

Projektabschlussbericht

Innovatives Baukastensystem zum integrierten Downstreamprocessing von Pharmatargets auf der Basis modularer Membranadsorbertechnologie

DBU/ICBio-Az. 13099

Antragsteller:

Prof. Dr. Thomas Scheper¹, Prof. Dr. Roland Ulber²

¹Institut für Technische Chemie der Universität Hannover (kurz TCI)

²AG Bioverfahrenstechnik an der Technischen Universität Kaiserslautern

Industriepartner:

1.

Dr. Oscar-Werner Reif

Fa. Sartorius AG (kurz Sartorius)

2.

Dr. Alexander Loa

Fa. Cell Culture Service GmbH (kurz CCS)

Berichtszeitraum:

01. August 2003 – 30. September 2005



Az	13099	Referat	32	Fördersumme	242.914 €
----	--------------	---------	-----------	-------------	------------------

Antragstitel **Förderschwerpunkt Biotechnologie: ICBio: Innovatives Baukastensystem zum integrierten Downstream-Processing von Pharmatargets auf der Basis modularer Membranadsorbertechnologie**

Stichworte Schwerpunkt-Biotechnologie , Downstreamprocessing , Umweltchemikalien , Mikrobiologie , Verfahren

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
2 Jahre	01.08.2003	30.09.2005	2

Zwischenberichte nach 18 Monaten

Bewilligungsempfänger	Universität Hannover Institut für Technische Chemie Callinstr. 3 30167 Hannover	Tel	0511/7622509
		Fax	0511/7623004
		Projektleitung Prof. Dr. Scheper	
		Bearbeiter Dr. Sascha Beutel	

Kooperationspartner

- Sartorius AG, Göttingen (keine Fördermittel)
- Cell Culture Service GmbH, Hamburg

Zielsetzung und Anlass des Vorhabens

Isolierung und Aufreinigung von wertschöpfenden Proteinkomponenten aus Rohprodukten, wie Fermentationsbrühen, Blutseren oder Reaktionslösungen stellt heute eine der großen Herausforderungen im Bereich Downstreamprocessing biotechnologischer Pharmazeutika dar. Bis heute müssen die einzelnen energie- und abwasserintensiven Verfahrensschritte getrennt von einander durchgeführt werden. Das vorliegende Vorhaben zielt darauf ab, integrierte Systeme zu schaffen, die eine schnelle und gezielte Problemlösung vorliegender Trennaufgaben, Kopplung der Verfahrensschritte und einfache Handhabung ermöglichen sollen. Diese integrierten Systeme auf Basis von Membranadsorbentien werden in einem Baukastensystem verwirklicht, das eine flexible Anpassung an die jeweilige Problemstellung erlaubt und durch die Integration in modulare Kartuschensysteme eine hohe Scale-up-Fähigkeit aufweist.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Die praktischen Arbeiten beginnen mit der Konzeption und Entwicklung der Basis-membranen, wobei Derivatisierungstechniken zur Funktionalisierung der Membranen und Dekorationstechniken zur Bindung spezifischer Liganden verwendet werden. Diese Membranen werden dann in verschiedene Module (Kapsule) eingesetzt und anhand von Standardproteinen getestet. Die Übertragung der Ergebnisse auf Realmedien am speziellen Beispiel des r-hGH führt dann zu einer allgemeinen Methodik, die die Optimierung der Aufreinigungsparameter durch HTDS-Systeme (high throughput downstream screening) ermöglicht. Das System erlaubt eine schnelle und leicht zu handhabende Modellierung jedes Downstreamprocessing-Problems und vereinfacht somit das Upscaling in den Produktionsbereich erheblich, was anhand des Beispiels r-hGH verwirklicht werden soll.

Ergebnisse und Diskussion

Die im Rahmen des Projektes geplanten wissenschaftlichen Arbeiten wurden erfolgreich durchgeführt. Die Arbeitspakete, wie die Konzeption und Entwicklung bzw. die Funktionalisierung der Basismembranen so wie deren Einsatz und Testung in Modulen sind vollständig abgeschlossen. So liegen derzeit funktionsfähige Membranmodule im 8-er Streifen Format vor. Diese *8-strips* sind mit üblicherweise verwendeten 96-well-Mikrotiterplatten kompatibel und bilden die Basis für das HTDSS. Auch die verfahrenstechnischen Probleme (wie Prozessführung durch Unterdruck, Überdruck oder Zentrifugation) wurden intensiv bearbeitet. Das HTDS-System wurde an Standards und auch an Realproben getestet. Die Membranmodule kamen insbesondere bei der Aufreinigung von hGH aus dem Zellkulturüberstand zum Einsatz. Anstatt des kosten- und ressourcenintensiven herkömmlichen Verfahrens konnte so auf ein schnelles und einfaches Verfahren zurückgegriffen werden.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

2003, Dechema: Proteinaufreinigung durch Affinitätswechselwirkungen mittels Membranadsorbereinheiten; K. Kitzler, A. Tappe, F. Menzel, C. Kasper, N. Kashani-Poor, R. Zeidler, T. Scheper

2003, Gordon Conference "Bioinformatics: from predictive models to inference", Oxford; Enzyme purification from fermentation broth using membrane adsorber based centrifugal devices; C. Kasper, K. Suck, F. Stahl, R. Zeidler, T. Scheper

2004, Bioperspectives: Human growth hormone (hGH) purification from CHO cell culture supernatant using membrane adsorber based centrifugal devices; J. Walter, K. Suck, A. Tappe, C. Kasper, R. Zeidler, A. Kocourek, T. Scheper

2004, Dechema-Tagung "Simultane und integrierte Bioprozessentwicklung": (Bio-)modifizierte Membranmodule im Downstream-Processing; *Poster*: D. Harkensee, T. Scheper, O.-W. Reif, R. Ulber

2005, Bioperspectives: Purification of His₆-tagged β -Glucanase using membrane adsorber based devices; Ö. Kökpinar, J. Walter, C. Kasper, R. Zeidler, K. Friehs, T. Scheper

2005, Bioperspectives: Human growth hormone (hGH) purification from CHO-cell culture supernatant, *Poster*: A. Tappe, J. Walter, C. Kasper, R. Zeidler, O.-W. Reif, T. Scheper

2005, Bioperspectives: Reversible immobilisation of glycoproteins on biological activated membranes; *Vortrag*: D. Harkensee, S. Beutel, T. Scheper, O.-W. Reif, R. Ulber

2005, ESACT

Human growth hormone (hGH) purification from CHO-cell culture supernatant utilizing macroporous chromatographic media *Poster*: J. Walter, A. Tappe, C. Kasper, R. Zeidler, O.-W. Reif, T. Scheper

Veröffentlichungen:

Fast and efficient protein purification from complex cell culture samples using membrane adsorber systems; K. Suck, J. Walter, F. Menzel, A. Tappe, C. Kasper, C. Naumann, R. Zeidler, T. Scheper; Eingereicht bei *Journal of Biotechnology*

Fazit

Die im Projekt benannten Arbeitspakete wurden in der Projektlaufzeit von 2 Jahren, unter Berücksichtigung einer kostenneutralen Verlängerung aufgrund des um 2 Monate verzögerten internen Projektbeginns, bis auf das letzte Arbeitspaket vollständig abgeschlossen.

Das Vorhaben wird auch über die Projektlaufzeit hinaus weitergeführt: Das Up-scaling in den Produktionsbereich bei der Aufreinigung von hGH wird auch nach Ende des Projektes intensiv bearbeitet. Zur schnellen Ermittlung der optimalen Aufreinigungsparameter verschiedener Zielproteine wird das HTDS-System weiterhin verstärkt eingesetzt. Mit den im Bereich der Membranentwicklung gewonnenen Erkenntnissen werden auch in Zukunft weitere Funktionalisierungsversuche durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Bericht.....	2
2.1 Anlass und Zielsetzung des Projekts.....	2
2.2 Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden.....	5
2.2.1 Membranadsorber.....	5
2.2.2 Kultivierungen.....	7
2.3 Ergebnisse.....	9
2.3.1 AP 1: Konzeption und Entwicklung der Basismembran.....	9
2.3.2 AP 2: Entwicklung und Beschreibung der Module.....	10
2.3.3 AP 3: Entwicklung und Testung der funktionalisierten Membranmodule mit Modellsystemen.....	13
2.3.4 AP 4: Übertragung auf Realmedien am speziellen Beispiel Somatotropin.....	27
2.3.5 AP 5: Optimierung der Downstreambedingungen im HTDSS.....	33
2.3.6 AP 6 / AP 7: Modellierung des prozessintegrierten Downstreamprocessings.....	35
2.3.7 AP 8: Upscaling in den Produktionsbereich.....	36
2.4 Diskussion.....	36
2.5 Soll-/Ist-Vergleich.....	38
2.6 Öffentlichkeitsarbeit.....	39
2.7 Fazit.....	40
3. Literaturangaben.....	41

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: links: Vivapure spin columns; rechts: Vivawell 8-strips.....	6
Abbildung 2: Prinzip der Proteinaufreinigung über Membranadsorbereinheiten.....	7
Abbildung 3: Positionierung der 8-strips auf einer 96-well-Platte und Zentrifugation.....	10
Abbildung 4: Überdruckmodul, entwickelt am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover.....	11
Abbildung 5: Unterdruck-Modul, entwickelt von der Firma Vivascience AG.....	11
Abbildung 6: Screeningmodul, entwickelt von der Firma Vivascience AG.....	12
Abbildung 7: Verteilung der aufgegebenen Flüssigkeit innerhalb der Spinmoduls durch Zentrifugation.....	13
Abbildung 8: Testung verschiedener Puffersysteme zur Immobilisierung von Con A auf Epoxy-Membran.....	14
Abbildung 9: Gelelektrophorese für die Elutionsfraktionen für die Elution von Glucoseoxidase von Con A-Membranen; 12,5 %iges homogenes SDS-PAGE-Gel, Silber gefärbt.....	15
Abbildung 10: Reversible Immobilisierung von GOD an Con A-Epoxy-Membranen.....	16
Abbildung 11: Immobilisierung von Con A an IDA-Spinmodule und anschließende Bindung von GOD an Con A.....	18
Abbildung 12: Gelelektrophorese für die Immobilisierungs- und Elutionsfraktionen für die Bindung und Elution von GOD an Cu ²⁺ -IDA-Membranen, Coomassie-gefärbt.....	19
Abbildung 13: Gelelektrophorese für die Elutionsfraktionen für die Elution von Glucoseoxidase von Con A-IDA-Membranen; 12,5 %iges homogenes SDS-PAGE-Gel, Silber gefärbt.....	20
Abbildung 14: Reversible Bindung von GOD an Con A-IDA-Membranen.....	21
Abbildung 15: Beladung und Elution von Q- und S-Membranen mit BSA bzw. Lysozym.....	22
Abbildung 16: Durchbruchskurven für BSA und Lysozym auf Q bzw. S-Membranen.....	24
Abbildung 17: Aufreinigung von Bgl-His; 15 %-iges homogenes SDS-PAGE-Gel, Silber gefärbt.....	25
Abbildung 18: Aufreinigung von GFP-His; 15 %-iges homogenes SDS-PAGE-Gel,	

Silber gefärbt.....	26
Abbildung 19: Bindung und Elution von Anti-Fibrinogen an Protein A-Membran; 15 %-iges homogenes SDS-PAGE-Gel, Coomassie gefärbt.....	26
Abbildung 20: SDS-PAGE (15%), homogenes Gel mit Coomassie gefärbt.....	28
Abbildung 21: Bestimmung der Aktivität einer gereinigten hGH Probe im Vergleich zum WHO Standard mittels Nb2-11 Bio-Assay.....	30
Abbildung 22: Bestimmung der Aktivität einer weiteren gereinigten hGH Probe im Vergleich zum WHO Standard mittels Nb2-11 Bio-Assay.....	31
Abbildung 23: links: 15 %-iges homogenes SDS-PAGE-Gel; Coomassie gefärbt, Silber nachgefärbt; rechts: Westernblot, PVDF-Membran.....	32
Abbildung 24: Auftrennung des Proteingemischs über Ionenaustauscher bei pH 7,5; 15 %-iges homogenes SDS-PAGE-Gel, Coomassie gefärbt.....	34
Abbildung 25: Auftragung des Proteingemischs über IDA-Membran; 15 %-iges homogenes SDS-PAGE-Gel, Coomassie gefärbt.....	35

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mögliche Targetproteine für den Einsatz von Membranadsorbern im Bereich der pharmazeutischen Industrie.....	5
Tabelle 2: Membranen mit verschiedenen Funktionalitäten und ihre Anwendung.....	6
Tabelle 3: Technische Daten von Vivapure Mini spin columns und Vivawell 8-strips.....	7
Tabelle 4: Bindung von GOD an die mit verschiedenen Puffersystemen hergestellten Con A-Membranen.....	14
Tabelle 5: Bindungskapazitäten für die Immobilisierung von Concanavalin A an metallchelatisierenden Membranen. Die Beladung der Membranen erfolgt mit Cobalt, Kupfer, Nickel bzw. Zink.....	17
Tabelle 6: Bindungskapazitäten und Protein-Wiederfindungsraten für <i>Vivapure Mini spin columns</i>	23
Tabelle 7: Bindungskapazitäten und Wiederfindungsraten für <i>Vivawell 8-strips</i>	24

Abkürzungsverzeichnis

BCA	<i>Bicinchonic acid</i>
BSA	<i>Bovines Serum Albumin</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CM	C arboxymethyl
ddH ₂ O	Reinstwasser
DEAE	D iethylaminoethyl
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymimmunoassay (engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
EtOH	Ethanol
h	Stunde
hGH	<i>human Growth Hormone</i>
His	Histidin
HPLC	Hochleistungs- Flüssigkeitschromatographie (engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HSA	h umanes S erum A lbumin
IDA	Iminodiessigsäure (engl. <i>Iminodiacetic acid</i>)
IEX	Ionenaustauschchromatographie (engl. <i>ion exchange chromatography</i>)
IgG	Immunoglobulin
IMAC	Metallchelat-Affinitätschromatographie (engl. <i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>)
KPP	K aliumphosphatpuffer
MeOH	Methanol
min	Minute
MW	Molekulargewicht (engl. <i>molecular weight</i>)
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>

NTA	Nitrilotriessigsäure (engl. Nitrilotriacetic acid)
PBS	Phosphate buffered saline
pI	Isoelektrischer Punkt
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Quaternäre Trimethylaminoethyl
QAE	Quaternäre Hydroxypropyldiethylaminoethyl
S	Sulfomethyl
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. Sodiumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBS	25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl; pH 7,4
TBST	TBS + 0,05 % Tween 20
TGS	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS; pH 8,3
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1. Zusammenfassung

Der vorliegende Bericht beinhaltet die wissenschaftlichen Arbeiten der Projektpartner TCI, Sartorius und CCS im DBU/ICBio-Forschungsprojekt „Innovatives Baukastensystem zum integrierten Downstreamprocessing von Pharmatargets auf der Basis modularer Membranadsorbertechnologie“, Az. 13099 in der Zeit vom 01. August 2003 bis 30. September 2005.

Die Arbeiten zum Aufbau von HTDS-Systemen zum vereinfachten Screening von Downstreamingbedingungen und zur Bündelung von Arbeitsschritten durch den Einsatz neuartiger Membranadsorber führt zur ökonomisch wie ökologisch sinnvollen Verminderung des Ressourcenverbrauches und Verringerung der Reststoffströme.

Der vorliegende Bericht belegt die Eignung und Effizienz modularer Membranadsorberelemente für den Bereich Downstreaming, sowohl anhand umfangreicher Arbeiten mit Standardproteinen und –gemischen, als auch mit verschiedenen Realproben, wie hGH und Bgl. Verschiedene Membranen wurden vom Partner Sartorius aktiviert und vom Partner TCI für Ligandendekorationen und spezifische Trennprobleme getestet und eingesetzt.

Integraler Bestandteil der Arbeiten ist auch die Entwicklung geeigneter Verfahrenseinheiten zur simultanen Prozessierung verschiedener Membranmodule, die in enger Kooperation der Projektpartner durchgeführt wird.

2. Bericht

2.1 Anlass und Zielsetzung des Projektes

Bei der biotechnologischen Produktion von Pharmazeutika stellt das Downstreaming eine große Herausforderung dar. Die wertschöpfenden Komponenten müssen aus den Rohprodukten, wie beispielsweise Reaktionslösungen oder Fermentationsbrühen zunächst isoliert und im Anschluss aufgereinigt werden. Dabei werden die benötigten Verfahrensschritte, angefangen bei der Isolierung der gewünschten Komponente bis zur Aufreinigung des Rohproduktes, in heute angewandten Verfahren getrennt voneinander durchgeführt. Hierdurch entstehen eine Vielzahl von energie- und abwasserintensiven Verfahrensschritten wie z. B. Filtrations- und Chromatographieschritten.

Um das Downstreaming biotechnologisch hergestellter Pharmazeutika zeit- und ressourcenschonender zu gestalten, ist es daher wünschenswert, verschiedene Prozessschritte in eine sogenannte Unit-Operation zu integrieren. Eine zeitgemäße Möglichkeit stellt das Feld der Membranadsorbertechnologie dar.

Membranverfahren werden derzeit vor allem in der milchverarbeitenden Industrie verwendet, um einzelne Komponenten aus einer Lösung oder Suspension abzutrennen. Hierbei handelt es sich um druckgesteuerte Verfahren, bei denen zur Trennung auf Unterschiede in der Größe, der Ladung oder der Form der zu trennenden Moleküle oder Partikel zurückgegriffen wird. Diese Verfahren sind, da sie über den Druck gesteuert werden, sehr schonend im Hinblick auf die zu trennenden Komponenten und somit sehr gut für empfindliche Substanzen geeignet. Die Verbindungen müssen keiner sich ändernden chemischen Umgebung oder thermischem Stress ausgesetzt werden.

Seit Beginn der achtziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts werden Membranverfahren angewandt, bei denen Proteintrennungen durch Größenausschluss oder Ionenaustausch über Membranen durchgeführt werden. Die Membranen fungieren hierbei als stationäre Matrix des chromatographischen Prozesses und zeigen verschiedene Vorteile wie

- einfache Handhabung
- hohe Flussraten, die Adsorption läuft durch die an der Oberfläche der Membran lokalisierten Austauschergruppen nicht diffusionslimitiert ab
- geringe Produktionskosten
- einfaches Up-scaling durch den Einsatz verschiedenster Modulformen.

Ionenaustauschermembranen sind mit verschiedenen Austauscherguppen kommerziell erhältlich. Hierzu gehören Sulfonsäuregruppen (stark saure Tauschergruppen), Carbonsäuren (schwach saure Tauschergruppen), quartäres Ammonium und Diethylamin (stark bzw. schwach basische Tauschergruppen). Darüber hinaus sind Membranen mit chelatisierenden Gruppen wie Iminodiacetat erhältlich.

Die Möglichkeiten zum Einsatz von Membranadsorbern im Bereich der pharmazeutischen Industrie sind derzeit selten, da eine Trennung der Komponenten über die Ladung oder Größe der Moleküle vorgenommen wird. Ein wesentliches Problem ist hierbei die bisher eingeschränkte Selektivität von Membranprozessen. Die Trennung von Proteinen erfolgt über die Größe und/oder die Ladung, eine zufriedenstellende Trennung in Proteinfractionen kann daher nur erreicht werden, wenn bezüglich der Trenneigenschaft ein ausreichend großer Unterschied vorliegt.

Um die Einsatzmöglichkeiten von Membranadsorbersystemen im Pharmabereich ausdehnen zu können, wäre es daher wünschenswert, Membrantypen einsetzen zu können, die nicht nur eine Unterscheidung nach Größe oder Ladung des Moleküls treffen können. Statt dessen sollen Membransysteme Verwendung finden, die Proteine selektiv zu binden.

Für den Einsatz von Membranadsorbersystemen im Bereich des Downstreaming sprechen eine Reihe umweltrelevanter Vorteile gegenüber herkömmlichen Verfahren zur Produktaufreinigung:

- Einsparung von Energie durch kurze Zykluszeiten.
- Membransysteme ermöglichen scharfe Elutionspeaks, hierdurch liegen höhere Produktkonzentrationen im Eluat vor. Daraus folgend werden die anschließenden Konzentrierungsschritte vereinfacht.
- Aufgrund des geringen Druckabfalls wird deutlich weniger Prozessenergie benötigt.

Im Rahmen des Vorhabens sollen daher integrierte Systeme auf Basis der Membranadsorbertechnologie zur Aufreinigung von Pharmatargets geschaffen werden. Diese Systeme sollen sowohl eine gezielte und schnelle Problemlösung der vorliegenden Trennaufgabe, als auch eine Kopplung verschiedener Verfahrensschritte ermöglichen. Darüber hinaus wird eine einfache Handhabung des Systems angestrebt.

Die Möglichkeit zur flexiblen Anpassung an das jeweilige Trennproblem wird durch die Integration der Membranadsorber in ein Baukastensystem verwirklicht. Um eine optimale

Anpassung zu ermöglichen, kann das Membransystem an verschiedenen Stellen modifiziert werden. Die Porengröße der Membranbasis kann variiert werden und erlaubt so die gezielte Abtrennung der Wertkomponente von Verunreinigungen. Die Derivatisierung der Basismembran erfolgt mit verschiedenen funktionellen Gruppen. Möglich sind Epoxy- und Aldehydgruppen oder andere chemische Gruppierungen wie eine Bromcyanaktivierung. Auf diese Derivatisierung kann die so genannte Dekoration aufgebracht werden. Diese Kopplungskomponenten erlauben die selektive Abtrennung der gewünschten Komponente. Mögliche Dekorationsvariationen sind beispielsweise Anionen- oder Kationenaustauschergruppen, oder auch Lektine, Antikörper oder Metallchelate. Verschiedene Membranen können kombiniert werden, um damit eine optimale Aufreinigung der gewünschten Komponente zu erzielen. Darüber hinaus wird durch die Verwendung eines modularen Kartuschensystems eine hohe Scale-up-Fähigkeit erreicht.

Um für das jeweilige Trennproblem eine Aufreinigungsstrategie zu entwickeln, muss zunächst in einem kleinen Maßstab eine geeignete Kombination von Membranbasis, Derivatisierung der Membran und entsprechender Dekoration, sowie geeignete Immobilisierungs- und Elutionsbedingungen gefunden werden. Für diese Anwendung sollen Screening-Module entwickelt werden, die erlauben, verschiedene Membransysteme unter gleichen Bedingungen auf ihre Eignung zur Abtrennung der gewünschten Komponente zu testen. Daneben sollen Membransysteme entwickelt werden, die die Aufreinigung im Labormaßstab und im größeren Prozessmaßstab erlauben. Im Prozessmaßstab eignen sich insbesondere Modulformen, bei denen die Membran auf einen zylindrischen Träger aufgewickelt wird und die proteinhaltige Lösung das Modul von innen nach außen durchströmt. Verwirklicht wurde diese Modulform durch den Partner Sartorius als Membranadsorber der Sartobind[®] Factor-Two Family. Bestückt mit Membranen, die als funktionelle Gruppe Sulfonsäure zum Kationenaustausch tragen, wurden diese Module vom Partner Institut für Technische Chemie der Universität Hannover bereits zur Aufreinigung von bovinem Lactoferrin (bLF) eingesetzt.

Im Bereich der pharmazeutischen Industrie gibt es eine Reihe möglicher Zielproteine, bei deren Aufreinigung der Einsatz von Membranadsorbern, integriert in ein modulares System, einfach zu verwirklichen wäre. In der unten stehenden Tabelle (Tabelle 1) ist eine Auswahl dieser Targetproteine angegeben.

Tabelle 1: Mögliche Targetproteine für den Einsatz von Membranadsorbern im Bereich der pharmazeutischen Industrie.

Bindungsgruppe	Zielprotein
Antikörper	r-hGH, rt-PA
Protein A	Immunglobuline
Concanavalin A	glykosylierte Proteine
Cu, Ni	His-tag-Proteine
Biotin	Streptavidin

Als Modellprotein für die Aufreinigung von Proteinen aus Realmedien wurde Somatotropin herangezogen. Somatotropin oder human growth hormon (hGH) fördert u. A. das Wachstum von Knochen, Weichteilen und Knorpeln im menschlichen Körper. Somatotropin wird von Zellen des Hypophysenvorderlappens synthetisiert, Abweichungen von der normalen GH-Sekretion können im Fall der Überproduktion bei Kindern zu Riesenwuchs und bei Erwachsenen zu Wucherungen von Weichteilen, Knorpeln oder Knochen führen. Ein Mangel von Somatotropin während der Kindheit hingegen verursacht sogenannten Zwergwuchs.

Die pharmazeutische Bedeutung von GH liegt vor allem in der Möglichkeit, einen Mangel an GH durch die Gabe von rekombinantem hGH auszugleichen.

Somatotropin wird vom Partner Cell Culture Service (CCS) biotechnologisch in CHO-Zellen hergestellt. Die Isolierung erfolgt zur Zeit über ein mehrstufiges chromatographisches Verfahren.

2.2 Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

2.2.1 Membranadsorber

Für Arbeiten im Mikrolitermaßstab wurden zwei verschiedene Membranadsorbereinheiten entwickelt: *Vivapure mini spin columns* und *Vivawell 8-strips*.

Die *spin columns* sind so angefertigt, dass die Adsorbereinheiten in Eppendorfhütchen (siehe Abbildung 1, links) überführt werden können, wodurch die einzelnen Aufreinigungsschritte dann einfach in der Zentrifuge erfolgen.



Abbildung 1: links: Vivapure spin columns; rechts: Vivawell 8-strips. (Quelle: Vivascience AG)

Die *8-strips* bestehen aus 8 nebeneinander angeordneten Einheiten (Abb. 1, rechts) und werden über einen Lochrahmen mit 96-well-Platten kombiniert. Somit können Proteingemische auf den *8-strips* in einer Zentrifuge oder in einem Überdruckmodul getrennt werden. Eine Trennung mit Hilfe von Unterdruck ist ebenfalls möglich.

Beide Typen sind mit einer Reihe unterschiedlicher Membranfunktionalitäten ausgestattet (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Membranen mit verschiedenen Funktionalitäten und ihre Anwendung.

<i>Funktionalität</i>	<i>Anwendung</i>
Q	Ionenaustauschchromatografie (IEX)
S	IEX
Epoxy	Affinitätschromatographie
IDA	Immobilized metal affinity chromatography (IMAC)
Protein A	Affinitätschromatographie

Zu jeder Membransorte wurden von der Firma Vivascience AG ausführliche Versuchsprotokolle entwickelt. Diese wurden dann an die vorliegenden Bedingungen angepasst und durchgeführt. Abbildung 2 zeigt das Prinzip der Aufreinigung.

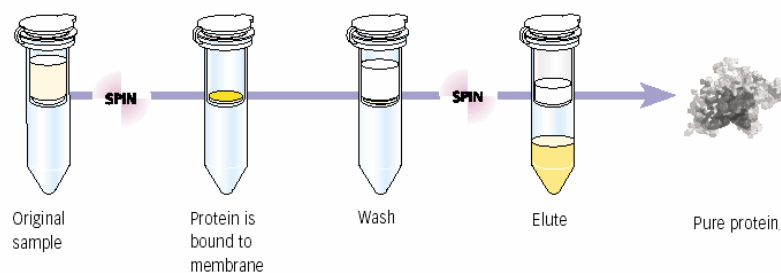


Abbildung 2: Prinzip der Proteinaufreinigung über Membranadsorbereinheiten. (Quelle: Vivascience AG)

Die Probe wird aufgetragen, dabei bindet das Zielprotein an die Membran. Nach einem Waschschrift, bei dem die unspezifisch gebundenen Proteine entfernt werden, erfolgt die Elution des Zielproteins durch einen Pufferwechsel.

Die Kapazität sowohl von *spin columns* als auch von *8-strips* kann durch die Verwendung von Mehrlagensystemen variiert werden. Die Matrix der 230-320 µm dicken Membranen besteht aus regenerierter Cellulose mit einer mittleren Porengröße von 3-5 µm. In Tabelle 2 sind die technischen Daten für beide Adsorbereinheiten zusammengefasst.

Tabelle 3: Technische Daten von Vivapure Mini spin columns und Vivawell 8-strips. (Quelle: Vivascience AG)

Adsorbereinheit	Bettvolumen	Membranlagen	Membranfläche	Max. Durchsatzvolumen
<i>Vivapure Mini M</i>	60 µl	5	1,87 cm ²	500 µl
<i>Vivapure Mini</i>	120 µl	10	3,74 cm ²	500 µl
<i>Vivapure Mini H</i>	240 µl	20	7,48 cm ²	500 µl
<i>Vivawell 8-strip</i>	45 µl	5	1,6 cm ²	300 µl/well
<i>Vivawell 8-strip</i>	90 µl	10	3,2 cm ²	300 µl/well
<i>Vivawell 8-strip</i>	180 µl	20	6,4 cm ²	300 µl/well

2.2.2 Kultivierungen

Zur Untersuchung der Membranen wurden neben Modellproteinen auch Realproben eingesetzt. Hierzu wurden Zelllinien kultiviert, die Somatotropin und β-Glucanase-His (Bgl-His) bzw. GFP-His (Grün Fluoreszierendes Protein-His) produzieren. Im Anschluss wurden

die Proteinen aus diesen Zelllinien aufgereinigt.

Kultivierung von Somatotropin (hGH)

Die Kultivierungsversuche wurden mit der rekombinanten Zelllinie CHOSFS hGH (Chinese hamster ovary) durchgeführt. Die an serumfreies Medium adaptierte Suspensionszelllinie ist über Plasmidtechnik gentechnisch so verändert, dass sie hGH (human Growth Hormone) exprimiert. Das in die Zellen eingeschleuste Plasmid enthält die Gene für die hGH-Produktion und die MTX-Resistenz. Durch Zugabe von Methotrexat (MTX) zum Kulturmedium werden unproduktive Zellen getötet. Die Verdopplungszeit der Zellen beträgt ca. 24 h.

Die CHOSFS hGH-Zellen werden in dem proteinarmen Medium ProCHO 4-CDM (Cambrex) kultiviert. Es enthält 10 µg/ml Insulin. Vor dem Gebrauch wird das Medium mit 4 mmol L-Glutamin, 0,1 µmol MTX und Antibiotika (Penicillin, Streptomycin, Amphotericin) versetzt.

Die Kultivierung wurde in einem 30 l Biostat C-Reaktor (B. Braun) bei 37 °C und 100 rpm unter 50 %iger O₂-Atmosphäre bei einem pH-Wert von 7,2 durchgeführt. Die pH-Regulierung erfolgte über 1 N HCl und 1 N NaOH. Es wurde mit einer Zelldichte von 5x10⁵ c/ml (in 10 l) angeimpft, wobei die Kultivierung ohne Zugabe von MTX durchgeführt wurde. Die Prozessdauer betrug 10 Tage (Batch mit einer Nachfütterung nach 7 Tagen). Nach Beendigung der Kultivierung (Erntezelldichte 4,3x10⁶ c/ml in 15 l) wurden die Zellen durch Zentrifugation in 500 ml Zentrifugenbechern (4°C, 3000 g, 15 min) vom Überstand abgetrennt.

Kultivierung von β-Glucanase-His (Bgl-His) und GFP-His (Grün Fluoreszierendes Protein-His)

Die *E. coli*-Stämme zur Bgl-His- und GFP-His-Produktion wurden von PD Dr. Karl Friehs, Technische Fakultät, AG Fermentationstechnik, Universität Bielefeld zur Verfügung gestellt.

Die Kultivierungen wurden mit Zellen aus Stammhaltungsplatten in jeweils 500 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 120 rpm und 30°C für 24 h durchgeführt. Vier Stunden nach Beimpfen wurde mit IPTG induziert (1 mM Endkonzentration im Medium). Nach Beendigung der Kultivierung wurden die Bakterien von ihrem Flüssigmedium durch Zentrifugation (30 min bei 4°C und 3345 g) abgetrennt. Der Bgl-His-Überstand wurde filtriert. Die Zellen wurden mit 25 ml bidest. Wasser versetzt und in 2 ml Eppendorfhütchen mit Ultraschall (60 W, 6 min, 0,3 s Pulsdauer) aufgeschlossen. Nach 30 min Abzentrifugieren bei 14.000 g wurden die Lösungen ebenfalls filtriert.

2.3 Ergebnisse

Zuerst wurden vom Partner Sartorius die Basismembranen entwickelt (Arbeitspaket 1). Im Rahmen der Arbeitspakete 2 und 3 wurden unterschiedlich funktionalisierte Membranmodule angefertigt und deren Bindungs- und Elutionsverhalten unter Einsatz von Modellproteinen untersucht. Für die Aufarbeitung anhand von *8-strips* wurden Überdruck- und Unterdrucksysteme entwickelt und getestet. Im Arbeitspaket 4 wurden dann die optimalen Aufreinigungsbedingungen für Somatotropin ermittelt. Nach der Untersuchung der Bindungs- und Elutionseigenschaften wurden die Membranen im Arbeitspaket 5 zur Isolierung von Zielverbindungen aus Modellprotein-Gemischen eingesetzt.

Die Schwerpunkte der Arbeiten des Partners Cell Culture Services GmbH (CCS) liegt in den Arbeitspaketen Nr. 5 „Optimierung der Downstreambedingungen im HTDSS“, Nr. 7 „Modellierung des Downstreamprozesses“ und Nr. 8 „Upscaling in den Produktionsbereich“.

2.3.1 AP 1: Konzeption und Entwicklung der Basismembran

Vom Partner Sartorius wurden Membranen für das Downstreaming in Bioprozessen entwickelt und unter verschiedenen Bedingungen aktiviert. Hierfür wurden Informationen über die Membraneigenschaften (Sartorius) mit den Informationen zu den Produkteigenschaften und den z.Zt. angewandten Aufreinigungsverfahren (CCS) zusammengeführt und somit die Auswahl geeigneter Liganden für die Derivatisierung der Membranen getroffen.

Die folgenden Membranfunktionalitäten stehen in gleich bleibender Qualität und ausreichender Quantität den Partnern während der gesamten Projektlaufzeit für die Arbeiten zur Verfügung:

- Epoxidgruppen
- Aldehydgruppen
- Hydroxylgruppen

Auch eine Ligandendekoration dieser aktivierten Membranen wurde teilweise vom Partner Sartorius geleistet. Die Dekoration erfolgte so, dass als terminale Gruppen

- Kationen- und Anionenaustauschergruppen
- Protein A
- Iminodiacetatgruppen (IDA)

zur Verfügung stehen. In Abschnitt 2.3.3 wird außerdem die zusätzlich vom Partner TCI

durchgeführte Dekoration mit Concanavalin A (Con A) beschrieben, die zur selektiven Bindung von Glykoproteinen verwendet wird.

2.3.2 AP 2: Entwicklung und Beschreibung der Module

Um das Screening im Mikroliterbereich und die Aufarbeitung in größerem Maßstab zu ermöglichen, wurden verschiedene Modulformen entwickelt.

Für das Screening werden 8-Strips verwendet, die in Abschnitt 2.2.1 beschrieben werden. Für den Durchsatz von Flüssigkeiten durch die Membranen der *8-strips* wurden drei Methoden getestet.

Bei der ersten Methode wird eine Zentrifuge mit Ausschwingrotor, bei der die *8-strips* über einen Lochrahmen auf einer 96-well *Deep Well*-Platte (1,2 ml Volumenkapazität pro Vertiefung) positioniert werden (siehe Abbildung 3), verwendet. Es werden jeweils 300 µl Flüssigkeit auf die Membranen gegeben.

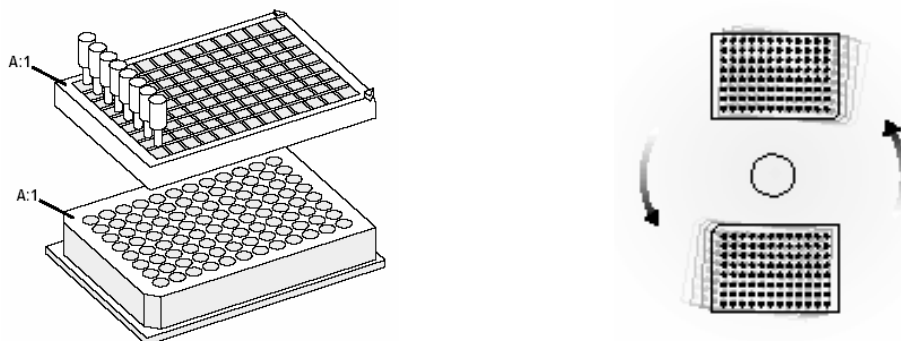


Abbildung 3: Positionierung der 8-strips auf einer 96-well-Platte und Zentrifugation.

Die Flüssigkeit kann auch mit Hilfe von Überdruck durch die Membranen gepresst werden. Solch ein Überdruckmodul wurde vom Partner Institut für Technische Chemie der Universität Hannover entwickelt (Abbildung 4). Der *8-strip* wird dabei mittels eines Lochrahmens (C) auf einer 96-well Mikrotiterplatte (D, mit 300 µl Volumenkapazität pro Vertiefung) verschoben. Das Modul wird über eine Schlauchverbindung (E) mit Druckluft beschickt. Der Stempel (B) kann durch Betätigung des Schraubrades (A) abgesenkt werden. Er besitzt acht mit Dichtungen bestückte Öffnungen (F), welche die Druckluft auf die einzelnen wells der *8-strips* verteilen.

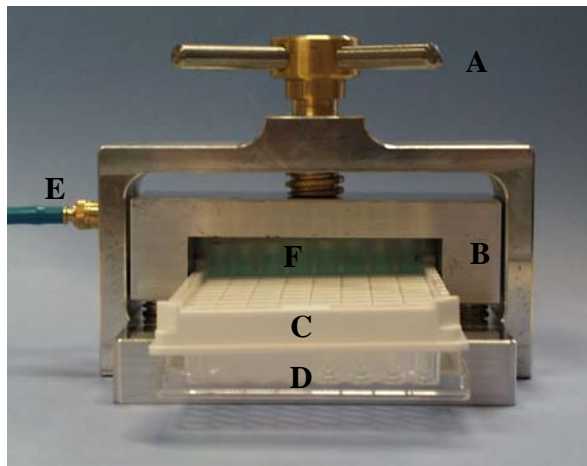


Abbildung 4: Überdruckmodul, entwickelt am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover.

Die wells werden mit je 150 μl Flüssigkeit gefüllt, da die Ablaufstutzen der einzelnen Membranadsorbereinheiten bei höheren Durchlaufvolumina in die aufgefangene Flüssigkeit tauchen. *Deep Well*-Platten wie bei der Zentrifugeneinheit können aufgrund der zu niedrigen Höhe des Moduls nicht eingesetzt werden.

Eine andere Möglichkeit für den Durchsatz von Flüssigkeiten durch die Membranen der *8-strips* ist das Arbeiten mit Unterdruck. Solch ein Unterdruck-Modul wurde von einer Tochterfirma des Partners Sartorius der Vivascience AG entwickelt und zur Verfügung gestellt (siehe Abbildung 5). Die leeren 1,2 ml *8-strip tubes* (A) werden in die im Inneren des Moduls befindlichen Vertiefungen gesteckt.

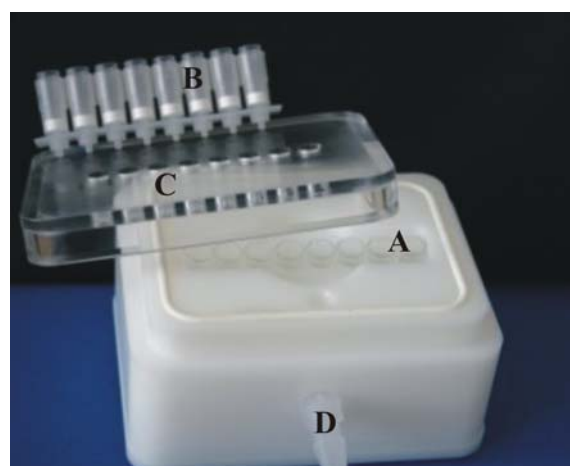


Abbildung 5: Unterdruck-Modul, entwickelt von der Firma Vivascience AG.

Auf den Deckel wird der *Vivawell 8-strip* (B) über eine gelochte Plastikleiste (C) platziert. Auf die wells werden jeweils 300 µl Flüssigkeit aufgetragen. Das Absaugen durch die Membranen erfolgt durch die vordere Schlauchverbindung (D) zur Vakuumpumpe. Nach jedem Beladungs- bzw. Elutionsschritt werden die *tubes* ausgetauscht.

Für das Screening mit Unterdruck wurde auch das Modul in Abbildung 6 von der Firma Vivascience entwickelt. Bei diesem Modul ist die gleichzeitige Aufarbeitung von bis zu 96 Proben möglich.



Abbildung 6: Screeningmodul, entwickelt von der Firma Vivascience AG.

Die *8-strips* werden auf einer Plastiklochplatte zu einem 96-well Format kombiniert und auf das Modul platziert. Das Absaugen durch die Membranen erfolgt durch die vordere Schlauchverbindung, wobei die Flüssigkeiten in einer *Deep-well-Platte* aufgefangen werden. Nach den einzelnen Beladungs-, Wasch- und Elutionsschritten wird die Platte gewechselt.

Größere Probenvolumina werden über Spinmodule aufgearbeitet. Neben den im Abschnitt 2.2.1 vorgestellten Spinmodulen, wurden Maxi-Spinmodule von Vivascience entwickelt. Daneben wurden Testmodule aus Edelstahl hergestellt, bei denen eine variable Anzahl von Membranen eingelegt werden kann. Auch diese Module sind in der Zentrifuge zu benutzen. Exemplarisch für die verschiedenen Spinmodule zeigt Abbildung 7 die Verteilung der auf die Membran aufgegebenen Flüssigkeit innerhalb des Moduls beim Zentrifugieren. Zur Verdeutlichung der Verteilung wurde rote bzw. blaue Tinte zentrifugiert.

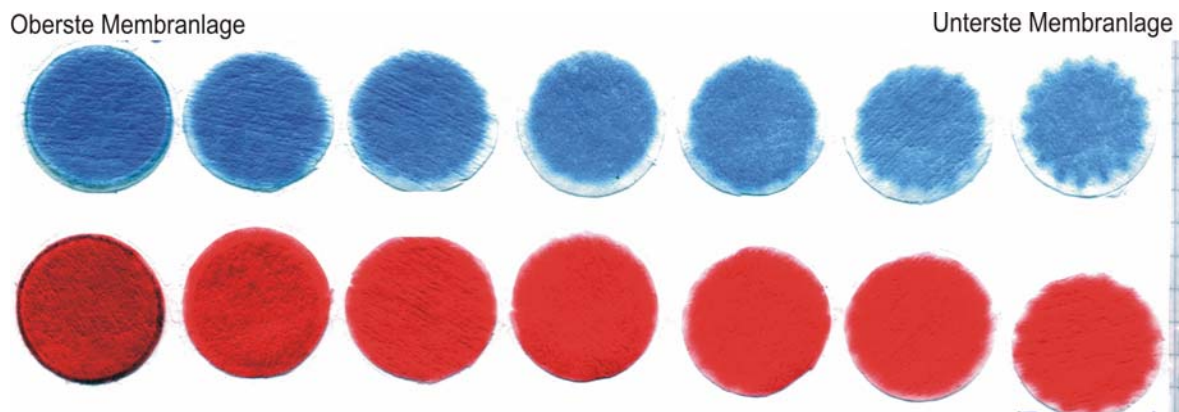


Abbildung 7: Verteilung der aufgegebenen Flüssigkeit innerhalb der Spinmoduls durch Zentrifugation.

Es zeigt sich, dass sich die Flüssigkeit über die Membranen innerhalb des Spinmoduls sehr gleichmäßig verteilt. Somit ist die optimale Ausnutzung der eingesetzten Membranfläche gewährleistet.

2.3.3 AP 3: Entwicklung und Testung der funktionalisierten Membranmodule mit Modellsystemen

In diesem Arbeitspaket wurden Concanavalin A-Membranen zur Aufreinigung von glykosylierten Proteinen hergestellt und getestet. Daneben wurden weitere Systeme bezüglich ihres Einsatzes in einem Baukastensystem untersucht. Hierzu gehören Kationen- und Anionenaustauscher, sowie Protein A-Membranen für IgG und metallchelatisierende Membranen zur Bindung von His-tag-Proteinen.

Con A-Membranen

Con A-Membranen wurden auf der Basis zweier verschiedener Membranen hergestellt. Zum einen wurden Epoxymembranen verwendet, zum anderen wurden metallchelatisierende Membranen mit Iminodiacetatgruppen getestet.

Zur Optimierung der Immobilisierung von Concanavalin A an Epoxymembranen wurden die nachfolgend genannten Puffersysteme getestet: KPP (pH 8,5), Boratpuffer (pH 9,5), Carbonatpuffer (pH 8,5) und Natriumacetatpuffer (pH 6,5; Zusatz von strukturbildenden Metallionen). Das Vorgehen zur Immobilisierung entspricht dem Protokoll, das von der Firma Vivascience zur Verfügung gestellt wird. In Abbildung 8 ist dargestellt, welche Menge Concanavalin A pro cm² Membran immobilisiert werden konnte.

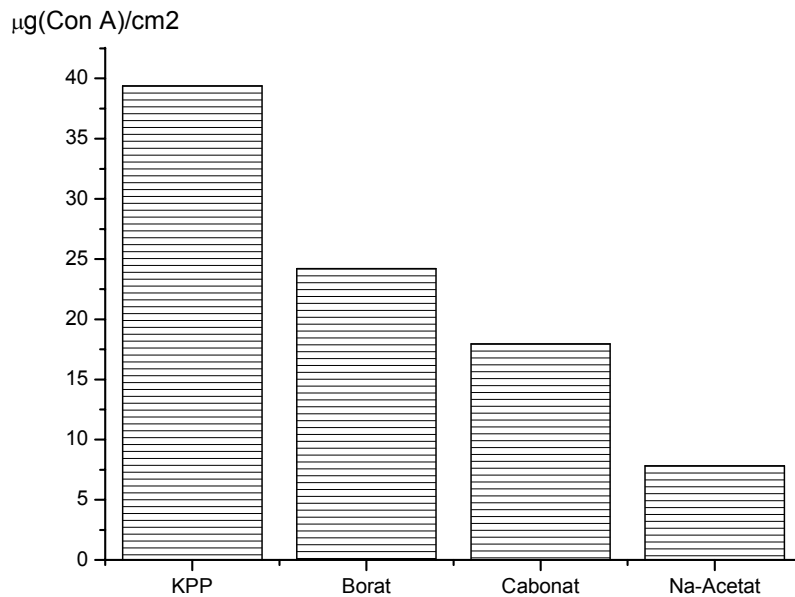


Abbildung 8: Testung verschiedener Puffersysteme zur Immobilisierung von Con A auf Epoxy-Membran.

Es zeigt sich, dass bei Verwendung von Phosphat-Puffer die größte Menge Concanavalin A immobilisiert werden konnte.

Das Glykoprotein Glucoseoxidase (GOD) konnte allerdings nur an Membranen gebunden werden, bei denen Con A in Borat- bzw. Natriumacetatpuffer immobilisiert wurde. Tabelle 4 gibt an, welche Menge GOD auf der Con A-Membran gebunden werden konnte.

Tabelle 4: Bindung von GOD an die mit verschiedenen Puffersystemen hergestellten Con A-Membranen.

<i>Puffersystem zur Immobilisierung von ConA</i>	<i>GOD, eingesetzt [mg]</i>	<i>GOD, immobilisiert [mg]</i>	<i>[µg/cm²]</i>	<i>GOD, immobilisiert [%]</i>
KPP	0,404	-	-	-
Boratpuffer	0,404	0,073	9,9	18,1
Carbonatpuffer	0,404	-	-	-
NaAc-Puffer	0,404	0,027	3,6	6,6

Zur Elution des Glykoproteins wurde Mannosidlösung und die Elution über einen pH-Shift getestet. Die Abbildung der Gelelektrophorese (Abbildung 9) stellt dar, dass nur die Elution über den pH-Shift erfolgreich ist.

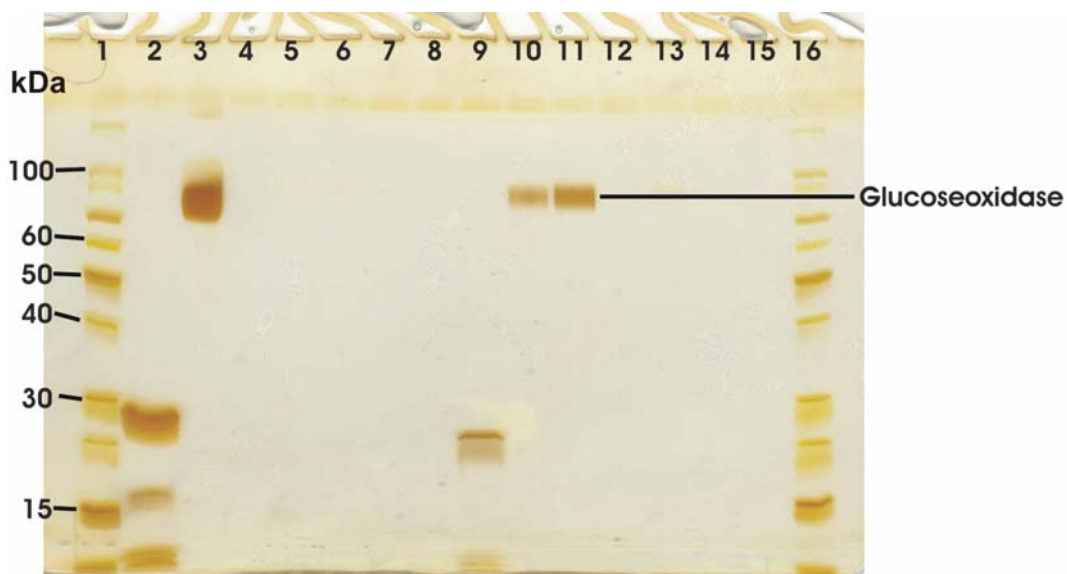


Abbildung 9: Gelelektrophorese für die Elutionsfraktionen für die Elution von Glucoseoxidase von Con A-Membranen; 12,5 %iges homogenes SDS-PAGE-Gel, Silber gefärbt.

Bahn 1, 16: Marker, Bahn 2: Concanavalin A, Bahn 3: GOD; Bahn 4-6 Elutionen mit Mannosidlösung (Probe Boratpuffer), Bahn 7-9: Elution mit Mannosidlösung (Probe NaAc-Puffer), Bahn 10-12: Elution mit pH-Shift (Probe Boratpuffer), Bahn 13-15: Elution mit pH-shift (Probe NaAc-Puffer).

Für die Aufreinigung von GOD auf der Basis von Con A-Membranen auf Epoxy-Basis ist daher folgende Strategie am erfolgversprechendsten: Immobilisierung von Con A in Boratpuffer und die anschließende Aktivierung von gebundenem Con A. Für die Elution von GOD ist ein pH-Shift vorzuziehen, da die starke Bindung zwischen Lektin und Glykoprotein offensichtlich nicht durch Mannosidlösung gespalten werden kann.

Diese Kombination aus Immobilisierungs- und Elutionspuffer wurde daher auch zur Testung der wiederholten Bindung von GOD an die Epoxy-Con A-Membran eingesetzt. Nachdem Con A kovalent an die Membran gebunden und durch NaAc-Puffer (pH 6,5; Zusatz strukturbildender Metallionen) aktiviert wurde, wurde wiederholt GOD (gelöst in NaAc-Puffer) an die Membran gebunden und durch pH-Shift eluiert. Hierbei wurden nacheinander NaAc-Puffer mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen an Metallionen eingesetzt. Zunächst wurde Puffer mit jeweils 1 mMol Ionen verwendet, im Anschluss 10 mM Puffer. Abbildung 10 zeigt, wie viel mg GOD pro mg gebundenes Con A gebunden werden konnten.

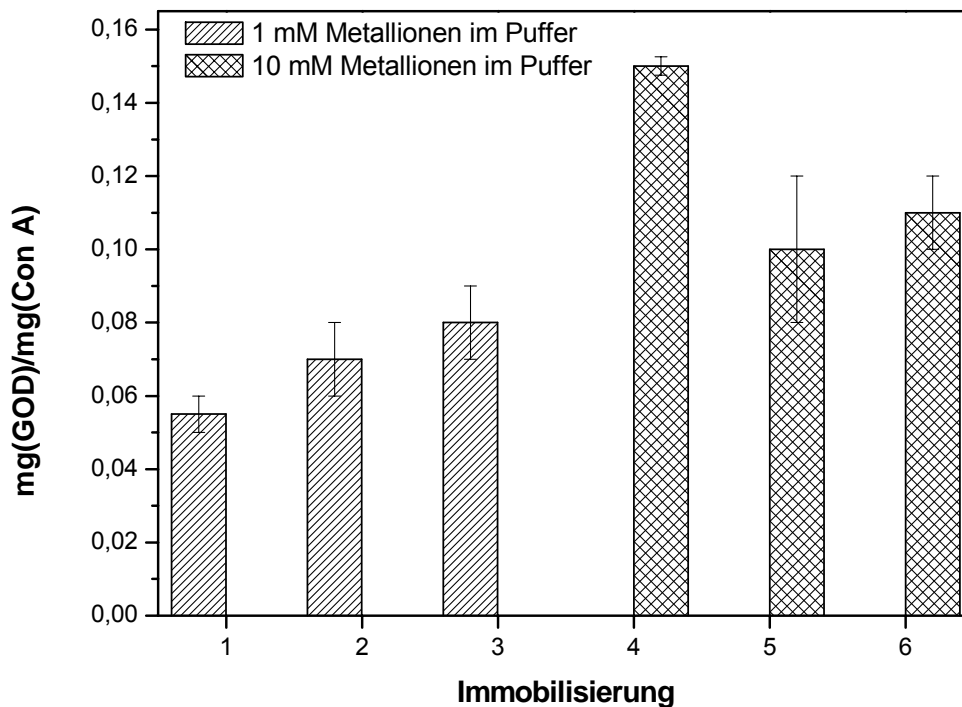


Abbildung 10: Reversible Immobilisierung von GOD an Con A-Epoxy-Membranen.

Aus Abbildung 10 wird deutlich, dass die Con A-Membranen wiederholt für die Bindung von GOD eingesetzt werden können. Bei mehrfacher Immobilisierung steigt die Menge GOD, die an die Con A-Membran gebunden werden kann an. Die Vergrößerung der Metallionenkonzentration im Immobilisierungspuffer hat hingegen nur einen geringen Effekt. Mit Ausnahme der Immobilisierung 4 zeigt sich unabhängig von verwendeten Puffer ein linearen Anstieg der gebundenen GOD-Menge.

Eine zweite Möglichkeit zur Herstellung von Con A-Membranen ist die Verwendung von metallchelatisierenden Membranen. Zunächst soll nur die Bindungskapazität der vor allem zur Immobilisierung von His-tag-Proteinen eingesetzten Gruppen in Bezug auf die Bindung von Concanavalin A getestet werden. Hierzu wurde fünfmal jeweils 0,4 ml einer 1 mg/ml Con A-Lösung in NaAc-Puffer auf die mit verschiedenen Metallionen beladenen Spinmodule gegeben. Die Durchführung der Versuche entsprach den Vorschriften im von Vivascience entwickelten Protokoll. Tabelle 5 gibt die genauen Ergebnisse dieser Untersuchungen bezüglich der gebundenen Concanavalin A Mengen an.

Tabelle 5: Bindungskapazitäten für die Immobilisierung von Concanavalin A an metallchelatisierenden Membranen. Die Beladung der Membranen erfolgt mit Cobalt, Kupfer, Nickel bzw. Zink.

<i>Metall-Ion</i>	<i>Con A, eingesetzt [mg]</i>	<i>ConA, immobilisiert [mg]</i>	<i>[$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]</i>	<i>Con A, immobilisiert [%]</i>
Co ²⁺	2,022	0,751	101,6	37,2
Cu ²⁺	2,022	1,238	167,3	61,2
Ni ²⁺	2,022	1,131	152,9	55,9
Zn ²⁺	2,022	1,872	252,9	92,6

Bei Vergleich der verschiedenen Metallionen zur Beladung der metallchelatisierenden Gruppe zeigt sich, dass bei einer Beladung mit Zinkionen die größte Menge Con A gebunden werden kann. Die geringste Bindungskapazität weisen Membranen bei einer Beladung mit Cobaltionen auf.

Im Anschluss wurden zur Bestimmung der für die Isolation von GOD am besten geeignete Con A-IDA-Membran die Bindungskapazitäten in Abhängigkeit von der Metallionenbeladung ermittelt. Es ergeben sich die in Abbildung 11 dargestellten Werte in μg (gebundene GOD)/ cm^2 (Membran). Ebenfalls dargestellt sind die Ergebnisse für die zuvor durchgeführte Immobilisierung von Con A, an welches GOD gebunden wurde.

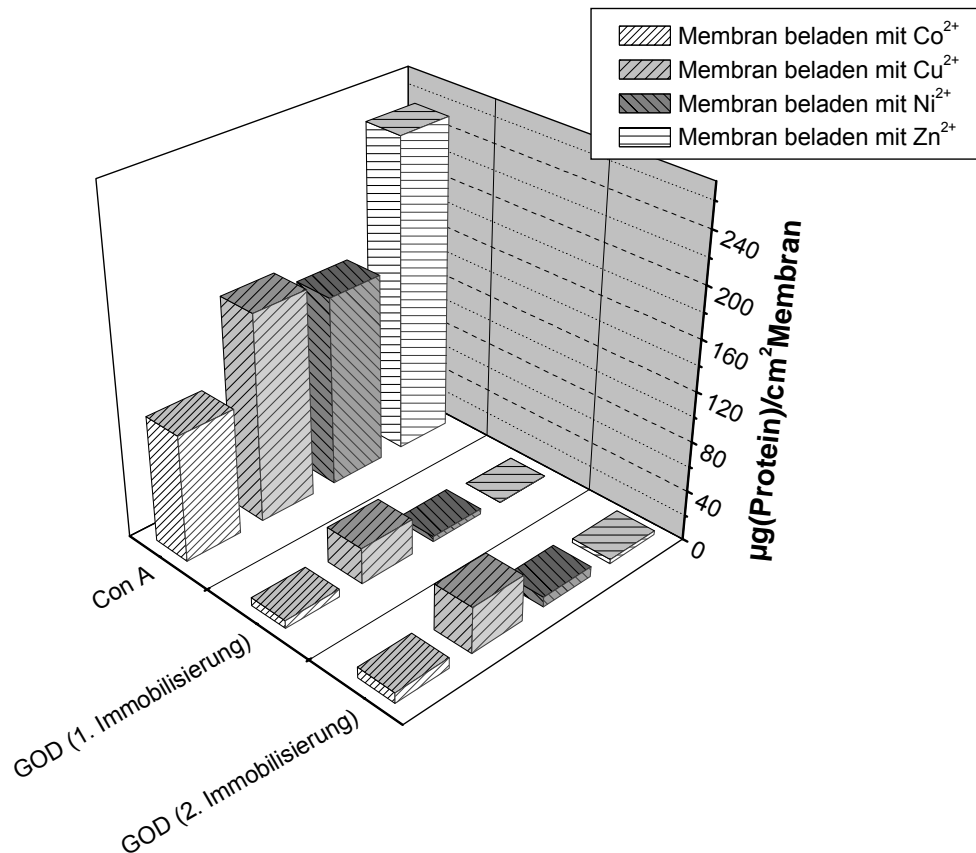


Abbildung 11: Immobilisierung von Con A an IDA-Spinmodule und anschließende Bindung von GOD an Con A.

Es wird deutlich, dass die Membran, an der die größte Menge Con A gebunden werden konnte (Beladung mit Zink), kaum GOD bindet ($6,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Bei einer Beladung mit Kupfer wird zwar weniger Con A gebunden, die aus der Lösung isolierte Menge GOD ist aber signifikant größer ($29 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Um sicherzustellen, dass GOD an das Con A gebunden wird und nicht direkt an die mit Kupfer beladene IDA-Membran, wurde ein entsprechender Versuch für GOD ohne vorherige Immobilisierung von Con A durchgeführt. Mittels Gelelektrophorese wurde untersucht, ob in den Elutionsfraktionen GOD zu finden ist. Abbildung 12 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung, in Spur 2 ist die auf die Membran aufgegebene Probe aufgetragen, in den Spuren 3 – 5 der Durchlauf bzw. die Waschfraktionen. Es zeigt sich hier, dass ein Teil der GOD zunächst unspezifisch an die Membran gebunden wurde, durch Waschschriffe wurde die GOD aber wieder entfernt. In den Elutionsfraktionen wurden nur sehr geringe Mengen GOD nachgewiesen (Spur 6).

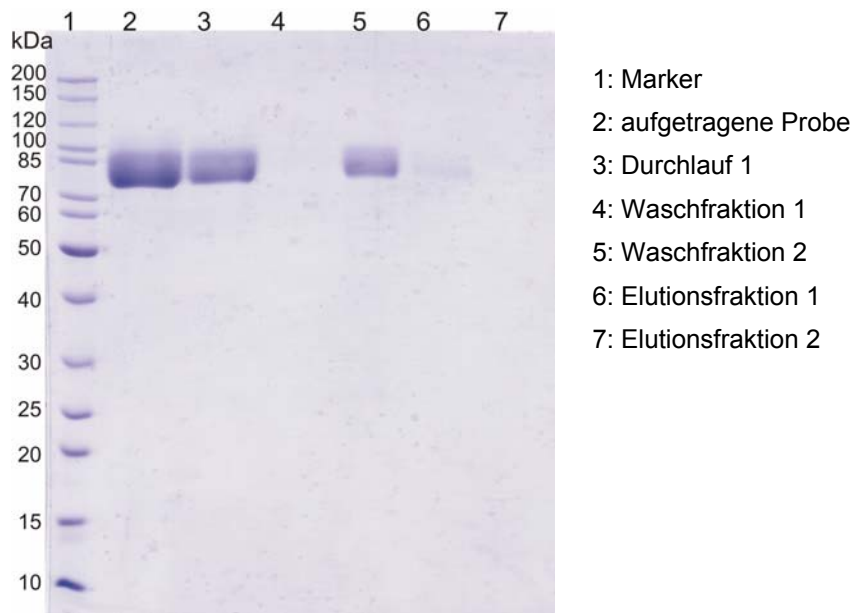


Abbildung 12: Gelelektrophorese für die Immobilisierungs- und Elutionsfraktionen für die Bindung und Elution von GOD an Cu²⁺-IDA-Membranen, Coomassie-gefärbt.

Es ist daher davon auszugehen, dass an eine zuvor mit Con A beladenen Membran die GOD an Con A und nicht an die Membran gebunden wird.

Für die Elution von GOD von der Con A-IDA-Membran wurde wie zuvor für die Epoxymembran Mannosid-Lösung und pH-Shift getestet. Abbildung 13 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese der verschiedenen Elutionsfraktionen. Weiterhin sind als Standards GOD und Con A aufgetragen.

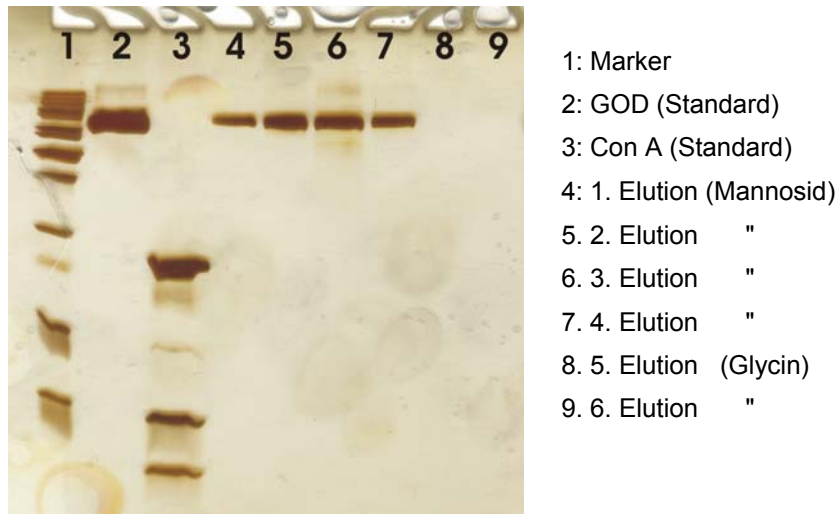


Abbildung 13: Gelelektrophorese für die Elutionsfraktionen für die Elution von Glucoseoxidase von Con A-IDA-Membranen; 12,5 %iges homogenes SDS-PAGE-Gel, Silber gefärbt.

Im Unterschied zur Epoxymembran kann GOD schon mittels Mannosidlösung von der Membran eluiert werden (Spur 4 – 7). In keiner der Elutionsfraktionen konnte Con A nachgewiesen werden. Entsprechend den Epoxymembranen wurden Untersuchungen zur reversiblen Immobilisierung von Glykoproteinen am Beispiel der GOD durchgeführt.

Bei aufeinanderfolgender siebenfacher Bindung und Elution ergeben sich die in Grafik 14 dargestellten Mengen für gebundene beziehungsweise eluierte Glucoseoxidase. Es zeigt sich, dass die Bindungskapazität der Con A-IDA-Membran bei wiederholter Beladung annähernd gleich bleibt.

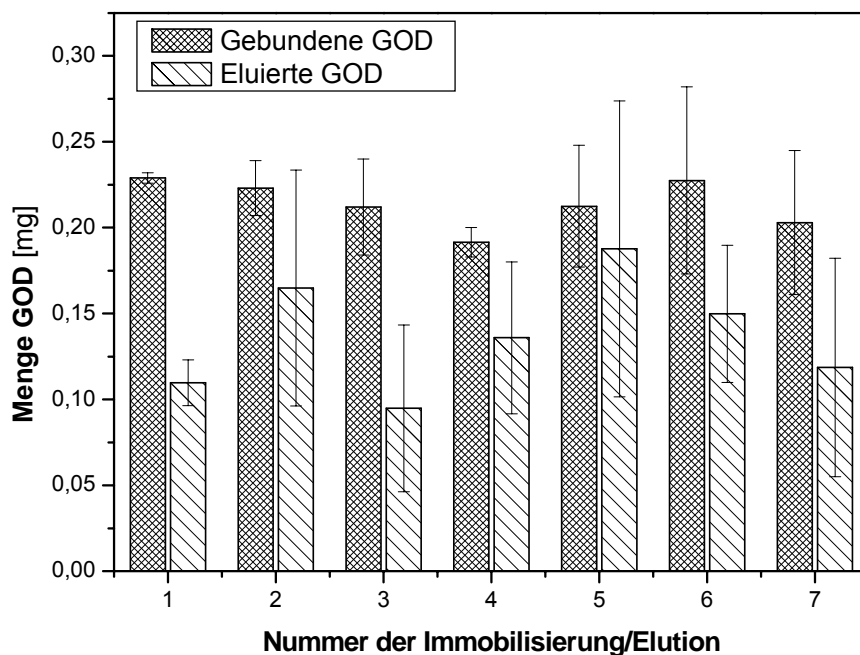


Abbildung 14: Reversible Bindung von GOD an Con A-IDA-Membranen

Die Menge der gebundenen GOD schwankt um einen Mittelwert von $29 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Con A-Membran. Die Menge der eluierten GOD schwankt ebenfalls, im Mittel beträgt sie $0,137 \text{ mg GOD}$ ($18 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Die Wiederfindungsrate beträgt 64%, könnte aber durch Verringerung der Fließgeschwindigkeit und der damit einhergehenden längeren Kontaktzeit zwischen Elutionsmittel und Membran weiter gesteigert werden.

An metallchelatisierenden Membranen kann eine wesentlich größere Menge Concanavalin A pro Quadratzentimeter gebunden werden als an Membranen mit Epoxy-Aktivierung, weiterhin zeigen die auf IDA-Basis hergestellten Con A-Membranen eine größere Bindungskapazität für Glucoseoxidase ($0,25 \text{ mg (GOD)}/\text{mg(Con A)}$ gegenüber $0,1 \text{ mg(GOD)}/\text{mg(Con A)}$).

Ionenaustauscher-Membranen

Auf den hier verwendeten Ionenaustauscher-Membranen sind stark anionische quarternäre Trimethylaminoethyl- (Q) und stark kationische Sulfomethyl-Gruppen (S) immobilisiert. Zur Bestimmung der Bindungskapazitäten und Protein-Wiederfindungsraten von *spin columns*

und *8-strips* wurden als Modellproteine BSA (pI 5,5) und Lysozym (pI 9,3) verwendet. Die optimalen Bindungsbedingungen für beide Proteine wurden ermittelt, indem die Proteine bei verschiedenen pH-Werten parallel auf Q- und S- Membranen aufgegeben wurden. Besonders eignen sich hierzu die *8-strips*, da verschiedene Proben gleichzeitig bearbeitet werden können. Bei pH 7,5 konnte BSA an die Q- und Lysozym an die S-Membran optimal gebunden werden.

Abbildung 15 gibt den mittels BCA-Test bestimmten Proteingehalt in den einzelnen Beladungs- und Elutions-Fractionen der Q und S-Membranen in *spin columns* wieder. Durch Subtraktion der bestimmten Proteinmenge in jedem Durchlauf (DL) von der aufgetragenen Probe kann die an die Membran gebundene Proteinmenge für jeden Beladungsschritt ermittelt werden. Die Summe der so erhaltenen Werte ergibt dann die Gesamtmenge an Protein auf der jeweiligen Membran (Beladung). Summiert man den Proteingehalt in den Waschfraktionen (WF) und Elutionen (E), erhält man die wiedergefundene absolute Proteinmenge (WF+E).

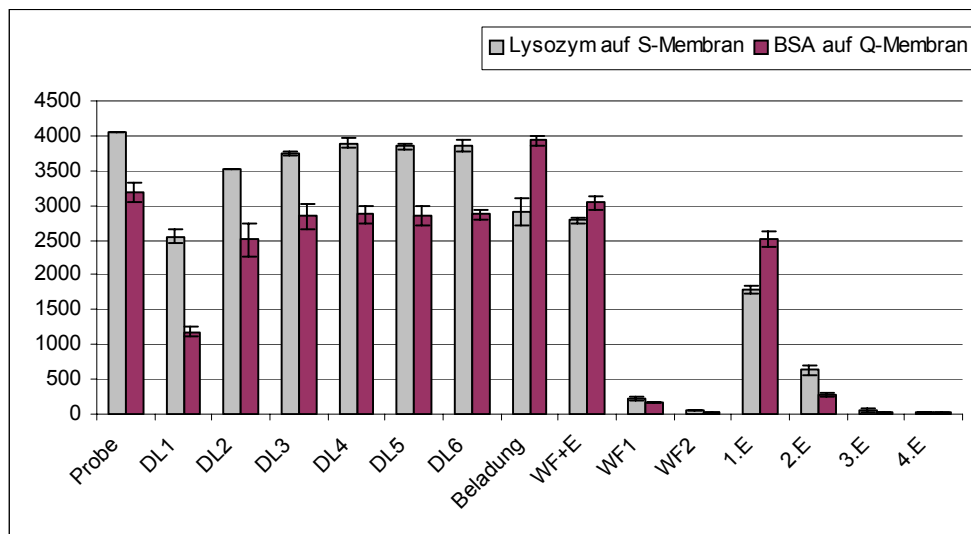


Abbildung 15: Beladung und Elution von Q- und S-Membranen mit BSA bzw. Lysozym.

Unter Berücksichtigung der Membranfläche (1,87 cm²) wurden folgende Werte erhalten (Tabelle 6):

Tabelle 6: Bindungskapazitäten und Protein-Wiederfindungsraten für *Vivapure Mini spin columns*.

Membran	Modellprotein	Bindungskapazität [mg/cm²]	Protein-Wiederfindungsrate [%]
Q	BSA	1,52	77
S	Lysozym	1,35	96

Die Wiederfindungsraten konnten durch die auf den letzten Elutionsschritt folgende Denaturierung der gebundenen Proteine mit Laemmli-Puffer gesteigert werden.

Für Arbeiten mit *8-strips* wurden zunächst die in Abschnitt 2.3.2 vorgestellten Module zum Flüssigkeitsdurchsatz miteinander verglichen.

Beim Unterdruckmodul traten Probleme beim Auffangen der durchgelaufenen Fraktionen auf. Da die Verbindung zur Vakuumpumpe seitlich am Modul angebracht ist, wird die aufgetragene Flüssigkeit in die Richtung gesogen, so dass sie teilweise nicht in den vorgesehenen *tubes* aufgefangen wird. Dies führte zu Schwankungen in den Fraktionsvolumina. Außerdem kann der Unterdruck in dem Modul nicht reguliert werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde mittlerweile ein neues Unterdrucksystem zur Vermeidung dieser Probleme entwickelt (siehe Abbildung 6); dieses wird derzeit getestet. Das neue System ermöglicht auch Aufarbeitungen auf Mikrotiterplatten und dient als Grundlage für High-Throughput-Downstream-Screening Systeme (HTDSS).

Aufgrund des geringeren Probenauftragsvolumens (150 µl statt 300 µl) sind beim Überdruckmodul doppelt so viele Auftragungsschritte notwendig, um die gleiche Proteinmenge wie bei Verwendung der Unterdruckeinheit bzw. der Zentrifugeneinheit zu binden. Hier muss eine Veränderung im Modulaufbau erfolgen, damit die ganze Platte auf einmal mit Überdruck betrieben werden kann und eine Auftragung größerer Volumina ermöglicht wird. Dann könnte auch dieses Modul für HTDSS eingesetzt werden.

Der Einsatz in der Zentrifuge kann eindeutig als am einfachsten zu bedienendes System eingestuft werden. Hierbei werden die Proben auf einer Mikrotiterplatte aufgefangen und sind somit leichter in der Handhabung. Ein weiterer Vorteil der Zentrifuge ist, dass die Möglichkeit gegeben ist, vier Mikrotiterplatten auf einmal zu zentrifugieren, so dass mehrere *8-strips* gleichzeitig bearbeitet werden können, wobei hier aber die gleichen Zentrifugationsbedingungen vorliegen müssen.

Die Bestimmung der Bindungskapazitäten und Wiederfindungsraten der Q und S-Membranen in *8-strips* erfolgte dann unter Verwendung der Zentrifugeneinheit. Die aufgenommenen Durchbruchkurven sind in Abbildung 16 dargestellt.

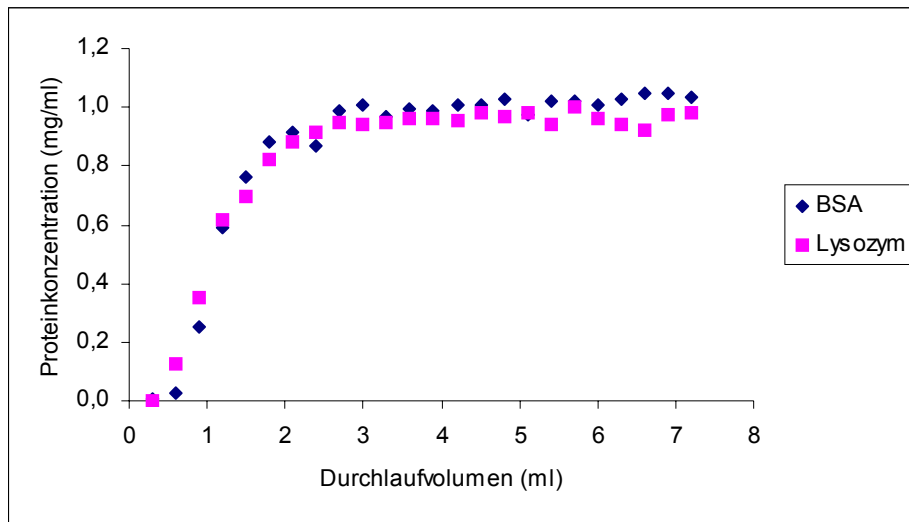


Abbildung 16: Durchbruchkurven für BSA und Lysozym auf Q bzw. S-Membranen.

Wie oben beschrieben wurden die Bindungskapazitäten und Protein-Wiederfindungsraten berechnet. Unter Tabelle 7 fasst die Ergebnisse unter Berücksichtigung der Membranfläche (1,6 cm²) zusammen.

Tabelle 7: Bindungskapazitäten und Wiederfindungsraten für *Vivawell 8-strips*

<i>Membran</i>	<i>Modellprotein</i>	<i>Bindungskapazität [mg/cm²]</i>	<i>Protein- Wiederfindungsrate [%]</i>
Q	BSA	1,02	92
S	Lysozym	0,91	79

Metallchelate-Membranen

Die besondere Affinität der Proteine mit Histidin- oder Cysteinresten gegenüber bestimmten Metallionen macht man sich in der Metallchelatchromatographie zu nutze. Dabei werden die Metallionen auf festen Trägern über chelatisierende Gruppen (IDA oder NTA) gebunden. Die im Rahmen des Projekts entwickelten Membranen sind mit IDA funktionalisiert, das

Übergangsmetallion kann dabei frei gewählt werden.

Die IDA-Membranen wurden direkt zur Aufreinigung von rekombinantem Bgl-His und GFP-His aus Zellkulturüberstand bzw. Zellysate eingesetzt. Dazu wurden die Membranen zuerst mit den Metallionen Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} beladen, um ihre Eignung zur Reinigung und Wiederfindung des zu analysierenden His-tag-Proteins zu testen, wobei sich für diesen Zweck die *8-strips* wieder bewährten. Auf die so vorbereiteten Membranen wurde dann der Kulturüberstand bzw. das Zellysate aufgetragen. Somit konnten acht verschiedene Versuche auf einmal durchgeführt werden, was zu einer deutlichen Reduzierung an Zeit- und Energieaufwand führte. In Abbildung 17 ist das Ergebnis der Aufreinigung von Bgl-His aus dem Zellkulturüberstand und Zellysate dargestellt. Das Bgl-His ist ein intra- und extrazelluläres Protein, das sowohl im Überstand (Spur 2) als auch im Zellysate (Spur 8) gefunden wird. Das Protein konnte mit allen verwendeten Metallionen isoliert werden, über Cu^{2+} (Spur 5 bzw. 11) wurde die größte Proteinmenge gebunden und eluiert. Man sieht jedoch, dass die Elutionen über Kupfer durch andere Proteine verunreinigt sind. Eine Aufreinigung von Bgl-His aus dem Überstand mit Ni^{2+} -Ionen (Spur 3) lieferte bezüglich des Reinigungseffektes die besten Ergebnisse.

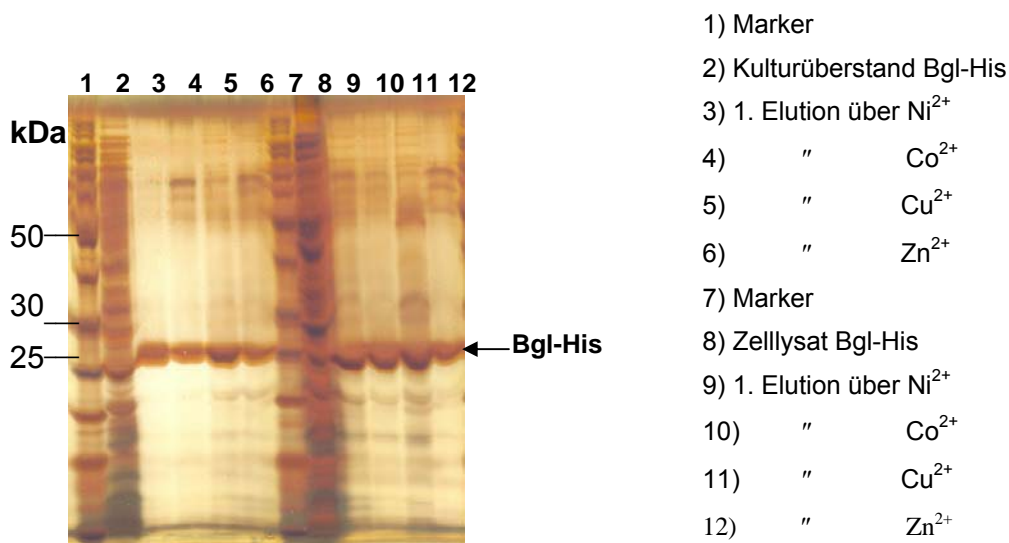


Abbildung 17: Aufreinigung von Bgl-His; 15 %-iges homogenes SDS-PAGE-Gel, Silber gefärbt.

Da GFP-His als intrazelluläres Protein nicht an das Kulturmedium abgegeben wird, wird das Protein aus dem Zellysate isoliert. Für die Aufreinigung von GFP-His scheinen die Co^{2+} -Ionen am geeignetesten zu sein (siehe Abbildung 18, Spur 4). Die Elutionsfraktion enthält nur Spuren von Verunreinigungen.

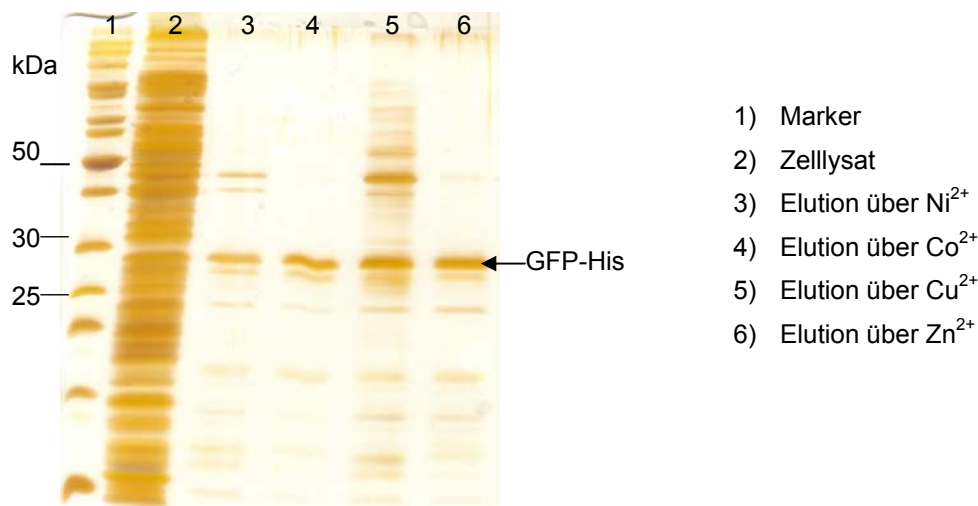


Abbildung 18: Aufreinigung von GFP-His; 15 %-iges homogenes SDS-PAGE-Gel, Silber gefärbt.

Protein A-Membranen

Bei der Aufreinigung von Antikörpern ist die Verwendung von Protein A-Affinitätsmatrices weit verbreitet. Die Bindungsstärke zwischen einem Antikörper und Protein A ist abhängig von der Herkunft (Spezies) und Subklasse des Antikörpers.

Bei der Untersuchung des Bindungs- und Elutionsverhaltens der Protein A-Membran wurde als Antikörper Anti-Fibrinogen verwendet. Der vom Kaninchen stammende Antikörper besitzt eine starke Affinität zu Protein A. Die einzelnen Fraktionen der Bindung und Elution von Anti-Fibrinogen an die Protein A-Membran wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 19) und die Proteinkonzentrationen mit dem BCA- bzw. Coomassie-Test bestimmt.

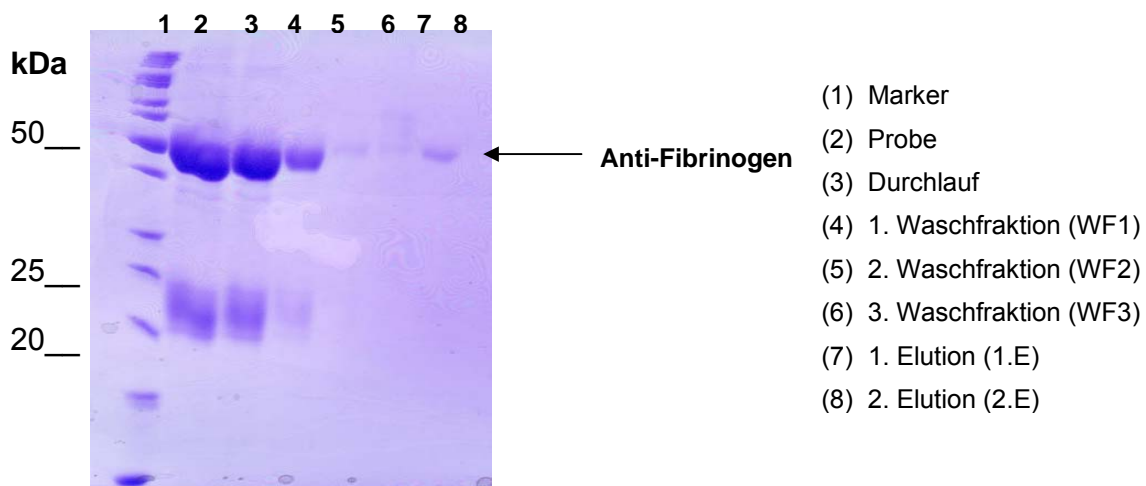


Abbildung 19: Bindung und Elution von Anti-Fibrinogen an Protein A-Membran; 15 %-iges homogenes SDS-PAGE-Gel, Coomassie gefärbt.

Abbildung 19 verdeutlicht, dass die Intensität der Proteinbanden nach jedem Waschschrift abnimmt, bis in der dritten Waschfraktion (Spur 6) fast kein Anti-Fibrinogen mehr zu erkennen ist. Die deutliche Bande in der ersten Elution zeigt, dass geringe Mengen an Anti-Fibrinogen auf der Protein A-Membran gebunden und wieder eluiert werden konnten (Spur 7). Mit den verwendeten Proteintests konnte aber kein Protein in der 1. Elution nachgewiesen werden. Um die Affinität des Antikörpers zu Protein A zu überprüfen, wurden zwei Chromatographie-Säulen (Protein A-Sepharose, Sigma Aldrich; HiTrap™ Protein A, Pharmacia) als Vergleich zum Membranadsorber mit Anti-Fibrinogen beladen. Sowohl anhand der Durchflussmessung während des Chromatographie-Verfahrens als auch mit dem Proteintest konnte festgestellt werden, dass die Bindung und Elution größerer Antikörpermengen über die Säulen möglich war. Der Grund für die schwache Affinität der Protein A-Membran zu Anti-Fibrinogen ist also nicht in der Wahl des Antikörpers begründet. Möglicherweise ist die Protein A-Konzentration auf der Membran gering. Außerdem könnte es beim Herstellungsprozess bei der kovalenten Bindung von Protein A an die Membran zum Verlust dessen biologischer Aktivität gekommen sein oder das aktive Zentrum ist für den Antikörper nur schwer erreichbar. Bei der Herstellung der Protein A-Membranen werden Arbeiten zur Steigerung der Bindungskapazität durchgeführt.

2.3.4 AP 4: Übertragung auf Realmedien am speziellen Beispiel Somatotropin

Neben Überständen aus der in 2.2.2 beschriebenen Kultivierung in Spinnerflaschen, die vom Partner Institut für Technische Chemie durchgeführt wurde, wurden Überstände aus laufenden Fermentationen des Partners CCS verwendet. CCS hat im Laufe der Versuche die Zusammensetzung des Kulturmediums verändert, um die Aufreinigung zu verbessern. Im anfänglich geringe Mengen an Phenolrot enthaltenden Medium wurde das Phenolrot komplett eliminiert. Durch Supplementierung des Basismediums und Änderung der Prozessführung konnte die Produktkonzentration im Kulturüberstand um den Faktor 4 verbessert werden. Zur Aufreinigung stehen nun Überstände mit Titern von 160 µg/ml h-GH zur Verfügung.

Klassische Reinigung

Das bisherige Verfahren zur Aufreinigung von hGH ging über mehrere Stufen, die mit hohen Ausbeuteverlusten einhergingen.

Der Zellkulturüberstand wird in diesem Verfahren zuerst von zellulären Bestandteilen grob befreit. Im Anschluss erfolgt eine Aufkonzentrierung der Überstände durch Cross-Flow-Filtration mit einer Modul Polyethersulfon- (PES-) Membran (MWCO = 5 kDa). Der aufkonzentrierte Überstand wird mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung bei pH 7 und +4°C gefällt. Die Ammoniumsulfatlösung wird mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min unter Rühren zugetropft und anschließend weitere 120 min gerührt. Die so erhaltene Lösung wird 30 min bei +4°C und 15.000 xg zentrifugiert. Das Pellet muss nun in PBS aufgenommen und gegen 50 mM NaPO₄, pH 7,0 und 0,8 M NaCl dialysiert, bzw. mittels Cross-Flow-Einheit umgepuffert werden (Abbildung 20).

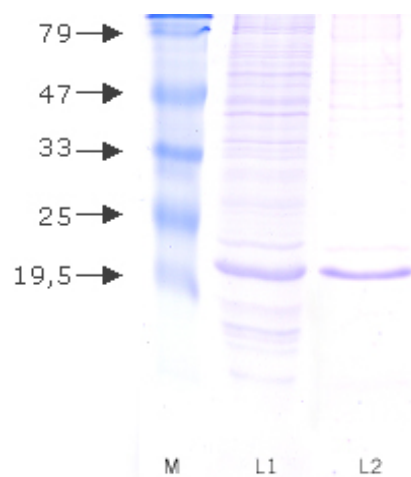


Abbildung 20: SDS-PAGE (15%), homogenes Gel mit Coomassie gefärbt. Marker (M) von Fermentas; ungereinigter Überstand (L1); über Ammoniumsulfatfällung gereinigtes hGH.

Wie in der Abbildung 20 zu sehen ist, konnten Fremdproteine zwar abgereichert werden, aber es sind noch immer relativ viele Verunreinigungen vorhanden. Die Intensität der hGH Banden in L1 und L2 sind vergleichbar, obwohl der Überstand für die Ammoniumsulfatfällung etwa 5-fach aufkonzentriert wurde. Hieraus ergeben sich Verluste von ca. 80%, die bei dieser Reinigungsmethode auftreten.

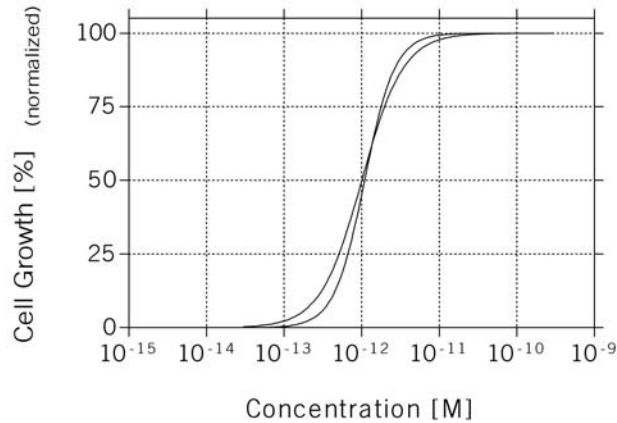
Das so erhaltene Rohprodukt muss nun noch einmal durch eine Gelfiltration endgereinigt werden, so dass am Ende die Gesamtausbeute lediglich 10% beträgt.

Aktivität des gereinigten hGH

Für die pharmazeutische Nutzung des hGH ist seine biologische Aktivität von entscheidender Bedeutung. Um sicherzustellen, dass das Reinigungsverfahren keinen negativen Einfluss auf die Aktivität des hGH hat wurden gereinigte Proben in einem In-vitro-Assay untersucht.

Der hGH-Aktivitäts-Assay basiert auf Nb2-11 Zellen (ECACC No: 97041101), deren Proliferation vom Hormon hGH abhängig ist. Für den Assay werden Zellen aus der Erhaltungskultur mit hGH-freiem Medium gewaschen und in 96well Platten eingesät. Zu den Zellen werden im Anschluss steigende Konzentrationen an hGH Standard (NIBSC Code: 98/574; second International Standard) und analog Verdünnungen des Gereinigten hGHs, zugefügt. Die Konzentration des hGH wird für die Erstellung der Verdünnungsreihe mittels BCA-Assay bestimmt. Bei gleicher Aktivität sollte die Probe, bei gleichen Konzentrationen, die gleiche proliferationsfördernde Wirkung zeigen. Die Auftragung der Wachstumsstimulation in Abhängigkeit von der hGH-Konzentration zeigt, inwieweit das gereinigte Protein in seiner Aktivität dem Standard entspricht. Die Bestimmung des IC_{50} -Wertes mittels nichtlinearer Regression der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve ermöglicht den Vergleich (Abbildung 21).

Response of Nb2-11 cells on hGH - hGH-Bioassay -



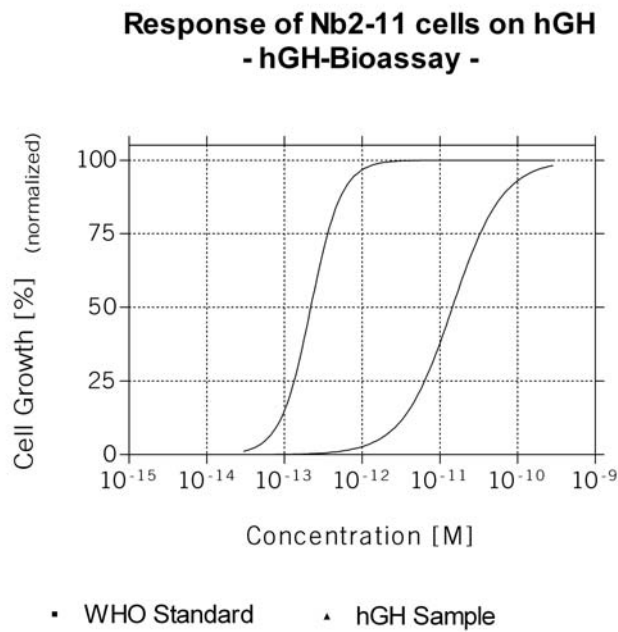
- WHO Standard
- ▲ hGH Sample

	WHO Standard	hGH Sample
Sigmoidal dose-response (variable slope)		
Best-fit values		
BOTTOM	0.0	0.0
TOP	100.0	100.0
LOGEC50	-12.00	-11.96
HILLSLOPE	1.630	2.229
EC50	1.0101e-012	1.0959e-012
Std. Error		
LOGEC50	0.04227	0.04792
HILLSLOPE	0.2362	0.5741
95% Confidence Intervals		
LOGEC50	-12.08 to -11.91	-12.06 to -11.86
HILLSLOPE	1.143 to 2.117	1.046 to 3.412
EC50	8.2626e-013 to 1.2348e-012	8.7312e-013 to 1.3756e-012
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	24	25
R ²	0.9637	0.9318
Absolute Sum of Squares	1632	3206
Sy .x	8.247	11.32
Constraints		
BOTTOM	BOTTOM = 0.0	BOTTOM = 0.0
TOP	TOP = 100.0	TOP = 100.0
Data		
Number of X values	9	9
Number of Y replicates	3	3
Total number of values	26	27
Number of missing values	1	0

Abbildung 21: Bestimmung der Aktivität einer gereinigten hGH Probe im Vergleich zum WHO Standard mittels Nb2-11 Bio-Assay.

Die gereinigte Probe zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit dem WHO Standard. D.h. die Reinigungsmethode ist per se geeignet aktives hGH aus dem Zellkulturüberstand zu isolieren. Leider gibt es immer wieder Chargen, deren Aktivität schlechter ist, als die des

Standards (Abbildung 22). Die Ursache hierfür konnte noch nicht ermittelt werden.



	WHO Standard	hGH Sample
Sigmoidal dose-response (variable slope)		
Best-fit values		
BOTTOM	0.0	0.0
TOP	100.0	100.0
LOGEC50	-12.66	-10.84
HILLSLOPE	2.216	1.338
EC50	2.1977e-013	1.4550e-011
Std. Error		
LOGEC50	0.04092	0.03174
HILLSLOPE	0.4035	0.1175
95% Confidence Intervals		
LOGEC50	-12.74 to -12.57	-10.90 to -10.77
HILLSLOPE	1.385 to 3.047	1.096 to 1.580
EC50	1.8100e-013 to 2.6684e-013	1.2516e-011 to 1.6913e-011
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	25	25
R ²	0.9402	0.9817
Absolute Sum of Squares	2147	785.0
Sy .x	9.268	5.603
Constraints		
BOTTOM	BOTTOM = 0.0	BOTTOM = 0.0
TOP	TOP = 100.0	TOP = 100.0
Data		
Number of X values	9	9
Number of Y replicates	3	3
Total number of values	27	27
Number of missing values	0	0

Abbildung 22: Bestimmung der Aktivität einer weiteren gereinigten hGH Probe im Vergleich zum WHO Standard mittels Nb2-11 Bio-Assay.

Aufreinigung über Membranadsorber

Zur effizienten Aufreinigung von hGH aus Zellkulturüberständen wurden alle entwickelten Membranen getestet.

Vor dem Einsatz wurde der Kulturüberstand unter Verwendung einer *Vivaflow* 50 (Membran 10.000 MWCO RC) Einheit um den Faktor 8 aufkonzentriert.

Zunächst wurde versucht hGH an die Q- und S-Membran zu binden und zu eluieren. Um die optimalen Aufreinigungsbedingungen zu bestimmen wurde nach dem *Scouting*-Protokoll verfahren. Die Proben wurden dabei im Verhältnis 1:5 mit den Bindungspuffern verdünnt. Der Bindungsschritt wurde dreimal durchgeführt, um die Bindungskapazität der Membran trotz geringer Proteinkonzentration ausnutzen zu können. Insgesamt wurden 1200 µl der verdünnten Probe auf die Membran aufgetragen.

Eine optimale Aufreinigung des hGHs gelang bei einem pH-Wert von 4,5 über die S-Membran (Abbildung 23, links). Um das hGH eindeutig zu identifizieren, wurde außerdem ein Westernblot erstellt (siehe Abbildung 17, rechts). Das hGH kann in der 1. und 2. Elution (Spuren 5 und 6) im SDS-PAGE-Gel nachgewiesen werden. In der ersten Elution können keine Verunreinigungen mehr erkannt werden. Im Westernblot ist auch in der 3. Elution (Spur 7) noch hGH zu erkennen. Durch die mehrfache Auftragung der Probe lässt sich sowohl im SDS-PAGE-Gel, als auch im Westernblot eine Aufkonzentrierung des hGHs feststellen (Vergleich: Spur 2 – Spur 5).

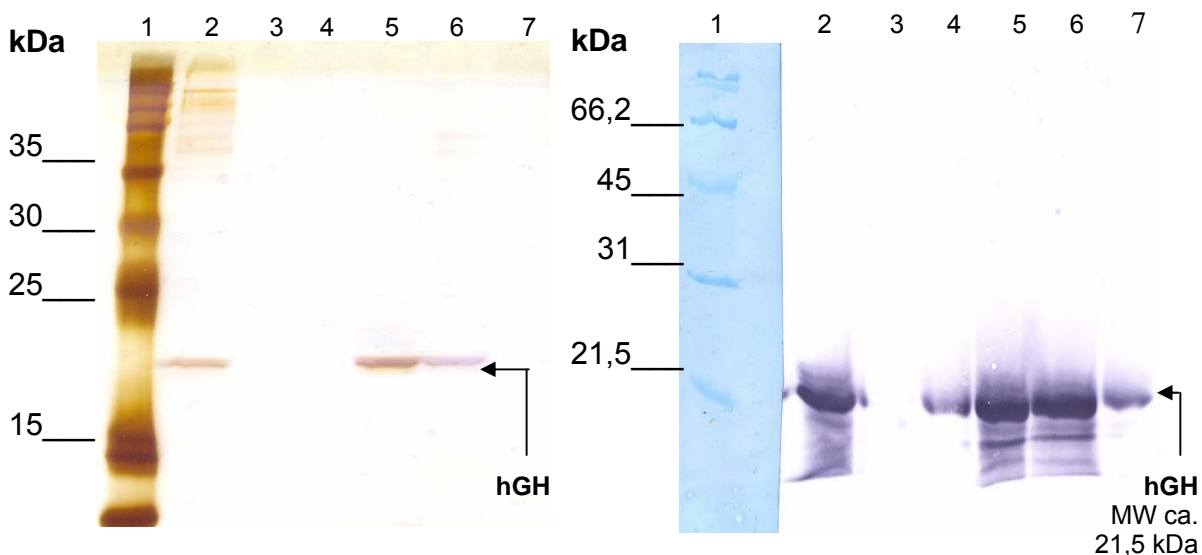


Abbildung 23: links: 15 %-iges homogenes SDS-PAGE-Gel; Coomassie gefärbt, Silber nachgefärbt; rechts: Westernblot, PVDF-Membran, 1. Antikörper: Mouse anti-hGH, 2. Antikörper: Goat anti-Mouse IgG; Spur 1 Coomassie gefärbt; Spuren 2-7 gefärbt mit Alkalischer Phosphatase.

Folgende Fraktionen wurden dabei aufgetragen:

- (1) Marker
- (2) hGH-Überstand 1:5 verdünnt in Bindungspuffer
- (3) 1. Durchlauf
- (4) 1. Waschfraktion
- (5) 1. Elution (300 mM NaCl)
- (6) 2. Elution (600 mM NaCl)
- (7) 3. Elution (900 mM NaCl)

Beim Einsatz von IDA-Membranen zur Reinigung von hGH wurden Ni^{2+} -, Cu^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen getestet. Mit Nickel- und Zinkionen konnte kein hGH an die Membran gebunden werden. Mit Kupfer konnten geringe Mengen an hGH aus dem Überstand aufgereinigt werden.

Die Entwicklung der Antikörper-Membran gegen hGH gelang bisher nicht. Es wurde versucht, *mouse*-anti-hGH an die Protein A- bzw. an die Epoxy-Membran zu binden. Die Bindungskapazität der beiden Membranen ist jedoch bisher noch zu gering. Eine Auswaschung des Antikörpers beim Eluieren von gebundenem hGH konnte nicht verhindert werden. Zur Zeit wird versucht die Bindungskapazität von Epoxy- und Protein A-Membranen zu erhöhen. Außerdem wird mit einem *rabbit*-anti-hGH gearbeitet, der eine deutlich höhere Affinität zu Protein A-Membranen zeigt.

2.3.5 AP 5: Optimierung der Downstreambedingungen im HTDSS

Im HTDSS sollte ein Gemisch aus Modellproteinen über unterschiedlich funktionalisierte Membranen aufgetrennt werden. Da das Unterdrucksystem noch nicht zur Verfügung stand, wurden die Versuche mit 8-strips in der Zentrifuge durchgeführt, wobei hier auch verschiedene Proben mit gleichen Zentrifugationsbedingungen parallel durchgeführt werden konnten, so z.B. die Auftrennung über Q- und S-Membranen bei vier verschiedenen pH-Werten. Auch die Isolierung über die IDA-Membranen unter Verwendung von verschiedenen Metallionen konnte gleichzeitig erfolgen (siehe Abschnitt 2.3.3).

Da bei der Epoxy- und Protein A-Membran keine zufriedenstellenden Ergebnisse erhalten wurden, wurde ein Gemisch aus nur drei Proteinen (BSA, Lysozym, Bgl-His) hergestellt, welches über Q-, S- und IDA-Membranen aufgetrennt werden sollte. Anhand des *Scouting*-Protokolls wurden die optimalen Bedingungen zur Trennung über die Ionenaustauscher ermittelt. Die optimalen Bindungs- und Elutionsergebnisse wurden bei einem pH-Wert von 7,5 erhalten (siehe Abbildung 24).

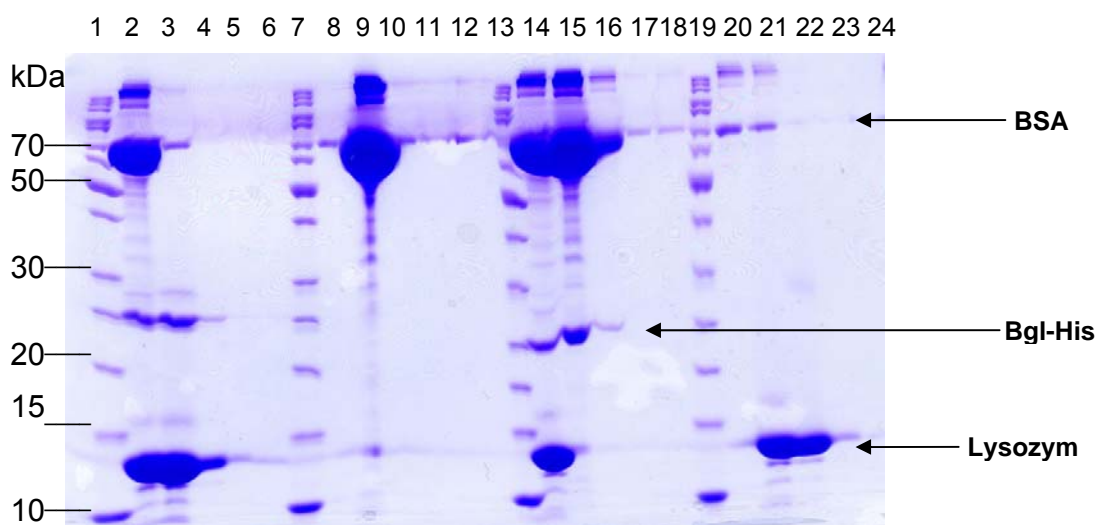


Abbildung 24: Auftrennung des Proteingemischs über Ionenaustauscher bei pH 7,5; 15 %-iges homogenes SDS-PAGE-Gel, Coomassie gefärbt.

Folgende Fraktionen wurden aufgetragen:

(1) Marker		(13) Marker	
(2) Probe in Tris/HCl, pH 7,5: Q-Membran		(14) Probe Tris/HCl, pH 7,5:	S-Membran
(3) Durchlauf	"	(15) Durchlauf	"
(4) Waschfraktion 1	"	(16) Waschfraktion 1	"
(5) Waschfraktion 2	"	(17) Waschfraktion 2	"
(6) Waschfraktion 3	"	(18) Waschfraktion 3	"
(7) Marker		(19) Marker	
(8) 1. Elution (100 mM NaCl)	"	(20) 1. Elution (100 mM NaCl)	"
(9) 2. Elution (300 mM NaCl)	"	(21) 2. Elution (300 mM NaCl)	"
(10) 3. Elution (600 mM NaCl)	"	(22) 3. Elution (600 mM NaCl)	"
(11) 4. Elution (900 mM NaCl)	"	(23) 4. Elution (900 mM NaCl)	"
(12) 5. Elution (1500 mM NaCl)	"	(24) 5. Elution (1500 mM NaCl)	"

Man sieht, dass BSA an die Q-Membran gebunden hat (Vergleich Spur 2 und 3), während Lysozym an die S-Membran gebunden wurde (Vergleich Spur 14 und 15). Bgl-His bleibt in Lösung und kann sowohl im Durchlauf der Q-, als auch im Durchlauf der S-Membran gefunden werden (Spuren 3 und 14). BSA wird mit der zweiten Elution (Spur 9) von der Membran gelöst. Die Elution des Lysozyms von der S-Membran erfolgt im zweiten und dritten Elutionsschritt (Spur 21 und 22). In Spur 22 sind fast keine Verunreinigungen mehr zu erkennen.

Bei der Auftragung des Proteingemischs auf eine mit Kupfer beladene IDA-Membran konnte Bgl-His von BSA und Lysozym abgetrennt werden. Somit konnte jedes Protein aus dem Gemisch mit Hilfe der funktionalisierten Membranen isoliert werden (siehe Abbildung 25).

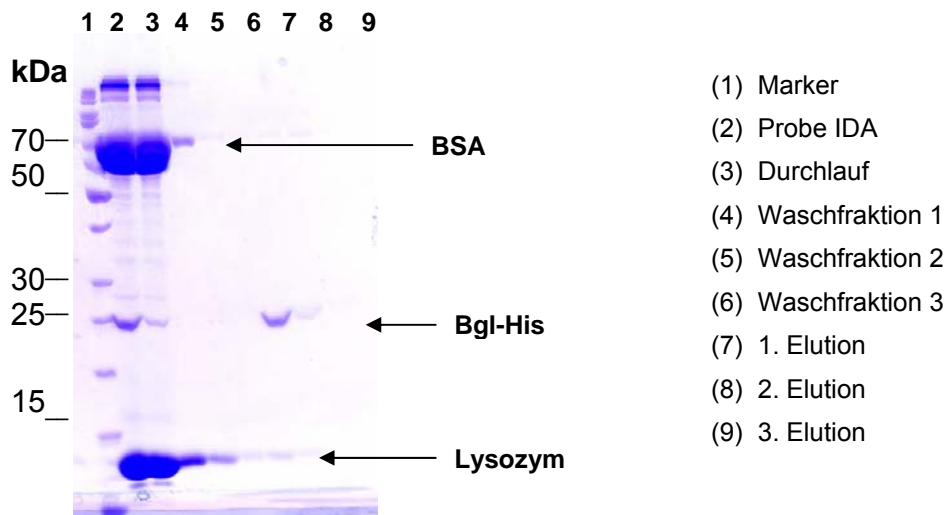


Abbildung 25: Auftragung des Proteingemischs über IDA-Membran; 15 %-iges homogenes SDS-PAGE-Gel, Coomassie gefärbt.

Das Bgl-His wurde aus dem Proteingemisch (Spur 7) isoliert. BSA und Lysozym befinden sich im Durchlauf (Spur 3). Alle drei Proteine im Gemisch konnten also durch den Einsatz spezifischer Membranen isoliert werden.

2.3.6 AP 6 / AP 7: Modellierung des prozessintegrierten Downstreamprocessings

Die entwickelten Module werden bei CCS in verschiedenen Prozessen eingesetzt. Die Prozessmodi werden variiert, um den Einfluss verschiedener Prozessbedingungen auf die Aufarbeitung zu simulieren.

Optimierung des Produktionsprozesses

Das ursprünglich zur hGH Produktion verwendete batch-Verfahren wurde in den letzten Monaten auf ein kontinuierliches Verfahren umgestellt, mit dem deutlich höhere Zelldichten (2×10^7 c/ml) und damit auch Produkttiter erreicht werden können. Im Perfusionsbetrieb wird aus dem Bioreaktor Medium entfernt, das nur wenig zelluläre Bestandteile enthält. Das System ist so aufgebaut, dass der Erntestrom direkt über die Membran geleitet werden kann. Hierdurch ist es möglich, semikontinuierlich Produkt aus dem laufenden Fermentationsbetrieb

aufzureinigen. Nach dem Beladen einer Membran kann auf eine zweite umgeschaltet werden, die während der Wasch- und Elutionsschritte beladen wird.

Durch die kontinuierliche Prozessführung, die mehrere Monate ununterbrochen betrieben werden kann, wird die Auslastung des Fermenters optimiert. Standzeiten durch Reinigung und Sterilisation sind minimiert. Die Ernte erfolgt kontinuierlich und mit höheren Titern, als im Batch-Verfahren. Durch die schnelle Aufbereitung der Fermentationsüberstände ist das Produkt nur kurze Zeit mit Medienbestandteilen, Stoffwechselprodukten und zellulären Bestandteilen in Kontakt. Hervorzuheben sind hier vor allem zelluläre Proteasen, die während des Prozesses ins Medium freigesetzt werden. Die Membranen bieten hier eindeutig einen Vorteil, da im klassischen Reinigungsverfahren immer erst Überstand gesammelt werden muss, um die Reinigung durchzuführen. Das Produkt wird dabei erst viele Stunden später isoliert und von dem undefinierten Kulturüberstand getrennt.

Ein weiterer positiver Nebeneffekt sind die geringeren Reinigungs- und Energiekosten beim kontinuierlichen Prozess.

2.3.7 AP 8: Upscaling in den Produktionsbereich

Die Erkenntnisse, der im Bericht beschriebenen Arbeiten und Ergebnisse, werden in der zukünftigen Reinigungsprozedur umgesetzt. Die sehr gute Reinheit des rohgereinigten Produktes erleichtert die Endreinigung enorm.

Für die direkte Einbindung der Module in den Produktionsprozess bedarf es zwar noch einiger Experimente und Modifikationen, doch sind derzeit keine Gründe offensichtlich, die eine Einbindung verhindern könnten.

2.4 Diskussion

Vergleich von Membranadsorbern mit konventionellen, kommerziell erhältlichen Chromatographiesäulen

Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten wurden auch drei Chromatographiesäulen zur Isolierung von Proteinen eingesetzt: Die Affinität von Protein A zu Anti-Fibrinogen wurde mit Protein A-Sepharose-Säule von der Firma Sigma-Aldrich und HiTrap™ Protein A von der

Firma Pharmacia überprüft. Zur Isolierung größerer Mengen an Bgl-His aus dem Zellkulturüberstand wurde eine *His•Bind Quick Column* von der Firma Novagen verwendet.

Vergleicht man die Chromatographie-Säulen bezüglich ihrer Bindungskapazität mit den Membranadsorbern, so stellt man unterschiedliche Ergebnisse für die verschiedenen Funktionalitäten fest. So konnten beim IDA-Membranadsorber 83 $\mu\text{mol Ni}^{2+}/\text{ml}$ Bettvolumen immobilisiert werden, während die Nickel-Bindungskapazität der Chromatographie-Säule von der Firma Novagen mit 15 $\mu\text{mol Ni}^{2+}/\text{ml}$ Partikelvolumen angegeben wird. Dementsprechend ist auch die Proteinbindungskapazität beim Membranadsorber größer.

Im Gegensatz hierzu waren die Bindungskapazitäten der Protein A-Säulen deutlich größer als vom Protein A-Membranadsorber. Ein Nachteil der gepackten Säulen ist, dass die Elution des Zielproteins nur mit großen Mengen Pufferlösung gelingt, da die Proteine durch innerhalb der porösen Partikel nur durch Diffusion transportiert werden. So wurden z.B. 5 Säulenvolumen (5 ml) Elutionspuffer benötigt, um etwa 90 μg Anti-Fibrinogen von der Sepharose-Säule zu lösen. Im Gegensatz dazu können Proteine beim Einsatz von Membranadsorbern schon mit 400 μl Pufferlösung eluiert werden. Daher können Membranadsorber auch zur Aufkonzentrierung von Zielproteinen eingesetzt werden. Ein Vorteil der Protein A-Säulen war, dass sie an die FPLC angeschlossen werden konnten und somit der Chromatographie-Prozess automatisiert ablief und mittels Durchflussmessung *online* verfolgt werden konnte. Bei der *His•Bind Quick Column* wurde eine Vakuumeinheit verwendet, bei der die Fließgeschwindigkeit schwer einzustellen war und mittels einer Stoppuhr kontrolliert werden musste. Durch die Einsetzbarkeit in der Zentrifuge sind die Membranadsorbereinheiten einfacher zu handhaben.

Je nach Aufgabenstellung erscheint somit der Einsatz von Membranadsorbern oder chromatographischen Methoden für ein Trennproblem geeignet. Dies sollte im Einzelfall entschieden werden, da jede Methode ihre Vorteile hat. Hingegen ist der Einsatz von modularen Membranadsorbern für das HTDSS-Screening z.B. von Downstreambedingungen konkurrenzlos und nicht mit Chromatographiesäulen zu verwirklichen. Hier etabliert sich ein wichtiger Bereich zur Testung und Optimierung der Aufarbeitungsbedingungen, selbst wenn im Einzelfall nach Ermittlung optimaler Parameter auf herkömmliche Säulenmaterialien zurückgegriffen wird. Denn die Minimierung der Arbeitszeiten, der Verbrauchsmaterialien und der Reststoffströme, sowie das schnelle Auffinden von Aufarbeitungsparametern stellen eine der größten Herausforderungen im Bereich des Downstreamings biologischer Target-Moleküle dar.

2.5 Soll-/Ist-Vergleich

Arbeitspakete

AP-Nr.	Arbeitspaket (AP)	Soll/Ist	Monate																											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26		
1	Konzeption und Entwicklung der Basismembran (alle Partner)	Soll	█																											
		Ist	←														→													
2	Entwicklung und Beschreibung der Module (Kapsule) (Sartorius, TCI)	Soll																												
		Ist	←						→																					
3	Entwicklung und Testung der funktionalisierten Membranmodule mit Modellsystemen (alle Partner)	Soll																												
		Ist	←				→																							
4	Übertragung auf Realmedien am speziellen Bsp. Somatotropin (alle Partner)	Soll																												
		Ist	←								→																			
5	Optimierung der Downstreambedingungen im HTDSS (TCI, CCS)	Soll																												
		Ist	←			→																								
6	Prozessintegriertes Downstreamprocessing (Sartorius, TCI, CCS)	Soll																												
		Ist	←										→																	
7	Modellierung des Downstreamprozesses (TCI, CCS)	Soll																												
		Ist	←																				→							
8	Upscaling in den Produktionsbereich (Sartorius, CCS)	Soll																												
		Ist	←																		→									
	Koordination & Berichterstellung (TCI)	Soll	█																											
		Ist	←												→															

Aufgrund einem verzögerten internen Projektbeginn, der durch die Neueinstellung wissenschaftlicher Mitarbeiter bedingt war, kam es zu einer ca. 2-monatigen Verschiebung in der Bearbeitung und im Abschluss der einzelnen Arbeitspakete. Dies ist in der Prognose dargestellt. Das Projekt wurde dann im Rahmen einer kostenneutralen Verlängerung, die zu gegebener Zeit beantragt wurde, abgeschlossen.

2.6 Öffentlichkeitsarbeit

2004, Bioperspectives

Human growth hormone (hGH) purification from CHO cell culture supernatant using membrane adsorber based centrifugal devices *Poster*

J. Walter, K. Suck, A. Tappe, C. Kasper, R. Zeidler, A. Kocourek, T. Scheper

2004, Dechema-Tagung "Simultane und integrierte Bioprozessentwicklung"

(Bio-)modifizierte Membranmodule im Downstream-Processing *Poster*

D. Harkensee, T. Scheper, O.-W. Reif, R. Ulber

2005, Bioperspectives

Purification of His₆-tagged β -Glucanase using membrane adsorber based devices *Poster*

Ö. Kökpinar, J. Walter, C. Kasper, R. Zeidler, K. Friehs, T. Scheper

2005, Bioperspectives

Human growth hormone (hGH) purification from CHO-cell culture supernatant *Poster*

A. Tappe, J. Walter, C. Kasper, R. Zeidler, O.-W. Reif, T. Scheper

2005, Bioperspectives

Reversible immobilisation of glycoproteins on biological activated membranes *Vortrag*

D. Harkensee, S. Beutel, T. Scheper, O.-W. Reif, R. Ulber

2005, ESACT

Human growth hormone (hGH) purification from CHO-cell culture supernatant utilizing macroporous chromatographic media *Poster*

J. Walter, A. Tappe, C. Kasper, R. Zeidler, O.-W. Reif, T. Scheper

Veröffentlichungen

Fast and efficient protein purification from complex cell culture samples using membrane adsorber systems

K. Suck, J. Walter, F. Menzel, A. Tappe, C. Kasper, C. Naumann, R. Zeidler, T. Scheper

Eingereicht bei *Journal of Biotechnology*

2.7 Fazit

Die im Rahmen des Projektes geplanten wissenschaftlichen Arbeiten wurden erfolgreich durchgeführt. Die Arbeitspakete, wie die Konzeption und Entwicklung der Basismembranen so wie die Entwicklung, Beschreibung und Testung der Module sind vollständig abgeschlossen. So liegen derzeit funktionsfähige Membranmodule im 8-er Streifen Format vor. Diese *8-strips* sind mit üblicherweise verwendeten 96-well-Mikrotiterplatten kompatibel und bilden die Basis für das HTDSS. Auch die verfahrenstechnischen Probleme (wie Prozessführung durch Unterdruck, Überdruck oder Zentrifugation) wurden intensiv bearbeitet. Eine Vielzahl verschiedener Oberflächenfunktionalitäten der Membranen wurde generiert und an Standards und auch Realproben getestet. Die Membranmodule kamen insbesondere bei der Aufreinigung von hGH aus dem Zellkulturüberstand zum Einsatz. Anstatt des kosten- und ressourcenintensiven herkömmlichen Verfahrens konnte so auf ein schnelles und einfaches Verfahren zurückzugriffen werden.

Insgesamt verlief die Kooperation der Projektpartner problemlos. Alle benötigten Membranen und –Modulentwürfe sowie die Proben der Kultivierungen wurden zeitnah ohne Umstände in den benötigten Quantitäten zur Verfügung gestellt. Verschiedene Projekttreffen der Partner ermöglichten diese gute Zusammenarbeit und erleichterten maßgeblich die Koordination des Vorhabens.

Die im Projekt benannten Arbeitspakete wurden in der Projektlaufzeit von 2 Jahren, unter Berücksichtigung einer kostenneutralen Verlängerung aufgrund des um 2 Monate verzögerten internen Projektbeginns, bis auf das letzte Arbeitspaket vollständig abgeschlossen.

Das Vorhaben wird auch über die Projektlaufzeit hinaus weitergeführt: Das Up-scaling in den Produktionsbereich bei der Aufreinigung von hGH wird auch nach Ende des Projektes intensiv bearbeitet. Zur schnellen Ermittlung der optimalen Aufreinigungsparameter verschiedener Zielproteine wird das HTDS-System weiterhin verstärkt eingesetzt. Mit den im Bereich der Membranentwicklung gewonnenen Erkenntnissen werden auch in Zukunft weitere Funktionalisierungsversuche durchgeführt.

3. Literaturangaben

- [1] F. Lottspeich, H. Zorbas; *Bioanalytik*; Spektrum Akademischer Verlag (1998)
- [2] www.roemp.com
- [3] E. L. V. Harris, S. Angal; *Protein Purification Methods – A Practical Approach*; Oxford University Press (1989)
- [4] V. I. Muronetz, M. Sholukh, T. Korpela; *Use of protein – protein interactions in affinity chromatography*; *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*; **49** (2001)
- [5] V. I. Muronetz, T. Korpela; *Isolation of antigens and antibodies by affinity chromatography*; *Journal of Chromatography B*; **790, 1-2** (2003)
- [6] T. Burnouf, M. Radosevich; *Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use*; *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*; **49** (2001)
- [7] M. A. Firer; *Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography*; *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*; **49** (2001)
- [8] That T. Ngo; *Molecular interactions in Bioseparations*; Plenum Press, New York (1993)
- [9] J. Turková; *Bioaffinity chromatography*; Elsevier (1993)
- [10] E. K. M. Ueda, P. W. Gout, L. Morganti; *Current and prospective applications of metal ion-protein binding*; *Journal of Chromatography A*; **998 1**, (2003), 1
- [11] F. H. Arnold; *Biotechnology*; **9** (1991) 151
- [12] L. Kågedal; J. C. Janson, L. Ryden; *Protein Purification: Principles, High-Resolution Methods, and Applications*; Wiley-VCH, New York (1998) 311
- [13] J. Liesienė, K. Račaitytė, M. Morkevičienė, p. Valančius, V. Bumelis; *Immobilized metal affinity chromatography of human growth hormone – Effect of ligand density*; *Journal of Chromatography A*; **764** (1997) 27
- [14] B. C. Cunningham, S. Bass, G. Fuh, J. A. Wells; *Science*; **250** (1990) 1709
- [15] R. Ghosh; *Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges*; *Journal of chromatography A*; **952** (2002)
- [16] G. T. Hermanson, A. K. Mallia, P. K. Smith; *Immobilized affinity ligand techniques*; Academic Press; (1992)
- [17] H. Zou, Q. Luo, D. Zhou; *Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins*; *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*; **49** (2001)
- [18] Maria Teresa C.P. Ribela, Peter W. Gout, Paolo Bartolini, *Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituitary hormones*, *Journal of Chromatography B*, **790 1-2** (2003) 285

- [19] J.D. Dyr, J. Suttner, Journal of Chromatography; **699** (1997) 383
- [20] J.E. De Oliveira, C. R. J. Soares, C. N. Peroni, E. Gimbo, I. M. C. Camargo, L. Morganti, M. H. Bellini, R. Affonso, R. R. Soares, P. Bartolini, M. T. C. P. Ribela, Journal of Chromatography A; **852** (1999) 441
- [21] Pier Giorgio Righetti, Elisabeth Wensch; *PRIME purification of recombinant human growth hormone*
- [22] K. Itakura, T. Hirose, R. Crea, A. Riggs, H. L. Heyneker, F. Bolivar, H. Boyer; Science; **198** (1977) 1056
- [23] M.T.C.P. Ribela, I.M.C. Camargo, J.E. Oliveira and P. Bartolini. Protein Exp. Purif.; **18** (2000) 115
- [24] G.L. Gray, J.S. Baldrige, K.S. Mc Keown, H.L. Heyneker and C.N. Chang; Gene; **39** (1985) 247
- [25] P. Gellerfors, G. Eketorp, K. Fohlenhag, B. Pavlu, S. Johansson, L. Fryklund; *Characterization of a secreted form of recombinant derived human growth hormone, expressed in Escherichia coli cells*; J. Pharm. Biomed. Anal.; **7 (2)** (1989) 173
- [26] D. Malamud, J. W. Drysdale; Anal. Biochem; **86** (1978) 620