

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

XII

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Struktur und Funktion von Antikörpern und deren Rolle im pharmazeutisch/diagnostischen Bereich . . . . .	4
1.2	Grundlagen der Flüssigchromatographie . . . . .	9
1.2.1	Chromatographische Kenngrößen . . . . .	11
1.2.2	Dynamische Theorie in der Chromatographie . . . . .	14
1.3	Mischmodale Interaktionschromatographie an Apatitphasen . . . . .	17
1.3.1	Struktur und Interaktionsmechanismus von Apatitphasen . . . . .	17
1.3.2	Apatitphasen in der Antikörperaufreinigung . . . . .	21
1.4	Fragestellung und Zielsetzung der Dissertation . . . . .	24
<b>2</b>	<b>Charakterisierung der Interaktionspartner Apatit/anti-RhD IgG<sub>1</sub></b>	<b>27</b>
2.1	Einleitung . . . . .	27
2.2	Material und Methoden . . . . .	28
2.2.1	Apatitcharakterisierung . . . . .	28
2.2.1.1	Partikelgrößenverteilung . . . . .	29
2.2.1.2	Porengrößenbestimmung . . . . .	29
2.2.1.3	ζ-Potential-Bestimmung der Apatitphasen . . . . .	29
2.2.2	Antikörperproduktion und -aufreinigung . . . . .	30
2.2.2.1	Säugerzellkultivierung (Vorkultur) . . . . .	31
2.2.2.2	Batchkultivierung in Spinnerflaschen . . . . .	31
2.2.2.3	Bestimmung der Zellzahl und -vitalität . . . . .	32
2.2.2.4	Antikörperaufreinigung . . . . .	32

2.2.3	Antikörpercharakterisierung . . . . .	33
2.2.3.1	Massenspektrometrische Messungen . . . . .	33
2.2.3.2	Isoelektrische Fokussierung (IEF) . . . . .	34
2.2.3.3	$\zeta$ -Potential-Bestimmung des Modellantikörpers anti-RhD IgG <sub>1</sub> . . . . .	35
2.2.3.4	Proteinmodellierung des Modellantikörpers anti-RhD IgG <sub>1</sub> . . . . .	36
2.2.3.5	Modellierung des molekularen elektrostatischen Potentials . . . . .	37
2.2.3.6	Bestimmung der Nettooberflächenladung des Modellan- tikörpers anti-RhD IgG <sub>1</sub> . . . . .	38
2.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	40
2.3.1	Bewertung des Massentransports bzw. der fluidodynamischen Eigen- schaften chromatographischer Apatitphasen . . . . .	40
2.3.2	Interaktionsbestimmende Eigenschaften der untersuchten kerami- schen Apatitphasen . . . . .	45
2.3.3	Proteinbiochemische Charakterisierung des Modellantikörpers anti- RhD IgG <sub>1</sub> . . . . .	50
2.3.4	Das Zetapotential des Modellantikörpers anti-RhD IgG <sub>1</sub> . . . . .	54
2.3.5	Proteinmodellierung und Ladungsverhalten des Modellantikörpers anti-RhD IgG <sub>1</sub> . . . . .	56
2.3.6	Elektrostatische Berechnungen am Proteinmodell des anti-RhD IgG <sub>1</sub> . . . . .	66
2.3.7	Zusammenfassung und Schlussfolgerung . . . . .	73
<b>3</b>	<b>Das Potential von Apatitphasen zur Aufreinigung von Antikörpern</b> . . . . .	<b>75</b>
3.1	Einleitung . . . . .	75
3.2	Material und Methoden . . . . .	78
3.2.1	Proteinanalytik . . . . .	78
3.2.1.1	Proteinkonzentrationsbestimmung . . . . .	78
3.2.1.2	Proteinkonzentrationsbestimmung via Bicinchonininsäure- Assay . . . . .	78

3.2.1.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	79
3.2.1.4	Sandwich-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) . . . . .	80
3.2.2	Chromatographische Methoden . . . . .	81
3.2.2.1	Protein A Affinitätschromatographie . . . . .	82
3.2.2.2	Isolierung des anti-RhD-IgG mittels Protein G Affinitätschromatographie . . . . .	83
3.2.2.3	Packprotokoll der Apatitsäulen . . . . .	84
3.2.2.4	Hydroxyl-/Fluorapatitchromatographie von Zellkulturüberständen . . . . .	84
3.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	87
3.3.1	Aufreinigung des Modellantikörpers anti-RhD IgG <sub>1</sub> mittels Protein A/G Affinitätschromatographie . . . . .	87
3.3.2	Aufreinigung des Modellantikörpers anti-RhD IgG <sub>1</sub> mittels Hydroxylapatit-Chromatographie . . . . .	93
3.3.3	Aufreinigung des Modellantikörpers anti-RhD IgG <sub>1</sub> mittels Fluorapatit-Chromatographie . . . . .	96
3.3.4	Einfluss des pH sowie der Ionenkonzentration auf die Retention . . . . .	99
3.3.5	Zusammenfassung und Schlussfolgerung . . . . .	107
<b>4</b>	<b>Untersuchung des Interaktionsmechanismus von Apatitphasen</b> . . . . .	<b>111</b>
4.1	Einleitung . . . . .	111
4.2	Material und Methoden . . . . .	113
4.2.1	Biochemische Methoden . . . . .	113
4.2.1.1	Papainverdau . . . . .	113
4.2.1.2	Deglykosilierung der IgG <sub>1</sub> -Fc-Fragmente . . . . .	114
4.2.1.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	114
4.2.2	Peptidsynthese . . . . .	115

4.2.3	Chromatographische Methoden . . . . .	116
4.2.3.1	Hydroxyl-/Fluorapatitchromatographie von [Lys-Gly] <sub>5</sub> und [Asp-Gly] <sub>5</sub> . . . . .	117
4.2.3.2	Gelfiltrationschromatographie . . . . .	118
4.2.3.3	Kationenaustauschchromatographie . . . . .	119
4.2.3.4	Fluorapatitchromatographie im HEPES-Puffersystem . . .	120
4.2.3.5	Hydroxyl-/Fluorapatitchromatographie mittels Boratsystem	121
4.2.3.6	Hydroxyl-/Fluorapatitchromatographie von Fab/Fc- Fragmenten . . . . .	122
4.2.3.7	Fluorapatitchromatographie im pH-Elutions-Modus . . .	122
4.2.3.8	Hydroxyl-/Fluorapatitchromatographie (CHT/CFT vs. CFT-Prototyp) . . . . .	123
4.2.4	Isothermenniessung (statisch) . . . . .	124
4.2.5	Lineare Gradientenelution . . . . .	125
4.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	126
4.3.1	Interaktion von [Lys-Gly] <sub>5</sub> und [Asp-Gly] <sub>5</sub> mit keramischen Fluora- patit . . . . .	126
4.3.2	Interaktion des Modellantikörpers anti-RhD IgG <sub>1</sub> und seiner Frag- mente mit chromatographischen Apatitphasen . . . . .	134
4.3.3	Einfluss der Hydroxylgruppen auf den Interaktionsmechanismus Apatit/Protein . . . . .	151
4.3.4	Anwendbarkeit von Adsorptionsmodellen für Apatitphasen . . . .	156
4.3.4.1	Langmuir-Approximation für statische Batch-Isothermen .	156
4.3.4.2	Lineare Gradientenelution nach Yamamoto . . . . .	159
4.3.5	Zusammenfassung und Schlussfolgerung . . . . .	165
5	Schlussfolgerung und Ausblick . . . . .	168
6	Literaturverzeichnis . . . . .	172