglichkeit gegeben, meine Dissertation am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover anzufertigen. Ich danke Ihm für das spannende Forschungsprojekt, die angenehme Arbeitsatmosphäre und den gewährten Freiraum bei der Bearbeitung meines Dissertationsthemas.

Ich danke ebenfalls Frau Prof. Dr. Ursula Rinas für die inhaltliche Unterstützung und die Übernahme des Korreferats. Für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes möchte ich Herrn PD Dr. Ulrich Krings danken.

Herrn Dr. Florian Taft und Herrn Dr. Lukas Kupracz der Sartorius AG und Dr. Lutz Mathe von GE Healthcare Life Sciences möchte ich für die Bereitstellung verschiedener Prototypen für die Bearbeitung meines Forschungsthemas danken.

Ein großes Dankeschön möchte ich Frau Dr. Iliyana Pepelanova für ihre schnelle und ausführliche Hilfe beim Verfassen meiner Dissertation aussprechen.

Frau Dr. Antonina Lavrentieva möchte ich für die Einführung in die Zellkultur und der Anleitung im Labor sowie für ihre Unterstützung bei den Laborexperimenten und dessen Auswertung danken.

Furthermore, I would like to special thanks Dr. Zhaopeng Li for answering many questions, discussing experiments and for analysing my results.

Danken möchte ich ebenfalls Martina Weiß und Martin Pähler, die in der Organisation der Labore des TCIs den Überblick behalten, sowie Ulrike Dreschel, Cornelia Alic und Christiane Hellwig, die bei Verwaltungsfragen und -aufgaben immer zur Seite standen. Mein Dank an Martina Weiß möchte ich an dieser Stelle besonders betonen, da ich ohne ihre Hilfe, Tipps und Geduld manche Versuche abgebrochen oder nie begonnen hätte. Vielen Dank!



Meinen Bacheloranden, insbesondere meiner Bachelorstudentin Anne-Sophie Knoll, die zielstrebig, engagiert und wissbegierig mit mir geforscht hat, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls danken.

Ein besonderer Dank geht ebenso an alle Kollegen, Mitdoktoranden und auch Freunden am TCI für die großartige Zeit während und nach der Arbeit. Dies gilt vor allem für meine Bürokollegen und dem Büro 265!

Ich danke ebenfalls meinen Freunden sowohl aus der Schulzeit als auch aus dem Studium „Life Science 2010“. Besonders danke ich Julia, Jana und Alina. Danke, dass ich mich in jeder Lebenslage auf euch verlassen kann.

Ein besonderer und herzlicher Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich in allen Lebenslagen unterstützt und immer in mich vertraut und an mich geglaubt haben.

## Kurzfassung

Heparin wird als biospezifischer Ligand zur Proteinaufreinigung in der Biotechnologie verwendet. Dieses Verfahren ist bei vielen Heparin-bindenden Proteinen sehr ergiebig. Heparin wird allerdings aus Schlachtabfällen von Schweinen gewonnen und birgt die Gefahr der Kontamination mit tierischen Pathogenen. Die aufgereinigten Proteine könnten aufgrund dessen ebenfalls kontaminiert sein, weshalb nach adäquaten Alternativen sowohl in der Biotechnologie als auch in der Pharmaindustrie geforscht wird.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden verschiedene Materialien mit synthetischen Liganden für die Aufreinigung des Modellproteins, dem basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF), untersucht. Die verwendeten Aufreinigungsmethoden konnten der Mixed-Mode-Chromatographie (MMC) und pseudo-Affinitätschromatographie zugeordnet werden. Bei der MMC werden Materialien mit multimodalen Liganden eingesetzt, welche aufgrund ihrer molekularen Zusammensetzung unterschiedliche Wechselwirkungen zum Analyten ausbilden können (ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Wechselwirkungen), traditionelle Chromatographien beruhen auf nur einer Art von Wechselwirkungen. Materialien bei der pseudo-Affinitätschromatographie besitzen pseudo-biospezifische Liganden, die synthetisch hergestellt werden. Bei den verwendeten Liganden handelte es sich um Heparin-ähnliche Moleküle, die auf der molekularen Struktur des Heparins basierten.

Es wurden acht multimodale und pseudo-biospezifische Materialien für die Aufreinigung des bFGF eingesetzt und im Capture-Schritt sowie im intermediären Aufreinigungsschritt in einer mehrstufigen Aufreinigung des bFGF getestet. Die Materialien wurden hinsichtlich Reinheit, Wiederfindungsrate und Ausbeute des bFGF bewertet. Durch die Verwendung der multimodalen Materialien HiTrap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup> MMC und Foresight<sup>TM</sup> Nuvia<sup>TM</sup> cPrime<sup>TM</sup> konnten zwei wirksame Alternativen ohne tierische Komponenten zur Aufreinigung des bioaktiven bFGF demonstriert werden.

**Stichworte:** Heparin-Affinitätschromatographie; Material nicht tierischen Ursprungs; Mixed-Mode-Chromatographie; pseudo-Affinitätschromatographie; bFGF; Säulenchromatographie; Membranchromatographie

## Abstract

Heparin is known for its therapeutic benefits in the treatment and prevention of thrombosis. It is also used in the biotech industry as a bio-specific ligand for protein purification. Heparin affinity chromatography is very efficient for the purification of various heparin-binding proteins. However, heparin is isolated from porcine intestines and entails the risk of contamination with animal pathogens. As a consequence, the purified proteins could also be contaminated. Therefore, both the biotech and the pharmaceutical industry are looking for an adequate alternative to heparin affinity chromatography.

This dissertation outlines various materials with synthetic ligands for heparin-free purification. Basic fibroblast growth factor (bFGF) was used as a model protein. The alternative ligands used in this work could be assigned to mixed-mode chromatography (MMC) and pseudo-affinity chromatography. Due to the molecular composition of their ligands, MMCs can undergo different interactions with the analyte (ionic interactions, hydrogen bonds, Van-der-Waals interactions), in contrast to traditional chromatography, which typically uses only one kind of interaction. Pseudo-affinity chromatography supports pseudo-specific ligands which are synthetically produced. In this case, heparin-like molecules based on heparin's molecular structure were tested as ligands.

Eight multimodal and pseudo-biospecific materials were used in the capture step and in the second purification step for the purification of bFGF. They were compared to one another by evaluating purity, recovery, and yield of bFGF after purification. Two of the tested synthetic phases – the MMC HiTrap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup> MMC and Foresight<sup>TM</sup> Nuvia<sup>TM</sup> cPrime<sup>TM</sup> – were demonstrated to be effective animal-component free alternatives for the purification of bioactive bFGF.

**Keywords:** Heparin affinity chromatography; animal-component free; mixed-mode-chromatography; pseudo-affinity chromatography; bFGF; column chromatography; membrane chromatography

## Abkürzungsverzeichnis

AEX	Anionenaustauschchromatographie
AT	Antithrombin
Apo	Apolipoprotein
bFGF	Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor, FGF-2
BMP	Knochenmorphogenetisches Protein (bone morphogenetic protein)
bp	Basenpaare
BP	Bindepuffer
BTM	Biotrockenmasse
BSA	Bovines Serumalbumin
CEX	Kationenaustauschchromatographie
CIP	Ortsgebundene Reinigung (Cleaning-In-Place)
CTB	CellTiter-Blue®
CV	Säulenvolumen (column volume)
DF	Durchfluss
DMEM	Dublecco's Modified Eagle's Medium
DO	Gelöstsauerstoff (dissolved oxygen)
DoE	Statistische Versuchsplanung (Design of Experiments)
DNB	Defined Non-inducing Broth
DTT	Dithiothreitol
EC <sub>50</sub>	Mittlere effektive Konzentration
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Elutionspuffer
EU	Endotoxin Unit
FCS	Fetales Kälberserum

FDA	Food and Drug Administration
FGFR	FGF-Rezeptor/Tyrosinkinase-Rezeptor
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfermessung
GMP	Gute Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice)
HB-EGF	Heparin-bindender Epidermaler Wachstumsfaktor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
IB	Einschlusskörperchen (inclusion bodies)
IEX	Ionenaustauschchromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LAL	Limulus Amebocyten Lysat
LB	Lysogeny Broth
MA	Membranadsorber
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
MWCO	Molekulargewichtsgrenzwert (molecular weight cut-off)
NP	Normalphasenchromatographie
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
ori	Replikationsstart (origin of replication)
pH	<i>Potentia hydrogenii</i>
pI	Isoelektrischer Punkt
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
S-DAB	Simple Defined Autoinduction Medium

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
Tris-Puffer	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Puffer
T <sub>m</sub>	Schmelzpunkt (melting point)
U	Enzymeinheit (μmol Substratumsatz pro min)
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
V <sub>N</sub>	Vitronektin

## Inhaltsverzeichnis

Zitat .....	I
Danksagung.....	II
Kurzfassung.....	IV
Abstract .....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung und Zielsetzung .....	1
2 Theoretischer Teil.....	3
2.1 Fibroblasten-Wachstumsfaktor .....	3
2.1.1 Struktur des bFGF .....	3
2.1.2 Biologische Funktion des bFGF .....	4
2.1.3 Medizinische Anwendung des bFGF.....	5
2.2 Aufarbeitungsstrategien für biologisch aktive Proteine.....	5
2.2.1 Struktureller Aufbau und biologische Funktion des Heparins.....	6
2.2.2 Analyse der Heparin-Protein Wechselwirkungen.....	7
2.2.3 Verwendung von Heparin in der Proteinaufreinigung .....	11
2.3 Alternative Methoden ohne tierische Komponenten zur Aufreinigung von biologisch aktiven Proteinen.....	12
2.3.1 Mixed-Mode-Chromatographie .....	12
2.3.2 Pseudo-Affinitätschromatographie.....	16
2.3.3 Anwendung alternativer Aufreinigungsmethoden.....	18
3 Experimenteller Teil .....	20
3.1 Kultivierung und Proteinexpression des bFGF.....	20
3.2 Etabliertes Aufarbeitungsverfahren des bFGF.....	24
3.2.1 Capture-Schritt per Kationenaustauschchromatographie.....	25
3.2.2 Aufreinigung des bFGF per Heparin-Affinitätschromatographie .....	27
3.2.3 Polishing-Schritt per Anionenaustauschchromatographie .....	28

3.2.4	Bestimmung des Endotoxingehalts.....	29
3.3	Aufreinigung des bFGF mittels alternativer chromatographischer Methoden ohne tierische Komponenten .....	30
3.3.1	Alternative Aufarbeitungsmethoden als Capture-Schritt in der Aufreinigung des bFGF .....	33
3.3.2	Alternative Aufarbeitungsmethoden als intermediärer Aufreinigungsschritt in der Aufreinigung des bFGF .....	45
3.3.3	Fazit.....	56
3.4	Variation der alternativen Aufreinigungsmethoden des bFGF .....	57
3.4.1	Aufreinigung des bFGF per MMC-Säule HiTrap™ Capto™ MMC.....	58
3.4.2	Aufreinigung des bFGF mittels der MMC-Säule Foresight™ Nuvia™ cPrime™ .....	60
3.4.3	Bestimmung der Proteasekonzentration.....	61
3.4.4	Fazit.....	62
3.5	Stabilitätstest des bFGF .....	62
3.5.1	Entwicklung des Stabilitätstests.....	64
3.5.2	Optimierung des Puffersystems .....	66
3.5.3	Einfluss verschiedener Additive auf die Stabilität des bFGF.....	68
3.5.4	Einfluss von Glycerol und Saccharose in Kombination mit NaCl.....	70
3.5.5	Fazit.....	70
3.6	Bioaktivität des bFGF .....	71
3.6.1	Fazit.....	76
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	78
	Literatur.....	82
A	Anhang .....	96
A.1	Materialien .....	96
A.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	96



A.1.2	Laborgeräte.....	97
A.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	99
A.1.4	Puffer, Medien und Lösungen.....	101
A.1.5	Aminosäuresequenz des bFGF.....	104
A.1.6	Biomoleküle, Vektoren und Zellen.....	104
A.1.7	Software.....	104
B	Methoden.....	106
B.1	Proteinexpression.....	106
B.1.1	Anlegen einer Gefrierkultur.....	106
B.1.2	Kultivierung.....	106
B.1.3	Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm.....	107
B.1.4	Bestimmung der Biotrockenmasse.....	107
B.2	Zellaufschluss.....	107
B.2.1	Mechanischer Zellaufschluss mittels Hochdruck-Homogenisator.....	107
B.2.2	Enzymatischer Zellaufschluss mittels BugBuster® Reagenz.....	108
B.3	Proteinaufreinigung mittels FPLC.....	108
B.3.1	Kationenaustauschchromatographie.....	108
B.3.2	Heparin-Affinitätschromatographie.....	109
B.3.3	Alternative Aufarbeitungsmethoden.....	110
B.3.4	Umpuffern/Entsalzen des Proteins.....	111
B.3.5	Anionenaustauschchromatographie.....	111
B.4	Weiterverarbeitung des Proteins.....	112
B.4.1	Gefriertrocknung.....	112
B.5	Proteinanalytik.....	112
B.5.1	SDS-PAGE-Analyse.....	112
B.5.2	Kolloidale Coomassie-Färbung.....	113
B.5.3	Densitometrische Auswertung.....	113

B.5.4	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	114
B.5.5	Bestimmung des Proteasekonzentration.....	114
B.5.6	Bestimmung der Endotoxinkonzentration.....	115
B.5.7	Thermal Shift Assay (TSA).....	115
B.5.8	Zellkulturtechniken.....	116
C	Zusätzliche Ergebnisse.....	118
C.1	Stabilitätstests bFGF.....	118
C.1.1	Entwicklung des Stabilitätstests.....	118
D	Abbildungsverzeichnis.....	119
E	Tabellenverzeichnis.....	123
F	Unterstützende Arbeiten.....	125
G	Lebenslauf.....	126
H	Publikationen und Konferenzbeiträge.....	127

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Die Einnahme medizinischer Produkte tierischen Ursprungs ist hinsichtlich ihrer therapeutischen Wirkung und Biokompatibilität gegenüber Materialien synthetischen Ursprungs sehr effektiv [1]. Sie können allerdings mit tierischen Pathogenen, wie z.B. Prionen, Viren, Lipiden, Proteinen oder der transmissiblen spongiformen Enzephalopathie (TSE), kontaminiert sein. Es besteht das Risiko einer Krankheitsübertragung vom Tier auf den Menschen [2–4].

Ein bekanntes Beispiel eines medizinischen Produkts tierischen Ursprungs ist Heparin. Es wird erfolgreich zur therapeutischen Behandlung, u.a. von Thrombosen, eingesetzt [5]. Bis zur TSE-Epidemie Ende des 20. Jahrhunderts wurde Heparin aus dem Gewebe von Rindern und Schweinen gewonnen. Zur Vermeidung des Risikos an TSE zu erkranken, welche eine tödliche Krankheit ist, die das Gehirngewebe von Rindern, Schafen und Ziegen angreift und auf den Menschen übertragen werden kann, wurde seitdem Heparin nur noch aus Schweinen isoliert [4,6–8]. Weitere Risiken der Kontamination und der damit einhergehenden Erkrankung des Patienten bleiben allerdings bestehen. Materialien aus tierischer Herkunft unterliegen daher hohen Qualitätskontrollen [9].

Neben der therapeutischen Anwendung gilt dieses Problem auch in der biotechnologischen Anwendung. Heparin interagiert mit diversen biologisch aktiven Proteinen, was sich bei deren Aufreinigung zu Nutze gemacht wird [10]. Die biologische Sicherheit dieser Produkte ist durch diese Art der Aufreinigung nicht immer gewährleistet [2]. Aus diesem Grund wird sowohl für den therapeutischen als auch biotechnologischen Zweck nach einer Alternative zu Heparin geforscht [11].

Ziel dieser Dissertation ist die Entwicklung eines neuen Aufreinigungsverfahrens für biologisch aktive Proteine ohne Materialien tierischen Ursprungs. Als Modellprotein diente der humane basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF). Das mehrstufige

Aufreinigungsverfahren bestand aus einer Kationenaustauschchromatographie als Capture-Schritt, einer sich anschließenden Heparin-Affinitätschromatographie und einer Anionenaustauschchromatographie als Polishing-Schritt. Der letzte Schritt kann vernachlässigt werden, da dieser ohne die Verwendung tierischer Komponenten der Entfernung von Endotoxinen und DNA-Resten dient und bereits optimiert ist.

Für die Umsetzung der Versuche ist es notwendig über ausreichend Proteinmaterial zu verfügen. Dafür wird bFGF rekombinant in *Escherichia coli* (*E. coli*) produziert. Die Versuche werden mit dem Zellüberstand durchgeführt. Die Mixed-Mode- und pseudo-Affinitätschromatographie werden als Ersatz der Heparin-Affinitätschromatographie getestet. Hierbei werden acht verschiedene multimodale und pseudo-biospezifische Materialien in den alternativen Methoden als Capture-Schritt und als intermediärer Aufreinigungsschritt in einer mehrstufigen Aufreinigung des bFGF getestet und hinsichtlich der Proteinreinheit, Ausbeute und Wiederfindungsrate beurteilt. Im Anschluss soll die Stabilität des Proteins und die biologische Aktivität des bFGF nach dem Downstream Processing untersucht werden.

## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Fibroblasten-Wachstumsfaktor

Als Modellprotein für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden diente der humane basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF, FGF-2). Dieser Wachstumsfaktor gehört zu einem der 22 Proteine der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren [12]. Es handelt sich hierbei um Signalproteine für die Steuerung entscheidender Prozesse im Zellwachstum sowie der Zelldifferenzierung *in vivo* und *in vitro* [13]. Zusätzlich regulieren sie das Zellüberleben und die Zellmigration. FGF wurde erstmals aus der Hypophyse von Rindern aufgrund seiner mitogenen Aktivität, das Zellwachstum von Fibroblasten zu stimulieren, isoliert [14–16]. Die Wachstumsfaktoren sind sowohl in Vertebraten als auch in wirbellosen Tieren nachweisbar, im Menschen sogar in fast allen Geweben. In einzelligen Organismen wurde bis jetzt kein FGF gefunden [12,17]. Das Molekulargewicht der FGF liegt zwischen 17 und 34 kDa in Wirbeltieren. Die meisten Proteine der FGF-Familie sind sich strukturell sehr ähnlich und besitzen eine Übereinstimmung in ihrer Kernregion mit 28 stark konservierten und sechs identischen Aminosäureresten [18,19].

#### 2.1.1 Struktur des bFGF

Das Protein bFGF besitzt 155 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 18 kDa [13]. Der Wachstumsfaktor hat aufgrund vieler basischer Aminosäurereste einen isoelektrischen Punkt (pI) von 9,6 [18,19]. Er besteht aus 12 antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern mit einer trigonal pyramidalen Anordnung (Abbildung 1). Die zwei  $\beta$ -Faltblätter 1 und 2 sowie 10 und 11 besitzen viele basische Aminosäurereste und formen eine Bindestelle zu dem Glykosaminoglykan Heparin sowie Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG). Die Bindung von bFGF an Heparin oder HSPGs stabilisiert das

Protein und schützt es vor Denaturierung durch Hitze oder Säure sowie vor dem Abbau durch Proteasen [19,20]. Die Entdeckung der Heparin-Bindedomäne wurde sich für die Proteinaufreinigung von bFGF zunutze gemacht [17].

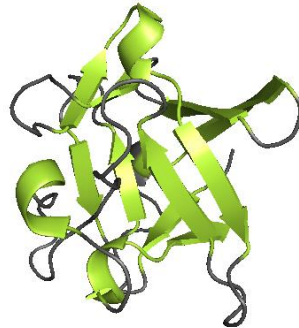


Abbildung 1: Kristallstruktur des bFGF nach PDB:4OEE mit PyMol dargestellt. Die  $\beta$ -Faltblätter sind hellgrün hinterlegt.

### 2.1.2 Biologische Funktion des bFGF

Die biologische Aktivität des bFGF ist unter anderem auf seine spezifische Bindung an FGF-Rezeptoren (FGFR1-4) zurückzuführen. FGFR sind auf der Membranaußenseite der Zelle und besitzen eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität [13]. Die FGFR haben drei Immunglobulin-ähnliche Domänen für die FGF-Bindung und eine Heparin-Bindedomäne [21,22]. Die Rezeptoren entstehen durch unterschiedliches Spleißen und führen zu diversen Signalantworten durch die Interaktion mit verschiedenen FGFs [19,22]. Der Wachstumsfaktor weist zwei separate Rezeptorbindestellen auf, wodurch das Protein bis zu zwei Rezeptoren gleichzeitig oder einen Rezeptor auf unterschiedliche Weisen binden kann [22].

Zusätzlich regulieren HSPGs die bFGF-Aktivität, in dem sie die Bindung des Proteins an seine Rezeptoren verstärken [23]. HSPGs sind eine große Gruppe funktionell unterschiedlicher Moleküle an der Oberfläche der Membranaußenseite der Zelle, an der sie mit bFGF interagieren und dessen Verteilung und Funktion steuern [24]. FGFR in

Zellen ohne HSPGs führen weniger Interaktionen zu bFGF aus, wodurch die Zellantwort schwächer ist. Die Zellantwort (Proliferation, Migration, Differenzierung) ist von der Beschaffenheit der HSPGs und der Rezeptoren abhängig [19,22].

### 2.1.3 Medizinische Anwendung des bFGF

Der Wachstumsfaktor bFGF reguliert aufgrund seiner starken angiogenen Aktivität das Wachstum und die Funktion von vaskulären Zellen. Er ist *in vivo* an dem Wachstum und der Neuentwicklung von Blutgefäßen (Angiogenese) beteiligt [13,25]. Auf diese Weise können Wundheilung und Geweberegeneration, welches der Linderung von Durchblutungsstörungen (Ischämie) dient, aber auch Krankheiten wie Krebs sowie Atherosklerose entstehen [26]. Dies steigert das medizinische Interesse an bFGF. Für Forschungszwecke ist der Bedarf an bFGF sehr hoch, weshalb dieser Wachstumsfaktor biotechnologisch hergestellt wird. Die Aufreinigung des Proteins wird aufgrund der Heparin-Bindedomäne mittels Heparin-Affinitätschromatographie durchgeführt [27,28].

## 2.2 Aufarbeitungsstrategien für biologisch aktive Proteine

Neben dem bFGF besitzen verschiedene biologisch aktive Proteine (Tabelle 1) eine Heparin-Bindestelle, mit Hilfe derer sie aufgereinigt werden können. Die hohe Affinität zu diversen Proteinen liegt in der heterogenen Zusammensetzung des Heparins. Für eine detaillierte Beschreibung der folgenden Kapitel wird auf den Review von Bolten *et al.* [29] verwiesen.

Tabelle 1: Liste verschiedener Heparin-bindender Proteine [29].

Proteinart	Heparin-bindendes Protein	Quelle
Zytokine/Wachstumsfaktoren		
	Knochenmorphogenetisches Protein 2 (BMP-2)	[30]
	Saurer FGF (aFGF)	[31]
	bFGF	[31]
	Tyrosinkinase-Rezeptor (FGFR1)	[31]
	FGFR2	[31]
	Hepatozyten-Wachstumsfaktor	[5]

Heparin-bindender Epidermaler Wachstumsfaktor (HB-EGF)	[32]
Interleukin-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8, -10, -12	[33]
Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor A <sub>165</sub> (VEGF-A <sub>165</sub> )	[34]
Transforming Growth Factor beta (TGF-β)	[35]
Lipid-bindende Proteine	
Annexin V	[36]
Apolipoprotein B (ApoB)	[37]
ApoE	[38]
Adhäsionsproteine	
Fibronectin	[35]
Vitronectin (Vn)	[37]
Chemokine	
CXCL 4 (Platelet factor 4/PF4)	[39]
CCL5 (Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted/RANTES)	[40]
Weitere	
Antithrombin III (AT III)	[41]
Thrombin	[42]

### 2.2.1 Struktureller Aufbau und biologische Funktion des Heparins

Heparin ist ein lineares Polysaccharid und gehört zu den Glykosaminoglykanen [19,43,44]. Es besteht zu 75-95 % aus den sich abwechselnden Disacchariden der L-Iduronsäure und des D-Glucosamins, die stark sulfatiert sind [6,45]. Die Struktur des Heparins kann variieren, in dem Sulfatreste durch Wasserstoff oder Acetat (Abbildung 2) substituiert wurden. Des Weiteren ist die Anzahl der Disaccharide variabel. Eine einheitliche molekulare Zusammensetzung des Heparins existiert somit nicht, weshalb die molare Masse zwischen 5 und 40 kDa liegt [40].

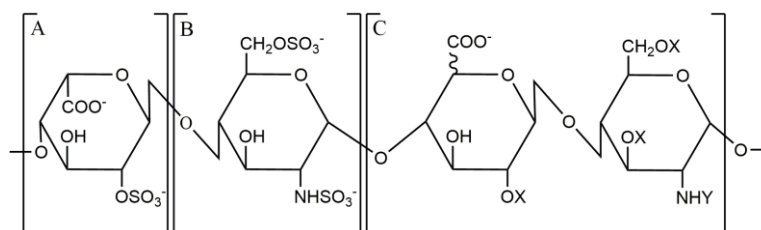


Abbildung 2: Struktureller Aufbau des Heparins.

Heparin besteht aus sich wiederholenden Folgen der 2-O-sulfo- $\alpha$ -L-Iduronsäure (A) und 6-O-sulfo-N-sulfo- $\alpha$ -D-Glucosamin (B). Es gibt allerdings auch strukturelle Variationen, die in (C) abgebildet sind. Hier können folgende Modifikationen vorliegen: X=H oder  $\text{SO}_3^-$ , Y=Acetat,  $\text{SO}_3^-$  oder H [29].

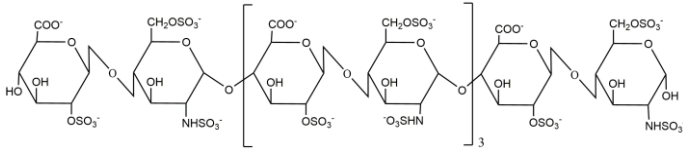
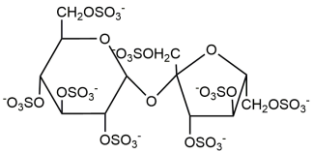
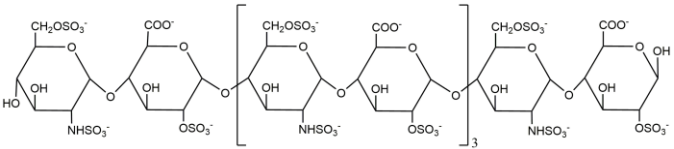


Heparin wird in Mastzellen hergestellt [46]. Die biologische Hauptaufgabe ist die Hemmung der Blutgerinnung, welches für medizinische Zwecke zur Behandlung von Thrombosen verwendet wird [45,47]. Es ist aber auch an der Regulation der Zelldifferenzierung, dem Zellwachstum und der Zellmigration beteiligt [48]. Die Wirkung des Heparins beruht auf der starken Interaktion mit verschiedenen Proteinen [49] wie Zytokinen, Morphogenen, Wachstumsfaktoren, Chemokinen oder Adhäsionsmolekülen (Tabelle 1).

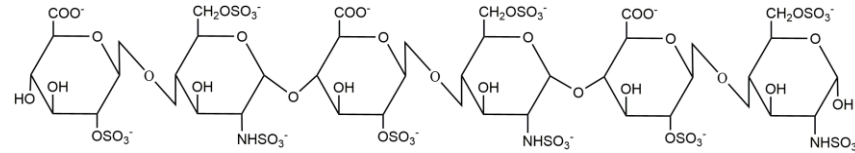
### **2.2.2 Analyse der Heparin-Protein Wechselwirkungen**

Die Interaktion zwischen Heparin und Heparin-bindenden Proteinen wurde schon vielseitig erforscht. Mit Hilfe von Kristallstrukturen von verschiedenen Protein-Heparin-Komplexen konnten bereits erste Aussagen über die Beschaffenheit der Heparin-Protein-Interaktionen getroffen werden. Hierfür wurden die Wechselwirkungen zwischen Heparin und den Wachstumsfaktoren aFGF [50,51] und bFGF [31,52,53], der Serinprotease Thrombin [42,54] sowie dem Glykoprotein ATIII [35,54–56] untersucht. Aufgrund des heterogenen Aufbaus von Heparin wurden für die Kristallstrukturanalyse Heparin-ähnliche Moleküle verwendet. Die Ergebnisse der Kristallstrukturen sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Analysen ergaben weder in der Struktur des Proteins noch in der des Heparins ein definiertes Muster. Die Heparin-Bindedomäne zeichnet sich hauptsächlich durch eine Ansammlung von basischen Aminosäuren (Lysin, Arginin) aus. Die Interaktion des Heparins zu Heparin-bindenden Proteinen ergeben sich größtenteils aus negativ geladenen Sulfat-Resten. Carboxyl- und Hydroxylgruppen sind weniger involviert. Ein Zusammenspiel verschiedener Interaktionen führen zu der hohen Affinität des Heparins zu verschiedenen Proteinen [29].

Tabelle 2: Eigenschaften der Heparin-Protein-Bindung [29].

Protein	pI	MW [kDa]	Heparin-ähnliches Molekül	Interaktionen	Quelle
			<p>IdoA-(2-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-β(1→4)-GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-α(1→4)-(IdoA-(2-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-β(1→4)-GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>))<sub>3</sub>-α(1→4)-IdoA-(2-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-β(1→4)-GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Decasaccharid)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interaktionen mit IdoA(3)-GlcNSO<sub>3</sub>(8)</li> <li>• Asn18, Reste 112-128</li> </ul>	[51]
aFGF	6,51	16,8	<p>Sulfatierte Saccharose (Disaccharid)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asn18, Reste 112-127</li> </ul>	[50]
			<p>GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-α(1→4)-IdoA-(2-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-α(1→4)-(GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-α(1→4)-IdoA-(2-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-α(1→4))<sub>3</sub>-GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-α(1→4)-IdoA-(2-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Decasaccharid)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asn18, Lys112, Lys113, Asn114, Lys118, Arg119, Arg122, Gln127 und Lys128</li> </ul>	[53]

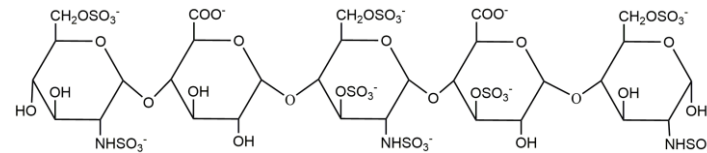
IdoA-(2-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-β(1→4)-GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-α(1→4)-IdoA-(2-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-β(1→4)-GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-α(1→4)-IdoA-(2-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-β(1→4)-GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)  
 (Hexasaccharid; das Pentasaccharid gilt für die Ringe 1-4)



**bFGF**      9,6      18

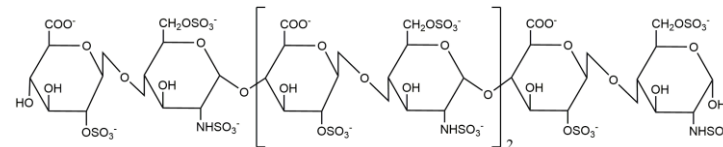
- Lys27, Asn28, 101-103, 120-137 [57]
- Ringe 5 und 6 haben eine geringere Affinität zu bFGF als die Ringe 2 und 3
- Reste 28, 121, 126, 136 binden an die Ringe 2 und 3
- Reste 27, 101, und 136 binden an die Ringe 5 und 6

GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-α(1→4)-IdoA-α(1→4)-GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(3-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-α(1→4)-GlcUA-(3-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-α(1→4)-GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Pentasaccharid)



- Lys25, Leu27, Arg81, Lys119, Arg120, Thr121, Gln123, Lys125, Lys129, Gln134 und Lys135 [58]

IdoA-(2-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-β(1→4)-GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-α(1→4)-(IdoA-(2-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-β(1→4)-GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-α(1→4))<sub>2</sub>-IdoA-(2-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-β(1→4)-GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)  
 (Octasaccharid)

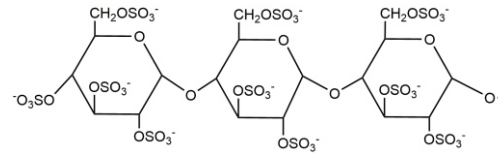


**Thrombin**    5,63      70

- Arg91, Arg93, Arg101, Arg126, Arg165, His230, Arg233, Lys236, Trp237, Lys240 [42]

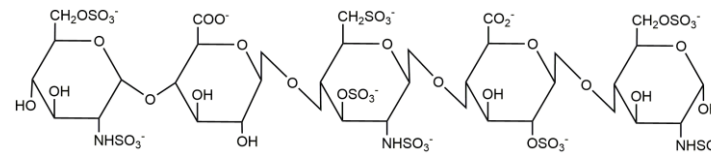
Sulfatierte Glucose (Trisaccharid)

- Arg93, Arg101, [54]  
Arg233, Lys236,  
Lys240



GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-α-(1→4)-IdoA-β-(1→4)-GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(3-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(6OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-β-(1→4)-GlcUA-(2-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-β-(1→4)-GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Pentasaccharid)

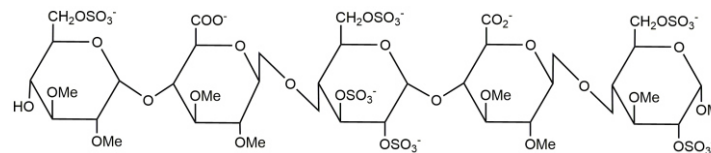
- Lys11, Arg13, [59]  
Glu45, Arg46,  
Arg47, Asn113,  
Lys114, Lys125 und  
Arg129



**ATIII** 6,32 52,6

-O-2,3-di-O-Methyl-6-O-Sulfo-α-D-Glucopyranosyl-(1→4)-O-2,3-di-O-Methyl-β-D-Glucopyranuronosyl-(1→4)-O-2,3,6-tri-O-Sulfo-α-D-Glucopyranosyl-(1→4)-O-2,3-di-O-Methyl-α-L-Idopyranuronosyl-(1→4)-3-O-Methylbis(hydrogensulphat) (Pentasaccharid; Molekülname: SR-123781)

- Lys11, Arg13, [54]  
Glu45, Arg46,  
Arg47, Asn113,  
Lys114, Lys125 und  
Arg129



GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup> = N-Sulfo-α-D-Glucosamin; GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) = 6-O-Sulfo-N-Sulfo-α-D-Glucosamin; GlcNSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-(3OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(6OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) = 3, 6-O-Sulfo-N-Sulfo-α-D-Glucosamin; IdoA = α-L-Iduronsäure; IdoA-(2-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) = 2-O-Sulfo-α-L-Iduronsäure; GlcUA-(3-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) = 3-O-Sulfo-α-D-Glucuronsäure.

### 2.2.3 Verwendung von Heparin in der Proteinaufreinigung

Heparin wird in der Proteinaufreinigung als spezifischer Ligand an einer Matrix immobilisiert und in Form der Heparin-Affinitätschromatographie verwendet [60,61]. Es ist eine sehr effektive und einfache Methode zur Aufreinigung verschiedener Proteine [61–64]. Mittels Heparin-Affinitätschromatographie können viele verschiedene Proteinklassen unter anderem die Wachstumsfaktoren bFGF [28,65], VEGF [66] sowie BMP-2 [67], das Enzym Thrombin [68], der Enzyminhibitor ATIII [69] und die Rezeptor-Tyrosinkinase FGFR [70] erfolgreich aufgereinigt werden.

Nachteilig an der Verwendung der Heparin-Affinitätschromatographie ist, dass diese Methode allein nicht ausreicht, um ein Heparin-bindendes Protein aus dem Zelllysat aufzureinigen. Diese Methode eignet sich als intermediärer Aufreinigungsschritt nach einem vorherigen Capture-Schritt in einer mehrstufigen Aufreinigung, welches mit einer höheren Aufreinigungsdauer und somit auch mit höheren Kosten einhergeht. Es kommt hinzu, dass die Anschaffung von Affinitätsmaterialien im Gegensatz zu anderen Aufreinigungsmaterialien kostenintensiver ist [62,71]. Zusätzlich wird Heparin aus dem Schleimhautgewebe von Schlachtabfällen gewonnen, welches mit Viren oder Prionen kontaminiert sein könnte. Die mit Heparin aufgereinigten Proteine könnten ebenfalls kontaminiert sein und die Verwendung dieser Proteine als Biopharmazeutikum die Patienten erkranken lassen [62]. Des Weiteren stammt Heparin aus verschiedenen Produktionschargen, sodass die Aufreinigung nicht reproduzierbar ist und eine gleichbleibende Qualität des aufgereinigten Proteins nicht gewährleistet ist. Nicht zuletzt könnten nach dem Chromatographieschritt Spuren von Heparin zurückbleiben, welche sich negativ auf die biologische Aktivität des Proteins auswirken können [72].

Derzeit ist Heparin jedoch das verwendete Material zur Aufreinigung von biologisch aktiven Proteinen mit einer Heparin-Bindestelle. Aufgrund der genannten Nachteile werden im nachfolgenden Kapitel alternative Materialien erläutert.

### **2.3 Alternative Methoden ohne tierische Komponenten zur Aufreinigung von biologisch aktiven Proteinen**

In Kapitel 2.2.3 wurde beschrieben, dass der Ersatz von Heparin in der Proteinaufreinigung von großem Interesse ist [11,62,71,72]. Einige Nachteile der Heparin-Affinitätschromatographie würden sich durch die Bereitstellung von Heparin aus nicht tierischen Quellen beheben. Für den therapeutischen Einsatz wird die Möglichkeit bereits erforscht, Heparin chemisch [6,73], chemoenzymatisch [74–77] oder biotechnologisch [78] herzustellen. Das hierbei hergestellte Heparin wurde bisher allerdings nicht als Ligand für die Proteinaufreinigung getestet. Eine weitere Möglichkeit ist die Heparin-Affinitätschromatographie durch Heparin-ähnliche bereits kommerziell erhältliche chromatographische Methoden zu ersetzen. In Kapitel 2.2.2 wurde erläutert, dass die Affinität von Heparin und Protein durch ein Zusammenspiel verschiedener Wechselwirkungen entsteht und Heparin aufgrund der vielen Sulfatreste als Kationenaustauscher fungiert [60,61]. Aus diesem Grund könnte die Heparin-Affinitätschromatographie durch die Mixed-Mode-Chromatographie (MMC) ersetzt werden. Bei der MMC werden Materialien mit multimodalen Liganden verwendet, welche sowohl kationische Eigenschaften als auch weitere funktionelle Gruppen für die Ausbildung verschiedener Interaktionen mit dem Protein besitzen (Kapitel 2.3.1). Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung der pseudo-Affinitätschromatographie mit der Verwendung von Materialien mit Heparin-ähnlichen Liganden (Kapitel 2.3.2).

#### **2.3.1 Mixed-Mode-Chromatographie**

Bei der MMC werden Materialien mit Liganden von multimodaler Funktionalität verwendet. Für die Proteinadsorption wird die Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen mit Wasserstoffbrückenbindungen sowie hydrophoben Wechselwirkungen verknüpft. Die MMC nutzt im Gegensatz zu den herkömmlichen Single-Mode-Chromatographien eine Kombination aus mehreren Wechselwirkungen zwischen Analyten und

Liganden, um zu einer effizienten Aufreinigung zu führen. Sie stellt dadurch eine Alternative zu den traditionellen Aufreinigungsmethoden wie der Hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC), Ionenaustauschchromatographie (IEX) oder Normalphasenchromatographie (NP) dar [79,80]. Bei der traditionellen Chromatographie steht nur eine Interaktion zwischen Ligand und Analyten im Fokus [81]. In den letzten Jahren ist die Verwendung der MMC stark gewachsen [11,82–84]. Durch den hydrophoben Anteil der multimodalen Liganden zeichnet sich die MMC durch eine höhere Salztoleranz im Gegensatz zu den traditionellen Aufreinigungsverfahren aus [80]. Diese Eigenschaft wäre bei der Verwendung der MMC als intermediärer Aufreinigungsschritt entscheidend, da kein weiterer Schritt zum Umpuffern benötigt wird [11]. Jeder weitere Aufreinigungsschritt würde mit Proteinverlusten und höheren Kosten einhergehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sechs verschiedene Materialien mit multimodalen Liganden von unterschiedlichen Firmen getestet. Hierzu gehörten die Chromatographiesäulen Foresight™ Nuvia™ cPrime™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) und HiTrap™ Capto™ MMC (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA). Von der Sartorius AG wurden vier verschiedene Membranadsorber (MA), Prototypen B – E, zur Verfügung gestellt und getestet.

#### *Foresight™ Nuvia™ cPrime™*

Die MMC-Säule Foresight™ Nuvia™ cPrime™ von Bio-Rad Laboratories zeichnet sich durch einen Liganden mit multimodaler Funktionalität aus. Die Strukturformel ist in Abbildung 3 dargestellt.

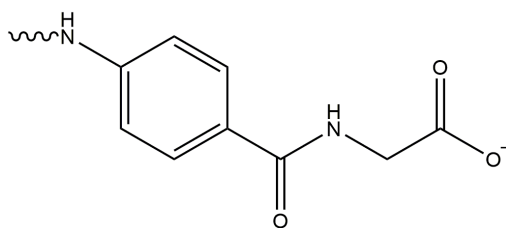


Abbildung 3: Strukturformel des Liganden der Foresight™ Nuvia™ cPrime™ von Bio-Rad Laboratories. Adaptiert nach [85].

Der Ligand weist eine Carboxylgruppe, eine polare Amidbindung und eine Arylgruppe auf. Dadurch können ionische und hydrophobe Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden.

Dieser multimodale Ligand fungiert aufgrund der negativ geladenen Carboxylgruppe als schwacher Kationenaustauscher. Der Ligand kann somit für die Proteinaufreinigung mit dem Analyten ionische Wechselwirkungen ausbilden. Des Weiteren besitzt der Ligand eine polare Amidbindung für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und eine Arylgruppe für die Affinität zu hydrophoben Resten. Durch die Verwendung der Foresight™ Nuvia™ cPrime™ kann die Proteinaufreinigung durch die Ausbildung ionischer und hydrophober Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen erfolgen [85].

#### *HiTrap™ Capto™ MMC*

Die MMC-Säule der HiTrap™ Capto™ MMC (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA) zeichnet sich ebenfalls durch einen multimodalen Liganden aus. Die Strukturformel ist in Abbildung 4 dargestellt.



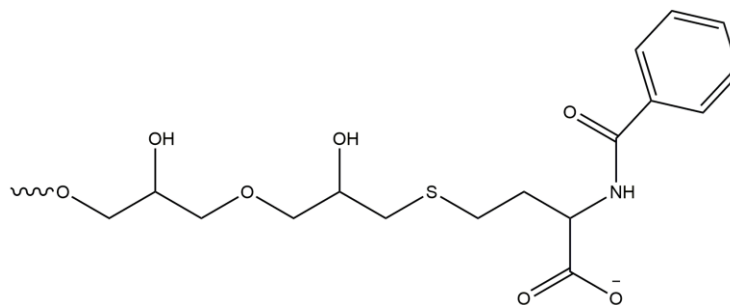


Abbildung 4: Strukturformel der HiTrap™ Capto™ MMC von GE Healthcare Life Sciences. Adaptiert nach [86]. Aufgrund der Carboxylgruppe wird die HiTrap™ Capto™ MMC einem schwachen Kationenaustauscher zugeordnet und besitzt zusätzlich eine polare Amidbindung, eine Arylgruppe und einen Thioether. Dadurch können ionische und hydrophobe Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein gebildet werden.

Die HiTrap™ Capto™ MMC-Säule wird aufgrund seiner negativ geladenen Carboxylgruppe einem schwachen Kationenaustauscher zugeordnet, welcher ionische Wechselwirkungen bei der Proteinaufreinigung ausbilden kann. Zusätzlich weist der Ligand eine polare Amidbindung für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen aus. Eine Arylgruppe und ein Thioether sind ebenfalls vorhanden, wodurch sich die Affinität des Liganden zu hydrophoben und thiophilen Resten erhöht. Durch diese Kombination vereint dieser Ligand ionische Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen und weist ebenfalls eine hydrophobe und thiophile Affinität auf [81,83,86].

#### *Prototypen B bis E*

Die Sartorius AG stellte verschiedene Prototypen von MA zur Verfügung. Die genaue Zusammensetzung der Liganden dieser Testmaterialien ist nicht bekannt. Es handelt sich um schwache Kationenaustauscher mit unterschiedlichen Anteilen eines hydrophoben Rests. Der hydrophobe Anteil der Prototypen nimmt von Prototyp B bis Prototyp E zu. Durch die Zusammensetzung der Liganden werden ionische und hydrophobe Wechselwirkungen vereint.

### 2.3.2 Pseudo-Affinitätschromatographie

Die pseudo-Affinitätschromatographie beruht, wie die Affinitätschromatographie, auf der hohen Spezifität zwischen Liganden und Analyten. Es werden Liganden mit einer hohen Selektivität verwendet, weshalb diese Art der Chromatographie sehr effektiv ist und zu einem reinen Produkt führt. Als Liganden eignen sich vor allem Antigene und Cofaktoren, aber auch spezifische Peptide. Nachteilig ist, dass diese Liganden meist sehr teuer sind und die Aufreinigung dadurch hohe Kosten verursacht [71]. Diesen Nachteil gleichen die Liganden der pseudo-Affinitätschromatographie aus. Im Gegensatz zur herkömmlichen Affinitätschromatographie, die biospezifische Liganden, wie z.B. Heparin, verwenden, werden bei der pseudo-Affinitätschromatographie pseudo-biospezifische Liganden verwendet. Diese werden synthetisch hergestellt. Die Liganden haben geringere Herstellungskosten und sind zusätzlich robuster gegenüber dem chemischen und biochemischen Abbau. Eine Zusammenfassung der Gegenüberstellung biospezifischer und pseudo-biospezifischer Liganden befindet sich in Tabelle 3.

Tabelle 3: Gegenüberstellung biospezifischer und pseudo-biospezifischer Liganden. Hinsichtlich der Spezifität, Selektivität, Kapazität, Elution, Stabilität, Toxizität und Kosten werden die Liganden bewertet. +++: sehr gut, ++: mittelmäßig, +: schlecht. Adaptiert nach [87].

Charakteristik	Biospezifischer Ligand	Pseudo-biospezifischer Ligand
Spezifität	+++	+
Selektivität	+++	+
Kapazität	+	+++
Elution	+	++
Stabilität	+	+++
Toxizität	++	+
Kosten	++	+

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei der pseudo-Affinitätschromatographie Materialien mit Heparin-ähnlichem Liganden getestet. Hierbei wurden von der Sartorius AG der MA Sartobind® Sulfatierte Cellulose (SUCA) und von GE Healthcare Life Sciences das Säule Capto™ DeVirS zur Verfügung gestellt.

*Sartobind® Sulfatierte Cellulose*

Die SUCA (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) ist ein MA mit einem pseudo-biospezifischen Liganden. Die Strukturformel ist in Abbildung 5 dargestellt.

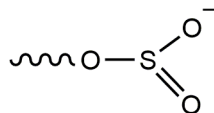


Abbildung 5: Strukturformel des Liganden der pseudo-Affinitätschromatographie SUCA der Sartorius AG, Göttingen, Deutschland.

Das Membranmaterial besteht aus verstärkter Cellulose, die stark sulfatiert wurde. Dadurch soll die SUCA dem stark sulfatierten Glykosaminoglykan Heparin ähneln [88,89]. Die SUCA gehört somit ebenfalls zu den Kationenaustauschern und ist negativ geladen. Bei der Verwendung für die Proteinaufreinigung können sich ionische Wechselwirkungen ausbilden und zum gewünschten Aufreinigungseffekt führen.

*Capto™ DeVirS*

Die Capto™ DeVirS von GE Healthcare Life Sciences besteht aus einer hoch vernetzten Agarosematrix, die mit Dextransulfaten besetzt ist. Die Strukturformel ist in Abbildung 6 dargestellt.

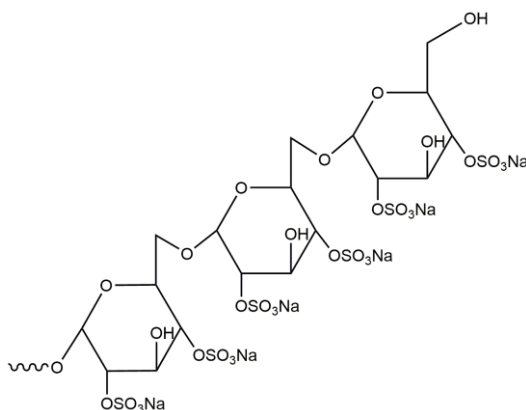


Abbildung 6: Strukturformel der Capto™ DeVirS von GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA. Adaptiert nach [90]. Der Ligand besteht aus Dextransulfat und besitzt Hydroxylgruppen sowie Sulfonsäuresalze. Durch diese funktionellen Gruppen können sich Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen zur Proteinaufreinigung ausbilden.

Dextransulfat ist strukturell sehr ähnlich zum Heparin [88]. Durch die Sulfatreste ist der Ligand stark negativ geladen und zählt zu den Kationenaustauschern. Die zusätzlichen Hydroxylgruppen können Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Somit können ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zur erfolgreichen Proteinaufreinigung führen [90].

### **2.3.3 Anwendung alternativer Aufreinigungsmethoden**

In der Literatur wurden bereits einige Methoden ohne die Verwendung von tierischen Materialien zum Ersatz der Heparin-Affinitätschromatographie in der Aufreinigung verschiedener Heparin-bindender Proteine veröffentlicht. Der Wachstumsfaktor BMP-2 diente hierbei mehrfach als Modelprotein. Dieser konnte sowohl durch ein einstufiges Aufreinigungsverfahren mittels eines starken Kationenaustauschers (SP Sepharose Fast Flow, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA) [91] als auch durch ein zweistufiges Aufreinigungsverfahren mit zwei HIC-Schritten (HiTrap<sup>TM</sup> Phenyl Fast Flow, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA) aufgereinigt werden [92]. Beide Methoden erzielten eine Proteinreinheit von 95 %. Des Weiteren wurde BMP-2 durch die Verwendung einer MMC aufgereinigt. Die MMC-Säule konnte einem schwachen Kationenaustauscher mit zusätzlichen hydrophoben Resten zugeordnet werden und erzielte eine Proteinreinheit von etwa 90 % [11]. Diese drei Methoden ohne tierische Komponenten stellen mögliche Alternativen zur Heparin-Affinitätschromatographie dar.

Des Weiteren wurde mit Hilfe eines dreistufigen Aufreinigungsverfahrens das Heparin-bindende Protein VEGF-A<sub>165</sub> aufgereinigt. Diese Aufreinigung bestand aus einer MMC (HiTrap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup> MMC, Abbildung 4) als Capture-Schritt, gefolgt von einer starken Kationenaustauschchromatographie (SP Sepharose Fast Flow, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA) als intermediärer Aufreinigungsschritt und einer HIC (Phenyl

Sepharose™ 6 Fast Flow, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA) als Polishing-Schritt und erzielte eine Proteinreinheit von 99 % [93].

Diese Beispiele aus der Literatur anhand anderer Proteine mit Heparin-Bindestelle verdeutlichen, dass ein Ersatz der Heparin-Affinitätschromatographie möglich ist.

### 3 Experimenteller Teil

Ziel des praktischen Teils dieser Dissertation ist die Entwicklung eines Downstream Prozesses für biologisch aktive Proteine, welcher keine tierischen Materialien verwendet. Als Modellprotein für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden diente der humane basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (Kapitel 2.1). Um für die praktischen Arbeiten über genügend bFGF zu verfügen, wurde das Protein zunächst rekombinant in *E. coli* produziert (Kapitel 3.1). Das löslich exprimierte Protein wurde daraufhin mit Hilfe des etablierten Aufreinigungsverfahrens isoliert. Dies bestand aus drei chromatographischen Methoden, die eine Kationenaustausch-, eine Heparin-Affinitäts- und abschließend eine Anionenaustauschchromatographie beinhaltete (Kapitel 3.2). Im Anschluss wurden die Parameter der Aufreinigung per Heparin-Affinitätschromatographie übernommen und auf Methoden ohne tierische Komponenten übertragen, um bFGF aufzureinigen. In dieser Dissertation wurden verschiedene Chromatographiesäulen und Membranadsorber der MMC und pseudo-Affinitätschromatographie getestet (Kapitel 3.3). Im Anschluss wurde die Stabilität (Kapitel 3.5) und die biologische Aktivität des bFGF nach dem Downstream Processing untersucht (Kapitel 3.6).

#### 3.1 Kultivierung und Proteinexpression des bFGF

Zur rekombinanten Herstellung von bFGF wurde in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, Darmstadt, Deutschland) der pET29c(+)-Vektor mit dem bFGF-Insert (pET29c(+)-bFGF) transformiert (Abbildung 7). Der Vektor enthält die cDNA, die für den humanen basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor mit 155 Aminosäuren codiert. Der Expressionsstamm besitzt das Gen für die T7-RNA-Polymerase ( $\lambda$ DE3-Gen), welches wie das bFGF-Gen im Vektor unter der Kontrolle des lac-Operons steht und erst nach Zugabe von Lactose oder IPTG translatiert.

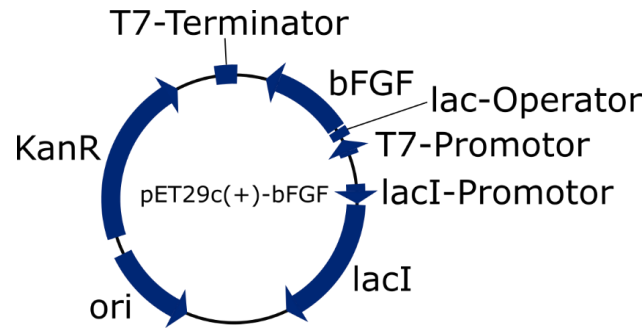


Abbildung 7: Expressionsvektor zur Produktion des Wachstumsfaktors bFGF.

Der Vektor pET29c(+) zeichnet sich durch das Kanamycin-Resistenzgen (KanR) aus. Die Proteinexpression unterliegt der Kontrolle des T7-Promotors, welcher selbst vom *lac*-Operator kontrolliert wird. Der Replikationsstart (*ori*) gewährleistet die autonome Replikation des Vektors.

Auf diese Weise wird die Expression des rekombinanten Gens doppelt kontrolliert und minimiert die Basalexpression. Der transformierte *E. coli*-Stamm wurde von Frank Hoffmann (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung) konstruiert und zur Verfügung gestellt [94].

Die *E. coli* Kultivierung zur bFGF-Produktion wurde, wie in der Literatur, beschrieben durchgeführt [95,96]. Es wurde im Rührkesselreaktor im 10 L Maßstab kultiviert. Die Vorkulturen wurden im Schüttelkolben angesetzt. Zuerst wurde eine Vorkultur bei 37 °C in LB-Medium bis zum Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) von 4 inkubiert. Aus dieser LB-Vorkultur wurde eine weitere Vorkultur in Minimalmedium mit einer  $OD_{600}$  von 0,02 angeimpft und bei 23 °C inkubiert. Für die Hauptkultur wurde ein optimiertes definiertes Autoinduktionsmedium verwendet, welches auf dem Prinzip des zweiphasigen Wachstums von *E. coli* beruht. Als Kohlenstoffquellen lagen Glycerol, Glucose sowie Lactose vor. Die leichter zugänglichen Kohlenstoffquellen Glucose und Glycerol wurden zuerst verstoffwechselt, im Anschluss daran Lactose. Lactose diente als Induktor bei der vom *lac*-Operon kontrollierten Proteinproduktion [96]. Die Kultivierung wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt: Zellkulturvolumen: 10 L; Temperatur: 23 °C; pH: 6,8; Rührgeschwindigkeit: 400 rpm; Zuluft: 10 mL · min<sup>-1</sup>.

Nach der Kultivierung lag bFGF als lösliches, aktives Protein sowie als inaktives Aggregat, auch genannt inclusion bodies (IB), vor. Die Daten der Rührkesselreaktorkultivierung sind in Abbildung 8 dargestellt.

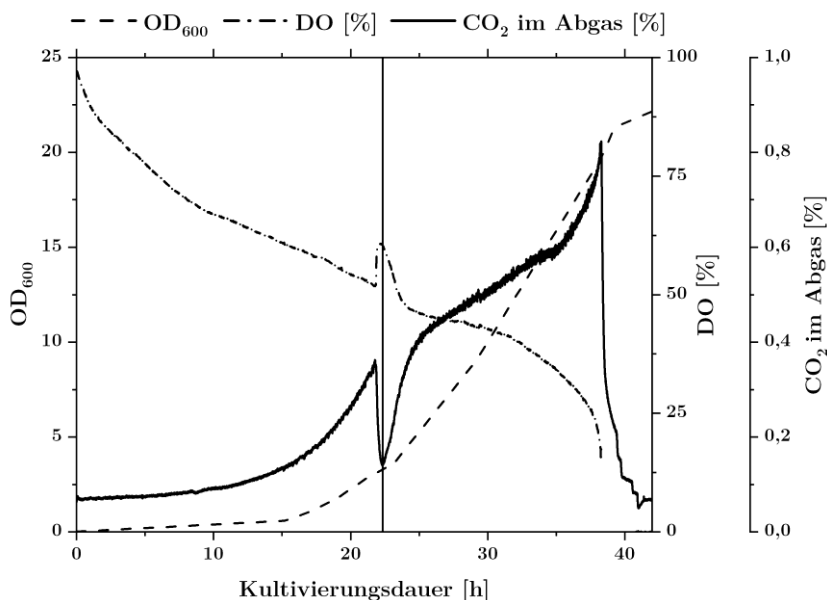


Abbildung 8: Daten der Rührkesselreaktorkultivierung von *E. coli* zur Proteinexpression von bFGF. Kultivierungsbedingungen: Zellkulturvolumen: 10 L; Temperatur: 23 °C; pH: 6,8; Rührgeschwindigkeit: 400 rpm; Zuluft: 10 mL · min<sup>-1</sup>. Nach ca. 22 h (waagrechtter Strich) hat *E. coli* Glucose und Glycerol verbraucht und wechselt auf das Wachstum mit Lactose als Kohlenstoffquelle. Dies ist in der Kurve des Gelöstsauerstoffanteils (DO) als Anstieg und in der Kurve des CO<sub>2</sub> im Abgas als Abfall zu erkennen. Ab diesem Zeitpunkt findet die Proteinexpression des bFGF statt.

Die Kultivierung benötigte bis zu dem vollständigen Verbrauch der ersten zwei Kohlenstoffquellen ca. 22 h. Daraufhin wurde Lactose als Kohlenstoffquelle verstoffwechselt. Dies ist an dem kurzen Anstieg des Gelöstsauerstoffanteils (DO) und dem kurzen Abfall des Anteils an CO<sub>2</sub> im Abgas zu erkennen. Gleichzeitig wurde die Proteinexpression durch den Induktor Lactose gestartet. Nach ca. 40 h wurde die gesamte Lactose verbraucht und die Kultivierung beendet. Die Proteinexpression wurde anschließend mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 9).



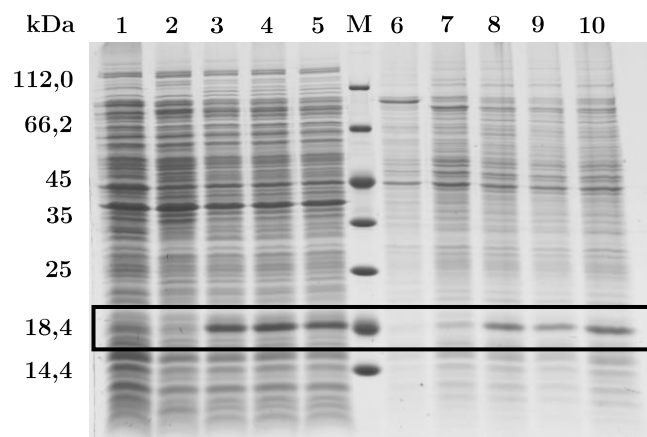


Abbildung 9: SDS-PAGE-Analyse der Reaktorkultivierung zur Proteinexpression von bFGF. Nachweis des rekombinanten in *E. coli* exprimierten bFGF in den löslichen (links; 1 – 5) und unlöslichen Fraktionen (rechts; 6 – 10) zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Kultivierungsprozesses. 1 + 6: Vorkultur in LB-Medium; 2 + 7: Vorkultur in S-DAB Medium; 3 + 8: 29 h Kultivierungsdauer; 4 + 9: 32 h Kultivierungsdauer; 5 + 10: 38,5 h Kultivierungsdauer. Hervorgehoben sind die Banden des bFGF bei 18 kDa.

Während des Kultivierungsprozesses wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen und die Zellen per Zentrifugation von dem Kultivierungsmedium abgetrennt. Der Zellaufschluss wurde enzymatisch mit dem Proteinextraktionsreagenz BugBuster (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt) durchgeführt. In dieser Arbeit sollte sowohl die Anwesenheit von bFGF in der löslichen als auch in der unlöslichen Fraktion untersucht werden. Aus diesem Grund wurde die lösliche und unlösliche Fraktion durch Zentrifugation voneinander separiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die unlösliche Fraktion für weitere Analysen in H<sub>2</sub>O resuspendiert. Beide Fraktionen wurden per Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 9 dargestellt. In den Fraktionen der Hauptkultur sind sowohl in den löslichen als auch unlöslichen Fraktionen intensive Banden bei ca. 18 kDa zu erkennen, welches auf eine Überexpression eines Proteins hinweist. Die Größe des Proteins entspricht der molekularen Größe des bFGF von 18 kDa. Die Intensität der Banden nimmt mit der Kultivierungsdauer zu, woraus sich eine erfolgreiche Kultivierung schließen lässt. In den Fraktionen der zwei Vorkulturen sind ebenfalls Banden bei der

Größe des bFGF zu erkennen, allerdings von geringerer Intensität. Dies lässt entweder auf eine Basalexpression des Proteins oder auf zelleigene Proteine mit einem ähnlichen Molekulargewicht schließen.

Die Kultivierung erzielte mit einer finalen  $OD_{600}$  von 22,2 eine Biotrockenmasse von  $9,15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  und eine bFGF-Konzentration von  $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  pro Liter Kulturvolumen, welches den Literaturwerten entspricht. Der Anteil des löslich exprimierten bFGF betrug etwa 55 %, welches ebenfalls mit der Literatur übereinstimmt [96]. Die weiteren Arbeiten wurden ausschließlich mit dem löslichen Anteil des bFGF durchgeführt.

### **3.2 Etabliertes Aufarbeitsverfahren des bFGF**

Vor der chromatographischen Aufreinigung des bFGF wurden die Zellen mittels Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen und das Zelllysate im Anschluss zentrifugiert. Die unlöslichen Bestandteile lagen im Pellet und die löslichen Bestandteile im Überstand vor. Wie in Kapitel 3.1 erwähnt, wurden die experimentellen Arbeiten mit dem löslichen Protein durchgeführt. Aus diesem Grund wurde das Pellet für mögliche weitere Experimente bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren und der Überstand für die chromatographische Aufreinigung sterilfiltriert (Porengröße  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ ). Das etablierte Aufarbeitsverfahren von bFGF bestand aus drei chromatographischen Schritten, einer Kationenaustausch-, einer Heparin-Affinitäts- und abschließend einer Anionenaustauschchromatographie (Abbildung 10).

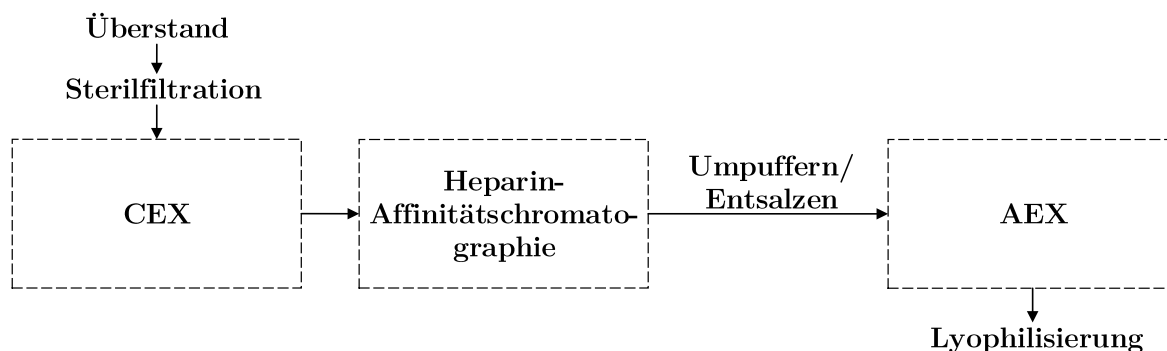


Abbildung 10: Schematische Darstellung des etablierten Aufreinigungsverfahrens des bFGF. Nach dem Zellaufschluss wird nach einer anschließenden Zentrifugation der Überstand sterilfiltriert und mit dem löslichen bFGF weitergearbeitet. Die chromatographische Aufreinigung besteht aus drei Schritten, einer Kationenaustauschchromatographie (CEX), einer Heparin-Affinitätschromatographie und einer Anionenaustauschchromatographie (AEX). Vor der AEX muss die Proteinprobe entsalzt und umgepuffert werden. Zur Lagerung wird das aufgereinigte Protein lyophilisiert.

### 3.2.1 Capture-Schritt per Kationenaustauschchromatographie

Der erste Aufreinigungsschritt diente als Capture-Schritt, um das Zielprotein von möglichst vielen zelleigenen Proteinen zu isolieren. Die Aufreinigung fand in Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,5 statt. Der isoelektrische Punkt (pI) des bFGF liegt bei 9,6, weshalb das Protein positiv geladen vorlag und sich als erster Schritt die Kationenaustauschchromatographie (CEX) anbot. In diesem Fall wurde keine Säulenchromatographie durchgeführt, sondern ein MA (Sartobind® S 75, Sartorius AG, Göttingen) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen starken Kationenaustauscher mit Sulfonsäure als Liganden. Verglichen mit Chromatographiesäulen zeichnen sich MA nicht durch eine höhere dynamische Bindekapazität aus, sondern durch den geringeren Druckverlust. Gepackte Säulen weisen einen hohen Druckverlust auf und können nur bei geringen Flussraten betrieben werden. MA halten selbst hohen Flussraten von bis zu  $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  stand. Dadurch können Prozesse verkürzt und Kosten gespart werden. Zusätzliche Kosten werden bei Ionenaustauschern in der Anschaffung als MA minimiert, da diese günstiger sind als gepackte Säulen [97].

Durch die beschriebene Methode konnte bereits ein hoher Reinigungseffekt des bFGF erzielt werden. Der Grund hierfür lag in dem leicht sauren pI (pH 6,6) der meisten

zelleigenen Proteine, die unter diesen Bedingungen (pH 7,5) negativ geladen sind und somit nicht mit dem negativ geladenen Liganden des MA wechselwirkten [98]. In Abbildung 11 ist das Chromatogramm und die SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung des bFGF per Kationenaustauscher dargestellt.

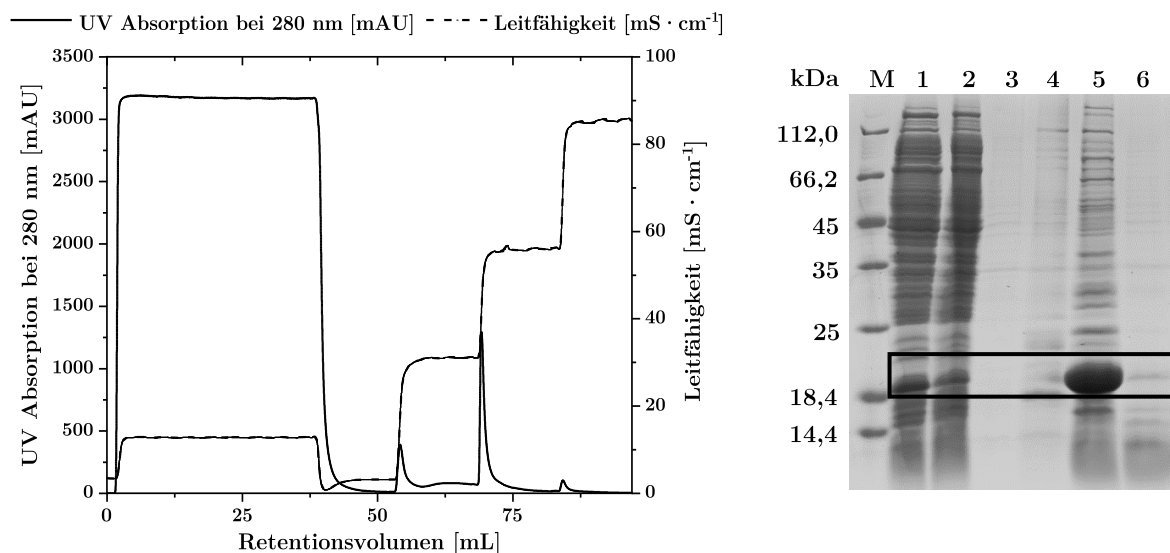


Abbildung 11: Aufreinigung des bFGF per CEX MA.

Links ist das FPLC-Chromatogramm dargestellt, rechts das Gel der SDS-PAGE-Analyse. M: Molekularer Größenstandard; 1: Probenauftrag; 2: Durchfluss; 3: Waschfraktion; 4: Elution bei 300 mM NaCl; 5: Elution bei 600 mM NaCl; 6: Elution bei 1 M NaCl. Hervorgehoben sind die Banden des bFGF bei 18 kDa.

Die hohe UV-Absorption am Anfang der Chromatographie verdeutlicht, dass viele zelleigene Proteine nicht mit dem MA wechselwirken und direkt eluieren. Nach einem Waschschrift erfolgte die Elution mittels optimierter Stufenelution mit einer NaCl-Konzentration von 300 mM, 600 mM und 1 M. In der zweiten Elutionsstufe eluierte bFGF. Die Reinheit wurde densitometrisch bestimmt und lag bei etwa 65 %. Es ist sowohl im Durchfluss als auch in den anderen beiden Stufenelutionen eine Bande bei ca. 18,4 kDa zu erkennen. Hierbei könnte es sich einerseits um zelleigene Proteine von einem ähnlichen Molekulargewicht wie bFGF handeln [99]. Andererseits könnte es

auch nicht vollständig gefaltetes bFGF sein, welches somit nicht wie vollständig gefaltetes bFGF mit dem MA wechselwirkte und dementsprechend sofort oder mit einer geringeren NaCl-Konzentration eluierte.

### 3.2.2 Aufreinigung des bFGF per Heparin-Affinitätschromatographie

Wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben, besitzt bFGF eine Heparin-Bindedomäne und somit eine hohe Affinität zu diesem Molekül. Aus diesem Grund wurde im zweiten Aufreinigungsschritt die Heparin-Affinitätschromatographie (HiTrap™ Heparin HP 5 mL, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA) verwendet, um die restlichen zelleigenen Proteine von bFGF zu trennen (Abbildung 10). Nach dem Capture-Schritt wurden die bFGF-haltigen Elutionsfraktionen refraktioniert und direkt ohne weiteres Umpuffern oder Entsalzen verwendet. In Abbildung 12 ist das Chromatogramm und die SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung des bFGF per Heparin-Affinitätschromatographie dargestellt.

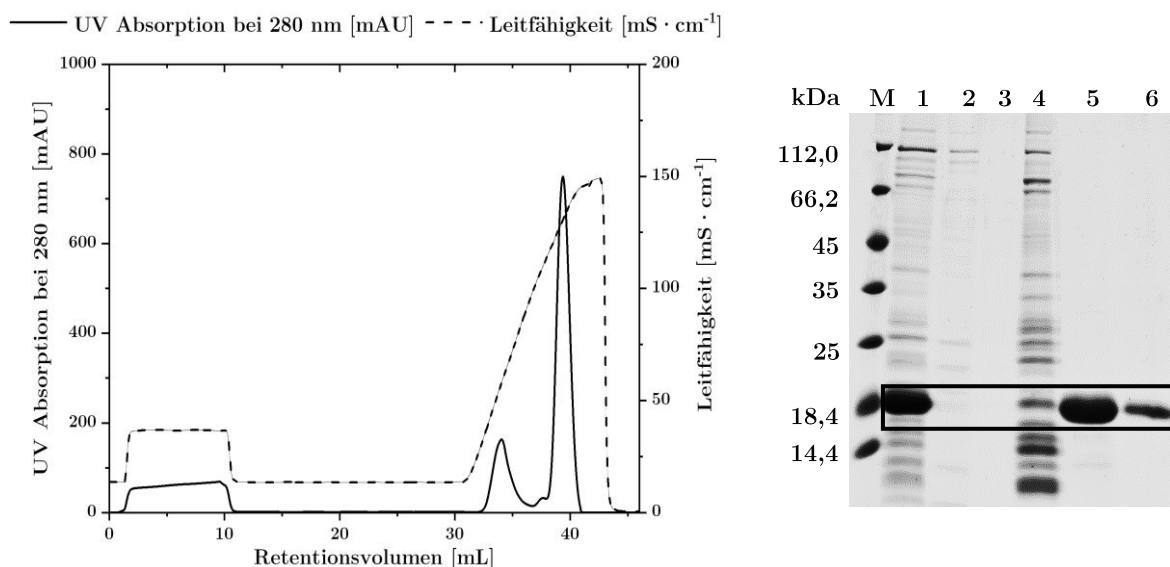


Abbildung 12: Aufreinigung des bFGF per Heparin-Affinitätschromatographie.

Links ist das FPLC-Chromatogramm dargestellt, rechts das Gel der SDS-PAGE-Analyse. M: Molekularer Größenstandard; 1: Probenauftrag; 2: Durchfluss; 3 + 4: 1. Elutionspeak; 5 + 6: 2. Elutionspeak. Hervorgehoben sind die Banden des bFGF bei 18 kDa.

Nach Aufgabe der Probe eluierten einige Proteine, die nicht mit Heparin wechselwirken. Die Elution erfolgte mit einem über 10 Säulenvolumen (CV) verlaufenden NaCl-

Gradienten von 0 M bis 2 M NaCl. Es sind zwei Elutionspeaks zu erkennen. Der erste Peak liegt bei einer NaCl-Konzentration von etwa 500 mM, der zweite Peak bei 1,7 M. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. In der Fraktion des Durchflusses ist keine Bande bei der Größe des bFGF zu erkennen, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass das gesamte bFGF mit Heparin wechselwirken konnte. In den Fraktionen des ersten Peaks sind viele Banden zu erkennen, die zelleigenen Proteinen zugeordnet werden können. Ebenfalls ist eine Bande bei der Größe des bFGF zu erkennen, bei der es sich entweder um bFGF handelt, welches nicht vollständig gefaltet ist und somit eher eluierte, oder um zelleigene Proteine, die ein ähnliches Molekulargewicht aufweisen. Der zweite Peak besitzt lediglich eine intensive Bande bei etwa 18,4 kDa. Hierbei wird es sich wahrscheinlich um das aufgereinigte bFGF handeln. Durch diesen Aufreinigungsschritt wurde eine Reinheit von etwa 95 % erreicht.

### **3.2.3 Polishing-Schritt per Anionenaustauschchromatographie**

Der letzte Schritt des Downstream Processings ist ein Polishing-Schritt durch eine Anionenaustauschchromatographie (AEX, Abbildung 10). Dieser Schritt ist nötig, um Endotoxine und DNA-Reste zu entfernen. Endotoxine sind Lipopolysaccharide an der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien, welche nach dem Zellaufschluss von der Membran abgetrennt werden können und somit löslich vorliegen. Auf Menschen sowie Tiere wirken sie toxisch und müssen somit entfernt werden [100]. Endotoxine und DNA-Reste sind negativ geladen, weshalb die AEX verwendet wurde. Dadurch würde das positiv geladene bFGF sofort eluieren und die negativ geladenen Endotoxine und DNA-Reste mit dem negativ-geladenen Liganden wechselwirken. Für die AEX wurde der MA Sartobind<sup>TM</sup> Q 75 (Sartorius AG, Göttingen) verwendet. Zur Ausbildung ionischer Wechselwirkungen zur AEX, musste die Proteinprobe zuvor noch entsalzt werden. Dieser Schritt wurde zusätzlich zum Umpuffern der Probe ver-

wendet, da nach dem Polishing-Schritt der Wachstumsfaktor für die Lagerung lyophilisiert wird und dies in Phosphatpuffer ungünstig ist. Ein Bestandteil des Natriumphosphatpuffers kann durch die Temperaturänderung präzipitieren, welches zu einem pH-Shift (von pH 7,5 zu pH 3,8) führen würde und letztendlich zu der Denaturierung des Proteins [101]. Dementsprechend wurden die bFGF-enthaltenden Fraktionen vereint und mittels Desalting-Säule (HiPrep™ 26/10 Desalting, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA) entsalzt und in Tris-Puffer (pH 7,5) überführt. Der AEX-Schritt schloss sich daran an. Nach der AEX wurden die bFGF-enthaltenden Fraktionen vereint, mittels Spin column auf eine Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  aufkonzentriert und steril filtriert (Porengröße  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ ). Anschließend wurde die bFGF-Probe lyophilisiert und für weitere Anwendungen bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### **3.2.4 Bestimmung des Endotoxingehalts**

In Kapitel 3.2.3 wurde bereits erwähnt, dass Lipopolysaccharide an der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien toxische Eigenschaften für Menschen und Tiere besitzen können [100]. Für den medizinischen Nutzen des Proteins ist die Entfernung von Endotoxinen somit unabdingbar. Geringe Endotoxinkonzentrationen von  $1 \text{ ng} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$  können sich bereits negativ auf die Gesundheit auswirken. Diese können sich durch Fieber bis hin zu einem lebensbedrohlichen Schock äußern [102–104]. Die Bestimmung der Endotoxinkonzentration wurde mittels Limulus Amebocyten Ly-sat-Test (LAL-Test) durchgeführt. Die aufgereinigte bFGF-Probe enthielt nach der AEX eine Endotoxinkonzentration von  $0,421 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Für klinische Anwendungen muss der Endotoxingehalt laut FDA kleiner als  $0,5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$  sein, welches erfüllt wurde [105].

### 3.3 Aufreinigung des bFGF mittels alternativer chromatographischer Methoden ohne tierische Komponenten

In dieser Dissertation sollen neue Aufreinigungsverfahren für bFGF erprobt werden, um die Heparin-Affinitätschromatographie bei der Aufreinigung zu ersetzen. Wie in Kapitel 2.2.3 bereits ausführlich beschrieben, weist die Heparin-Affinitätschromatographie viele Vorteile, wie die schnelle und effektive Aufreinigung verschiedener Proteine, auf. Als tierisches Erzeugnis birgt Heparin allerdings die Gefahr der Kontamination mit tierischen Pathogenen, wodurch die aufgereinigten Proteine ebenfalls kontaminiert sein könnten. Nachteilhaft ist auch, dass die Heparin-Affinitätschromatographie nur mit zusätzlichen chromatographischen Methoden zur erfolgreichen Proteinaufreinigung führt und mehrstufige Aufreinigungsprozesse mit einer höheren Zeitdauer sowie Proteinverlusten und somit mit höheren Kosten einhergehen [29,62]. Aus diesen Gründen ist nach einem Ersatz der Heparin-Affinitätschromatographie durch alternative Säulen- oder Membran-chromatographische Methoden ohne tierische Komponenten gesucht.

Der Wachstumsfaktor wurde intrazellulär in *E. coli* sowohl löslich als auch in IB exprimiert. Nach dem Zellaufschluss und einer sich anschließenden Zentrifugation wurde mit dem Zellüberstand, dem löslich vorliegenden bFGF, weitergearbeitet. Das etablierte Aufreinigungsverfahren des bFGF (Kapitel 3.2) bestand aus drei chromatographischen Methoden, der CEX als Capture-Schritt, der Heparin-Affinitätschromatographie als intermediärer Aufreinigungsschritt und der AEX als Polishing-Schritt (Abbildung 13, A).

Aufgrund der oben genannten Gründe wurden alternative chromatographische Methoden als Capture-Schritt getestet (Abbildung 13, B) und direkt mit dem Überstand nach dem Zellaufschluss beladen. Zusätzlich wurden alternative Methoden als intermediärer Aufreinigungsschritt nach vorherigem CEX-Schritt (Abbildung 13, C) in einem mehrstufigen Aufreinigungsverfahren geprüft. Für die Versuche in den Kapiteln



3.3.1 und 3.3.2 wurden nur die chromatographischen Schritte bis zum Umpuffern/Entsalzen betrachtet, da dieser Schritt und die AEX effektive Methoden ohne Verwendung tierischer Komponenten sind und zum Entfernen der Endotoxine verwendet werden.

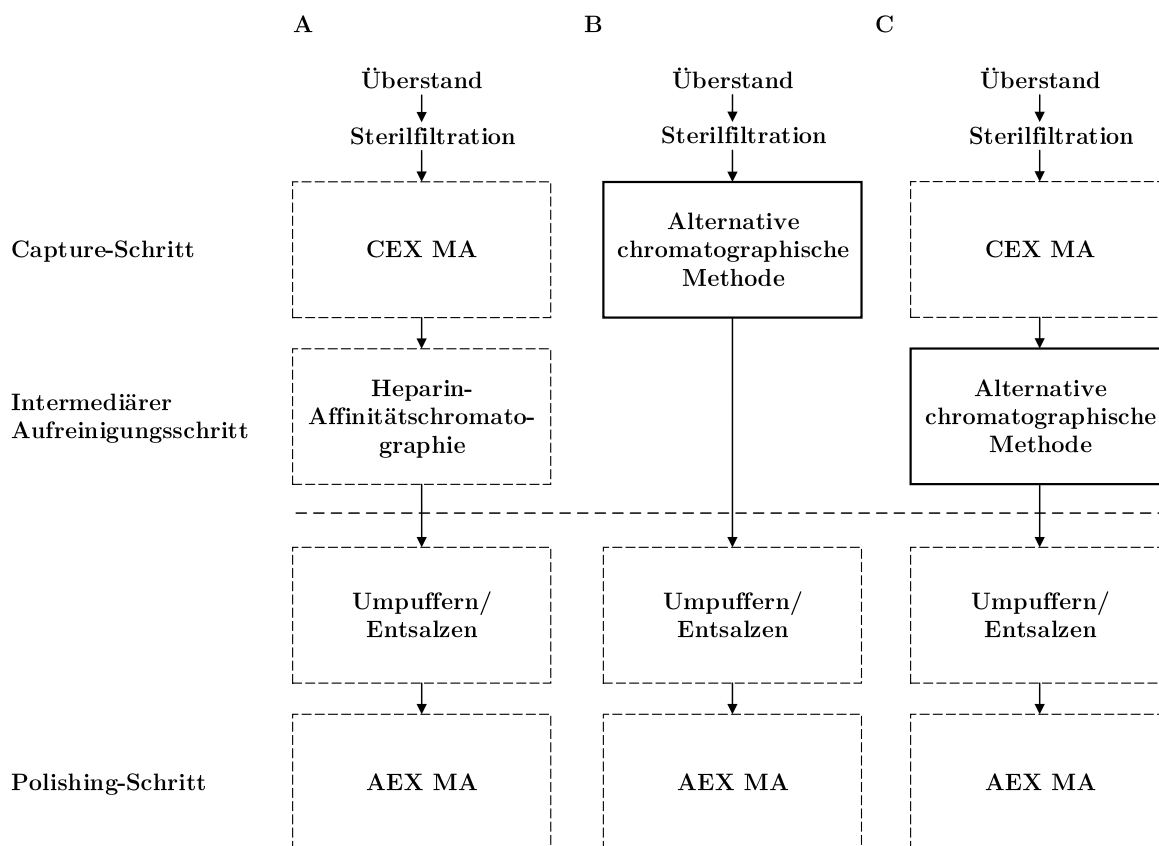


Abbildung 13: Schematische Darstellung der chromatographischen Methoden zur Aufreinigung des löslichen bFGF aus dem Zellüberstand.

Es wird in (A) die etablierte Methode bestehend aus der CEX als Capture-Schritt, der Heparin-Affinitätschromatographie, dem Umpuffern/Entsalzen und dem Polishing-Schritt per AEX dargestellt. (B) und (C) beschreiben die Aufreinigung des bFGF ohne die Heparin-Affinitätschromatographie durch den Austausch mit alternativen chromatographischen Methoden ohne tierische Komponenten. Hierbei wird zusätzlich unterschieden zwischen einer Aufreinigung mit alternativen chromatographischen Methoden als Capture Schritt (B) und in Kombination als intermediärer Aufreinigungsschritt (C).

Die alternativen chromatographischen Methoden lassen sich unterschiedlichen chromatographischen Trennverfahren zuordnen. Eine detaillierte Auflistung aller verwendeten Säulen und MA befindet sich in Tabelle 4, eine nähere Erläuterung der Spezifikationen wurde in Kapitel 2.3 beschrieben.

Tabelle 4: Säulen- und Membran-chromatographische Methoden zur Aufreinigung des bFGF.

Chromatographisches Trennverfahren	Wechselwirkungen	Säule/Membran
Affinitätschromatographie	Elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Kräfte	HiTrap™ Heparin HP
Ionenaustauschchromatographie	Elektrostatische Wechselwirkungen	Sartobind® S 75
Mixed-Mode-Chromatographie	Elektrostatische, thiophile und hydrophobe Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen	HiTrap™ Capto™ MMC
	Elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen	Foresight™ Nuvia™ cPrime™
	Elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen	Prototypen B bis E
Pseudo-Affinitätschromatographie	Elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen	Sartobind® Sulfatierte Cellulose (SUCA)
	Elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen	Capto™ DeVirS

Die Ergebnisse der Ausbeute, Wiederfindungsrate (Recovery) und Reinheit wurden mit den Ergebnissen der Heparin-Affinitätschromatographie verglichen, da diese maßgeblich für die Qualität des Verfahrens sind.

Die Ausbeute wird durch den Quotienten der Menge an bFGF im Elutionspeak und der für die Aufreinigung eingesetzten Menge an bFGF berechnet. Diese liefert eine Aussage über den Verlust des Proteins während des Aufreinigungsprozesses und sollte einen möglichst hohen Wert annehmen. Niedrige Ausbeuten gehen mit hohen Proteinverlusten und somit einem großen Zeitaufwand, dem erhöhten Verbrauch von Chemikalien und dementsprechend höheren Kosten einher. Die Wiederfindungsrate ist das Verhältnis aus der bFGF-Menge, die als Messergebnis in allen resultierenden Elutionspeaks gefunden wird, und dem gesamten eingesetzten bFGF. Eine Wiederfindungsrate von 100 % bedeutet, dass während des gesamten Aufreinigungsschritts keine Verluste an Protein auftraten. Verluste könnten z.B. durch eine irreversible Bindung an das Säulenmaterial auftreten. Die Reinheit des bFGF wird durch den Quotienten der Menge an bFGF und der Gesamtproteinmenge in derselben Fraktion densitometrisch

ermittelt. Diese lässt sich sowohl für die Probenauftrags-, Durchfluss- und Elutionsfraktion anwenden.

### **3.3.1 Alternative Aufarbeitungsmethoden als Capture-Schritt in der Aufreinigung des bFGF**

Im folgenden Kapitel wurden verschiedene Säulen- und Membran-chromatographische Methoden als Capture-Schritt in Bezug auf die bFGF-Aufreinigung aus dem Überstand nach dem Zellaufschluss getestet (Abbildung 13, B).

Hierfür wurden 21 g Zellpellet in 15 mL Zellysepuffer (25 mM Phosphatpuffer, 1,25 mM  $\text{MgCl} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 100 mM NaCl, 3 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7,5) pro Gramm Zellfeuchtmasse gelöst und per Hochdruck-Homogenisator aufgeschlossen. Nach Zentrifugation und Sterilfiltration (0,2  $\mu\text{m}$  Porengröße) des Überstands wurde die Probe entsprechend dem Säulenvolumen der einzelnen Säulen oder MA aufgeteilt, sodass pro CV Säulen- oder Membranvolumen 20 mL Probenvolumen berechnet wurden. Die Gesamtproteinkonzentration betrug  $7,6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  mit einem Anteil des bFGF von etwa 12 %. Dies entsprach einer bFGF-Konzentration von  $0,91 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Alle Aufreinigungen fanden aufgrund der Vergleichbarkeit unter denselben Aufreinigungsbedingungen der Heparin-Affinitätschromatographie statt (Kapitel 3.2.2). Es wurden dieselben Puffer und Elutionsbedingungen verwendet. Der Bindepuffer (BP) bestand aus einem Phosphatpuffer (25 mM Phosphatpuffer, 3 mM DTT, 1 mM EDTA) mit einem pH-Wert von 7,5, der Elutionspuffer (EP) beinhaltete zusätzlich 2 M NaCl. Die Einstellungsparameter (CV des Probenauftrags, CV des Waschschrattes, CV der Elution) der Aufreinigung waren bei jeder Säulen- und Membran-chromatographischen Methode identisch, sie unterschieden sich nur in ihren Cleaning-In-Place (CIP) Schritten.

Unter CIP wird das Reinigungsverfahren von Säulen und MA ohne vorherige Demontage verstanden. Diese werden durch Spülen mit verschiedenen sauren oder alkalischen

Lösungen gesäubert und können im Anschluss vom Gerät demontiert und direkt gelagert werden. Durch den CIP-Schritt werden irreversibel gebundene Stoffe gelöst und das Material nicht beschädigt, sodass die Säule oder der MA nach der Reinigung wiederverwendet werden kann. Aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheit der Säulen und MA, ist jeder CIP-Schritt individuell.

Die Säule oder der MA wurden zuerst mit 10 CV BP äquilibriert und anschließend mit der Proteinlösung beladen. Es folgte der Waschschrift von 20 CV BP und die Elution per 10 CV EP. Die Versuchsreihe wurde jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die chromatographische Aufreinigung wurde per SDS-PAGE analysiert. Die Proteinkonzentration wurde per Bradford-Test bestimmt und die Produktreinheit densitometrisch ermittelt.

### 3.3.1.1 Heparin-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung per Heparin-Affinitätschromatographie ist, wie bereits erwähnt, die etablierte bFGF-Aufreinigungsmethode [65] mit der jede weitere Säulen- oder Membran-chromatographische Methode dieses Kapitels verglichen wurde. Es wurde die Affinitätssäule HiTrap<sup>TM</sup> Heparin HP mit einem Säulenvolumen von 1 mL (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA) und nicht mit 5 mL verwendet. Dies gewährleistete eine bessere Vergleichbarkeit mit den anderen Säulen und MA, die größtenteils ein Bettvolumen von 1 mL aufwiesen. Das Probenvolumen betrug 20 mL mit einer bFGF-Konzentration von  $0,9 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Das Chromatogramm und die SDS-PAGE-Analyse sind in Abbildung 14 dargestellt.

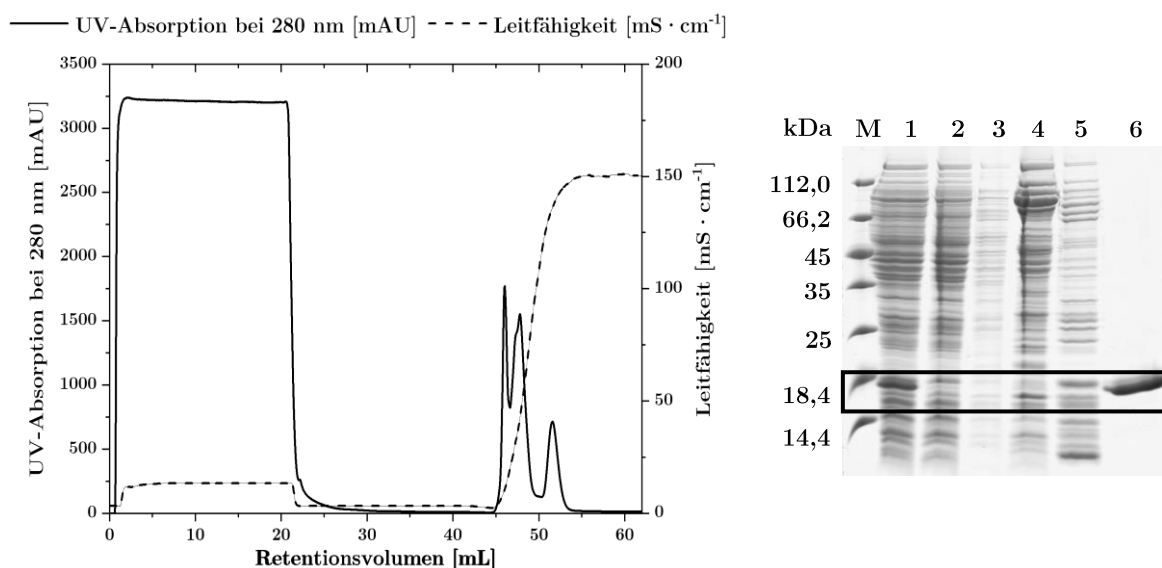


Abbildung 14: Aufreinigung des bFGF aus dem Zellüberstand per Heparin-Affinitätschromatographie (HiTrap™ Heparin HP, 1 mL, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA).

Links ist das FPLC-Chromatogramm dargestellt, rechts das Gel der SDS-PAGE-Analyse. M: Molekularer Größenstandard; 1: Probenauftrag; 2: Durchfluss; 3 – 5: Überlagerte Elutionspeaks; 6: bFGF-Elutionspeak. Hervorgehoben sind die Banden des bFGF bei 18 kDa.

In dem FPLC-Chromatogramm der bFGF-Aufreinigung sind zwei überlagerte Peaks und ein getrennter Peak zu erkennen. Anhand der SDS-PAGE wird deutlich, dass sich der Wachstumsfaktor im dritten Peak befindet und bei etwa 1,7 M NaCl eluierte. Einige der Verunreinigungen wurden bereits bei einer geringeren NaCl-Konzentration entfernt. Durch diesen Aufreinigungsschritt wurde eine densitometrisch bestimmte Reinheit des bFGF von etwa 86 % erzielt. Die Ausbeute lag bei 52 % und die Wiederfindungsrate bei 82 %. Die Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein, dass die Heparin-Affinitätschromatographie als einzige Aufreinigungsmethode nicht für die Anwendung medizinischer Zwecke ausreicht.

Im Überstand befinden sich viele zelleigene Proteine von *E. coli*. Aus diesem Grund ist der Probenauftrag sehr überladen (Fraktion 1). Die Verunreinigungen in der Probe können bFGF daran hindern, spezifische Bindestellen zu erreichen und zu besetzen. Zusätzlich wurden durch unspezifische Wechselwirkungen der zelleigenen Proteine Bindestellen besetzt, so dass bFGF teilweise direkt eluierte. Des Weiteren könnte sich

in der Probe noch fehlgefaltetes bFGF befinden, welches aufgrund der Biospezifität von Heparin nicht binden konnte und direkt eluierte.

### 3.3.1.2 Kationenaustauschchromatographie

Zum Vergleich mit den Ergebnissen der alternativen Methoden wurde die CEX, welche in der etablierten Aufreinigungsmethode des bFGF den Capture-Schritt darstellt, ebenfalls getestet. Der Ionenaustauscher ist ein starker Kationenaustauscher mit Sulfonsäuregruppen. Der MA Sartobind® S 75 mit einem Bettvolumen von 2,1 mL (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) wurde verwendet. Das Probenvolumen betrug 42 mL mit einer bFGF-Konzentration von  $0,9 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Das Chromatogramm und die SDS-PAGE-Analyse sind in Abbildung 15 dargestellt.

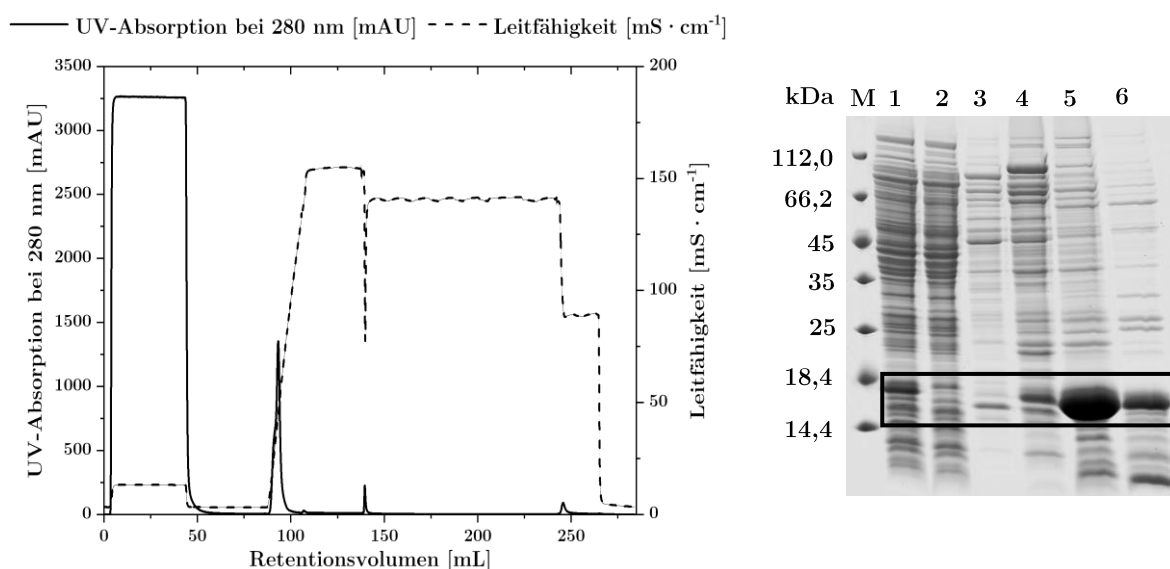


Abbildung 15: Aufreinigung des bFGF aus dem Zellüberstand per CEX (Sartobind® S 75, 2,1 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland).

Links ist das FPLC-Chromatogramm dargestellt, rechts das Gel der SDS-PAGE-Analyse. M: Molekularer Größenstandard; 1: Probenauftrag; 2: Durchfluss; 3 – 6: bFGF-Elutionspeak. Hervorgehoben sind die Banden des bFGF bei 18 kDa.

Das Chromatogramm zeigt einen Elutionspeak zwischen 0,1 M und 1 M NaCl. Zusätzlich sind zwei kleine Peaks in den zwei CIP-Schritten erkennbar, bei denen es sich laut SDS-PAGE (Ergebnisse nicht gezeigt) nicht um bFGF handelt.

Anhand der SDS-PAGE-Analyse konnte gezeigt werden, dass bFGF im Elutionspeak bei etwa 0,5 M NaCl eluierte. Ebenfalls ist zu erkennen, dass zusätzlich zur intensiven bFGF-Bande auch andere Proteinbanden vorhanden sind. Neben dem Zielprotein wechselwirkten auch andere Proteine mit dem MA, wodurch dieser Aufreinigungsschritt eine Reinheit von etwa 55 % erreichte. Die Wiederfindungsrate lag bei 90 % und die Ausbeute bei 40 %. Die niedrige Ausbeute und Reinheit sind wahrscheinlich durch die hohe Gesamtproteinkonzentration zu erklären. Unter diesen Aufreinigungsbedingungen konnten ebenfalls andere zelleigene Proteine mit den Liganden wechselwirken.

### 3.3.1.3 Mixed-Mode-Chromatographie

Im Gegensatz zu den üblichen Single-Mode-Chromatographien nutzt die Mixed-Mode-Chromatographie, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, eine Kombination aus mehreren Wechselwirkungen zwischen Analyten und Liganden aus, um zu einer effizienten Aufreinigung zu führen. Die getesteten Materialien der MMC zeichneten sich durch Liganden mit negativ geladener Carboxylgruppe und einem unterschiedlich starken hydrophoben Anteil aus.

Sowohl von Bio-Rad (Foresight<sup>TM</sup> Nuvia<sup>TM</sup> cPrime<sup>TM</sup>) als auch von GE Healthcare Life Sciences (HiTrap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup> MMC) wurde eine Säulenchromatographie getestet, während von der Sartorius AG vier verschiedene MA (Prototypen B – E) zur Verfügung gestellt und getestet wurden. Das Säulen- und Membranvolumen umfasste jeweils 1 mL, weshalb das Probenvolumen jeweils 20 mL betrug und die bFGF-Konzentration bei etwa 0,9 mg · mL<sup>-1</sup> lag. Die Chromatogramme sind in Abbildung 16 und die SDS-PAGE-Analysen in Abbildung 17 dargestellt.

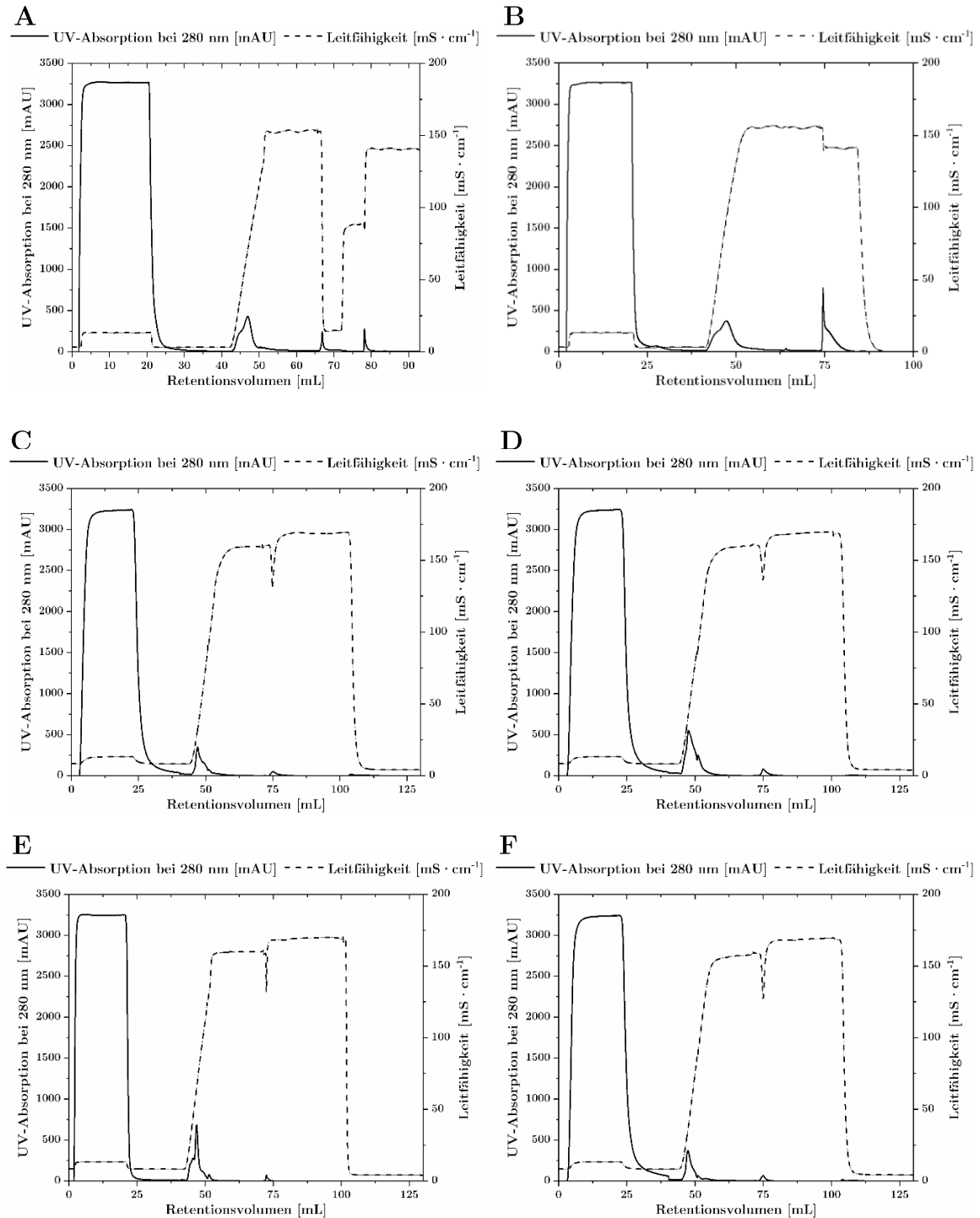


Abbildung 16: Aufreinigung des bFGF aus dem Zellüberstand per MMC. Dargestellt sind die FPLC-Chromatogramme der einzelnen Aufreinigungsmethoden.

- (A) Aufreinigung per Foresight<sup>TM</sup> Nuvia<sup>TM</sup> cPrime<sup>TM</sup>, 1 mL, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA.
- (B) Aufreinigung per HiTrap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup> MMC, 1 mL, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA.
- (C) Aufreinigung per Prototyp B, 1 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland.
- (D) Aufreinigung per Prototyp C, 1 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland.
- (E) Aufreinigung per Prototyp D, 1 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland.
- (F) Aufreinigung per Prototyp E, 1 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland.



Das FPLC-Chromatogramm der Proteinaufreinigung mittels Foresight™ Nuvia™ cPrime™ (Abbildung 16, A) wies einen überlagerten Peak zwischen einer NaCl-Konzentration von 0,1 und 1,5 M auf. Die Säule wurde nach der Aufreinigung mittels drei CIP-Schritten gereinigt, in denen ebenfalls Peaks zu sehen waren. Anhand der SDS-PAGE-Analyse (Abbildung 17, A) wurde bestimmt, dass sich bFGF im gesamten Elutionspeak befand. Die Reinheit, Wiederfindungsrate und Ausbeute sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Im CIP-Schritt war kein bFGF nachweisbar (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Aufreinigung des bFGF mittels HiTrap™ Capto™ MMC (Abbildung 16, B) wies einen überlagerten Peak auf. Die Elution fand zwischen 0,1 und 1,9 M NaCl statt. Im CIP-Schritt war ein Peak mit starkem Tailing. Die SDS-PAGE-Analyse (Abbildung 17, B) verdeutlichte, dass bFGF im gesamten Elutionspeak nachweisbar ist. Die Reinheit, Wiederfindungsrate und Ausbeute sind in Tabelle 5 dargestellt. Im CIP-Schritt war kein bFGF erkennbar (Ergebnis nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der bFGF-Aufreinigung mittels Prototypen B, C und E (Abbildung 16 C, 16 D und 16 F) resultierten allesamt mit einem Elutionspeak mit Tailing. Die Elution erfolgte mit einer NaCl-Konzentration von 0,1 M bis 1,5 M. Der Peak im CIP-Schritt war vernachlässigbar klein. Auch bei diesen Methoden wurde im gesamten Elutionspeak bFGF per SDS-PAGE-Analyse nachgewiesen (Abbildung 17 C, 17 D und 17 F). Die Reinheit, Wiederfindungsrate und Ausbeute sind in Tabelle 5 dargestellt. Im CIP-Schritt wurde kein bFGF nachgewiesen (Ergebnis nicht gezeigt).

Die Aufreinigung des bFGF mit Prototyp D (Abbildung 16 E) besaß einen hohen Elutionspeak zwischen 0,15 M und 1,8 M NaCl. Im CIP-Schritt befand sich ein kleiner Peak. Anhand der SDS-PAGE-Analyse (Abbildung 17 E) konnte bestimmt werden, dass sich bFGF im gesamten Elutionspeak befindet. Die Reinheit, Wiederfindungsrate und Ausbeute wurden in Tabelle 5 zusammengefasst. Im CIP-Schritt waren keine Banden des bFGF zu erkennen (Ergebnis nicht gezeigt).

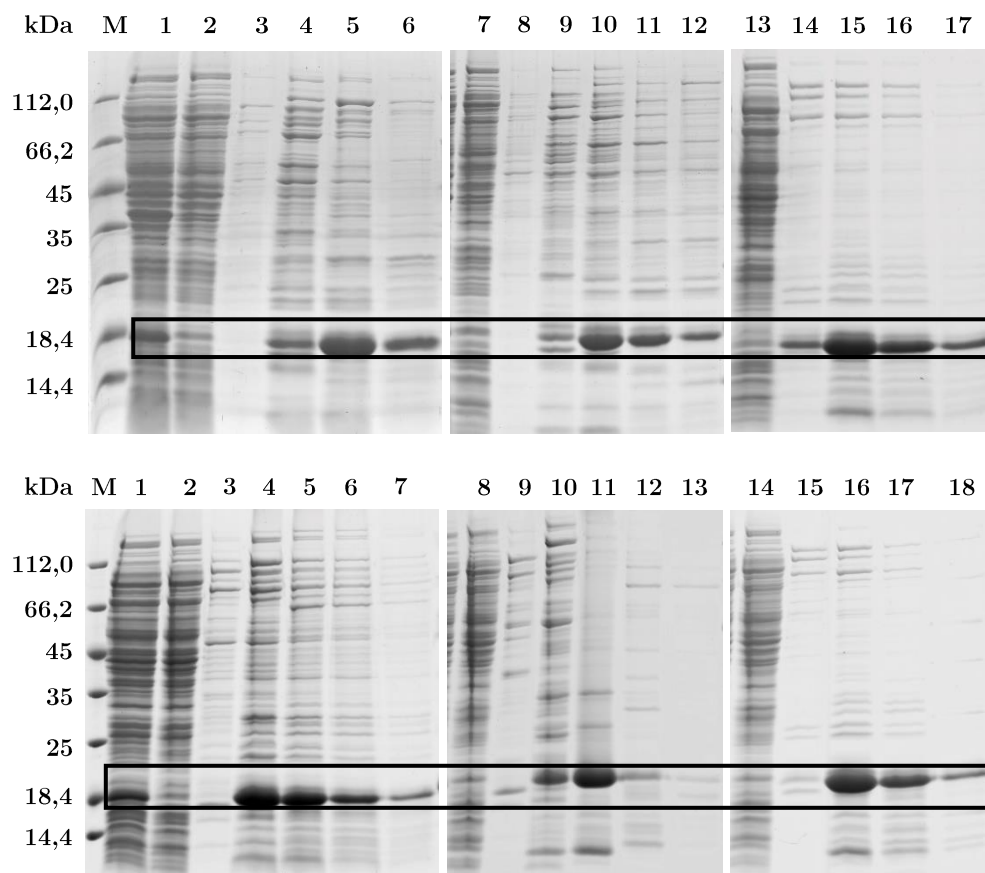


Abbildung 17: SDS-PAGE-Analysen der Aufreinigung des bFGF aus dem Zellüberstand per MMC. Hervorgehoben sind die Banden des bFGF bei 18 kDa.

Obere Reihe der SDS-PAGE-Analysen: M: Molekularer Größenstandard; 1: Probenauftrag; 2 – 6: Aufreinigung per Foresight™ Nuvia™ cPrime™, 1 mL, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA; 2: Durchfluss; 3 – 6: Elutionspeak; 7 – 12: Aufreinigung per HiTrap™ Capto™ MMC, 1 mL, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA; 7: Durchfluss; 8 – 12: Elutionspeak; 13 – 17: Aufreinigung per Prototyp B, 1 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland; 13: Durchfluss; 14 – 17: Elutionspeak.

Untere Reihe der SDS-PAGE-Analysen: M: Molekularer Größenstandard; 1: Probenauftrag; 2 – 7: Aufreinigung per Prototyp C, 1 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland; 2: Durchfluss; 3 – 7: Elutionspeak; 8 – 13: Aufreinigung per Prototyp D, 1 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland; 8: Durchfluss; 9 – 13: Elutionspeak; 14 – 18: Aufreinigung per Prototyp E, 1 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland; 14: Durchfluss; 15 – 18: Elutionspeak.

Die Aufreinigung des bFGF per MMC resultierte in einer Produktreinheit zwischen 40 und etwa 60 %. Die Ausbeuten waren allesamt sehr gering und lagen zwischen etwa 30 und 45 %. Die Wiederfindungsrate war zwischen 54 und 78 %. Es ist davon auszugehen, dass die geringe Ausbeute und die bFGF-Reinheit durch die hohe Konzentration zelleigener Proteine in der Probe zu erklären sind. Diese könnten die spezifischen

Bindestellen besetzt oder blockiert haben, sodass das Zielprotein die spezifischen Bindestellen nicht besetzen oder erreichen konnte.

Tabelle 5: Ergebnisse der Aufreinigung des bFGF aus dem Zellüberstand per MMC durch die Angabe der Proteinreinheit, Wiederfindungsrate und Ausbeute in [%] mit Standardabweichungen.

Säule/Membranadsorber	Reinheit [%]	Wiederfindungsrate [%]	Ausbeute [%]
Foresight <sup>TM</sup> Nuvia <sup>TM</sup> cPrime <sup>TM</sup>	51±1	75±20	29±1
HiTrap <sup>TM</sup> Capto <sup>TM</sup> MMC	45±4	59±8	28±8
Prototyp B	57±5	78±23	35±5
Prototyp C	40±5	54±2	36±5
Prototyp D	56±4	77±16	45±4
Prototyp E	55±0,5	68±16	41±0,5

### 3.3.1.4 Pseudo-Affinitätschromatographie

Die Eigenschaften einer pseudo-Affinitätschromatographie beruhen wie die der Affinitätschromatographie auf der hohen Spezifität zwischen Liganden und Analyten, wobei die Liganden in diesem Fall synthetisch hergestellt wurden. Weitere Eigenschaften wurden bereits in Kapitel 2.3.2 diskutiert.

Die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Materialien der pseudo-Affinitätschromatographien besaßen Heparin-ähnliche Liganden. Hierbei wurden von der Sartorius AG der MA Sartobind® Sulfatierte Cellulose (SUCA) und von GE Healthcare Life Sciences die Chromatographiesäule Capto<sup>TM</sup> DeVirS zur Verfügung gestellt und getestet.

#### *Sartobind® Sulfatierte Cellulose (SUCA)*

Der MA SUCA zeichnet sich durch Sulfatgruppen an chemisch modifizierter Cellulose aus. Das Bettvolumen des MA liegt bei 3 mL, weshalb das Probenvolumen 60 mL umfasste. Die bFGF-Konzentration betrug 0,9 mg · mL<sup>-1</sup>. Das Chromatogramm und die SDS-PAGE-Analyse sind in Abbildung 18 dargestellt.

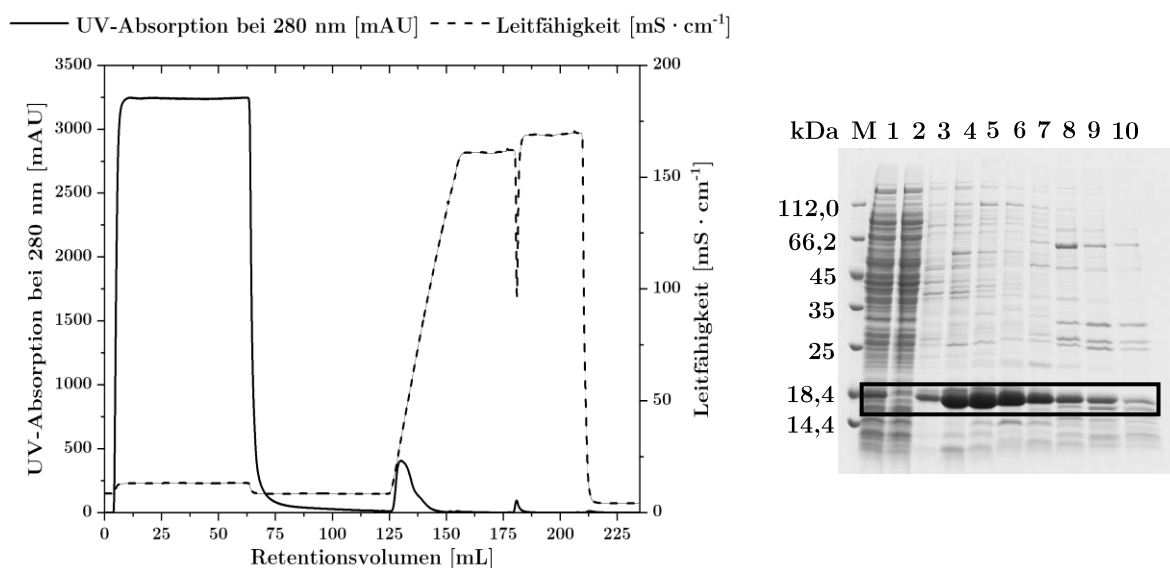


Abbildung 18: Aufreinigung des bFGF aus dem Zellüberstand per Pseudo-Affinitätschromatographie (Sartobind® Sulfatierte Cellulose, 3 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland).

Links ist das FPLC-Chromatogramm dargestellt, rechts das Gel der SDS-PAGE-Analyse. M: Molekularer Größenstandard; 1: Probenaufrag; 2: Durchfluss; 3 – 10: bFGF-Elutionspeak. Hervorgehoben sind die Banden des bFGF bei 18 kDa.

Die Aufreinigung des bFGF per MA SUCA resultierte in einem Elutionspeak zwischen 0,1 und 1,3 M NaCl, welcher sich durch geringes Tailing auszeichnete. Anhand der SDS-PAGE-Analyse wurde bestimmt, dass der Wachstumsfaktor bei 0,25 M NaCl eluierte. Unter diesen Bedingungen konnte eine Reinheit des bFGF von 60 % erreicht werden. Die Wiederfindungsrate lag bei 78 % und die Ausbeute bei 41 %. Die Ausbeute und die bFGF-Reinheit sind wahrscheinlich durch die hohe Konzentration der zelleigenen Proteine in der Probe zu erklären. Diese könnten verhindert haben, dass das Zielprotein die spezifischen Bindestellen erreichen und besetzen kann. Zusätzlich könnten die Verunreinigungen durch unspezifische Wechselwirkungen die Bindestellen besetzt haben, so dass bFGF teilweise mit einer sehr niedrigen NaCl-Konzentration eluierte.

*Capto<sup>TM</sup> DeVirS*

Das verwendete Material der Chromatographiesäule Capto<sup>TM</sup> DeVirS bestand aus Dextran, das chemisch mit Sulfatgruppen modifiziert wurde, und wies ein Bettvolumen von 4,7 mL auf. Es wurde ein Probenvolumen von 48 mL aufgetragen. Das Chromatogramm und die SDS-PAGE-Analyse sind in Abbildung 19 abgebildet.

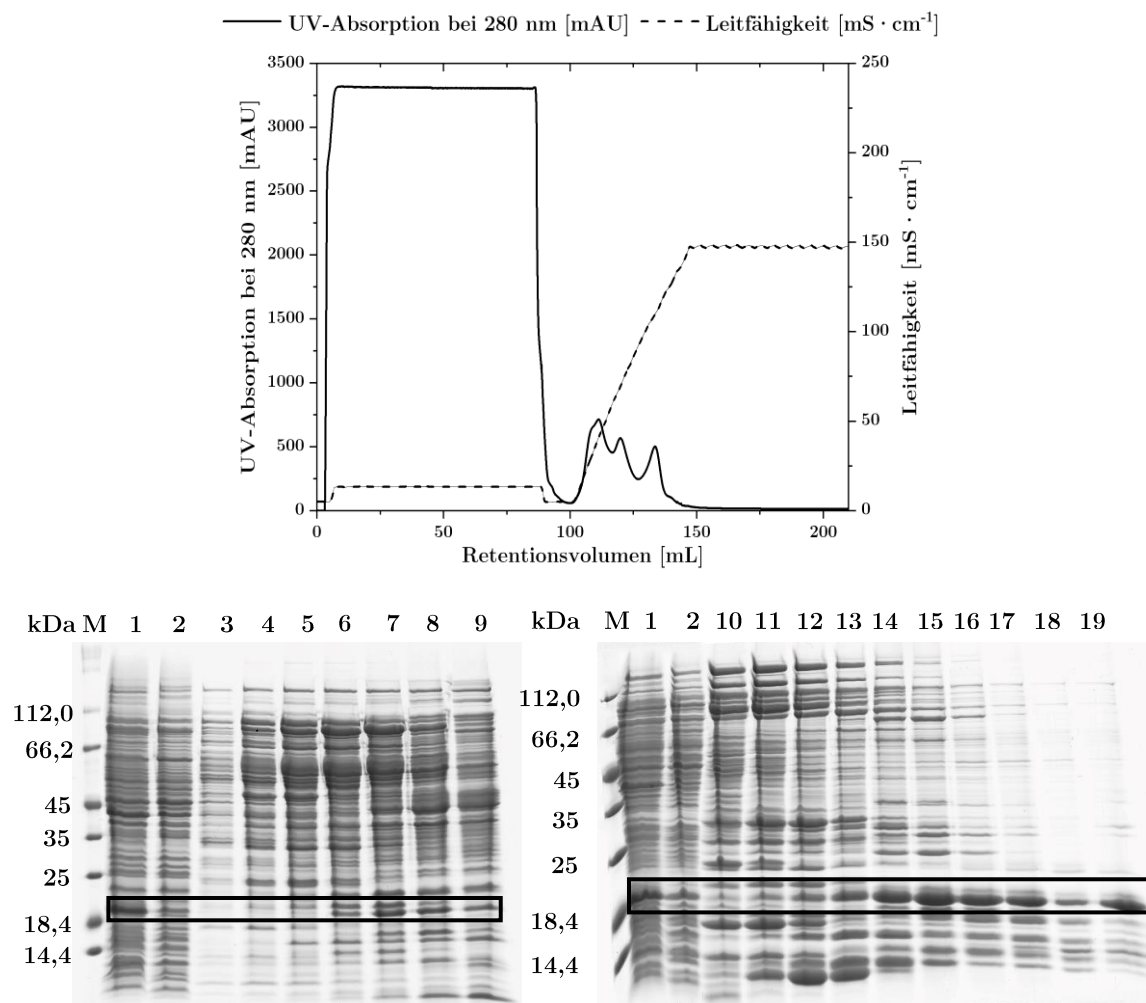


Abbildung 19: Aufreinigung des bFGF aus dem Zellüberstand per Pseudo-Affinitätschromatographie (Capto<sup>TM</sup> DeVirS, 4,7 mL, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA).

Oben: FPLC-Chromatogramm, unten: Gele der SDS-PAGE-Analyse. M: Molekularer Größenstandard; 1: Probenauftrag; 2: Durchfluss; 3 – 19: Überlagerte Elutionspeaks.

Die Aufreinigung mittels Capto<sup>TM</sup> DeVirS-Säule erfolgte über drei überlagerte Elutionspeaks zwischen 0,1 und 1,7 M NaCl. Anhand der SDS-PAGE-Analyse ist zu erkennen, dass der letzte Elutionspeak bei etwa 1,3 M NaCl dem Wachstumsfaktor bFGF

zugeordnet werden kann (Fraktionen 13-19). In diesem Elutionspeak sind deutliche Banden bei der Größe des bFGF zu erkennen. Im ersten Peak befindet sich ebenfalls bei 18,4 kDa eine Bande, allerdings wird es sich um zelleigene Proteine von derselben Größe wie bFGF handeln. Eventuell könnte es auch fehlgefaltetes bFGF sein, welches nicht dieselben Interaktionen mit dem Liganden eingehen konnte und daher früher eluierte. Unter diesen Bedingungen erzielte die Capto<sup>TM</sup> DeVirS-Säule eine bFGF-Reinheit von 60 %. Die Ausbeute lag bei 73 % und die Wiederfindungsrate bei 82 %.

### 3.3.1.5 Zwischenfazit

Die Ergebnisse der Aufreinigung direkt aus dem Überstand sind in Abbildung 20 zusammengefasst. Anhand der Versuche wurde gezeigt, dass die Verwendung der Heparin-Affinitätschromatographie unter diesen Bedingungen die höchste Proteinreinheit und Wiederfindungsrate erzielt. Die besten Ergebnisse hinsichtlich der Reinheit des erhaltenen bFGF erzielte die Aufreinigung mittels pseudo-Affinitätschromatographie mit der Capto<sup>TM</sup> DeVirS-Säule und dem SUCA-MA sowie die MMC mit dem MA Prototyp B. Diese erreichten eine bFGF-Reinheit von etwa 60 %. Beim Einbeziehen der Ausbeute und Wiederfindungsrate ist die Verwendung der Capto<sup>TM</sup> DeVirS-Säule die beste Alternative. Ein Capture-Schritt allein ermöglicht somit nicht die vollständige Aufreinigung des bFGF. Durch einen vorherigen CEX-Schritt wie in der etablierten Methode könnte die Aufreinigung verbessert werden. Aus diesem Grund wurde ein CEX-Schritt als Capture-Schritt eingeführt und der intermediäre Aufreinigungsschritt mittels alternativer Aufreinigungsmethoden durchgeführt (Kapitel 3.3.2).

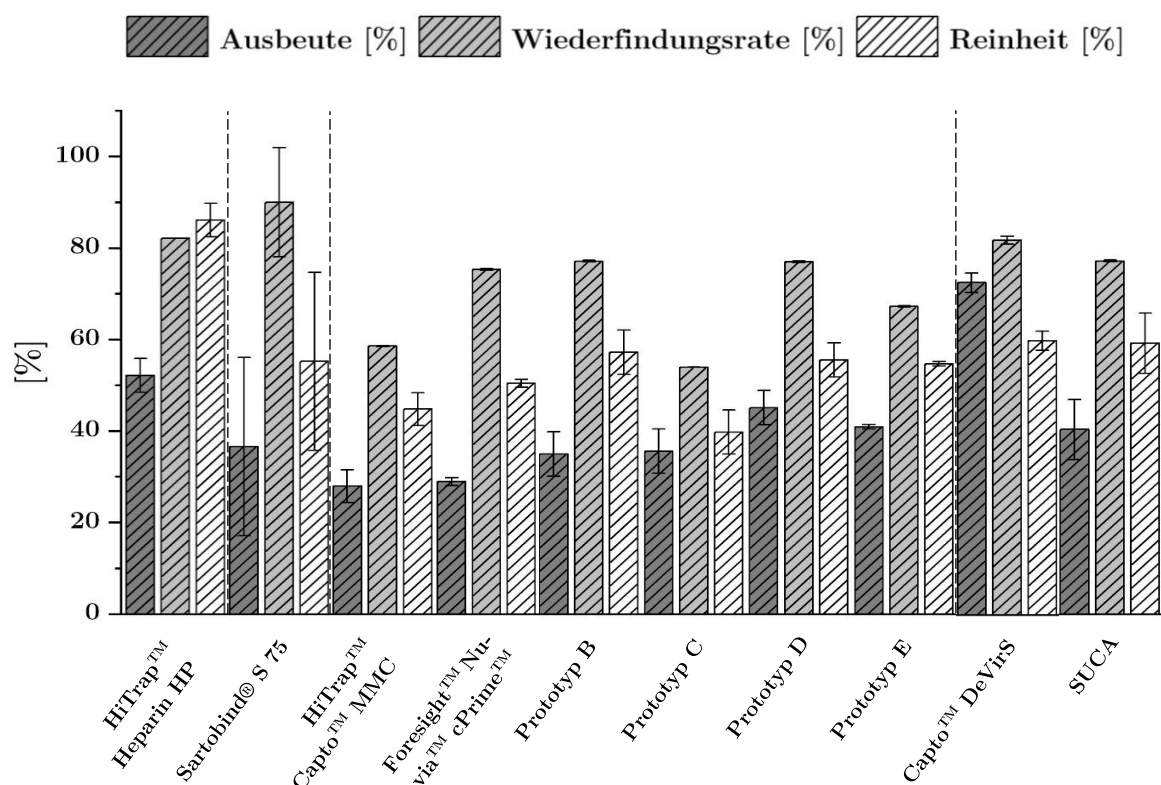


Abbildung 20: Ergebnisse der Aufreinigung des bFGF aus dem Überstand nach dem Zellaufschluss. Es sind die einzelnen Säulen- und Membran-chromatographischen Methoden hinsichtlich ihrer Ausbeute (dunkelgrau), Wiederfindungsrate (mittelgrau) und Reinheit (hellgrau) nebeneinander mit Standardabweichungen aufgetragen. Die Standardabweichung ergibt sich aus der dreifachen Durchführung der Versuche. Die waagrecht gestrichelten Linien begrenzen die einzelnen Methoden wie im Kapitel (Heparin-Affinitätschromatographie, CEX, MMC, Pseudo-Affinitätschromatographie).

### 3.3.2 Alternative Aufarbeitungsmethoden als intermediärer Aufreinigungsschritt in der Aufreinigung des bFGF

Mit der Aufreinigung des bFGF aus dem Zellüberstand per alternativer Säulen- und Membran-chromatographischer Methoden in Kapitel 3.3.1 konnte eine Reinheit des bFGF von maximal 60 % erreicht werden. Für die therapeutische Anwendung wird jedoch eine höhere Reinheit benötigt. Aus diesem Grund wurden die alternativen Säulen- und Membran-chromatographischen Methoden ebenfalls als intermediärer Aufreinigungsschritt nach vorheriger CEX als Capture-Schritt getestet, um eine höhere Proteinreinheit zu erreichen.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden, wie in Kapitel 3.3.1, 21 g Zellpellet in 15 mL Zellysepuffer (25 mM Phosphatpuffer, 1,25 mM  $\text{MgCl} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 100 mM NaCl, 3 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7,5) pro Gramm Zellfeuchtmasse gelöst und per Hochdruck-Homogenisator aufgeschlossen. Nach Zentrifugation und Sterilfiltration (0,2  $\mu\text{m}$  Porengröße) des Überstands wurde die Probe per CEX aufgereinigt. Die Aufreinigung des bFGF aus dem Überstand erfolgte mit einem starken Kationenaustauscher (Sartobind® S nano, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) mit einem Bettvolumen von 3 mL. Dieser MA zeichnet sich ebenfalls wie der bisher verwendete Sartobind® S 75 durch Sulfonsäure-Reste als Liganden aus. Für diese Versuchsreihe lag ein sehr großes Probenvolumen vor, weshalb der Sartobind® nano mit einem größeren Bettvolumen und der damit einhergehenden höheren Kapazität verwendet wurde (Tabelle 6) [106,107]. Es wurden zusätzlich zwei MA in Reihe geschaltet, wodurch ein Bettvolumen von 6 mL entstand. Aufgrund der höheren Kapazität konnte der Capture-Schritt mit dem gesamten Probenvolumen in einem Chromatographielauf durchgeführt werden.

Tabelle 6: Vergleich der MA Sartobind® S 75 und Sartobind® S nano [106,107].

Membranadsorber	Bettvolumen [mL]	Membranfläche [ $\text{cm}^2$ ]	Dynamische Bindekapazität [10 %, mg pro Einheit]
Sartobind® S 75	2,1	75	52,5
Sartobind® S nano	3	110	77,0

Das Probenvolumen lag bei etwa 300 mL mit einem Anteil des bFGF von etwa 12 %, welches einer bFGF-Konzentration von  $0,9 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  entsprach. Die Aufreinigung des bFGF per CEX als Capture-Schritt wurde, wie in Kapitel 3.2.1, beschrieben durchgeführt. Der MA wurde zuerst mit 10 CV BP äquilibriert. Nach der Probenaufgabe wurde der MA mit 15 CV BP gewaschen. Die Elution erfolgte über einen dreistufigen Gradienten mit 300 mM NaCl, 600 mM NaCl sowie 1 M NaCl (1. Stufe (40 CV), 2. und 3. Stufe (20 CV)). Die chromatographische Aufreinigung wurde per SDS-PAGE analysiert und die Proteinkonzentration per Bradford-Test bestimmt (Abbildung 21).



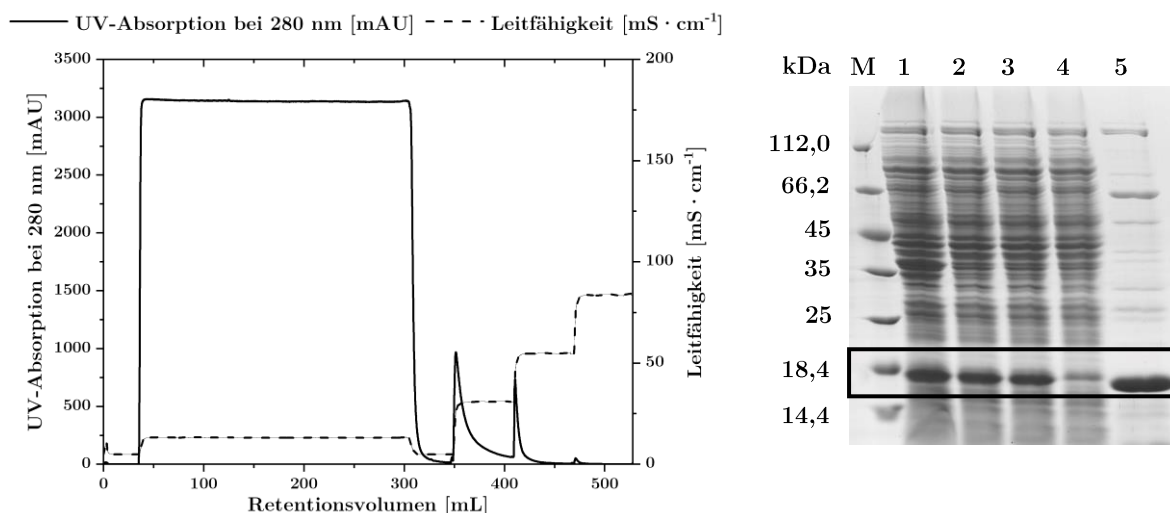


Abbildung 21: Aufreinigung des bFGF aus dem Zellüberstand per zwei in Reihe geschalteter CEX (Sartobind® S nano, 3 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland).

Links ist das FPLC-Chromatogramm dargestellt, rechts das Gel der SDS-PAGE-Analyse. M: Molekularer Größenstandard; 1: Probenauftrag; 2: Durchfluss; 3: 1. Elutionspeak bei 300 mM NaCl; 4: bFGF-Elutionspeak bei 600 mM NaCl; 5: Elutionspeak bei 1 M NaCl. Hervorgehoben sind die Banden des bFGF bei 18 kDa.

Die bFGF-enhaltenden Fraktionen der zweiten Stufe wurden vereint und enthielten  $3,3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  bFGF. Nach diesem Aufreinigungsschritt lag der Wachstumsfaktor mit einer Reinheit von 65 % vor. Damit die bFGF-Probe unter denselben Bedingungen vorlag wie bei den vorherigen Versuchen aus Kapitel 3.3.1, wurden die bFGF-enhaltenden Fraktionen per Desalting-Säule HiPrep 26/10 (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA) entsalzt. Diese Methode ist zum Entsalzen sehr effektiv, geht allerdings mit einem starken Verdünnungsfaktor der Probe einher. Die bFGF-enhaltenden Fraktionen wurden vereint und wiesen eine bFGF-Konzentration von  $0,6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  auf. Das Probenvolumen wurde hinsichtlich des Säulenvolumens auf die einzelnen Methoden aufgeteilt. Die Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Im Folgenden wurden die Ergebnisse der verschiedenen chromatographischen Methoden untersucht. Die Parameter und Puffer sind identisch zu 3.3.1.

### 3.3.2.1 Heparin-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung des bFGF per Heparin-Affinitätschromatographie wurde auch in diesem Kapitel als Referenzmethode für alle weiteren Säulen- oder Membran-chromatographischen Methoden verwendet. Die Affinitätssäule HiTrap™ Heparin HP mit einem Volumen von 1 mL (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA) wurde mit einem Probenvolumen von 2,5 mL und einer bFGF-Konzentration von  $0,6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  beladen. Das Chromatogramm und die SDS-PAGE-Analyse sind in Abbildung 22 dargestellt.

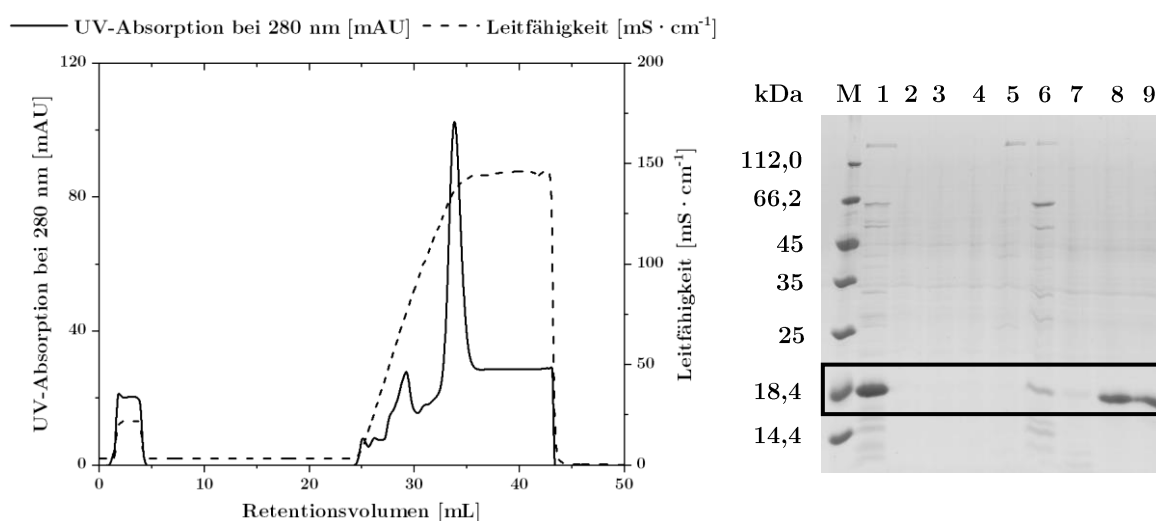


Abbildung 22: Aufreinigung des bFGF nach vorherigem CEX-Schritt per Heparin-Affinitätschromatographie (HiTrap™ Heparin HP, 1 mL, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA).

Links ist das FPLC-Chromatogramm dargestellt, rechts das Gel der SDS-PAGE-Analyse. M: Molekularer Größenstandard; 1: Probenauftrag (vor dem Entsalzen); 2 + 3: Durchfluss; 4 – 7: Überlagerte Elutionspeaks; 8 + 9: bFGF-Elutionspeak. Hervorgehoben sind die Banden des bFGF bei 18 kDa.

Das Chromatogramm weist zwei Elutionspeaks auf. Anhand der SDS-PAGE-Analyse wurde bestimmt, dass der zweite Elutionspeak bei 1,7 M NaCl dem bFGF zugeordnet werden kann. Die Verunreinigungen wurden bereits bei einer geringeren NaCl-Konzentration entfernt. Durch diesen Aufreinigungsschritt wurde eine densitometrisch ermittelte Reinheit des bFGF von etwa 94 % erzielt. Die Ausbeute lag bei 89 %.

### 3.3.2.2 Mixed-Mode-Chromatographie

Nach dem Kationenaustauscher wurde die bFGF-Probe ebenfalls per MMC aufgereinigt und die Ergebnisse verglichen.

#### *Foresight<sup>TM</sup> Nuvia<sup>TM</sup> cPrime<sup>TM</sup>*

Die MMC-Säule *Foresight<sup>TM</sup> Nuvia<sup>TM</sup> cPrime<sup>TM</sup>* von Bio-Rad Laboratories (Bettvolumen 1 mL) wurde mit einem Probenvolumen von 2,5 mL und einer bFGF-Konzentration von  $0,6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  beladen. Das Chromatogramm und die SDS-PAGE-Analyse sind in Abbildung 23 dargestellt.

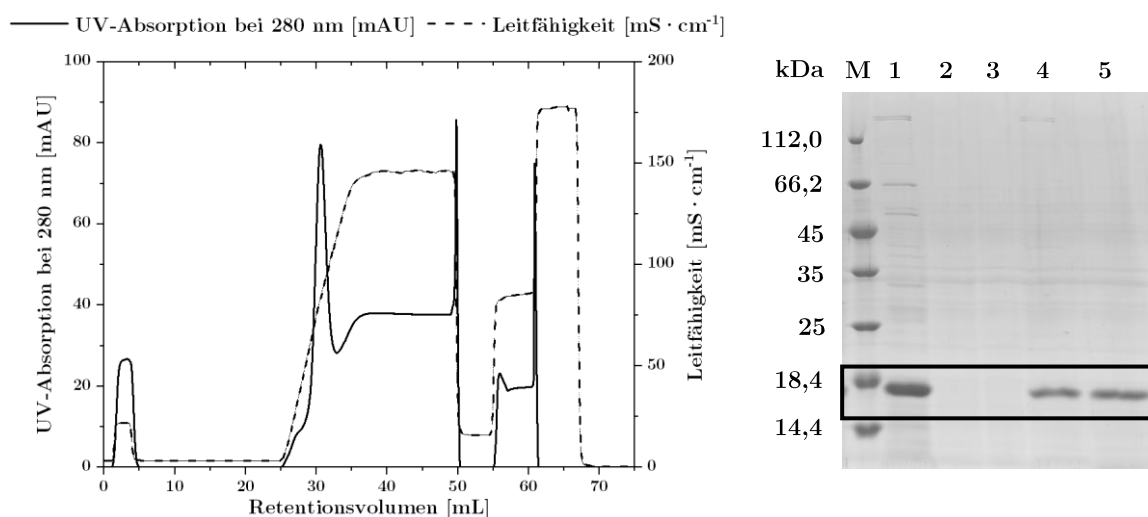


Abbildung 23: Aufreinigung des bFGF nach vorherigem CEX-Schritt per MMC (*Foresight<sup>TM</sup> Nuvia<sup>TM</sup> cPrime<sup>TM</sup>*, 1 mL, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

Links ist das FPLC-Chromatogramm dargestellt, rechts das Gel der SDS-PAGE-Analyse. M: Molekularer Größenstandard; 1: Probenaufnahme (vor dem Entsalzen); 2: Durchfluss; 3 – 6: bFGF-Elutionspeak. Hervorgehoben sind die Banden des bFGF bei 18 kDa.

Der Verlauf der bFGF-Aufreinigung resultierte in einem Elutionspeak zwischen 0,8 und 1,5 M NaCl. Die drei CIP-Schritte wiesen jeweils einen hohen, schmalen Peak auf. Anhand der SDS-PAGE-Analyse wurde bFGF im gesamten Elutionspeak nachgewiesen. Unter diesen Bedingungen wurde eine bFGF-Reinheit von 90 % und einer Ausbeute von 85 % erzielt. Die Peaks in den CIP-Schritten sind wahrscheinlich aufgrund der Ventilumstellung auf die CIP-Lösungen entstanden, da in der SDS-PAGE-Analyse (Ergebnisse nicht gezeigt) keine Banden zu erkennen waren. Im Gegensatz zu der

direkten Aufreinigung des bFGF aus dem Zelllysat (51 % Reinheit des bFGF) konnte durch die Verwendung der Foresight™ Nuvia™ cPrime™-Säule im zweiten Aufreinigungsschritt deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden.

### *HiTrap™ Capto™ MMC*

Ebenfalls wurde die MMC-Säule HiTrap™ Capto™ MMC von GE Healthcare Life Sciences (Bettvolumen 1 mL) als zweiter Aufreinigungsschritt getestet. Die Säule wurde mit einem Probenvolumen von 2,5 mL und einer bFGF-Konzentration von  $0,6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  beladen. Das Chromatogramm und die SDS-PAGE-Analyse sind in Abbildung 24 abgebildet.

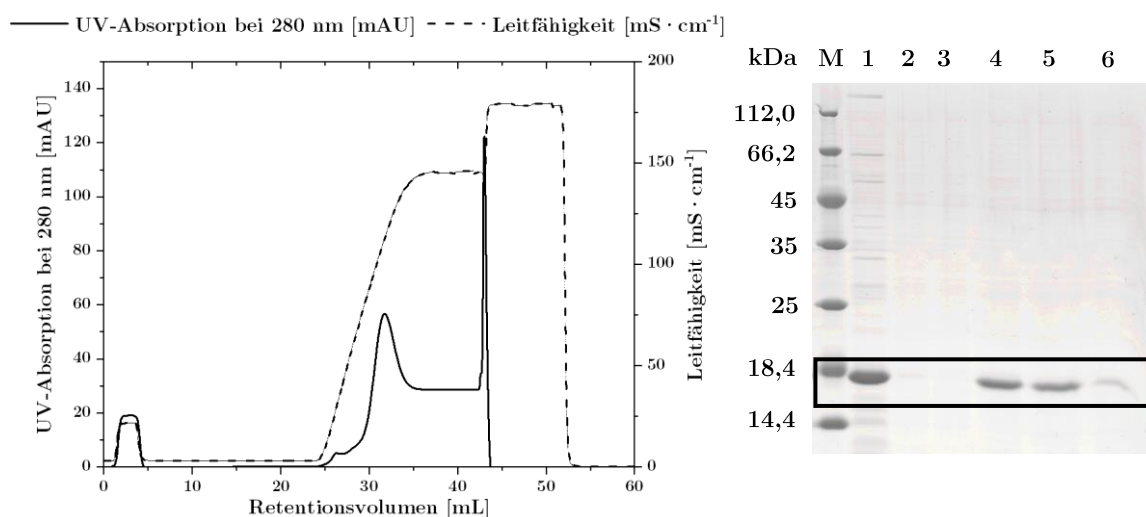


Abbildung 24: Aufreinigung des bFGF nach vorherigem CEX-Schritt per MMC (HiTrap™ Capto™ MMC, 1 mL, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA).

Links ist das FPLC-Chromatogramm dargestellt, rechts das Gel der SDS-PAGE-Analyse. 1: Probenauflauf (vor dem Entsalzen); 2: Durchfluss; 3: Wachsritt; 4 – 6: bFGF-Elutionspeak. Hervorgehoben sind die Banden des bFGF bei 18 kDa.

Der Verlauf der bFGF-Aufreinigung resultierte in einem Elutionspeak zwischen 0,8 und 1,9 M NaCl. Im CIP-Schritt ist ein hoher, schmaler Peak zu sehen. Anhand der SDS-PAGE-Analyse konnte bestätigt werden, dass sich bFGF in jeder Fraktion des Elutionspeaks befindet. In der Fraktion des CIP-Schrittes (Ergebnisse nicht gezeigt) waren keine Banden zu erkennen, weshalb sich der hohe, schmale Elutionspeak im CIP-Schritt wohl ebenfalls auf das Umschalten der Ventile zurückführen lässt.

Durch die Verwendung der MMC-Säule HiTrap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup> MMC im zweiten Aufreinigungsschritt konnte eine Reinheit des bFGF von 90 % mit einer Ausbeute von 85 % erzielt werden. Diese Ergebnisse sind ebenfalls deutlich besser als die Aufreinigung des bFGF direkt aus dem Überstand nach dem Zellaufschluss (45 % bFGF-Reinheit).

### Prototypen B bis E

Die Mixed-Mode-MA Prototypen B bis E der Sartorius AG mit einem Bettvolumen von 1 mL wurden ebenfalls als intermediärer Aufreinigungsschritt getestet und mit 2,5 mL Probevolumen mit einer bFGF-Konzentration von  $0,6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  beladen. Aufgrund der ähnlichen Ergebnisse wurden diese der Übersichtlichkeit halber zusammengefasst. Die FPLC-Chromatogramme sind in Abbildung 25 und die SDS-PAGE-Analysen in Abbildung 26 dargestellt.

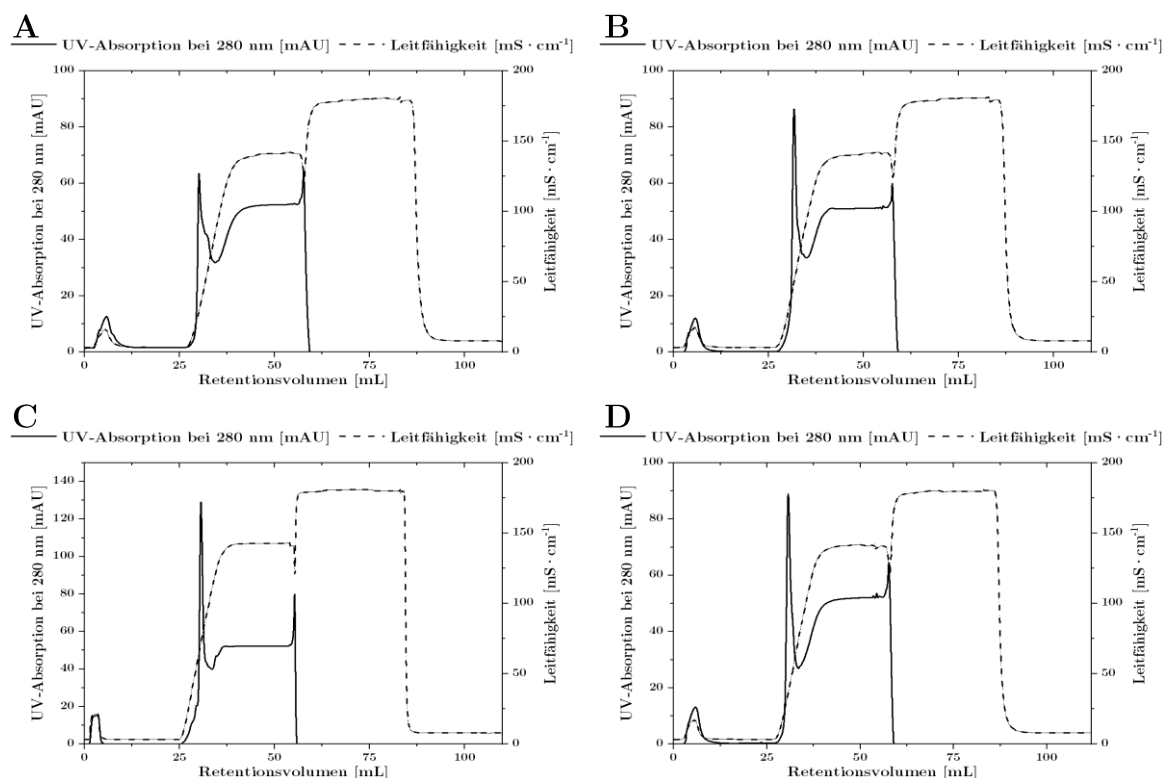


Abbildung 25: Aufreinigung des bFGF nach der CEX per Mixed-Mode-Chromatographie. Es sind die FPLC-Chromatogramme der verschiedenen Prototypen dargestellt.

- (A) Aufreinigung per Prototyp B, 1 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland;
- (B) Aufreinigung per Prototyp C, 1 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland;
- (C) Aufreinigung per Prototyp D, 1 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland;
- (D) Aufreinigung per Prototyp E, 1 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland.

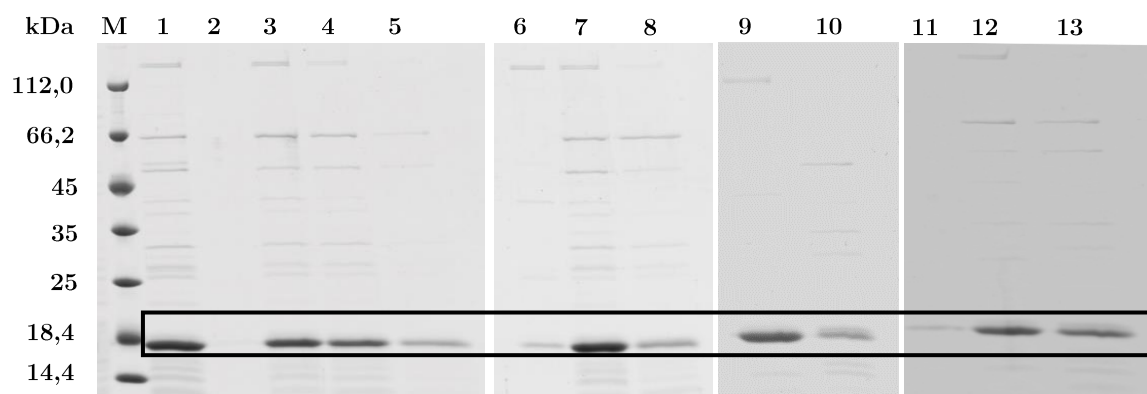


Abbildung 26: SDS-PAGE-Analysen der Aufreinigung des bFGF nach vorherigem CEX-Schritt per MMC MA. Hervorgehoben sind die Banden des bFGF bei 18 kDa.

Von links nach rechts: M: Molekularer Größenstandard; 1: Probenauftrag der MMCs (vor dem Entsalzen); 2 – 5: Aufreinigung per Prototyp B, 1 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland; 2: Durchfluss; 3 – 5: Elutionspeak; 6 – 8: Elutionspeak der Aufreinigung per Prototyp C, 1 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland; 9+10: Elutionspeak der bFGF-Aufreinigung per Prototyp D, 1 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland; 11 – 13: Aufreinigung per Prototyp E, 1 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland. Die Fraktionen des Durchflusses von den Prototypen C bis E sind nicht dargestellt, da in diesen keine Banden zu erkennen sind.

Die Elution der Proteinprobe führte bei der Verwendung jedes MA zu einem Elutionspeak zwischen 0,1 und 1 M NaCl, in welchem in jeder Fraktion bFGF nachgewiesen werden konnte. Jeder dieser Versuche führte zu einer Reinheit von 60-65 %, welches somit keiner Verbesserung nach dem Capture-Schritt (65 % Reinheit) entsprach.

### 3.3.2.3 Pseudo-Affinitätschromatographie

Die pseudo-Affinitätschromatographie – SUCA und Capto™ DeVirS – wurde ebenfalls nach vorherigem CEX-Schritt getestet.

#### *Sartobind® Sulfatierte Cellulose (SUCA)*

Der MA SUCA mit dem Bettvolumen von 3 mL wurde mit einem Probenvolumen von 7,5 mL und einer bFGF-Konzentration von  $0,6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  beladen. In Abbildung 27 sind das Chromatogramm und die SDS-PAGE-Analyse dargestellt.

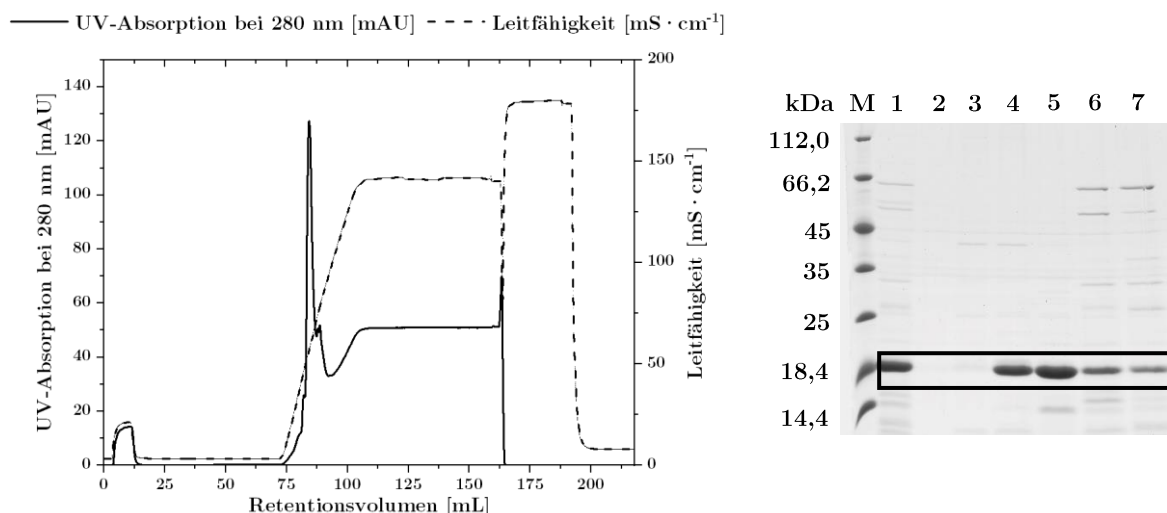


Abbildung 27: Aufreinigung des bFGF nach vorherigem CEX-Schritt per Pseudo-Affinitätschromatographie (Sartobind® Sulfatierte Cellulose, 3 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland).

Links ist das FPLC-Chromatogramm dargestellt, rechts das Gel der SDS-PAGE-Analyse. M: Molekularer Größenstandard; 1: Probenauftrag (vor dem Entsalzen); 2: Durchfluss; 3 – 7: bFGF-Elutionspeak. Hervorgehoben sind die Banden des bFGF bei 18 kDa.

Der Verlauf der bFGF-Aufreinigung resultierte in einem Elutionspeak zwischen 0,1 und 1,3 M NaCl. Anhand der SDS-PAGE-Analyse konnte ermittelt werden, dass der Wachstumsfaktor bei einer NaCl-Konzentration von etwa 0,8 M eluierte. Unter diesen Bedingungen konnte eine Reinheit des bFGF von 70 % erreicht werden. Die Ausbeute betrug 76 %. Im Gegensatz zu der direkten Aufreinigung des bFGF aus dem Zelllysate (60 % Reinheit des bFGF) konnte die Verwendung des MA SUCA im zweiten Aufreinigungsschritt bessere Ergebnisse erzielen.

### *Capto™ DeVirS*

Die pseudo-Affinitätssäule Capto™ DeVirS wurde entsprechend ihres Bettvolumens von 4,7 mL mit einem Probenvolumen von 11,5 mL beladen. Die bFGF-Konzentration betrug auch hier  $0,6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Das Chromatogramm und die SDS-PAGE-Analyse sind in Abbildung 28 abgebildet.

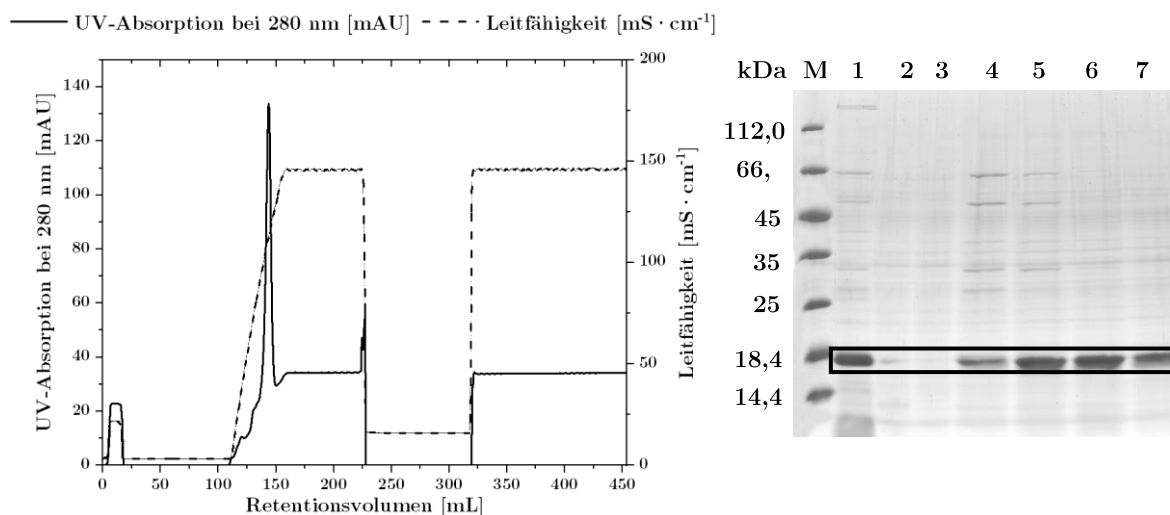


Abbildung 28: Aufreinigung des bFGF nach vorherigem CEX-Schritt per pseudo-Affinitätschromatographie (Capto™ DeVirS, 4,7 mL, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA). Links ist das FPLC-Chromatogramm dargestellt, rechts das Gel der SDS-PAGE-Analyse. M: Molekularer Größenstandard; 1: Probenauftrag (vor dem Entsalzen); 2: Durchfluss; 3: Waschschrift; 4 – 7: bFGF-Elutionspeak. Hervorgehoben sind die Banden des bFGF bei 18 kDa.

Die Aufreinigung des bFGF per pseudo-Affinitätssäule Capto™ DeVirS nach vorherigem CEX-Schritt resultierte in einem Elutionspeak zwischen 1,3 und 1,7 M NaCl. Der Wachstumsfaktor ist in jeder der Elutionsfraktionen wiederzufinden. Durch die Verwendung der Capto™ DeVirS als zweiten Aufreinigungsschritt wurde eine Reinheit des bFGF von 70 % und einer Ausbeute von 95 % erreicht. Im Gegensatz zu der direkten Aufreinigung des bFGF aus dem Zelllysate (60 % Reinheit des bFGF) konnte die Verwendung dieser Säule im zweiten Aufreinigungsschritt bessere Ergebnisse erzielen.

### 3.3.2.4 Zwischenfazit

Die zweistufige Aufreinigung des bFGF erzielte in den vorangegangenen Experimenten deutlich bessere Ergebnisse als die einstufige Aufreinigung (Kapitel 3.3.1). Die Aufreinigung des bFGF per CEX lieferte durch die Stufenelution bereits eine bFGF-Reinheit von 65 %. Die bFGF-enthaltenden Fraktionen wurden vereint, durch die Desalting-Säule HiPrep 26/10 entsalzt und auf die weiteren Säulen und MA verteilt. Die Ergebnisse in Reinheit, Ausbeute und Recovery sind als Säulendiagramm in Abbildung 29



dargestellt. Anhand dieser Versuche lässt sich darauf schließen, dass die Verwendung der Heparin-Affinitätschromatographie unter den getesteten Bedingungen die beste Methode zur Aufreinigung des bFGF darstellt. Allerdings stellen die MMC-Säulen HiTrap™ Capto™ MMC von GE Healthcare Life Sciences und Foresight™ Nuvia™ cPrime™ Bio-Rad Laboratories gute Alternativen dar. Diese erzielen unter den getesteten Bedingungen eine Produktreinheit von 90 % und eine Ausbeute von 85 %.

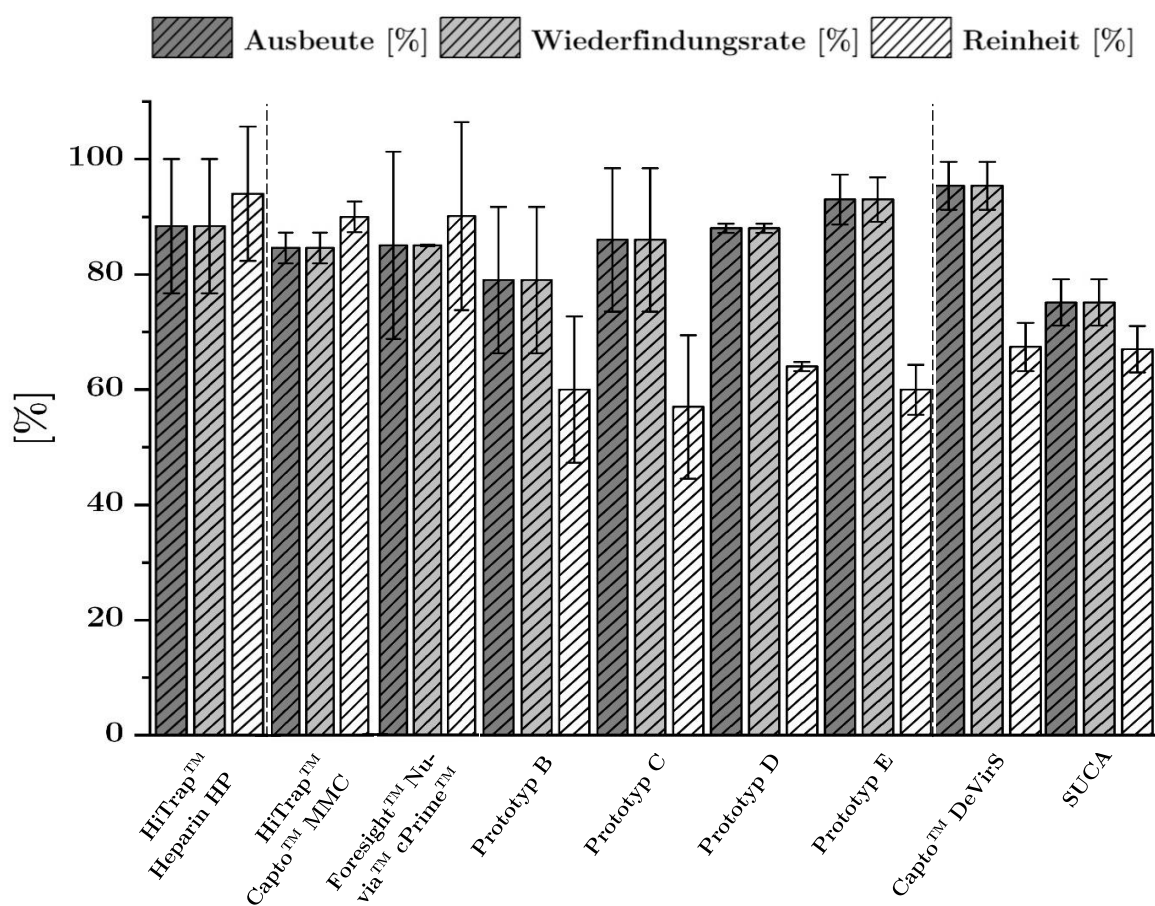


Abbildung 29. Ergebnisse der Aufreinigung des bFGF nach vorherigem CEX-Schritt.

Es sind die einzelnen Säulen- und Membran-chromatographischen Methoden hinsichtlich ihrer Ausbeute (dunkelgrau), Wiederfindungsrate (mittelgrau) und Reinheit (hellgrau) nebeneinander mit Standardabweichung aufgetragen. Die Standardabweichung ergibt sich aus der dreifachen Durchführung der Versuche. Die waagrecht gestrichelten Linien begrenzen die einzelnen Methoden wie im Kapitel (Heparin-Affinitätschromatographie, MMC, Pseudo-Affinitätschromatographie).

### 3.3.3 Fazit

In diesem Kapitel wurde die Aufreinigung des bFGF mit verschiedenen Materialien mit multimodalen und pseudo-biospezifischen Liganden untersucht. Diese Materialien wurden im Aufreinigungsverfahren der bFGF bei der MMC oder pseudo-Affinitätschromatographie eingesetzt. Diese Methoden wurden direkt als Capture-Schritt und als intermediärer Aufreinigungsschritt getestet und bewertet.

Die Aufreinigung des bFGF erzielte durch die Kombination aus der CEX als Capture-Schritt und einem sich anschließenden intermediären Aufreinigungsschritt deutlich bessere Ergebnisse in der Proteinreinheit, Wiederfindungsrate und Ausbeute als nur mit einem Capture-Schritt. Die Aufreinigung nur mit einem Capture-Schritt führte bei der Verwendung der Heparin-Affinitätschromatographie zwar zu einer bFGF-Reinheit von 86 %, ging allerdings mit hohen Proteinverlusten von etwa 50 % einher. Die Aufreinigung mittels MMC und pseudo-Affinitätschromatographie erreichte eine geringere Produktreinheit von maximal 60 % und wies ebenfalls hohe bFGF-Verluste auf. Dies könnte darin begründet sein, dass zelleigene Proteine das Zielprotein bFGF daran hinderten die spezifischen Bindestellen zu erreichen und zu besetzen. Des Weiteren könnten durch unspezifische Wechselwirkungen der zelleigenen Proteine Bindestellen besetzt worden sein.

Im zweiten Versuchsteil führte die Verwendung des etablierten Capture-Schritts mittels CEX bereits zu einer bFGF-Reinheit von 65 %. Der Einsatz der Heparin-Affinitätschromatographie als intermediärer Aufreinigungsschritt führte zu einer Produktreinheit von 94 % mit einer Ausbeute von 90 %. Die Verwendung der alternativen chromatographischen Methoden resultierte in unterschiedlichen Ergebnissen. Die MMC-Säulen HiTrap™ Capto™ MMC von GE Healthcare Life Sciences und Foresight™ Nuvia™ cPrime™ von Bio-Rad Laboratories stellten die erfolgreichsten Alternativen zur Affinitätssäule HiTrap™ Heparin HP dar. Diese erzielten unter den getesteten Bedingungen eine Produktreinheit von 90 % mit einer Ausbeute von 85 %. Die

anderen verwendeten Säulen und MA führten zu einer geringeren Produktreinheit (60 und 70 %).

### **3.4 Variation der alternativen Aufreinigungsmethoden des bFGF**

Die beste alternative Aufarbeitungsmethode des bFGF stellt die MMC mit den MMC-Säulen HiTrap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup> MMC von GE Healthcare Life Sciences und Foresight<sup>TM</sup> Nuvia<sup>TM</sup> cPrime<sup>TM</sup> von Bio-Rad Laboratories dar. Mit diesen im intermediären Schritt in der Aufreinigung konnte eine bFGF-Reinheit von 90 % und eine Ausbeute von 85 % erreicht werden. Bei den im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurde der Elutionsgradient von 10 CV auf 15 und 20 CV erhöht, um die restlichen Verunreinigungen vom bFGF zu entfernen.

Für diese Versuche wurde wie in Kapitel 3.3.1 und 3.3.2 eine bestimmte Menge des Zellpellets (40 g) in 15 mL Zellysepuffer (25 mM Phosphatpuffer, 1,25 mM MgCl, 100 mM NaCl, 3 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7,5) pro Gramm Zellfeuchtmasse resuspendiert und per Hochdruck-Homogenisator aufgeschlossen. Nach Zentrifugation und Sterilfiltration (0,2 µm Porengröße) des Überstands wurde dieser direkt auf die CEX geladen. Die bFGF-enthaltenden Fraktionen wurden vereint und per HiPrep 26/10 Desalting-Säule entsalzt (Chromatogramme und SDS-PAGE-Analysen dieser Versuche nicht gezeigt). Die entsalzte Proteinprobe wurde entsprechend der Versuche und dem Säulenvolumen verteilt und betrug 7,5 mL. Die Proteinprobe hatte eine Gesamtproteinkonzentration von  $1,4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  mit einem bFGF-Anteil von etwa 65 %, welches einer Konzentration von  $0,9 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  entsprach.

Die Versuche fanden unter denselben Bedingungen wie im Kapitel 3.3.2 statt. Die Chromatographiesäule wurde zuerst mit 10 CV BP äquilibriert und anschließend mit der Proteinlösung beladen. Es folgte der Waschschrift mit 20 CV BP. Die Elution erfolgte in einem Ansatz mit 15 CV EP und in dem anderen Ansatz mit 20 CV EP.

Die chromatographische Aufreinigung wurde per SDS-PAGE analysiert, die Proteinkonzentration per Bradford-Test bestimmt und die Produktreinheit densitometrisch ermittelt.

### 3.4.1 Aufreinigung des bFGF per MMC-Säule HiTrap™ Capto™

#### MMC

Die Chromatogramme der Aufreinigung des bFGF per MMC-Säule HiTrap™ Capto™ MMC sind in Abbildung 30 und die dazugehörigen SDS-PAGE-Analysen in Abbildung 31 dargestellt. In dem linken Chromatogramm (A) ist die Elution mit einem linearen Gradienten von 15 CV abgebildet, in dem rechten Chromatogramm (B) die Elution mit einem linearen Gradienten von 20 CV. Der CIP-Schritt wurde bei beiden Durchläufen mit 10 CV 1 M NaOH durchgeführt. Bei der Methode des rechten Chromatogramms schloss sich ein Storage-Schritt mit 20 % Ethanol an.

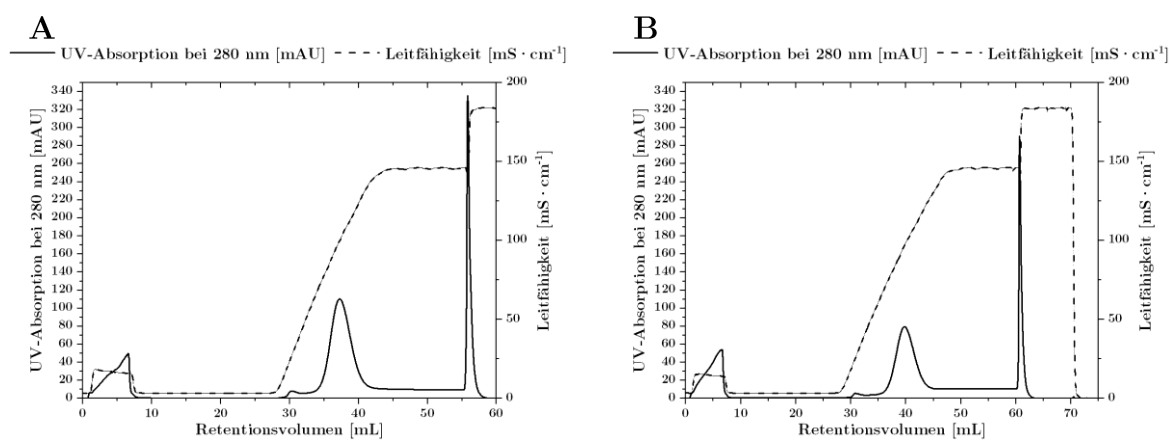


Abbildung 30: FPLC-Chromatogramme der Aufreinigung des bFGF per HiTrap™ Capto™ MMC (1 mL, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA) nach vorherigem CEX-Schritt.

(A) Linearer Elutionsgradient mit 15 CV EP; (B) linearer Elutionsgradient mit 20 CV EP.

Durch die Elution mit einem flacheren linearen Gradienten ergab sich ebenfalls nur ein Elutionspeak. Aufgrund des steileren Gradienten (15 CV EP) ist der Elutionspeak in Chromatogramm A höher und schmaler (7 Fraktionen) als in Chromatogramm B (8 Fraktionen), der die Elution mit 20 CV EP darstellt. Beide Elutionspeaks lagen

zwischen einer NaCl-Konzentration von 0,8 und 1,9 M. Im CIP-Schritt ist ein hoher, schmaler Peak zu sehen.

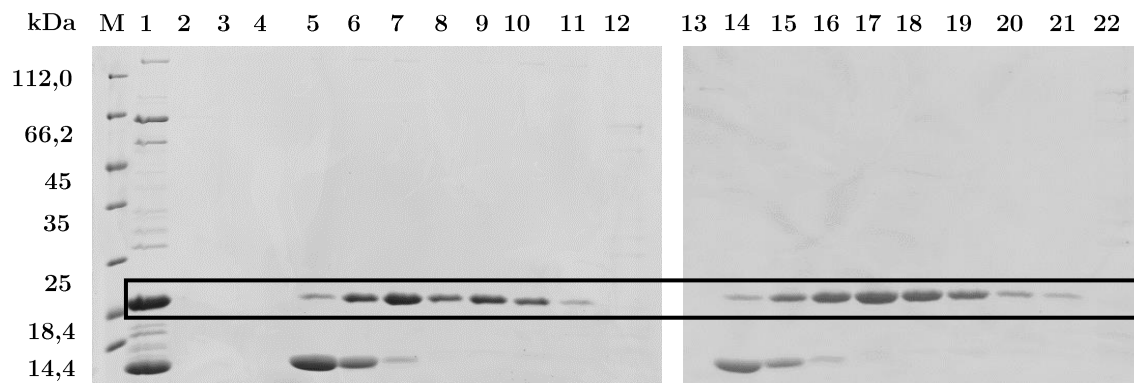


Abbildung 31: SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung des bFGF per HiTrap<sup>TM</sup> Cacto<sup>TM</sup> MMC (1 mL, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA) nach vorherigem CEX-Schritt.

M: Molekularer Größenstandard; 1: Probenauftrag; 2 – 12: bFGF-Elution mit einem linearen Gradienten von 15 CV; 2: Durchfluss; 3 + 4: Waschschrift; 5 – 11: bFGF-Elutionspeak; 12: CIP-Schritt; 13 – 22: bFGF-Elution mit einem linearen Gradienten von 20 CV; 13: Durchfluss; 14 – 21: bFGF-Elutionspeak, 22: CIP-Schritt. Hervorgehoben sind die Banden des bFGF bei 18 kDa.

Anhand der SDS-PAGE-Analyse wurde deutlich, dass es sich bei den Elutionspeaks um bFGF handelt. Auffällig ist hierbei, dass sich in den ersten Elutionsfraktionen intensive Banden unterhalb der 14,4 kDa Grenze befinden. Diese stellen vermutlich zersetztes bFGF dar. Dies könnte auf Proteaseaktivität zurückzuführen sein, da das Protein aus dem Zellysate aufgereinigt wurde und nicht aus IB. Auf diese Weise könnten sich Proteasen in der Probe befinden, die bFGF abbauen. Des Weiteren ist das bFGF ein instabiles Protein [108] und eine Verzögerung in dem Aufreinigungsverfahren könnte zum Zersetzen des Proteins führen. Ohne Berücksichtigung dieser Proteinbande wurde durch beide Elutionsmethoden eine Reinheit zwischen 91 und 93 % erzielt.

In den Fraktionen des CIP-Schritts sind in dem SDS-Gel keine Banden bei der Größe des bFGF zu erkennen. Es wird sich hierbei um zelleigene Proteine von *E. coli* handeln.

### 3.4.2 Aufreinigung des bFGF mittels der MMC-Säule Foresight™ Nuvia™ cPrime™

In den Abbildung 32 und Abbildung 33 sind die Chromatogramme und SDS-PAGE-Analysen der Aufreinigung des bFGF per MMC-Säule Foresight™ Nuvia™ cPrime™ dargestellt. Das linke Chromatogramm (A) stellt die Elution mit einem linearen Gradienten von 15 CV dar, das rechte Chromatogramm (B) die Elution mit einem linearen Gradienten von 20 CV. Die Reinigung der Säule erfolgte in mehreren Schritten (0,1 M NaOH, 1 M NaCl und 1 M NaOH, jeweils 6 CV).

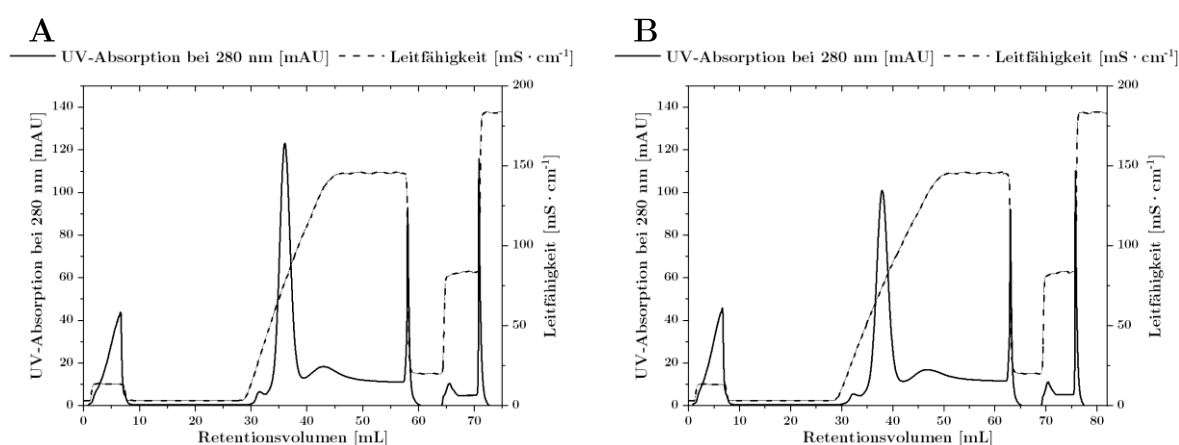


Abbildung 32: FPLC-Chromatogramme der Aufreinigung des bFGF per Foresight™ Nuvia™ cPrime™ (1 mL, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) nach vorherigem CEX-Schritt.

(A) Linearer Elutionsgradient mit 15 CV EP; (B) linearer Elutionsgradient mit 20 CV EP.

Die Elution mit einem flacheren linearen Gradienten führte ebenfalls zu einem Elutionspeak. Der steilere Gradient mit 15 CV EP führte in Chromatogramm A zu einem höheren und schmaleren Elutionspeak (4 Fraktionen) als in Chromatogramm B (5 Fraktionen), welches die Elution mit dem linearen Gradienten mit 20 CV EP darstellt. Die Elution erfolgte zwischen 0,7 und 1,4 M NaCl. In den drei CIP-Schritten ist jeweils ein Peak zu erkennen.

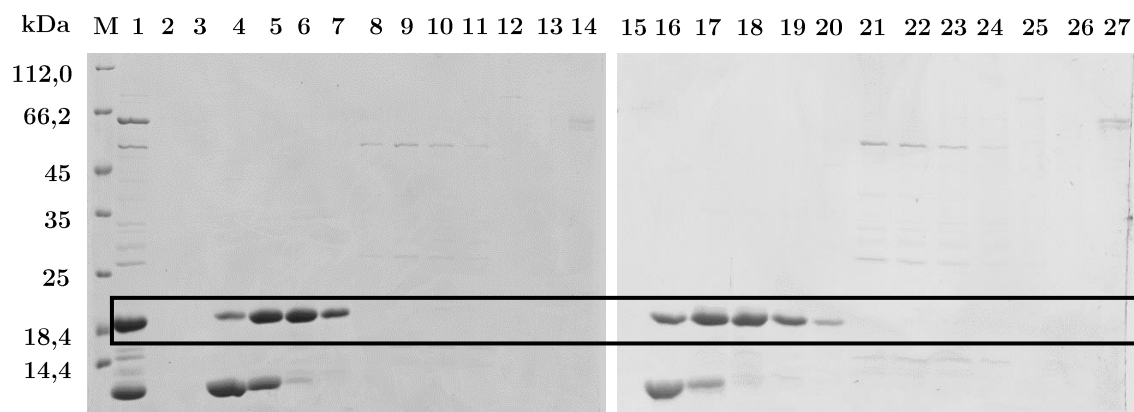


Abbildung 33: SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung des bFGF per Foresight™ Nuvia™ cPrime™ (1 mL, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) nach vorherigem CEX-Schritt.

M: Molekularer Größenstandard; 1: Probenauftrag; 2 – 14: bFGF-Elution mit einem linearen Gradienten von 15 CV; 2: Durchfluss; 3: Waschschrift; 4 – 7: bFGF-Elutionspeak; 8 – 10: 2. Elutionspeak, 11 – 14: CIP-Schritte; 15 – 27: bFGF-Elution mit einem linearen Gradienten von 20 CV; 14: Durchfluss; 15 – 20: bFGF-Elutionspeak, 21 – 27: CIP-Schritt. Hervorgehoben sind die Banden des bFGF bei 18 kDa.

Die SDS-PAGE-Analyse weist in dem Elutionspeak nur auf das bFGF hin. Der Probenauftrag aus Kapitel 3.4.1 und diesem Kapitel ist identisch, weshalb es nicht verwunderlich ist, dass in dem SDS-Gel ebenfalls intensive Banden unterhalb der 14,4 kDa Grenze zu erkennen sind. Ohne Berücksichtigung des zerfallenen Proteins wurde durch beide Elutionsmethoden eine Reinheit zwischen 90 und 93 % erzielt.

In jedem CIP-Schritt ist ein Elutionspeak zu erkennen. Anhand der SDS-PAGE-Analyse wurde allerdings deutlich, dass keine der Banden auf der Höhe der bFGF-Bande liegt und es sich somit um zelleigene Proteine von *E. coli* handelt.

### 3.4.3 Bestimmung der Proteasekonzentration

In Kapitel 3.4.1 und 3.4.2 wurde durch die SDS-PAGE-Analyse eine intensive Bande mit einem Molekulargewicht, welches kleiner als 14,4 kDa ist, beobachtet. Diese Bande könnte auf zersetztes bFGF aufgrund dessen Instabilität [108] oder durch Proteasen hinweisen. Proteasen oder auch Peptidasen sind Enzyme, die Proteine oder Peptide spalten. Sie katalysieren dabei die Hydrolyse der Peptidbindungen. Die Proteaseaktivität wurde mittels Protease Assay Kit von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) über eine Fluoreszenz-Resonanzenergietransfermessung (FRET) bestimmt. Vor der

Aufreinigung befanden sich Proteasen in einer Konzentration von  $210 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  in der Probe, nach der Aufreinigung des bFGF mittels der MMC-Säulen HiTrap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup> MMC oder Foresight<sup>TM</sup> Nuvia<sup>TM</sup> cPrime<sup>TM</sup> wurden noch  $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  nachgewiesen. Proteasen befanden sich somit in der Probe und könnten für die Zersetzung verantwortlich sein.

#### **3.4.4 Fazit**

Durch die Verwendung der MMC-Säulen HiTrap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup> MMC von GE Healthcare Life Sciences und Foresight<sup>TM</sup> Nuvia<sup>TM</sup> cPrime<sup>TM</sup> Bio-Rad Laboratories wurden gute Alternativen für die Affinitätssäule HiTrap<sup>TM</sup> Heparin HP demonstriert. Die Verwendung der MMC-Säulen erzielte eine Reinheit von etwa 92 %, welche nur 2 % schlechter als das Ergebnis der Affinitätssäule HiTrap<sup>TM</sup> Heparin HP war und stellen somit gute Alternativen zu dieser Vorgehensweise dar. Der Elutionsgradient ist hierbei allerdings nebensächlich, da lineare Elutionsgradienten von unterschiedlicher Länge (10, 15 oder 20 CV) keinen starken Einfluss auf die Aufreinigung des bFGF hatten. Die Ergebnisse aus Kapitel 3.4 haben aber gezeigt, dass nicht nur der Aufreinigungseffekt ein Kriterium der alternativen Aufarbeitungsmethode darstellt, sondern auch die Stabilität des Proteins, da sich diese auf die biologische Aktivität des bFGF auswirkt. Aus diesem Grund wurden im folgenden Kapitel Stabilitätstests des Proteins durchgeführt, um für zukünftige Versuche die besten Pufferbedingungen zu bestimmen.

#### **3.5 Stabilitätstest des bFGF**

Für den späteren Einsatz von biotechnologischen Produkten spielt die Stabilität des Proteins eine entscheidende Rolle. Sie beeinflusst die Aufreinigung, Lagerung, Aktivität und Analysen. Nur ein stabiles Produkt eignet sich für weitere Experimente und für den medizinischen Einsatz, welcher beabsichtigt wird.



Im vorherigen Kapitel wurde anhand der SDS-PAGE-Analyse verdeutlicht, dass bFGF durch den Verzug der Aufreinigung oder durch Proteasen zersetzt vorlag. Das Protein wird intrazellulär exprimiert und nach dem Zellaufschluss aus dem Überstand aufgereinigt. Proteasen sind somit in der Probe vertreten und können aktiv sein, obwohl alle Schritte des Downstream Processings bei 4 °C durchgeführt wurden. Zusätzlich ist bFGF ein instabiles Protein [108], weshalb bereits Zusätze wie Dithiothreitol (DTT) und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) im Puffersystem vorliegen und es stets auf Eis oder bei 4 °C gelagert wird. Proteasen können durch eine optimierte Aufreinigung entfernt werden. Aus diesem Grund sollte ein optimales Puffersystem für die höchste Stabilität des bFGF für die weiteren Versuche bestimmt werden. Dafür wurden im Folgenden unterschiedliche Bedingungen und dessen Wirkung auf die Stabilität des bFGF mittels Thermal Shift Assay (TSA) getestet.

Beim TSA wird ein Protein mit einem fluoreszierenden Proteinfarbstoff (Sypro® Orange) erhitzt. Durch den Temperaturanstieg entfaltet sich das Protein und legt somit die hydrophoben Seitenketten frei. An diese lagert sich der Farbstoff an, welcher durch das Ansteigen der Fluoreszenz sichtbar wird. Mittels TSA wird somit die Änderung der Thermostabilität der Faltung des Proteins gemessen. Es resultiert eine Schmelzkurve, aus der sich die Schmelztemperatur ermitteln lässt. Je höher die Schmelztemperatur, desto stabiler das Protein. Für die Experimente wurde das in Kapitel 3.2 aufgereinigte bFGF und der Farbstoff Sypro® Orange verwendet. Zuerst wurde der Assay entwickelt (Kapitel 3.5.1), im Anschluss wurden verschiedene Puffersysteme (Kapitel 3.5.2) und Additive (Kapitel 3.5.3) sowie ihr Einfluss auf die Stabilität des bFGF untersucht.

### 3.5.1 Entwicklung des Stabilitätstests

Zur Entwicklung des Stabilitätstests musste zuerst eine passende Kombination der bFGF- und Sypro® Orange-Konzentration gefunden werden. Dazu wurden verschiedene bFGF-Konzentrationen ( $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $62,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $31,75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $15,625 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) gegen verschiedene Farbstoffkonzentrationen (20x, 10x, 5x, 2,5x und 1x) getestet. Die Stammlösung des Sypro® Orange liegt in einer 5000-fachen Konzentration vor. Die Temperatur startete bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  und wurde alle 38 s um  $1 \text{ }^\circ\text{C}$  erhöht bis eine Temperatur von  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  erreicht wurde. Die Versuche wurden in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 und Tabelle 7 dargestellt. Zusätzliche, nicht aufgeführte Ergebnisse sind Tabelle 27 (S. 118) zu entnehmen.

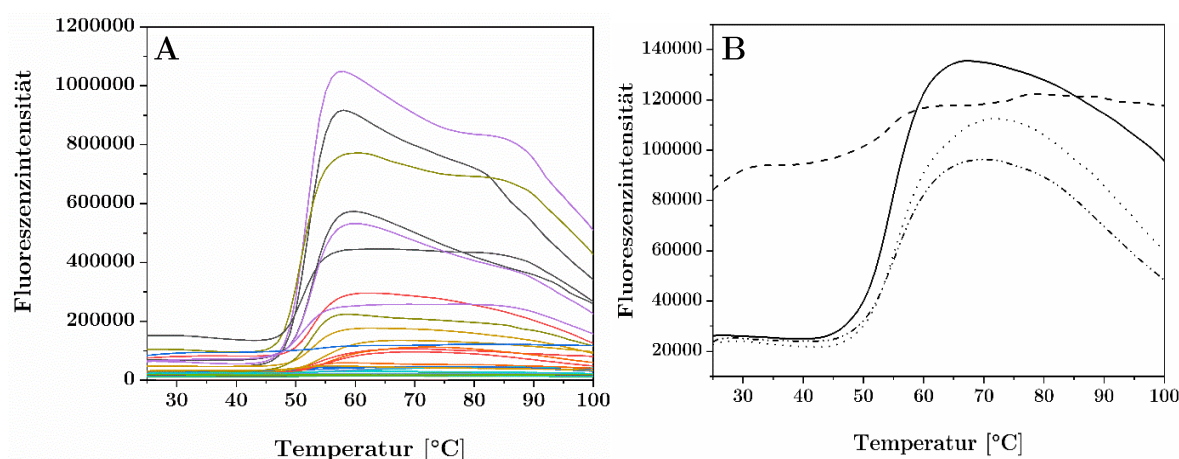


Abbildung 34: Ergebnisse des Thermal Shift Assays.

(A) Schmelzkurven von allen Konzentrationskombinationen aus bFGF und Sypro® Orange (bFGF:  $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $62,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $31,75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $15,625 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; Sypro® Orange: 20x, 10x, 5x, 2,5x und 1x Konzentration). (B) Darstellung der Kombinationen mit der höchsten Schmelztemperatur. Dargestellt sind 5x Sypro® Orange Konzentration und  $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  bFGF (durchgezogene Linie) und  $31,25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  bFGF (gestrichelte Linie); 2,5x Sypro® Orange Konzentration und  $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  bFGF (gepunktete Linie); 1,25x Sypro® Orange Konzentration und  $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  bFGF (gestrichelt und gepunktete Linie).

Die Schmelzkurven der verschiedenen Kombinationen wurden miteinander verglichen und mit ihrer Hilfe der Schmelzpunkt des Proteins unter den vorliegenden Bedingungen berechnet. Idealerweise entfaltet sich das Protein und sorgt für einen schnellen

Anstieg des Fluoreszenzsignals. Im Wendepunkt dieser sigmoidalen Kurve befindet sich der Schmelzpunkt ( $T_m$ ). Die Schmelzpunkte des bFGF lagen bei den Versuchen zwischen 51 und 55 °C. Angestrebt wird ein hoher Schmelzpunkt, weil dadurch eine höhere Stabilität des Proteins gewährleistet wird [109]. Die Kombinationen mit dem höchsten Schmelzpunkt von 55 °C sind in Tabelle 7 und in Abbildung 34 B dargestellt.

Tabelle 7: Auflistung der Farbstoff- und Protein-Konzentrationen mit den Ergebnissen der höchsten Schmelztemperatur ( $T_m$ ), die im Wendepunkt der Schmelzkurve ermittelt wurde. Markiert sind die Konzentrationen von Sypro® Orange und bFGF, die für die weiteren Versuche verwendet wurden.

<b>Sypro® Orange</b>	<b>bFGF-Konzentration</b>	<b><math>T_m</math></b>
<b>Konzentration</b>	<b>[<math>\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}</math>]</b>	<b>[°C]</b>
<b>5x</b>	<b>125</b>	<b>55</b>
5x	31,25	55
2,5x	125	55
1,25x	125	55

Gesucht war eine geeignete Kombination aus Proteinfarbstoff und Protein, um mit möglichst wenig Materialverbrauch weitere Tests durchführen zu können und die optimalen Pufferbedingungen für bFGF zu etablieren. Nicht nur die Schmelztemperatur, sondern auch der Verlauf der Schmelzkurve geben Informationen über ein gutes Verhältnis zwischen Protein und Proteinfarbstoff. Aus diesem Grund sind die vier besten Ergebnisse noch einmal zu betrachten (Abbildung 34, B). Es ist zu erkennen, dass die Kurve mit 5x Sypro® Orange Konzentration und 31,25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  bFGF (gestrichelte Kurve) nicht den typischen Verlauf einer Schmelzkurve aufweist. Somit wird diese Kombination nicht mehr in Betracht gezogen. Die anderen drei Variationen weisen einen typischen Verlauf einer Schmelzkurve auf und würden sich somit für die folgenden Experimente eignen. Die Proteinkonzentration lag jeweils bei 125  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  bFGF. Eine höhere Sypro® Orange Konzentration resultierte in einer höheren Fluoreszenzintensität. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Versuche eine Proteinkonzentration von 125  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  und eine 5-fache Konzentration des Farbstoffs festgelegt.

### 3.5.2 Optimierung des Puffersystems

Nach der Etablierung des TSA sollten verschiedene Puffersysteme getestet und ihr Einfluss auf die Stabilität des bFGF untersucht werden. Unabhängig von dem Puffersystem war bereits bekannt, dass das Protein sehr instabil ist und aufgrund seiner zwei freiliegenden und zwei verborgenen Cysteine leicht zu oxidieren ist [108]. Unter oxidierenden Bedingungen können die freiliegenden Thiol-Gruppen eine Disulfidbrücke bilden, welches die Stabilität des Proteins herabsenkt. Aus diesem Grund muss sich bFGF immer in einem reduzierenden Milieu befinden. Dies spiegelt sich darin wieder, dass alle Puffer und Lösungen vor der Verwendung entgast werden müssen und DTT als Reduktionsmittel zugesetzt wird. Die Stabilität des DTT wiederum wird durch kühle Lagerung und den Zusatz des Komplexbildners EDTA erhöht [28,65]. Aus diesem Grund wurden die getesteten Puffersysteme allesamt mit 3 mM DTT und 1 mM EDTA versetzt, entgast und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Des Weiteren ist laut Literatur bekannt, dass bFGF im pH-Bereich von 5 bis 9 stabil ist [110]. Dementsprechend wurden nur Puffer in diesem pH-Bereich getestet. In Tabelle 8 sind die getesteten Puffersysteme aufgelistet.

Tabelle 8: Getestete Puffersysteme mit ihrem Pufferbereich.

<b>Puffersystem</b>	<b>Pufferbereich</b>
HEPES	7,2 – 8,2
Diethanolamin	6,8 – 8,8
MOPS	6,6 – 7,8
Phosphatpuffer	5,8 – 8,0
Tris/HCl	7,0 – 9,0

In Anbetracht der Aufreinigung des bFGF, in welcher mit einem hohen NaCl-Gradienten eluiert wurde, wurde nicht nur der Einfluss des Puffersystems auf die Stabilität des bFGF getestet, sondern zusätzlich der Einfluss von verschiedenen NaCl-Konzentrationen.

Verschiedene Puffersysteme mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen zu testen, erfordert eine große Menge an Versuchen. Aus diesem Grund wurden die Versuche mit der statistischen Versuchsplanung, Design of Experiments (DoE), mit dem Programm MODDE geplant und durchgeführt (Abbildung 35). Hierbei handelt es sich um einen zweidimensionalen DoE, weil nur der Einfluss von zwei Parametern getestet wurde. Der DoE eignet sich aber für eine höhere Anzahl an Parametern [111].

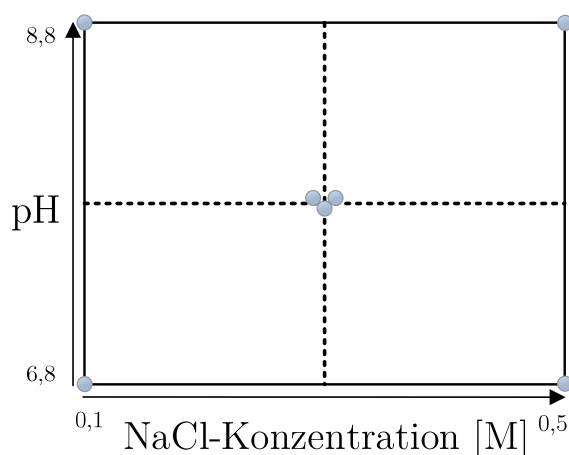


Abbildung 35: Geometrisches Modell für eine statistische Versuchsplanung mit zwei Faktoren. Auf der x-Achse ist die NaCl-Konzentration und auf der y-Achse der pH-Wert dargestellt. Die Versuche konzentrieren sich sowohl auf die Eckpunkte als auch auf den zentralen Punkt, dieser wird dreifach bestimmt. Exemplarisch sind die pH-Werte (pH 6,8 und 8,8) und NaCl-Konzentrationen (0,1 und 0,5 M NaCl) für die statistische Versuchsplanung mit Diethanolamin dargestellt.

Hierbei wurden die Randbedingungen der Versuche (Grenzen der pH-Werte und NaCl-Konzentrationen) festgelegt und als Versuche durchgeführt. Die zentralen Bedingungen wurden dreifach getestet. Die Randbedingungen für die NaCl-Konzentrationen waren 0,1 und 0,5 M NaCl und bei den Puffersystemen galt der niedrigste und höchste pH-Wert des Pufferbereichs als Randbedingung. Alle Puffersysteme wiesen eine Konzentration von 25 mM auf.

Die Ergebnisse des DoE sind in Tabelle 9 dargestellt und deuten an, dass bFGF mit der Anwesenheit von NaCl stabiler ist. Des Weiteren wurde in Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 6,9 und einer NaCl-Konzentration von 0,3 M die höchste Schmelztemperatur von 57,6 °C erzielt.

Tabelle 9: Ergebnisse der statistischen Versuchsplanung.

Es sind die Schmelztemperaturen der Kombinationen aus NaCl-Konzentration und Puffersystem dargestellt. Die statistische Versuchsplanung deckt nur die Randbedingungen und den zentralen Punkt mit Versuchen ab, die restlichen Möglichkeiten wurden nicht getestet und sind mit „x“ bezeichnet.

		NaCl-Konzentration [M]			
		pH-Wert	0,1	0,3	0,5
Diethanolamin	6,8	55	x	56,7	
	7,8	x	55,9	x	
	8,8	50,5	x	54	
HEPES	7,2	54,7	x	56,2	
	7,7	x	56,4	x	
	8,2	53	x	55,7	
MOPS	6,6	53,7	x	56,7	
	7,2	x	56	x	
	7,8	54	x	55,3	
Phosphat	5,8	55,3	x	56	
	6,9	x	<b>57,6</b>	x	
	8	54,7	x	56,7	
Tris/HCl	7	54	x	57,3	
	8	x	56,2	x	
	9	48,3	x	52	

### 3.5.3 Einfluss verschiedener Additive auf die Stabilität des bFGF

Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,9 erzielte die höchste Schmelztemperatur des bFGF, weshalb mit diesem Puffersystem weitergearbeitet wurde. Als nächstes wurde überprüft, ob der Zusatz von Additiven wie Osmolyten oder chaotropen Salzen einen positiven Einfluss auf die Stabilität des bFGF haben. Chaotrope Salze schwächen bei hohen Konzentrationen die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren und setzen dadurch die Stabilität des Proteins herab. Bei niedrigeren Konzentrationen haben sie einen stabilisierenden Effekt [100,109]. Als chaotrope Salze wurden Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ ), Calciumchlorid ( $CaCl_2$ ) und Guanidin-HCl getestet. Osmolyte sollen laut Literatur [109,112] ebenfalls die Stabilität und Löslichkeit

von Proteinen erhöhen, hierbei wurden Glycerol und Saccharose getestet. Alle Versuchsansätze enthielten 0,1 M NaCl, da der Zellysepuffer diese Konzentration an Salz enthält. Die Versuche wurden alle in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Der Einfluss von  $\text{CaCl}_2$  auf die Stabilität des bFGF wurde in den Konzentrationen 0 mM, 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM und 10 mM getestet,  $\text{MgCl}_2$  in den Konzentrationen 0 mM, 1,25 mM, 2,5 mM, 3,75 mM und 5 mM. Der Einfluss von Guanidin-HCl wies die Konzentrationen 0 M, 0,25 M, 0,5 M und 0,75 M auf. Das Osmolyt Saccharose wurde mit den Konzentrationen 0 M, 0,25 M, 0,5 M, 0,75 M und 1 M getestet und Glycerol mit einer Anwesenheit von 0 %, 5 %, 10 %, 15 % und 20 %. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Ergebnisse des TSA mit den verschiedenen Additiven.

$T_m$  ist die Schmelztemperatur, welche durch den Wendepunkt der Schmelzkurve ermittelt wurde. Markiert wurde die höchste  $T_m$ .

Glycerol-Konzentration [%]	$T_m$ [°C]	$\text{CaCl}_2$ -Konzentration [mM]	$T_m$ [°C]
0	58	0	58
5	58	2,5	56
10	59	5	56
15	60	7,5	55
20	60	10	56
Saccharose-Konzentration [M]	$T_m$ [°C]	$\text{MgCl}_2$ -Konzentration [mM]	$T_m$ [°C]
0	58	0	58
0,25	59	1,25	58
0,5	60	2,5	58
0,75	61	3,75	57
1	<b>62</b>	5	57
Guanidin-HCl-Konzentration [M]	$T_m$ [°C]		
0	58		
0,25	57		
0,5	52		
0,75	49		

Anhand der Tabelle wird deutlich, dass die chaotropen Salze  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  und Guanidin-HCl die Stabilität des Proteins herabsetzen. Die Osmolyte Glycerol sowie Saccharose erhöhen den Schmelzpunkt des bFGF und somit auch die Stabilität des Proteins.

### 3.5.4 Einfluss von Glycerol und Saccharose in Kombination mit NaCl

Wie bereits erwähnt, wird bFGF mittels NaCl-Gradienten bis zu einer Konzentration von 2 M NaCl eluiert. Ein weiterer TSA wurde durchgeführt, um zu überprüfen, wie sich die Kombination aus Osmolyt und NaCl-Konzentration auf die Stabilität des bFGF auswirkt. Hierfür wurde ein zweidimensionaler DoE durchgeführt. Es wurden verschiedene Saccharose- (0,5 M und 2 M) sowie Glycerol-Konzentrationen (15 %, 20 % und 25 %) mit den NaCl-Konzentrationen 0,5 M, 1,25 M und 2 M getestet. Die Versuche wurden in einer Dreifachbestimmung durchgeführt, die Ergebnisse sind in Abbildung 36 dargestellt.

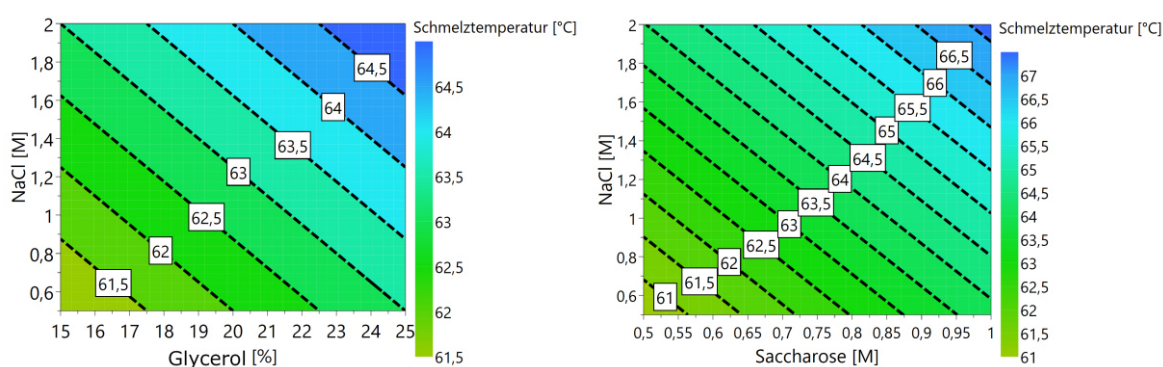


Abbildung 36: Ergebnisse des DoE als Response Contour Plot.

Links ist die Kombination aus verschiedenen Glycerol- und NaCl-Konzentrationen, rechts die Kombinationen aus verschiedenen Saccharose- und NaCl-Konzentrationen dargestellt.

Anhand des Response Contour Plots wird ersichtlich, dass sich die Schmelztemperatur mit steigender NaCl- und Osmolyt-Konzentration ebenfalls erhöht. Somit ist bFGF nach der Elution mit einer hohen NaCl-Konzentration auch stabil.

### 3.5.5 Fazit

Anhand des etablierten TSA konnte gezeigt werden, dass die bFGF-Stabilität in Phosphatpuffer bei einem pH von 6,9 am höchsten ist. Zusätzlich erweist sich die Anwesenheit von einer NaCl-Konzentration von bis zu 2 M positiv auf die Stabilität des bFGF aus, weshalb die Elution weiterhin mit diesem Gradienten geführt werden kann. Für die folgenden Versuche könnten dem Puffer außerdem die Osmolyte Saccharose



oder Glycerol hinzugefügt werden, da sich deren Zusatz auch als sinnvoll erwiesen hat. Hierbei gilt es allerdings zu beachten, dass Osmolyte die Viskosität erhöhen und dementsprechend noch Vorversuche durchgeführt werden müssen, um deren richtige Konzentration zu bestimmen.

### 3.6 Bioaktivität des bFGF

In den vorherigen Kapiteln wurde beschrieben, dass die Aufreinigung des bFGF ohne Heparin-Affinitätschromatographie und somit ohne tierische Produkte möglich ist. Die Verwendung der MMC-Säulen HiTrap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup> MMC und Foresight<sup>TM</sup> Nuvia<sup>TM</sup> cPrime<sup>TM</sup> zur bFGF-Aufreinigung erzielte ähnliche Ergebnisse wie die Affinitätssäule HiTrap<sup>TM</sup> Heparin HP (Kapitel 3.4). In diesem Kapitel wurde die biologische Aktivität des Wachstumsfaktors nach verschiedenen Aufreinigungsmethoden als intermediärer Aufreinigungsschritt (HiTrap<sup>TM</sup> Heparin HP, HiTrap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup> MMC und Foresight<sup>TM</sup> Nuvia<sup>TM</sup> cPrime<sup>TM</sup>) überprüft. Hierfür wurde der am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover etablierte Bioaktivitätstest verwendet, welcher auf der mitogenen und Zell-überlebenden Aktivität des Proteins beruht. *In vitro* wird bFGF als Zusatz in Stammzellmedien verwendet, da der Wachstumsfaktor die Konfluenz der Zellen erhöht [65].

Für den Bioaktivitätstest wurden die Fibroblasten-Zellen NIH-3T3 (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Diese wurden in 96-Well-Platten mit vollsupplementiertem Medium, welches aus Duplecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) mit 10 % FCS (Fetalem Kälberserum) und 1 % Penicillin/Streptomycin bestand (s. Tabelle 18), für 24 h und einer Zelldichte von 4.000 Zellen pro Well inkubiert. Nach den 24 h wurde das vollsupplementierte Medium durch reduziertes Medium (DMEM, 1 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin) ersetzt und erneut für 24 h inkubiert. Nach diesem Schritt wurden die Zellen mit bFGF für 72 h kultiviert.

Dafür wurde das reduzierte Medium mit 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 und 0,625  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  bFGF versetzt. Als Positivkontrolle wurde mittels Heparin-Affinitätschromatographie aufgereinigtes bFGF verwendet, als Negativkontrolle diente reduziertes Medium ohne bFGF. Jede Konzentration wurde in Vierfachbestimmung getestet. In Abbildung 37 sind Fibroblasten NIH-3T3 während der Kultivierung in reduziertem Medium (A) und reduziertem Medium, welches mit bFGF versetzt ist (B), dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die NIH-3T3 mit bFGF ( $320 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) im Medium konfluent sind, welches auf den positiven Effekt des bFGF auf das Wachstum der Zellen verweist.

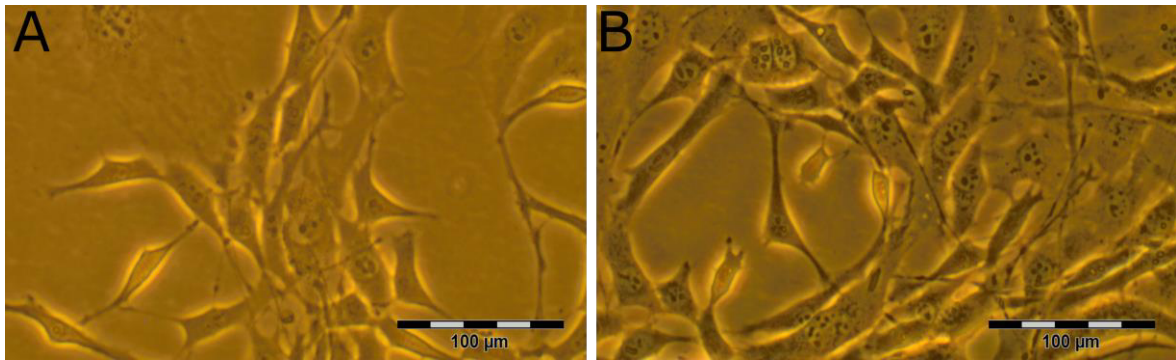


Abbildung 37: Die Fibroblasten NIH-3T3 während der Kultivierung in reduziertem Medium (A) und mit  $320 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  bFGF (B).

Für die Auswertung dieses Aktivitätstests wurde ein fluorometrischer Viabilitätstest, der CellTiter-Blue® Assay (CTB-Assay, Promega Fitchburg, USA), durchgeführt. Bei diesem Test wird die metabolische Aktivität der Zellen analysiert, wodurch indirekt die Viabilität bestimmt werden kann. Das CTB-Reagenz beinhaltet den Farbstoff Resazurin, der durch Reduktionsreaktionen von metabolisch aktiven Zellen zum pinken fluoreszierenden Resorufin umgewandelt wird. Resorufin absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 579 nm und emittiert Licht bei 584 nm. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur Anzahl der vitalen Zellen. In Abbildung 38 sind die Ergebnisse dieses Tests per Konzentrations-Wirkungs-Kurven dargestellt.

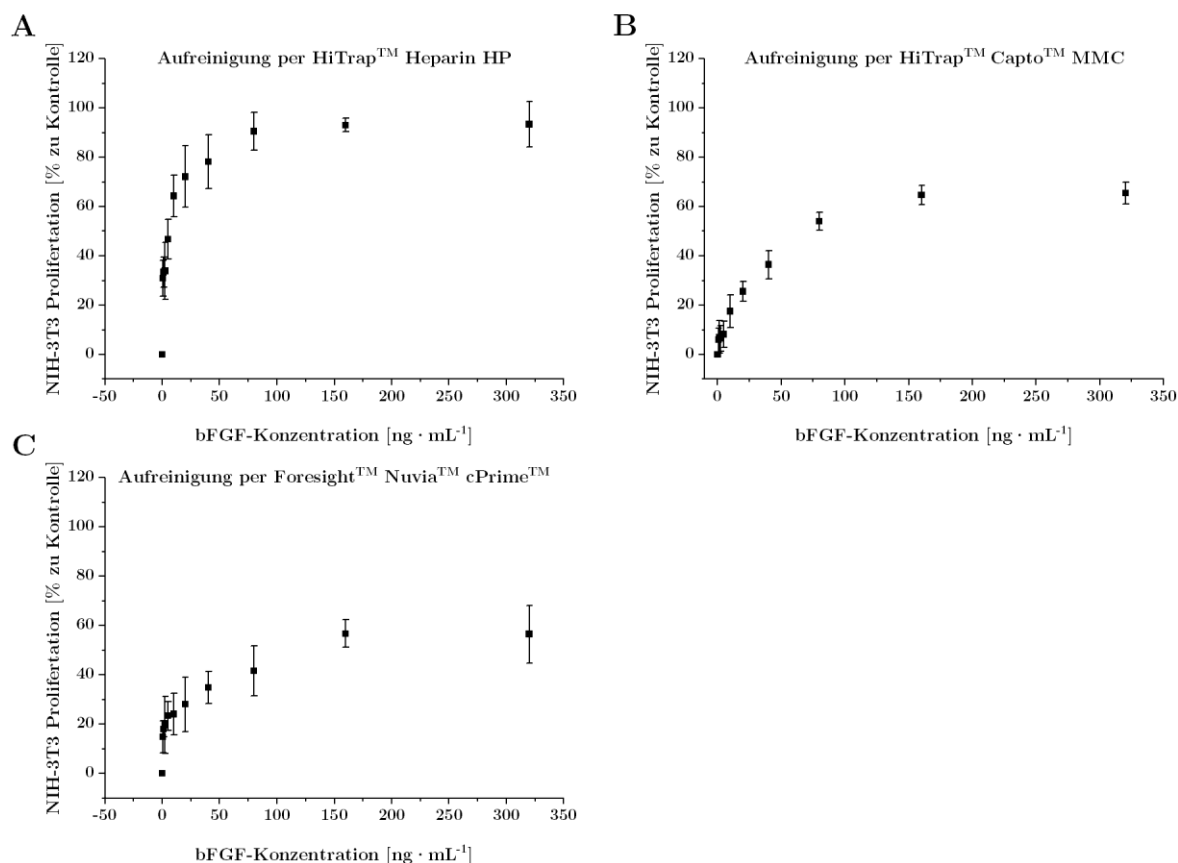


Abbildung 38: Konzentrations-Wirkungs-Kurven des bFGF.

Es ist die gemessene Fluoreszenz in Abhängigkeit verschiedener bFGF-Konzentrationen (320, 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 und 0,625  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  bFGF) dargestellt. A: bFGF-Aufreinigung per HiTrap<sup>TM</sup> Heparin HP; B: bFGF-Aufreinigung per HiTrap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup> MMC; C: bFGF-Aufreinigung per Foresight<sup>TM</sup> Nuvia<sup>TM</sup> cPrime<sup>TM</sup>.

Durch diese Kurven ist der graphische Zusammenhang zwischen der bFGF-Konzentration und der daraus resultierenden Wirkung ersichtlich. In jedem Ansatz konnte die Zellviabilität nachgewiesen werden, welches auf die Bioaktivität aller bFGF-Proben deutet. Das typische Plateau der Zellproliferation wurde in jedem Ansatz bei einer anderen bFGF-Konzentration und mit einer unterschiedlichen maximalen Wirkung erreicht.

Die NIH-3T3, die mit dem herkömmlich aufgereinigten bFGF versetzt wurden, haben die höchste Viabilität von knapp 95 % mit einer bFGF-Konzentration von etwa  $60 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  erreicht. Die anderen beiden Ansätze, in denen bFGF über Produkte ohne

tierischen Ursprungs aufgereinigt wurde, haben mit einer höheren bFGF-Konzentration trotzdem eine geringere Viabilität erreicht (HiTrap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup> MMC: 125 ng · mL<sup>-1</sup> bFGF, 66 % Viabilität; Foresight<sup>TM</sup> Nuvia<sup>TM</sup> cPrime<sup>TM</sup>: 150 ng · mL<sup>-1</sup> bFGF, 57 % Viabilität).

Für die weitere Auswertung des Tests wurde die bFGF-Konzentration logarithmisch aufgetragen, so dass die Konzentrations-Wirkungskurve einen sigmoidalen Verlauf aufwies. Anhand dieser Kurve wurde mittels der Software OriginPro® die mittlere effektive Konzentration (EC<sub>50</sub>) berechnet. Die EC<sub>50</sub> ist die Konzentration des bFGF, bei der die halbmaximale Proliferation der NIH-3T3 beobachtet wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 und Tabelle 11 dargestellt.

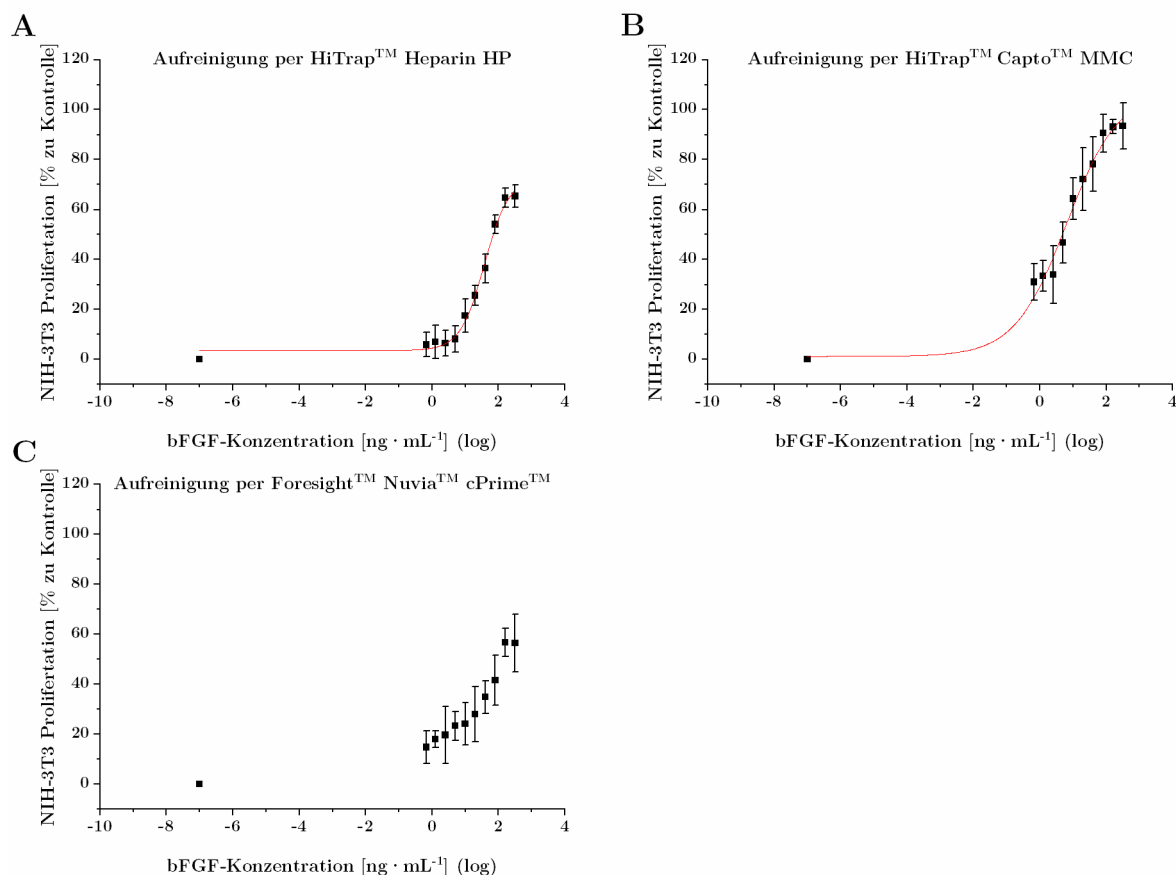


Abbildung 39: Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit logarithmisch aufgetragener bFGF-Konzentration.

Es ist die konzentrationsabhängige Proliferation der Fibroblasten in Abhängigkeit verschiedener bFGF-Konzentrationen dargestellt. A: bFGF per HiTrap™ Heparin HP aufgereinigt; B: bFGF per HiTrap™ Capto™ MMC aufgereinigt; C: bFGF per Foresight™ Nuvia™ cPrime™ aufgereinigt.

Die Bestimmung des EC<sub>50</sub> bestätigte die Ergebnisse aus Abbildung 39. Das per HiTrap™ Heparin HP aufgereinigte bFGF führte zu einer höheren Viabilität der Zellen bei geringen Konzentrationen. Die beiden Ansätze mit dem alternativ aufgereinigten bFGF wiesen eine Viabilität von etwa 70 % im Vergleich zu dem Ansatz ohne bFGF auf. Die EC<sub>50</sub> des per MMC-Säule HiTrap™ Capto™ MMC aufgereinigtem bFGF ist doppelt so hoch (37,92 ng · mL<sup>-1</sup>) wie die mittlere effektive Konzentration des bFGF, welches per MMC-Säule Foresight™ Nuvia™ cPrime™ aufgereinigt wurde (18,78 ng · mL<sup>-1</sup>). Um dieselbe Response zu erhalten, wird doppelt so viel bFGF aus der HiTrap™ Capto™ MMC-Aufreinigung benötigt als von dem bFGF aus der Foresight™ Nuvia™ cPrime™-Aufreinigung.

Tabelle 11: Ergebnisse des Bioaktivitätstests.

Es sind die mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ), die maximale NIH-3T3 Proliferation und die bFGF-Reinheit dargestellt.

Aufreinigungsmethode	$EC_{50}$ [ng · mL <sup>-1</sup> ]	Maximale NIH-3T3 Proliferation [% zu Kontrolle]	Reinheit [%]
HiTrap™ Heparin HP	6	108	94
Capto™ MMC	38	73	92
Foresight™ Nuvia™ cPrime™	19	66	92

### 3.6.1 Fazit

Anhand des Bioaktivitätstests konnte bestätigt werden, dass per alternativer Aufreinigungsverfahren aufgereinigtes bFGF seine Bioaktivität beibehält und für weitere Experimente verwendet werden kann. Im Gegensatz zu dem bFGF, welches mittels der etablierten Methoden aufgereinigt wurde, lag die maximale Proliferation der Fibroblasten bei etwa 65 %. Ebenfalls wurde von diesen Proben eine höhere Konzentration benötigt, um die  $EC_{50}$  zu erreichen (HiTrap™ Capto™ MMC: 37,92 ng · mL<sup>-1</sup>; Foresight™ Nuvia™ cPrime™: 18,78 ng · mL<sup>-1</sup>). Für diese geringere Bioaktivität gibt es mehrere Erklärungen. Zum einen könnte es an der Reinheit der Probe liegen. Das per Heparin-Affinitätschromatographie aufgereinigte bFGF wies eine etwas höhere Reinheit als das alternativ aufgereinigte bFGF auf. Dies hat zur Folge, dass die angegebene bFGF-Konzentration der alternativ aufgereinigten Proben nicht komplett mit den angegebenen Konzentrationen übereinstimmt, sondern geringer sein könnte. Eine geringere Konzentration des Proteins könnte somit auch zu einem geringeren Effekt führen. Es könnte auch sein, dass bei der Aufreinigung per Heparin-Affinitätschromatographie inaktives bFGF nicht mit dem Säulenmaterial interagiert und somit direkt aussortiert wird. Bei der Proteinaufreinigung mittels der MMC-Säulen HiTrap™ Capto™ MMC und Foresight™ Nuvia™ cPrime™ handelte es sich um keine Affinitäts-

chromatographie, wodurch ebenfalls andere Proteine mit dem Säulenmaterial interagieren und sich in der aufgereinigten Probe befinden können. Inaktives bFGF könnte sich somit ebenfalls in der aufgereinigten Probe befinden.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Dissertation war die Entwicklung eines neuen Aufreinigungsverfahrens für biologisch aktive Proteine ohne die Verwendung von Materialien tierischen Ursprungs. Die Versuche wurden mit dem Modellprotein bFGF durchgeführt. Das etablierte Aufreinigungsverfahren dieses Proteins bestand aus einem Capture-Schritt durch eine CEX, der sich anschließenden Heparin-Affinitätschromatographie und einem finalen Polishing-Schritt mittels AEX (Abbildung 13 A, S. 31). Der Fokus dieser Dissertation lag auf dem zweiten Schritt, der Heparin-Affinitätschromatographie. Heparin ist ein natürliches Produkt und birgt deshalb einige Nachteile wie Kontaminationen durch tierische Pathogene und sollte aufgrund dessen durch synthetische Materialien ersetzt werden. Als Ersatz für die Heparin-Affinitätschromatographie wurde die MMC und pseudo-Affinitätschromatographie getestet (Tabelle 4, S. 32).

Die MMC vereint verschiedene traditionelle Single-Mode-Chromatographien. Aufgrund der multimodalen Zusammensetzung ihrer Liganden können unterschiedliche Wechselwirkungen zum Analyten ausgebildet werden. Die getesteten Liganden konnten allesamt den schwachen Kationenaustauschern zugeordnet werden, die noch weitere funktionelle Gruppen, wie eine polare Amidbindung für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen oder einer Arylgruppe für eine höhere Affinität zu hydrophoben Resten, beinhalteten. Die pseudo-Affinitätschromatographie verwendet im Gegensatz zu der traditionellen Affinitätschromatographie Materialien mit pseudo-biospezifische Liganden, die synthetisch hergestellt werden. In diesem Fall wurden Heparin-ähnliche Liganden, die sich an der molekularen Struktur des Heparins orientierten, getestet.

Die Heparin-Affinitätschromatographie eignete sich aufgrund ihrer hohen Spezifität zu diversen Proteinen nicht als einzige Methode für die Aufreinigung des bFGF, wes-



halb der Capture-Schritt eingeführt wurde [62]. Jeder Aufreinigungsschritt geht allerdings mit höheren Proteinverlusten, Zeitaufwand und Kosten einher [62,71]. Aus diesen Gründen wurde der Aufreinigungseffekt der alternativen chromatographischen Methoden als Capture-Schritt und als intermediärer Aufreinigungsschritt in einem mehrstufigen Aufreinigungsverfahren untersucht (Abbildung 13 B und C, S. 31).

Für die Versuche wurde der Wachstumsfaktor mittels rekombinanter Expression intrazellulär in *E. coli* produziert und lag sowohl in löslicher als auch unlöslicher Form vor. Die Versuche wurden nur mit dem löslichen Anteil des bFGF durchgeführt. Die Probe beinhaltete neben bFGF eine große Menge an löslichen zelleigenen Proteinen. Die Aufreinigung des bFGF aus dem Zellüberstand als Capture-Schritt erzielte bei der Verwendung der pseudo-Affinitätschromatographie mit der Säule Capto™ DeVirS und dem MA SUCA sowie der MMC mit dem MA Prototyp B die höchste Proteinreinheit von 60 % (Tabelle 5, S. 41). Die Aufreinigung ging allerdings bei dem MA SUCA und dem MA Prototyp B mit hohen Proteinverlusten einher (etwa 60 %). Hinsichtlich einer Ausbeute von 73 % erzielte die Capto™ DeVirS-Säule die erfolgreichsten Ergebnisse. Im Vergleich erzielte die Proteinaufreinigung per Heparin-Affinitätschromatographie eine höhere Proteinreinheit (86 %) und Wiederfindungsrate (83 %), wies allerdings auch einige Proteinverluste (52 % Ausbeute) auf. Die Ergebnisse dieses Versuchsteils könnten darin begründet sein, dass in der aufzureinigenden Probe zu viele zelleigene Proteine vorhanden waren, die zum einen Bindestellen der Säulen- oder Membranchromatographie durch unspezifische Wechselwirkungen besetzt haben und zum anderen bFGF hinderten die Bindestellen zu erreichen und zu besetzen.

Aufgrund der Vermutung, dass störende zelleigene Proteine den Aufreinigungsprozess behindern, wurden die Versuche ebenfalls wie das etablierte Aufreinigungsverfahren mit einer vorgeschalteten CEX als Capture-Schritt durchgeführt. Der Zellüberstand

besaß nach dem CEX-Schritt bereits eine Proteinreinheit von 65 % und wurde daraufhin im zweiten Schritt mit den verschiedenen Materialien der MMC und pseudo-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Durch die Verwendung der zwei MMC-Säulen HiTrap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup> MMC und Foresight<sup>TM</sup> Nuvia<sup>TM</sup> cPrime wurden die höchsten Aufreinigungseffekte im Vergleich zur Affinitätssäule HiTrap<sup>TM</sup> Heparin HP erzielt. Sie erreichten eine Proteinreinheit von etwa 92 % mit einer Ausbeute und Wiederfindungsrate von 85 %. Im Vergleich führte die Affinitätssäule HiTrap<sup>TM</sup> Heparin HP zu einer Reinheit von 94 % mit einer Ausbeute und Wiederfindungsrate von 89 %. Die zwei MMC-Säulen stellen somit nach vorab durchgeführtem Capture-Schritt Alternativen zur Affinitätssäule HiTrap<sup>TM</sup> Heparin HP dar.

Für den späteren Einsatz des bFGF spielt die Stabilität des Proteins eine entscheidende Rolle. Sie beeinflusst die Aufreinigung, Lagerung, Aktivität und Analysen. Nur ein stabiles Produkt eignet sich für weitere Experimente und für den medizinischen Einsatz, welcher beabsichtigt ist. Aus diesem Grund wurden anhand von Stabilitätstests das Puffersystem und nötige Additive untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass der bisher verwendete Phosphatpuffer für die höchste Stabilität des bFGF sorgt und sich der Zusatz von Osmolyten wie Saccharose und Glycerol als sinnvoll erwiesen haben.

Anhand der oben genannten Versuche wurden zwei Alternativen zur Affinitätssäule HiTrap<sup>TM</sup> Heparin HP dargestellt (HiTrap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup> MMC, Foresight<sup>TM</sup> Nuvia<sup>TM</sup> cPrime<sup>TM</sup>). Zusätzlich zur effektiven Aufreinigung ist die Bioaktivität des bFGF entscheidend für die Bewertung einer neuen Methode. Aus diesem Grund wurde bFGF, welches mittels der MMC-Säulen HiTrap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup> MMC und Foresight<sup>TM</sup> Nuvia<sup>TM</sup> cPrime<sup>TM</sup> und zum Vergleich mittels der Affinitätssäule HiTrap<sup>TM</sup> Heparin HP aufgereinigt wurde, auf seine biologische Aktivität untersucht (Tabelle 11).

Die Versuche wiesen allesamt bioaktives bFGF auf. Für dieselbe Wirkung wurde von dem mittels Affinitätssäule HiTrap<sup>TM</sup> Heparin HP aufgereinigten bFGF eine deutlich geringere Konzentration benötigt ( $EC_{50}$ :  $6,4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) als von dem bFGF, welches mittels der MMC-Säulen HiTrap<sup>TM</sup> Capto<sup>TM</sup> MMC ( $EC_{50}$ :  $37,92 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) oder Foresight<sup>TM</sup> Nuvia<sup>TM</sup> cPrime<sup>TM</sup> ( $EC_{50}$ :  $18,78 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) aufgereinigt wurde.

Dies kann darin begründet sein, dass die Heparin-Affinitätschromatographie eine Affinitätschromatographie mit spezifischen Wechselwirkungen zum aktiven Protein ist und bei der Aufreinigung inaktives bFGF gar nicht bindet und aufgereinigt wird. Zusätzlich lag das bFGF nach den alternativen chromatographischen Methoden nicht mit derselben hohen Reinheit vor. In der Probe befanden sich somit noch andere zell-eigene Proteine, wodurch eventuell die Bioaktivität des bFGF und die Konzentrationsberechnung des bFGF negativ beeinflusst wurden.

Abschließend lässt sich sagen, dass diese Dissertation zwei Möglichkeiten einer alternativen chromatographischen Aufreinigungsmethode am Beispiel des bFGF, bei denen keine tierischen Materialien verwendet wurden, demonstriert hat. Das aufgereinigte Protein war ebenfalls bioaktiv. Durch eine Anpassung der Pufferzusammensetzung und der Aufreinigungsparameter (beispielsweise Fließgeschwindigkeit, Stufengradienten) könnte bFGF zukünftig ohne tierische Materialien aufgereinigt werden und dadurch die Probleme der Kontamination von tierischen Pathogenen lösen. Zusätzlich unterliegen Proteine, die ohne tierische Materialien aufgereinigt werden, einer weniger strengen Qualitätskontrolle, wodurch Herstellungskosten gesenkt werden würden. Weitere Kosten könnten durch das kostengünstigere Material eingespart werden, wodurch die Bereitstellung des Proteins preiswerter werden würde. Des Weiteren könnte die Übertragung dieser Methode auf andere biologisch aktive Proteine getestet werden und somit für deren Aufreinigung mittels synthetischer Materialien motivieren.

## Literatur

- [1] Medizinprodukte mit Materialien tierischen Ursprungs | TÜV SÜD Available online: <https://www.tuvsud.com/de-de/branchen/gesundheit-und-medizintechnik/innovative-medizinprodukte/medizinprodukte-mit-materialien-tierischen-ursprungs> (accessed on Dec 10, 2019).
- [2] Pamukcoglu, T. A risk-based approach to establishing animal-component - Free facilities. *Bioprocess Int.* **2009**, *7*, 54–57.
- [3] Beni, S.; Limtiaco, J.F.K.; Larive, C.K. Analysis and characterization of heparin impurities. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 527–539, doi: 10.1007/s00216-010-4121-x.
- [4] Alban, S. The “precautionary principle” as a guide for future drug development. *Eur. J. Clin. Invest.* **2005**, *35*, 33–44, doi: 10.1111/j.0960-135X.2005.01455.x.
- [5] Muñoz, E.M.; Linhardt, R.J. Heparin-binding domains in vascular biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2004**, *24*, 1549–1557, doi: 10.1161/01.ATV.0000137189.22999.3f.
- [6] Liu, H.; Zhang, Z.; Linhardt, R.J. Lessons learned from the contamination of heparin. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 313–321, doi: 10.1039/b819896a.
- [7] Bett, C.; Grgac, K.; Long, D.; Karfunkle, M.; Keire, D.A.; Asher, D.M.; Gregori, L. A Heparin Purification Process Removes Spiked Transmissible Spongiform Encephalopathy Agent. *AAPS J.* **2017**, *19*, 765–771, doi: 10.1208/s12248-017-0047-y.
- [8] Demir, M.; Iqbal, O.; Dietrich, C.P.; Hoppensteadt, D.A.; Ahmad, S.; Daud, A.N.; Fareed, J. Anticoagulant and Antiprotease Effects of a Novel Heparinlike Compound From Shrimp (*Penaeus brasiliensis*) and Its Neutralization by Heparinase I. *Clin. Appl. Thromb.* **2001**, *7*, 44–52, doi: 10.1177/107602960100700110.

- [9] Guerrini, M.; Beccati, D.; Shriver, Z.; Naggi, A.M.; Capila, I.; Lansing, J.; Guglieri, S.; Fraser, B.; Al-hakim, A.; Viswanathan, K.; et al. Heparin associated with Adverse Clinical Events. **2012**, *26*, 669–675, doi: 10.1038/nbt1407.Oversulfated.
- [10] Mejía-Manzano, L.A.; Lienqueo, M.E.; Escalante-Vázquez, E.J.; Rito-Palomares, M.; Asenjo, J.A. Optimized purification of mono-PEGylated lysozyme by heparin affinity chromatography using response surface methodology. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2017**, *92*, 2554–2562, doi: 10.1002/jctb.5269.
- [11] Gieseler, G.; Pepelanova, I.; Stuckenberg, L.; Villain, L.; Nölle, V.; Odenthal, U.; Beutel, S.; Rinas, U.; Scheper, T. Purification of bone morphogenetic protein-2 from refolding mixtures using mixed-mode membrane chromatography. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 123–130, doi: 10.1007/s00253-016-7784-1.
- [12] Ornitz, D.M.; Itoh, N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* **2001**, *2*, 3005.1–3005.12, doi: 10.1186/gb-2001-2-3-reviews3005.
- [13] Bikfalvi, A.; Klein, S.; Pintucci, G.; Rifkin, D.B. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr. Rev.* **1997**, *18*, 26–45, doi: 10.1210/er.18.1.26.
- [14] Montesano, R.; Vassalli, J.D.; Baird, A.; Guillemin, R.; Orci, L. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83*, 7297–7301, doi: 10.1073/pnas.83.19.7297.
- [15] Bohlen, P.; Baird, A.; Esch, F. Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1984**, *81*, 5364–5368, doi: 10.1073/pnas.81.17.5364.
- [16] Gospodarowicz, D.; Neufeld, G.; Schweigerer, L. Fibroblast growth factor. *Mol. Cell. Endocrinol.* **1986**, *46*, 187–204, doi: 10.1016/0303-7207(86)90001-8.
- [17] Ornitz, D.M. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential

- for development. *BioEssays* **2000**, *22*, 108–112, doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<108::AID-BIES2>3.0.CO;2-M.
- [18] Nugent, M.A.; Iozzo, R. V. Fibroblast growth factor-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2000**, *32*, 115–120, doi: 10.1016/S1357-2725(99)00123-5.
- [19] Conrad, H.E. *Heparin-binding proteins*; Academic Press, 1998; ISBN 9780080533902.
- [20] Moscatelli, D. High and Low Affinity Binding Sites for Basic Fibroblast Growth Factor on Cultured Cells: Absence of a Role for Low Affinity Binding in the Stimulation of Plasminogen Activator Production by Bovine Capillary Endothelial Cells. *J. Cell. Physiol.* **1987**, *131*, 123–130.
- [21] Johnson, D.E.; Williams, L.T. Structural and functional diversity in the fgf receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.* **1992**, *60*, 1–41, doi: 10.1016/S0065-230X(08)60821-0.
- [22] Kan, M.; Wang, F.; Xu, J.; Crabb, J.W.; Hou, J.; McKeehan, W.L. An essential heparin-binding domain in the fibroblast growth factor receptor kinase. *Science (80-. )*. **1993**, *259*, 1918–1921, doi: 10.1126/science.8456318.
- [23] Yayon, A.; Klagsbrun, M.; Esko, J.D.; Leder, P.; Ornitz, D.M. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* **1991**, *64*, 841–848, doi: 10.1016/0092-8674(91)90512-W.
- [24] Iozzo, R. V Matrix Proteoglycans: From Molecular Design to Cellular Function. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 609–652, doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.609.
- [25] Chen, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 1102–1107, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.013.
- [26] Sellke, F.W.; Laham, R.J.; Edelman, E.R.; Pearlman, J.D.; Simons, M.

- Therapeutic angiogenesis with basic fibroblast growth factor: Technique and early results. *Ann. Thorac. Surg.* **1998**, *65*, 1540–1544, doi: 10.1016/S0003-4975(98)00340-3.
- [27] Garke, G.; Deckwer, W.D.; Anspach, F.B. Preparative two-step purification of recombinant human basic fibroblast growth factor from high-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **2000**, *737*, 25–38, doi: 10.1016/S0378-4347(99)00394-1.
- [28] Seeger, A.; Rinas, U. Two-step chromatographic procedure for purification of basic fibroblast growth factor from recombinant *Escherichia coli* and characterization of the equilibrium parameters of adsorption. *J. Chromatogr. A* **1996**, *746*, 17–24, doi: 10.1016/0021-9673(96)00286-5.
- [29] Bolten, S.N.; Rinas, U.; Scheper, T. Heparin: role in protein purification and substitution with animal-component free material. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 8647–8660, doi: 10.1007/s00253-018-9263-3.
- [30] Ori, A.; Wilkinson, M.C.; Fernig, D.G. A systems biology approach for the investigation of the heparin/heparan sulfate interactome. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 19892–19904, doi: 10.1074/jbc.M111.228114.
- [31] Schlessinger, J.; Plotnikov, A.N.; Ibrahimi, O.A.; Eliseenkova, A.V.; Yeh, B.K.; Yayon, A.; Linhardt, R.J.; Mohammadi, M. Crystal Structure of a Ternary FGF-FGFR-Heparin Complex Reveals a Dual Role for Heparin in FGFR Binding and Dimerization. *Mol. Cell* **2000**, *6*, 743–750, doi: 10.1016/S1097-2765(00)00073-3.
- [32] Aviezer, D.; Yayon, A. Heparin-dependent binding and autophosphorylation of epidermal growth factor (EGF) receptor by heparin-binding EGF-like growth factor but not by EGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 12173–7, doi: 10.1073/pnas.91.25.12173.
- [33] Koopmann, W.; Ediriwickrema, C.; Krangel, M.S. Structure and function of the

- glycosaminoglycan binding site of chemokine macrophage inflammatory protein-1b. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 2120–2127.
- [34] Robinson, C.J.; Mulloy, B.; Gallagher, J.T.; Stringer, S.E. VEGF165-binding sites within heparan sulfate encompass two highly sulfated domains and can be liberated by K5 lyase. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 1731–1740, doi: 10.1074/jbc.M510760200.
- [35] Coombe, D.R.; Kett, W.C. Heparan sulfate-protein interactions: Therapeutic potential through structure-function insights. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 410–424, doi: 10.1007/s00018-004-4293-7.
- [36] Capila, I.; Hernáiz, M.J.; Mo, Y.D.; Mealy, T.R.; Campos, B.; Dedman, J.R.; Linhardt, R.J.; Seaton, B.A. Annexin V-heparin oligosaccharide complex suggests heparan sulfate-mediated assembly on cell surfaces. *Structure* **2001**, *9*, 57–64, doi: 10.1016/S0969-2126(00)00549-9.
- [37] Cardin, A.D.; Weintraub, H.J. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* **1989**, *9*, 21–32, doi: 10.1161/01.ATV.9.1.21.
- [38] Dong, J.; Peters-Libeu, C.A.; Weisgraber, K.H.; Segelke, B.W.; Rupp, B.; Capila, I.; Hernáiz, M.J.; LeBrun, L.A.; Linhardt, R.J. Interaction of the N-terminal domain of apolipoprotein E4 with heparin. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2826–2834, doi: 10.1021/bi002417n.
- [39] Imberty, A.; Lortat-Jacob, H.; Pérez, S. Structural view of glycosaminoglycan-protein interactions. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 430–439, doi: 10.1016/j.carres.2006.12.019.
- [40] Handel, T.M.; Johnson, Z.; Crown, S.E.; Lau, E.K.; Sweeney, M.; Proudfoot, A.E. Regulation of Protein Function By Glycosaminoglycans—As Exemplified By Chemokines. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 385–410, doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161747.



- [41] Johnson, D.J.D.; Huntington, J.A. Crystal structure of antithrombin in a heparin-bound intermediate state. *Biochemistry* **2003**, *42*, 8712–8719, doi: 10.1021/bi034524y.
- [42] Carter, W.J.; Cama, E.; Huntington, J.A. Crystal structure of thrombin bound to heparin. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 2745–9, doi: 10.1074/jbc.M411606200.
- [43] Perlin, A.; Mazurek, M. A proton magnetic resonance spectral study of heparin.: L-Iduronic acid residues in commercial heparins. *Carbohydr. Res.* **1968**, *5*, 369–379, doi: 10.1016/S0008-6215(00)81210-0.
- [44] Esko, J.D.; Linhardt, R.J. Proteins that Bind Sulfated Glycosaminoglycans. In *Essentials of Glycobiology*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009 ISBN 9780879697709.
- [45] Best, C.H. Preparation of heparin and its use in the first clinical cases. *Circulation* **1959**, *19*, 79–86, doi: 10.1161/01.CIR.19.1.79.
- [46] Mulloy, B.; Forster, M.J.; Jones, C.; Davies, D.B. N.m.r. and molecular-modelling studies of the solution conformation of heparin. *Biochem. J.* **1993**, *293*, 849–858, doi: 8352752.
- [47] Langer, R.; Linhardt, R.; Hoffberg, S.; Larsen, A.; Cooney, C.; Tapper, D.; Klein, M. An enzymatic system for removing heparin in extracorporeal therapy. *Science (80-. )*. **1982**, *217*, 261–263, doi: 10.1126/science.7089564.
- [48] Hileman, R.E.; Fromm, J.R.; Weiler, J.M.; Linhardt, R.J. Glycosaminoglycan-protein interactions: Definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. *BioEssays* **1998**, *20*, 156–167, doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199802)20:2<156::AID-BIES8>3.0.CO;2-R.
- [49] Gandhi, N.S.; Mancera, R.L. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem. Biol. Drug Des.* **2008**, *72*, 455–482, doi: 10.1111/j.1747-0285.2008.00741.x.
- [50] Zhu, X.; Hsu, B.T.; Rees, D.C. Structural studies of the binding of the anti-

- ulcer drug sucrose octasulfate to acidic fibroblast growth factor. *Structure* **1993**, *1*, 27–34, doi: 10.1016/0969-2126(93)90006-3.
- [51] DiGabriele, A.D.; Lax, I.; Chen, D.I.; Svahn, C.M.; Jaye, M.; Schlessinger, J.; Hendrickson, W.A. Structure of a heparin-linked biologically active dimer of fibroblast growth factor. *Nature* **1998**, *393*, 812–7, doi: 10.1038/31741.
- [52] Faham, S.; Hileman, R.; Fromm, J.; Linhardt, R.; Rees, D. Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor. *Science (80-. )*. 1996, *271*, 1116–1120.
- [53] Pellegrini, L.; Burke, D.F.; von Delft, F.; Mulloy, B.; Blundell, T.L. Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature* **2000**, *407*, 1029–1034, doi: 10.1038/35039551.
- [54] Li, W.; Johnson, D.J.D.; Esmon, C.T.; Huntington, J.A. Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 857–862, doi: 10.1038/nsmb811.
- [55] Mulloy, B.; Linhardt, R.J. Order out of complexity - Protein structures that interact with heparin. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 623–628, doi: 10.1016/S0959-440X(00)00257-8.
- [56] Xu, D.; Esko, J.D. Demystifying heparan sulfate-protein interactions. *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83*, 129–57, doi: 10.1146/annurev-biochem-060713-035314.
- [57] Faham, S.; Hileman, R.E.; Fromm, J.R.; Linhardt, R.J.; Rees, D.C. Heparin Structure and Interactions with Basic Fibroblast Growth Factor. *Science (80-. )*. **1996**, *271*, 1116–1120, doi: 10.1126/science.271.5252.1116.
- [58] Thompson, L.D.; Pantoliano, M.W.; Springer, B.A. Energetic characterization of the basic fibroblast growth factor-heparin interaction: identification of the heparin binding domain. *Biochemistry* **1994**, *33*, 3831–3840, doi: 10.1021/bi00179a006.

- [59] Jin, L.; Abrahams, J.P.; Skinner, R.; Petitou, M.; Pike, R.N.; Carrell, R.W. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Med. Sci.* **1997**, *94*, 14683–14688, doi: 10.1073/pnas.94.26.14683.
- [60] Xiong, S.; Zhang, L.; He, Q.-Y. Fractionation of proteins by heparin chromatography. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *424*, 213–221, doi: 10.1007/978-1-60327-064-9\_18.
- [61] Guan, D.; Chen, Z. Challenges and recent advances in affinity purification of tag-free proteins. *Biotechnol. Lett.* **2014**, *36*, 1391–1406, doi: 10.1007/s10529-014-1509-2.
- [62] Farooqui, A.A. Purification of enzymes by heparin-sepharose affinity chromatography. *J. Chromatogr. A* **1980**, *184*, 335–345, doi: 10.1016/S0021-9673(00)89004-4.
- [63] Staby, A.; Sand, M.B.; Hansen, R.G.; Jacobsen, J.H.; Andersen, L.A.; Gerstenberg, M.; Bruus, U.K.; Jensen, I.H. Comparison of chromatographic ion-exchange resins: IV. Strong and weak cation-exchange resins and heparin resins. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1069*, 65–77, doi: 10.1016/j.chroma.2004.11.094.
- [64] Zhang, Q.; Lao, X.; Huang, J.; Zhu, Z.; Pang, L.; Tang, Y.; Song, Q.; Huang, J.; Deng, J.; Deng, N.; et al. Soluble production and function of vascular endothelial growth factor/basic fibroblast growth factor complex peptide. *Biotechnol. Prog.* **2015**, *31*, 194–203, doi: 10.1002/btpr.1997.
- [65] Chen, R.; John, J.; Lavrentieva, A.; Müller, S.; Tomala, M.; Zhao, Y.; Zweigerdt, R.; Beutel, S.; Hitzmann, B.; Kasper, C.; et al. Cytokine production using membrane adsorbers: Human basic fibroblast growth factor produced by *Escherichia coli*. *Eng. Life Sci.* **2012**, *12*, 29–38, doi: 10.1002/elsc.201100045.
- [66] Fiebich, B.L.; Jager, B.; Schollmann, C.; Weindel, K.; Wilting, J.; Kochs, G.; Marme, D.; Hug, H.; Weich, H.A. Synthesis and assembly of functionally active human vascular endothelial growth factor homodimers in insect cells. *Eur J*

- Biochem* **1993**, *211*, 19–26.
- [67] Vallejo, L.F.; Rinas, U. Optimized Procedure for Renaturation of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 at High Protein Concentration. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *85*, 601–609, doi: 10.1002/bit.10906.
- [68] Nordenman, B.; Björk, I. Purification of thrombin by affinity chromatography on immobilized heparin. *Thromb. Res.* **1977**, *11*, 799–808, doi: 10.1016/0049-3848(77)90108-6.
- [69] Miller-Andersson, M.; Borg, H.; Andersson, L.-O. Purification of antithrombin III by affinity chromatography. *Thromb. Res.* **1974**, *5*, 439–452, doi: 10.1016/0049-3848(74)90001-2.
- [70] Perderiset, M.; Courty, J.; Mereau, A.; Chevet, E.; Barritault, D. Purification of a heparin binding FGF receptor (HB-FGFR) from adult bovine brain membranes. *Biochimie* **1992**, *74*, 1091–1096, doi: 10.1016/0300-9084(92)90007-2.
- [71] Batra, S.; Sahi, N.; Mikulcik, K.; Shockley, H.; Turner, C.; Laux, Z.; Badwaik, V.D.; Conte, E.; Rajalingam, D. Efficient and inexpensive method for purification of heparin binding proteins. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2011**, *879*, 2437–2442, doi: 10.1016/j.jchromb.2011.06.047.
- [72] Lemaître, G.; Laaroubi, K.; Soulet, L.; Barritault, D.; Miskulin, M. Production and purification of active FGF2 via recombinant fusion protein. *Biochimie* **1995**, *77*, 162–166, doi: 10.1016/0300-9084(96)88120-X.
- [73] Petitou, M.; Van Boeckel, C.A.A. A synthetic antithrombin III binding pentasaccharide is now a drug! What comes next? *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2004**, *43*, 3118–3133, doi: 10.1002/anie.200300640.
- [74] Lindahl, U.; Li, J.-P.; Kusche-Gullberg, M.; Salmivirta, M.; Alaranta, S.; Veromaa, T.; Emeis, J.; Roberts, I.; Taylor, C.; Oreste, P.; et al. Generation of “Neoheparin” from *E. coli* K5 Capsular Polysaccharide. *J. Med. Chem.* **2005**,

- 48, 349–352, doi: 10.1021/jm049812m.
- [75] Zulueta, M.M.L.; Lin, S.Y.; Hu, Y.P.; Hung, S.C. Synthetic heparin and heparan sulfate oligosaccharides and their protein interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 1023–1029, doi: 10.1016/j.cbpa.2013.10.008.
- [76] Masuko, S.; Linhardt, R.J. Chemoenzymatic synthesis of the next generation of ultralow MW heparin therapeutics. *Future Med. Chem.* **2012**, *4*, 289–296, doi: 10.4155/fmc.11.185.
- [77] Fu, L.; Suflita, M.; Linhardt, R.J. Bioengineered heparins and heparan sulfates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *97*, 237–249, doi: 10.1016/j.addr.2015.11.002.
- [78] Baik, J.Y.; Gasimli, L.; Yang, B.; Datta, P.; Zhang, F.; Glass, C.A.; Esko, J.D.; Linhardt, R.J.; Sharfstein, S.T. Metabolic engineering of Chinese hamster ovary cells: Towards a bioengineered heparin. *Metab. Eng.* **2012**, *14*, 81–90, doi: 10.1016/j.ymben.2012.01.008.
- [79] Zhang, K.; Liu, X. Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *128*, 73–88, doi: 10.1016/j.jpba.2016.05.007.
- [80] Oehme, F.; Peters, J. Mixed-Mode Chromatography in Downstream Process Development. *BioPharm Intl.* **2010**, *50*, 3–10.
- [81] Parimal, S.; Garde, S.; Cramer, S.M. Interactions of Multimodal Ligands with Proteins: Insights into Selectivity Using Molecular Dynamics Simulations. *Langmuir* **2015**, *31*, 7512–7523, doi: 10.1021/acs.langmuir.5b00236.
- [82] Gagnon, P. IgG Aggregate Removal by Charged-Hydrophobic Mixed Mode Chromatography. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2009**, *10*, 434–439, doi: 10.2174/138920109788488888.
- [83] 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*. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 235–242,

- doi: 10.1016/j.chroma.2009.07.023.
- [84] Chen, J.; Tetrault, J.; Zhang, Y.; Wasserman, A.; Conley, G.; DiLeo, M.; Haimes, E.; Nixon, A.E.; Ley, A. The distinctive separation attributes of mixed-mode resins and their application in monoclonal antibody downstream purification process. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 216–224, doi: 10.1016/j.chroma.2009.09.047.
- [85] Xuemei M. He; Sherif Hanala; Snyder, M. Purification of Recombinant Proteins on Nuvia cPrime Hydrophobic Cation Exchange Media : A Simple Approach to Method Development. *BioRad Lab. Inc.* **2013**, *6418*.
- [86] GE Healthcare HiTrap™ Capto™ MMC , 1. 1–16.
- [87] Roque, A.C.A.; Silva, C.S.O.; Taipa, M.Â. Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: Advances and perspectives. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1160*, 44–55, doi: 10.1016/j.chroma.2007.05.109.
- [88] Fortuna, A.R.; van Teeffelen, S.; Ley, A.; Fischer, L.M.; Taft, F.; Genzel, Y.; Villain, L.; Wolff, M.W.; Reichl, U. Use of sulfated cellulose membrane adsorbers for chromatographic purification of cell cultured-derived influenza A and B viruses. *Sep. Purif. Technol.* **2019**, *226*, 350–358, doi: 10.1016/j.seppur.2019.05.101.
- [89] Sartorius Stedim Sartobind ® Sulfated Cellulose Sheet. **2017**.
- [90] GE Healthcare Capto™ DeVirS. *Data File* **2009**, *28-9616-49*.
- [91] Sharapova, N.E.; Kotnova, A.P.; Galushkina, Z.M.; Lavrova, N.V.; Poletaeva, N.N.; Tukhvatulin, A.E.; Semikhin, A.S.; Gromov, A.V.; Soboleva, L.A.; Ershova, A.S.; et al. Production of the recombinant human bone morphogenetic protein-2 in *Escherichia coli* and testing of its biological activity in vitro and in vivo. *Mol. Biol.* **2010**, *44*, 923–930, doi: 10.1134/S0026893310060099.
- [92] Guo, W.; Zhu, X.; Cai, J.; Huang, L.; Cen, P.; Xu, Z. Refolding and two-step purification by hydrophobic interaction chromatography of recombinant human

- bone morphogenetic protein-2 from *Escherichia coli*. *Process Biochem.* **2012**, *47*, 960–967, doi: 10.1016/j.procbio.2012.03.003.
- [93] Pizarro, S.A.; Gunson, J.; Field, M.J.; Dinges, R.; Khoo, S.; Dalal, M.; Lee, M.; Kaleas, K.A.; Moiseff, K.; Garnick, S.; et al. High-yield expression of human vascular endothelial growth factor VEGF 165 in *Escherichia coli* and purification for therapeutic applications. *Protein Expr. Purif.* **2010**, *72*, 184–193, doi: 10.1016/j.pep.2010.03.007.
- [94] Hoffmann, F.; Van Den Heuvel, J.; Zidek, N.; Rinas, U. Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *34*, 235–241, doi: 10.1016/j.enzmictec.2003.10.011.
- [95] Li, Z.; Carstensen, B.; Rinas, U. Smart sustainable bottle (SSB) system for *E. coli* based recombinant protein production. *Microb. Cell Fact.* **2014**, *13*, 1–8, doi: 10.1186/s12934-014-0153-9.
- [96] Li, Z.; Kessler, W.; Van Den Heuvel, J.; Rinas, U. Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based *Escherichia coli* expression systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *91*, 1203–1213, doi: 10.1007/s00253-011-3407-z.
- [97] Orr, V.; Zhong, L.; Moo-Young, M.; Chou, C.P. Recent advances in bioprocessing application of membrane chromatography. *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31*, 450–465, doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.007.
- [98] Link, A.J.; Robison, K.; Church, G.M. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. In *Proceedings of the Electrophoresis*; 1997; Vol. 18, pp. 1259–1313, doi: 10.1002/elps.1150180807.
- [99] *E.coli* Protein Database Available online: <http://eecoli.kaist.ac.kr/main.html> (accessed on Dec 7, 2019).

- [100] Forman, D.S.; Ledeen, R.W. Axonal Transport of Gangliosides in the Goldfish Optic Nerve. *Science (80-. )*. **1972**, *177*, 630–633, doi: 10.1126/science.177.4049.630.
- [101] Pikal-Cleland, K.A.; Carpenter, J.F. Lyophilization-induced protein denaturation in phosphate buffer systems: Monomeric and tetrameric  $\beta$ -galactosidase. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 1255–1268, doi: 10.1002/jps.1078.
- [102] Petsch, D. Endotoxin removal from protein solutions. *J. Biotechnol.* **2000**, *76*, 97–119, doi: 10.1016/S0168-1656(99)00185-6.
- [103] Anspach, F.B.; Petsch, D. Membrane adsorbers for selective endotoxin removal from protein solutions. *Process Biochem.* **2000**, *35*, 1005–1012, doi: 10.1016/S0032-9592(00)00132-1.
- [104] Anspach, F.B. Endotoxin removal by affinity sorbents. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2001**, *49*, 665–681, doi: 10.1016/S0165-022X(01)00228-7.
- [105] Guidance for Industry: Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers | FDA Available online: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-pyrogen-and-endotoxins-testing-questions-and-answers> (accessed on Dec 7, 2019).
- [106] Sartorius Stedim Sartobind® S nano 3 mL. **2008**, 3–6.
- [107] Sartorius Stedim Biotech Sartobind® IEX MA 15, 75 and 100. 2–3.
- [108] Thompson, S.A.; Fiddes, J.C. Chemical Characterization of the Cysteines of Basic Fibroblast Growth Factor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1991**, *638*, 78–88.
- [109] Boivin, S.; Kozak, S.; Meijers, R. Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. *Protein Expr. Purif.* **2013**, *91*, 192–206, doi: 10.1016/j.pep.2013.08.002.
- [110] Vemuri, S.; Beylin, I.; Sluzky, V.; Stratton, P.; Eberlein, G.; Wang, Y.J. The Stability of bFGF Against Thermal Denaturation. *J. Pharm. Pharmacol.* **1994**, *46*, 481–486, doi: 10.1111/j.2042-7158.1994.tb03831.x.



- [111] Scheffler, E. *Einführung in die Praxis der statistischen Versuchsplanung*; 1986; ISBN 3-342-00099-6.
- [112] Leibly, D.J.; Nguyen, T.N.; Kao, L.T.; Hewitt, S.N.; Barrett, L.K.; Van Voorhis, W.C. Stabilizing Additives Added during Cell Lysis Aid in the Solubilization of Recombinant Proteins. *PLoS One* **2012**, *7*, doi: 10.1371/journal.pone.0052482.

## A Anhang

### A.1 Materialien

Im Folgenden wird für doppelt-deionisiertes Wasser die Bezeichnung H<sub>2</sub>O verwendet, welches aus dem Reinstwassersystem arium® 611 stammt. Die pH-Werte wurden bei Raumtemperatur eingestellt.

#### A.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller, Ort
96-Well-Platte	0,2 mL Wells, Platte ohne Rahmen	Brand, Wertheim, Deutschland
Bechergläser	Duran® Becher niedrige und hohe Form mit Ausguss; verschiedene Volumina	Duran Group, Wertheim/Main, Deutschland
Chromatographiesäule (1)	HiTrap™ Heparin HP, 1 mL	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA
Chromatographiesäule (2)	Capto™ DeVirS, 4,7 mL	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA
Chromatographiesäule (3)	Foresight™ Nuvia™ cPrime™, 1 mL	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Chromatographiesäule (4)	HiTrap™ Capto™ MMC, 1 mL	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA
Chromatographiesäule (5)	HiPrep 26/10 Desalting, 53 mL	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA
Einwegspritzen (1)	Injekt® Solo, 5 mL	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Einwegspritzen (2)	20 und 50 mL, Omnifix®	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Filter/Filterpumpenaufsatz	Sartolab® Vakuumfilter	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Glaspipetten	Pasteurpipetten (kurz und lang)	Brand, Wertheim, Deutschland
Halb-Mikro Küvetten	Höhe: 45 mm, Schichtdicke: 10 mm, Polystyrol	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Kämme (15 Taschen)	Mini-PROTEAN® Comb 15 Wells, 0,75 mm, 20 µL	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Kryoröhre (2 mL)	CryoPure mit QuickScal Schraubverschluss	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Laborflasche	Duran® Laborglasflasche mit DIN Gewinde	Duran Group, Wertheim/Main, Deutschland
Messzylinder	Duran® Messzylinder mit Sechskantfuß; verschiedene Volumina	Duran Group, Wertheim/Main, Deutschland

Membranadsorber (1)	Sartobind® S nano, 3 mL	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Membranadsorber (2)	Sartobind® Q 75, 2,1 mL	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Membranadsorber (3)	Prototyp B, 1 mL	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Membranadsorber (4)	Prototyp C, 1 mL	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Membranadsorber (5)	Prototyp D, 1 mL	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Membranadsorber (6)	Prototyp E, 1 mL	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Membranadsorber (7)	Sartobind® Sulfatierte Cellulose (SUCA), 3 mL	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
PCR-Gefäß	PCR Einzelgefäß 0,2 mL	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetten (2, 5, 10, 25 und 50 mL)	Corning® Costar® Stripette®	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pipettenspitzen	10, 200 und 1000 µL max. Volumen	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitze für Multipette®	Combitip advanced® (5 und 10 mL); steril (Eppendorf Biopur®), einzeln verpackt	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	1,5 und 2 mL SafeSeal Reagiergefäß mit hängendem Deckel und breitem Rand	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Schüttelkolben/Schikankolben	100 und 500 mL	Duran Group, Wertheim/Main, Deutschland
T175 Flasche	TC Flask T175, Stand., Vent. Cap	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
T75 Flasche	TC Flask T75, Stand., Vent. Cap	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Ultrafiltrationseinheit	VivaSpin 20, MWCO 3000 Da	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

### A.1.2 Laborgeräte

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Laborgeräte

Geräteart	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Abgassensor	BlueInOne Ferm	BlueSens gas sensor GmbH, Herten, Deutschland
Autoklav	Syntec V150	Syntec, Linden, Deutschland
Brechungsindexdetektor	LaChrom RI-Detektor L7490	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Brutschrank	Brutschrank IN	Memmert, Schwabach, Deutschland
Brutschrank	Heracell™ 240	Heraeus, Hanau, Deutschland
DO-Messsonde	OxyFerm FDA	Hamilton Company, Reno, USA
Eismaschine	Scotsman AF103	Hubbard Systems, Ipswich, UK
Elektronischer Dispenser	Multipette® E3	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Elektrophoresesystem	Mupid®-One Submarine	Mupid, Tokyo, Japan
Endotoxin-Kartusche	Endosafe®-PTS™ 10 – 0,1 EU/mL	Charles River Laboratories, Wilmington, USA
Fluoreszenz-Detektor	RF-20A	Shimadzu, Kyoto, Japan

FPLC-Anlage	Äkta-Pure 25 L	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA
Gel/WB-Scanner	Epson Perfection V750 Pro	Epson, Meerbusch, Deutschland
Gelöstsauerstoffelektrode	InPro6820	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-4 LSC	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland
Glucosemessgerät	YSI 2900	YSI Incorporated, Yellow Springs, USA
Hochdruck-Homogenisator	M-110 L Microfluidizer® Processor	Microfluidics, Newton, USA
Inkubationsschüttler (1)	KS 4000 I control	IKA, Staufen, Deutschland
Inkubationsschüttler (2)	Certomat® BS-1	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Inkubationsschüttler (3)	New Brunswick™ Innova® 44	Eppendorf, Hamburg
Kryotank	Orion ET-44	Chart Industries, Luxemburg
Laborgefrierschrank (- 80 °C)	Forma™ 900 series	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magnetrührer	IKA® RH basic 2	IKA®-Werke, Staufen, Deutschland
Mikroliterpipetten	Trasferpette® S	Brand, Wertheim, Deutschland
Mikrotiterplatten-Spektrophotometer	Multiskan® GO	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikroskop	Olympus IX50 Inversmikroskop	Olympus, Hamburg, Deutschland
NanoDrop	NanoDrop 1000 Mikrovolumen-Spektralphotometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Neubauer Zählkammer	Neubauer Zählkammer; 0,1 mm Tiefe	Brand, Wertheim, Deutschland
pH-Meter (1)	Metrohm 605	Metrohm, Filderstadt, Deutschland
pH-Meter (2)	HI 221	Hanna Instruments, Québec, Kanada
pH-Messsonde	EasyFerm Plus	Hamilton Company, Reno, USA
Photometer	Multiskan® Spectrum	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Real-time PCR System	iQ-5	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Reinstwassersystem	Arium® 611	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Rührkesselreaktor (10 L)	Biostat® C	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
SDS-Gel-Gießstation und Gelelektrophoreseapparatur	Mini-Protein® Tetra Handcast System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Sterilwerkbank	HERAsafe KS 18	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Temperaturschüttler	ThermoMixer® comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultraschall-Wasserbad	Sonorex Super RK 510 H	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Waage (1)	U 3600	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Waage (2)	AC 210 S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Waage (3)	AC 211 S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Waage (4)	Denver Summit Standard Analysewaage	Denver Instrument, Bohemia, USA
Wasserbad (1)	TW 12	Julabo, Seelbach, Deutschland
Wasserbad (2)	WNB 29	Memmert, Schwabach, Deutschland

Zentrifuge (1)	Heraeus™ Multifuge™ X3 FR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge (2)	Heraeus™ Biofuge™ pico	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge (3)	Heraeus™ Fresco™ 21	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge (4)	Zentrifuge 5702	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### A.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	CAS-Nummer	Hersteller, Ort
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	4432-31-9	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	60-24-2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	1132-61-2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aceton	67-64-1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar	9002-18-0	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	9012-36-6	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniak	7664-41-7	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	7727-54-0	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumsulfat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7783-20-2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	9048-46-8	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	10043-35-3	Fluka, Buchs, Schweiz
Bromphenolblau	115-39-9	Fluka, Buchs, Schweiz
Cobalt(II)-chlorid (CoCl <sub>2</sub> )	7646-79-9	Fluka, Buchs, Schweiz
Coomassie Brilliant Blue G250 (CBB)	6104-58-1	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	7758-11-4	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O)	10028-24-7	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	3483-12-3	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eisen(III)citrat (Fe(III)citrate)	28633-45-6	Merck Millipore, Billerica, USA
Endotoxinfreies Wasser	7732-18-5	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA
Essigsäure (CH <sub>3</sub> COOH)	64-19-7	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 96 % (EtOH)	64-17-5	Merck Millipore, Billerica, USA
EtOH 70 %	64-17-5	Merck Millipore, Billerica, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	60-00-4	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat (Titriplex® III)	6381-92-6	Merck Millipore, Billerica, USA

## Anhang

Fetales Kälberserum (FCS)	9014-81-7	Merck Millipore, Billerica, USA
Glycerin	56-81-5	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	8013-01-2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	67-63-0	VWR, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	744-40-7	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	7778-77-0	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycinsulfat	25389-94-0	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kupfer(II)chlorid (CuCl <sub>2</sub> )	7447-39-4	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	7786-30-3	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	7487-88-9	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Mangan(II)chlorid Dihydrat (MnCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O)	7773-01-5	Merck Millipore, Billerica, USA
Methanol (MeOH)	67-56-1	Merck Millipore, Billerica, USA
N-Cyclohexyl-2-aminoethan-sulfonsäure (CHES)	103-47-9	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	7647-14-5	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	144-55-8	
Natriumhydroxid (NaOH)	1310-73-2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	151-21-3	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriummolybdat Dihydrat (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O)	7631-95-0	Fluka, Buchs, Schweiz
ortho-Phosphorsäure 85 %	7664-38-2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese 40 %	79-06-1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	7647-01-0	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
N'N'N'N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	110-18-9	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris Base)	77-86-1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris HCl)	1185-53-1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau-Lösung (40 %)	72-57-1	VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypton	91079-40-2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zinkacetat (Zn(CH <sub>3</sub> COOH) <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O)	5970-45-6	Merck Millipore, Billerica, USA
Zitronensäure	77-92-9	Riedel-de Häen, Seelze, Deutschland

Tabelle 15: Auflistung der verwendeten Antibiotika-Stammlösungen.

Antibiotikum	Konzentration	Hersteller, Ort
Kanamycin	50 mg · mL <sup>-1</sup>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	10 mg · mL <sup>-1</sup>	Biochrom, Berlin, Deutschland

Tabelle 16: Auflistung sonstiger Reagenzien.

Sonstige Reagenzien	Konzentration	Hersteller/Ort
Benzonase® Nuklease	250 U · $\mu$ L (Stammlösung)	Merck Millipore, Billerica, USA
Bovines Serumalbumin (BSA) Standard (23209)	2 mg · mL in H <sub>2</sub> O	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pierce™ Unstained Protein Ladder 26614		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
rLysozym™ (71110-3)	30 KU · $\mu$ L (Stammlösung)	Merck Millipore, Billerica, USA
Sypro® Orange	5000x konzentriert in DMSO	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
10x Trypsin/EDTA	0,5 % Trypsin/0,2 % EDTA (w/v) in PBS	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

#### A.1.4 Puffer, Medien und Lösungen

Tabelle 17: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Anionenaustauschchromatographie Bindepuffer (AEX BP, pH 7,5)	20 mM Tris 150 mM NaCl 3 mM DTT 1 mM EDTA
Anionenaustauschchromatographie Waschlösung 1 (AEX W1)	2 M KOH 30 % Ethanol
Anionenaustauschchromatographie Waschlösung 2 (AEX W2)	0,1 M KOH 20 % Ethanol 1,5 M NaCl
APS	25 %ige Lösung
BugBuster® Working Solution	1 mL BugBuster® Reagenz, 0,9 $\mu$ L rLysozym, 0,9 $\mu$ L Benzonase
Glycerol-Lösung	50 %ige Lösung
Heparin-Affinitätschromatographie Bindepuffer (BP, pH 7,5)	s. CEX Bindepuffer (pH 7,5)
Heparin-Affinitätschromatographie Elutionspuffer (EP, pH 7,5)	s. CEX Elutionspuffer (pH 7,5)
CEX Bindepuffer (BP, pH 7,5)	5,4 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O 20,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 mM EDTA 3 mM DTT
CEX Elutionspuffer (EP, pH 7,5)	5,4 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O 20,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 M NaCl 1 mM EDTA 3 mM DTT

Mixed-Mode-Chromatographie Bindepuffer (BP, pH 7,5)	s. CEX Bindepuffer (pH 7,5)
Mixed-Mode-Chromatographie Elutionspuffer (EP, pH 7,5)	s. CEX Elutionspuffer (pH 7,5)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O
Pseudo-Affinitätschromatographie Bindepuffer	s. CEX Bindepuffer (pH 7,5)
Pseudo-Affinitätschromatographie Elutionspuffer	s. CEX Elutionspuffer (pH 7,5)
Saccharose-Lösung	20 % Saccharose in H <sub>2</sub> O
Salinelösung	0,9 % NaCl in H <sub>2</sub> O
SDS-Probenpuffer (pH 6,8, reduzierend)	20 mM Tris/HCl 2 mM EDTA 5 % SDS 5,5 % Glycerin 10 % 2-Mercaptoethanol
Tris/HCl (pH 6,8)	1,5 M Tris/HCl
Tris/HCl (pH 8,8)	1,5 M Tris/HCl
1x Tris-Glycin-SDS-Puffer (TGS; pH 8,3)	25 mM Tris Base 192 mM Glycin 0,1 % SDS
Zellysepuffer (pH 7,5)	5,4 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O 20,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 mM NaCl 1,25 mM MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O 1 mM EDTA 3 mM DTT

Tabelle 18: Auflistung der verwendeten Medien.

Medien	Zusammensetzung
Dublecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-Basal)	13,3 g · L <sup>-1</sup> DMEM-Pulver 3,7 g · L <sup>-1</sup> NaHCO <sub>3</sub>
Defined Non-inducing Broth (DNB-Medium; pH 6,8; Medium für die 2. Vorkultur)	60 mM Glucose 30 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8 mM Zitronensäure 5 mM MgSO <sub>4</sub> 412 mM Fe(III)citrat 10 mM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O 15 mM CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O 73 mM MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O 8,8 mM CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O 49 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 154 mM Zn(CH <sub>3</sub> COOH) <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O 38 mM Titriplex III



Kryomedium	70 % DMEM 20 % FCS 10 % DMSO
LB-Medium (Medium für die 1. Vorkultur)	0,5 % Hefeextrakt 1 % Trypton 1 % NaCl
LB-Agar	0,5 % Hefeextrakt 1 % Trypton 1 % NaCl 1,5 % Agar
Reduziertes Medium	1 % Penicillin/Streptavidin 0,1 % FCS 98,9 % DMEM
S-DAB (Autoinduktionsmedium für die Hauptkultur; pH 6,8)	2,94 g · L <sup>-1</sup> Glucose 11,2 g · L <sup>-1</sup> Glycerol 7,4 g · L <sup>-1</sup> Lactose 1,2 g · L <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O 4 g · L <sup>-1</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 13,3 g · L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,55 g · L <sup>-1</sup> Zitronensäure 100,8 mg · L <sup>-1</sup> Fe(III)citrate 1,79 mg · L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 1,4 mg · L <sup>-1</sup> CoCl <sub>2</sub> 9,56 mg · L <sup>-1</sup> MnCl <sub>2</sub> 1,2 g · L <sup>-1</sup> CuCl <sub>2</sub> 3 mg · L <sup>-1</sup> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 28,25 mg · L <sup>-1</sup> Zn(CH <sub>3</sub> COOH) <sub>2</sub> 14,1 mg · L <sup>-1</sup> Tritriplex III
Vollsupplementiertes Medium	1 % Penicillin/Streptavidin 10 % FCS 89 % DMEM

Tabelle 19: Auflistung der verwendeten Gellösungen.

Gellösungen	Zusammensetzung
Polyacrylamid Sammelgel (6 %)	0,75 mL Polyacrylamid/Bisacrylamid 0,3 mL SDS (1 %) 0,630 mL TRIS/HCl (1,5 M, pH 6,8) 3,775 mL H <sub>2</sub> O 10 µL TEMED 10 µL APS (10 %)
Polyacrylamid Trenngel (15 %)	3 mL Polyacrylamid/Bisacrylamid 0,8 mL SDS (1 %) 2 mL TRIS/HCl (1,5 M, pH 6,8) 2,08 mL H <sub>2</sub> O 8 µL TEMED 32 µL APS (10 %)

Tabelle 20: Auflistung der verwendeten Färbelösungen.

Färbelösungen	Zusammensetzung
Coomassie Fixierlösung	50 % Ethanol 20 % Essigsäure
Coomassie Färbelösung	0,15 % Coomassie Brilliant G-250 10 % Ammoniumsulfat 10 % ortho-Phosphorsäure 20 % Methanol

### A.1.5 Aminosäuresequenz des bFGF

MAAGSITTLPALPEDGGSGAFPPGHFKDPKRLYCKNGGFFLRIHPDGRVDGVREKSDPHIKLQ  
LQAEERGVSISIKGVCANRYLAMKEDGRLLASKCVTDECFERLESNNYNTYRSRKYTSWYV  
ALKRTGQYKLGSKTGPGQKAILFLPMSAKS

### A.1.6 Biomoleküle, Vektoren und Zellen

Tabelle 21: Auflistung der verwendeten Vektoren.

Vektor	Hersteller/Ort
pET29c(+)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 22: Auflistung der verwendeten Zellen.

Zellen	Hersteller/Ort
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Fibroblasten-Zellen NIH-3T3	DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland

Tabelle 23: Auflistung der verwendeten Reaktionskits.

Reaktionskits	Hersteller/Ort
BugBuster® 10x Proteinextraktionsreagenz	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bradford Reagenz	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
CellTiter-Blue (CTB) Reagenz	Promega, Fitchburg, USA
Protease Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

### A.1.7 Software

Tabelle 24: Auflistung der verwendeten Software.

Anwendung	Software (Hersteller)
Bearbeitung und Erstellung von Graphiken	GNU Image Manipulation Program (The GIMP Team, USA)
Bearbeitung und Erstellung von Vektor-graphiken	InkScape (Inkscape Community)

## Anhang

---

Chromatographiekontrolleinheit	Unicorn™, GE Healthcare, Chicago, USA
Darstellung von Biomolekülen	PyMOL (DeLano Scientific LLC, Schrödinger)
Datenanalyse	MS Excel (Microsoft Corporation, USA)
Datenanalyse	OriginPro® (OriginLab)
Densitometrische Auswertung	GelAnalyzer
Design of Experiments	MODDE (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
Klonierungssoftware	Snapgene (GSL Biotech LLC, San Diego, California)
Kultivierungskontrolleinheit	ProfiSignalGo (Delphin, Bergisch Gladbach, Deutschland)
Mikroskopie Software	cellSens Standard (Olympus, Hamburg, Deutschland)
Photometer (Plate Reader) Software	SkatIt™ RE for Multiskan Go
SDS-PAGE Gel Scanner Software	Adobe® Photoshop CS2
Thermal Shift Assay Software	iQ™-5 Optical System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Verfassen der Dissertation	MS Word (Microsoft Corporation, USA)
Zeichnung chemischer Strukturen	ChemDraw (CambridgeSoft, USA)

---

## B Methoden

### B.1 Proteinexpression

#### B.1.1 Anlegen einer Gefrierkultur

Für das Anlegen einer Gefrierkultur wird eine Einzelkolonie des *Escherichia coli* (*E. coli*) Stammes BL21(DE3) mit dem Insert pET29c(+) in 10 mL LB-Medium (Tabelle 18) mit Kanamycin ( $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) in einem 100 mL Schüttelkolben mit Schikane bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und 170 rpm kultiviert. Bei einer optischen Dichte bei 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) von 0,6 werden in gleichen Anteilen die Zellsuspension und Glycerol (50 %ige Lösung) gemischt, 10 min auf Eis gekühlt und bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

#### B.1.2 Kultivierung

Die erste Vorkultur von *E. coli* BL21(DE3):pET29c(+)-bFGF wird über Nacht in einem 100 mL Schüttelkolben mit Schikane durchgeführt (10 mL LB-Medium (Tabelle 18),  $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Kanamycin, 100  $\mu\text{L}$  Gefrierkultur,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 170 rpm). Die zweite Vorkultur wird mit einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,01 angeimpft und findet in einem 500 mL Schüttelkolben mit Schikane für 6-8 h statt (50 mL Defined Non-inducing Broth (DNB)-Medium, pH 6,8,  $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Kanamycin,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 170 rpm). Die Hauptkultur wird in 10 L „simple“ defined autoinduction broth (S-DAB) Medium mit  $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Kanamycin durchgeführt. Unter folgenden Bedingungen wird kultiviert: pH 6,8 (kontrolliert durch die Zugabe von Ammoniak), Temperatur von  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ , Start- $\text{OD}_{600}$  von 0,02, Zuluft von  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  und einer Rührergeschwindigkeit von 400 rpm. Der Prozess wird mit Hilfe der Gelöstsauerstoffelektrode InPro6820 (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland), der pH-Elektrode EasyFerm Plus K8 200 (Hamilton Company, Reno, USA) und der Biostat® C plus Kontrolleinheit (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) überwacht. ProfiSignal Go (Delphin Technology, Bergisch Gladbach, Deutschland) wird für die Protokollierung der Kultivierung verwendet. Die Kultivierung endet mit einem steilen Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration. Die Zellen werden durch

eine Zentrifugation (Heraeus™ Multifuge™ X3 FR, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei  $10.000 \cdot g$  für 20 min und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  geerntet. Der Überstand wird entsorgt und die Zellpellets bis zur weiteren Verwendung bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### **B.1.3 Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm**

Die optische Dichte bei 600 nm ist ein Maß für die Bakterienkonzentration in einer Lösung/Medium. Sie wird bei 600 nm photometrisch bestimmt (Multiskan® Spectrum, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Als Referenz wird eine 0,9 %ige Salinelösung verwendet. Es können nur Proben bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6 gemessen werden, bei Überschreitung dieses Werts müssen die Proben mit der 0,9 %igen Salinelösung verdünnt werden.

### **B.1.4 Bestimmung der Biotrockenmasse**

Die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) erfolgt über eine Gewichts Differenz. Es wird 1 mL der Probe in ein trockenes 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, 5 min bei  $13.000 \cdot g$  zentrifugiert (Heraeus™ Biofuge™ pico; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet für mindestens 48 h bei  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  getrocknet und das Gewicht des Zellpellets bestimmt.

## **B.2 Zellaufschluss**

### **B.2.1 Mechanischer Zellaufschluss mittels Hochdruck-Homogenisator**

Die durch Zentrifugation geernteten Zellen werden in 15 mL Zellysispuffer pro Gramm Zellfeuchtmasse resuspendiert und per Hochdruck-Homogenisator (M-110 L Microfluidizer® Processor, Microfluidics) bei 9000 psi in 10 Zyklen aufgeschlossen. Der Zellaufschluss findet auf Eis statt. Die aufgeschlossenen Zellen werden anschließend bei  $10.000 \cdot g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 20 min zentrifugiert (Heraeus™ Multifuge™ X3 FR, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und sterilfiltriert ( $0,2 \text{ }\mu\text{m}$  Porengröße). Die Proben werden bis zur weiteren Verwendung bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### **B.2.2 Enzymatischer Zellaufschluss mittels BugBuster® Reagenz**

Mit Hilfe dieser Methode werden kleine Mengen des Bakterienzellpellets aufgeschlossen. Die Zellen der Zellsuspension werden per Zentrifugation (Heraeus™ Fresco™ 21; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) geerntet, dabei wird das Probenvolumen so gewählt, dass das Zellpellet gelöst in 1 mL Puffer einer OD<sub>600</sub> von 4 entspricht (z.B. 1 mL Zellsuspension mit einer OD<sub>600</sub> von 4 oder 10 mL einer Zellsuspension mit einer OD<sub>600</sub> von 0,4). Nach der Zentrifugation wird der Überstand entfernt und das Zellpellet mit 0,2 mL BugBuster® Working Solution (Tabelle 17) versetzt. Der Ansatz wird für 60 min bei 28° C schüttelnd (600 rpm) im Temperaturschüttler (ThermoMixer® comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Um die löslichen Bestandteile von den unlöslichen zu trennen, wird der Ansatz für 25 min zentrifugiert (14.000 · g, 4° C). Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet in 100 µL H<sub>2</sub>O gelöst. Alle Fraktionen werden mit demselben Volumen mit SDS-Probenpuffer (Tabelle 17) versetzt und für die SDS-PAGE-Analyse vorbereitet.

### **B.3 Proteinaufreinigung mittels FPLC**

Die chromatographische Aufreinigung wird mit dem FPLC-System ÄKTA™ pure 25 L (GE Healthcare, Chigaco, USA) durchgeführt. Vor der chromatographischen Aufreinigung werden sowohl die Pufferlösungen als auch die Proteinlösung mittels Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm Porengröße) von Schwebstoffen befreit. Die Pufferlösungen werden zusätzlich noch mit Hilfe des Ultraschallbads (Sonorex Super RK 510 H, Bandelin electronic, Deutschland) entgast. Jeder Aufreinigungsschritt erfolgt gekühlt bei 4° C.

#### **B.3.1 Kationenaustauschchromatographie**

Bei der Kationenaustauschchromatographie (CEX) wird der MA Sartobind® S nano (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) mit einem Volumen von 3 mL oder der MA Sartobind® S75 (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) mit einem Volumen von

2,1 mL verwendet. Der MA wird mit 10 CV CEX Bindepuffer (BP) und einer Flussrate von  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  äquilibriert. Mit einer Flussrate von  $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  wird der MA mit der Proteinlösung beladen. Darauf findet ein Waschschriff mit 15 CV BP und einer Flussrate von  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  statt. Die Elution mit dem CEX Elutionspuffer (EP) findet in drei Stufen 15 %, 30 % und 50 % EP statt, welches einer NaCl-Konzentration von 300 mM, 600 mM und 1 M entspricht. Jede Stufe besteht auf 20 CV und die gesamte Elution wird mit einer Flussrate von  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  durchgeführt. Das Protein bFGF eluiert in der zweiten Stufe bei einer NaCl-Konzentration von 600 mM. Der MA wird anschließend mit 1 M NaOH gespült (50 CV,  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) und zur Vorbereitung auf den nächsten Chromatographielauf mit BP (10 CV,  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) äquilibriert. Die Elutionsfraktionen werden per SDS-PAGE untersucht, die bFGF enthaltenen Fraktionen vereint und die Proteinkonzentration per Bradford-Test bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wird das Protein auf Eis gelagert.

### **B.3.2 Heparin-Affinitätschromatographie**

Bei diesem Aufreinigungsschritt wird die Heparin-Affinitätschromatographiesäule HiTrap<sup>TM</sup> HP Heparin (GE Healthcare, Chicago, USA) mit einem Säulenvolumen von 1 mL oder 5 mL verwendet. Die Säule wird mit 10 CV BP und einer Flussrate von  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  äquilibriert. Die vereinigten Elutionsfraktionen aus dem vorherigen Aufreinigungsschritt können direkt auf die Säule gegeben werden (Flussrate:  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Die Säule wird mit 20 CV BP und einer Flussrate von  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  gespült. Die Elution erfolgt mit einem Gradienten von 0 auf 100 % EP über 10 CV und ebenfalls einer Flussrate von  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Das Protein bFGF eluiert bei einer NaCl-Konzentration von 1,7 M. Die Säule wird mit BP für den nächsten Chromatographielauf (10 CV,  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) äquilibriert. Die Elutionsfraktionen werden per SDS-PAGE untersucht, die bFGF enthaltenen Fraktionen vereint und die Proteinkonzentration per Bradford-Test bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wird das Protein bei  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### B.3.3 Alternative Aufarbeitungsmethoden

Die Aufreinigung des bFGF ohne tierischen Ursprung umfasst folgende Säulen- und Membran-chromatographische Methoden:

Tabelle 25: Auflistung der verwendeten Membranadsorber und Chromatographiesäulen ohne tierische Komponenten.

Stationäre Phase	Bezeichnung (CV)	Hersteller, Ort
Membranadsorber (1)	Prototyp B (1 mL)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Membranadsorber (2)	Prototyp C (1 mL)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Membranadsorber (3)	Prototyp D (1 mL)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Membranadsorber (4)	Prototyp E (1 mL)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Membranadsorber (5)	Sartobind® Sulfatierte Cellulose (SUCA) (3 mL)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Chromatographiesäule (1)	Capto™ DeVirS, 4,7 mL	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA
Chromatographiesäule (2)	Foresight™ Nuvia™ cPrime™, 1 mL	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Chromatographiesäule (3)	HiTrap™ Capto™ MMC, 1 mL	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA

Diese chromatographischen Methoden unterliegen demselben Protokoll wie die Heparin-Affinitätschromatographie (B.3.2) nur mit den der Säulenchromatographie/MA entsprechenden Binde- bzw. Elutionspuffer. Zusätzlich besitzen die alternativen Säulen- und Membran-chromatographischen Methoden CIP-Schritte (Herstellerangaben).

Tabelle 26: CIP-Schritte der verschiedenen Säulen und Membranadsorber.

Säule/Membranadsorber	CIP-Schritt
Sartobind® Sulfatierte Cellulose (SUCA) (3 mL)	1 M NaOH; 10 CV; 10 mL · min <sup>-1</sup>
Capto™ DeVirS, 4,7 mL	0,1 M NaOH; 20 CV; 1 mL · min <sup>-1</sup> 1 M NaOH; 20 CV; 1 mL · min <sup>-1</sup>
Prototypen B bis E	1 M NaOH; 30 CV; 1 mL · min <sup>-1</sup>
Foresight™ Nuvia™ cPrime™, 1 mL	0,1 M NaOH; 6 CV; 1 mL · min <sup>-1</sup> 1 M NaCl; 6 CV; 1 mL · min <sup>-1</sup> 1 M NaOH; 6 CV; 1 mL · min <sup>-1</sup>
HiTrap™ Capto™ MMC, 1 mL	1 M NaOH; 10 CV; 1 mL · min <sup>-1</sup>



### B.3.4 Umpuffern/Entsalzen des Proteins

Das Protein bFGF wird für die Anionenaustauschchromatographie (AEX) und die Gefriertrocknung in AEX Bindepuffer (AEX BP) umgepuffert. Dies wird mit Hilfe der HiPrep™ 26/10 Desalting Säule (GE Healthcare, Chicago, USA) mit einem Säulenvolumen von 53 mL durchgeführt. Die Säule wird mit AEX BP mit 5 CV und  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  äquilibriert. Die Probe kann direkt mit unveränderter Flussrate auf die Säule gegeben werden. Darauf wird weiter mit AEX BP gespült (2 CV,  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Bei dieser Art der Chromatographie eluieren die großen Moleküle (z.B. bFGF) schneller, wohingegen die kleineren Moleküle (z.B. NaCl) von dem Säulenmaterial zurückgehalten werden und eine höhere Retentionszeit haben. So werden NaCl und bFGF voneinander separiert und gleichzeitig das Protein in den AEX BP überführt. Die Säule wird mit AEX BP für den nächsten Chromatographielauf (3 CV,  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) äquilibriert. Die Elutionsfraktionen werden per SDS-PAGE untersucht, die bFGF enthaltenen Fraktionen vereint und die Proteinkonzentration per Bradford-Test bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wird das Protein auf Eis gelagert.

### B.3.5 Anionenaustauschchromatographie

Die AEX ist der Polishing-Schritt der Aufreinigung und dient dem Entfernen von Endotoxinen und DNA-Resten in der Probe. Es wird der MA Sartobind® Q75 (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) mit einem Volumen von 2,1 mL verwendet. Das Prinzip der Aufreinigung beruht hierbei nicht auf dem Bind-and-Elute Prinzip. Das Protein bFGF liegt positiv geladen vor und interagiert somit nicht an den negativ geladenen MA, sondern eluiert direkt. Die negativ geladenen Endotoxine oder DNA-Reste in der Probe wechselwirken mit dem MA und können dadurch vom bFGF getrennt werden. Vor der Chromatographie wird das FPLC-System mit 25 CV AEX Waschlösung 1 (AEX W1) mit einer Flussrate von  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  gespült. Anschließend wird erst der MA installiert und zuerst mit 5 CV AEX W2 gespült und anschließend

mit 15 CV AEX BP äquilibriert. Die Flussrate hierbei beträgt  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Die vereinten Proteinproben werden direkt mit unveränderter Flussrate auf den Membranadsorber gegeben. Darauf wird weiter mit AEX BP gespült (5 CV,  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Das Protein bFGF eluiert sofort, wohingegen die Endotoxine/DNA-Reste mit dem MA wechselwirken. Diese werden durch Waschen mit AEX W2 von der Membran gewaschen. Die Elutionsfraktionen werden per SDS-PAGE untersucht, die bFGF enthaltenen Fraktionen vereint und die Proteinkonzentration per Bradford-Test bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wird das Protein bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### **B.4 Weiterverarbeitung des Proteins**

#### **B.4.1 Gefriertrocknung**

Die Gefriertrocknung wird mit der Gefriertrocknungsanlage (Alpha 1-4 LCS, Martin Christ Gefiertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland) durchgeführt. Zur Vorbereitung wird die Proteinlösung mit Hilfe eines Zentrifugalkonzentrators (VivaSpin 20, MWCO 3000 Da, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) auf eine Konzentration von  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  aufkonzentriert, mit 1/10 Volumen (v/v) mit einer 20 %igen Saccharose-Lösung versetzt, sterilfiltriert ( $0,2 \text{ }\mu\text{m}$  Porengröße) und für 48 h bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren. Die Gefriertrocknung wird bei einer Proben temperatur von weniger als  $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ , einer Kondensationstemperatur von  $-60 \text{ }^\circ\text{C}$  und einem Vakuum von 0,12 mbar für 24 h bis 36 h durchgeführt. Die gefriergetrockneten Proben werden unter normalatmosphärischen Bedingungen verschlossen und bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **B.5 Proteinanalytik**

#### **B.5.1 SDS-PAGE-Analyse**

Es wird eine diskontinuierliche Gelelektrophorese mit 15 %igem Trenngel und 6 %igem Sammelgel (Tabelle 19) durchgeführt. Hierfür werden mit dem Mini-Protein®

Tetra Handcast System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) Gele mit gewünschtem Vernetzungsgrad gemäß Abschnitt A.1.4 Tabelle 19 vorbereitet. Die Proteinproben werden mit demselben Volumen an SDS-Probenpuffer (Tabelle 17) versetzt und für 10 min bei 96 °C (ThermoMixer® comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) aufgeköcht. Zum Abtrennen von unlöslichen und ausgefallenen Feststoffen werden die Proben noch 5 min bei  $10.000 \cdot g$  (Heraeus™ Fresco™ 21; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zentrifugiert. In die Geltaschen werden 5  $\mu\text{L}$  des Proteinstandards oder 10  $\mu\text{l}$  der Proteinprobe gegeben. Für den Gellauf werden die Gele in die Elektrophoresemodul-Einsätze eingespannt und mit 1x TGS gefüllt. Dieses Modul wird in die Vorrichtung des Laufkammertanks gestellt und dieser ebenfalls mit 1x TGS aufgefüllt. An die Apparatur wird zuerst eine Spannung von 60 V für 30 min, dann 150 V für 60 min angelegt. Nach dem Gellauf werden die Proteine mittels kolloidaler Coomassie-Färbung (s. B.5.2) gefärbt.

### **B.5.2 Kolloidale Coomassie-Färbung**

Nach dem Gellauf der SDS-PAGE folgt die Anfärbung der Proteine im Gel per kolloidalem Coomassie. Das Gel wird zuerst in der Fixierlösung inkubiert (30 min, schüttelnd, Tabelle 20), darauf dreimal mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und über Nacht in der Coomassie-Färbelösung (Tabelle 20) inkubiert. Die Färbelösung wird fachgerecht entsorgt und das Gel bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes in  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und daraufhin für die weitere Auswertung eingescannt.

### **B.5.3 Densitometrische Auswertung**

Für die densitometrische Auswertung der Gele wird die Software GelAnalyzer verwendet. Die eingescannten Gele werden in das Programm importiert und die Laufstrecken der einzelnen Proben markiert. Anhand der Intensität der bFGF-Bande im Vergleich zu den restlichen Proteinbanden im Gel wird auf den prozentualen Anteil und somit auf die Reinheit des bFGF geschlossen.

#### **B.5.4 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode zur Bestimmung der Gesamteinkonzentration. Der Test findet in einer 96-Well-Platte statt und wird mit dem Multititerplatten-Spektrophotometer (Multiskan™ GO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Es werden 10 µL der Proteinprobe mit 240 µL Bradfordreagenz gemischt und für 10 min bei Dunkelheit inkubiert. Darauf wird der Ansatz 30 s geschüttelt und die Absorption bei 595 nm und 470 nm gemessen. Die Absorption bei 595 nm gibt Auskunft über die Komplexbildung von Farbstoff und Protein, die Absorption bei 470 nm über die Menge an ungebundenen Farbstoff. Die beiden Werte werden ins Verhältnis gesetzt (Absorption bei 595 nm/Absorption bei 470 nm) und sind ein Maß für die Proteinkonzentration. Je höher der Wert, desto höher ist die Proteinkonzentration. Zusätzlich zu den zu bestimmenden Proteinproben wird eine BSA-Standardreihe (1000, 750, 500, 250, 125, 100, 75, 50, 25, 10 und 0 µg · mL<sup>-1</sup> BSA) vermessen. Aus dieser lässt sich eine Kalibrationsgerade mit einer Gleichung ermitteln, die zur Bestimmung der Proteinkonzentration der vermessenen Proben verwendet wird.

#### **B.5.5 Bestimmung des Proteasekonzentration**

Mit Hilfe des Protease Assay Kits von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) wurde die Proteaseaktivität über eine Fluoreszenz-Resonanzenergietransfermessung (FRET) bestimmt. Als Proteasen oder auch Peptidasen werden Enzyme bezeichnet, die Proteine oder Peptide spalten können. Sie katalysieren dabei die Hydrolyse der Peptidbindungen. Für den Protease Assay wird Fluoreszenz-markiertes Casein (FTC-Casein) als Substrat zur Beurteilung der Proteaseaktivität verwendet. Das FTC-Casein ist ein natives Casein, welches mit einem großen molaren Überschuss an Fluoresceinisothiocyanat markiert wurde. Während des Abbaus durch die Proteasen ver-

ändern sich die Fluoreszenzeigenschaften des intakten sowie schwer markierten Proteinsubstrats sehr stark, was zu einem messbaren Indiz für eine Proteolyse führt. Die Messungen wurden mit Hilfe des Spektralphotometers F-7000 der Firma HITACHI durchgeführt.

### **B.5.6 Bestimmung der Endotoxinkonzentration**

Zur Bestimmung des Endotoxingehalts in der Probe wird der Limulus-Amöbozyten-Lysat Test (LAL) mit dem Endosafe®-PTS™-System (Charles River Laboratories) durchgeführt. In endotoxinfreiem Wasser werden die Proben angesetzt bzw. verdünnt. Die verwendeten Endotoxin-Kartuschen können eine Endotoxinkonzentration zwischen  $0,1-10 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$  detektieren.

### **B.5.7 Thermal Shift Assay (TSA)**

Mit Hilfe des TSA werden Schmelzkurven von Proteinproben bestimmt, welche als Maß für die Stabilität des Proteins dienen. Der Test wird in einer PCR-Platte durchgeführt. Es werden pro Well  $22,5 \mu\text{L}$  Protein mit einer Konzentration von  $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  benötigt. Für die Reaktion wird das Protein mit dem Farbstoff Syrho® Orange erhitzt. Dieser Farbstoff liegt in einer 5000x Konzentration vor. Für den Test wird nur eine 5x Konzentration benötigt. Aufgrund des Verdünnungseffekts (1:10) mit der Proteinprobe, wird mit DNase- und RNase-freiem Wasser eine 50x Konzentration des Proteinfarbstoffs hergestellt. Pro Well werden  $2,5 \mu\text{L}$  des Farbstoffs benötigt. Der Test wird mit dem Real-time PCR System iQ™-5 und der Software iQ™-5 Optical System Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules) durchgeführt. Die Fluoreszenz wird mit einem SYBR Green Filter erfasst und die Temperatur von  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  alle 38 s um  $1 \text{ }^\circ\text{C}$  erhöht bis eine Temperatur von  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  erreicht wird.

### **B.5.8 Zellkulturtechniken**

Alle genutzten Materialien werden autoklaviert, außer sie wurden bereits steril geliefert. Dies gilt ebenfalls für die verwendeten Lösungen, diese werden autoklaviert oder sterilfiltriert, sollte ein Autoklavieren wegen der darin befindlichen Inhaltsstoffe nicht möglich sein. Die Fibroblasten-Zellen NIH-3T3 werden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Kultivierung erfolgt in Dublecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), wobei zwischen dem vollsupplementiertem Medium (DMEM mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % Fetalen Kälberserum (FCS)) und reduziertem Medium (DMEM mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % FCS) zu unterscheiden ist.

#### **Zellpräservation**

Für die Kryokonservierung wird ein Tag zuvor das vollsupplementierte Medium gewechselt und die Zellen sollten zu 80-90 % konfluent sein. Zur Vorbereitung wird der Gefrierbehälter bis zur Markierung mit Isopropanol gefüllt und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Entsprechend des Protokolls werden die Zellen zum Passagieren trypsinisiert und gezählt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt (300 · g, 3 min). Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in dem entsprechenden Volumen an Kryomedium (Tabelle 18) resuspendiert. Die Zellsuspension wird in 1 mL Fraktionen auf die Kryoröhren überführt und über Nacht bei -80 °C eingefroren. Darauf werden die Kryoröhren in den Kryotank mit flüssigem Stickstoff überführt.

#### **Revitalisierung und Zellexpansion**

Für die Zellrevitalisierung werden die NIH-3T3 aus dem Kryobehälter genommen und im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. 0,5 mL der Zellsuspension werden in einer T175 Zellkulturflasche mit 24 mL vollsupplementiertem DMEM versetzt und für 5 Tage bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die adhärenierten Zellen werden mit 10 mL PBS gewaschen und durch eine Inkubation (5 min, 37 °C) mit

4 mL Trypsin vom Flaschenboden gelöst. Die gelösten Zellen werden in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei  $300 \cdot g$  zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in 3 mL vollsupplementiertem DMEM resuspendiert. 20  $\mu$ L der Zellsuspension werden zum gleichen Anteil mit Trypanblau (0,4 %) versetzt und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellsuspension wird weiter für den bFGF-Bioaktivitätstest verwendet.

### **bFGF-Bioaktivitätstest**

Für den bFGF-Bioaktivitätstest wird in jedes Well einer 96-Well-Platte 100  $\mu$ L vollsupplementiertes DMEM (Tabelle 18) mit NIH-3T3 (Tabelle 22) in einer Dichte von 4000 Zellen gegeben und diese für 24 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wird durch 100  $\mu$ L reduziertem Medium (Tabelle 18) ersetzt und die Zellen erneut unter denselben Bedingungen für 24 h inkubiert. Das Medium wird abgesaugt und durch 100  $\mu$ L reduziertem Medium mit verschiedenen Konzentrationen an bFGF ersetzt und für 72 h kultiviert. Im Anschluss folgt der Cell-Titer-Blue-Assay.

### **CellTiter-Blue-Assay (CTB-Assay)**

Mit Hilfe des CTB-Assays wird die Zellviabilität kontrolliert. Dieser Test basiert auf der Reaktion des Farbstoffs Resazurin, der bei Reduktion durch das zelluläre Redoxsystem vom blauen nicht-fluoreszierenden Farbstoffs zum pink fluoreszierenden Resorufin wird. Dies gilt als Maß für die metabolische Aktivität lebender Zellen und somit für die Zellviabilität. Als Maß der metabolischen Aktivität wird das Fluoreszenzsignal gesehen. Der Aktivitätstest wird in einer 96-Well-Platte durchgeführt und in jedes Well 10 % (v/v) die Cell-Titer-Blue-Reagenz gegeben. Darauf wird der Ansatz für 2 h bei 38 °C und in Dunkelheit inkubiert. Das Fluoreszenzsignal wird bei einer Exzitation von 544 nm und einer Emission von 590 nm ermittelt.

## C Zusätzliche Ergebnisse

### C.1 Stabilitätstests bFGF

#### C.1.1 Entwicklung des Stabilitätstests

Tabelle 27: Ergebnisse des Thermal Shift Assays. Es sind die einzelnen Sypro® Orange Konzentrationen gegen die bFGF-Konzentrationen mit den Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) dargestellt.

<b>Sypro® Orange Konzentration 20x</b>		<b>Sypro® Orange Konzentration 2,5x</b>	
bFGF-Konzentration [ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ]	$T_m$ [ $^{\circ}\text{C}$ ]	bFGF-Konzentration [ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ]	$T_m$ [ $^{\circ}\text{C}$ ]
500	52	500	51
250	52	250	53
125	52	125	55
62,5	51	62,5	52
31,25	52	31,25	52
15,625	52	15,625	53
<b>Sypro® Orange Konzentration 10x</b>		<b>Sypro® Orange Konzentration 1,25x</b>	
bFGF-Konzentration [ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ]	$T_m$ [ $^{\circ}\text{C}$ ]	bFGF-Konzentration [ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ]	$T_m$ [ $^{\circ}\text{C}$ ]
500	52	500	51
250	53	250	53
125	53	125	55
62,5	52	62,5	53
31,25	52	31,25	53
15,625	52	15,625	52
<b>Sypro® Orange Konzentration 5x</b>			
bFGF-Konzentration [ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ]	$T_m$ [ $^{\circ}\text{C}$ ]		
500	51		
250	53		
125	55		
62,5	51		
31,25	55		
15,625	52		



## D Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kristallstruktur des bFGF nach PDB:4OEE mit PyMol dargestellt. Die $\beta$ -Faltblätter sind hellgrün hinterlegt.....	4
Abbildung 2: Struktureller Aufbau des Heparins.....	6
Abbildung 3: Strukturformel des Liganden der Foresight <sup>TM</sup> Nuvia <sup>TM</sup> cPrime <sup>TM</sup> von Bio-Rad Laboratories. Adaptiert nach [85].....	14
Abbildung 4: Strukturformel des Liganden HiTrap <sup>TM</sup> Capto <sup>TM</sup> MMC von GE Healthcare Life Sciences.....	15
Abbildung 5: Strukturformel des Liganden der pseudo-Affinitätschromatographie SUCA der Sartorius AG, Göttingen, Deutschland.....	17
Abbildung 6: Strukturformel der Capto <sup>TM</sup> DeVirS von GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA.....	17
Abbildung 7: Expressionsvektor zur Produktion des Wachstumsfaktors bFGF.....	21
Abbildung 8: Daten der Rührkesselreaktorkultivierung von <i>E. coli</i> zur Proteinexpression von bFGF.....	22
Abbildung 9: SDS-PAGE-Analyse der Reaktorkultivierung zur Proteinexpression von bFGF.....	23
Abbildung 10: Schematische Darstellung des etablierten Aufreinigungsverfahrens des bFGF.....	25
Abbildung 11: Aufreinigung des bFGF per CEX MA. ....	26
Abbildung 12: Aufreinigung des bFGF per Heparin-Affinitätschromatographie. ....	27
Abbildung 13: Schematische Darstellung der chromatographischen Methoden zur Aufreinigung des löslichen bFGF aus dem Zellüberstand.....	31
Abbildung 14: Aufreinigung des bFGF aus dem Zellüberstand per Heparin-Affinitätschromatographie (HiTrap <sup>TM</sup> Heparin HP, 1 mL, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA). ....	35

Abbildung 15: Aufreinigung des bFGF aus dem Zellüberstand per CEX (Sartobind® S 75, 2,1 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland).....	36
Abbildung 16: Aufreinigung des bFGF aus dem Zellüberstand per MMC. Dargestellt sind die FPLC-Chromatogramme der einzelnen Aufreinigungsmethoden. ....	38
Abbildung 17: SDS-PAGE-Analysen der Aufreinigung des bFGF aus dem Zellüberstand per MMC. Hervorgehoben sind die Banden des bFGF bei 18 kDa.....	40
Abbildung 18: Aufreinigung des bFGF aus dem Zellüberstand per Pseudo-Affinitätschromatographie (Sartobind® Sulfatierte Cellulose, 3 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland).....	42
Abbildung 19: Aufreinigung des bFGF aus dem Zellüberstand per Pseudo-Affinitätschromatographie (Capto™ DeVirS, 4,7 mL, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA). ....	43
Abbildung 20: Ergebnisse der Aufreinigung des bFGF aus dem Überstand nach dem Zellaufschluss.....	45
Abbildung 21: Aufreinigung des bFGF aus dem Zellüberstand per zwei in Reihe geschalteter CEX (Sartobind® nano, 3 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). ....	47
Abbildung 22: Aufreinigung des bFGF nach vorherigem CEX-Schritt per Heparin-Affinitätschromatographie (HiTrap™ Heparin HP, 1 mL, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA). ....	48
Abbildung 23: Aufreinigung des bFGF nach vorherigem CEX-Schritt per MMC (Foresight™ Nuvia™ cPrime™, 1 mL, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).....	49
Abbildung 24: Aufreinigung des bFGF nach vorherigem CEX-Schritt per MMC (HiTrap™ Capto™ MMC, 1 mL, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA). ....	50
Abbildung 25: Aufreinigung des bFGF nach der CEX per Mixed-Mode-Chromatographie. Es sind die FPLC-Chromatogramme der verschiedenen Prototypen dargestellt.....	51

Abbildung 26: SDS-PAGE-Analysen der Aufreinigung des bFGF nach vorherigem CEX-Schritt per MMC MA. ....	52
Abbildung 27: Aufreinigung des bFGF nach vorherigem CEX-Schritt per Pseudo-Affinitätschromatographie (Sartobind® Sulfatierte Cellulose, 3 mL, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland).....	53
Abbildung 28: Aufreinigung des bFGF nach vorherigem CEX-Schritt per Pseudo-Affinitätschromatographie (Capto™ DeVirS, 4,7 mL, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA). ....	54
Abbildung 29. Ergebnisse der Aufreinigung des bFGF nach vorherigem CEX-Schritt. ....	55
Abbildung 30: FPLC-Chromatogramme der Aufreinigung des bFGF per HiTrap™ Capto™ MMC (1 mL, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA) nach vorherigem CEX-Schritt. ....	58
Abbildung 31: SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung des bFGF per HiTrap™ Capto™ MMC (1 mL, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA) nach vorherigem CEX-Schritt. ....	59
Abbildung 32: FPLC-Chromatogramme der Aufreinigung des bFGF per Foresight™ Nuvia™ cPrime™ (1 mL, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) nach vorherigem CEX-Schritt. ....	60
Abbildung 33: SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung des bFGF per Foresight™ Nuvia™ cPrime™ (1 mL, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) nach vorherigem CEX-Schritt. ....	61
Abbildung 34: Ergebnisse des Thermal Shift Assays.....	64
Abbildung 35: Geometrisches Modell für eine statistische Versuchsplanung mit zwei Faktoren.....	67
Abbildung 36: Ergebnisse des DoE als Response Contour Plot.....	70

Abbildung 37: Die Fibroblasten NIH-3T3 während der Kultivierung in reduziertem Medium (A) und mit $320 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ bFGF (B).....	72
Abbildung 38: Konzentrations-Wirkungs-Kurven des bFGF.....	73
Abbildung 39: Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit logarithmisch aufgetragener bFGF-Konzentration.....	75

## E Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste verschiedener Heparin-bindender Proteine [29].....	5
Tabelle 2: Eigenschaften der Heparin-Protein-Bindung [29].....	8
Tabelle 3: Gegenüberstellung biospezifischer und pseudo-biospezifischer Liganden. .	16
Tabelle 4: Säulen- und Membran-chromatographische Methoden zur Aufreinigung des bFGF.....	32
Tabelle 5: Ergebnisse der Aufreinigung des bFGF aus dem Zellüberstand per MMC durch die Angabe der Proteinreinheit, Wiederfindungsrate und Ausbeute in [%] mit Standardabweichungen.....	41
Tabelle 6: Vergleich der MA Sartobind® S 75 und Sartobind® S nano [106,107]. ....	46
Tabelle 7: Auflistung der Farbstoff- und Protein-Konzentrationen mit den Ergebnissen der höchsten Schmelztemperatur (T <sub>m</sub> ), die im Wendepunkt der Schmelzkurve ermittelt wurde. Markiert sind die Konzentrationen von Sypro® Orange und bFGF, die für die weiteren Versuche verwendet wurden.....	65
Tabelle 8: Getestete Puffersysteme mit ihrem Pufferbereich.....	66
Tabelle 9: Ergebnisse der statistischen Versuchsplanung. ....	68
Tabelle 10: Ergebnisse des TSA mit den verschiedenen Additiven. ....	69
Tabelle 11: Ergebnisse des Bioaktivitätstests. ....	76
Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	96
Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Laborgeräte .....	97
Tabelle 15: Auflistung der verwendeten Chemikalien.....	99
Tabelle 16: Auflistung der verwendeten Antibiotika-Stammlösungen. ....	100
Tabelle 17: Auflistung sonstiger Reagenzien.....	101
Tabelle 18: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen. ....	101
Tabelle 19: Auflistung der verwendeten Medien.....	102
Tabelle 20: Auflistung der verwendeten Gellösungen. ....	103
Tabelle 21: Auflistung der verwendeten Färbelösungen.....	104

Tabelle 22: Auflistung der verwendeten Vektoren.....	104
Tabelle 23: Auflistung der verwendeten Zellen.....	104
Tabelle 24: Auflistung der verwendeten Reaktionskits.....	104
Tabelle 25: Auflistung der verwendeten Software.....	104
Tabelle 26: Auflistung der verwendeten Membranadsorber und Chromatographie- säulen ohne tierische Komponenten.....	110
Tabelle 27: CIP-Schritte der verschiedenen Säulen und Membranadsorber.....	110
Tabelle 28: Ergebnisse des Thermal Shift Assays. Es sind die einzelnen Sypro® Orange Konzentrationen gegen die bFGF-Konzentrationen mit den Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) dargestellt.....	118

## F Unterstützende Arbeiten

In der vorliegenden Dissertation wurden Teile der praktischen Arbeiten in folgenden studentischen Abschlussarbeiten nach Planung und in Zusammenarbeit des Autors dieser Dissertation durchgeführt.

Jannis Renzelmann

- Bachelorarbeitstitel: Alternative Aufarbeitung des FGF-2 mittels Mixed-Mode-Chromatographie
- Bearbeitungszeitraum: 30.08.2018 – 01.11.2018
- Teilergebnisse in Kapitel 3.5

Anne-Sophie Knoll

- Bachelorarbeitstitel: Vergleich verschiedener chromatographischer Methoden zur Aufreinigung des Fibroblasten-Wachstumsfaktors FGF-2.
- Bearbeitungszeitraum: 10.04.2019 – 12.06.2019
- Teilergebnisse in Kapitel 2.3

An den praktischen Arbeiten der Bioassays (Kapitel 3.6) waren neben der Autorin dieser Dissertation auch Dr. Antonina Lavrentieva beteiligt. Diese Arbeiten wurden teilweise gemeinsam durchgeführt.

## G Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Svenja Nicolin Bolten  
Geburtsdatum und – ort: 29.01.1990 in Hannover  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Studium

2016 – 2020 Promotionsstudium: Chemie an der Leibniz Universität  
Hannover am Institut für Technische Chemie  
Abschluss: Doktor der Naturwissenschaften

2013 – 2015 Masterstudium: Life Science an der Leibniz Universität  
Hannover  
Abschluss: Master of Science

2010 – 2013 Bachelorstudium: Life Science an der Leibniz Universität  
Hannover  
Abschluss: Bachelor of Science

### Schulbildung

2002 – 2009 Besuch des Viktoria-Luise Gymnasiums in Hameln  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife



## H Publikationen und Konferenzbeiträge

### Journal Publikationen

Svenja Nicolin Bolten (85 %), Anne-Sophie Knoll, Pia Gellermann, Illiyana Pepelanova, Ursula Rinas, Thomas Scheper: Purification of fibroblast growth factor 2 using novel animal-component free systems, in Vorbereitung

Tracy Kurth, Sandra Witt, Svenja Bolten (10 %), Janice-Joy Waniek, Carlotta Kortmann, Antonina Lavrentieva, Thomas Scheper, Johanna-Gabriela Walter: Development of aptamer-based TID assays using thermophoresis and microarrays, *Biosensors (2019) 9(4):124*, *Research Article*. DOI: 10.3390/bios9040124

Pia Gellermann, Caroline Schneider-Barthold, Svenja Nicolin Bolten (10 %), Ethan Overfelt, Thomas Scheper, Illiyana Pepelanova: Production of a Recombinant Non-Hydroxylated Gelatin Mimetic in *Pichia pastoris* for Biomedical Applications, *Journal of Functional Biomaterials (2019) 10(3), 39*, *Research Article*. DOI: 10.3390/jfb10030039

Ruth Olmer, Lena Engels, Abdulai Usman, Sandra Menke, Muhammad Nasir Hayat Malik, Frank Pessler, Gudrun Göring, Dorothee Bornhorst, Svenja Bolten (2,5 %), Salim Abdelilah-Seyfried, Thomas Scheper, Henning Kempf, Robert Zweigerdt, Ulrich Martin: Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Functional Endothelial Cells in Scalable Suspension Culture, *Stem Cell Reports (2018) 10(5):1657-1672*, *Research Article*. DOI: 10.1016/j.stemcr.2018.03.017

Svenja Nicolin Bolten (90 %), Ursula Rinas, Thomas Scheper: Heparin: role in protein purification and substitution with animal-component free material, *Applied Microbiology and Biotechnology (2018) 102:8647*, *Review*. DOI: 10.1007/s00253-018-9263-3

Maren Lönne, Svenja Bolten (15 %), Frank Stahl, Thomas Scheper, Johanna-Gabriela Walter: Development of an Aptamer-based Affinity Purification Method for Vascular Endothelial Growth Factor, *Biotechnology Reports (2015) 8:16-23*, *Research Article*. DOI: 10.1016/j.btre.2015.08.006

### Internationale Konferenzvorträge

Svenja Nicolin Bolten (95 %), Ursula Rinas, Thomas Scheper: Animal-component free chromatography methods for the purification of cytokines, *International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynucleotides (ISPPP), Berlin (11/2018)*

### **Posterkurzvortrag und Poster**

Svenja Nicolin Bolten (95 %), Ursula Rinas, Thomas Scheper: Tierfreie chromatographische Methoden zur Aufarbeitung von Zytokinen, *ProcessNet-Jahrestagung und 33. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen (09/2018)*

### **Vorträge auf internationalen PhD-Seminaren**

Svenja Nicolin Bolten (95 %), Ursula Rinas, Thomas Scheper: Substitution of heparin for purification of cytokines, *Seminar on Chromatographic Separation Science (SoCSS), Quedlinburg (02/2019)*

Svenja Nicolin Bolten (95 %), Ursula Rinas, Thomas Scheper: Animal-component free chromatography methods for the purification of cytokines, *SoCSS, Burghausen (02/2018)*