

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Proteinchromatographie und anschließende Analysemethoden in der pharmazeutischen Biotechnologie	1
1.1.1	Die Hydrophobe Wechselwirkungschromatographie als Trennprinzip in der Proteinchromatographie	1
1.1.2	Analysemethoden in der Proteinchromatographie	2
1.1.3	Konfokale Laser Raster Mikroskopie als Analysemethode	3
1.1.4	Das Konzept des ‚Design Space‘ und der ‚Quality by Design‘ (QbD)-Zulassung von Biopharmazeutika	3
1.2	Zielsetzung und Aufgabenstellung	6
2	Theoretische Grundlagen	8
2.1	Grundlagen der Proteinchromatographie	8
2.1.1	Definition	8
2.1.2	Betriebsweisen	8
2.1.3	Trennprinzipien	12
2.1.4	Adsorption	13
2.1.5	Stofftransport in Flüssigphasen	17
2.2	Erstellung des Bilanzmodells für einen Einzelpartikel	20
2.2.1	Definition des effektiven Porendiffusionskoeffizienten	21
2.2.2	Erweiterung des effektiven Porendiffusionskoeffizienten	24
2.2.3	Differentielle Massenbilanzen	25
2.3	Eigenschaften wässriger Lösungen	27
2.3.1	Lösungseigenschaften von Wasser	28
2.3.2	Hydrophobizität von Proteinen	31
		I

2.3.3	Eigenschaften biochemischer Puffer	31
2.4	Optische Eigenschaften von Molekülen und deren Detektion	33
2.4.1	Lichtextinktion	33
2.4.2	Fluoreszenz	35
2.4.3	Konfokale Laser Raster Mikroskopie (CLSM)	37
3	Material und Methoden	44
3.1	Materialien	44
3.1.1	Proteine	44
3.1.2	Fluorophore	45
3.1.3	Adsorbentien	48
3.1.4	Puffersysteme	48
3.2	Experimentelle Methode	50
3.2.1	Probenvorbereitung	50
3.2.2	Experimente im Säulenmodus	54
3.2.3	Experimente im Shallow Bed Modus	59
3.2.4	Experimente im Finite Bath Modus	61
3.3	Erstellung intrapartikulärer Konzentrationsprofile	74
3.3.1	Radiale Mittelung des gemessenen Fluoreszenzsignals	75
3.3.2	Korrektur der Lichtabschwächung	76
3.3.3	Erstellung absoluter intrapartikulärer Konzentrationsprofile	78
4	Ergebnisse	80
4.1	Löslichkeiten der Proteine in verschiedenen HIC Puffersystemen	80
4.2	Einfluss der Proteinmarkierung mit Fluorophoren auf das Adsorptionsverhalten	81
4.2.1	Dynamische Sorptionsstudien im Säulenmodus mit indirekter Analyse	82

4.2.2	Sorptionsstudien im Shallow Bed Modus mittels direkter und indirekter Analyse	88
4.2.3	Sorptionsstudien im Finite Bath Modus mittels direkter und indirekter Analyse	92
4.3	Simulation der intrapartikulären Proteinkonzentration	97
4.3.1	Einfache Porendiffusionsbehinderung	97
4.3.2	Erweiterte Porendiffusionsbehinderung	101
4.4	Einfluss chromatographischer Prozessparameter auf die Adsorptionseigenschaften der untersuchten HIC-Systeme.	105
4.4.1	Kosmotrope Salze: Position in der Hofmeister-Reihe und Konzentrationseffekte von NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	106
4.4.2	Ligandendichte: Phenyl-Liganden auf Sepharose 6 FF Partikeln	116
4.4.3	Proteinhydrophobizität & -größe: Charakterisierung anhand verschiedener Kennzahlen	119
5	Diskussion und Ausblick	123
5.1	Limitierungen der CLSM Analyse im Finite Bath Modus	124
5.1.1	Optische Messartefakte bei der Messung der Fluoreszenzintensität mit der CLSM	126
5.1.2	Kompetitives Adsorptionsverhalten von markierten und unmarkierten Proteinen	130
5.1.3	Fazit für die untersuchten HIC Systeme	133
5.1.4	Aliquotierung der Adsorbenspartikel für die Finite Bath Messungen	136
5.1.5	Normierung der Radien der direkt analysierten Partikel	141
5.2	Aussagekraft der CLSM für die Charakterisierung von HIC-Systemen	146

5.2.1	Wertigkeit der CLSM Daten und des Erweiterten Porendiffusionsmodells für die Charakterisierung von HIC Systemen	146
5.2.2	Experimenteller Nachweis von Strukturänderungen bei der Adsorption von Proteinen	152
5.3	Ausblick	156
5.3.1	Charakterisierung der strukturellen Eigenschaften der Protein-Adsorptiva	156
5.3.2	Weiterführende Charakterisierung der unterschiedlichen Ergebniskategorien eines formal gleichen chromatographischen Systems	159
6	Anhang	161
6.1	Parameter aus den Isothermen- und Kinetikmessungen	161
6.2	Verzeichnisse verwendeter Materialien	164
6.2.1	Herstellerverzeichnis	164
6.2.2	Geräteverzeichnis	164
6.2.3	Chemikalienverzeichnis	166
7	Literaturverzeichnis	172