

# Matrix gestützte Polymernetzwerke für die Anwendung in der konvektiven präparativen Chromatographie

# Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

"Doctor rerum naturalium"

der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm Chemie

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

M. Sc. Adrian Ley

aus Dieburg

Göttingen, 2018

# Betreuungsausschuss

Prof. Dr. Philipp Vana	Makromolekulare Chemie, Institut für Physikalische Chemie		
	Georg-August-Universität Göttingen		
Prof. Dr. Claudia Steinem	Biomolekulare Chemie, Institut für Organische und		
	Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen		
Mitglieder der Prüfungskon	nmission		
Referent:			
Prof. Dr. Philipp Vana	Makromolekulare Chemie, Institut für Physikalische Chemie,		
	Georg-August-Universität Göttingen		
Korreferentin:			
Prof. Dr. Claudia Steinem	Biomolekulare Chemie, Institut für Organische und		
	Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität Göttingen		
Weitere Mitglieder der Prüf	ungskommission:		
Prof. Dr. Burkhard Geil	Biophysikalische Chemie, Institut für Physikalische Chemie,		
	Georg-August-Universität Göttingen		
Prof. Dr. Michael Buback	Technische und Makromolekulare Chemie, Institut für		
	Physikalische Chemie, Georg-August-Universität Göttingen		
Dr. Franziska Thomas	Chemische Biologie und Peptid Design, Institut für Organische		
	und Biomolekulare Chemie, Georg-August-Universität		
	Göttingen		
Dr. Sebastian Kruss	Nanobiotechnologie, Institut für Physikalische Chemie,		
	Georg-August-Universität Göttingen		

Tag der mündlichen Prüfung: 08.01.2019

# Vorwort

Diese Arbeit wurde im Zeitraum vom 01.07.2016 bis zum 05.11.2018 im Arbeitskreis für Makromolekulare Chemie von Herrn *Prof. Dr. Philipp Vana*, MBA, am Institut für Physikalische Chemie der Georg-August-Universität Göttingen und der Abteilung Membranchromatographie und Modifizierung von Herrn *Dr. Volkmar Thom* bei der *Sartorius Stedim Biotech GmbH* in Göttingen geschrieben. Auszüge dieser Arbeit sind bereits im *Journal of Membrane Science*<sup>1</sup> sowie als Patentschrift<sup>2</sup> veröffentlicht. Meiner Ehefrau

## Zusammenfassung

Durch die Entwicklungen in der Produktion von Biopharmazeutika und der zunehmend steigenden Nachfrage, aufgrund vermehrter Applikationsgebiete, insbesondere für den Einsatz monoklonaler Antikörper (mAb`s), ist die Aufreinigung (*Downstream*) dieser Produkte in den letzten Jahren zu einer limitierenden Komponente geworden. Bei der Herstellung solcher Biopharmazeutika (*Upstream*) konnten erstaunliche Fortschritte in Bezug auf die erreichten Titer erzielt werden, wodurch die Aufreinigung zum teuersten Schritt der gesamten Produktion geworden ist. Üblicherweise werden für die Aufreinigung dieser Produkte chromatographische Verfahren genutzt. Wobei die Affinitätschromatographie im *product capture* einen wesentlichen Schritt darstellt, da in einer Basisoperation eine Reinheit von bis zu >99 % erreicht werden kann.

Hierbei wird am weitaus häufigsten auf stationäre Phasen in Form von porösen Partikeln zurückgegriffen. Diese haben sich in den letzten Jahrzehnten bewährt, verfügen über hohe spezifische Oberflächen und folglich hohe Proteinbindungskapazitäten. Die immer weiter steigende Nachfrage und die Fortschritte im *Upstream* lassen diese Technologie allerdings sowohl physiko-chemisch, als auch apparativ, an ihre Grenzen stoßen.

Die Entwicklung alternativer stationärer Phasen ist somit ein wesentlicher Weg dieser technischen Limitierung zu entgehen und die Chromatographie als Basisoperation im *Downstream* rentabler zu machen.

In dieser Arbeit werden zwei Verfahren zur Herstellung solcher alternativer stationärer Phasen vorgestellt und diese auf ihre physiko-chemischen Eigenschaften sowie auf ihre Verwendung im *product capture* Schritt hin untersucht.

Dabei kann gezeigt werden, dass eine Modifizierung von Zellulosemembranen mit globulären Polymernetzwerkstrukturen über eine verdünnte Fällungspolymerisation zu einer Steigerung der spezifischen Oberfläche und gleichzeitiger Funktionalisierung solcher Membranen führt. Die Morphologie der globulären Polymernetzwerkstrukturen ist im Wesentlichen entscheidend für die spätere Leistung solcher modifizierten Membranen. Es wird gezeigt, dass die Morphologie über die Zusammensetzung der Polymerisationslösung steuerbar ist. Des Weiteren kann der Einfluss der Ausgangsmembran gezeigt werden. Die Optimierung dieser Eigenschaften, hin zu einer besonders hohen Proteinbindungskapazität bei hohen Permeabilitäten, ergibt, im Vergleich zur unmodifizierten Membran, eine Steigerung der Proteinbindungskapazität um ca. 50 %, während die Permeabilität um lediglich ca. 20 % verringert wird.

Die Herstellung von Membranadsorbern aus Polysaccharid basierten Polymernetzwerken eröffnet hingegen die Möglichkeit die Vorteile von porösen Partikeln, die hohe Oberfläche und damit auch die hohe Proteinbindungskapzität sowie die Vorteile der Membranadsorber, den schnellen Massentransfer, zu kombinieren. Hierbei wird insbesondere die Struktur des Polysaccharid basierten Membranadsorbers untersucht. Es wird gezeigt, dass die entstandenen *flow-through* Poren im Polysaccharid die Eigenschaften dynamische Proteinbindung und Permeabilität maßgeblich beeinflussen. Durch die Struktur der *flow-through* Poren im Polysaccharid membranadsorber ist ein schneller Massentransfer in- und aus dem Meso- bzw. Makroporösen Polysaccharidnetzwerk möglich, welcher zu hohen Proteinbindungen bei hohen Permeabilitäten führt.

Durch die Entkopplung der *flow-through* Porengröße von der spezifischen Oberfläche bzw. der Proteinbindungskapazität ist die sogenannte *trade-off* Kurve für Membranen bei diesem neu entwickelten Membranadsorber nicht mehr gültig.

In einem theoretischen *product capture* Schritt ist zudem dargestellt, dass die Produktivität beider Prototypen signifikant oberhalb der eines chromatographischen Mediums aus porösen Partikeln liegt. In diesem theoretischen Beispiel können Steigerungen der Produktivität (g mAb pro h Prozesszeit) um den Faktor 2,5 (Prototyp Kapitel I, mit Polymernetzwerk modifizierte Membran) bzw. um den Faktor 6,9 (Prototyp Kapitel II, makro- & mesoporöser Polysaccharid Membranadsorber) erzielt werden.

Abschließend wird eine neuartige Methode zur Charakterisierung makroporöser Membranen am Beispiel einer *lateral-flow* Membran beschrieben, welche innerhalb dieser Arbeit auch auf die Polysaccharid Membranadsorber angewendet wird. Die Entwicklung dieser Methode ist für Membranmaterialien, die in getrocknetem bzw. mit Lösungsmittel benetztem Zustand ihre strukturellen Eigenschaften ändern, notwendig. Herkömmliche Methoden arbeiten fast ausschließlich mit getrockneten Proben. Membranen, die für die Aufreinigung von Biopharmazeutika konzipiert sind, sind häufig mit wässrigen Lösungen benetzt. Somit ist eine Methode, welche die Struktureigenschaften auch in benetztem Zustand charakterisieren kann notwendig, um die Struktur der Membran unter applikationsrelevanten Bedingungen zu verstehen. Die Methode baut auf dreidimensionalen Rekonstruktionen der Membranstruktur auf, die durch die Verwendung von *Confocal-Laser-Scanning* Mikroskopie und Bildbearbeitungsverfahren erhalten werden. Die daran anschließende, computergestützte Bildauswertung ist in Zusammenarbeit mit dem *KIT* (Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Angewandte Materialien), innerhalb der dort entwickelten Simulationsumgebung  $PACE3D^{1,3}$ , realisiert worden. Es wird gezeigt, dass mithilfe dieser Methode vergleichbare Ergebnisse zu herkömmlichen Methoden erzielt werden, diese allerdings, aufgrund des dreidimensionalen Charakters der Methode, auch lokal und in jede Raumrichtung auswertbar sind.

#### Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung1
1.1 Herausforderungen und Trends biotechnologischer Prozesse und Downstream
processing therapeutisch wirksamer Biomoleküle1
1.1.1 Grundlagen Biotechnologischer Prozesse und Downstream processing1
1.1.2 Chromatographie als Grundoperation im Downstream processing monoklonaler
Antikörper
1.2 Herausforderungen und Trends chromatographischer Medien4
1.3 Oberflächenmodifizierung chromatographischer Medien7
1.4 Charakterisierung chromatographischer Membranen10
1.5 Problemstellung und Lösungsansatz11
2. Theoretische Grundlagen
2.1 Membranchromatographie zur Aufreinigung therapeutischer Biomoleküle13
2.2 Affinitätschromatographie17
2.3 Strukturparameter chromatographischer Medien19
2.3.1 Lückengrad, Porosität und Porengrößenverteilung19
2.3.2 Spezifische Oberfläche
2.3.3 Ligandendichte
2.4 Polymernetzwerke als chromatographische Medien
2.4.1 Kovalente Methacrylat basierte Polymernetzwerke
2.4.2 Physikalische Polysaccharid basierte Polymernetzwerke
2.5 Confocal-Laser-Scanning (CLS) und Stimulated-Emission-Depletion (STED)
Mikroskopie
2.6 Mathematische Beschreibung von Membranstrukturen im Hinblick auf ihre
chromatographische Leistung L <sub>0</sub>
3. Kapitel I – Oberflächenmodifikation von Zellulosemembranen mittels
Fällungspolymerisation

3.1 Einleitung
3.2 Materialien und Methoden
3.2.1 Materialien
3.2.2 Oberflächenmodifikation mittels Fällungspolymerisation41
3.2.3 Physiko-chemische Charakterisierung44
3.3 Ergebnisse und Diskussion
3.3.1 Theoretische Betrachtung der Problemstellung54
3.3.2 Einfluss der Verdünnung der Polymerisationslösung
3.3.3 Einfluss der Komponenten der Polymerisationslösung
3.3.4 Einfluss des Lösemittelsystems64
3.3.5 Einfluss des verwendeten Ausgangsmaterials
3.3.6 Einfluss der Protein-Ligand Immobilisierung70
3.4 Zusammenfassung Kapitel I – Oberflächenmodifikation von Zellulosemembranen mittels Fällungspolymerisation
4. Kapitel II- Agarose Membranadsorber
4.1 Einleitung – Agarose basierte chromatographische Medien
4.2 Materialien und Methoden82
4.2.1 Materialien
4.2.2 Herstellung konvektiver Agarose Membranen
4.2.3 Physiko-chemische Charakterisierung85
4.3 Ergebnisse und Diskussion
4.3.1 Strukturanalyse mittels CLSM
4.3.2 Einfluss der Immobilisierung von <i>ProteinA</i> 92
4.3.3 Einfluss der Porengröße der Agarose auf die Diffusionsabhängigkeit der dynamischen Bindungskapazität
4.3.4 Vergleich der Konzepte aus Kapitel I und II mit kommerzieller chromatographischen Medien im Hinblick auf einen <i>product capture</i> Schritt
4.4 Zusammenfassung Kapitel II – Agarose Membranadsorber101

5. Kapitel III- 3D Membranstrukturanalyse mittels CLSM104
5.1 Einleitung computergestützte 3D-Strukturanalyse104
5.2 Materialien und Methoden105
5.2.1 Materialien106
5.2.2 3D Rekonstruktionen aus der Confocal-Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM)107
5.2.3 Computergestützte Charakterisierung (CgC) der 3D Rekonstruktionen109
5.3 Ergebnisse und Diskussion117
5.4 Zusammenfassung Kapitel III – 3D Membranstrukturanalyse mittels CLSM120
6. Zusammenfassung und Ausblick
7. Abkürzungsverzeichnis
8. Tabellenverzeichnis
9. Schemataverzeichnis
10. Abbildungsverzeichnis
11. Literaturverzeichnis
12. Anhang145
12.1 Anhang zu Abschnitt 3.3.2145
12.2 Anhang zu Abschnitt 3.3.3147
12.3 Anhang zu Abschnitt 3.3.4148
Danksagung149
Lebenslauf

# 1. Einleitung

# 1.1 Herausforderungen und Trends biotechnologischer Prozesse und *Downstream processing* therapeutisch wirksamer Biomoleküle

#### 1.1.1 Grundlagen Biotechnologischer Prozesse und Downstream processing

In den letzten 50 Jahren hat die pharmazeutische Biotechnologie bei der Produktion von Biopharmazeutika (u.a Peptide, Proteine, Viren, DNA und Antiköper) große Fortschritte gemacht.<sup>4-6</sup> Insbesondere die Innovationen in der rekombinanten DNAbzw. Zellkulturbiologie ermöglichten die Herstellung monoklonaler Antikörper im industriellen Maßstab für den Einsatz gegen eine Vielzahl menschlicher Krankheiten. Dies führte zu einer stetig ansteigenden Nachfrage und macht monoklonale Antikörper zum derzeit erfolgreichsten biotechnologischen Produkt.<sup>7</sup> Die Produkttiter sind innerhalb der letzten Jahrzehnte von wenigen Milligramm auf mittlerweile 3-5 Gramm pro Liter Nährmedium gestiegen und in der Literatur werden bereits Konzentrationen von 10-13 Gramm pro Liter in fed-batch Prozessen, bis hin zu 25 Gramm pro Liter in modifizierten Perfusionsprozessen, diskutiert.<sup>5,8-14</sup> Diese rasante Entwicklung in der Herstellung von Biopharmazeutika aus dem sogenannten Upstream Prozess macht es unabdingbar, dass die nötige Aufreinigung des Rohproduktes im Downstream Prozess, auf dem Weg zum fertigen biopharmazeutischem Produkt, darauf angepasst ist. Da die konventionellen Methoden im Downstream Prozess ursprünglich für geringere Produkttiter bzw. Produktmengen ausgelegt wurden, führt dies zu Kapazitätsproblemen. Dies ist in der Literatur häufig als *Downstream bottleneck* beschrieben.<sup>15</sup> Die im *Downstream* verursachten Kosten machen so, stand 2014, 50-80 % der Gesamtproduktionskosten aus.<sup>15-17</sup> In diesem Teilbereich der Produktion biopharmazeutischer Produkte ist somit viel Potential vorhanden, um die Gesamtproduktionskosten zu senken. Insbesondere für Entwicklungsländer ist der Preis ein entscheidender Faktor, denn trotz ihrer hohen Wirksamkeit, sind biopharmazeutische Produkte für diese Länder bisher kaum verfügbar.

Die Produktion von Biopharmazeutika teilt sich im Allgemeinen in die bereits angesprochenen Teilschritte des *Upstreams* und des *Downstreams*. Der *Upstream* Prozess umfasst die Bioreaktion zum gewünschten Produkt aus verschiedensten Quellen. Zum Beispiel werden die Rohprodukte aus menschlichem sowie tierischem Gewebe, aus Pflanzen, mikrobieller Fermentation oder mittels Zellkulturen in Bioreaktoren gewonnen. Der *Downstream* Prozess beinhaltet alle Aufreinigungsschritte nach der Bioreaktion.<sup>18,19</sup>



Abbildung 1:Schematische Darstellung der Grundoperationen zur Produktion monoklonaler Antikörper (mAb`s).<sup>20</sup>

Diese können als eine Reihe verschiedener Grundoperationen beschreiben werden, die durch ihre Anwendung nach der Produktion des geklärten Nährmediums zum jeweiligen Zielprodukt in der gewünschten Reinheit führen. Im Allgemeinen können die Grundoperationen jedoch wie folgt gegliedert werden. Mittels geeigneter Kombination von Zentrifugation, Mikro- und Ultrafiltration oder Fällungstechniken wird zunächst das Zielprodukt von Zellrückständen befreit und erstmals konzentriert. Im Anschluss wird durch verschiedene Membran- und Chromatographieverfahren sowie Sterilisationsmethoden das Zielprodukt aufgereinigt, stabilisiert und formuliert.

# 1.1.2 Chromatographie als Grundoperation im *Downstream processing* monoklonaler Antikörper

Unabhängig von der jeweiligen biotechnologischen Produktion müssen die erzeugten Rohprodukte somit viele Aufreinigungsschritte durchlaufen, um in der, für die Nutzung nötigen, Form und Reinheit erhalten zu werden. Hierbei ist die Chromatographie, wie bereits angesprochen, eine essentielle Methode, um die gewünschte Reinheit der Produkte zu erreichen.<sup>16,21</sup> Dabei die ist physikalisch-chemische Grundlage einer jeden chromatographischen Operation die Auftrennung von Ziel- und Nebenkomponenten, gelöst in einer mobilen Phase, durch Interaktion mit einer stationären Phase. Wie in Abbildung 1 zu erkennen besteht die klassische Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus einer Abfolge von Operationen basierend auf Filtration und Chromatographie. Die nötigen chromatographischen Operationen, die für die gezielte Aufreinigung benötigt werden, unterscheiden sich hierbei je nach Anforderung an die Reinheit und Ausbeute des gewünschten Zielmoleküls. Sie lassen sich aber grundsätzlich in die drei Schritte product capture, intermediate purification und polishing gliedern. In der Regel erfolgt vor dem product capture die Klärung des Nährmediums, wie bereits eingangs beschrieben. Im product capture soll das Zielmolekül in großer Reinheit und Ausbeute<sup>16,21</sup> aus der geklärten Lösung isoliert werden. Zudem wird in diesem Schritt auch eine Stabilisierung und Konzentrierung des Produktes erreicht. Als Prozess hat sich im product capture die Protein A Chromatographie etabliert. Diese ermöglicht eine hohe Aufkonzentrierung des Antikörpers und eine hohe Produktreinheit, aufgrund ihrer hohen Selektivität gegenüber Antikörpern vom Typ Immunglobulin G (IgG) und hohen Bindekapazitäten. Im product capture wird im sogenannten bind and elute Modus gearbeitet. Hierbei wird der Antikörper bzw. das Zielmolekül unter bindenden Bedingungen auf der stationären Phase gebunden und im Anschluss unter nicht bindenden Bedingungen eluiert. In der intermediate purification sollen die verbliebenen intrazellulären Verunreinigungen (DNA, RNA, Endotoxine, Viren, host cell proteins (HCP)) entfernt und im polishing letztendlich der finale Reinheitsgrad erreicht werden, indem auch nahe verwandte Verbindungen (Isomere, Dimere, etc.) entfernt werden.<sup>22</sup> In diesem Prozessschritt wird häufig der sogenannte flowthrough Modus eingesetzt, wobei die Verunreinigungen an die stationäre Phase gebunden werden, während der Antikörper bzw. das Zielmolekül die stationäre Phase ungebunden passiert.

#### 1.2 Herausforderungen und Trends chromatographischer Medien

Ein wesentlicher Ansatz, dem eingangs beschriebenen Downstream bottleneck zu begegnen und die Ausbeute und Produktivität im Downstream Prozess zu erhöhen, ist die Entwicklung neuer oder die Verbesserung bestehender chromatographischer Medien bzw. stationärer Phasen. Die erreichte performance eines chromatographischen Mediums im Hinblick auf den jeweiligen Prozess hängt dabei im Wesentlichen an den physikalisch-chemischen Eigenschaften der stationären Phase. Diese besteht aus einer Matrix und darauf immobilisierten Liganden, welche die gewünschte Wechselwirkung mit dem Zielprodukt zeigen. Bekannte und häufig genutzte Materialien für stationäre Phasen, in der Aufreinigung biopharmazeutischer Produkte, sind insbesondere Polysaccharide wie z.B. Zellulose, Dextrane, Agarose und deren Derivate sowie synthetische Polymere wie z.B. Polyacrylamide und Polymethacrylate oder poröse Silicate.<sup>23-31</sup> Zusätzlich zu den verschiedenen Materialien haben sich in der Chromatographie drei unterschiedliche Arten für stationäre Phasen etabliert. Bei diesen handelt es sich um gepackte Säulen mit porösen Gelpartikeln<sup>16</sup>, Membranadsorber<sup>32</sup> (Abbildung 2 und Abbildung 3) sowie Monolithsäulen.<sup>33,34</sup> Gepackte Säulen aus porösen Partikeln (sog. *beads*, resins) stellen dabei die meist etablierte Methode dar. Insbesondere bei der Protein A Affinitätschromatographie, zur Reinigung und Konzentrierung monoklonaler Antikörper im product capture, werden diese verwendet. Moderne Protein A Affinitätsmedien auf Basis solch poröser Partikel verfügen über Bindungskapazitäten von 15 – 100 Gramm Antikörper pro Liter stationärer Phase, bei einer Reinheit, die konsistent größer 95 % liegt.<sup>35–39</sup> Diese Entwicklung in der performance geht mit der ständigen Optimierung der stationären Phasen und der Liganden sowie den immer weiter steigenden Anforderungen an solche Systeme einher. Durch die zahlreichen Optimierungen dieser auf porösen Partikeln basierten stationären Phasen und dem häufigen, praktischen Einsatz in vielen Downstream Prozessen, wird dieses klassische System als verlässlich, effektiv und gut verstanden beschrieben. Aktuelle Studien zur weiteren Optimierung dieses klassischen Systems beschäftigen sich u.a. mit der weiteren Optimierung der stationären Phasen und der Liganden, im Hinblick auf die Verringerung der Zyklusdauer, um die Produktivität signifikant steigern zu können.<sup>35,36,40</sup> Dies ist notwendig, da diese stationären Phasen zwar über einige bereits beschriebene Vorteile verfügen aber, aufgrund ihrer sphärischen Geometrie und ihrer hochporösen Struktur, gewissen Limitierungen unterliegen. Etwa 70 % der vorhandenen Bindungsstellen befinden sich innerhalb der Partikel.<sup>41</sup> Der Transport der Zielmoleküle erfolgt somit hauptsächlich über einen IntrapartikelDiffusionsmechanismus (Abbildung 2). Diese Diffusionlimitierung macht lange Verweilzeiten der Zielmoleküle innerhalb der Säulenpackung notwendig, um ausreichend viele Bindungsstellen ausnutzen zu können. Somit kann die Prozessdauer nicht über eine Erhöhung der Flussrate verkürzt werden, sondern die Säulendimension muss angepasst werden. Durch die größeren Volumina der Säulen kann trotz langer Verweilzeiten der Zielmoleküle eine größere Flussrate realisiert werden. Allerdings führt dies zu einem größeren Verbrauch an stationärer Phase und somit höheren Kosten.<sup>42–44</sup> Die Verkürzung der Diffusionswege ist somit ein Ansatz die Diffusionslimitierung zu umgehen. Allerdings sollten die Partikel einen gewissen Durchmesser nicht unterschreiten, da ansonsten die Partikelzwischenräume weiter abnehmen und so die Permeabilität der Partikelpackung sinken bzw. die benötigten Prozessdrücke für einen konstanten Volumenstrom steigen würden. Zusätzlich ist das Packen und Validieren der Säulen sehr zeit- und personalintensiv.<sup>15</sup> Dies trägt zu den bereits angesprochenen hohen Kosten im *Downstream* Prozess bei.



Abbildung 2: Schematischer Vergleich des Massentransports am Beispiel konventioneller poröser Partikel und Membranadsorbern.<sup>45</sup>

Ein vielversprechender Ansatz, um die Schwächen klassischer Systeme zu umgehen, ist die Entwicklung neuer chromatographischer Medien, die einen schnellen Massentransfer aus der mobilen Phase zu den Bindungsstellen erlauben. Eine Möglichkeit besteht darin, die Diffusionswege signifikant zu verkürzen oder, im Idealfall, lediglich konvektiven Massentransport zu den Bindungsstellen sicherzustellen. Beispiele für solche Ansätze sind die Prozessintegration von Monolithsäulen und Membranadsorbern.<sup>46–50</sup> Solche Systeme lassen aufgrund der hochporösen Netzwerkstruktur und großen Porengrößen im einstelligen Mikrometerbereich (ca.  $1 - 5 \mu m$ ) einen konvektiven Fluss zu den Bindungsstellen zu, welcher zu niedrigeren Prozesszeiten, im Vergleich zu *beads*, führt (Abbildung 2).<sup>33,34</sup> In Produktion und Regeneration verursachen Monolithsysteme allerdings ebenfalls hohe Kosten und sind zudem in ihrer Größe nur bedingt skalierbar, wodurch diese für einen Prozess im industriellen Maßstab nur eingeschränkt nutzbar sind.<sup>51</sup> Membranadsorber sind hingegen deutlich besser skalierbar. Allerdings verfügen Membranadsorber nur über geringe spezifische Oberflächen und demzufolge auch niedrige Bindungskapazitäten im Vergleich zu klassischen stationären Phasen was einen Einsatz im *bind and elute* Modus aktuell verhindert. Jedoch werden diese Systeme speziell im Prozessschritt des *polishing* genutzt, da hier lediglich die verbliebenen Verunreinigungen gebunden werden. Dies macht eine hohe Bindungskapazität nicht nötig weshalb sich diese Systeme zur finalen Reinigung monoklonaler Antikörper auch im industriellen Maßstab bereits bewährt haben.



Abbildung 3: Rasterelektronenmikroskopaufnahmen einer Membranoberfläche (links) sowie die Oberfläche eines porösen Partikels (rechts); 550xVergrößerung.

Zur Senkung der Kosten im Bereich des *Downstream* wäre demnach eine diffusionsunabhängige stationäre Phase, die hohe Flussraten zulässt und sich einfach handhaben sowie skalieren lässt, notwendig. So könnte die Produktivität und damit einhergehend die Menge an gereinigtem Protein pro Zeit erhöht werden. Dies würde folgerichtig auch die Kosten im Bereich des *Downstream* senken. Da Membranen sowohl die

nötige mechanische Stabilität, als auch Skalierbarkeit aufweisen, sind diese ideal als Ausgangsmaterial geeignet, um stationäre Phasen mit den benötigten Eigenschaften zu erhalten.

#### 1.3 Oberflächenmodifizierung chromatographischer Medien

Die spezifischen Oberflächen nicht partikulärer stationärer Phasen sind, verglichen mit denen partikulärer Systeme, deutlich geringer. Die Immobilisierung von Liganden an den Oberflächen solcher stationärer Phasen führt somit zu kleineren, volumetrischen Ligandendichten und als Konsequenz daraus, zu niedrigeren Bindungskapazitäten. Wie eingangs beschrieben sind es u.a. die geringeren Bindungskapazitäten, die einen Einsatz nicht partikulärer stationärer Phasen, insbesondere im *product capture*, verhindern. Somit ist die Verbesserung dieser Eigenschaft, bei Erhalt möglichst aller Vorteile der nicht partikulären Systeme, erstrebenswert und Gegenstand aktueller Forschung.



Abbildung 4: Schematische Darstellung von immobilisierten Polymerketten mit inhärenten Bindungsstellen am Beispiel kationischer Bindungsstellen auf der Oberfläche eines Membranadsorbers.

Ein häufig verfolgter Ansatz ist die Immobilisierung einer Polymernanoschicht, in der die Bindungsstellen nachträglich eingebracht oder bereits inhärent vorhanden sind. Dieses immobilisierte Polymer ermöglicht somit eine Multilagen Adsorption des Zielmoleküls und kann so die Bindungskapazität der stationären Phase, verglichen mit einer monolagen Adsorption des gleichen Mediums, um zwei Größenordnungen erhöhen (Abbildung 4).<sup>52</sup> Dieser Ansatz benötigt eine oberflächenspezifische Anbindung der einzelnen Polymerketten. Hierbei kann generell in drei Ansätze gegliedert werden. Beim *grafting-to* Ansatz wird ein endfunktionalisiertes zuvor hergestelltes Polymer über eine spezifisch reaktive Endgruppe kovalent an die Oberfläche der stationären Phase gebunden. Somit eröffnet sich die Möglichkeit die Polymereigenschaften, des zu immobilisierenden Polymers, zuvor gezielt einzustellen.<sup>53,54</sup> Ein weiterer Ansatz ist der *grafting-through* Ansatz. Hierfür werden ungesättigte Funktionalitäten an der Oberfläche der stationären Phase benötigt, welche dann, durch eine in der stationären Phase initiierten Polymerisation, in die wachsende Polymerkette eingebaut werden.<sup>55</sup> Am häufigsten ist in der Literatur jedoch der *grafting-from* Ansatz beschreiben (Abbildung 5). Hierbei wird die Oberflächenselektivität durch an der Oberfläche befindlichen Initiatoren bzw. dort erzeugten Radikalen erreicht.



Abbildung 5: Schematische Darstellung der Immobilisierung einer Polymerkette auf einer Oberfläche.<sup>56</sup>

Diese Ansätze werden in Bezug auf Membranadsorber häufig für die Ionenaustauschchromatographie (IEX) untersucht.<sup>57,58</sup> Die Bindungsstellen sind hierbei mindestens einfach geladen und stoßen sich durch die Coulombsche Abstoßung untereinander ab. Somit nehmen die Ketten den maximal möglichen Abstand zueinander ein wodurch das immobilisierte Polymer stark quillt. Durch die weitreichende Coulombsche Anziehung zum Zielmolekül entsteht zudem eine starke Triebkraft für die Zielmoleküle, die immobilisierte Polymernanoschicht zu penetrieren. Durch diese Faktoren entsteht ein gequollenes und dadurch zugängliches sowie ein geladenes und dadurch attraktives immobilisiertes Polymer.<sup>57,58</sup> Ist eine der beiden Voraussetzungen nicht erfüllt (kollabierte Polymernanoschicht bzw. fehlende oder schwache Triebkraft für Penetration der Polymernanoschicht), können die Vorteile dieser Technik nicht ausgenutzt werden.

Dies wird an der sukzessiv sinkenden Bindung von Zielmolekülen an das Polymer und gleichzeitig steigendem zugänglichem Volumenanteil der stationären Phase, bei steigender Konzentration an Gegenionen oder sinkenden geladenen Anteilen in der Polymerkette, besonders deutlich.<sup>57,58</sup> Zudem kollabiert ein, auf diese Weise hergestelltes oberflächengebundenes, Polymer auch bei vorhandener Coulombscher Abstoßung, bei zu großen Abständen (>10 nm) der jeweiligen Polymerketten zueinander.<sup>57,58</sup>

Für die Herstellung neuer affinitätschromatographischer Medien, insbesondere der Herstellung von Protein A Affinitätsmedien, ist ein solcher Ansatz somit aus verschiedenen Gründen nicht geeignet. Zum einen kann hierbei, durch fehlende Coulombsche Abstoßung, eine ausreichende Quellung des Polymernetzwerks nicht gewährleistet werden. Zum anderen besitzen, sowohl der Ligand Protein A (~45 Kg/mol; ~3,5 nm  $D_H$ )<sup>59</sup>, als auch der Antikörper als Zielmolekül (Immunglobulin G (IgG); ~150 Kg/mol; ~8 nm  $D_H$ )<sup>60,61</sup> ein hohes molares Gewicht und hydrodynamischen Durchmesser (D<sub>H</sub>), die eine Penetration in ein ungeladenes Polymernetzwerk entropisch erschwert. Eine solche Penetration wäre nur dann denkbar, wenn die Polymerketten einen Abstand >10 nm hätten. Allerdings kollabiert ein solches Polymernetzwerk bei diesen Polymerkettenabständen.<sup>57,58</sup>

Stationäre Phasen für die Protein A Affinitätschromatographie benötigen somit eine weiträumige und inhärent stabile Oberflächenmodifizierung. Ein Beispiel für aktuelle Studien in diesem Gebiet ist die kovalente Immobilisierung von Polysacchariden (wie. z.B. Dextranen), die durch ihre verzweigte, ungeladene und große Struktur ein für Protein A und den Antikörper zugängliches Netzwerk bilden und so die Bindungskapazität erhöhen.<sup>62–64</sup>

Ein weiterer Ansatz basiert auf der Kombination aus monolithischen Strukturen, welche über Fällungspolymerisationen (*precipitation polymerization*) erhalten werden und Membranen bzw. Vliese als Stützmatrix enthalten. Hierbei werden die Poren der Stützmatrix vollständig mit einer homogenen zu polymerisierenden Lösung, bestehend aus Initiator, Monomer/en, Vernetzer und einem schlechten Lösungsmittel für das sich bildende Polymernetzwerk, gefüllt und im Anschluss polymerisiert. Durch das wachsende Polymernetzwerk bilden sich so polymerreiche und polymerarme Bereiche aus. So entsteht in den Poren des Stützmaterials ein poröses Polymernetzwerk bzw. ein monolithisches System.<sup>65–68</sup> Dieser patentierte Ansatz führt aufgrund der Vergrößerung der zur Verfügung stehenden Oberfläche im Polymernetzwerk zu großen Bindekapazitäten und ist aufgrund der starken Vernetzung auch ohne Ladungen und Coulombsche Abstoßung stabil. Allerdings führt diese Form der Modifizierung stationärer Phasen zu kleinen Permeabilitäten. Dies wird mit der vollständigen Ausfüllung der Poren des Stützmaterials mit monolithischen Polymernetzwerkstrukturen begründet. Die geringen Permeabilitäten verringern wiederum signifikant die chromatographische *performance* und somit das Verhältnis aus Menge gereinigtem Zielmolekül und dafür aufgebrachter Zeit.<sup>69</sup> Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass aktuelle Forschungen für die Entwicklung neuer stationärer Phasen für die Chromatographie im *Downstream* Prozess darauf ausgelegt sind, die spezifische und erreichbare Oberfläche für Antikörper bzw. Zielmoleküle, bei möglichst gleichbleibender Permeabilität, zu erhöhen.

#### 1.4 Charakterisierung chromatographischer Membranen

Aufgrund der strukturellen Komplexität der soeben beschriebenen chromatographischen Membranen stellt die Charakterisierung solcher Medien eine Herausforderung dar. Eigenschaften der Membranen, wie die spezifische Oberfläche, die Porengröße bzw. die Porengrößenverteilung sowie die Porosität, haben einen Einfluss auf die gewünschte performance solcher Membranen. Insbesondere Membranen, die ihre Struktur bei der Benetzung mit Lösemittel verändern (z.B. Polymernanoschicht Membranen oder Polysaccharid basierte Membranen) können mittels üblicherweise genutzter Verfahren nur unzureichend charakterisiert werden. Solche für gewöhnlich genutzten Verfahren, um die Porenstruktur von Membranen zu charakterisieren, sind z.B. die Kapillarfluss Porometrie, BET-Oberflächenmessungen, inverse Größenausschlusschromatographie (i-SEC)<sup>70-72</sup> oder Bubblepointmessungen<sup>73–80</sup>. Diese Methoden geben allerdings keinen Aufschluss über lokale Strukturen, sondern sind als Summe der gesamten Membranstruktur zu verstehen. Rasterelektronenmikroskop oder konfokale Lasermikroskop Aufnahmen können, bei unterschiedlicher Präparation der Proben, genutzt werden, um solche lokalen Strukturinformationen zu erhalten.<sup>81–83</sup> Typischerweise werden solche Darstellungen von Membranen nur zweidimensional z.B. in Aufsicht oder Querschnitt aufgenommen. Somit ist eine quantitative Charakterisierung solcher Aufnahmen nur schwer möglich. Alternative Techniken, die für die dreidimensionale Darstellung von Membranen entwickelt wurden, wie Röntgen-Streuung<sup>83</sup>, Epoxidharz gefüllte Membranen<sup>84–86</sup> oder konfokale Laser-ScanningMikroskopie<sup>87,88</sup>, sind limitiert in der quantitativen Auswertung der erhaltenen dreidimensionalen Strukturinformation. Hierbei ist die konfokale *Laser-Scanning*-Mikroskopie allerdings herauszuheben, da diese eine Visualisierung der Membranen in Lösemittel benetztem Zustand ermöglicht.

#### 1.5 Problemstellung und Lösungsansatz

Wie eingangs beschrieben ist die biopharmazeutische Industrie, aufgrund der hohen Nachfrage, des therapeutischen Potentials und der immer weiter steigenden Qualitätsansprüche der Produkte aktuellen Herausforderungen ausgesetzt. Die Produktivität ist hierbei im Wesentlichen limitiert durch den *Downstream* Prozess und die darin gestellten Anforderungen an Reinheit und Ausbeute. Um dieses *Downstream bottleneck* zu überwinden, hat sich die Entwicklung nicht partikulärer stationärer Phasen als besonders Erfolg versprechend herausgestellt, da diese die wesentlichen Limitierungen Partikel basierter stationärer Phasen überwinden. Die Anforderungen, welche an diese neuen stationären Phasen gestellt werden, sind jedoch sehr vielfältig, möchten diese mit den klassischen Partikel basierten Systemen in Konkurrenz treten.

Diese müssen mindestens vergleichbare Eigenschaften in Bezug auf Bindungskapazität, Trenneffizienz und mechanische Stabilität aufweisen. Gleichzeitig sollen sie die Limitierungen der klassischen Partikel basierten Systeme umgehen. Ein besonders entscheidender Punkt hierbei ist der diffusionslimitierte Massentransfer, welcher bei klassischen Partikel basierten Systemen zu langen Prozessdauern und hohem Volumen der stationären Phasen führt. Zudem sollte die alternative stationäre Phase so ausgelegt sein, dass diese als *plug-play* und *single-use* Produkt genutzt werden kann, um arbeits- und kostenintensive Reinigungs- bzw. Validierungsschritte zu vermeiden.

Diesen Anforderungen folgend, kann die Entwicklung von Membran basierten bzw. gestützten Polymernetzwerken, die den zuvor geschilderten Anforderungen genügen, als grundlegendes Ziel dieser Arbeit definiert werden. Des Weiteren ist eine Spezialisierung auf den *product capture* Schritt, genauer die Protein A Affinitätschromatographie, innerhalb des *Downstream* Prozesses von monoklonalen Antikörpern erfolgt, da dieser Schritt besonders abhängig von klassischen Partikelbasierten stationären Phasen ist. Hierfür werden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt, die beide eine Steigerung der spezifischen Oberfläche und so eine Steigerung der Bindungskapazität zum Ziel haben. Zudem lag ein besonderes Augenmerk auch auf der Charakterisierung dieser stationären Phasen jenseits der bereits bekannten Methoden, um ein Verständnis für strukturelle Einflüsse auf die *performance* der stationären Phasen gewinnen zu können.

Der in Kapitel I beschriebene Ansatz nutzt eine an die Literatur angelehnte Methode.<sup>65–68</sup> Durch *precipitation polymerization* (Fällungspolymerisation) sollen gezielt Polymernanostrukturen auf der Oberfläche von Zellulose Membranen immobilisiert werden. Durch die erzeugte raue Oberfläche soll ein Zuwachs an spezifischer Oberfläche, bei gleichzeitiger Funktionalisierung dieser, entstehen. Durch die Erhöhung der spezifischen Oberfläche und die Funktionalisierung soll eine leichte Immobilisierung von Liganden, in diesem Fall zwei unterschiedliche funktionelle Protein A Analoga, gewährleistet werden und gleichzeitig die gebundene Menge an Antikörper signifikant gesteigert werden.

Im zweiten Ansatz, beschrieben in Kapitel II, wird das Polysaccharid Agarose genutzt, um Makro- bzw. Mesoporöse Strukturen zu erzeugen, die konvektiv durch *flow-through* Poren durchströmt werden können. Durch die Makro- bzw. Mesoporen der Agarose soll der Antikörper in großer Menge gebunden werden können, während die konvektiven *flow-through* Poren für eine hohe Permeabilität und einen schnellen Massentransport, in und aus den Makro- bzw. Mesoporen, sorgen.

In Kapitel III wird ein Ansatz zur Charakterisierung von Membranen beschrieben, der mittels *Confocal-Laser-Scanning* Mikroskopie dreidimensionale Repräsentationen von Membranen in Lösemittel benetztem Zustand ermöglicht. Durch eine nachgeschaltete computergestützte Analyse dieser dreidimensionalen Membranstrukturen (CgC) sollen Strukturparameter wie die spezifische Oberfläche, die Porengrößenverteilung und die Permeabilität ermittelt werden.

# 2. Theoretische Grundlagen

In diesem Abschnitt werden die theoretischen Grundlagen zu den genutzten Materialien und Reaktionen vorgestellt. Insbesondere sind dies die photoinitiierte radikalische Polymerisation, Monolithe, Fällungspolymerisationen, Agarose sowie Membranen und die ihnen zugrundeliegenden Eigenschaften.

# 2.1 Membranchromatographie zur Aufreinigung therapeutischer Biomoleküle

Eine Membran ist eine dünne Schicht eines Materials, die Bereiche voneinander trennt und dabei unterschiedliche Kriterien für einen möglichen Stofftransport aufweist. Das hierbei einfachste denkbare Kriterium ist die Größe (Größenausschlussprinzip). In der Natur sind semipermeable Membranen in Zellen die am häufigsten anzutreffende Form von Membranen. Bei diesen speziellen Membranen können bestimmte Stoffe diese passieren, andere hingegen werden zurückgehalten.



Abbildung 6: Gegenüberstellung der Wechselwirkungen in der hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC), der Ionenaustauschchromatographie (IEX) und der Affinitätschromatographie.

Die Selektivität dieser Membranen ist durch ihren biologischen Nutzen für die entsprechende Zelle gegeben, ist jedoch meist abhängig von der Ladung des zu transportierenden Stoffes.

Membranadsorber hingegen unterscheiden sich von semipermeablen Membranen dahingehend, dass die Stofftrennung aufgrund von gezielten Wechselwirkungen mit der Oberfläche erfolgt. Ein Stofftransport in das Innere des Membranadsorbers ist prinzipiell für alle Stoffe möglich, die nicht aufgrund ihrer Größe bereits ausgeschlossen werden.

Je nach Modifizierung der Membranoberfläche können einige Stoffe die Membran, aufgrund chemischer Wechselwirkungen mit der Oberfläche, nicht ungehindert passieren (Abbildung 6). Mögliche Modifizierungen, die in Membranadsorbern genutzt werden, sind ionische, hydrophobe, hydrophile und affinitätsbedingte Wechselwirkungen. In der biopharmazeutischen Industrie kommen am häufigsten die ionischen, hydrophoben und Affinitätswechselwirkungen von Molekülen mit der modifizierten Oberfläche zum Einsatz. Im Weiteren wird auf die Affinitätswechselwirkungen genauer eingegangen.

Ein wesentlicher Vorteil der Chromatographie mit Membranadsorbern ist, dass deren Bindungskapazität nahezu unabhängig von der Flussrate ist. Dies wird mit den größtenteils über Konvektion erreichbaren Bindungsstellen der Membranadsorber begründet. Bei porösen Partikeln führen, aufgrund der Porendiffusion der Zielmoleküle zu den Bindungsstellen, lediglich kleine Flussraten zu hohen Bindungskapazitäten und steigende Flussraten lassen diese einbrechen (Abbildung 7).<sup>16,32</sup>

Ein häufig verwendetes Membranmaterial ist Zellulose oder seine Derivate. Diese bieten den Vorteil, dass sie in Herstellung und Entsorgung ökologisch unbedenklich sind<sup>89,90</sup>. Zusätzlich ist die Oberflächenmodifizierung solcher Membranen einfach zugänglich, da mit den Hydroxylfunktionalitäten bereits Anknüpfpunkte für eine Vielzahl chemischer Reaktionen mit der Oberfläche gegeben sind.

Aufgrund der Porenstruktur der Zellulose-Membranen ist ein Einsatz als unmodifizierte Membran, auf Grundlage des Größenausschlussprinzips, im Bereich der Mikro- und Ultrafiltration genauso möglich, wie als oberflächenmodifizierte Membran in den bereits genannten Bereichen der Membranchromatographie.<sup>91,92</sup>

Membranadsorber werden insbesondere durch ihre Permeabilität und ihre Bindungskapazität gegenüber der jeweiligen Zielverbindung charakterisiert.

$$P_i = v_f \eta_F \frac{\Delta d}{\Delta p} \tag{1}$$

Die Permeabilität  $P_i$  in Millidarcy [mD], ist dabei nach *Darcy* das Verhältnis der linearen Flussgeschwindigkeit  $v_f$  in Zentimeter pro Sekunde [cm/s], der dynamischen Viskosität  $\eta_F$  in Centipoise [cP] der Lösung und der Membrandicke  $\Delta d$  in Zentimetern [cm] zum Transmembrandruck  $\Delta p$  in Atmosphäre [atm] (Gleichung 1).<sup>93,94</sup> Insbesondere die Verwendung mehrerer Membranen übereinander macht die Membrandicke zu einem relevanten Parameter. Besonders wenn diese Membranen mit einer Säule gepackter poröser Partikel verglichen werden, da hierfür die gleichen Zusammenhänge gelten.



Abbildung 7: Gegenüberstellung der Transportprozesse in Gelpartikeln und Membranen und Auftragung der dynamischen Bindungskapazität gegen den Fluss von Säulen mit porösen Partikeln und Membranadsorbern.

Neben der Permeabilität ist die statische Bindungskapazität eine wichtige Gleichgewichtsgröße, die angibt wie viele Zielmoleküle nach Gleichgewichtseinstellung unter den gewählten Bedingungen pro Membranvolumen an die verfügbaren Bindungsstellen gebunden werden können. Diese Kenngröße ist bedeutend für die Charakterisierung von Membranen, da sie sowohl von den chemischen (u.a. Ligandendichte) als auch den physikalischen Eigenschaften (u.a. Porengrößenverteilung) abhängt.

Die statische Bindungskapazität SBC ist definiert als die Menge m einer Substanz, die reversibel pro Membranvolumen  $V_{\rm MV}$  im Gleichgewicht gebunden werden kann.

m



$$SBC = \frac{m}{V_{\rm MV}} \tag{2}$$

Volumen Proteinlösung

Abbildung 8: Schematische Darstellung des Verlaufs einer Durchbruchskurve eines Membranadsorbers. Die rot markierte Fläche stellt die dynamische Kapazität bei 10% des Durchbruchs (DBC10%) dar. Die gepunktete Fläche die dynamische Kapazität bei 100 % des Durchbruchs (DBC100%).95

Dieser Wert wird häufig aus statischen Gleichgewichtsexperimenten ermittelt, kann allerdings auch aus der Durchbruchskurve (Abbildung 8) ermittelt werden und wird dann als DBC<sub>100%</sub> bezeichnet. Die Kapazität bei 100 % des Durchbruchs ist somit gleichzusetzten mit der statischen Bindungskapazität (Gleichung 2). Die unterschiedliche Nomenklatur ergibt sich aus der entweder statischen oder dynamischen Messmethode. Allerdings ist dieser Wert für die Anwendung als Membranadsorber eher unbedeutend, da die Zielmoleküle, wie eingangs beschrieben, oft sehr wertvoll sind und demnach unter einer Maximierung der Ausbeute isoliert werden sollen. Daher wird in der Anwendung neben der statischen auch die dynamische Kapazität als Kenngröße aufgenommen, die sich je nach Prozessführung und Chromatographiemedium stark von der statischen Kapazität unterscheiden kann. Bei der dynamischen Kapazität wird zusätzlich berücksichtigt, dass bei einem Fluss von Zielmolekülen in Lösung durch die Membran bzw. die stationäre Phase auch vor Erreichen der statischen Kapazität Zielmoleküle die Membran ungebunden passieren. Dies wird hauptsächlich durch Dispersion innerhalb der stationären Phase und der genutzten Anlage verursacht.<sup>96–98</sup>

Bestimmt wird dabei in der Praxis meist der Durchbruch bei 10 % und 100 % der Ausgangskonzentration, d.h. wenn die Konzentration des Zielmoleküls, welches den Membranadsorber passiert, 10 % bzw. 100 % der Ausgangskonzentration entspricht. Abbildung 8 zeigt einen typischen Verlauf einer solchen Durchbruchskurve für Membranadsorber. Die Durchbruchskurve sollte im Idealfall senkrecht ansteigen, womit die statische der dynamischen Bindungskapazität entsprechen würde. Je flacher die Durchbruchskurve ist, desto kleiner ist die dynamische im Vergleich zur statischen Bindungskapazität. Dies ist dahingehend relevant, da in der biopharmazeutischen Industrie meist maximal bis zu einem Durchbruch von 1 % beladen wird.

#### 2.2 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie basiert auf der bioselektiven Wechselwirkung eines, an die Membran oder sonstige Trägermatrix, gebundenen Liganden, mit dem ausschließlich die Zielverbindung wechselwirken sollte (Abbildung 9). Alle anderen Komponenten des zu trennenden Gemisches werden nicht gebunden. Somit kann bei der hier vorliegenden Methode selektiv ein Zielmolekül hoch rein aus dem Gemisch abgetrennt werden.<sup>99</sup>

Besonders von Interesse ist hierbei die Affinitätschromatographie mit Protein A als bioselektivem Liganden für die Abtrennung von Antikörpern vom Typ Immunglobulin G (IgG) aus Blutserum oder anderen Quellen.<sup>99</sup> Dies ist in der hohen Affinität von Protein A zu IgG begründet. Aufgrund der Vielzahl von anderen Bestandteilen des jeweiligen Ursprungsmediums (z.B. Vitamine, Hormone, Enzyme u.a.) ist hier eine schnelle und hoch selektive Aufreinigung im *product capture* des *Downstream* Prozesses von Vorteil gegenüber anderen Methoden in diesem Arbeitsschritt.<sup>99</sup> Protein A bindet selektiv viele Unterklassen des IgG (z.B. Humanes IgG 1/2/4) und nur wenige nicht (z.B. Humanes IgG 3/M).<sup>59</sup> Trotz der hohen Affinität ist eine Elution, also eine Lösung der Bindung zwischen den theoretisch möglichen fünf Bindungsstellen des nativen Protein A<sup>59</sup> und den Fc-Regionen des IgG, bei niedrigem pH-Wert (häufig pH 2-4) möglich.



Abbildung 9: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Affinitätschromatographie.<sup>100</sup>

Die theoretisch möglichen fünf Bindungen von nativem Protein A zu IgG werden in der Praxis allerdings nicht erzielt. Auf Membranadsorbern werden derzeitig Werte zwischen 1 und 2 Bindungen zu IgG pro immobilisiertem Protein A Molekül und für poröse Partikel Werte zwischen 2,5 und 3,5 erreicht.<sup>59,101</sup> Somit ist auch die Modifizierung des Affinitätsliganden, auf Basis der Peptidsequenzen der Bindungsstellen des nativen Protein A Liganden, Teil aktueller und vorrangegangener Forschung. Da oftmals basische Reinigungsschritte (*CIP*, *cleanin-in-place*) zwischen den einzelnen Zyklen notwendig sind, um zum Beispiel verbliebene DNA-Fragmente zu entfernen, wurde auch die Laugestabilität der Liganden, im Vergleich zum nativem Protein A Liganden, deutlich verbessert.<sup>61,102–105</sup>

Eine weitere Herausforderung stellt auch die Immobilisierung des Liganden dar. Dieser muss auf einer ausreichend porösen Matrix so immobilisiert werden, dass diese als stationäre Phase im chromatographischen Trennprozess wirksam ist.<sup>99</sup> Dies setzt voraus, dass der Ligand für das Zielmolekül erreichbar ist. Zudem muss die stationäre Phase ausreichend dicht mit Liganden besetzt sein, damit eine hohe Bindungskapazität entsteht.<sup>99</sup> Jedoch darf die Besetzung nicht zu hoch sein, da sonst die Liganden durch sterische Abschirmung untereinander wechselwirken und die Bindungskapazität somit verringert wird.<sup>59</sup>

#### 2.3 Strukturparameter chromatographischer Medien

Strukturparameter sind Materialparameter, die durch die Herstellung und Funktionalisierung des Materials festgelegt werden. Diese beeinflussen die Trenneffizienz der stationären Phase. Für poröse Partikel sind dabei der Lückengrad, die Porosität, die Porengrößenverteilung, die spezifische Oberfläche, die Ligandendichte sowie die Geometrie und die Abmessungen der stationären Phase von Bedeutung. Diese Strukturparameter können analog auch für Membranen zugrunde gelegt und als bestimmend für die Trenneffizienz angesehen werden.

Die Grundlagen dieser Strukturparameter sowie Methoden zu deren Bestimmung sollen im Folgenden diskutiert werden.

#### 2.3.1 Lückengrad, Porosität und Porengrößenverteilung

Der Lückengrad und die Porosität spiegeln die Phasenverteilung innerhalb einer stationären Phase wieder. Hierfür muss das Gesamtvolumen der stationären Phase  $V_{\rm G}$  in drei Teilvolumina unterteilt werden.<sup>106</sup> Zum einen das Volumen der mobilen Phase außerhalb der stationären Phase  $V_{\rm ext}$ , zum anderen das Volumen der stationären Phase innerhalb des Porensystems der stationären Phase  $V_{\rm int}$  und das Gesamtvolumen der stationären Phase  $V_{\rm Stat}$  (Feststoff und Porensystem, falls dies vorhanden ist).

Somit lassen sich unterschiedliche Porositäten und Lückengrade definieren. Der externe Lückengrad  $\varepsilon_{b}$ , auch Hohlraumanteil genannt, wird aus dem Verhältnis von  $V_{ext}$  und Gesamtvolumen des Säulenbettes V bestimmt.

$$\varepsilon_b = \frac{V_{ext}}{V} \tag{3}$$

Poröse Partikel in Säulen erreichen hierbei typischerweise Werte zwischen 0,36 - 0,4 und liegen damit nahe am Erwartungswert, resultierend aus der dichtesten Kugelpackung sphärischer Partikel. Für Membranadsorber liegt dieser Wert typischerweise zwischen 0,5-0,75.<sup>107</sup> Die interne Porosität  $\varepsilon_p$  charakterisiert den internen Lückengrad der stationären Phase. Für poröse Partikel ist es das Verhältnis zwischen Volumenanteil der Mikro-, Mesound Makroporen zum Gesamtvolumen der stationären Phase.

$$\varepsilon_p = \frac{V_{int}}{V_{Stat}} = \frac{V_{int}}{(1 - \varepsilon_b)V}$$
<sup>(4)</sup>

Sofern keine interne Porosität vorliegt, falls die stationäre Phase aus einem nicht porösen Trägermaterial besteht, beläuft sich  $\varepsilon_p$  somit zu null. Die Gesamtporosität eines chromatographischen Systems ist als die Summe der internen Porosität  $\varepsilon_p$  und externem Lückengrad  $\varepsilon_b$  definiert.

$$\varepsilon = \varepsilon_b + \varepsilon_p \tag{5}$$

Üblicherweise genutzte Methoden zur Charakterisierung dieser Kenngrößen sind Gasadsorptionsexperimente (z.B. BET-Isothermen mit Stickstoff als Adsorbens) oder die Quecksilberintrusion.<sup>108,109</sup> Die so erhaltenen Ergebnisse spiegeln die stationäre Phase allerdings nur im trockenen Zustand wieder und können keine Quellungseffekte der stationären Phase bei Kontakt mit wässrigen Lösungen wiedergeben.

Um solche Effekte wiedergeben zu können hat sich die inverse Größenausschlusschromatographie (i-SEC) als Methode etabliert. Diese erlaubt die Charakterisierung der stationären Phase in der Säule bzw. im Modul. So können der externe Lückengrad, die interne Porosität sowie die Porengrößenverteilung der Mikro-, Meso- und in Teilen auch der Makroporen bestimmt werden.<sup>70–72</sup>

Für die Bestimmung der *flow-through* Porengrößenverteilung ist diese Methode allerdings nicht geeignet, da die verwendbaren Analyten für diese Porengrößen (>100 nm) zu klein sind. Hierfür wird für Membranen üblicherweise die Kapillarfluss Porometrie verwendet.<sup>110</sup>

#### 2.3.2 Spezifische Oberfläche

Die spezifische Oberfläche *O* ist als die gesamte Oberfläche einer Matrix definiert. Diese wird, der Vergleichbarkeit halber, typischerweise auf die Masse oder das Volumen der Matrix referenziert. Für poröse Systeme in der Chromatographie ist diese Angabe sehr verbreitet, da sowohl die Immobilisierung von Liganden als auch die Adsorption von Zielmolekülen maßgeblich von der zur Verfügung stehenden Oberfläche der stationären Phase bestimmt wird. In einem idealen System, in dem die verfügbare Oberfläche vollständig erreichbar ist, korreliert die Oberfläche linear mit der Bindungskapazität der stationären Phase.

In idealisierten Betrachtungen, wie z.B. der Betrachtung der stationären Phasen als regelmäßige Abfolge einfacher geometrischer Strukturen, kann die spezifische Oberfläche näherungsweise berechnet werden. Für komplexere Strukturen kann die Oberfläche experimentell über Gasadsorptionexperimente bestimmt werden. Hierbei ist zu beachten, dass solche Experimente nicht für alle stationären Phasen in der Flüssigkeitschromatographie sinnvoll sind.

Handelt es sich um eine stationäre Phase, die im trockenen sowie nassen Zustand (benetzt mit einem applikationsrelevanten Fluid), dieselben geometrischen Abmessungen besitzt, die folglich nicht quillt oder schrumpft, liefern solche Experimente wertvolle Daten zur Oberfläche der stationären Phase für die Flüssigkeitschromatographie. Beispiele für solche stationären Phasen sind z.B. vernetzte Zellulose oder stark vernetzte Polymernetzwerke. Sind hingegen beim Übergang vom nassen in den trockenen Zustand ein Schrumpfen oder sogar ein vollständiges oder teilweises Kollabieren der Struktur zu erwarten, sollten andere Methoden für die Bestimmung der Oberfläche herangezogen werden. Beispiele für solche Medien sind z.B. nicht oder schwach vernetzte, oberflächengebundene Polymernetzwerke oder hochporöse Gele basierend auf Polysacchariden, wie z.B. Agarose.

Eine alternative Methode für solche Materialien stellt die i-SEC (Abschnitt 2.3.1; Seite 19) dar. Über die Bestimmung der Porengrößenverteilung (der Mikro-, Meso- und in Teilen auch Makroporen) und unter Annahme einer bestimmten Geometrie der Poren kann auf die Oberfläche des Porensystems, in Abhängigkeit der Zielmolekülgröße, geschlossen werden.<sup>70,72</sup> In einer solchen Betrachtung sind jedoch *flow-through* Poren nicht enthalten. Da diese allerdings nur einen kleinen Teil der spezifischen Oberfläche ausmachen sind diese in guter Näherung zu vernachlässigen.

#### 2.3.3 Ligandendichte

Als Ligandendichte wird die Anzahl verfügbarer Liganden für das jeweilige Zielmolekül auf der Oberfläche der stationären Phase eines chromatographischen Systems bezeichnet. Dies stellt einen wesentlichen Steuerparameter für die mögliche Bindungskapazität der stationären Phase, neben den strukturellen Steuerparametern, wie zuvor bereits diskutiert, dar.<sup>57,111,112</sup> Typischerweise wird hierbei die molare Anzahl oder die Masse der verfügbaren Liganden bzw. Bindungsstellen auf das Volumen der stationären Phase referenziert. Je nach Wechselwirkung, welche die stationäre Phase mit den Zielmolekülen zeigen soll, werden ionische Funktionalitäten (Ionenaustauschchromatographie; IEX), hydrophobe Moleküle (Hydrophobe Interaktionschromatographie; HIC), aber auch Proteine oder Bindungsdomänen (Affinitätschromatographie; hier im speziellen Protein A Chromatographie) als Liganden bezeichnet. Da in dieser Arbeit die Liganden (Protein A und modifizierte funktionelle Analoga der Bindungsdomänen) ausschließlich auf die Oberfläche der stationären Phase immobilisiert werden, ist die mögliche Ligandendichte direkt proportional zur verfügbaren Oberfläche. Wie bereits beschrieben (siehe Abschnitt 2.2), können die Proteinliganden aufgrund sterischer Wechselwirkungen nicht beliebig eng auf die Oberfläche angebracht werden. Somit ist die Ligandendichte ein Steuerparameter, welcher für jede stationäre Phase in der Protein A Affinitätschromatographie gesondert angepasst bzw. optimiert werden muss.<sup>113</sup>

Für die Quantifizierung der Ligandendichte wird in der Literatur eine Vielzahl an Methoden diskutiert. Für ionische Funktionalitäten werden häufig Säure-Base-Titrationen eingesetzt.<sup>57</sup> Proteine oder Peptide als Liganden werden häufig über einen Bicinchonsäure (BCA) bzw. Bradford Test quantifiziert.<sup>114</sup> Über Infrarot- oder UV/Vis-Spektroskopie ist auch eine Bilanzierung der angebotenen Menge an Ligand und der Menge, die sich nach der Reaktion noch in Lösung befindet, ein häufig genutztes Verfahren.<sup>115,116</sup>

#### 2.4 Polymernetzwerke als chromatographische Medien

Für Membranadsorber mit z.B. Zellulose als nicht poröser Membranmatrix, ist eine direkte Funktionalisierung der vorhandenen Hydroxylgruppen mit verschiedenen Funktionalitäten (u.a Epoxide, Carbonsäuren) möglich. Dies führt allerdings zu geringen Bindungskapazitäten aufgrund der geringen spezifischen Oberfläche der Adsorber. Im Folgenden werden auf Polymernetzwerken basierende chromatographische Medien im Allgemeinen und im Einsatz als Modifizierungen von Matrixoberflächen für die Erzeugung alternativer Adsorber mit porösen und unporösen Matrices, auf Basis von kovalenten Methacrylat basierten und physikalischen Polysaccharid basierten Polymernetzwerken, beschrieben. Letztlich haben die beschriebenen Methoden gemeinsam, dass eine Optimierung der verfügbaren spezifischen Oberfläche mithilfe des Polymernetzwerks angestrebt wird.

#### 2.4.1 Kovalente Methacrylat basierte Polymernetzwerke

Eine mögliche Modifizierung nicht poröser Trägermatrices ist die Pfropfung von funktionalisiertem Polymer auf die Oberfläche der Membranmatrix (siehe Seite 7; Abschnitt 1.3).<sup>117,118</sup> Am weitaus häufigsten wird dazu die konventionelle radikalische Polymerisation verwendet.<sup>118</sup>

Initiatorzerfall	$I_2 \xrightarrow{k_d}$	2 I <sup>°</sup>
Start	i + M —►	R <sub>1</sub>
Wachstum	$R_i + M \xrightarrow{k_p}$	R <sub>i+1</sub>
Übertragung	$R_i + T \xrightarrow{k_{tr}}$	R <sub>1</sub> + P <sub>i</sub>
Abbruch	$R_1 + R_j \xrightarrow{k_{t, c, d}}$	P <sub>i+j</sub> oder P <sub>i</sub> +P <sub>j</sub>

Abbildung 10: Schematische Darstellung eines Mechanismus zur konventionellen radikalischen Polymerisation, dargestellt sind die einzelnen Reaktionsschritte und die zugehörigen Geschwindigkeitskoeffizienten k<sub>i</sub>.<sup>90</sup>

Die konventionelle radikalische Polymerisation bietet die Möglichkeit die verschiedensten Monomere zu verwenden. Zwingende Voraussetzung ist jedoch eine endständige  $\pi$ -Bindung zwischen zwei Kohlenstoffatomen.<sup>90</sup> Sie ist unempfindlich gegenüber Verunreinigungen wie Sauerstoff oder Kohlenstoffdioxid und tolerant gegenüber vielen funktionellen Gruppen, z.B. Alkoholen, Amiden und Epoxiden.<sup>90</sup> Sie kann unter verschiedenen Reaktionsbedingungen, wie in Substanz, Lösung, Emulsion und Suspension durchgeführt werden und mit Wasser als möglichem Lösungsmittel ist sie zudem attraktiv für technische Umsetzungen.<sup>90</sup> Die konventionelle radikalische Polymerisation verläuft in den fünf Schritten Initiierung, Start, Wachstum, Übertragung und Abbruch (Abbildung 10).<sup>90</sup> Im Allgemeinen basiert sie auf der Addition von Monomeren zur wachsenden Polymerkette. Dem Start vorgelagert ist die Radikalbildung (Initiierung). Diese kann thermisch, chemisch, durch Plasma, durch Hochenergiestrahlen oder photochemisch geschehen.<sup>117</sup> Dies ist notwendig, um mittels entstehender freier Radikale an die  $\pi$ -Bindung zu addieren und Makroradikale zu erzeugen. Diese bilden dann die wachsende Polymerkette (Abbildung 10).<sup>90</sup>

Neben Membranen mit Nanoschichten aus oberflächengebundenem Polymer bzw. Polymernetzwerken (Abbildung 5; Seite 8; Abschnitt 1.3) wurden in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts monolithische Polymernetzwerke als stationäre Phasen in der Flüssigkeitschromatographie entdeckt.<sup>119–121</sup> Diese zeichnen sich durch ihre hochporöse Struktur und die netzwerkartigen, miteinander verknüpften Poren aus. Gleichzeitig befinden sich keine Hohlräume zwischen den Partikeln, wie es typischerweise bei gepackten Säulen mit porösen Partikeln vorkommt.



Abbildung 11: Schematischer Ablauf für die Herstellung von Monolithsäulen.<sup>122</sup>

Monolithe werden üblicherweise mittels konventioneller radikalischer *in situ* Polymerisation in oberflächenmodifizierten *stainless steel* Zylindern (modifiziert für *grafting-through*) für die direkte Verwendung als Trennsäulen in der *HPLC* (*high-performance-liquid chromatography*) hergestellt (Abbildung 11). Dies kann auf verschiedene Arten geschehen.<sup>119–121,123–128</sup>

Im Allgemeinen bestehen Polymerisationsansätze für Monolithen aus einem geeigneten Lösungsmittel für das Monomer bzw. die Monomere, einem UV, thermisch oder chemisch initiierten Radikalstarter, einem Vernetzer (ein Monomer mit zwei oder mehr  $\pi$ -Bindungen)
und einem oder mehreren sogenannten porogenen (für das entstehende Polymer nicht bzw. schlecht lösenden) Lösungsmitteln.

Die Morphologie der Monolithe entsteht durch Phasenseparation während der Ausbildung des Polymernetzwerks und ist somit per Definition in der Literatur der Fällungspolymerisation, bzw. der *polymerization induced phase separation* (PIPS) zugeordnet.<sup>129–131</sup> Aus der ursprünglich homogenen Lösung wird ein heterogenes Gemisch.

Die Poren entstehen hierbei durch den Ausschluss des wachsenden Polymernetzwerks aus bestimmten Bereichen, welche durch die schlechte Löslichkeit des wachsenden Polymernetzwerks im porogenen Lösungsmittel verursacht werden was zu einer Fällung bzw. unter bestimmten Umständen zu einer spinodalen Entmischung führt.<sup>122,130</sup>

Für die Herstellung monolithischen Polymernetzwerkstrukturen von werden Fällungspolymerisationen typischerweise in relativ hoch konzentrierten Polymerisationslösungen durchgeführt, um eine zusammenhängende bikontinuierliche Polymernetzwerkstruktur zu erzeugen.<sup>126,128,130,131</sup> Die Größe und Verteilung der entstehenden Polymernetzwerkstrukturen wird hauptsächlich durch die porogenen Lösungsmittel (volumetrischer Anteil und Art), den Vernetzer (molarer Anteil und Art) und dem Verhältnis von Monomer zur porogenen Phase bestimmt (Abbildung 12; Abbildung 13).<sup>34</sup>



Abbildung 12: Beispielhafte REM Aufnahmen zweier monolitischer Strukturen auf Matrixoberflächen bei 60000-facher Vergrößerung. Zusammensetzung entsprechend Versuch 4 (links) und Versuch 8 (rechts) in Tabelle 10 (Anhang 12.2).

Der Initiator beeinflusst die Porengröße und Verteilung seinerseits durch seine Konzentration und die Geschwindigkeit seines Zerfalls, indem er die Kettenlängen bzw. die Maschenweite im Polymernetzwerk beeinflusst. Je schneller dieser Radikale freisetzt, desto kleiner werden die Maschenweiten im Polymernetzwerk aufgrund der Mehrzahl an gestarteten Polymerketten, welche folglich zu kürzeren statistischen Abständen zwischen den Knotenpunkten im Polymernetzwerk führen.<sup>34</sup> Dies wiederum beeinflusst auch die Löslichkeit im Lösungsmittel. Systeme mit mehreren porogenen Lösungsmitteln sorgen in der Regel für eine bessere Löslichkeit der sich bildenden Polymere im Polymerisationsansatz und verändern so zusätzlich die sich ausbildenden Poren durch eine später einsetzende Fällung bzw. spinodale Entmischung. Üblicherweise werden leichte Alkohole oder Ether wie 1-Propanol, Dodecanol oder Tetrahydofuran als porogene Lösungsmittel verwendet.<sup>132,133</sup>



Abbildung 13: Beispielhafte REM Aufnahmen von monolitischen Strukturen auf Matrixoberflächen bei 6000 facher Vergrößerung. Zusammensetzung entsprechend Versuch 23 in Tabelle 9 (Anhang 12.1). Lösungsmittel 1-Decanol und Cyclohexanol (100 v% Cyclohexanol abzüglich der hier angegebenen Anteile an 1-Decanol).

Innerhalb der Porenstruktur der Monolithe gibt es vier Haupttypen von Poren. Die sogenannten flow-through Poren (>100 nm), Makroporen (>50 nm), Mesoporen (2 nm-50 nm) und die Mikroporen (<2 nm). Die *flow-through* Poren und Makroporen ermöglichen einen konvektiven Fluss durch die Matrix. Diese machen allerdings nur einen kleinen Teil der spezifischen Oberfläche des Monolithen aus.<sup>132–134</sup> Mesoporen und Mikroporen hingegen erlauben aufgrund ihres Durchmessers keinen oder kaum konvektiven Fluss, tragen allerdings signifikant zu der hohen spezifischen Oberfläche des Monolithen bei und sind somit maßgeblich an den hohen Bindungskapazitäten der Monolithe beteiligt.<sup>134,135</sup> Zusätzlich ist die Länge der Poren für die ausschlaggebend spätere *performance* als stationäre Phase in der Flüssigkeitschromatographie. Kurze Poren tragen, wie schmale Poren, stärker zur spezifischen Oberfläche bei, vermindern aber die konvektive Strömung innerhalb des Monolithen.<sup>128</sup> Für eine stationäre Phase im Downstream Prozess sind beide Aspekte wichtig, die Permeabilität für die realisierbare Prozessgeschwindigkeit und die Bindungskapazität pro Volumen der stationären Phase für eine optimale Ausnutzung dieser.

Hierfür ist es notwendig, dass innerhalb des Monolithen die Balance zwischen möglichst hohem konvektiven Fluss und hoher Oberfläche gefunden wird. Dies macht eine optimale Mischung aus Makro-, Meso- und Mikroporen notwendig. Aufgrund der interessanten Eigenschaften der monolitischen Polymernetzwerke finden sich in der Literatur auch hybride Materialien, die monolitische Polymernetzwerke mit Membran- bzw. Vliesmatrices verknüpfen.<sup>65,68</sup> Diese Materialien weisen, insbesondere für die IEX-Chromatographie kleinerer Proteine wie z.B. Lysozym, hohe Bindungskapazitäten auf. Allerdings sind die dabei erzielten Permeabilitäten deutlich unterhalb dessen, was mit z.B. Membranadsorbern mit oberflächengebundenen Polymer Nanoschichten erreicht werden kann.

Dies liegt im Wesentlichen an der vollständigen Ausfüllung der Poren der Membran- bzw. Vliesmatrix mit den monolithischen Polymernetzwerken. Dadurch wird die Porosität der Trägermatrix durch die Porosität des monolitischen Polymernetzwerks ersetzt. Wird die Leistung  $L_C$  solcher Materialien als Produkt von gebundenem Protein bei 10 % des Durchbruchs pro Volumen Membran  $DBC_{10\%}$  [mg/mL] und seiner Permeabilität P [mD] beschrieben (Gleichung 6), so ergeben sich für kommerziell erhältliche, hybride Materialien, trotz ihrer hohen Bindungskapazitäten, Werte deutlich unterhalb der Werte, die für Membranadsorber mit oberflächengebundenen Polymer Nanoschichten erreicht werden.

Aufgrund der starken Abhängigkeit der möglichen Proteinbindungskapazität zur spezifischen Oberfläche des chromatographischen Mediums (Abschnitt 2.2) kann in Gleichung 6 die Bindungskapazität durch die spezifische Oberfläche  $O_S$  ersetzt werden (Gleichung 7) um einen Wert für die Leistung *L* des chromatographischen Mediums zu erhalten.<sup>2</sup>

$$L_{C} = DBC_{10\%}P\left[\frac{mgmD}{mL}\right]$$
(6)

$$L_0 = O_S P\left[\frac{m^2 m D}{mL}\right] \tag{7}$$

Wird eine wie zuvor beschriebene Polymerisation, für die Herstellung monolithischer Polymernetzwerkstrukturen, in Gegenwart lediglich verdünnter Mengen an Monomer und Vernetzer durchgeführt ergibt sich jedoch, trotz gleicher chemischer Zusammensetzung des Polymernetzwerks, eine andere mikroskopische Morphologie des Polymernetzwerks.<sup>136,137</sup>



Schema 1: Schematische Darstellung der stattfindenden und möglichen Teilreaktionen mit den dazugehörigen Geschwindigkeitskoeffizienten  $k_i$  während der Fällungspolymerisation, adaptiert nach Medina-Castillo<sup>136</sup>.

Hierbei spielen die gleichen Effekte, wie bereits zuvor beschrieben, eine Rolle. Dies liegt darin begründet, dass beide Strukturtypen auf den gleichen thermodynamischen zusammenhängen der Löslichkeit von wachsenden Polymeren bzw. Polymernetzwerken in Lösungsmitteln beruhen. Polymernetzwerkstrukturen, die strukturell den monolithischen Polymernetzwerken zugeordnet werden, können auch als zusammenhängende Homo Koagualate einer verdünnten Fällungspolymerisation beschrieben werden (Schema 1c).

Allerdings ist die Morphologie des entstehenden Polymernetzwerks, wie bereits beschrieben, eine andere. Durch die Verdünnung entstehen isolierte globuläre Partikel, da die einzelnen präpolymeren Nuklei in der Frühphase einer solchen Polymerisation, aufgrund des räumlichen Abstands zueinander, nicht oder nur wenig mit anderen wechselwirken (Schema 1b).<sup>136,137</sup>

Können die präpolymeren Nuklei, aufgrund eines geringen Abstands zueinander bis zu einem gewissen Grad miteinander reagieren, entsteht eine Homo-Koagulation. Es bilden sich kovalent miteinander verbundene Nuklei-Cluster, die je nach Konzentration der präpolymeren Nuklei unterschiedlich groß, bis hin zu einer zusammenhängenden Struktur, ausfallen können (Schema 1c).<sup>136</sup>

Wie bereits zuvor beschrieben haben auch die Löslichkeitscharakteristika der verwendeten Lösungsmittel einen großen Einfluss auf die erzielte Morphologie solcher Polymernetzwerke. Entstehen während einer Fällungspolymerisation aufgrund zu guter Löslichkeit des Polymers im Lösungsmittel, keine oder nur sehr wenige Nuklei, so entsteht dabei ein polymeres Gel (Schema 1d).<sup>136</sup> Um die Lösungsmittel und ihre Löslichkeitsverhalten zu charakterisieren werden häufig die sogenannten Hansen-Löslichkeits Parameter herangezogen. Diese sind empirisch bestimmte Parameter, welche die London Wechselwirkungen ( $\delta_D$ ), die dipolaren Wechselwirkungen ( $\delta_P$ ) und die Wasserstoffbrückenbindungswechselwirkungen ( $\delta_H$ ) beschreiben.<sup>138</sup> Diese drei Parameter können als Koordinaten für einen Punkt in drei Dimensionen behandelt werden, auch als Hansen-Raum bekannt. Je näher sich zwei Moleküle in diesem dreidimensionalen Raum sind, desto wahrscheinlicher ist es, dass sie sich ineinander auflösen. Um zu bestimmen, ob die Parameter von zwei Molekülen (üblicherweise ein Lösungsmittel und ein Polymer) innerhalb des Bereichs liegen, wird für die Substanz die gelöst wird ein empirischer Wert bestimmt, der als Wechselwirkungsradius ( $R_0$ ) bezeichnet wird. Dieser Wert bestimmt den Radius der Kugel im Hansen-Raum und sein Mittelpunkt sind die drei Hansen-Parameter. Diese Parameter sind für viele kommerziell erhältliche Lösungsmittel in der Literatur zu finden.<sup>138</sup>

#### 2.4.2 Physikalische Polysaccharid basierte Polymernetzwerke

Als physikalische Polysaccharid basierte Polymernetzwerke werden im folgenden Polysaccharide bezeichnet, welche aus natürlichen Quellen gewonnen werden und in der Lage sind Polymernetzwerke auszubilden. Solche üblicherweise als Geliermittel bezeichneten Polysaccharide finden neben der Lebensmittelindustrie (Lebensmittelzusatzstoffe E406, Agar; E415, Xanthan oder E440, Pektin) auch in der Herstellung stationärer Phasen für die Flüssigkeitschromatographie und Gelelektrophorese rege Verwendung.

Insbesondere Agarose, das aus Agar gewonnen wird, ist das Basismaterial vieler kommerziell erhältlicher poröser Partikel.<sup>24,25,116,139–143</sup> Agarose wird aus der roten Seealge gewonnen und ist ein lineares Polysaccharid bestehend aus 1,3-verknüpfter  $\beta$ -D-Galactopyranose und 1,4-verknüpfter 3,6-hydrierter  $\alpha$ -L-Galactopyranose. <sup>25,144</sup> Agarose ist in heißen, wässrigen Lösungen löslich und geliert unterhalb von ca. 45 °C aus. Hierbei gilt es zu beachten, dass es verschiedene Subklassen von kommerziell erhältlichen Agarosen gibt, die sich im Wesentlichen in der Herkunft (exakte Algenart) und der damit verknüpften exakten chemischen Zusammensetzung oder aus synthetisch erzeugten Agarose Derivaten ergeben. Für die Ausbildung des Polymernetzwerks sind u.a. die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Polysaccharidketten verantwortlich. Folglich führt eine chemische Modifikation der ursprünglichen Polysaccharidketten zu einer Modifikation des Polymernetzwerks und seiner Eigenschaften.

Zusätzlich werden kommerziell auch verschiedene Kettenlängen und Dispersitäten vertrieben. Somit sind auch die Schmelz- und Gelpunkte dieser verschiedenen kommerziell erhältlichen Agarosen unterschiedlich. Röntgenstreu Experimente legen nahe, dass Agarose eine Doppel-Helix Struktur annimmt, sobald diese geliert (Abbildung 14).<sup>145</sup> Wenn diese aggregieren bilden sich in der Gelstruktur Poren von ca. 50 nm bis über 200 nm Durchmesser aus. Die Porengröße ist hierbei abhängig von der Konzentration an Agarose in wässriger Lösung, der Elektrolytkonzentration und dem Temperaturgradienten, mit dem die Lösung abgekühlt wird.

Allgemein lässt sich sagen, je höher konzentriert die Agarose, je kleiner die Elektrolytkonzentration und je höher der Temperaturgradient, desto kleiner die Porendurchmesser.<sup>146,147</sup> In Kapitel II (Seite 81 ff.) wird auf die Steuerparameter der Gelierung genauer eingegangen.



Abbildung 14: Schematische Darstellung der Gelierung von Agarose.<sup>146</sup>

Die sich selbständig ausbildenden Poren im Makro- bzw. Mesoporenbereich sind ein entscheidender Vorteil von Agarose gegenüber anderen, in der Flüssigkeitschromatographie ebenfalls verwendeten, Materialien. Durch die inhärente Porosität besitzen Materialien aus Agarose eine sehr hohe innere Oberfläche und können somit hohe Bindungskapazitäten erreichen. Auch ist die Porengröße des entstehenden porösen Systems, wie soeben beschreiben, relativ leicht steuerbar.<sup>146</sup> Zudem ist Agarose, über die vorhandenen Hydroxylfunktionalitäten, leicht chemisch modifizierbar, um Liganden auf der Oberfläche zu immobilisieren.

Insbesondere in der Protein A Affinitätschromatographie sind poröse Partikel aus Agarose die stationäre Phase der Wahl für fast alle großen kommerziellen Hersteller solcher Produkte.<sup>148</sup>

# 2.5 Confocal-Laser-Scanning (CLS) und Stimulated-Emission-Depletion (STED) Mikroskopie

Mikroskopische Methoden sowie die Lichtmikroskopie oder die Rasterelektronenmikroskopie sind weit verbreitet in der qualitativen Charakterisierung von Festkörpern und Oberflächen. Bei der qualitativen Betrachtung von Membranstrukturen ist die Lichtmikroskopie, aufgrund der limitierten Auflösung und der Strukturen im niedrigen Mikrometerbereich, häufig nicht geeignet.

Gängiger sind hier die Rasterelektronenmikroskopie oder die *Atomic-Force* Mikroskopie, aufgrund der deutlich höheren Auflösung. Allerdings ist es, insbesondere bei Membranen, die in der Flüssigkeitschromatographie eingesetzt werden sollen, von Vorteil, dass eine Charakterisierung solcher Strukturen im nassen Zustand stattfindet. Dies gilt besonders für Matrices, die einen strukturellen Unterschied zwischen ihrem trockenen und Fluid benetzten Zustand aufweisen.

Aus diesen Voraussetzungen schlussfolgernd eignet sich die *Confocal-Laser-Scanning* Mikroskopie in besonderem Maße, um solche Strukturen mikroskopisch untersuchen zu können.

Neben der Verwendung Fluid benetzter Proben, ist es gleichzeitig möglich eine ausreichend gute Auflösung zu erzielen. Dies hängt u.a. mit dem starken Kontrast zusammen, welcher durch den Einsatz von kovalent immobilisierten Flourophoren und dem Aufbau des Konfokalmikroskops ermöglicht wird.

In einem Konfokalmikroskop werden zwei konfokale Löcher, sogenannte *pinholes*, genutzt, wobei eines unmittelbar vor dem Detektor positioniert ist, um das von der Probe emittierte Licht von Streulicht zu filtern. Dadurch wird die Auflösung der erhaltenen Bilder deutlich erhöht.

Im Gegensatz zur Weitfeldmikroskopie wird ein Bild erzeugt indem ein Laser die Probe scannt und jeden Bildpunkt einzeln detektiert.<sup>149</sup> Die Fokussierung auf einen einzelnen Bildpunkt erfolgt durch den Einsatz des zweiten *pinholes*.



Abbildung 15: Schematische Darstellung eines CLSM-Aufbaus.<sup>149</sup>

Aus den einzelnen Bildpunkten wird anschließend das Gesamtbild der Probe zusammengesetzt. Die Fokussierung ermöglicht dadurch auch die Auflösung einzelner Bildpunkte in unterschiedlichen z-Ebenen.

Kontrastreiche Bilder mit hoher Auflösung aus verschiedenen z-Ebenen erlauben eine spätere Rekonstruktion der untersuchten Strukturen im 3D-Modell. Für die Anregung wird meist kohärentes Licht in Form eines Lasers verwendet, sodass eine Fokussierung am zweiten *pinhole* nicht mehr nötig ist und dieses entfällt.<sup>149</sup>

Die Betrachtung von Membranen und Membranadsorbern mittels *Confocal-Laser-Scanning* Mikroskopie wurde in der Literatur bereits mehrfach gezeigt.<sup>87,88,150,151</sup> Allerdings konnten diesen qualitativen Analysen nur wenige quantitative Strukturmerkmale der untersuchten Membranen entnommen werden. Die Auflösung dieser Technik ist allerdings durch das *Abbe*-Limit auf maximal 200 nm begrenzt (Gleichung 8).<sup>152</sup>

$$\Delta d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \tag{8}$$

$$\Delta d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + \frac{I}{I_{Sat}}}}$$
(9)

Eine weiterentwickelte Form der CLSM ist die *Stimulated-Emission-Depletion* (STED)-Mikroskopie. Hierbei kommt ein Fluoreszenz deaktivierender, ringförmiger Laser zum Einsatz, der, je nach Abmessung, nur einen kleinen Bereich an Fluoreszenz im inneren des Rings belässt. Durch den Einsatz dieser stimulierten Emission wird eine deutlich höhere, theoretisch unbegrenzte, Auflösung erreicht.

Durch diese Neuerung ist es gelungen das *Abbe*-Limit zu verschieben (Gleichung 9).<sup>152–154</sup> Wobei *I* die maximale Fokale Intensität des ringförmigen STED-Lasers und  $I_{Sat}$  die charakteristische Sättigungsintensität (Wert, bei der die Fluoreszenzwahrscheinlichkeit auf ~1/e gesunken ist) darstellt. Mithilfe dieser Technik ist es somit möglich Strukturen deutlich unterhalb der 200 nm in guter Auflösung darzustellen.

# 2.6 Mathematische Beschreibung von Membranstrukturen im Hinblick auf ihre chromatographische Leistung *L*<sub>0</sub>

Werden Membranen als Quader mit regelmäßig angeordneten, zylindrisch geformten Löchern betrachtet ergibt sich ihr makroskopisches Membranvolumen  $V_{MV}$  (Gleichung 10) bzw. ihr Porenvolumen  $V_P$  (Gleichung 11) wie folgt.

$$V_{MV} = L \cdot B \cdot H \tag{10}$$

$$V_P = \pi r^2 H \cdot \frac{L \cdot B}{r^2 2\sqrt{3}} \tag{11}$$

Wobei *L* die Länge, *B* die Breite und *H* die Höhe des betrachteten Quaders und *r* den Radius der einzelnen Pore beschreibt. Die Porenanzahl selbst ergibt sich aus dem Verhältnis der Fläche der Modellmembran und der Fläche der Pore. Für die Fläche der Pore wird eine hexagonale Verteilung der Poren angenommen, da sich die Poren nicht überschneiden. Ihre Porosität  $P_M$ , sprich der volumetrische Anteil an Poren innerhalb der Membran, ergibt sich dann nach Gleichung 12.

$$P_M \left[\%\right] = \left(\frac{V_P}{V_{MV}}\right) \cdot 100 \tag{12}$$

Die Oberfläche  $O_M$  einer solchen Modellmembran setzt sich dann aus der Mantelfläche der Poren und der verbliebenen Oberfläche des Quaders zusammen (Gleichung 13).

$$O_M = 2\pi r H + (2 \cdot (LB + LH + BH) - 2\pi r^2 \cdot \left(\frac{L \cdot B}{r^2 2\sqrt{3}}\right))$$
(13)

$$O_S = \frac{O_M}{V_{MV}} \tag{14}$$

Die spezifische Oberfläche ergibt sich dann aus dem Verhältnis zwischen der Oberfläche  $O_M$  zu dem makroskopischen Membranvolumen  $V_{MV}$  (Gleichung 14). Über das Hagen-Poiseuille`sche<sup>155</sup> Gesetz, das die Strömungsgeschwindigkeiten in Rohren beschreibt, als solche die zylindrischen Poren hier verstanden werden, kann im Folgenden auch der Volumenstrom  $\dot{V}$ durch eine solche Membran beschrieben werden (Gleichung 15).

$$\dot{V}\left[\frac{m^3}{s}\right] = \frac{dV}{dt} = \frac{\pi r^4 \Delta p}{8\eta H}$$
(15)

$$P_{i} = \left(\frac{\dot{V} \cdot \left(\frac{L \cdot B}{r^{2} 2\sqrt{3}}\right)}{L \cdot B}\right) \cdot 100 \cdot \eta_{F} \frac{\Delta d}{\Delta p}$$
(16)

Wobei r den Radius,  $\Delta p$  die Druckdifferenz zwischen Anfang und Ende des Rohres,  $\eta$  die dynamische Viskosität des betrachteten Fluides und H die Höhe bzw. die Länge der einzelnen Pore beschreibt.



Abbildung 16: Beispielhafte Auftragung der Permeabilität und der spezifischen Oberfläche einer Modellmembran gegen den Porenradius. Festgelegte Porosität 80 %.

Die Permeabilität (Gleichung 16) kann somit aus Gleichung 1 und 15 beschrieben werden, indem die Strömungsgeschwindigkeit für alle Poren in eine lineare Flussgeschwindigkeit in [cm/s] überführt wird (Gleichung 16).

Nach Gleichung 6 ist die Leistung eines chromatographischen Mediums definiert als das Produkt der Menge gebundenen Proteins bei 10% des Durchbruchs (DBC<sub>10%</sub>) und der jeweiligen Permeabilität.

Die Menge gebundenen Proteins hängt u.a. stark von der spezifischen Oberfläche des chromatographischen Mediums ab. Wird die spezifische Oberfläche und die Permeabilität der Modellmembran im Verhältnis zum Porenradius, bei gegebener Porosität (Abbildung 16; 80 % Porosität) betrachtet, ergibt sich daraus eine Limitierung in Bezug auf die chromatographische Leistungsfähigkeit von Membranen. Es ist zu erkennen, dass kleine Porenradien zwar zu größeren spezifischen Oberflächen, aber auch zu einer kleineren Permeabilitäten führen.

Werden die so erhaltenen Leistungsdaten gegeneinander aufgetragen, ergibt sich eine sogenannte *trade-off* Kurve (Abbildung 17), welche die soeben beschriebene Limitierung von

Membranen als chromatographisches Medium noch einmal verdeutlicht. Eine Steigerung der Leistung nach Gleichung 7 bedeutet in diesem Zusammenhang also immer auch ein verschieben einer solchen *trade-off* Kurve, wie in Abbildung 17 beispielhaft dargestellt.



Abbildung 17: *trade-off* Kurve (schwarz) zwischen der Permeabilität und der spezifischen Oberfläche der Modellmembran aus Abbildung 16 und gewünschte Verschiebung der *performance* (rot).

# **3.** Kapitel I – Oberflächenmodifikation von Zellulosemembranen mittels Fällungspolymerisation

## **3.1 Einleitung**

Aufgrund der eingangs beschriebenen Notwendigkeit hoher Leistungen der chromatographischen Medien, ist neben der maximal möglichen Proteinbindung bzw. der spezifischen Oberfläche, auch die Permeabilität neuartiger Membranadsorber ein entscheidendes Kriterium zu deren Beurteilung (Gleichung 6 und 7) und Vergleich mit bereits kommerziell erhältlichen Absorbern oder klassischen chromatographischen Medien.

Somit sind als physikalische Strukturparameter der chromatographischen Medien vor allem die spezifische Oberfläche, für eine möglichst hohe Proteinbindung, als auch der Radius bzw. der Durchmesser der konvektiven Poren, für eine entsprechend hohe Permeabilität, von entscheidender Bedeutung.

Da die direkte Oberflächenmodifizierung nach den grafting-Verfahren für eine Anwendung in der Protein A Affinitätchromatographie nicht geeignet erscheint (Abschnitt 1.3) und die monolitischen Strukturen hybrider Adsorber zu nur sehr geringen Permeabilitäten führen (Abschnitt 2.4.1), wird im Weiteren die Modifizierung mittels verdünnter Fällungspolymerisation beschrieben. Diese soll die gezielte Erzeugung globulärer Strukturen auf der Membranoberfläche ermöglichen, ohne dabei die Poren der Membran vollständig auszufüllen. Durch diese Form der Modifizierung soll eine Vergrößerung der Oberflächenrauigkeit und damit auch der spezifischen Oberfläche erreicht werden. Zusätzlich dient diese Modifizierung auch als inhärente Funktionalisierung der Membranoberfläche mit den entsprechenden funktionellen Polymernetzwerken. Hierbei findet keine vorherige Funktionalisierung der Oberfläche statt, sodass die globulären Strukturen allein durch Adhäsion an der Membranoberfläche verbleiben.

Es werden die Einflüsse von Monomer-, Initiator- und Vernetzerkonzentration sowie der Einfluss des Lösemittels und der verwendeten Ausgangsmembran auf die entstehenden globulären Strukturen untersucht. Des Weiteren wird der Zusammenhang der Morphologie und der Größe der globulären Strukturen auf die leistungsrelevanten Strukturparameter untersucht. Letztlich werden die so modifizierten Membranen mit den Liganden (*rsPA50* und *ProteinA*), welche für die Anwendung in der Protein A Affinitätschromatographie notwendig sind, umgesetzt. Die reaktionsrelevanten Parameter werden hierbei in Zusammenhang mit der chromatographischen Leistung, insbesondere der Proteinbindungskapazität, gesetzt.

# 3.2 Materialien und Methoden

# **3.2.1 Materialien**

Tabelle 1: In Abschnitt 3 genutzte Chemikalien mit Hersteller und CAS-Nummer.

Chemikalie	CAS-Nr.	Hersteller
Kaliumchlorid (>99,5%)	7447-40-7	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tyramin (>98%)	51-67-2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
2-Hydroxy-4-(2-hydroxyetoxy)-2- methylpropiophenon (98%)	106797-53-9	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Aceton (≥99,9%)	67-64-1	Carl Roth GmbH
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP, ≥98%)	51805-45-9	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
ProteinA (lyophilisiert)	/	Osaka Soda Co. Ltd.
rsPA50 (>95%)	/	Repligen GmbH
Dichlormethan (DCM) (≥99,9%)	75-09-2	Carl Roth GmbH
Natriumcyanoborhydride, (≥95%)	25895-60-7	Alfa Aesar GmbH
Natriumborhydrid (≥96%)	16940-66-2	Merck KGaA
Dinatriumhydrogenphosphat (98%)	7782-85-6	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glycidylmethacrylat (GMA) (>99%)	106-91-2	DOW Chemicals AG
Cyclohexanol (≥99%)	108-93-0	Merck KGaA
1-Decanol (≥99%)	112-30-1	Merck KGaA
konz. Salzsäure (32%ig)	7647-01-1	Carl Roth GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat (99,5%)	7778-77-0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumchlorid (>99,8%)	7647-14-5	Carl Roth GmbH
Natriumhydroxid (≥99%)	1310-73-2	Carl Roth GmbH
Glycin (>99%)	56-40-6	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

BCA Protein Assay Reagent A	/	Thermo Fisher Scientific GmbH
(Pierce Prod. Nr. 23221)		
BCA Protein Assay Reagent B	/	Thermo Fisher Scientific GmbH
(Pierce Prod. Nr. 23224)		
Natriummetaperiodat (≥99%)	7790-28-5	Merck KGaA
Trimethylolpropantriacrylat (t. grade)	15625-89-5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethylenglycoldimethacrylat	97-90-5	Evonik-Degussa GmbH
(EDMA, ≥98%)		
Cellca II (IgG)	/	Sartorius Stedim Cellca GmbH
Alexa Fluor® 594 NHS Ester	/	Thermo Fisher Scientific GmbH
Ethanol (t. grade)	64-17-5	Merck KGaA
Porefil®	/	Porometer Ltd.
Lysozym (from chicken egg white)	/	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Als Ausgangsmaterialien werden vernetzte Zellulosemembranen der Firma *Sartorius Stedim Biotech GmbH* genutzt.<sup>156</sup> Als reines Wasser dient das vor Ort durch Umkehrosmose gewonnene RO-Wasser (*reverse osmosis*, ROW). Dieses wird als Spülmedium für die modifizierten Membranen verwendet. Die in diesem Kapitel verwendeten Puffer werden wie folgt hergestellt.

1xPBS-Puffer (Waschpuffer): 1000 g Wasser werden vorgelegt und 8,00 g Natriumchlorid,0,2 gKaliumchlorid,1,42 gDinatriumhydrogenphosphatund0,27 gKaliumdihydrogenphosphat darin gelöst.

0,1 M Glycinpuffer (Elutionslösung): 1 L ROW wird mit 0,1 M HCl auf einen pH-Wert von 3,5 eingestellt. In 1 L dieser Lösung wird im Anschluss 7,5 g Glycin gelöst.

Bindungspuffer: In 1 L Waschpuffer (1xPBS-Puffer) wird 0,5 g IgG (Cellca II) gelöst (0,05 w%). Die Proteinlösung wird durch einen Sterilfilter der Firma *Sartorius Stedim Biotech GmbH* (0,22 µm) filtriert.

KPI-Puffer: 541,5 g Wasser werden vorgelegt und 208,5 g Dikaliumhydrogenphosphat gelöst. Zusätzlich werden 383,0 g Wasser vorgelegt und 117,0 g Kaliumdihydrogenphosphat gelöst. Letztere Lösung wird zur ersten zugegeben, bis ein pH-Wert von 7,0 erreicht ist. Im Anschluss werden 5 L Wasser vorgelegt und mithilfe der zuvor hergestellten Lösung eine Leitfähigkeit von 1,75 mS/cm eingestellt.

### 3.2.2 Oberflächenmodifikation mittels Fällungspolymerisation



Abbildung 18: Hauptkomponenten einer typischen Polymerisationslösung; das Monomer GMA, der UV-Initiator 2-Hydroxy-4-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenon, der Vernetzer EDMA, das Lösungsmittel 1-Decanol und das Lösungsmittel Cyclohexanol.

Für die Oberflächenmodifikation mittels Fällungspolymerisation werden aus dem Ausgangsmaterial Stanzlinge (d = 70 mm) ausgestanzt. Diese werden mittels Pinzette bis zur vollständigen Benetzung der Membran in die Polymerisationslösung eingetaucht. Für eine typische Polymerisationslösung werden 3,00 mL (3,12 g; 21,90 mmol; 0,21 Äq.) Glycidylmethacrylat, 0,16 g (0,71 mmol; 7·10<sup>-3</sup> Äq.) 2-Hydroxy-4-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenon, 1,00 mL (1,05 g; 5,29 mmol; 0,05 Äq.) Ethylenglycoldimethacrylat, 1,00 mL (0,83 g; 5,24 mmol; 0,05 Äq.) 1-Decanol und 11,00 mL (10,45 g; 104,30 mmol; 1,00 Äq.) Cyclohexanol eingewogen bzw. abgemessen und bis zum vollständigen Lösen 30 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Anschließend werden die mit Polymerisationslösung benetzten Proben luftblasenfrei zwischen zwei LD-PE (*low-density polyethylen*) Folien platziert und mit UV-Licht (Ultraviolettes Licht; 254 nm, 40 W) bestrahlt (20 Minuten). Für die hierbei ablaufende UV-initiierte, konventionelle, radikalische Polymerisation (Schema 2) wird ein UV-Crosslinker BLX-E254 BIO-Link des Herstellers *LLG* verwendet. Die modifizierten Membranen werden abschließend 10 Minuten unter laufendem ROW gespült und anschließend für 20 Minuten in Aceton geschüttelt und an Luft getrocknet.

Auf diesen Membranen wird anschließend der Ligand (Protein A) immobilisiert. In dieser Arbeit werden zwei verschiedene kommerziell erhältliche Protein A Liganden eingesetzt und miteinander verglichen. Der Ligand *rsPA50* der Firma *Repligen GmbH* und der Ligand *ProteinA* der Firma *Osaka Soda Co. Ltd.* 



Schema 2:Schematische Darstellung der konventionellen radikalischen Polymerisation nach UV-Initiierung. M = Monomer,  $R_{1/2} = Radikal$ ,  $P_n = Präpolymer bzw.$  Makroradikal, V = Vernetzer.

Beide Liganden unterscheiden sich in ihrer Struktur und den vorhandenen funktionellen Gruppen, welche für eine Immobilisierung zur Verfügung stehen. Der Ligand *rsPA50* weist laut Hersteller eine molare Masse von 45 Kg/mol auf und für die Immobilisierung stehen primäre Amine, hauptsächlich durch vorhandene Lysine, in der Primärstruktur des Proteins, zur Verfügung. Der Ligand *ProteinA* weist laut Hersteller eine molare Masse von 21,5 Kg/mol auf und für die Immobilisierung stehen primäre Amine (Lysine in der Primärstruktur) und eine Thiolgruppe (ein Cystein in der Primärstruktur) zur Verfügung. Es werden somit in dieser Arbeit zwei Immobilisierungskonzepte verfolgt. Eines für die Immobilisierung mit primären Aminen und eines für die Immobilisierung mit Thiolen. Die Immobilisierung mittels primären Aminen erfolgt durch Umsetzten der Epoxidfunktionalitäten zu Aldehydfunktionalitäten mit Natriummetaperiodatlösung in ROW, wodurch sich Imine zwischen dem Liganden und der Membran ausbilden, die in einem abschließenden Schritt mit Natriumcyanoborhydrid zu stabilen sekundären Aminen reduziert werden.



Schema 3: Schematische Darstellung beider in dieser Arbeit genutzten Reaktionswege zur immobilisierung der Protein Liganden *rsPA50* (a) und *ProteinA* (b).

Für eine typische Immobilisierung mittels primären Aminen werden die modifizierten Membranen 2 h in eine 0,01 w% Natriummetaperiodatlösung in ROW gelegt, 10 Minuten in fließendem ROW gespült, 20 Minuten in Aceton geschüttelt und an der Luft getrocknet. Anschließend werden die so präparierten Membranen 2 h in eine 2.5 w% Natriumcyanoborhydridlösung in Kaliumhydrogenphosphatpuffer (pH 8) gelegt (1,1 mL/cm<sup>2</sup>) zu der 4,96 · 10<sup>-3</sup> mL/cm<sup>2</sup> rsPA50 Lösung (1 mL  $\equiv$  50,4 mg rsPA50) gegeben wird, um eine Konzentration von 7,2 mg/mL zu erreichen (Reaktionsweg a in Schema 3). Anschließend werden die Membranen nach dem Immobilisierungsschritt nacheinander in eine 0.1 w% Natriumborhydridlösung, eine 5.8 w% Lösung von Natriumchlorid in ROW, einer 0,1 M Glycinlösung in ROW (mit 1M HCl auf pH 3.5 eingestellt) gelegt und für jeweils 15 Minuten auf einer Schüttelplattform (80 rpm) bewegt, um verbliebene Aldehydfunktionalitäten zu reduzieren und verbliebenes NaBH4 zu entfernen.

Die Immobilisierung mittels Thiolfunktionalitäten erfolgt durch direkte Reaktion der Thiole des *ProteinA* Liganden mit den vorhandenen Epoxiden (Reaktionsweg b in Schema 3). Für eine typische Immobilisierung mittels Thiolen werden die modifizierten Membranen für 2 h in eine Lösung bestehend aus 5 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) und 25·10<sup>-2</sup> mg/cm<sup>2</sup> *ProteinA* Ligand (entspricht einer Konzentration von 7,2 mg/mL) in Kaliumhydrogenphosphatpuffer (pH 8,5) gelegt. Die so umgesetzten Membranen werden anschließend für 30 Minuten unter fließendem ROW gespült und für 20 Minuten in 1xPBS geschüttelt. Die Lagerung erfolgte für beide Reaktionswege in 20 v% Ethanol in 1xPBS bei 8 °C im Kühlschrank, um eine bakterielle oder sonstige Denaturierung des Proteinliganden zu vermeiden.

#### 3.2.3 Physiko-chemische Charakterisierung

#### 3.2.3.1 Bestimmung des Massenzuwachses durch das Polymernetzwerk

Der Pfropfgrad beschreibt in dieser Arbeit den relativen Massezuwachs durch das Polymer, dass sich in den Kavitäten der Membran befindet. Er wird gravimetrisch mit einer Feinwaage des Modells LE225D der Firma *Sartorius Stedim Biotech GmbH* bestimmt.

$$P_{Pf} [\%] = \left(\frac{m_{Pf} - m_0}{m_0}\right) \cdot 100 \tag{17}$$

Hierfür werden zum einen die Massen der Membranen vor der Pfropfung ( $m_0$ ) und zum anderen nach der Pfropfung ( $m_{Pf}$ ) bestimmt. Um Messungenauigkeiten durch den Wassergehalt möglichst auszuschließen, wird die Messung an einer Trockenwaage bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz vorgenommen. Der Pfropfgrad  $P_{Pf}$  wird über Gleichung 17 bestimmt.

#### 3.2.3.2 Bestimmung der Porosität

Die Porosität beschreibt das volumetrische Verhältnis aus Porenraum und Struktur eines porösen Mediums und entspricht somit dem in Abschnitt 2.3.1 (Seite 19) definierten, externen Lückengrad  $\varepsilon_b$  eines chromatographischen Mediums. Sämtliche Proben dieser Arbeit werden für die Porositätsbestimmung mit ROW benetzt und im Folgenden als nass bezeichnet. Für die experimentelle Porositätsbestimmung werden zum einen die Massen der Membranen in trockenem Zustand ( $m_0$ ) und zum anderen in nassem Zustand ( $m_n$ ) bestimmt. Diese werden mit einer Feinwaage des Modells LE225D der Firma *Sartorius Stedim Biotech GmbH* bestimmt. Um Messungenauigkeiten durch den Wassergehalt bei der Bestimmung von  $m_0$  möglichst auszuschließen, wird die Messung an einer Trockenwaage bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz vorgenommen. Die Porosität  $P_M$  wird über Gleichung 18 bestimmt.

$$P_M [\%] = \left(\frac{m_n - m_0}{\pi r^2 \cdot H \cdot \rho_{ROW}}\right) \cdot 100 \tag{18}$$

Hierbei stellt *r* den Radius des vermessenen Stanzlings, *H* die Höhe bzw. die Dicke des Stanzlings und  $\rho_{ROW}$  die Dichte von Wasser dar.

#### 3.2.3.3 Bestimmung der Permeabilität

Die Untersuchung der Membranen auf ihre Permeabilität wird mittels einer speziellen Durchflussapparatur vorgenommen. Diese verfügt über acht identische Messzellen (*stainless steel* Pressure Holder, 200 mL Kapazität) der Firma *Sartorius Stedim Biotech GmbH*, welche an eine Peristaltikpumpe des Typs TC der Firma *Meredos GmbH* angeschlossen sind.

Für die Messung werden aus den zu untersuchenden Membranen Stanzlinge (d = 47 mm) ausgestanzt und ihre Dicke mittels Messschieber bestimmt. Die Stanzlinge werden jeweils in eine der acht Messzellen der Apparatur eingesetzt. Über eine Peristaltikpumpe werden die Messzellen mit ROW befüllt und ein Druck von 100 mbar aufgebaut. Durch Öffnen der Hähne werden die Messungen gestartet und die Permeate in unterhalb der Messzellen befindlichen Messbechern, die auf jeweils einer Waage stehen, aufgefangen. Die Messung ist beendet, sobald die vorher am System eingestellte Zielmasse erreicht ist. Die dafür notwendige Zeit wird gemessen und die Permeabilität  $P_i$  in der Einheit Millidarcy [mD] wie folgt (Gleichung 19) berechnet.

Es entspricht *V* dem aufgefangenen Volumen des Permeates, dass sich aus der Dichte und der gemessenen Masse ergibt, *t* der Zeit nach Beginn des Auffangens des Permeates bis zum Erreichen der Zielmasse, *A* der Membranfläche,  $\eta_{ROW}$  der dynamischen Viskosität von ROW,  $\Delta d$  der Dicke der Membran und  $\Delta p$  dem eingestellten Druck. Es wird jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

$$P[mD] = \left(\frac{\left(\frac{V[mL]}{A \ [cm^2]}\right)}{t \ [sek]}\right) \cdot \eta_{ROW}[cP] \frac{\Delta d \ [cm]}{\Delta p \ [atm]}$$
(19)

# 3.2.3.4 Bestimmung der Anzahl an immobilisierten Liganden und Aldehydfunktionalitäten

Für die Bestimmung des immobilisierten Proteins pro Membranfläche wird ein BCA (*Bicinchoninic acid*) Test verwendet.

Hierfür werden Stanzlinge (d = 13 mm) aus der zu untersuchenden, modifizierten Membran ausgestanzt und ihre Dicke mittels Messschieber bestimmt. Diese werden in Petrischalen (3 mL) vorgelegt und mit dem BCA-Reagenz (2 mL) benetzt. Das BCA-Reagenz besteht aus dem BCA Protein Assay Reagent A (Pierce Prod. Nr. 23221) und dem BCA Protein Assay Reagent B (Pierce Prod. Nr. 23224) im volumetrischen Verhältnis 50:1. Anschließend werden die so präparierten Proben 60 Minuten auf einer Schüttelplattform (80 rpm) bewegt.

Die aus der Oxidation des BCA-Reagenzes folgende Verfärbung wird als Extinktion (562 nm) gegenüber einer Referenzlösung des BCA-Reagenzes ohne Membranprobe gemessen. Die photometrischen Messungen erfolgen an einem UV/Vis-Spektralphotometer Specord200plus von *Analytik Jena AG*. Die Extinktion kann mittels einer Kalibriergerade (Abbildung 19), aus der die Gleichungen 20 (*ProteinA*) und 21 (*rsPA50*) hervorgehen, in Masse Protein [µg] umgerechnet werden.

Dieser Wert wird im Anschluss auf das Volumen des Stanzlings bezogen und in mg Protein/mL Membranvolumen ( $V_{\rm M}$ ) angegeben.

Der Bestimmung der Anzahl an Aldehydfrunktionalitäten geht die Immobilisierung von Tyramin voraus. Tyramin besitzt lediglich ein primäres Amin und reagiert somit äquimolar mit den vorhandenen Aldehydfunktionalitäten.

Die Immobilisierung verläuft nach Abschnitt 3.2.2 (Immobilisierung über primäre Amine) in großem Überschuss (2 M Tyramin) für 24 Stunden, um eine vollständige Umsetzung zu gewährleisten. Über den soeben beschriebenen BCA-Test wird die Masse an Tyramin auf dem Stanzling bestimmt (Gleichung 22), welche mit der molaren Masse von Tyramin (137,179 g/mol)<sup>157</sup> und dem Volumen des untersuchten Membranstanzlings ( $V_M$ ) umgerechnet und im Weiteren in µmol/mL angegeben wird.



Abbildung 19:Kalibriergeraden des BCA-Tests für rsPA50, Tyramin und ProteinA.

ProteinA: 
$$m_{ProetinA} \left[ \mu g \right] = 165,41 \cdot A \left[ Au \right]$$
 (20)

*rsPA50*: 
$$m_{rsPA50}$$
 [µg] = 239,53·A [Au] (21)

Tyramin: 
$$m_{Tyramin} [\mu g] = 22,76 \cdot A [Au]$$
 (22)

#### 3.2.3.5 Bestimmung der dynamischen Proteinbindungskapazität (DBC<sub>10%/100%</sub>)

Für die Ermittlung der dynamischen Proteinbindungskapazität wird ein ÄKTAexplorer Chromatographiesystem des Herstellers *GE Healthcare Europe GmbH* verwendet. Hierfür werden die Membranen ausgestanzt (d = 30 mm) und in ein Membranhaltermodul (*LP*-Modul, *Sartorius Stedim Biotech GmbH*) verbaut, welches über eine Anströmverteilung verfügt. Bei Messungen mit kommerziell erhältlichen chromatographischen Medien werden diese in den Modulen vermessen, in denen sie geliefert werden. Vor der Messung wird das Totvolumen des Systems, mitsamt chromatographischen Medium, mit Hilfe eines Aceton Pulses (2 v% Aceton in ROW) bestimmt. Da Aceton von der Membran nicht adsorbiert wird, gelangt es ohne Rückhalt zum Detektor. Der Massenschwerpunkt des dabei entstehenden Peaks entspricht dem Totvolumen. Im Anschluss werden die Membranen mit Elutionspuffer (25 mL 0,1 M Glycin pH 3,5) gespült und mit Waschpuffer (35 mL 1xPBS) equilibriert, ehe sie mit Bindungspuffer (0,5 mg/mL IgG) beladen werden. Sofern nicht anders angegeben wird in dieser Arbeit mit einer Flussgeschwindigkeit von 5 Membranvolumen/min (bei 0,3 mL Membranvolumen somit 1,5 mL/min), was einer Verweilzeit der Lösungen im chromatographischen Medium von 12 Sekunden entspricht, gearbeitet. Die Proteinkonzentration wird kontinuierlich auf der Permeatseite der Membran mittels eines UV/Vis-Spektrometers bei 280 nm bestimmt.

Die dynamische Kapazität entspricht der Masse an Protein bezogen auf das Membranvolumen, die bei Erreichen einer Permeatkonzentration von 10 % bzw. 100 % der Proteinausgangslösung von der Membran adsorbiert wird. Die dynamischen Kapazitäten werden nach Gleichung 23 berechnet.

$$DBC_{10\%/100\%} \left[\frac{mg}{mL}\right] = \frac{\left(V_{10\%/100\%} - V_{TotV}\right) \cdot c_{Proteinlösung}}{V_{MV}}$$
(23)

Hierbei ist  $DBC_{10\%/100\%}$  die dynamische Bindungskapazität bei 10 % bzw 100 % des Proteins im Permeat.  $V_{10\%/100\%}$  ist hierbei dann das Volumen, welches die Membran bis zum Erreichen dieser Werte durchströmt hat.  $V_{TotV}$  ist das Totvolumen des Versuchsaufbaus und  $V_{MV}$  das Volumen der entsprechenden Membran. Gleichzeitig wird der Druckabfall am Membranadsorber in Abhängigkeit der Flussrate aufgenommen. Dieser Wert dient als Überprüfung zur bestimmten Permeabilität, da bei konstantem Fluss und gemessenem Druckverlust auch hier die Permeabilität über Gleichung 19 direkt bestimmt werden kann.

#### 3.2.3.6 Statistische Versuchsplanung mittels Design of Experiment (DoE)

Die Bestimmung der Einflüsse und Wechselwirkungen verschiedener Parameter für verschiedene physikalische Effekte dieses Kapitels erfolgte über einen "*Design of Experiment*"-Ansatz (*MODDE*<sup>®</sup>, *Umetrics MKS Instruments AB*, Vers. 11).<sup>158</sup> Hierfür wird ein *central-coposite-face design* verwendet. Mit diesem Ansatz wird ein Versuchsraum aufgespannt, der exemplarisch für zwei zu untersuchende Faktoren in Abbildung 20 dargestellt ist. Dafür werden alle Kombinationen der Grenz- und Mittelwerte miteinander gebildet, sodass die Faktoren jeweils auf 3 Ebenen (+1/0/–1) untersucht werden.



2 Faktoren: A+B

Abbildung 20: Beispielhafte Darstellung eines central-coposite-face design Versuchsraums.

Zusätzlich wird dem Versuchsplan ein *centerpoint* hinzugefügt, bei dem von jedem Parameter der Mittelwert verwendet wird. Dieser dient zur Einschätzung, inwieweit eine Linearität einer Observablen mit dem jeweiligen Parameter besteht und wie signifikant sich ein Parameter auf eine Observable auswirkt. Über die dreifache Bestimmung des *centerpoints* wird zusätzlich bestimmt, ob die erhaltenen Daten reproduzierbar sind.<sup>158</sup> Eine Übersicht aller Versuchsbedingungen und den gemessenen Charakteristika der Membranen ist dem Anhang bzw. dem jeweiligen Kapitel zu entnehmen. Für die Darstellung des Einflusses der einzelnen Parameter auf die untersuchten Observablen werden die Ergebnisse jeweils eines Parameters über die anderen Parameter gemittelt. Der Fehlerbalken ergibt sich somit aus den Einflüssen der anderen Parameter und der Messungenauigkeit der Messmethode der jeweiligen Observablen als seine Standardabweichung. Jeder Datenpunkt enthält somit die Einflüsse aller anderen Parameter, weshalb dieser als signifikant zu betrachten ist.

# 3.2.3.7 Bestimmung des Durchmessers der kovalenten Polymernetzwerkstrukturen mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM oder Scanning Electron Microscopy, SEM) ist eine Methode um Objekte vergrößert darzustellen, wobei die theoretisch erreichbaren Vergrößerungen erheblich größer sind, als bei der klassischen Lichtmikroskopie. Die Elektronenmikroskopie basiert auf der Abbildung durch Elektronenstrahlen, welche fokussiert über die Probe geführt werden. Diese erzeugen Sekundärelektronen in der Probe, welche von einem Detektor aufgefangen werden. Die erzeugten Sekundärelektronen strahlen von der Oberfläche ungerichtet ab, werden aber durch die positive Ladung des Detektors angezogen. Somit werden alle freien Elektronen detektiert, die Auflösung der Probe erfolgt lediglich durch das Abfahren der Oberfläche mit dem Elektronenstrahl. Die Erzeugung des Elektronenstrahls erfolgt durch eine Glühkathode und eine anschließende Beschleunigung und Fokussierung in einem elektrischen Feld. Durch die Bestrahlung mit Elektronen lädt sich die Probe negativ auf, sodass diese dem Strahl mit der Zeit ein immer stärker werdendes Feld entgegensetzt. Um dies zu verhindern, werden Proben für die REM, sofern nicht selber leitfähig, mit Gold oder Graphit beschichtet, wodurch die Ladung abgeführt werden kann. In dieser Arbeit werden die Rasterelektronenmikroskop Aufnahmen an einem Nova NanoSEM, der Firma FEI Deutschland GmbH mittels HVD (high-vacuum detector), nach einer Gold Beschichtung, durchgeführt. Die Bestimmung des Durchmessers der kovalenten Polymernetzwerkstrukturen erfolgt durch händisches Ausmessen der Strukturen mittels ImageJ (1.47v). Dabei werden an REM Aufnahmen mit einer 60000x fachen Vergrößerung jeweils 40 zufällig ausgewählte Strukturen vermessen und diese Werte im Anschluss gemittelt.

### 3.3.2.8 Brunauer-Emmett-Teller (BET) Oberflächenmessung

Die in dieser Arbeit durchgeführten Oberflächenbestimmungen werden mithilfe eines Gemini V der Firma *Micromeritics GmbH* durchgeführt. Die zu messenden Proben werden zuvor abgewogen und in die Probenkammer gegeben. Diese werden daraufhin bei 100 °C und 2 mbar (Vakuum erzeugt durch eine VacPrep 061 der Firma *Micromeritics GmbH*) für 24 h ausgeheizt. Im Anschluss wird die Probenkammer mit Stickstoff gespült und erneut bei 100 °C und 2 mbar 1 h ausgeheizt. Zur eigentlichen Messung wird Stickstoff über das zu untersuchende Material geleitet. Aufgrund von Kühlung, durch flüssigen Stickstoff (–196 °C),

kann mit einem Normaldruckmessgerät unterhalb des Sättigungsdampfdruckes des Stickstoffs die adsorbierte Menge bestimmt werden (Adsorption). Anschließende Verringerung des Drucks innerhalb der Apparatur löst einen Teil der adsorbierten Gasmenge von der Oberfläche (Desorption). Dadurch kann eine Adsorptions-Desorptions-Isotherme ermittelt werden. Im Relativdruckbereich von 0,05 mbar bis 0,3 mbar ist die dabei gemessene Menge an adsorbiertem oder frei werdendem Gas proportional zur Oberfläche.<sup>77,159</sup>

# 3.2.3.9 *Confocal-Laser-Scanning* (CLSM) und *Stimulated-Emission-Depletion* (STED) Mikroskopie

Wie zuvor bereits beschreiben (Abschnitt 2.5, Seite 32) eignet sich CLS und STED Mikroskopie besonders für die Visualisierung und Charakterisierung von Membranen bzw. Membranadsorbern. Vor der Visualisierung der Proteinliganden auf der Membran mittels CLS bzw. STED Mikroskopie, werden die darauf immobilisierten Proteinliganden mit Fluorophoren spezifisch markiert, um diese sichtbar zu machen. Die kovalente Markierung der Liganden (*rsPA50* und *ProteinA*) erfolgt nach der jeweiligen Immobilisierung auf der Membran mithilfe von Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 (*Thermo Fisher Scientific GmbH*) mit reaktiver Esterfunktionalität (Succinimidyl Ester; NHS-Ester; Abbildung 21). Hierfür werden die modifizierten Membranen, auf denen der Proteinligand bereits nach Abschnitt 3.2.2 immobilisiert ist, für 2 h in einer Lösung aus 32 µg/mL Fluorophor in 1xPBS-Puffer geschüttelt.





Anschließend werden diese Membranen drei Mal für jeweils 15 Minuten in 1xPBS gewaschen und dunkel in 1xPBS gelagert.

Die so präparierten Proben werden auf einem Objektträger platziert (*Fisher Scientific GmbH*, Ultra White Glass; 75 x 25 x 1 mm) und mit 1xPBS-Puffer benetzt. Anschließend wird ein Deckglas (*Fisher Scientific GmbH*, 20 x 20 x 0,25 mm) über der Membran aufgebracht. Die in diesem Kapitel durchgeführten Experimente werden mit einem Leica TCS SP8 und einem Leica TCS SP5 (*STED*) Mikroskop durchgeführt. Für sämtliche Messungen wird ein Argon-Krypton Laser mit einem Spektrum an emittierter Strahlung von 458-591 nm und ein 63xÖl-Objektiv (HC PL APO 63x/1.40 Oil CS2; *Leica Microsystems GmbH*) verwendet. Für die STED Messungen werden zusätzlich die STED-Laser für die x- und y-Ebene (660 STED: Vortex Donut (FWHM); *Leica Microsystems GmbH*) sowie ein separater Laser für die z-Ebene (660 STED: Z Donut (FWHM); *Leica Microsystems GmbH*) dazu geschaltet.

### 3.2.3.10 Kapillarfluss Porometrie

Membranstanzlinge mit einem Durchmesser von 25 mm werden mit Porefil®, einem Perflourether, benetzt. Porefil® besitzt eine niedrige Oberflächenspannung sowie einen niedrigen Dampfdruck bei Raumtemperatur (16 mN/m; 399 Pa), womit es sich für diese Methode besonders eignet.

Nach dem vollständigen Benetzen des Membranstanzlings wird ein Stickstoffstrom oberhalb der Membran angelegt und Stickstoff durch die Membran gedrückt, wobei Porefil® über die Dauer der Messung vollständig verdrängt wird. Hierbei wird die sogenannte *pressure scan method* genutzt.<sup>110,160,161</sup> Bei dieser Methode wird der Druck des Stickstoffstroms kontinuierlich, anhand eines vordefinierten Druckgradienten, erhöht. Das gleiche Messverfahren wird direkt im Anschluss für die dann trockene Membran wiederholt. Für die Auswertung wird der Fluss, welcher hinter der Membran gemessen wird, gegen den angelegten Druck aufgetragen.

Der Druckunterschied zwischen der trockenen und der benetzten Probe  $\Delta p$  ist hierbei direkt antiproportional zum Porendurchmesser *d*. Somit kann eine Porengrößenverteilung über die Young-Laplace Gleichung (Gleichung 24) bestimmt werden.

$$\Delta p = \frac{4 \cdot \sigma \cdot \cos(\theta) \cdot a}{d} \tag{24}$$

Hierbei ist  $\sigma$  die Oberflächenspannung des verwendeten Fluids,  $\theta$  der Kontaktwinkel des verwendeten Fluids, welcher bei dem verwendeten Membranmaterial literaturgemäß zu 0° angenommen wird und *a* ist der sogenannte *shape* Faktor, der eine bestimmte zweidimensionale Porengeometrie beschreibt. In dieser Arbeit wird ein in der Literatur üblicher *shape* Faktor von 0,715 genutzt, welcher einer ovalen Porengeometrie entspricht.<sup>162</sup>

Die mittlere Porengröße ist definiert als der Punkt, in dem sich die halbe trockene Kurve, bei der alle Werte der trockenen Messung durch zwei dividiert werden, und die Kurve aus der Messung mit Porefil® schneiden. Alle Messungen werden mit einem Porolux500 der Firma *Porometer Ltd.* durchgeführt.

#### 3.2.3.11 Bestimmung der Transmission von Membranen

Die Transmission der Membranen wird mittels UV/Vis Messung bestimmt. Hierbei wird ein Streifen der jeweiligen Membran (1 x 3 cm) in einer Küvette (*Fisherbrand*<sup>TM</sup>; Quarzglas; 1 mm Weglänge) fixiert. Anschließend wird ein UV/Vis Spektrum von 220-500 nm aufgenommen und diese Messung mit der gleichen leeren Küvette wiederholt. Alle Messungen werden an einem Specord200plus von *Analytik Jena AG* durchgeführt.

### 3.3 Ergebnisse und Diskussion

Die angegebenen Fehlerbalken beziehen sich auf die Standardabweichung der Messergebnisse einer Doppelbestimmung mit der jeweiligen Messmethode bzw. dem angegebenen Gerätefehler bei Verwendung der genutzten Pipetten und Waagen. Bei *Design of Experiment* Ansätzen (Abschnitte 3.3.2, 3.3.3 und 3.3.6) ergeben sich die Fehlerbalken, wie in Abschnitt 3.2.3.6 beschrieben, aus den Einflüssen der anderen Parameter und der Messungenauigkeit der Messmethode der jeweiligen Observablen als seine Standardabweichung.

#### 3.3.1 Theoretische Betrachtung der Problemstellung

In diesem Abschnitt wird eine modellhafte Membran mit zylindrischen Poren, wie in Abschnitt 2.6 beschrieben, mit oberflächlich immobilisierten globulären Strukturen betrachtet (Abbildung 22). Hierbei gelten dieselben Gesetzmäßigkeiten wie in Abschnitt 2.6, erweitert um die geometrischen Gesetzmäßigkeiten zu Kugeln (Gleichung 25). Diese stark vereinfachte theoretische Betrachtung wird vorgenommen, um die relevanten strukturellen Parameter dieser Modifizierung zu identifizieren. Dies sind insbesondere der Durchmesser der globulären Strukturen sowie die Porengröße und Porosität der verwendeten Ausgangsmembran. Die spezifische Oberfläche der modifizierten Membran  $O_{\rm SmM}$  wird hierbei über die Oberfläche der immobilisierten globulären Struktur und der Fläche eines Hexagons, in der sich jeweils eine der immobilisierten globulären Strukturen befindet, berechnet (Gleichung 26).

Die Annahme dieser hexagonalen Raumausfüllung ist notwendig, da sich die angebundenen globulären Strukturen in diesem Modell nicht überschneiden können.

Die Permeabilität wird über Gleichung 16 berechnet. Hierbei wird dem Radius der Pore allerdings der doppelte Radius der immobilisierten globulären Struktur abgezogen. Dies berücksichtigt die Porenverengung der modifizierten Membran durch die globulären Strukturen im Vergleich zur Ausgangsmembran.

Wird die Membran aus Abschnitt 2.6 mit 80 % Porosität mit der modifizierten Membran verglichen ((Abbildung 23A und B); äquivalente Ausgangsmembran mit 100 nm Durchmesser der globulären Strukturen) fällt die Verschiebung der *trade-off* Kurve im Bereich kleiner

Permeabilitäten (100-400 nm Porenradius) auf. In diesem Bereich wird durch die Modifizierung mehr Oberfläche generiert, als gleichzeitig Permeabilität durch die Porenverengung verringert wird. Für die weiteren Berechnungen wird aufgrund dieser Ergebnisse mit einer Modellmembran mit 200 nm Porenradius gerechnet. In Abbildung 23D ist der Einfluss der Porosität zu erkennen. Je höher die Porosität, desto höher auch die Leistung einer modifizierten Membran.



Abbildung 22: Schematische Darstellung einer Pore der beschriebenen Modellmembran vor und nach der Modifizierung mit oberflächlich immobilisierten globulären Strukturen.

Λ

$$O_{iqS} = 4\pi r^2 \tag{25}$$

$$O_{SmM} = \frac{O_{igS} \cdot \frac{O_M}{r^2 \cdot 2\sqrt{3}}}{V_M} \tag{26}$$

Dies ist darin begründet, dass die Porosität entscheidend ist für die Anzahl der vorhandenen Poren und somit beide relevanten Parameter der Leistung (Gleichung 7) positiv beeinflusst.

Abbildung 23C zeigt die Auswirkungen des Durchmessers der globulären Strukturen auf die Leistung der modifizierten Membran. Es ist zu erkennen, dass die Leistung bei größer werdenden globulären Strukturen stark abnimmt. Dies wird damit begründet, dass die Permeabilität durch die effektive Verkleinerung der Porengröße stark abnimmt (Gleichung 16). Gleichzeitig steigt die Oberfläche nicht, da die Oberfläche in diesem Modell nicht von der Größe der globulären Strukturen abhängt. Die zunehmende Oberfläche für größere globuläre Strukturen wird durch die geringere Anzahl an globulären Strukturen vollständig kompensiert.



Abbildung 23: Auftragung der Permeabilität gegen die spezifische Oberfläche (*trade-off*; A); der Permeabilität bzw. der spezifischen Oberfläche gegen den Porenradius (B), der Leistung gegen den Durchmesser der globulären Strukturen (C) bzw. die Porosität (D).

Aufgrund dieser Ergebnisse und der Verfügbarkeit, wird im Weiteren, wenn nicht anders beschreiben, mit einer Membran mit 0,45 µm mittlerer Porendurchmesser und 71 % Porosität gearbeitet. Des Weiteren wird ein besonderer Fokus auf die durchschnittliche Größe der erzeugten globulären Strukturen gelegt.

#### 3.3.2 Einfluss der Verdünnung der Polymerisationslösung

Wie in Abschnitt 2.4.1 (Seite 23) beschrieben, unterscheidet sich die verdünnte Fällungspolymerisation von der Herstellung monolithischer Strukturen im Wesentlichen durch die Konzentration an Monomeren in Lösung. Um die notwendige Verdünnung bis zum vollständigen ausfüllen der Poren der verwendeten Membran (Regenerierte Zellulose; 0,45 µm mittlere Porengröße; *Sartorius Stedim Biotech GmbH*) mit monolithischen Polymernetzwerken zu ermitteln, wird in einem DOE-Ansatz (Abschnitt 3.2.3.7; Seite 43; Anhang 12.1) das

Volumen an Lösungsmittel, Monomer, Vernetzer und Initiator (Abschnitt 3.2.2; Abbildung 18) stark variiert. Hierbei wird das Gesamtvolumen des Polymerisationsansatzes konstant gehalten.

Die große Variation der einzelnen Messwerte in Abbildung 24 wird hierbei durch die Einflüsse der Monomer-, Vernetzer- und Initiatorkonzentration verursacht. Nichtsdestotrotz sind klare Trends in Bezug auf den volumetrischen Anteil an Monomer und Vernetzer zu erkennen. Mit steigendem volumetrischem Anteil sinkt die Permeabilität der modifizierten Membranen stark ab (Abbildung 24A), während gleichzeitig der Pfropfgrad stark zunimmt (Abbildung 24C). Die direkte Korrelation dieser beiden Parameter ist in Abbildung 24D zu erkennen und zeigt eine abfallende Permeabilität mit steigendem Pfropfgrad.



Abbildung 24: Auftragung der Permeabilität (A), der Leistung (B) und des Pfropfgrades (C) gegen den volumetrischen Anteil an Monomer und Vernetzer; Auftragung des Pfropfgrades gegen die Permeabilität (D). Markierte Bereiche entsprechen dem Bereich mit der maximalen Leistung  $L_0$ .

Wird die Leistung  $L_0$ , definiert nach Gleichung 7, der modifizierten Membran betrachtet (Abbildung 24B), lässt sich erkennen, dass dieser Parameter ein Maximum zwischen 10 und 15 v% aufweist und danach stark abfällt. Insbesondere die Steigung der Leistung von 0 v% (Ausgangsmaterial) auf 10 v% ist deutlich zu erkennen und liegt im Maximum bei 160 %.

Strukturell lässt sich eine niedrige Permeabilität der so modifizierten Membran auf eine annähernd gefüllte bzw. vollständig mit einem monolithischen Polymernetzwerk gefüllte Pore zurückführen (monolithische Struktur).



Abbildung 25:REM Aufnahmen von modifizierten Membranen mit 0 v% (Ausgangsmaterial; A), 34 v% (B) und 8,8 v% (C, D).

Dies ist in Abbildung 25B beispielhaft zu erkennen. Im Gegensatz dazu lassen kleine volumetrische Anteile nahe bei 10 v% darauf schließen, dass lediglich die Membranoberfläche bedeckt ist. Dies lässt sich auf den REM Aufnahmen (Abbildung 25C und D) gut erkennen.

Aufgrund dieser vorgeschalteten, prinzipiellen Untersuchung wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Fällungspolymerisation in einem Bereich zwischen 5 und 20 v% betrachtet, da sich dieser Bereich, für das hier verwendete Polymerisationssystem und die gestellten Anforderungen hinsichtlich der Leistung, als das Optimum erwiesen hat.

### 3.3.3 Einfluss der Komponenten der Polymerisationslösung

Aufgrund des deutlich sichtbaren Einflusses der Komponenten Monomer, Vernetzer und Initiator aus Abschnitt 3.3.2, wird in diesem Abschnitt deren Einfluss auf die Morphologie der globulären Strukturen im Bereich von 5-20 v% untersucht. Mithilfe dieser Erkenntnisse wird ein Zusammenhang zwischen der Morphologie der globulären Strukturen und den Leistungsparametern spezifische Oberfläche und Permeabilität hergestellt. Hierfür wird in einem DOE-Ansatz (Abschnitt 3.2.3.7; Seite 43; Anhang 12.2), wie in Abschnitt 3.3.2, die Monomer-, Vernetzer und Initiatorkonzentration variiert und dabei das Gesamtvolumen der Polymerisationslösung konstant gehalten. Abbildung 26 und Abbildung 27 zeigen die Eckpunkte des DOE Ansatzes. Durch die Wahl der jeweiligen maximalen Konzentrationen der einzelnen Komponenten werden dadurch die Extremfälle dargestellt. Qualitativ ist zu beobachten, dass sich insbesondere die Morphologie der immobilisierten Polymernetzwerkstrukturen verändert. Bei erhöhter Vernetzerkonzentration erscheinen die globulären Strukturen ausgeprägter und weitestgehend separiert voneinander. Ein ähnlicher Effekt ist für sinkende Initiatorkonzentrationen zu beobachten (vgl. Abbildung 26 mit Abbildung 27).

Zusätzlich erscheinen die entstehenden globulären Strukturen im Durchschnitt kleiner als bei hohen Initiatorkonzentrationen. Eine höhere Monomerkonzentration sorgt hingegen für größere globuläre Strukturen und eine weniger ausgeprägte globuläre Morphologie.

Die quantitative Bildauswertung in Abbildung 28 zeigt den Effekt der Monomer- und Initiatorkonzentration auf die durchschnittlichen Durchmesser der globulären Strukturen deutlich. Je größer die Konzentration an Monomer bzw. Initiator, desto größer auch der Durchmesser der globulären Strukturen. Der gegenläufige Effekt ist bei der Vernetzerkonzentration zu beobachten.

Dieses beobachtete Verhalten kann durch die Vorgänge während der Fällungspolymerisation erklärt werden. Durch eine höhere Konzentration an Monomer werden die sich bildenden Nuklei, bei ansonsten gleichbleibenden Bedingungen, größer, aufgrund der größeren Wahrscheinlichkeit, dass Monomer in das Polymernetzwerk eingebaut wird.



Abbildung 26: REM Aufnahmen mit einer Vergrößerung von 60000x mit variierenden Konzentrationen an Monomer und Vernetzer bei einer Initiatorkonzentration von 0,04 mol/L.



Abbildung 27: REM Aufnahmen mit einer Vergrößerung von 60000x mit variierenden Konzentrationen an Monomer und Vernetzer bei einer Initiatorkonzentration von 0,004 mol/L.


Abbildung 28: Auftragung des durchschnittlichen Durchmessers der globulären Strukturen zu den Konzentrationen an Monomer, Vernetzer und Initiator.

Eine höhere Vernetzerkonzentration hingegen verdichtet die entstehenden Nuklei und sorgt somit für eine früher eintretende Phasenseparation der Nuklei. Eine hohe Konzentration an Initiator sorgt für eine Mehrzahl an gestarteten Polymerketten und somit auch Nuklei.

Bei Ansonsten gleichbleibenden Bedingungen würde dies zu einer Verkleinerung der restlichen Polymerketten und damit auch zu einem kleineren Durchmesser der Nuklei führen. Allerdings erhöht eine größere Anzahl Nuklei auch die Wahrscheinlichkeit der Agglomeration der Nuklei untereinander, welches letztendlich zu größeren und weniger separierten Nuklei führen kann. In Abbildung 29 ist zu erkennen, dass steigende Monomer- Vernetzer- und Initiatorkonzentrationen zudem für einen größeren Pfropfgrad der modifizierten Membranen sorgen. Der Durchmesser der globulären Strukturen, deren Morphologie und auch der Pfropfgrad, der die Menge an immobilisiertem globulären Polymernetzwerk angibt, haben einen Einfluss auf die spezifische Oberfläche bzw. die Permeabilität der modifizierten Membran.

Auf die spezifische Oberfläche wirkt sich insbesondere der Einfluss der Vernetzerkonzentration aus. Je mehr Vernetzer vorhanden ist, desto definierter werden die globulären Strukturen und die spezifische Oberfläche steigt an. Die Initiatorkonzentration zeigt einen gegenläufigen Effekt.



Abbildung 29: Auftragung des Pfropfgrades gegen die Konzentration an Monomer, Vernetzer und Initiator.

Je weniger Initiatormoleküle vorhanden sind, desto definierter die globuläre Morphologie und größer die spezifische Oberfläche. Der Durchmesser der globulären Strukturen und als größter Einflussfaktor folgerichtig auch die Monomerkonzentration, haben keinen signifikanten Einfluss auf die spezifische Oberfläche.

Dies bestätigt die, aus der Modellmembran abgeleitete, Unabhängigkeit der spezifischen Oberfläche vom Durchmesser der globulären Strukturen. Wird die Leistung der modifizierten Membranen, definiert nach Gleichung 7, gegen den Durchmesser der globulären Strukturen bzw. deren jeweiligen Pfropfgrad aufgetragen, lässt sich erkennen, dass bei Zunahme beider Parameter die Leistung absinkt (Abbildung 30). Diese Beobachtung deckt sich mit der in Abschnitt 3.3.1 analysierten modifizierten Modellmembran (Abbildung 23), da der Durchmesser der globulären Strukturen sich nicht signifikant auf die Oberfläche, jedoch negativ auf die Permeabilität auswirkt.



Abbildung 30: Auftragung der Leistung gegen den Durchmesser der globulären Strukturen (A), den Pfropfgrad (B), die Monomerkonzentration (C) und die Vernetzerkonzentration (D).

Somit ist festzustellen, dass hohe Monomerkonzentrationen, die zu größeren Durchmessern, geringer ausgeprägter globulärer Morphologie und höheren Pfropfgraden führen, folgerichtig auch eine Verringerung der durchschnittlichen Leistung zur Folge haben.

Die Initiatorkonzentration zeigt einen leicht negativen Einfluss auf die durchschnittliche Leistung der Membran. Die Vergrößerung der Durchmesser der globulären Strukturen und der Einfluss auf den Pfropfgrad wird durch die positiv beeinflusste Morphologie und damit verbundene höhere spezifische Oberfläche teilweise kompensiert. Ähnlich verhält es sich bei der Vernetzerkonzentration. Da hier der positive Einfluss auf die Morphologie und damit auch die spezifische Oberfläche deutlich größer ist, als bei der Initiatorkonzentration, ist ein leicht positiver Einfluss auf die Leistung zu erkennen. Werden die so modifizierten Membranen wie in Tabelle 2 (Abschnitt 3.3.6; Seite 76) mit *rsPA50* umgesetzt und die Bindungskapazitäten bei 10 % und 100 % des Durchbruchs (DBC<sub>10%</sub> bzw. DBC<sub>100%</sub>) gegen die spezifische Oberfläche der modifizierten Membranen aufgetragen, lässt sich ein linearer Zusammenhang durch den Ursprung beider Parameter erkennen. Somit kann die bis hierher angenommene Proportionalität der Leistung  $L_{\rm C}$  nach Gleichung 6 und der Leistung  $L_{\rm O}$  nach Gleichung 7 gezeigt werden.



Abbildung 31: Auftragung der dynamischen Bindungskapazität bei 10% und 100% gegen die spezifische Oberfläche der modifizierten Membranen nach Immobilisierung von *rsPA50* nach Tabelle 2.

#### 3.3.4 Einfluss des Lösemittelsystems

Die Fällungspolymerisation ist neben den Komponenten Monomer, Initiator, Vernetzer und der Menge des verwendeten Lösemittels auch von der Art des Lösemittels abhängig. Je besser ein Lösemittel ein entstehendes Polymernetzwerk löst, desto größer werden auch die Nuklei, bevor diese unlöslich werden und ausfallen.<sup>136</sup> In diesem Abschnitt wird somit bei ansonsten konstanten Polymerisationsbedingungen die Art des Lösemittels variiert, um diesen Einfluss auf die Modifizierung beschreiben zu können. Die hierfür verwendeten Lösungsmittel und das genutzte Polymerisationssystem sind im Anhang (Anhang 12.3) genau ausgeführt.



Abbildung 32: 3D Auftragung der Hansen-Parameter  $\delta_H$ ,  $\delta_D$  und  $\delta_P$  gegeneinander für ausgewählte Lösungsmittel.

Hierfür werden die Lösemittel nach literaturbekannten Werten in der Klassifikation nach *Hansen*<sup>136–138,163–165</sup> ausgewählt, um einen möglichst großen Bereich innerhalb dieser Klassifikation zu untersuchen. Wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben, werden die Lösemittel nach den Werten  $\delta_{\rm H}$  (Wasserstoffbrückenbindungswechselwirkungen),  $\delta_{\rm D}$  (Dipol Wechselwirkungen) und  $\delta_{\rm P}$  (London Wechselwirkungen) kategorisiert.

Hierbei wird in Abbildung 32 lediglich unterschieden in Lösemittel, die zu einer Fällungspolymerisation innerhalb der Kavitäten der Membran geführt haben (rot), sowie Lösemitteln, die unter den gewählten Bedingungen zu keiner Fällungspolymerisation führen (grün). Die Parameter  $\delta_D$  und  $\delta_P$  zeigen keinen signifikanten Zusammenhang zu einer stattfindenden Polymerisation. Lediglich bei  $\delta_H$  ist ein Zusammenhang zu erkennen. Bei Werten für  $\delta_H \ge 9$  werden Fällungspolymerisationen beobachtet.  $\delta_H$  stellt die Stärke der Wasserstoffbrückenbindungswechselwirkungen der Lösemittel und damit auch ein Maß für deren Hydrophilie dar.



Abbildung 33: Auftragungen des Pfropfgrades (A), dem durchschnittlichen Durchmesser der globulären Strukturen (B), der prozentualen Zunahme der Oberfläche (C) und der prozentualen Reduktion der Permeabilität (D) gegen den Parameter  $\delta_{\text{H}}$ .

Es ist somit aus Abbildung 32 zu erkennen, dass Fällungspolymerisationen lediglich in ausreichend hydrophilen organischen Lösungsmitteln stattfinden, da diese ausreichend unlöslich für das entstehende hydrophobe Polymernetzwerk sind.

Wird der Pfropfgrad gegen den Parameter  $\delta_{\rm H}$  aufgetragen (Abbildung 33A), ist zu erkennen, dass auch der Pfropfgrad erst ab Werten für  $\delta_{\rm H} > 9$  signifikant zunimmt. Dieser erreicht bei einem Wert von  $\delta_{\rm H} = 13,5$  ein Maximum und fällt danach wieder ab. Auch die Auftragungen der prozentualen Zunahme an Oberfläche (Abbildung 33C) und der prozentualen Reduktion der Permeabilität (Abbildung 33D) folgen diesem Trend bzw. verlaufen antiproportional (Reduktion der Permeabilität) dazu. Der durchschnittliche Durchmesser der globulären Strukturen nimmt mit steigendem Wert für  $\delta_{\rm H}$  linear zu (Abbildung 33B). Qualitativ betrachtet zeigen die REM Aufnahmen allerdings, dass es nach dem Maximum bei  $\delta_{\rm H} = 13,5$  insgesamt weniger globuläre Strukturen werden. Dies stimmt mit den quantitativen Beobachtungen für den Pfropfgrad, die Oberfläche und die Permeabilität überein. Der sprunghafte Anstieg des Pfropfgrades und der spezifischen Oberfläche bzw. die Reduktion der Permeabilität bis zum beschriebenen Maximum, wird damit erklärt, dass bei Überschreiten des Grenzwertes für  $\delta_{\rm H}$  das Lösemittel ausreichend hydrophil ist für eine Ausfällung globulär strukturierter Polymernetzwerke des hier verwendeten Polymerisationssystems.



Abbildung 34: REM Aufnahmen der Proben mit  $\delta_{H}$ =13,5 (A) und  $\delta_{H}$ = 22,3 (B).

Bei weiter steigender Hydrophilie des Lösungsmittels sollte die Fällung des Polymernetzwerks zunehmend früher stattfinden und es sollten sich somit in der Frühphase der Polymerisation zunehmend kleinere Nuklei bilden (vgl. Abschnitt 2.4.1; Schema 1). Diese scheinen sich dann allerdings in einer Homokoagulation zusammen zu lagern, um die Grenzfläche mit dem Lösungsmittel zu reduzieren.<sup>136</sup> Dies würde den steigenden Durchmesser der globulären Strukturen bei ansteigendem Wert für  $\delta_{\rm H}$ erklären. Durch die mittlere Porengröße der Membran (450 nm bei der hier verwendeten Membran) ist den globulären Strukturen in ihrer maximalen Größe jedoch eine Grenze gesetzt.

Somit bilden diese sich, in den für sie zu kleinen Poren, nur sehr geringfügig aus. Ein Großteil der globulären Strukturen ist demnach auf der äußeren Oberfläche der Membran zu finden (Abbildung 34). Zusätzlich kann die Adhäsion aufgrund der größeren Strukturen geringer ausgeprägt sein, weshalb es zu einer instabileren Wechselwirkung mit der Membranoberfläche kommt. Dadurch könnten entstandene globuläre Strukturen während des Waschens der Membran ab- bzw. ausgewaschen worden sein. Dies könnte den Abfall bzw. Anstieg im Pfropfgrad und der Oberfläche bzw. der Permeabilität erklären.

## 3.3.5 Einfluss des verwendeten Ausgangsmaterials

Die Modifizierung der Membranoberfläche hängt neben den bereits untersuchten Parametern auch vom verwendeten Ausgangsmaterial ab. Eigenschaften der Membran, wie die Porengröße und ihre Porosität, beeinflussen nicht nur die Leistung der Membran, sondern auch die Oberfläche und den Raum, die für eine Modifizierung bzw. Polymerisation zur Verfügung stehen. In diesem Abschnitt wird somit der Einfluss des verwendeten Ausgangsmaterials bei ansonsten gleichen Bedingungen und konstantem Polymerisationssystem untersucht. Hierfür werden Membranen aus chemisch äquivalentem Material (regenerierte Zellulose), jedoch mit unterschiedlichen Porengrößen und Porositäten genutzt, um unterschiedliche chemische Wechselwirkungen der Oberfläche mit der Polymerisationslösung auszuschließen.

Wird die spezifische Oberfläche der modifizierten Membran gegen die spezifische Oberfläche des Ausgangsmaterials aufgetragen, ist zu erkennen, dass mit steigender spezifischer Oberfläche des Ausgangsmaterials, die spezifische Oberfläche der modifizierten Membran linear zunimmt (Abbildung 35A). Da diese Gerade nicht durch den Ursprung verläuft, kann die spezifische Oberfläche der globulären Strukturen hieraus als Ordinate extrapoliert werden. In diesem Fall beträgt die spezifische Oberfläche der globulären Strukturen 0,85±0,14 m<sup>2</sup>/mL.

Des Weiteren ist festzustellen, dass alle modifizierten Membranen eine höhere spezifische Oberfläche haben als das Ausgangsmaterial. Allerdings ist die Steigung der Geraden mit 0,87±0,04 kleiner eins wonach bei noch höheren spezifischen Oberflächen die modifizierte Membran sich der spezifischen Oberfläche des Ausgangsmaterials weiter annähern wird. Somit ist, insbesondere als prozentualer Zusammenhang aufgetragen (Abbildung 35B), zu erkennen, dass die prozentuale Zunahme der Oberfläche für Ausgangsmaterialien mit kleinen Oberflächen deutlich größer Ebenso ist der spezifischen ist. Pfropfgrad für Ausgangsmaterialien mit kleineren spezifischen Oberflächen deutlich höher, als für solche mit großen spezifischen Oberflächen.

Diese Effekte sind auf die Porosität, Porengröße und die Durchlässigkeit für Strahlung im Bereich von 256 nm der Ausgangsmaterialien zurückzuführen. Es kann festgestellt werden, dass bei gleichbleibenden Polymerisationslösungen die entstehenden globulären Strukturen für alle Proben eine gleichbleibende Form und durchschnittlichen Durchmesser haben. Aufgrund dieser Erkenntnis kann der Rückgang der Pfropfgrade und der damit verbundene Rückgang der prozentualen Zunahme an Oberfläche gedeutet werden. Bei Ausgangsmaterialien mit hohen Porositäten ist ein größeres Volumen innerhalb der Membran vorhanden, das für die Bildung von globulären Strukturen zur Verfügung steht.



Abbildung 35: Auftragung der sp. Oberfläche nach Modifizierung (A), der prozentualen Zunahme der sp. Oberfläche nach Modifizierung (B), dem Pfropfgrad (C) und dem Durchmesser der Pore des Ausgangsmaterials (D) gegen die sp. Oberfläche des Ausgangsmaterials.

Somit steigt hier der Pfropfgrad im Vergleich zu Ausgangsmaterialien mit kleinen Porositäten deutlich stärker an. Gleichzeitig sinkt mit der spezifischen Oberfläche auch die Porengröße. Ausgangsmaterialien mit kleineren Poren, insbesondere solche die ihre Porengröße im Bereich der Wellenlänge der eintreffenden Strahlung haben, lassen nur einen geringeren Anteil dieser Strahlung ins Innere der Membran. Da in dieser Arbeit mittels UV-Strahlung im Bereich von 256 nm die Polymerisation initiiert wird, werden so weniger Bereiche der Membran von der UV Strahlung erreicht und können somit die Polymerisation nicht oder nur mit einer geringen Konzentration an freien Radikalen initiieren.



Abbildung 36: Auftragung der Porosität des Ausgangsmaterials (A), der Transmission des Ausgangsmaterials bei 256 nm (B) gegen den Pfropfgrad der modifizierten Membran.

In dieser Untersuchung erwies sich die verwendete Membran mit 450 nm mittlerer Porengröße und 71 % Porosität als guter Kompromiss aus Permeabilität und absoluter spezifischer Oberfläche nach der Modifizierung.

# 3.3.6 Einfluss der Protein-Ligand Immobilisierung

Damit eine, wie in den vorherigen Kapiteln beschriebene, modifizierte Membran als Membranadsorber in der Affinitätschromatographie fungieren kann, muss auf das oberflächengebundene Polymer ein Affinitätsligand immobilisiert werden. Wie bereits beschrieben, werden in dieser Arbeit zwei verschiedene Verfahren genutzt, um zwei verschiedene, kommerziell erhältliche, Protein-Liganden auf den funktionellen Gruppen des Polymers zu immobilisieren. Zum einen die Immobilisierung über primäre Amine mit dem Liganden *rsPA50* und zum anderen die Immobilisierung über Thiole mit dem Liganden *ProteinA* (vgl. Abschnitt 3.2.2). Hierzu wird in allen Fällen eine modifizierte Membran aus Abschnitt 3.3.3 verwendet, die eine hohe Leistung  $L_0$  aufwies, da sowohl die Morphologie der globulären Strukturen, als auch ihr Ausgangsmaterial bereits zuvor dahingehend untersucht und optimiert worden sind (Tabelle 2).



Abbildung 37: Auftragung der Aldehydkonzentration gegen die prozentual eingesetzte Menge an NaIO<sub>4</sub> (A), Auftragung der dynamischen Bindungskapazität bei DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>100%</sub> (B), der Ausnutzung der Liganden bei DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>100%</sub> (C) und der Anbindung bzw. der Leistung (definiert nach Gleichung 7) (D) gegen die Aldehydkonzentration.

Das Verhältnis aus der molaren Menge an Aldehydfunktionalitäten und der immobilisierten Menge an *rsPA50* wird hier und im Weiteren als Anbindung (Gleichung 27) bezeichnet. Das Verhältnis der molaren Menge an Antikörper, welches über Affinitätswechselwirkungen an den Proteinliganden bei DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>100%</sub> (Abschnitt 2.1) gebunden ist, zur immobilisierten molaren Menge an Proteinligand wird hier und im Folgenden als Ausnutzung (Gleichung 28) bezeichnet.

Für die Immobilisierung mittels primären Aminen werden die vorhandenen Epoxide des Polymers, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, selektiv zu Aldehyden oxidiert und anschließend mittels Reduktionsmittel kovalent und irreversibel immobilisiert. Somit ergeben sich in beiden Teilschritten die folgenden Einflussfaktoren. Zum einen die verwendete Konzentration an Oxidationsmittel bei der Erzeugung der Aldehyde im ersten Teilschritt und zum anderen die verwendete Konzentration an *rsPA50* und der pH-Wert während der Reaktion im zweiten Teilschritt. Hierbei steuert die verwendete Konzentration an Oxidationsmittel die zur Verfügung stehende Anzahl an Aldehydfunktionalitäten (Abbildung 37A) und die verwendete Konzentration an *rsPA50* die Anbindung (Gleichung 27) an diese. Die Imin Bildung und die Reduktion der Imine mittels Reduktionsmittel zum sekundären Amin sind jeweils antiproportional pH-Wert abhängig.<sup>166</sup>

$$Anbindung = \frac{n_{Aldehydfunktionalitäten}}{n_{rsPA50}}$$
(27)

$$Ausnutzung = \frac{n_{geb.Antikörper\,(DBC_{10\%}\,bzw.\,DBC_{100\%}\,bzw.\,SBC)}}{n_{rsPA50}}$$
(28)



Abbildung 38: Auftragung DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>10%</sub> sowie die Anbindung (A), der Ausnutzung der Liganden bei DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>10%</sub> (B) gegen den eingesetzten pH-Wert und DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>100%</sub> sowie der Anbindung (C), der Ausnutzung der Liganden bei DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>10%</sub> (D) gegen die Konzentration an *rsPA50*.

Somit beeinflusst der pH-Wert die Ausbeute in diesem Reaktionsschritt. Je mehr *rsPA50* bei gleichbleibender Menge für eine Reaktion zur Verfügung steht, desto geringer wird die Anzahl an verfügbaren Aldehyden pro *rsPA50* (Gleichung 27).

In Abbildung 37A ist zu erkennen, dass die für eine Reaktion zur Verfügung stehende molare Menge an Aldehydfunktionalitäten mit der eingesetzten Menge an Oxidationsmittel wie zu erwarten stark zunimmt. Somit nimmt auch die immobilisierte Menge an Ligand und die Anbindung deutlich zu (Abbildung 37D). Die gesteigerte molare Menge an Protein und die Anbindung führen dazu, dass die Ausnutzung bei steigender Aldehydkonzentrationen abnimmt. Dies ist über zunehmende sterische Hinderung der Liganden und verstärkt auftretendes multipoint attachment zu erklären. Sind Liganden zu nah aneinander immobilisiert oder mit sehr vielen Bindungsstellen an der Oberfläche fixiert sind die Bindungsstellen der Liganden weniger flexibel und somit schlechter zu erreichen.<sup>59,113</sup> Da die molare Menge an immobilisiertem Ligand linear mit steigender Aldehydkonzentration zunimmt und dies die dynamischen Bindungen DBC10% und DBC100% erhöht, kann für eine Aldehydkonzentration von 74,3 µmol/mL ein Maximum für die dynamische Bindungskapazitäten DBC10% und DBC<sub>100%</sub> sowie für die Leistung beobachtet werden. Dies wird über die steigende molare Menge an Liganden und die abfallende Ausnutzung dieser erklärt. Der pH-Wert hat im untersuchten Bereich zwischen pH 6,9 und 8,4 keinen signifikanten Einfluss auf die untersuchten Parameter. Lediglich bei pH 10 sinken die Bindekapazitäten sowie die Ausnutzung stark ab. Bei einem höheren pH-Wert ist die Reduzierung der Imine die bevorzugte Reaktion gegenüber der Iminbildung. Somit steigt die Anbindung an, da bei gleichbleibender Aldehydkonzentration weniger *rsPA50* gebunden wird. Gleichzeitig sinken die Bindekapazitäten DBC10% und DBC100% sowie die Ausnutzung, da pro rsPA50 mehr Aldehydfunktionalitäten der Oberfläche mit rsPA50 reagieren. Dies führt zu einem starken multi-point attachment, welches die Beweglichkeit des Proteins sowie die Tertiärstruktur negativ beeinflusst.<sup>59,113,167</sup> Die Konzentration an *rsPA50* hat hingegen einen starken Einfluss auf die Anbindung. Diese sinkt mit steigender Konzentration an rsPA50 wie zu erwarten stark ab. Die Bindungskapazitäten DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>100%</sub> steigen zunächst von 3 mg/mL bis 6,5 mg/mL an, ändern sich bei weiterer Erhöhung auf 10 mg/mL aber nicht mehr signifikant. Das gleiche gilt für die Ausnutzung bei DBC<sub>10%</sub>. Bei DBC<sub>100%</sub> ändert sich die Ausnutzung nicht signifikant. Bei gleichbleibender Aldehydkonzentration wird durch eine Erhöhung der rsPA50 Konzentration die Anbindung herabgesetzt, da mehr rsPA50 Liganden an den vorhandenen Aldehyden immobilisieren können.



Abbildung 39: Auftragung der dynamischen Bindungskapazitäten  $DBC_{10\%}$  und  $DBC_{100\%}$  sowie der Konzentration an immobilisiertem *ProteinA* (A), der Ausnutzung der Liganden bei  $DBC_{10\%}$  und  $DBC_{100\%}$  (B) gegen die Reaktionszeit und den dynamischen Bindungskapazitäten  $DBC_{10\%}$  und  $DBC_{100\%}$  sowie der Konzentration an immobilisiertem *ProteinA* (C), der Ausnutzung der Liganden bei  $DBC_{100\%}$  (D) gegen die Konzentration an *ProteinA*.

Somit erhöhen sich zunächst auch die Bindekapazitäten  $DBC_{10\%}$  und  $DBC_{100\%}$  sowie die Ausnutzung bei  $DBC_{10\%}$ , da mehr *rsPA50* für eine Wechselwirkung mit dem Antikörper zur Verfügung steht und dieses sich sterisch gegenseitig nicht negativ beeinflusst. Gleichzeitig reduziert sich das *multi-point attachment*, welches zu einer größeren Beweglichkeit des *rsPA50* führt. Bei weiterer Erhöhung der Konzentration an *rsPA50* sind keine weiteren positiven Effekte auf die Bindungskapazität oder die Ausnutzung zu beobachten, obwohl sich die Anbindung weiter verkleinert und somit mehr Ligand zur Verfügung steht. Dieser ausbleibende positive Effekt kann, wie bereits thematisiert, über die sterische Hinderung der Liganden untereinander erklärt werden.

Für die Immobilisierung mittels Thiolen werden die vorhandenen Epoxide des Polymers, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, mit dem am *ProteinA* Liganden vorhandenen Thiol direkt umgesetzt. Die stattfindende Ringöffnung des Epoxids mit dem Thiol wird auf die Einflüsse der Konzentration an *ProteinA*, die Reaktionszeit sowie des pH-Wertes des dabei genutzten KPI-Puffers hin untersucht.



Abbildung 40: Auftragung der dynamischen Bindungskapazitäten  $DBC_{10\%}$  und  $DBC_{100\%}$  sowie der Konzentration an immobilisiertem *ProteinA* (A), der Ausnutzung der Liganden bei  $DBC_{10\%}$  und  $DBC_{100\%}$  (B) gegen den eingesetzten pH-Wert.

Um eine Ringöffnung der Epoxide mit den vorhandenen primären Aminen des *ProteinA* Liganden auszuschließen, werden vor der eigentlichen Untersuchung mit *ProteinA* die äquivalenten Bedingungen mit *rsPA50* und Lysozym als Modellproteine durchgeführt. Hierbei kann keinerlei signifikante kovalente Bindung an die Membran festgestellt werden, sodass im Weiteren davon ausgegangen wird, dass lediglich das vorhandene Thiol des *ProteinA* Liganden unter den hier genutzten Bedingungen reagiert und somit ein sogenanntes *single-point attachment* vorliegt.

Es ist zu erkennen, dass die Bindungskapazitäten DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>100%</sub> ein Maximum bei 2 h Reaktionszeit erreicht, wohingegen die immobilisierte Menge an *ProteinA* weiter zunimmt. Gleichzeitig sinkt die Ausnutzung des Liganden mit steigender Reaktionszeit stark ab. Dies lässt darauf schließen, dass ab einer Konzentration an immobilisierten *ProteinA* von 3,2 mg/mL die bereits zuvor beschriebene sterische Hinderung der Liganden einsetzt. Darüber hinaus immobilisierte *ProteinA* Liganden sind durch die sterische Abschirmung untereinander zunehmend schlechter für den Antikörper erreichbar und verringern somit die Bindungskapazitäten DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>100%</sub>. Ein ähnlicher Effekt ist für die Konzentration an *ProteinA* zu beobachten. Bei steigender Konzentration an *ProteinA* in der Reaktionslösung steigen sowohl die Bindungskapazitäten DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>100%</sub> wie auch die Konzentration an immobilisierten *ProteinA* bis zu einem Wert von 3,4 mg/mL stark an. Darüber hinaus immobilisiertes *ProteinA* verringert die Ausnutzungen bei DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>100%</sub>, die sich zuvor nicht signifikant ändern, und somit auch die Bindungskapazitäten DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>100%</sub> durch sterische Wechselwirkungen.

Tabelle 2: Experimentelle Bedingungen für die Modifizierung und Immobilisierung und Ergebnisse zweier äquivalenter modifizierter Membranen mit der bestmöglichen Immobilisierung für die Liganden *rsPA50* und *ProteinA*.

	ProteinA	rsPA50
Aldehydkonzentration [µmol/mL]	/	74,3±10,0
c <sub>Ligand</sub> Reaktionslösung [mg/mL]	20,0±0,6	6,5±0,5
pH [-]	8,5±0,2	8,2±0,25
Reaktionszeit [h]	2,0±0,01	2,0±0,01
Dyn. Bindungskapazität10% [mg/mL]	16,0±0,5	13,9±0,5
Dyn. Bindungskapazität <sub>100%</sub> [mg/mL]	23,1±0,9	23,3±1,1
Imm. Protein-Ligand [mg/mL]	3,5±0,15	6,3 ±0,15
Imm. Protein-Ligand [nmol/mL]	162,7±6,9	140,0±3,3
Imm. Protein-Ligand Bindungstellen [Bindungst./mL]	$(2,93\pm0,2)\cdot10^{17}$	$(4,21\pm0,1)\cdot10^{17}$
Ausnutzung <sub>10%</sub> [IgG/Bindungsstelle]	$(22\pm1)\cdot10^{-2}$	(13±1)·10 <sup>-2</sup>
Ausnutzung100% [IgG/Bindungsstelle]	$(32\pm1)\cdot10^{-2}$	$(22\pm1)\cdot10^{-2}$
Membran	450 nm PorenØ; 71 % Porosität	
Monomerkonzentration [mmol/L]	799±2	
Vernetzerkonzentration [mmol/L]	110±1	
Initiatorkonzentration [mmol/L]	25±1	
Lösungsmittel, Art und Konzentration [mmol/L]	Cyclohexanol; 8300,0	
$L_{\rm O} [{\rm m}^2{\rm m}{\rm D}/{\rm m}{\rm L}]$	20,9±0,8	
$L_{\rm C}$ [mgmD/mL]	131,7±1,2	114,4±1,5
$L_{C}$ ; Gleiche Membran ohne Modifizierung	48,5±0,9	

Der pH-Wert wirkt sich ebenfalls stark auf die Konzentration an immobilisierten *ProteinA* und somit auch auf die Bindungskapazitäten  $DBC_{10\%}$  und  $DBC_{100\%}$  aus. Hierbei ist festzustellen, dass beide Werte bei steigenden pH-Werten erst ansteigen und dann eine Sättigung bei einer Konzentration an immobilisiertem *ProteinA* von 3,4 mg/mL erreichen.

Es ist anzunehmen, dass keine abfallenden Bindungskapazitäten  $DBC_{10\%}$  und  $DBC_{100\%}$  beobachtet werden können, da der, zuvor beobachtete, Grenzwert für die sterische Hinderung

(3,2 mg/mL bzw. 3,4 mg/mL) nicht signifikant überschritten wird. Dies lässt sich auch an den Ausnutzungen bei DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>100%</sub> erkennen, die sich nicht signifikant ändern.

Beide Liganden, *rsPA50* und *ProteinA*, werden unter den jeweilig bestmöglichen Bedingungen, in Bezug auf ihre dynamische Bindungskapazität DBC<sub>10%</sub>, für die jeweilige Immobilisierung miteinander verglichen (Tabelle 2). Hierbei fällt auf, dass *ProteinA* um 15 % größere Werte für die Bindungskapazität DBC<sub>10%</sub> aufweist, obwohl die Konzentration an immobilisiertem Bindungsstellen pro Milliliter Membran für den *ProteinA* Liganden um 43 % kleiner ist (Tabelle 2).



Abbildung 41: STED-Aufnahmen einer beispielhaft modifizierten Membran mit immobilisierten *rsPA50*; Fluorophor auf *rsPA50* nach Abschnitt 3.2.3; Auftragung der normalisierten Intensität gegen den Durchmesser der globulären Struktur.

Bei der DBC<sub>100%</sub> unterscheiden sich die Werte allerdings nicht signifikant. Diese Beobachtungen kann zum einen über die Struktur der Liganden und zum anderen über die Immobilisierung selbst erklärt werden. *ProteinA* ist deutlich leichter und kleiner als *rsPA50* und besitzt drei Bindungsdomänen, wobei *rsPA50* fünf Bindungsdomänen besitzt.<sup>59</sup> Darüber

hinaus wird *ProteinA* über lediglich ein N-terminales Cystein an das Polymer gebunden, wohingegen *rsPA50* über viele Lysine (bzw. dessen primäre Amine) gebunden wird.

Somit ist *ProteinA* deutlich beweglicher und die Bindungsstellen besonders für die Bindungskapazität DBC<sub>10%</sub> besser erreichbar. Bei der Bindungskapazität DBC<sub>100%</sub> spiegelt sich die relative Häufigkeit der Bindungsdomänen des *rsPA50* wieder. Da es sich hierbei um einen Gleichgewichtswert handelt ist die Beweglichkeit des Liganden nicht mehr limitierend für dessen Erreichbarkeit. Somit können hier, relativ zur Bindungskapazität DBC<sub>10%</sub>, hohe Werte erzielt werden.

Dennoch bleibt festzuhalten, dass die Ausnutzung der Bindungsdomänen des *rsPA50* Liganden 69 % (DBC<sub>10%</sub>) bzw. 45 % (DBC<sub>100%</sub>) schlechter ist als die des *ProteinA* Liganden.

Für beide Liganden kann zusätzlich gezeigt werden, dass diese ausschließlich an der Oberfläche der globulären Strukturen der modifizierten Membranen immobilisiert werden. Die globulären Strukturen stellen somit keine, für die hier genutzten Proteine und Antikörper, zugängliche Porosität zur Verfügung. Hierfür ist eine STED-Mikroskop Aufnahme beispielhaft für eine modifizierte Membran (nach Tabelle 2 mit *rsPA50* immobilisiert) in Abbildung 41 dargestellt.

# 3.4 Zusammenfassung Kapitel I – Oberflächenmodifikation von Zellulosemembranen mittels Fällungspolymerisation

In diesem Kapitel kann gezeigt werden, dass es mit einer Oberflächenmodifikation von Zellulosemembranen mittels Fällungspolymerisation möglich ist, konvektive chromatographische Medien für die Affinitätschromatographie herzustellen.

Es ist gezeigt worden, dass die volumetrische Konzentration an Monomer und Vernetzer im Wesentlichen der Parameter ist, der für ein Verschließen der konvektiven Poren mit gefälltem Polymer sorgt und sich eine Konzentration in einem Bereich zwischen 5-15 v% sehr vorteilhaft auf die Leistung  $L_0$  auswirkt.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass neben dem Grad der Verdünnung auch die Morphologie und Masse der, durch Fällungspolymerisation entstandenen, globulären Strukturen von Bedeutung ist und sowohl die Monomer-, Vernetzer- und die Initiatorkonzentration als auch die Art des Lösungsmittels diese beeinflussen.

Eine Erhöhung der Konzentration an Initiator, Monomer oder Vernetzer sorgt jeweils für einen höheren Pfropfgrad und damit eine höhere Masse an Polymernetzwerk auf der Membranoberfläche. Zudem sorgen erhöhte Initiator- und Monomerkonzentrationen für einen Anstieg im durchschnittlichen Durchmesser der globulären Strukturen, wohingegen eine erhöhte Vernetzerkonzentration diese signifikant verkleinert.

Des Weiteren kann qualitativ festgestellt werden, dass eine erhöhte Vernetzerkonzentration bzw. eine niedrige Initiatorkonzentration für voneinander separierte globuläre Strukturen sorgen, wohingegen eine niedrige Konzentration an Vernetzer sowie eine hohe Konzentration an Initiator und Monomer zu verstärkter Homokoagulation der präpolymeren Nuklei führt.

Diese Zusammenhänge werden in einen Kontext mit der Leistung als chromatographisches Medium gesetzt und zeigen, dass kleine, separierte und niedermolekulare, globuläre Strukturen zu einer hohen Leistung  $L_0$  führen. Diese Beobachtungen können auch mit dem erstellten Modell in Einklang gebracht werden. Zusätzlich ist der zu Beginn postulierte Zusammenhang zwischen  $L_0$  und  $L_c$  an den unterschiedlich modifizierten Membranen gezeigt worden.

Für das Lösemittel wird eine Abhängigkeit der entstandenen globulären Strukturen von dem Hansen-Löslichkeitsparameter  $\delta_{\rm H}$  beobachtet. Sowohl ihr Durchmesser als auch ihre Masse nehmen mit steigendem Wert für  $\delta_{\rm H}$  zu, erreichen ein Maximum und fallen anschließend ( $\delta_{\rm H}$ >13,5) wieder ab. Dies kann mit der steigenden Hydrophilie der Lösemittel bei steigendem Wert für  $\delta_{\rm H}$  erklärt werden. Sobald die Lösungsmittel den Grenzwert ( $\delta_{\rm H}$ >9) überschritten haben lösen sich die entstehenden Nuklei nicht mehr während der Polymerisation im Lösungsmittel und fallen aus. Durch die weiter steigende Hydrophilie bei steigendem Wert für  $\delta_{\rm H}$  werden die präpolymeren Nuklei immer kleiner und beginnen verstärkt zu koagulieren. Dies sorgt für steigende Durchmesser der globulären Strukturen auf der Membranoberfläche. Durch die steigenden Durchmesser der globulären Strukturen und den durch die Membranopern und Porosität begrenzten Raum bilden sich weniger bzw. kaum noch globulären Strukturen in den Membranopern aus. Zusätzlich ist eine geringere Adhäsion der globulären Strukturen an der Membranoberfläche bei steigendem Durchmesser wahrscheinlich, welches zu einem Ablösen dieser im Waschprozess führen könnte. Diese Effekte sorgen für sinkende Pfropfgrade und steigende Permeabilitäten für Lösemittel mit Werten von  $\delta_{\rm H}$ >13,5. Bei der Ausgangsmembran sind die Porosität und die Transmission bei 256 nm, die von der Porengröße abhängt, entscheidend für die Polymerisation. Wie zuvor beschrieben bilden sich bei gleichbleibendem Durchmesser der globulären Strukturen und absinkendem Raum (Porosität) weniger globuläre Strukturen aus. Gleiches gilt für eine absinkende Porengröße, die zusätzlich die Transmission der Membran bei 256 nm verringert und so weniger Initiierung bei dieser UV-initiierten Polymerisation zulässt. Somit sinkt der Pfropfgrad in beiden Fällen stark ab.

Die Immobilisierung des Protein-Liganden ist letztendlich entscheidend für die Anwendung chromatographisches Medium in der Affinitätschromatographie. Es wird die als Immobilisierung über primäre Amine mit dem Liganden rsPA50 und die Immobilisierung über ein Cystein mit dem Liganden ProteinA untersucht. Hierbei kann festgestellt werden, dass in beiden Fällen ein gewisser Grenzwert an Ligand Konzentration nicht überschritten werden sollte. Ab diesem Wert sind sich die Liganden sterisch zu nah und wechselwirken miteinander und sind so für den Antikörper schlechter zu erreichen. Dieser Grenzwert beläuft sich für die untersuchte Membran bei ProteinA zu 3,3±0,1 mg/mL. Für rsPA50 kann kein definierter Grenzwert angegeben werden, da die negativen Effekte der sterischen Abschirmung und des multi-point attachments auf die dynamischen Bindungskapazitäten, aufgrund der Immobilisierung, nicht zweifelsfrei voneinander zu trennen sind. Des Weiteren kann gezeigt werden, dass ProteinA durch seine Anbindung (single-point attachment) über lediglich ein Cystein beweglicher sein muss im Vergleich zu rsPA50, das über viele primäre Amine gebunden ist. Somit wird bei der Immobilisierung von ProteinA auch die größere Bindekapazität bei 10 % des Durchbruchs von 16 mg/mL beobachtet. Abschließend kann gezeigt werden, dass die Leistung L<sub>C</sub> für die optimal modifizierte Membran im Vergleich zur gleichen Membran ohne Modifizierung eine Steigerung von 170 % aufweist.

## 4. Kapitel II- Agarose Membranadsorber

## 4.1 Einleitung – Agarose basierte chromatographische Medien

Wie bereits beschrieben und in Kapitel I bereits gezeigt, besteht ein Zusammenhang zwischen der spezifischen Oberfläche von chromatographischen Medien zu ihrer Bindungskapazität. Die in Kapitel I beschriebene Modifizierung ermöglicht eine signifikante Erhöhung der spezifischen Oberfläche, bei lediglich geringfügiger Permeabilitätsminderung. Um noch deutlich höhere spezifische Oberflächen zu erzeugen, müssten die globulären Strukturen eine inhärente Porosität besitzen und diese Poren müssten Porendurchmesser in einem Bereich von ca. 20-100 nm haben, damit diese für einen Antikörper ausreichend erreichbar wären. Allerdings kann die für den Antikörper erreichbare spezifische Oberfläche dieser modifizierten Membranen nicht weiter gesteigert werden, da die entsprechend benötigten Porengrößen über einen Solchen Modifizierungsansatz nicht zu erzielen sind.

Ein bereits bei *beads* bzw. *resins* genutztes Material, Agarose, bietet jedoch diese Eigenschaften eines Polymernetzwerks mit inhärenter Porosität und Poren mit einem Porendurchmesser von 50-200 nm. Diese Eigenschaft macht die Agarose zu einem häufig genutzten Material für die Herstellung chromatographischer Medien. Die daraus hergestellten *beads* verfügen allerdings nicht über *flow-through* Poren, durch welche ein konvektiver Fluss stattfinden kann. Zusätzlich sind sie aus applikativer Sicht limitiert in ihrem Durchmesser. Die Verweilzeiten der Zielmoleküle sind aufgrund ihrer Geometrie und der dadurch entstehenden Diffusionslimitierung deutlich länger als die bei Membranadsorbern. Somit ist der Ansatz, der in diesem Kapitel verfolgt wird, die Kombination der Vorteile von Membradsorbern mit ihren *flow-through* Poren und dem daraus resultierenden konvektiven Fluss durch diese, mit der inhärenten Porosität und der hohen spezifischen Oberfläche bzw. der daraus resultierenden hohen Bindungskapazität der Agarosematerialien.

Hierfür wird eine mit Vlies verstärkte Membran als *template* für die Agarose genutzt. Die Agarose wird als Sol in die Poren der *template* Membrane gefüllt. Nach dem Erstarren des Agarose Sols wird die Membran herausgelöst und die Agarose mit dem Vlies verbleiben. Durch die vorherigen Membranstege entstehen nach dem Herauslösen *flow-through* Poren in der festen Agarose. Durch die bikontinuierliche Membranstruktur der *template* Membran entsteht in der Agarose Membran ein negatives Abbild dieser bikontinuierlichen Struktur.

Somit entstehen durch die Porenstruktur in der *template* Membran sehr kurze Wegstrecken, welche das Zielmolekül aus den *flow-through* Poren der Agarose Membran in die Agarosestruktur diffundieren muss. So lassen sich sehr kurze Verweilzeiten bei gleichzeitig hoher Bindungskapazität im Vergleich zu globulären porösen *beads* realisieren.

Da in Kapitel I eine deutlich bessere Leistung mit dem Liganden *ProteinA* über das *singlepoint attachment* erzielt worden ist, wird in diesem Kapitel ausschließlich *ProteinA* als Affinitätsligand verwendet.

## 4.2 Materialien und Methoden

Für alle in diesem Kapitel durchgeführten Versuche wird eine Zelluloseacetat Membran (3-5 µm Porendurchmesser, 75 % Porosität, Abbildung 42) der Firma *Sartorius Stedim Biotech GmbH* genutzt. Diese Membranen enthalten ein integral eingebrachtes Vlies (Sontar 8001) der Firma *Freudenberg GmbH*.

## 4.2.1 Materialien

Chemikalie	CAS-Nr.	Hersteller	
Dichlormethan (DCM) (≥99,9%)	75-09-2	Carl Roth GmbH	
Ethanol (t. grade)	64-17-5	Merck KGaA	
Agarose, NEEO Ultra-Qualität	9012-36-6	Carl Roth GmbH	
Dinatriumhydrogenphosphat (98%)	7782-85-6	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	
Alexa Fluor® 594 NHS-Ester	/	Thermo Fisher Scientific GmbH	
Aceton (≥99,9%)	67-64-1	Carl Roth GmbH	
Kaliumdihydrogenphosphat (99,5%)	7778-77-0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	
Tris(2-carboxyethyl)phosphin	51805-45-9	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	
(TCEP, ≥98%)	51005-45-7	Signa-Aluren Chenne Oniori	
ProteinA (lyophilisiert)	/	Osaka Soda Co. Ltd.	

Tabelle 3: In Kapitel II genutzte Chemikalien mit Hersteller und CAS-Nummer.

Glycin (>99%)	56-40-6	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	
BCA Protein Assay Reagent A (Pierce Prod. Nr. 23221)	/	Thermo Fisher Scientific GmbH	
BCA Protein Assay Reagent B (Pierce Prod. Nr. 23224)	/	Thermo Fisher Scientific GmbH	
Cellca II (IgG)	/	Sartorius Stedim Cellca GmbH	
1,4-Butanedioldiglycidylether (>95%)	2425-79-8	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	
Natriumhydroxid	1310-73-2	Carl Roth GmbH	
Leica Typ F Immersion Oil (RI: 1,512)	/	Leica Microsystems GmbH	
Oregon Green 488 Cadaverin	/	Thermo Fisher Scientific GmbH	
FITC-Dextran (4, 10, 20, 110, 500 und 2000 Kg/mol)	60842-46-8	Tdb-Consultancy AB	
Natriummetaperiodat (≥99%)	7790-28-5	Merck KGaA	
Tyramin (>98%)	51-67-2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	
Natriumcyanoborhydride, (≥95%)	25895-60-7	Alfa Aesar GmbH	



Abbildung 42: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Querschnitts (links) und der Aufsicht (rechts), der in diesem Kapitel verwendeten vliesgestützten Zelluloseacetatmembran der Firma *Sartorius Stedim Biotech GmbH*.

## 4.2.2 Herstellung konvektiver Agarose Membranen

Für die Herstellung der Agarose Membran wird zuerst ein *template* Membranstanzling ausgestanzt (d = 70 mm) und im Anschluss das Agarose Sol hergestellt. Dafür werden 2 w% Agarose in ROW gegeben und in einem geschlossenen Durangefäß bei 95 °C für 1 h in einen Trockenschrank gestellt. Im Anschluss wird eine *template* Membran mit dem Agarose Sol imprägniert (40  $\mu$ L Agarose Sol pro cm<sup>2</sup> *template* Membran), und mit einem Papiertuch vorsichtig von überschüssigem Agarose Sol befreit wird. Die mit Agarose Sol imprägnierte *template* Membran wird dann für 45 min in ein Wasserbad (25 °C) gelegt. Nachdem das Agarose Sol geliert ist, wird der so präparierte Membranstanzling jeweils dreimal für 10 min in Ethanol, Dichlormethan und wieder in Ethanol geschüttelt, um den Membranstanzling im ersten Schritt von ROW zu befreien, im zweiten Schritt die Zelluloseacetat *template* Membran aufzulösen und im dritten Schritt das Dichlormethan zu entfernen.



Abbildung 43: Schematische Darstellung der Herstellung der Agarose Membran.

Abschließend wird die Agarose Membran dreimal für fünf Minuten in ROW geschüttelt, um Ethanol zu entfernen. Die verschiedenen Lösemittel werden jeweils deutlich im Überschuss dazugegeben (0,5 mL Lösungsmittel pro cm<sup>2</sup> Membran).

Für eine Immobilisierung von ProteinA ist eine Aktivierung der Agarose nötig. Hierfür wird die Agarose Membran für 20 h in 50 µL/cm<sup>2</sup> Vernetzungslösung geschüttelt. Eine typische Vernetzungslösung besteht aus 15 mL (13 v%; 81 mmol; 1 Äq.) 1,4-Butanedioldiglycidylether (Budge) und 0,39 g (10 mmol; 0,12 Äq.) Natriumhydroxid in 100 mL ROW. In diesem Schritt wird die Agarose chemisch an ihren Hydroxylfunktionalitäten vernetzt, indem beide Epoxydfunktionalitäten abreagieren. Durch die Konzentration an Budge und Natriumhydroxid bzw. die Reaktionszeit wird allerdings die Anzahl an nur einseitig abreagiertem Budge gesteuert. Die Immobilisierung mittels Thiolfunktionalitäten erfolgt dann äquivalent zu Kapitel I durch direkte Reaktion der Thiole des ProteinA Liganden mit den vorhandenen, nur einseitig reagierten, Epoxiden (Reaktionsweg b) in Schema 3. Für eine typische Immobilisierung mittels Thiolen werden die Agarose Membranen für 20 h in eine Lösung, bestehend aus 5 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) und 25.10-2 mg/cm2 ProteinA Ligand (entspricht einer Konzentration von 7,2 mg/mL) in Kaliumhydrogenphosphatpuffer (pH 8,5), geschüttelt. Die so umgesetzten Agarose Membranen werden anschließend für 30 Minuten unter fließendem ROW gespült und für 20 Minuten in 1xPBS geschüttelt. Die Lagerung erfolgt in 20 v% Ethanol in 1xPBS bei 8 °C im Kühlschrank, um eine bakterielle oder sonstige Denaturierung des Proteinliganden zu vermeiden.

### 4.2.3 Physiko-chemische Charakterisierung

Sofern nicht anders angegeben wird die Agarose Membran mit den bereits in Kapitel I (Abschnitt 3.2.3) und Kapitel III (Abschnitt 5.2) beschriebenen Methoden charakterisiert.

#### 4.2.3.1 Bestimmung der statischen Proteinbindungskapazität

Die zu untersuchenden Membranen (Stanzlinge: d = 13 mm) werden 24 h in 5 mL Bindungspuffer (2 mg/mL IgG in 1xPBS) auf einer Schüttelplattform (80 rpm) bewegt. Anschließend wird dreimal mit Waschpuffer (1xPBS) gewaschen (100 mL) und wiederum 2 h in Elutionslösung (100 mL; 0,1 M Glyin pH 3,5) auf einer Schüttelplattform (80 rpm) bewegt. Anschließend wird das Eluat mittels UV/Vis Messung (280 nm) untersucht. Die photometrischen Messungen erfolgen an einem UV/Vis-Spektralphotometer Specord 200 PLUS von *Analytik Jena AG*.



Abbildung 44: Kalibriergerade für IgG (Cellca II) bei 280 nm.

Die erhaltenen Absorbanzen werden mit einer Kalibriergerade (Abbildung 44) und der Gleichung der Ausgleichsgeraden (Gleichung 29) in Konzentrationen und anschließend in die statische Bindungskapazität pro Membranvolumen ( $V_{\rm M}$ ) (Gleichung 2, SBC, *static binding capacity*) umgerechnet. Aus diesem Wert wird auch die statische Ausnutzung (stat. Ausnutzung) nach Gleichung 28 bestimmt.

IgG (Cellca II; Humira®): 
$$c [mg/mL] = 0,716 \cdot A [Au]$$
 (29)

### 4.2.3.2 Inverse Größenausschlusschromatographie (i-SEC)

Für die inverse Größenausschlusschromatographie wird ein ÄKTAexplorer Chromatographiesystem des Herstellers *GE Healthcare Europe GmbH* verwendet (UV/Vis Detektor bei 280 nm). Es werden zwanzig Membranen ausgestanzt (d = 10 mm) und in eine Chromatographiesäule (Superformance 150; *Götec Labortechnik GmbH*) verbaut. Zusätzlich werden FITC-Dextrane (4, 10, 20, 110, 500 und 2000 Kg/mol; *tdb Consultancy AB*) in ROW gelöst (0,5 mg/mL). Vor der Messung wird das Totvolumen des Systems, ohne das chromatographische Medium, mit Hilfe eines Aceton Pulses (2 v% Aceton in ROW) bestimmt. Da Aceton von der Membran nicht adsorbiert wird, gelangt es ohne Rückhalt zum Detektor. Der Massenschwerpunkt des dabei entstehenden Peaks entspricht dem Totvolumen. Die Messung selbst verläuft identisch, jedoch werden, nach dem Einbau der Membranen, Aceton (2 v%) sowie die verschiedenen FITC-Dextrane in Lösung (ROW, 1 mg/mL) als Puls aufgegeben. Über die Verschiebung der Massenschwerpunkte wird im Anschluss darauf geschlossen, welcher Volumenanteil des chromatographischen Mediums für die verschiedenen Molekülgrößen zugänglich war. Hierbei ist  $\varepsilon$ , in Gleichung 30, die Porosität bzw. der zugängliche Volumenanteil,  $V_{ret}$  das Retentionsvolumen für das jeweilige Testmolekül und  $V_M$  das Membranvolumen.

$$\varepsilon = \frac{V_{ret}}{V_M} \tag{30}$$

#### 4.2.3.3 Strukturuntersuchung mittels CLSM

Die Strukturuntersuchung erfolgt angelehnt an die in Kapitel I und Kapitel III bereits beschriebenen Methoden. Die kovalente Markierung der Liganden (*ProteinA*) erfolgt nach der Immobilisierung auf der Agarose Membran mithilfe von Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 (*Thermo Fisher Scientific GmbH*) mit reaktiver Esterfunktionalität (Succinimidyl Ester; NHS-Ester; Abbildung 21). Hierfür werden die Agarose Membranen für 2 h in einer Lösung aus 32  $\mu$ g/mL Fluorophor in 1xPBS-Puffer geschüttelt. Anschließend werden diese Membranen dreimal für jeweils 15 Minuten in 1xPBS gewaschen und dunkel in 1xPBS gelagert.

Die kovalente Markierung der *template* Membran wird äquivalent zur Immobilisierung über primäre Amine durchgeführt (Kapitel I; Abschnitt 3.2.2). Jedoch wird hierbei nicht *rsPA50* als Ligand sondern Oregon Green® 488 Cadaverin (*Thermo Fisher Scientific GmbH*) als Fluorophor immobilisiert. Hierfür wird die *template* Membran nach der oxidativen Behandlung mit Natriummetaperiodat (oxidation verbliebener Diolfunktionalitäten des Zelluloseacetats in Dialdehyde) für 2 h in 32  $\mu$ g/mL der Fluorophorlösung in 1xPBS geschüttelt und anschließend drei Mal für jeweils 15 Minuten in 1xPBS gewaschen und dunkel in 1xPBS gelagert. Die so präparierten Agarose Membran Proben werden auf einem Objektträger platziert (*Fisher Scientific GmbH*, Ultra White Glass; 75 x 25 x 1 mm) und mit 1xPBS-Puffer benetzt. Anschließend wird ein Deckglas (*Fisher Scientific GmbH*, 20 x 20 x 0,25 mm) über der Membran aufgebracht. Daraufhin werden Bilder von der Oberfläche der einen Seite der Membran bis zu ihrer anderen mit einer Auflösung von 240 nm/Pixel in x-, y- und z-Richtung aufgenommen. Die in diesem Kapitel durchgeführten Experimente werden mit einem Leica TCS SP8 Mikroskop durchgeführt. Für sämtliche Messungen mit der Agarose Membran wird ein Argon-Krypton Laser mit einem Spektrum an emittierter Strahlung von 458-591 nm und ein 63xWasser-Objektiv (HC PL APO 63x/1.20 W Corr. CS2; *Leica Microsystems GmbH*) verwendet.



Abbildung 45: Strukturformel des Fluorophors Oregon Green® 488 Cadaverin.

Die präparierten *template* Membran Proben werden ebenfalls auf einem Objektträger platziert (*Fisher Scientific GmbH*, Ultra White Glass; 75 x 25 x 1 mm) und mit Immersionsöl (*Leica Microsystems GmbH* Typ F; Brechungsindex von 1,512) benetzt. Anschließend wird ein Deckglas (*Fisher Scientific GmbH*, 20 x 20 x 0,25 mm) über der Membran aufgebracht. Daraufhin werden Bilder von der Oberfläche der einen Seite der Membran bis zu ihrer anderen mit einer Auflösung von 240 nm/Pixel in x-, y- und z-Richtung aufgenommen. Für sämtliche Messungen mit der *template* Membran wird ein Argon-Krypton Laser mit einem Spektrum an emittierter Strahlung von 458-591 nm und ein 63xÖl-Objektiv (HC PL APO 63x/1.40 Oil CS2; *Leica Microsystems GmbH*) verwendet. Die erhaltenen Bildstapel werden wie in Kapitel III beschrieben bearbeitet und analysiert.

Für die Bildbearbeitung wird in allen Fällen *ImageJ* (Version 1.51j8) genutzt. Die Standardabweichung wird in diesem Kapitel aus einer Doppelbestimmung an zwei unterschiedlichen Positionen ( $40x40 \mu m$ ) desselben *template* Membranstanzlings erhoben.

#### 4.2.3.4 Bestimmung der Epoxiddichte

Die Epoxiddichte wird in diesem Kapitel indirekt bestimmt. Zuerst werden die freien Epoxide mittels 0,1 w% Natriummetaperiodat Lösung in ROW (20 h bei 50 rpm geschüttelt) quantitativ in Aldehyde überführt und diese dann wie in Kapitel I (Abschnitt 3.2.3) mittels BCA Test mit Tyramin quantifiziert.

## 4.3 Ergebnisse und Diskussion

Die angegebenen Fehlerbalken beziehen sich auf die Standardabweichung der Messergebnisse einer Doppelbestimmung mit der jeweiligen Messmethode bzw. dem angegebenen Gerätefehler bei Verwendung der genutzten Pipetten und Waagen.

#### 4.3.1 Strukturanalyse mittels CLSM

Mithilfe der in Kapitel III beschriebenen Methode zur computergestützten Charakterisierung (CgC) von Membranstrukturen aus CLSM Aufnahmen wird im Folgenden die *template* Membran und ihr Negativ, im Folgenden als Agarose Membran bezeichnet, untersucht. Diese Betrachtung ermöglicht die Bestimmung der Charakteristika der Agarose Membran, ausgehend von der experimentellen (CLSM und CgC) Untersuchung der *template* Membran, indem aus den erhaltenen dreidimensionalen Strukturen das Negativ gebildet wird (Abbildung 46).

Dies ist möglich, da durch die Herstellung der Agarose Membranen die Membranstruktur der *template* Membran der späteren *flow-through* Porenstruktur der Agarose Membran entspricht. Somit entspricht die *flow-through* Porengrößenverteilung der *template* Membran der Größenverteilung an Agarose und die *flow-through* Porenverteilung der Agarose Membran der Zelluloseacetatstruktur Dickenverteilung der *template* Membran.

Es ist zu erkennen, dass die *flow-through* Porengrößenverteilung der Agarose Membran schmaler und zu kleineren Werten hin verschoben ist, als die *flow-through* Porengrößenverteilung der *template* Membran (Abbildung 48).



Abbildung 46: Beispielhafte Darstellung der dreidimensionalen Struktur der *template* Membran (links) sowie deren Negativ, das die Agarose Membran darstellt (rechts).

Dies ist qualitativ auch in Abbildung 46 zu erkennen. Die Wegstrecken, welche die Antiköper zwischen den *flow-through* Poren der Agarose Membran diffusiv zurücklegen müssen, können so im Mittel zu 2,9±0,3 µm bestimmt werden, wobei die *flow-through* Poren der Agarose Membran selbst im Mittel zu 1,4±0,2 µm bestimmt werden können (Tabelle 4).



Abbildung 47: Rasterelektronemikroskopische Aufnahme der Aufsicht der *template* Membran (links) und CLSM-Aufnahme der daraus hergestellten Agarose Membran (rechts) bei gleicher Vergrößerung.

Eigenschaft	<i>template</i> Membran (CgC)	<i>template</i> Membran (Exp.)	Agarose Membran (CgC)	Agarose Membran (Exp.)
Porosität [-]	0,736±0,03	0,751±0,05	0,264±0,03	/
Permeabilität (ROW) [mD]	325±6	330±2	4,5±0,6	4,1±0,1
Mittlerer Porendurchmesser [µm]	2,9±0,3	/	1,4±0,2	/

Tabelle 4: Experimentell und über CgC bestimmte Charakteristika der template und Agarose Membran.



Abbildung 48: Porengrößenverteilungen (PGV) der Agarose- und der template Membran.

Die Wegstrecken, welche die Antikörper in die Agarose diffundieren müssen, sind neben der Porengröße innerhalb des Agarose Gels entscheidend für die Bindungskapazität unter nicht Gleichgewichtsbedingungen.

Je kürzer die Wegstrecken und größer die diffusiven Poren innerhalb des Agarose Gels, desto schneller findet die Diffusion der Antikörper zu den Liganden innerhalb des Agarose Gels statt. Zusätzlich wird über diese Methode die Permeabilität der Agarose Membran bestimmt. Die mittels CgC bestimmte Permeabilität für die Agarose Membran liegt im Fehlerbereich des experimentell bestimmten Wertes und liefert so eine Bestätigung für die angenommene Struktur als Negativ der *template* Membran. Aus CLSM-Aufnahmen der Agarose Membran selbst, im Vergleich zur REM Aufnahme der gleichen Probe vor der Umsetzung (*template* Membran), ist die Struktur der *template* Membran qualitativ ebenfalls zu erkennen (Abbildung 47).

## 4.3.2 Einfluss der Immobilisierung von ProteinA

Die zweistufige Reaktion der Immobilisierung von *ProteinA* wird in diesem Abschnitt auf den Einfluss der Konzentration an Natriumhydroxid, welches als Katalysator für die Ringöffnung des Epoxids dient sowie auf den Einfluss der Konzentration des Diepoxids (Budge) auf die Menge an Epoxiden für die anschließende Immobilisierung des Liganden *ProteinA* hin untersucht.

Im Anschluss wird der Einfluss der Reaktionszeit und der Konzentration an *ProteinA* auf die immobilisierte Menge an *ProteinA* sowie DBC<sub>10 %</sub> und die statische Bindungskapazität (SBC) hin untersucht. Der pH-Wert wird im Folgenden nicht weiter variiert, da aus Kapitel I das Optimum für die Reaktion zwischen dem Thiol des *ProteinA* Liganden und Epoxid bereits bekannt ist.

In Abbildung 49 ist der Einfluss der Konzentration an Natriumhydroxid bei der Aktivierung von Agarose mit dem Diepoxid Budge gezeigt. Bei konstanter Konzentration an Diepoxid (13 v%) und einer Reaktionszeit von 20 h ist zu erkennen, dass die Epoxiddichte erst stark zuzunehmen und ab einer Konzentration von 0,55 mol/L konstant zu bleiben scheint. Diese Beobachtung kann darauf zurückgeführt werden, dass bei steigenden Konzentrationen an Natriumhydroxid eine Mehrzahl an Diepoxiden mit beiden Epoxidfunktionalitäten reagiert und somit bei diesen keine Epoxidfunktionalität für die Immobilisierung des Liganden verbleibt, sondern die Agarose kovalent vernetzt wird.

Die molare Menge an immobilisierten *ProteinA* verhält sich äquivalent zur Epoxiddichte, wobei die Ausbeute der Reaktion zwischen Epoxid und Thiol des *ProteinA* bei 72-90 % liegt. Da *ProteinA* lediglich mit einer Thiolfunktionalität sehr selektiv mit den Epoxiden reagiert, ist ein solches Verhalten zu erwarten.

Die DBC<sub>10%</sub> sowie die SBC folgen dem Trend der Ligandendichte proportional. Die statische Ausnutzung der Liganden, berechnet bei der SBC, nimmt hingegen antiproportional zur

Ligandendichte ab. Dies kann mit der zunehmenden sterischen Abschirmung der Bindungsstellen der Liganden durch andere Liganden in der Nähe und eine damit verbundene schlechtere Erreichbarkeit der Liganden für den Antikörper im Gleichgewichtszustand begründet werden.



Abbildung 49: Auftragung der DBC<sub>10%</sub>, der statischen Bindungskapazität (SBC), der statischen Ausnutzung, der Ligandendichte an *ProteinA* in mg/mL (A) und  $\mu$ mol/mL (B) und der Epoxiddichte (B) und gegen die verwendete Konzentratuion an NaOH.

In Abbildung 50 ist der Einfluss der Reaktionszeit für die Immobilisierung von *ProteinA* auf Membranen mit einer Epoxiddichte von 1,7 µmol/mL gezeigt. Die Reaktion zwischen Thiol und Epoxid scheint innerhalb der ersten drei Stunden nahezu vollständig zu verlaufen und im Anschluss in eine Sättigung einzutreten. Der, in Abschnitt 3.3.6, beobachtete konstante Abfall in den Bindungskapazitäten sowie der Ausnutzung ist hier somit nicht zu beobachten. Dies weist darauf hin, dass über die erfolgte Aktivierung lediglich eine relativ geringe Anzahl an Epoxiden für die Immobilisierung zur Verfügung steht. Wohingegen bei der Modifizierung mit globulären Polymernetzwerkstrukturen, aufgrund der gewählten Monomerzusammensetzung,

eine um ein Vielfaches größere Anzahl an Epoxiden verfügbar ist. Bei 710  $\mu$ L Polymerisationslösung, die eine Membran aus Kapitel I pro mL Membran in ihren Kavitäten aufnehmen kann (71 % Porosität) und einer typischen Konzentration von 1,37 mmol/mL Glycidylmethacrylat in der Polymerisationslösung würde sich eine Epoxiddichte von 971 µmol/mL Membran ergeben. Selbst bei einem sehr geringen Umsatz der Polymerisation aus Kapitel I würde sich eine um ein vielfaches höhere Epoxiddichte auf der Membran ergeben. Zusätzlich ist die spezifische Oberfläche der modifizierten Membranen aus Kapitel I deutlich kleiner, als es hier der Fall ist, sodass bei gleicher Menge an immobilisierten *ProteinA* die Liganden näher beieinander liegen müssen. Dies lässt sich bereits ohne konkrete Messungen zur spezifischen Oberfläche der Agarose Membranen, über die Menge an immobilisiertem *ProteinA*, schlussfolgern. Welche bei den Agarose Membranen um ca. ein zehnfaches größer ist als bei den modifizierten Membranen aus Kapitel I, bei vergleichbarer Ausnutzung der Liganden. Die Epoxiddichte ist somit ein wichtiger Steuerparameter für die Immobilisiertung des Liganden und beeinflusst signifikant die Bindungskapazität sowie die statische Ausnutzung über die Steuerung der Ligandendichte an *ProteinA*.



Abbildung 50: Auftragung der DBC<sub>10%</sub>, der statischen Bindungskapazität, der Ligandendichte an *ProteinA*, der Epoxiddichte und der statischen Ausnutzung gegen die Reaktionszeit.

Aufgrund dieser Zusammenhänge beeinflusst die Konzentration an *ProteinA* in der Immobilisierungslösung, sofern *ProteinA* im Überschuss vorliegt, die absolute Menge an immobilisiertem *ProteinA* nicht signifikant, da diese fast ausschließlich von der Epoxiddichte abhängt.

Die Konzentration an Diepoxid zeigt, im untersuchten Bereich von 9-17 v%, lediglich einen kleinen Einfluss auf die Epoxiddichte und somit auch auf alle anderen Faktoren. Bei steigender Konzentration an Diepoxid und ansonsten gleichbleibenden Bedingungen (20 h, 0,1 mol/L NaOH) kann von 9 v% auf 17 v% eine Steigerung der Epoxiddichte von 15±2 % festgestellt werden. Dies wird auf den, bei allen Bedingungen, deutlichen Überschuss von Diepoxid gegenüber dem katalytisch wirkenden Natriumhydroxid zurückgeführt. Dieser Effekt ist in dieser Reaktion dominierend und müsste für noch größere Epoxiddichten dementsprechend ebenso erhöht werden.



Abbildung 51: Auftragung der Bindungskapazitäten (DBC $_{10\%}$  und SBC) sowie der jeweiligen Ausnutzungen der Liganden gegen die Ligandendichte an *ProteinA*.

In Abbildung 51 ist der Einfluss der Ligandendichte auf die Bindungskapazitäten und Ausnutzungen deutlich zu erkennen. Bei steigender Ligandendichte nimmt die DBC<sub>10%</sub> linear mit dieser zu, währenddessen die SBC bei 17,5 mg *ProteinA* pro mL Agarose Membran in eine Sättigung eintritt.

Die Ausnutzungen (bei DBC<sub>10%</sub> und SBC) verhalten sich zu den jeweiligen Bindungskapazitäten antiproportional und spiegeln die Erreichbarkeit der Liganden unter dynamischen und Gleichgewichtsbedingungen wieder. Es ist erkennbar, dass die dynamische Erreichbarkeit weniger stark abfällt als die Erreichbarkeit unter Gleichgewichtsbedingungen sowie, dass diese sich bei hohen Ligandendichten einem gemeinsamen Grenzwert nähern.

Auch nähern sich die DBC<sub>10%</sub> mit steigender Ligandendichte dem Wert der SBC an. Die beobachtete Sättigung der statischen Bindungskapazität deutet auf eine beginnende sterische Abschirmung der Bindungsstellen der Liganden zwischen 20-35 mg/mL hin. Ansonsten müsste bei steigender Ligandendichte auch die statische Bindungskapazität linear zunehmen. Dieser Effekt ist bei der DBC<sub>10%</sub> nicht zu beobachten. Dies lässt sich darüber erklären, dass unter dynamischen Bedingungen die drei verfügbaren Bindungsstellen aus sterischen Gründen für den Antikkörper nicht erreichbar sind, auch wenn genügend Abstand zwischen den Liganden vorherrscht.

Unter Gleichgewichtsbedingungen sind diese allerdings erreichbar. Somit ist die dynamische Ausnutzung bei geringer Ligandendichte sehr viel kleiner als die statische und mit zunehmender Ligandendichte nimmt somit die Anzahl an dynamisch erreichbaren Bindungsstellen linear mit der Ligandendichte zu. Währenddessen macht sich die sterische Abschirmung bei der statischen Bindungskapazität bereits bemerkbar.

# 4.3.3 Einfluss der Porengröße der Agarose auf die Diffusionsabhängigkeit der dynamischen Bindungskapazität

Über die Zugänglichkeit für Moleküle mit unterschiedlichen hydrodynamischen Durchmessern bzw. Molekulargewichten kann eine Aussage über die Porengröße der Agarose getroffen werden. Je zugänglicher die Poren der Agarose für die hier verwendeten Dextranderivate sind, desto größer sind die Poren der Agarose im Durchschnitt.


Abbildung 52: Auftragung der Zugänglichkeit bzw. der Porosität  $\varepsilon$  gegen den Agaroseanteil im Sol (A) und die Konzentration an NaCl im Sol bei 4 % Agaroseanteil (B).



Abbildung 53: Auftragung der Bindungskapazitäten DBC<sub>10%</sub> und SBC sowie der Konzentration an immobilisierten *ProteinA* gegen die Zugänglichkeit für die Dextranderivate mit 500 Kg/mol bzw. 2000 Kg/mol.

Mit steigendem Massenanteil an Agarose ist eine abnehmende Zugänglichkeit der Dextranderivate, mit einer molaren Masse von 500 Kg/mol bzw. 2000 Kg/mol, erkennbar. Ebenso sorgt eine steigende NaCl Konzentration in der Agaroselösung während der Herstellung für eine Zunahme der Zugänglichkeit der beiden Dextranderivate. Diese Trends sind aus der Literatur zu erwarten.

Werden die Bindungskapazitäten und die Konzentration an immobilisiertem *ProteinA* in Relation zu diesen Parametern betrachtet (Abbildung 53), fällt auf, dass bei sinkender Zugänglichkeit für die Dextranderivate die SBC und die Konzentration an immobilisiertem *ProteinA* zunimmt. Gleichzeitig nimmt die DBC<sub>10%</sub> ab. Insbesondere bei einem Massenanteil von 4 % Agarose fällt die DBC<sub>10%</sub> stark ab.

Diese beobachteten Effekte werden mit der steigenden spezifischen Oberfläche der Agarose Membranen bei sinkender Porengröße bzw. dem gesteigerten Massenanteil an Agarose erklärt.

# 4.3.4 Vergleich der Konzepte aus Kapitel I und II mit kommerziellen chromatographischen Medien im Hinblick auf einen *product capture* Schritt

Werden die Prototypen dieser Arbeit aus Kapitel I und Kapitel II mit kommerziellen chromatographischen Medien für die Affinitätchromatographie, im Hinblick auf ihre dynamische Bindungskapazität (DBC<sub>10%</sub>), verglichen (Abbildung 54) fällt auf, dass insbesondere die Agarose Membranen aus Kapitel II eine starke Steigerung dieser Werte aufzeigen.

Dabei zeigen alle getesteten chromatographischen Medien aus porösen Partikeln (MabSelect SuRe® und MabSelect SuRe® LX, *GE Healthcare Europe GmbH* sowie ProSep®Ultra Plus, *Merck KGaA*) die erwartete Diffusionslimitierung. Lediglich bei Verweilzeiten zwischen 120-240 Sekunden erzielen diese hohe Werte für die dynamische Bindungskapazität (DBC<sub>10%</sub>). Die nicht diffusionslimitierten Membranadsorber (Sartobind® ProteinA *Sartorius Stedim Biotech GmbH* und der Prototyp aus Kapitel I) zeigen hingegen eine relativ konstante dynamische Bindungskapazität über die Verweilzeit.

Insbesondere der Prototyp aus Kapitel I zeigt bei einer Verweilzeit von 60 Sekunden vergleichbare Bindungskapazitäten zu MabSelect SuRe®. Somit könnte hier eine Anwendung

im Bereich von Verweilzeiten unterhalb einer Minute sinnvoll sein, da eine kürzere Verweilzeit im chromatographischen Medium gleichzeitig einer kürzeren Prozesszeit entspricht.

Die Agarose Membran aus Kapitel II zeigt ebenfalls die erwartete Abhängigkeit der dynamischen Bindungskapazität von der Verweilzeit. Allerdings liegen, aufgrund der bikontinuierlichen Struktur der *template* Membran, die *flow-through* Poren der Agarose Membran so, dass die Abstände zwischen den größeren Agaroseansammlungen sehr klein sind und die Diffusion des Antikörpers in und aus der Agarose sehr viel schneller von statten geht, als bei konventioneller Chromatographie mit porösen Partikeln.



Abbildung 54: Auftragung der DBC<sub>10%</sub> verschiedener kommerzieller Protein A Affinitätsmedien gegen die Verweilzeit innerhalb des chromatographischen Mediums.

Basierend auf dem besten, in diesem Vergleich, gemessenen Wert für chromatographische Medien in der Protein A Affinitätschromatographie mit porösen Partikeln (ProSep® Ultra Plus; 57 mg/mL bei 120 Sekunden Verweilzeit *Merck KGaA*), bietet der hier hergestellte Prototyp des Agarose Membranadsorbers eine ca. 37 % höhere Bindekapazität bei lediglich einem Zehntel der Verweilzeit. Somit könnte ein *product capture* Schritt in einem *Downstream* Prozess mit dem hier entwickelten Agarose Membranadsorber deutlich schneller sowie in weniger Zyklen durchgeführt werden.

Dies ist an einem modellhaften *product capture* Schritt eines Beispielprozesses in Tabelle 5 gezeigt. Hierbei wird von einem *Feed* (verunreinigtes Ursprungsmedium) mit einer Antikörperkonzentration von 5 g/L und einem *Feed* Volumen von 2000 L ausgegangen. Zusätzlich wird mit fünf L chromatographischem Medium und jeweils fünf Membran- bzw. Säulenvolumen (25 L) für den Equilibrierungsschritt bzw. den Waschschritt und zwei Membran- bzw. Säulenvolumen (10 L) für die Elution gerechnet. Für den Equilibrierungs- und Waschschritt wird davon ausgegangen, dass für die Säule eine höhere Flussrate (fünf Säulenvolumen pro Minute) gewählt wird, zudem wird ohne den *CIP* (*cleaning in place* mit NaOH) Schritt gerechnet. Es wird zusätzlich davon ausgegangen, dass nur bis 10 % vor der DBC<sub>10%</sub> beladen wird, um möglichst wenig Produkt im Durchbruch zu verlieren.

Konzentration mAb im Feed [g/L]		5	
Volumen Feed [L]	Ĩ	2000	
Menge Antikörper [g]		10000	
Chromatographische Medien	Merck KGaA ProSep®	Prototyp Kapitel I	Prototyp Kapitel II
Volumon abrom Madium [1]	Ultra Plus	5	
	57	16	79
10.9/ Sicherheitzehstend zum Durchhruch [mg/m]	51.2	14.4	70.2
10 % Sicherneitsabstand zum Durchbruch [mg/mL]	31,5	14,4	70,2
	39	139	29
Flussrate [L/min]	2,5	25	25
Verweilzeit Beladung [s]	120	12	12
Zeit pro Beladung [s]	1231 35 169		
Volumen Equilibrierung & Waschen pro Zyklus [L]	50		
Volumen Elution pro Zyklus [L]	10		
Zeit pro Equilibrierung & Waschen [s]	120		
Zeit Pro Elution [s]	240	24	24
Zeit Pro Zyklus [s]	1591	179	313
Gesamtzeit capture Schritt [h]	17,2	6,9	2,5
Produktivität [gmAb/h]	581	1449	4000
Pufferverbrauch [L]	2340	8340	1740
L <sub>C</sub> (Gleichung 7) [mgmD/mL]	/	131.7	287,8

Tabelle 5: Modellhafter *product capture* Schritt in einem *Downstream* Prozess eines monoklonalen Antikörpers mit einem kommerziellen chromatographischen Medium aus porösen Partikeln und den Prototypen aus Kapitel I und Kapitel II.

Es ist zu erkennen, dass die Gesamtzeit für den *product capture* Schritt bereits mit den Prototypen aus Kapitel I deutlich herabgesetzt werden kann (60 %). Hierbei ist allerdings die deutlich größere Anzahl an Zyklen zu beachten. Dies sorgt für einen deutlich größeren Verbrauch an Puffer (72 %), als mit den konventionellen, porösen Partikeln. Je nach Puffer stellt dies einen signifikanten Kostenfaktor dar. Der Prototyp aus Kapitel II, der Agarose Membranadsorber, hingegen zeigt eine deutliche Verminderung der Gesamtzeit (85,5 %), der Zyklenanzahl (25 %) sowie des Pufferverbrauchs (25 %) gegenüber dem hier genutzten porösen Partikeln.

Wird die Produktivität als das Verhältnis der Masse an aufgereinigtem monoklonalem Antikörper (mAb) zu der dafür benötigten Zeit in Stunden definiert, so sind dieselben Zusammenhänge zu erkennen wie zuvor beschrieben. Sie liefern allerdings einen plastischen Eindruck über die Möglichkeiten, die sich mit den Prototypen aus dieser Arbeit ergeben. Für den Prototypen aus Kapitel I wird eine Erhöhung der Produktivität um den Faktor 2,5 und für den Prototypen aus Kapitel II um den Faktor 6,9 erreicht.

#### 4.4 Zusammenfassung Kapitel II – Agarose Membranadsorber

In dem hier vorgestellten Kapitel II wird die Herstellung und Charakterisierung einer stationären Phase, welche aus Agarose, einem Polysaccharid basierten Polymernetzwerk, mittels *templating* hergestellt wird beschrieben. Dazu wird eine Vliesgestützte Zellulosacetat-Membran mit dem Agarose Sol vollständig gefüllt und nach der Gelbildung der Agarose mittels Dichlormethan wieder herausgelöst. Durch das hier beschriebene Verfahren entstehen *flow-through* Poren, welche die Permeabilität der Agarose Membran bestimmen. Durch die inhärenten Poren des Agarose Gels entsteht so eine hohe, diffusiv zugängliche, spezifische Oberfläche für die Proteinbindung.

Es kann mittels CgC und CLSM gezeigt werden, dass die *flow-through* Poren der Agarose Membran den Stegen der *template* Membran entsprechen. Des Weiteren können so die strukturellen Eigenschaften der Agarose Membran, wie die Porengrößenverteilung und Permeabilität, bestimmt werden.

Für die Immobilisierung von *ProteinA* kann gezeigt werden, dass die Konzentration an Natriumhydroxid der dominierende Einflussparameter für die Aktivierung der Agarose mit

reaktiven Epoxidfunktionalitäten ist. Die anschließend erfolgende Immobilisierung von *ProteinA* verläuft proportional zur Epoxiddichte aufgrund der hohen Selektivität der Reaktion zwischen Thiol und Epoxid. Ebenso kann gezeigt werden, dass dieser Reaktionsschritt innerhalb der ersten drei Stunden nahezu vollständig verläuft.

Die Ligandendichte wiederum beeinflusst die Bindungkapazitäten der Agarose Membran signifikant. Bei steigender Ligandendichte wird eine steigende Bindungskapazität DBC<sub>10%</sub> beobachtet. Wohingegen die SBC bei einer Ligandendichte von ca. 17,5 mg/mL in eine Sättigung eintritt. Dies wird auf die molekularen Zusammenhänge und die unterschiedliche Erreichbarkeit der Bindungsstellen der einzelnen Liganden, unter Gleichgewichtsbedingungen und nicht Gleichgewichtsbedingungen, zurückgeführt.

Die Porengröße innerhalb des Agarose Gels wird mittels i-SEC abgeschätzt. Hierbei ist zu erkennen, dass die Porengrößen bzw. die Zugänglichkeiten für ausgewählte Dextranderivate bei zunehmendem Massenanteil an Agarose im Agarose Sol abnehmen. Gleichzeitig werden diese mit steigender Konzentration an Natriumchlorid wieder erhöht. Somit kann die Porengröße gezielt gesteuert werden. Dies ist von Bedeutung, denn die Porengröße des Agarose Gels ist für die diffusive Erreichbarkeit der Liganden, innerhalb der angestrebten Prozesszeit (12 Sekunden), maßgeblich.

Je größer die Poren innerhalb des Agarose Gels, desto schneller können die Antikörper in und aus dem Agarose Gel diffundieren. Dies wird insbesondere bei der abfallenden Bindungskapazität DBC<sub>10%</sub> mit sinkender Zugänglichkeit für die ausgewählten Dextranderivate deutlich.

Abschließend wird die Leistungsfähigkeit der in Kapitel I und Kapitel II hergestellten Membranadsorber für einen modellhaften *product capture* Schritt aufgezeigt. Hierbei wird deutlich, dass beide stationären Phasen zu einer Steigerung der Produktivität gegenüber einer konventionellen, auf porösen Partikeln basierten, stationären Phase führen. Dies ist durch die deutlich kürzere Verweilzeit innerhalb der stationären Phase möglich, da die Struktur beider Membranadsorber einen schnellen Massentransport zu den Liganden ermöglicht.

Allerdings führt der Ansatz aus Kapitel I zu einem höheren Pufferverbrauch, aufgrund der niedrigeren Bindungskapazität und der so erhöhten Cyclenanzahl. Die Agarose Membran aus Kapitel II jedoch führt, aufgrund ihrer höheren Bindungskapazität (DBC<sub>10%</sub>), zu einer

gesteigerten Produktivität bei niedrigerem Pufferverbrauch, als es bei der hier getesteten konventionellen stationären Phase der Fall ist.

Somit ist ein Einsatz dieser Materialien in einem großtechnischen Prozess sinnvoll, um die Kosten für die Produktion von monoklonalen Antikörpern (mAb`s) signifikant zu verringern.

#### 5. Kapitel III- 3D Membranstrukturanalyse mittels CLSM

#### 5.1 Einleitung computergestützte 3D-Strukturanalyse

Wie eingangs bereits beschrieben liefern üblicherweise verwendete Verfahren zur Charakterisierung der Porenstruktur von makroporösen Membranen (Kapillarfluss Porometrie<sup>73–75,110</sup>, BET-Analyse<sup>77</sup>, Bubble-Point-Messungen<sup>78,80</sup>) ausschließlich Integralstrukturparameter. Diese liefern jedoch keine lokal aufgelösten Informationen. Obwohl diese Informationen sehr bedeutend sind, da sie oft direkt mit der Leistung der Membran korrelieren, wie in Kapitel I gezeigt. Lokale Strukturinformationen können allerdings, insbesondere entlang der Dicke der Membran, sehr hilfreich sein bei der vollständigen Betrachtung und lokalen Verortung dieser Leistung.

Rasterelektronenmikroskopie und CLSM Bildanalysen von unterschiedlich präparierten Membranproben werden in der Literatur verwendet, um lokal aufgelöste Strukturinformationen zu erzeugen.<sup>81–83</sup> Jedoch ist, aufgrund des zweidimensionalen Charakters der REM Bildgebungstechniken und der berichteten zweidimensionalen CLSM Bilder, eine quantitative Auswertung der Porenstruktur, aufgrund ihrer strukturellen Komplexität, nicht möglich. Basierend auf verschiedenen Methoden der dreidimensionalen Bildgebung und Bildanalyse wurden alternative Techniken wie Röntgenbeugung<sup>83</sup>, Abbildung von harzgefüllten Membranen<sup>84–86</sup> oder dreidimensionale CLSM entwickelt.<sup>88</sup> Alle diese Techniken sind in ihrer Fähigkeit begrenzt quantitative Strukturinformationen aus den Bildern zu extrahieren. Die Probenvorbereitung erfordert hierbei oftmals eine künstliche Konditionierung der Proben weit entfernt von der jeweiligen Anwendung.

In diesem Kapitel, welches auch als Veröffentlichung in der Literatur zu finden ist<sup>1</sup>, soll somit ein Ansatz vorgestellt werden, der eine hinreichend aufgelöste dreidimensionale Darstellung kommerzieller Membranen<sup>168,169</sup> liefert und gleichzeitig die Auswertung hinsichtlich quantitativer Strukturinformationen aus diesen dreidimensionalen Darstellungen ermöglicht. Somit sollen detaillierte und lokale Struktur-Leistungs-Korrelationen zugänglich werden. Hierfür wird die CLSM in Kombination mit computergestützter Bildauswertung verwendet. Die dreidimensionalen Darstellungen werden mit zuvor fluoreszenzmarkierten, kommerziellen, makroporösen Nitrozellulosemembranen erzeugt. Mit einem auf einer vorzeichenbehafteten Abstandsfunktion und einer Medialachse für jede Pore basierenden Algorithmus, können Kugeln in die poröse dreidimensionale Struktur eingepasst werden. Anhand der Größenverteilung dieser Kugeln wird die Porengrößenverteilung der Membran auf lokaler Ebene bestimmt. Um die aus der CLSM erhaltenen dreidimensionalen Darstellungen zu validieren, werden typische Membrancharakteristika, wie die spezifische Oberfläche, die Porengrößenverteilung und die Permeabilität der Membran, mit experimentellen Werten verglichen.

In dieser Studie wird eine kommerziell verfügbare, makroporöse Nitrozellulosemembran untersucht. Diese Membran wird üblicherweise in lateralen Durchfluss Immunoassays, z.B. bei Tests zum Nachweis von Schwangerschaften, Drogen oder Infektionskrankheiten verwendet. Die makroporöse Nitrozellulosemembran sorgt hierbei für einen kapillargetriebenen Transport der Probenflüssigkeit. Nitrozellulosemembranen weisen zudem eine relativ hohe Bindungskapazität für Proteine auf, ohne die Aktivität des gebundenen Proteins zu beeinflussen. Somit können Antikörper auf die Membran gedruckt werden<sup>168,169</sup>.

Die hier untersuchte Membran soll im Kontext dieser Arbeit als Modellmembran dienen, um die beschriebene Technik zu entwickeln. Die gewählte Membran eignet sich hierfür besonders, da sie eine homogene Struktur sowie eine geringe Dicke besitzt. Zusätzlich ist diese Membran, im Hinblick auf die hier untersuchten Charakteristika, bereits gut charakterisiert. Dieser Ansatz ist so ausgelegt, dass er auch auf Membranadsorber, wie in Kapitel II gezeigt, anwendbar ist.

#### 5.2 Materialien und Methoden

Alle Experimente werden mit der Unisart©140 (*Sartorius Stedim Biotech GmbH*; 8 µm nominelle Porengröße; 142 µm Dicke; Abbildung 55), einer kommerziell erhältlichen, Nitrozellulose basierten Membran, durchgeführt. Alle experimentellen Messungen werden an denselben Membranproben durchgeführt, um Schwankungen der Messergebnisse, die durch eine Inhomogenität der Membran verursacht werden könnten, zu vermeiden.

Es werden acht Membranstanzlinge (jeweils 47 mm Durchmesser) genutzt, um die Porosität, die Permeabilität und die spezifische Oberfläche zu bestimmen. Im Anschluss werden aus dem Zentrum jedes Stanzlings kleinere (jeweils 25 mm Durchmesser) Stanzlinge genommen. Mit diesen wurde die Porengröße über die Kapillarfluss Porometrie (Abschnitt 3.2.3.10) bestimmt. Aus diesen Stanzlingen werden dann jeweils 2 Stanzlinge (jeweils 10 mm Durchmesser) für die CLSM-Experimente genommen. Sofern nicht anders angegeben wird die vorliegende Membran mit den bereits in Kapitel I (Abschnitt 3.2.3) und Kapitel II (Abschnitt 5.2) beschriebenen Methoden charakterisiert.



Abbildung 55: REM Aufnahme der in diesem Kapitel verwendeten Membran Unisart©140.1

## 5.2.1 Materialien

Tabelle 6: In Kapitel III genutzte Chemikalien mit Hersteller und CAS-Nummer.

Chemikalie	CAS-Nr.	Hersteller
Kupferchlorid (97%)	7447-39-4	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat (98%)	7782-85-6	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Alexa Fluor® 594 NHS-Ester	/	Thermo Fisher Scientific GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat	7778-77-0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
(99,5%)		
Leica Typ F Immersion Oil	/	Leica Microsystems GmbH
(RI: 1,512)		
konz. Salzsäure (32%ig)	7647-01-1	Carl Roth GmbH

# 5.2.2 3D Rekonstruktionen aus der *Confocal-Laser-Scanning* Mikroskopie (CLSM)

Wie zuvor beschrieben werden für die CLSM Experimente Membranstanzlinge mit 10 mm Durchmesser verwendet. Die Messungen selbst werden jeweils im Zentrum des Stanzlings aufgenommen.

Um die Membran im CLSM sichtbar zu machen, ist die Immobilisierung eines Fluorophors notwendig. Hierfür werden die Membranen nach einem modifizierten Protokoll aus der Literatur<sup>170</sup> jeweils für 16 Stunden in 1 mL einer Lösung aus 1 M HCl und 1 M Cu(I)Cl geschüttelt, um die Nitrogruppen auf der Oberfläche zu primären Aminen umzusetzen. Im Anschluss werden die Membranen 30 Minuten unter fließend ROW gewaschen und im Ofen bei 80 °C für 30 Minuten getrocknet. Die getrockneten Membranstanzlinge werden dann in 1 mL einer wässrigen Lösung aus 1M KPI; pH 7,0 und 32,5 mg/L Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 NHS-Ester, für 2 Stunden geschüttelt. Im Anschluss werden die Membranen dreimal 30 Minuten unter fließend ROW gewaschen und im Ofen bei 80 °C für 1 Stunde getrocknet.

Die so präparierten Membranstanzlinge werden für die CLSM Experimente auf Objektträger (*Fisher Scientific GmbH*, Ultra White Glass; 75 x 25 x 1 mm) gelegt und mit Immersionsöl (*Leica Microsystems GmbH* Typ F; Brechungsindex von 1,512) benetzt. Im Anschluss wird ein Deckglas (*Fisher Scientific GmbH*; 20 x 20 x 0,25 mm) auf der Membran positioniert und die Ränder mit Zweikomponentenkleber versiegelt. Da das Immersionsöl einen identischen Brechungsindex zur Membran aufweist, wird diese transparent und ermöglicht so eine vollständige Penetration des Lasers über die komplette Dicke der Membran (142  $\mu$ m), während die Strukturinformation über die immobilisierten Fluorophore sichtbar bleibt.<sup>88</sup>

Die in diesem Kapitel durchgeführten Experimente werden mit einem Leica TCS SP8 Mikroskop durchgeführt. Für sämtliche Messungen wird ein *DPSS* Laser, mit einer emittierten Strahlung von 561 nm und ein 63xÖl-Objektiv (HC PL APO 63x/1.40 Öl CS2; *Leica Microsystems GmbH*) mit einem maximalen Arbeitsabstand von 1,4 mm, verwendet. Das *pinhole* wird bei 95,6 µm und der *smart gain* (*photomultiplier* Detektorspannung) bei 650 V festgesetzt. Die Größe der Bilder beträgt in allen Fällen 256x256 Pixel. Dies entspricht einer Kantenlänge für die x- und y-Ebene von 61,56 µm. Für jeden Stanzling werden insgesamt 590 Bilder in der Z-Ebene aufgenommen. Dies entspricht einer Penetrationstiefe von 141,89 µm.



Abbildung 56: Bestimmung des oberen *threshold* Wertes über den Vergleich der Porositäten aus der computergestützten Charakterisierung und dem experimentell gemessenen Wert.<sup>1</sup>

Insgesamt werden so 16 Bildstapel im Zentrum der Stanzlinge aufgenommen, um eine statistische Evaluation durchführen und eine experimentelle Standardabweichung berechnen zu können.

Um die so erhaltenen Bildstapel in eine dreidimensionale Rekonstruktion überführen zu können, ist eine Bildbearbeitung und vor allem eine Überführung in binäre Bilder notwendig, um exakt zwischen Struktur und Porenraum unterscheiden zu können. Die Bildstapel werden dafür zunächst mittels *median*-Filter (2 Pixel) geglättet, um das Signal zu Rausch Verhältnis zu verbessern. Im Anschluss wird der *threshold* (Grenzwert) für die Überführung in binäre Bilder auf 0 als untere Grenze bzw. 170 als obere Grenze gesetzt. Der obere *threshold* wird hierbei im Vorfeld über die Porosität der computergestützten Auswertung (Abschnitt 5.2.3) und der experimentell gemessenen Porosität bestimmt (Abbildung 56). Dieses Referenzieren auf einen experimentell gut zugänglichen Wert ist notwendig, da der *threshold* einen großen Einfluss auf das Ergebnis und die dem Ergebnis zugrundeliegende Struktur der Rekonstruktion hat. Die binarisierten Bildstapel können dann anschließend in die dreidimensionalen Rekonstruktionen überführt werden (Abbildung 57). Für die beschriebene Bildbearbeitung wird in allen Fällen *ImageJ* (Version 1.51j8) genutzt.



Abbildung 57: Beispielhafte Bildbearbeitung für die dreidimensionale Rekonstruktion aus CLSM Bildstapeln.<sup>1</sup>

### 5.2.3 Computergestützte Charakterisierung (CgC) der 3D Rekonstruktionen

Die computergestützte Charakterisierung (CgC) der dreidimensionalen Rekonstruktionen beinhaltet numerische Flüssigkeits-Fluss-Simulationen sowie verschiedene, im Weiteren näher erläuterte, Nachbearbeitungsschritte. Beide sind in der Simulationsumgebung PACE3D<sup>3</sup> enthalten, die in dieser Arbeit verwendet wird. Für die Charakteristika Porosität und spezifische Oberfläche werden 16 dreidimensionale Rekonstruktionen vermessen, um die experimentelle Für die Standardabweichung bestimmen zu können. Permeabilität und die Porengrößenverteilung werden lediglich fünf Rekonstruktionen vermessen, da der Rechenaufwand für diese Messungen deutlich höher ist, als für die Porosität und die spezifische Oberfläche. Um auch für diese Werte eine plausible, experimentelle Standardabweichung bestimmen zu können, werden fünf verschiedene dreidimensionale Rekonstruktionen aus den Ergebnissen der 16 bestimmten Porositäten ausgewählt.

Hierbei werden die zwei Rekonstruktionen mit den höchsten, die zwei Rekonstruktionen mit den kleinsten sowie eine Rekonstruktionen mit der mittleren Porosität für die weitere Analyse der Permeabilität und der Porengrößenverteilung herangezogen. Um den Einfluss der geometrischen Inhomogenität der Membranstruktur zu reduzieren wird in dieser Arbeit im Vorfeld ein repräsentatives Volumenelement (RVE) bestimmt.



Abbildung 58: Bestimmung des repräsentativen Volumenelements (RVE); Das RVE ist bei einer Kantenlänge von 14,4  $\mu$ m erreicht.<sup>1</sup>

Dies entspricht somit dem minimalen Volumenelement, welches für eine statistisch repräsentative CgC Analyse genutzt werden sollte. Das RVE wird hierbei bestimmt, indem die Kantenlänge des analysierten Volumenelementes schrittweise vergrößert wird, bis die Standardabweichung für die Membrancharakteristika Porosität und spezifische Oberfläche unter 5 % fällt.<sup>171,172</sup> Es werden 50 Volumenelemente von 5-25  $\mu$ m Kantenlänge untersucht, währenddessen wird die Auflösung bei 240 nm/Pixel konstant gehalten. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 58 dargestellt und zeigt das erhaltene RVE von 14,4  $\mu$ m. Dies zeigt, dass die genutzten Repräsentationen von 61,56 x 61,56 x 141,89  $\mu$ m repräsentativ sind in Bezug auf ihr Volumenelement und die Heterogenität der Membranstruktur.

#### 5.2.3.1 Porosität bestimmt durch CgC

Die Porosität  $P_{CgC}$  wird aus dem Verhältnis des Porenvolumens  $V_p$  zum totalen Volumen der Repräsentation  $V_t$  bestimmt.

$$P_{CgC} = \frac{V_p}{V_t} \tag{31}$$

Die Porosität wird hierbei über ein Aufsummieren der Voxel beider Volumina berechnet, da die dreidimensionalen Rekonstruktionenen Voxel basiert sind. Voxel ist hierbei die Beschreibung für einen dreidimensionalen Pixel.

#### 5.2.3.2 Spezifische Oberfläche bestimmt durch CgC

Die spezifische Oberfläche  $S_{CgC}$  wird als Verhältnis der inneren Oberfläche  $S_i$  der Membranstruktur zum totalen Volumen  $V_t$  der Repräsentation bestimmt.

$$S_{cgc} = \frac{S_i}{V_t} \tag{32}$$

Die innere Oberfläche *S*<sub>i</sub> wird bestimmt, indem die Grenzen zwischen der Struktur und dem Porenbereich mit einem Gaußschen Filter verwischt werden, um eine diffuse Grenzfläche zu erhalten. An dieser werden anschließend Oberflächennormalen berechnet und aufsummiert.

#### 5.2.3.3 Permeabilität bestimmt durch CgC

Die Permeabilität  $P_{CgC}$  der dreidimensionalen Rekonstruktionen für ROW, wird über eine numerische Lösung der Stokes Gleichung im Porenraum bestimmt. Mit der Annahme, dass niedrige lineare Strömungsgeschwindigkeiten (<1 m/s) in den Poren vorherrschen, sind die resultierenden advektiven Trägheitskräfte, im Vergleich zu den viskosen Kräften, klein. Daraus ergibt sich eine niedrige Reynolds-Zahl (Re << 1) für das Strömungsproblem. Die advektive Kraft kann dann vernachlässigt werden und die vollständige Navier-Stokes-Gleichung kann zu der folgenden Stokes-Gleichung linearisiert werden.

$$\eta \nabla^2 u - \nabla p = 0 \tag{33}$$

$$\nabla \cdot u = 0 \tag{34}$$

111



Abbildung 59: Beispielhafte Fluss-Simulation in Durchflussrichtung (z-Ebene).<sup>1</sup>

Für die verbleibenden Grenzen wird die Gleitbedingung festgelegt. Das Geschwindigkeitsfeld, welches sich bei einem gegebenen Druckgradienten  $\nabla p$  einstellt, wird für die Permeabilitätsbestimmung, unter Verwendung des Darcy-Gesetzes, verwendet.<sup>173</sup> Hierbei ist *l* die Länge bzw. die Dicke der Membran.

$$P_{CgC} = u \cdot \eta \cdot \frac{l}{\nabla p} \tag{35}$$

Für numerische Strömungssimulationen ist es, neben einer minimalen physikalischen Kantenlänge des RVE, wichtig, eine sinnvolle numerische Auflösung für den Porenraum zu verwenden, um Diskretisierungsfehler beim numerischen Lösen der Gleichung 33 zu minimieren. Im Gegensatz zu der gegebenen räumlichen Auflösung der Bilder kann die numerische Auflösung durch Erhöhen der Anzahl von Voxeln modifiziert werden, um das Berechnungsgitter für den Porenraum in der 3D-Mikrostruktur darzustellen. Als eine Folge ändert sich auch die Voxelgröße. Um die erforderliche minimale Voxelgröße zu bestimmen, wird ein 3D-Schnitt von  $26,4 \times 26,4 \times 141,89$  µm der Membranstruktur extrahiert. In diesem

wird die Voxelgröße schrittweise verringert, währenddessen die Anzahl der Voxel zunimmt. Um die Erhaltung der Morphologie der Rekonstruktion zu gewährleisten, während die numerische Auflösung geändert wird, werden die binarisierten dreidimensionalen Daten durch einen Gauß'schen Filter zuerst diffus dargestellt. Anschließend wird die Gitterverfeinerung erhalten, indem die Domänengröße um das 2,4- und 5-fache erhöht wird, wobei jedes Mal eine trilineare Interpolation der ursprünglichen unscharfen Werte auf dem verfeinerten Gitter erfolgt.



Abbildung 60: Bestimmung der minimalen Voxelgröße der untersuchten Membranstruktur.<sup>1</sup>

Als abschließender Schritt wird die verfeinerte Domäne erneut binärisiert. Beginnend mit einer Voxelgröße von 240 nm wird die Permeabilität für jede numerische Auflösung berechnet. Unter der Annahme einer maximalen relativen Abweichung, mit der niedrigsten numerischen Auflösung, nimmt der relative Fehler für die Permeabilitätswerte mit zunehmender numerischer Auflösung ab. Der relative Fehler beträgt für die Voxelgröße von 60 nm auf 48 nm lediglich noch 1,67 %, wodurch die minimal erforderliche numerische Auflösung gekennzeichnet wird.

Die Bestimmung der Permeabilitätswerte und der entsprechenden relativen Abweichungen sind in Abbildung 60 dargestellt. Um den Diskretisierungsfehler für die Permeabilitätsschätzungen zu minimieren wird ein diskretes Gitter mit ungefähr 221 Millionen Berechnungspunkten benötigt. Für die numerischen Simulationen werden 193 CPU's des *ForHLR II Supercomputers* in Karlsruhe parallel verwendet.

#### 5.2.3.4 Bestimmung der Porengrößenverteilung mittels CgC

Für die Bestimmung der Porengrößenverteilung auf der Mikroskala wird ein Bildverarbeitungsverfahren entwickelt. Diese Methode kann in drei Verarbeitungsschritte unterteilt werden:

i) Lösen einer vorzeichenbehafteten Abstandsfunktion (SDF)

ii) Bestimmung der medialen Achse (MA)

iii) Filtern der Lösung der vorzeichenbehafteten Abstandsfunktion durch die Medialachse

Mit der vorzeichenbehafteten Abstandsfunktion (SDF) f(x) kann die kürzeste euklidische Entfernung zum nächsten Punkt, basierend auf der binären Darstellung der Mikrostruktur g(x)und innerhalb der Grenze  $\delta_S \Omega$  einer Domäne, berechnet werden.<sup>174,175</sup> Wird die SDF durch f(x) = g(x) initialisiert, kann die Entfernung jedes Punktes zur Grenzfläche beider Phasen, durch Einstellen der Größe des Gradienten des Normalvektors relativ zur Grenzfläche, berechnet werden (Gleichung 37). Die Lösung dieser Bedingungen wird durch eine iterative Lösung einer partiellen Differentialgleichung im dreidimensionalen Raum erreicht (Gleichung 37).

$$|\nabla f(\mathbf{x})| = 1 \tag{36}$$

$$\frac{\delta f(\mathbf{x})}{\delta t} = S(f) \cdot sign(f) \cdot (1 - |\nabla f(\mathbf{x})|)$$
(37)

$$S(f) = \frac{f}{\sqrt{f^2 + (\Delta x)^2}}$$
(38)

Hierbei unterscheidet die Funktion *sign* die diskreten Bereiche der Membranstruktur voneinander. Ist *sign* = 1, so wird die Funktion im Porenraum gelöst, ist *sign* = 0 beschreibt diese den Grenzbereich zwischen Porenraum und Membranstruktur und ist *sign* = -1 so beschreibt diese die Membranstruktur selbst. *S*(f) beschreibt in Gleichung 37 und 38 eine

sogenannte Schmierfunktion, welche in diesem Zusammenhang die Grenzflächen für die Lösung der SDF Funktion fixiert. Die partielle Differentialgleichung (Gleichung 33) wird mittels *Godunov`s upwind difference scheme* gelöst.<sup>176</sup>



Abbildung 61: Schematische Darstellung des Prozesses für die CgC Bestimmung der Porengrößenverteilung einer Domäne  $\Omega$  mit der Oberfläche  $\delta_S \Omega$ . Bestimmung der Medialachse (a), Lösung der SDF (b), Filtern der SDF mit der Medialachse (c).<sup>1</sup>

Um die Medialachse zu bestimmen wird an jedem Punkt der dreidimensionalen Struktur eine Sphäre eingefügt. Berührt die Sphäre die Membranstruktur an mehr als einem Punkt, so ist dies die maximale Sphäre für diesen Punkt der Struktur. Die Medialachse ist definiert, als der Ort aller Mittelpunkte der maximalen Sphären und verläuft somit im Mittel der Porenstruktur jeder Pore.

Die so erhaltene Medialachse wird mittels Ausdünnungsalgorithmen extrahiert, welche zu einfachen Linien führen, welche die topologischen Eigenschaften erfüllen. Jedoch liefern diese keine Informationen über Entfernungen zwischen Medialachse und Porenwand. Um zu erreichen, dass die Topologie der Membranstruktur erhalten bleibt und gleichzeitig parametrisch repräsentiert und somit charakterisiert wird, wird die vorzeichenbehaftete Abstandsfunktion mit der Medialachse überlagert. Der angewendete Algorithmus für das Ausdünnungsverfahren basiert auf *Lees* Algorithmus<sup>177</sup>.

Bei diesem wird durch symmetrisches Erodieren die Oberfläche der Geometrie auf die Topologie der resultierenden dünnen Linie projiziert.<sup>178</sup> Die Kombination aus SDF und Medialachse liefert somit einen Ausdruck für die Porengrößenverteilung der Membranstruktur. Dafür wird zuerst die partielle Differentialgleichung (Gleichung 33) gelöst, um das euklidische Distanzfeld zu erhalten.

Im Anschluss wird das euklidische Distanzfeld mit den Punkten aus der Medialachse gefiltert. Die daraus resultierenden Distanzen werden anschließend als Radien der Poren interpretiert, während die genaue Position dieser Porenradien aus der Medialachse hervorgeht.



Abbildung 62: Illustration der SDF mit überlagerter Medialachse und angaben der lokalen Porendurchmesser eines Beispielhaften Auschnitts einer dreidimensionalen Rekonstruktion aus den CLSM Messungen.<sup>1</sup>

Mithilfe dieser Methode wird der Porenraum von vielen unterschiedlich großen Kugeln durchsetzt (Abbildung 62), wobei sich benachbarte Kugeln überlappen dürfen. Somit sind auch lokale Informationen über die Porengrößen sowie die allgemeine Information über die Porengrößenverteilung und die resultierende mittlere Porengröße zugänglich.

Abbildung 61 veranschaulicht das gesamte Verfahren durch Vereinfachung des Porenraums der komplexen Membranstruktur zu einem einfachen zweidimensionalen Rechteck währenddessen Abbildung 62 das Ergebnis in der komplexen dreidimensionalen Struktur aufzeigt. Hierbei wird der Pfad der Medialachse durch Kügelchen visualisiert, die den Durchmesser der Poren durch die entsprechenden lokalen Farben aufzeigen.

#### 5.3 Ergebnisse und Diskussion

Die physikalische Charakterisierung der Porosität und der spezifischen Oberfläche werden durch Wiegen der trockenen und wasserbenetzten Membran und Messen der BET-Stickstoffadsorption durchgeführt (Abschnitt 3.2.3).

Im Gegensatz zu diesen Methoden bietet die hier vorgestellte CgC die Möglichkeit die Membraneigenschaften global oder lokal auf der Mikrometerskala und in Bezug auf jede Achse der Membran zu berechnen (Abbildung 63).

Die aus der CgC bestimmte Gesamtporosität der Membran stimmt, aufgrund des Referenzierens des *thresholds* über die experimentell bestimmte Porosität (Abbildung 56), wie zu erwarten gut mit den experimentellen Messungen überein (Tabelle 7). Die lokale Bestimmung über die z-Achse zeigt, dass die Membran eine homogene Porosität über der z-Achse aufweist. Der beobachtete Anstieg am oberen bzw. unteren Rand der Membran ist vermutlich auf die Unebenheit der Membranoberfläche zurückzuführen (Abbildung 63). Die lokale Bestimmung der spezifischen Oberfläche durch die CgC zeigt das erwartete antiproportionale Verhalten gegenüber der lokalen Porosität.

Tabelle 7: Experimentell und über CgC bestimmte Charakteristika der untersuchten Membran, Porositätsbestimmung (PB), spezifische Oberfläche (BET), Wasser (ROW) Permeabilitätsmessungen (WPM), Kapillarfluss Porometrie (KFP) und computergestützte Charakterisierung (CgC).<sup>1</sup>

Eigenschaft	PD	BET	WPM	KFP	CgC
Porosität [-]	$0,82\pm0,02$	/	/	/	0,79±0,02
spezifische Oberfläche [m <sup>2</sup> /mL]	/	0,69±0,09	/	/	0,27±0,02
Permeabilität (ROW) $[x10^{-13}m^2]$	/	/	9,92±0,96	/	9,41±1,22
mittlere Porengröße [µm]	/	/	/	3,05±0,09	3,74±0,19

Es ist deutlich zu erkennen, dass die untersuchte makroporöse Membran keinen signifikanten Gradienten hinsichtlich der Porosität und der spezifischen Oberfläche über die Dicke der Membran aufweist. Dies kann durch herkömmliche Porositätsbestimmung oder die BET-Analyse nicht gezeigt werden. Der absolute Wert für die, durch CgC bestimmte, spezifische Oberfläche ist jedoch signifikant kleiner als jene aus den Stickstoffadsorptionsversuchen (Tabelle 7). Eine Erklärung ist, dass die Auflösung der Bilder durch CLSM nicht hoch genug ist, um die Oberflächenrauigkeit auf molekularer Ebene. wie in Stickstoffadsorptionsexperimenten, darzustellen. Die Oberflächenrauigkeit hat keinen

signifikanten Einfluss auf Porosität, Wasserpermeabilität und Porengrößenverteilung aus den CgC-Bestimmungen, aber in Bezug auf die spezifische Oberfläche führt es zu einer unterschätzten Oberfläche in der CgC im Vergleich zur BET-Analyse.



Abbildung 63: Porosität und spezifische Oberfläche entlang der z-Achse der untersuchten Membran im Vergleich zu einer REM Querschnitts Aufnahme (155  $\mu$ m Höhe x 165  $\mu$ m Breite) des selben Stanzlings.<sup>1</sup>

Die Wasserpermeabilitätssimulationen werden mit einer Auflösung von 48 nm Voxelkantenlänge durchgeführt (Abbildung 60). Die Permeabilität aus der CgC, in Tabelle 7 angegeben, stimmt sehr gut mit den experimentell bestimmten Werten überein. Die quantifizierte Wasserpermeabilität bestätigt somit die dreidimensionale Morphologie sowie die ermittelten Strukturmerkmale. Die Porengrößenverteilung wird an den gleichen fünf Rekonstruktionen bestimmt, welche auch für die Simulationen der Permeabilität verwendet werden. Um eine bessere Vergleichbarkeit der hier dargestellten Ergebnisse zu gewährleisten, sind in Abbildung 63, Abbildung 64 und Abbildung 65 die exemplarischen Ergebnisse desselben Membranstanzlings gezeigt.

In Abbildung 64 ist die aus der CgC bestimmte Porengrößenverteilung relativ und kumulativ dargestellt. Die mittlere Porengröße der Membranrekonstruktion wird zu 3,59 µm bestimmt. Eine Normalverteilung spiegelt die Ergebnisse für die relative Porengrößenverteilung gut wider.



Abbildung 64: Relative und kummulative Porengrößenverteilung (PGV) aus der CgC, die hieraus bestimmte mittlere Porengröße beträgt  $3,59 \,\mu\text{m.}^1$ 



Abbildung 65: Vergleich der bestimmten Porengrößenverteilungen (PGV) über die CgC und der experimentell bestimmten PGV aus der Kapillarfluss (KF) Porometrie.<sup>1</sup>

Als mittlere Porengröße wird hierbei der Massenschwerpunkt der Normalverteilung angegeben. Dies zeigt, dass die Porengrößen symmetrisch um die mittlere Porengröße verteilt sind.

Ein Vergleich der, über die Normalverteilung angepassten, Verteilung aus der CgC und der experimentellen Porengrößenverteilung aus der Kapillarfluss Porometrie zeigt, dass die experimentell beobachtete mittlere Porengröße der Membran kleiner ist als die CgC-Daten (Tabelle 7). Die experimentellen Ergebnisse zeigen weiterhin eine schmalere Porengrößenverteilung im Vergleich zur CgC-Analyse.

## 5.4 Zusammenfassung Kapitel III – 3D Membranstrukturanalyse mittels CLSM

Die vorgestellte computergestützte Charakterisierung (CgC) wird erfolgreich zur Charakterisierung einer makroporösen Nitrozellulose Diagnostikmembran eingesetzt. Typische Membranstruktureigenschaften wie die Porosität, die spezifische Oberfläche und die Porengrößenverteilung werden in Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen bestimmt, welche durch üblicherweise genutzte Membrancharakterisierungsverfahren erhalten werden.

Zusätzlich wird die Permeabilität mit einem Stokes Ansatz simuliert, um die dreidimensionalen Rekonstruktionen weiter zu evaluieren. Diese Ergebnisse stimmen gut mit experimentellen Messungen überein. Die vorgestellte Methode ist in der Lage, Ergebnisse mit gängigen Techniken zu reproduzieren und darüber hinaus graduelle Veränderungen der Porosität und der Membranstruktur mit einer lokalen Parameteranalyse entlang der z-Achse (Abbildung 63) zu quantifizieren.

Dieser neue Ansatz, welcher experimentelle und computergestützte Methoden miteinander kombiniert, ermöglicht eine quantitative Bewertung der Heterogenitäten einer makroporösen Membranstruktur. Zukünftig können Untersuchungen mittels CgC verwendet werden, um für spezifische Membrantypen den *shape* Faktor für die Kapillarfluss Porometrie zu bestimmen. Dies würde eine dreidimensionale Betrachtung der Form einer Pore in einer Membran ermöglichen anstelle der heutzutage üblichen zweidimensionalen Betrachtung einer Pore.<sup>110,162</sup>

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Entwicklung nicht partikulärer chromatographischer Medien mithilfe von Matrix gestützten Polymernetzwerken ist ein vielversprechender Ansatz das, zu Beginn angesprochene, *Downstream bottleneck* zu überwinden. In dieser Arbeit werden zwei unterschiedliche Techniken zur Herstellung nicht partikulärer chromatographischer Medien untersucht, um die angestrebte Leistungssteigerung chromatographischer Medien im *product capture* Schritt zu erreichen. Zum einen die Modifizierung vernetzer Zellulosemembranen mit Methacrylat basierten Polymernetzwerken, wobei die Membran selbst als Stützmatrix dient und zum anderen die Herstellung von Agarose Membranadsorbern, bei denen die Agarose ein Polysaccharid basiertes Polymernetzwerk ausbildet und ein in die *template* Membran integral eingebrachtes Vlies als Stützmatrix dient.

In beiden Fällen kann eine deutliche Leistungssteigerung ( $L_0$  und  $L_C$ ; Gleichung 6 und 7) gegenüber kommerziellen Membranadsorbern festgestellt werden (Abbildung 54, Tabelle 5). Im Fall der Agarose Membranadsorber kann sogar eine deutliche Steigerung der Produktivität (in  $g_{mAb}/h$  um den Faktor 6,9) anhand eines modellhaft beschriebenen *product capture* Schrittes, gegenüber eines kommerziellen chromatographischen Mediums, aus porösen Partikeln, gezeigt werden. Zusätzlich eignen sich beide, in Kapitel I und II hergestellten, Prototypen als *plug-play* und *single-use* Produkt. Diese könnten somit direkt nach Anlieferung genutzt und nach Nutzung entsorgt werden, um arbeits- und kostenintensive Reinigungs- bzw. Validierungsschritte im *product capture* Schritt zu vermeiden.

In Kapitel III wird eine Methode zur Charakterisierung makroporöser Polymermembranen anhand einer Nitrozellulose basierten Modellmembran vorgestellt. Diese ist in der Lage, über dreidimensionale Rekonstruktionen aus der CLSM, die Struktur der Membran auch lokal zu beschreiben und somit neue Möglichkeiten in der vollumfänglichen Betrachtung und dem damit einhergehenden Prozessverständnis für makroporöse Polymermembranen im Allgemeinen bietet. Die direkte Übertragung der entwickelten Methode auf andere Membrantypen wird anhand der Agarose Membranen gezeigt. Dies ist von besonderer Bedeutung, da Agarose basierte Polymernetzwerke im trockenen Zustand nicht stabil sind und eine Charakterisierung mit herkömmlichen Methoden somit nicht zielführend ist. Durch die Toleranz der CLSM für jegliche Lösungsmittel kann die Agarose Membran somit auch im ROW benetzten (nassen) Zustand vermessen und charakterisiert werden.

121

Mithilfe der hier entwickelten Methoden aus Kapitel I ist eine Funktionalisierung einer Membranoberfläche zukünftig sehr leicht zugänglich. In Einzelversuchen, auf welche in dieser Arbeit nicht eingegangen wird, kann gezeigt werden, dass auch Membranen und Vliese aus anderen Materialien wie z.B. Polyethersulfon, Nylon, Zellulosenitrat, Zelluloseacetat und Polyethylenterephthalat mithilfe dieser Methode funktionalisiert werden können. Zusätzlich kann die spezifische Oberfläche erhöht werden, ohne die Permeabilität der Membran stark abzusenken.

Die in Kapitel II vorgestellte Methode zur Herstellung von Agarose Membranadsorbern zeigt in Bezug auf ihre Bindungskapazitäten und Permeabilität herausragende Leistungswerte. Mit weiterer Forschung an solchen Materialen, insbesondere im Hinblick auf ihre großtechnische Produktion, könnte eine völlig neue Art chromatographischer Affinitätsmedien den *Downstream* Prozess revolutionieren und das *Downstream bottneneck*, zumindest teilweise, beheben.

Mithilfe der in Kapitel III beschriebenen Methode könnten *template* Membranen in Zukunft direkt auf ihre *performance* als Agarose Membran bewertet werden und eine Entwicklung neuer *template* Membranen mit vorteilhaften Eigenschaften für die Agarose Membran weiter vorantreiben. So wäre eine weitere Steigerung der Permeabilität, über die Steigerung der Stegdicke der *template* Membrane, möglich.

Die in Kapitel III beschriebene Methode eignet sich darüber hinaus auch für Membranen anderer Applikationen, wie der Chromatographie oder *lateral flow* Tests. So ist auch eine Anwendung dieser Methode für die Filtration und eine lokale Verortung von Ablagerungen der Filtrationsmembranen denkbar. Zusätzlich ist auch hier keine Einschränkung bei den verwendeten Materialien zu erkennen, da lediglich ein Lösungsmittel mit dem Brechungsindex des Membranmaterials und eine Möglichkeit zur Immobilisierung von Fluorophoren benötigt werden.

# 7. Abkürzungsverzeichnis

BCA	bicinchoninic acid
BET	Brunauer-Emmet-Teller
bzw.	beziehungsweise
CgC	computergestützte Charakterisierung
CIP	cleaning in place
CLSM	confocal-laser-scanning microscopy
CPU	central processing unit
Cu(I)Cl	Kupfer(I)Chlorid
DBC <sub>10%</sub>	dynamic binding capacity at 10 % breakthrough
DBC100%	dynamic binding capacity at 100 % breakthrough
DCM	Dichlormethan
D <sub>H</sub>	Hydrodynamischer Durchmesser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOE	design of experiment
EDMA	Ethylenglycoldimethacrylat
GMA	Glycidylmethacrylat
HCl	Salzsäure
НСР	host-cell proteins
HIC	hydrophobic-interaction chromatography
HPLC	high performance liquid chromatography
IEX	ion-exchange

IgG	Immunglobulin G
i-SEC	inverse size exclusion chromatography
KFP	Kapillarfluss-Porometrie
KPI	Kaliumphosphat
LD-PE	low-density polyethylen
LM	Lösungsmittel
MA	Medialachse
mAb`s	monoclonal antibodys
PBS	phosphate buffered saline
PD	porosity determination
PGV	Porengrößenverteilung
PIPS	polymerization induced phase separation
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
ROW	reverse-osmosis water
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RVE	repräsentatives Volumenelement
SBC	static binding capacity
SDF	signed distance function
SEM	scanning electron microscopy
STED	stimulated emission depletion microscopy
ТСЕР	Tris(2-carboxyethyl)phosphin

124

### u.a. unter anderem

UV Ultraviolett

Vis visible

WPM Wasser Permeabilitätsmessungen

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In Abschnitt 3 genutzte Chemikalien mit Hersteller und CAS-Nummer
Tabelle 2: Experimentelle Bedingungen für die Modifizierung und Immobilisierung und
Ergebnisse zweier äquivalenter modifizierter Membranen mit der bestmöglichen
Immobilisierung für die Liganden rsPA50 und ProteinA76
Tabelle 3: In Kapitel II genutzte Chemikalien mit Hersteller und CAS-Nummer.       82
Tabelle 4: Experimentell und über CgC bestimmte Charakteristika der template und Agarose
Membran91
Tabelle 5: Modellhafter product capture Schritt in einem Downstream Prozess eines
monoklonalen Antikörpers mit einem kommerziellen chromatographischen Medium aus
porösen Partikeln und den Prototypen aus Kapitel I und Kapitel II.
Tabelle 6: In Kapitel III genutzte Chemikalien mit Hersteller und CAS-Nummer106
Tabelle 7: Experimentell und über CgC bestimmte Charakteristika der untersuchten Membran,
Porositätsbestimmung (PB), spezifische Oberfläche (BET), Wasser (ROW)
Permeabilitätsmessungen (WPM), Kapillarfluss Porometrie (KFP) und computergestützte
Charakterisierung (CgC). <sup>1</sup>
Tabelle 8: Versuchsbedingungen und Messdaten zu Abschnitt 3.3.2.    145
Tabelle 9: Zusammensetzung der Polymerisationlösungen zu Abschnitt 3.3.2
Tabelle 10: Zusammensetzung der Polymerisationlösungen zu Abschnitt 3.3.3
Tabelle 11: Messdaten zu Abschnitt 3.3.3    148
Tabelle 12: Genutzte Lösemittel und ihre Hansen-Solubility Parameter $\delta_{D, \delta_P}$ und $\delta_H$ aus
Abschnitt 3.3.4. <sup>138</sup>

## 9. Schemataverzeichnis

Schema 1: Schematisc	he Darstellung der stattfind	lend	en und mö	gliche	en Teilreaktionen mit den
dazugehörigen Gescl	windigkeitskoeffizienten	$\mathbf{k}_{\mathbf{i}}$	während	der	Fällungspolymerisation,
adaptiert nach Medina	-Castillo <sup>136</sup>	•••••			
Schema 2:Schematisc	he Darstellung der konver	ntion	ellen radil	caliscl	nen Polymerisation nach
UV-Initiierung. M =	Monomer, $R_{1/2} = Radikal$	, Pn	= Präpoly	mer l	ozw. Makroradikal, V =
Vernetzer					
Schema 3: Schematis	che Darstellung beider in	dies	ser Arbeit	genut	zten Reaktionswege zur
immobilisierung der P	rotein Liganden rsPA50 (a	l) un	d ProteinA	(b)	43

# 10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:Schematische Darstellung der Grundoperationen zur Produktion monoklonaler
Antikörper (mAb`s). <sup>20</sup>
Abbildung 2: Schematischer Vergleich des Massentransports am Beispiel konventioneller
poröser Partikel und Membranadsorbern. <sup>45</sup> 5
Abbildung 3: Rasterelektronenmikroskopaufnahmen einer Membranoberfläche (links) sowie
die Oberfläche eines porösen Partikels (rechts); 550xVergrößerung6
Abbildung 4: Schematische Darstellung von immobilisierten Polymerketten mit inhärenten
Bindungsstellen am Beispiel kationischer Bindungsstellen auf der Oberfläche eines
Membranadsorbers7
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Immobilisierung einer Polymerkette auf einer
Oberfläche. <sup>56</sup>
Abbildung 6: Gegenüberstellung der Wechselwirkungen in der hydrophoben
Interaktionschromatographie (HIC), der Ionenaustauschchromatographie (IEX) und der
Affinitätschromatographie13
Abbildung 7: Gegenüberstellung der Transportprozesse in Gelpartikeln und Membranen und
Auftragung der dynamischen Bindungskapazität gegen den Fluss von Säulen mit porösen
Partikeln und Membranadsorbern15
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Verlaufs einer Durchbruchskurve eines
Membranadsorbers. Die rot markierte Fläche stellt die dynamische Kapazität bei 10% des
Durchbruchs (DBC <sub>10%</sub> ) dar. Die gepunktete Fläche die dynamische Kapazität bei 100 % des
Durchbruchs (DBC <sub>100%</sub> ). <sup>95</sup> 16
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Affinitätschromatographie. <sup>100</sup>
Abbildung 10: Schematische Darstellung eines Mechanismus zur konventionellen
radikalischen Polymerisation, dargestellt sind die einzelnen Reaktionsschritte und die
zugehörigen Geschwindigkeitskoeffizienten k <sub>i</sub> . <sup>90</sup> 23
Abbildung 11: Schematischer Ablauf für die Herstellung von Monolithsäulen. <sup>122</sup> 24
Abbildung 12: Beispielhafte REM Aufnahmen zweier monolitischer Strukturen auf
Matrixoberflächen bei 60000-facher Vergrößerung. Zusammensetzung entsprechend Versuch
4 (links) und Versuch 8 (rechts) in Tabelle 10 (Anhang 12.2)

Abbildung 13: Beispielhafte REM Aufnahmen von monolitischen Strukturen auf Matrixoberflächen bei 6000 facher Vergrößerung. Zusammensetzung entsprechend Versuch 23 in Tabelle 9 (Anhang 12.1). Lösungsmittel 1-Decanol und Cyclohexanol (100 v% Abbildung 16: Beispielhafte Auftragung der Permeabilität und der spezifischen Oberfläche Abbildung 17: trade-off Kurve (schwarz) zwischen der Permeabilität und der spezifischen Oberfläche der Modellmembran aus Abbildung 16 und gewünschte Verschiebung der Abbildung 18: Hauptkomponenten einer typischen Polymerisationslösung; das Monomer UV-Initiator 2-Hydroxy-4-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenon, GMA, der der Vernetzer EDMA, das Lösungsmittel 1-Decanol und das Lösungsmittel Cyclohexanol......41 Abbildung 19:Kalibriergeraden des BCA-Tests für rsPA50, Tyramin und ProteinA......47 Abbildung 20: Beispielhafte Darstellung eines *central-coposite-face design* Versuchsraums. Abbildung 21: Strukturformel des in diesem Kapitel genutzten Fluorophors Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 Abbildung 22: Schematische Darstellung einer Pore der beschriebenen Modellmembran vor und nach der Modifizierung mit oberflächlich immobilisierten globulären Strukturen.......55 Abbildung 23: Auftragung der Permeabilität gegen die spezifische Oberfläche (trade-off; A); der Permeabilität bzw. der spezifischen Oberfläche gegen den Porenradius (B), der Leistung Abbildung 24: Auftragung der Permeabilität (A), der Leistung (B) und des Pfropfgrades (C) gegen den volumetrischen Anteil an Monomer und Vernetzer; Auftragung des Pfropfgrades gegen die Permeabilität (D). Markierte Bereiche entsprechen dem Bereich mit der maximalen Abbildung 25:REM Aufnahmen von modifizierten Membranen mit 0 v% (Ausgangsmaterial;A), 34 v% (B) und 8,8 v% (C, D)......58 Abbildung 26: REM Aufnahmen mit einer Vergrößerung von 60000x mit variierenden Konzentrationen an Monomer und Vernetzer bei einer Initiatorkonzentration von 0,04 mol/L. 

Abbildung 27: REM Aufnahmen mit einer Vergrößerung von 60000x mit variierenden Konzentrationen an Monomer und Vernetzer bei einer Initiatorkonzentration von 0,004 mol/L. Abbildung 28: Auftragung des durchschnittlichen Durchmessers der globulären Strukturen zu Abbildung 29: Auftragung des Pfropfgrades gegen die Konzentration an Monomer, Vernetzer Abbildung 30: Auftragung der Leistung gegen den Durchmesser der globulären Strukturen (A), den Pfropfgrad (B), die Monomerkonzentration (C) und die Vernetzerkonzentration (D).....63 Abbildung 31: Auftragung der dynamischen Bindungskapazität bei 10% und 100% gegen die spezifische Oberfläche der modifizierten Membranen nach Immobilisierung von rsPA50 nach Abbildung 32: 3D Auftragung der Hansen-Parameter  $\delta_{\rm H}$ ,  $\delta_{\rm D}$  und  $\delta_{\rm P}$  gegeneinander für Abbildung 33: Auftragungen des Pfropfgrades (A), dem durchschnittlichen Durchmesser der globulären Strukturen (B), der prozentualen Zunahme der Oberfläche (C) und der prozentualen Abbildung 34: REM Aufnahmen der Proben mit  $\delta_{\rm H}$ =13,5 (A) und  $\delta_{\rm H}$ = 22,3 (B). .....67 Abbildung 35: Auftragung der sp. Oberfläche nach Modifizierung (A), der prozentualen Zunahme der sp. Oberfläche nach Modifizierung (B), dem Pfropfgrad (C) und dem Durchmesser der Pore des Ausgangsmaterials (D) gegen die sp. Oberfläche des Abbildung 36: Auftragung der Porosität des Ausgangsmaterials (A), der Transmission des Ausgangsmaterials bei 256 nm (B) gegen den Pfropfgrad der modifizierten Membran......70 Abbildung 37: Auftragung der Aldehydkonzentration gegen die prozentual eingesetzte Menge an NaIO<sub>4</sub> (A), Auftragung der dynamischen Bindungskapazität bei DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>100%</sub> (B), der Ausnutzung der Liganden bei DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>100%</sub> (C) und der Anbindung bzw. der Abbildung 38: Auftragung DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>100%</sub> sowie die Anbindung (A), der Ausnutzung der Liganden bei DBC10% und DBC100% (B) gegen den eingesetzten pH Wert und DBC10% und DBC<sub>100%</sub> sowie der Anbindung (C), der Ausnutzung der Liganden bei DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>100%</sub> (D) gegen die Konzentration an *rsPA50*.....72 Abbildung 39: Auftragung der dynamischen Bindungskapazitäten DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>100%</sub> sowie der Konzentration an immobilisiertem ProteinA (A), der Ausnutzung der Liganden bei DBC10%

und DBC<sub>100%</sub> (B) gegen die Reaktionszeit und den dynamischen Bindungskapazitäten DBC<sub>10%</sub> und DBC100% sowie der Konzentration an immobilisiertem ProteinA (C), der Ausnutzung der Liganden bei DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>100%</sub> (D) gegen die Konzentration an *ProteinA*......74 Abbildung 40: Auftragung der dynamischen Bindungskapazitäten DBC<sub>10%</sub> und DBC<sub>100%</sub> sowie der Konzentration an immobilisiertem ProteinA (A), der Ausnutzung der Liganden bei DBC<sub>10%</sub> Abbildung 41: STED-Aufnahmen einer beispielhaft modifizierten Membran mit immobilisierten rsPA50; Fluorophor auf rsPA50 nach Abschnitt 3.2.3; Auftragung der Abbildung 42: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Querschnitts (links) und der Aufsicht (rechts), der in diesem Kapitel verwendeten vliesgestützten Zelluloseacetatmembran Abbildung 46: Beispielhafte Darstellung der dreidimensionalen Struktur der template Membran (links) sowie deren Negativ, das die Agarose Membran darstellt (rechts). ......90 Abbildung 47: Rasterelektronemikroskopische Aufnahme der Aufsicht der template Membran (links) und CLSM-Aufnahme der daraus hergestellten Agarose Membran (rechts) bei gleicher Abbildung 48: Porengrößenverteilungen (PGV) der Agarose- und der template Membran...91 Abbildung 49: Auftragung der DBC<sub>10%</sub>, der statischen Bindungskapazität (SBC), der statischen Ausnutzung, der Ligandendichte an ProteinA in mg/mL (A) und µmol/mL (B) und der Abbildung 50:Auftragung der DBC<sub>10%</sub>, der statischen Bindungskapazität, der Ligandendichte an ProteinA, der Epoxiddichte und der statischen Ausnutzung gegen die Reaktionszeit. ......94 Abbildung 51: Auftragung der Bindungskapazitäten (DBC<sub>10%</sub> und SBC) sowie der jeweiligen Ausnutzungen der Liganden gegen die Ligandendichte an ProteinA.......95 Abbildung 52: Auftragung der Zugänglichkeit bzw. der Porosität  $\varepsilon$  gegen den Agaroseanteil im Sol (A) und die Konzentration an NaCl im Sol bei 4 % Agaroseanteil (B)......97 Abbildung 53: Auftragung der Bindungskapazitäten DBC<sub>10%</sub> und SBC sowie der Konzentration an immobilisierten ProteinA gegen die Zugänglichkeit für die Dextranderivate mit 500 Kg/mol bzw. 2000 Kg/mol......97

Abbildung 54: Auftragung der DBC10% verschiedener kommerzieller Protein A
Affinitätsmedien gegen die Verweilzeit innerhalb des chromatographischen Mediums99
Abbildung 55: REM Aufnahme der in diesem Kapitel verwendeten Membran Unisart©140. <sup>1</sup>
Abbildung 56: Bestimmung des oberen threshold Wertes über den Vergleich der Porositäten
aus der computergestützten Charakterisierung und dem experimentell gemessenen Wert. <sup>1</sup> .108
Abbildung 57: Beispielhafte Bildbearbeitung für die dreidimensionale Rekonstruktion aus
CLSM Bildstapeln. <sup>1</sup> 109
Abbildung 58: Bestimmung des repräsentativen Volumenelements (RVE); Das RVE ist bei
einer Kantenlänge von 14,4 µm erreicht. <sup>1</sup>
Abbildung 59: Beispielhafte Fluss-Simulation in Durchflussrichtung (z-Ebene). <sup>1</sup> 112
Abbildung 60: Bestimmung der minimalen Voxelgröße der untersuchten Membranstruktur. <sup>1</sup>
Abbildung 61: Schematische Darstellung des Prozesses für die CgC Bestimmung der
Porengrößenverteilung einer Domäne $\Omega$ mit der Oberfläche $\delta_S \Omega$ . Bestimmung der Medialachse
(a), Lösung der SDF (b), Filtern der SDF mit der Medialachse (c). <sup>1</sup>
Abbildung 62: Illustration der SDF mit überlagerter Medialachse und angaben der lokalen
Porendurchmesser eines Beispielhaften Auschnitts einer dreidimensionalen Rekonstruktion
Porendurchmesser eines Beispielhaften Auschnitts einer dreidimensionalen Rekonstruktion aus den CLSM Messungen. <sup>1</sup>
Porendurchmesser eines Beispielhaften Auschnitts einer dreidimensionalen Rekonstruktion aus den CLSM Messungen. <sup>1</sup>
Porendurchmesser eines Beispielhaften Auschnitts einer dreidimensionalen Rekonstruktion aus den CLSM Messungen. <sup>1</sup>
Porendurchmesser eines Beispielhaften Auschnitts einer dreidimensionalen Rekonstruktion aus den CLSM Messungen. <sup>1</sup>
Porendurchmesser eines Beispielhaften Auschnitts einer dreidimensionalen Rekonstruktion aus den CLSM Messungen. <sup>1</sup>
Porendurchmesser eines Beispielhaften Auschnitts einer dreidimensionalen Rekonstruktion aus den CLSM Messungen. <sup>1</sup>
Porendurchmesser eines Beispielhaften Auschnitts einer dreidimensionalen Rekonstruktion aus den CLSM Messungen. <sup>1</sup>
### 11. Literaturverzeichnis

- (1) Ley, A.; Altschuh, P.; Thom, V.; Selzer, M.; Nestler, B.; Vana, P. Characterization of a Macro Porous Polymer Membrane at Micron-Scale by Confocal-Laser-Scanning Microscopy and 3D Image Analysis. *J. Memb. Sci.* **2018**.
- (2) Ley, A.; Taft, F.; Schwellenbach, J.; Villain, L. Chromatographiemedium Mit Gebundenen Mikroglobuli Und Verfahren Zu Dessen Herstellung. DE20171000631 20170124, 2018.
- (3) Hötzer, J.; Reiter, A.; Hierl, H.; Steinmetz, P.; Selzer, M.; Nestler, B. The Parallel Multi-Physics Phase-Field Framework Pace3D. J. Comput. Sci. 2018.
- (4) Uwe Gottschalk. Downstream Processing of Monoclonal Antibodies: From High Dilution to High Purity. *BioPharm Int.* 2005, *18*, 42–58.
- (5) Uwe Gottschalk. The Future of Downstream Processing. *BioPharm. Int.* 2013, 26.
- (6) M. Holzer. Technologies for Downstream Processing. *BioPharm. Int.* 2011, 24, 48–53.
- (7) Knudsen, H. L.; Fahrner, R. L.; Xu, Y.; Norling, L. A.; Blank, G. S. Membrane Ion-Exchange Chromatography for Process-Scale Antibody Purification. J. Chromatogr. A 2001, 907 (1–2), 145–154.
- (8) Shukla, A. A.; Thömmes, J. Recent Advances in Large-Scale Production of Monoclonal Antibodies and Related Proteins. *Trends Biotechnol.* **2010**, *28* (5), 253–261.
- (9) Kelley, B. Industrialization of MAb Production Technology: The Bioprocessing Industry at a Crossroads. *MAbs* **2009**, *1* (5), 440–449.
- (10) Chon, J. H.; Zarbis-Papastoitsis, G. Advances in the Production and Downstream Processing of Antibodies. *N. Biotechnol.* **2011**, *28* (5), 458–463.
- (11) Kelley, B. Very Large Scale Monoclonal Antibody Purification: The Case for Conventional Unit Operations. *Biotechnol. Prog.* **2007**, *23* (5), 995–1008.
- (12) Li, F.; Vijayasankaran, N.; Shen, A.; Kiss, R.; Amanullah, A. Cell Culture Processes for Monoclonal Antibody Production. *MAbs* **2010**, *2* (5), 466–479.
- (13) Jain, E.; Kumar, A. Upstream Processes in Antibody Production: Evaluation of Critical Parameters. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26* (1), 46–72.
- Butler, M.; Meneses-Acosta, A. Recent Advances in Technology Supporting Biopharmaceutical Production from Mammalian Cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 96 (4), 885–894.
- (15) Gronemeyer, P.; Ditz, R.; Strube, J. Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. *Bioengineering* **2014**, *1* (4), 188–212.
- (16) Curling, J.; Gottschalk, U. Process Chromatography: Five Decades of Innovation. *BioPharm Int.* **2007**, *20* (10), 70–94.

- (17) Freitag, R. Chromatographic Techniques in the Downstream Processing of Proteins in Biotechnology. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1104*, 419–458.
- (18) Roque, A. C. A.; Lowe, C. R. Antibodies and Genetically Engineered Related Molecules: Production and Purification - Roque - 2008 - Biotechnology Progress - Wiley Online Library. *Biotechnol. Prog.* 2004.
- (19) Hallgren, E.; Kálmán, F.; Farnan, D.; Horváth, C.; Ståhlberg, J. Protein Retention in Ion-Exchange Chromatography: Effect of Net Charge and Charge Distribution. J. Chromatogr. A 2000, 877 (1–2), 13–24.
- (20) Sommerfeld, S.; Strube, J. Challenges in Biotechnology Production Generic Processes and Process Optimization for Monoclonal Antibodies. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **2005**, *44* (10), 1123–1137.
- (21) G. Walsh. *Pharmaceutical Biotechnology*; Wiley: Chichester, 2007.
- (22) Zhou, J. X.; Tressel, T.; Yang, X.; Seewoester, T. Implementation of Advanced Technologies in Commercial Monoclonal Antibody Production. *Biotechnol. J.* 2008, 3 (9–10), 1185–1200.
- (23) Walton, H. F. Ion-Exchange Chromatography. J. Chromatogr. Libr. 1992, 51.
- (24) Gustavsson, P. E.; Mosbach, K.; Nilsson, K.; Larsson, P. O. Superporous Agarose as an Affinity Chromatography Support. J. Chromatogr. A **1997**, 776 (2), 197–203.
- (25) Cuatrecasas, P. Protein Purification by Affinity Chromatography. Derivatizations of Agarose and Polyacrylamide Beads. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245* (12), 3059–3065.
- (26) Weston, P. D.; Scorer, R. Comparison of Sepharose and Cellulose as a Support for Antibody and Antigen. In *Affinity Chromatography*; 1978; pp 207–210.
- (27) Filbert, A. M.; Hak, M. L. Glass Beads as a Chromatographic Support Material. J. *Chromatogr. Sci.* **1968**, *6* (3), 150–152.
- (28) Staby, A.; Jensen, I. H. Comparison of Chromatographic Ion-Exchange Resins II. More Strong Anion-Exchange Resins. J. Chromatogr. A **2001**, 908 (1–2), 149–161.
- (29) Staby, A.; Jensen, I. H.; Mollerup, I. Comparison of Chromatographic Ion-Exchange Resins. J. Chromatogr. A 2000, 897 (1–2), 99–111.
- (30) Staby, A.; Jacobsen, J. H.; Hansen, R. G.; Bruus, U. K.; Jensen, I. H. Comparison of Chromatographic Ion-Exchange Resins. V. Strong and Weak Cation-Exchange Resins. *J. Chromatogr. A* 2006, *1118* (2), 168–179.
- (31) Staby, A.; Jensen, R. H.; Bensch, M.; Hubbuch, J.; Dünweber, D. L.; Krarup, J.; Nielsen, J.; Lund, M.; Kidal, S.; Hansen, T. B.; et al. Comparison of Chromatographic Ion-Exchange Resins. VI. Weak Anion-Exchange Resins. J. Chromatogr. A 2007, 1164 (1–2), 82–94.
- (32) A. Allegrezza, T. Ireland, W. Kools, M. Philips, B. Raghunath, R. Wilkins, A. X. *Membranes for Life Science*; Wiley-VCH: Weinheim, 2008; Vol. 1.
- (33) Potter, O. G.; Hilder, E. F. Porous Polymer Monoliths for Extraction: Diverse

Applications and Platforms. J. Sep. Sci. 2008, 31 (11), 1881–1906.

- (34) Urban, J.; Jandera, P. Polymethacrylate Monolithic Columns for Capillary Liquid Chromatography. J. Sep. Sci. 2008, 31 (14), 2521–2540.
- (35) Liu, H. F.; Ma, J.; Winter, C.; Bayer, R. Recovery and Purification Process Development for Monoclonal Antibody Production. *MAbs* **2010**, *2* (5), 480–499.
- (36) Hober, S.; Nord, K.; Linhult, M. Protein A Chromatography for Antibody Purification. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *848* (1), 40–47.
- (37) Müller, E.; Vajda, J. Routes to Improve Binding Capacities of Affinity Resins Demonstrated for Protein A Chromatography. J. Chromatogr. B 2016, 1–10.
- (38) Shukla, A. A.; Hinckley, P. Host Cell Protein Clearance during Protein a Chromatography: Development of an Improved Column Wash Step. *Biotechnol. Prog.* 2008, 24 (5), 1115–1121.
- (39) Tarrant, R. D. R.; Velez-Suberbie, M. L.; Tait, A. S.; Smales, C. M.; Bracewell, D. G. Host Cell Protein Adsorption Characteristics during Protein a Chromatography. *Biotechnol. Prog.* 2012, 28 (4), 1037–1044.
- (40) Low, D.; O'Leary, R.; Pujar, N. S. Future of Antibody Purification. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2007, 848 (1), 48–63.
- (41) Scopes, R. K. Protein Purification : Principles and Practice; Springer, 1994; Vol. 2.
- (42) Boi, C. Membrane Adsorbers as Purification Tools for Monoclonal Antibody Purification. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2007, 848 (1), 19–27.
- (43) Woo, M.; Khan, N. Z.; Royce, J.; Mehta, U.; Gagnon, B.; Ramaswamy, S.; Soice, N.; Morelli, M.; Cheng, K. S. A Novel Primary Amine-Based Anion Exchange Membrane Adsorber. J. Chromatogr. A 2011, 1218 (32), 5386–5392.
- (44) Gavara, P. R.; Cabrera, R.; Vennapusa, R. R.; Grasselli, M.; Fernandez-Lahore, M. Preparation, Characterization, and Process Performance of Composite Fibrous Adsorbents as Cation Exchangers for High Throughput and High Capacity Bioseparations. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2012, 903, 14–22.
- (45) Fraud, N.; Faber, R.; Kiss, C.; Demmer, W. Hydrophobic-Interaction Membrane Chromatography for Large-Scale Purification of Biopharmaceuticals. *Bioprocess Int.* 2009, 2001 (June), 30–35.
- (46) Ghosh, R. Protein Separation Using Membrane Chromatography: Opportunities and Challenges. J. Chromatogr. A 2002, 952 (1–2), 13–27.
- (47) Charcosset, C. Review Puriücation of Proteins b y Membrane Chromatograph Y. J. *Chem. Technol. Biotechnol.* **1998**, *71*, 95–110.
- (48) Jungbauer, A. Chromatographic Media for Bioseparation. J. Chromatogr. A **2005**, 1065 (1), 3–12.
- (49) Hahn, R.; Panzer, M.; Hansen, E.; Mollerup, J.; Jungbauer, A. Mass Transfer Properties of Monoliths. *Sep. Sci. Technol.* **2002**, *37* (7), 1545–1565.

- (50) Jungbauer, A.; Hahn, R. Monoliths for Fast Bioseparation and Bioconversion and Their Applications in Biotechnology. *J. Sep. Sci.* **2004**, *27* (10–11), 767–778.
- (51) S. Rao. Neue Monolithische Trennsäulen Für Die Analyse von Biomolekülen. *BIOspektrum* 2008, 14, 178–180.
- (52) Gebauer, K. H.; Thömmes, J.; Kula, M. R. Breakthrough Performance of High-Capacity Membrane Adsorbers in Protein Chromatography. *Chem. Eng. Sci.* **1996**, *52* (3), 405– 419.
- (53) Sumerlin, B. S.; Tsarevsky, N. V.; Louche, G.; Lee, R. Y.; Matyjaszewski, K. Highly Efficient "Click" Functionalization of Poly(3-Azidopropyl Methacrylate) Prepared by ATRP. *Macromolecules* **2005**, *38* (18), 7540–7545.
- (54) Gao, H.; Matyjaszewski, K. Synthesis of Molecular Brushes by "Grafting onto" Method: Combination of ATRP and Click Reactions. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129 (20), 6633–6639.
- (55) Henze, M.; Mädge, D.; Prucker, O.; Rühe, J. "Grafting through": Mechanistic Aspects of Radical Polymerization Reactions with Surface-Attached Monomers. *Macromolecules* **2014**, *47* (9), 2929–2937.
- (56) Ebeling, B.; Ehlers, F.; Vana, P. Oberflächen Nach Maß. *Nachrichten aus der Chemie* **2014**, *62* (1), 24–28.
- (57) Schwellenbach, J.; Kosiol, P.; Sölter, B.; Taft, F.; Villain, L.; Strube, J. Controlling the Polymer-Nanolayer Architecture on Anion-Exchange Membrane Adsorbers via Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization. *React. Funct. Polym.* 2016, 106, 32–42.
- (58) Schwellenbach, J.; Taft, F.; Villain, L.; Strube, J. Preparation and Characterization of High Capacity, Strong Cation-Exchange Fiber Based Adsorbents. J. Chromatogr. A 2016, 1447, 92–106.
- (59) Moks, T.; Abrahmsén, L.; Nilsson, B.; Hellman, U.; Sjöquist, J.; Uhlén, M. Staphylococcal Protein A Consists of Five IgG-Binding Domains. *Eur. J. Biochem.* 1986, 156 (3), 637–643.
- (60) Charles A Janeway, J.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M. J. Antigen Recognition by B-Cell and T-Cell Receptors. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*; CRC Press: New York, 2001.
- (61) Abi-Ghanem, D. A.; Berghman, L. R. Immunoaffinity Chromatography: A Review. In *Affinity Chromatography*; IntechOpen: Rijeka, 2012.
- Yu, L. L.; Shi, Q. H.; Sun, Y. Effect of Dextran Layer on Protein Uptake to Dextran-Grafted Adsorbents for Ion-Exchange and Mixed-Mode Chromatography. J. Sep. Sci. 2011, 34 (21), 2950–2959.
- (63) Zhao, L.; Zhu, K.; Huang, Y.; Li, Q.; Li, X.; Zhang, R.; Su, Z.; Wang, Q.; Ma, G. Enhanced Binding by Dextran-Grafting to Protein A Affinity Chromatographic Media. *J. Sep. Sci.* 2017, 40 (7), 1493–1499.
- (64) Zhang, K.; Li, Q.; Fan, H.; Li, S.; Su, Y.; Zhao, L.; Huang, Y.; Wang, D.; Zhang, Z.; Su,

Z.; et al. Multi-Layer Dextran-Decorated Poly(Glycidyl Methacrylate)-Co-Divinyl Benzene Copolymer Matrices Enabling Efficient Protein Chromatographic Separation. *React. Funct. Polym.* **2017**, *112*, 45–52.

- (65) Childs, R. F.; Filipe, C.; Gosh, R. Composite Materials Comprising Supported Porous Gels. AB01D1536FI, 2009.
- (66) Childs, R. F.; Filipe, C.; Ghosh, R.; Mika, A. M.; Zhou, J.; Komkova, E. N.; Kim, M. Y.; Dey, T. K. Method for Separating a Substance from a Fluid. US 8652849 B2, 2014.
- (67) Mika, A. M.; Wang, M. S.; Childs, R. F. Stable Composite Material Compromising Supported Porous Gels. US 8133840 B2, 2012.
- (68) Komkova, E. N.; Honeyman, C. H. Mixed-Mode Chromatography Membranes. US 2014/0238935 A1, 2014.
- (69) Jacquemart, R.; Vandersluis, M.; Zhao, M.; Sukhija, K.; Sidhu, N.; Stout, J. A Single-Use Strategy to Enable Manufacturing of Affordable Biologics. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2016, 14, 309–318.
- (70) DePhillips, P.; Lenhoff, A. M. Pore Size Distributions of Cation-Exchange Adsorbents Determined by Inverse Size-Exclusion Chromatography. J. Chromatogr. A 2000, 883 (1-2), 39–54.
- (71) Goto, M.; McCoy, B. J. Inverse Size-Exclusion Chromatography for Distributed Pore and Solute Sizes. *Chem. Eng. Sci.* **2000**, *55* (4), 723–732.
- (72) Ndocko Ndocko, E.; Ditz, R.; Josch, J.-P.; Strube, J. New Material Design Strategy for Chromatographic Separation Steps in Bio-Recovery and Downstream Processing. *Chemie Ing. Tech.* **2011**, *83* (1–2), 113–129.
- (73) Young, T. An Essay on the Cohesion of Fluids. *Philos. Trans. R. Soc. London* **1805**, *95*, 65–87.
- (74) Laplace, P. S.; Courcier, L.; Duprat, J. B. .; Crapelet, C. *Traité de Mécanique Céleste*; de l'Imprimerie de Crapelet, 1798; Vol. 4.
- (75) Agarwal, C.; Pandey, A. K.; Das, S.; Sharma, M. K.; Pattyn, D.; Ares, P.; Goswami, A. Neck-Size Distributions of through-Pores in Polymer Membranes. *J. Memb. Sci.* 2012, 415, 608–615.
- (76) De Bruyne, M. A. A.; De Bruyne, R. J. E.; De Moor, R. J. G. Capillary Flow Porometry to Assess the Seal Provided by Root-End Filling Materials in a Standardized and Reproducible Way. *J. Endod.* **2006**, *32* (3), 206–209.
- (77) Brunauer, S.; Emmett, P. H.; Teller, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60* (2), 309–319.
- (78) Hernández, A.; Calvo, J. I.; Prádanos, P.; Tejerina, F. Pore Size Distributions in Microporous Membranes. A Critical Analysis of the Bubble Point Extended Method. J. Memb. Sci. 1996, 112 (1), 1–12.
- (79) Calvo, J. I.; Hernández, A.; Caruana, G.; Martínez, L. Pore Size Distributions in Microporous Membranes. I. Surface Study of Track-Etched Filters by Image Analysis.

J. Colloid Interface Sci. 1995, 175 (1), 138–150.

- (80) Reichelt, G. Bubble Point Measurements on Large Areas of Microporous Membranes. *J. Memb. Sci.* **1991**, *60* (2), 253–259.
- (81) Marroquin, M.; Bruce, T.; Pellegrino, J.; Wickramasinghe, S. R.; Husson, S. M. Characterization of Asymmetry in Microporous Membranes by Cross-Sectional Confocal Laser Scanning Microscopy. J. Memb. Sci. 2011, 379 (1–2), 504–515.
- (82) Wickramasinghe, S. R.; Carlson, J. O.; Teske, C.; Hubbuch, J.; Ulbricht, M. Characterizing Solute Binding to Macroporous Ion Exchange Membrane Adsorbers Using Confocal Laser Scanning Microscopy. *J. Memb. Sci.* **2006**, *281* (1), 609–618.
- (83) Barbe, S.; Boller, E.; Fáber, R.; Thom, V.; Scheper, T. The Use of X-Ray Microtomography for the Characterization of Macroporous Membranes. 2007.
- (84) Ziel, R.; Haus, A.; Tulke, A. Quantification of the Pore Size Distribution (Porosity Profiles) in Microfiltration Membranes by SEM, TEM and Computer Image Analysis. *J. Memb. Sci.* 2008, 323 (2), 241–246.
- (85) Reingruber, H.; Zankel, A.; Mayrhofer, C.; Poelt, P. Quantitative Characterization of Microfiltration Membranes by 3D Reconstruction. *J. Memb. Sci.* **2011**, *372* (1), 66–74.
- (86) Reingruber, H.; Zankel, A.; Mayrhofer, C.; Poelt, P. A New in Situ Method for the Characterization of Membranes in a Wet State in the Environmental Scanning Electron Microscope. J. Memb. Sci. 2012, 399–400, 86–94.
- (87) Charcosset, C.; Bernengo, J.-C. Comparison of Microporous Membrane Morphologies Using Confocal Scanning Laser Microscopy. *J. Memb. Sci.* **2000**, *168* (1), 53–62.
- (88) Charcosset, C.; Cherfi, A.; Bernengo, J.-C. Characterization of Microporous Membrane Morphology Using Confocal Scanning Laser Microscopy. *Chem. Eng. Sci.* 2000, 55 (22), 5351–5358.
- (89) G. Franz. Polysaccharide; Springer Verlag: Berlin-Heidelberg, 1991.
- (90) B. Thieke. *Makromolekulare Chemie*; Wiley-VCH: Weinheim, 2005.
- (91) Xu, Z.; Wan, L.; Huang, X. Surface Engineering of Polymer Membranes; 2009.
- (92) S. P. Nunes, K.-V. P. *Membrane Technology in the Chemical Industry*, 2nd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2006.
- (93) Whitaker, S. Flow in Porous Media I: A Theoretical Derivation of Darcy's Law. *Transp. Porous Media* **1986**, *1* (1), 3–25.
- (94) Darcy, H. Les Fontaines Publiques de La Ville de Dijon. *Recherche* 1856, 647.
- (95) Sölter, B. M. Pfropfung Funktioneller Monomere Auf Polymermembranen, Georg August Universität Göttingen, Institut für Physikalische Chemie, 2014.
- (96) Yamamoto, S.; Akazaki, N.; Kaltenbrunner, O.; Watler, P. Factors Affecting Dispersion in Expanded Bed Chromatography. *Bioseparation* **1999**, *8* (1–5), 33–41.
- (97) Hejtmánek, V.; Schneider, P. Axial Dispersion under Liquid-Chromatography

Conditions. Chem. Eng. Sci. 1993, 48 (6), 1163–1168.

- (98) Plicka, J.; Svoboda, V.; Kleinmann, I.; Uhlířová, A. Mathematical Modeling of the Peak in Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **1989**, *469* (C), 29–42.
- (99) Bende, H. Affinitäts-Chromatographie. *Chemie unserer Zeit* 1974, 8 (1), 17–25.
- (100) Pfaunmiller, E. L.; Paulemond, M. L.; Dupper, C. M.; Hage, D. S. Affinity Monolith Chromatography: A Review of Principles and Recent Analytical Applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 405 (7), 2133–2145.
- (101) Goding, J. W. Use of Staphylococcal Protein A as an Immunological Reagent. J. Immunol. Methods 1978, 20, 241–253.
- (102) Girot, P.; Moroux, Y.; Duteil, X. P.; Nguyen, C.; Boschetti, E. Composite Affinity Sorbents and Their Cleaning in Place. *J. Chromatogr. A* **1990**, *510* (C), 213–223.
- (103) Wang, L.; Dembecki, J.; Jaffe, N. E.; O'Mara, B. W.; Cai, H.; Sparks, C. N.; Zhang, J.; Laino, S. G.; Russell, R. J.; Wang, M. A Safe, Effective, and Facility Compatible Cleaning in Place Procedure for Affinity Resin in Large-Scale Monoclonal Antibody Purification. J. Chromatogr. A 2013, 1308, 86–95.
- (104) Kruljec, N.; Bratkovič, T. Alternative Affinity Ligands for Immunoglobulins. *Bioconjug. Chem.* **2017**, 28 (8), 2009–2030.
- (105) Arnold, M.; Bittermann, H.; Kalbfuss-Zimmermann, B.; Neumann, T.; Schmidt, K.; Sekul, R.; Hilbrig, F.; Ludolph, H.; Freitag, R. Antibody Purification by Affinity Chromatography Based on Small Molecule Affinity Ligands Identified by SPR-Based Screening of Chemical Microarrays. J. Chromatogr. A 2011, 1218 (29), 4649–4659.
- (106) A. Seidel-Morgenstern. *Mathematische Modellierung Der Präparativen Flüsigkeitschromatographie*; Dt. Univ. Verlag, 1995.
- (107) Tatárová, I.; Fáber, R.; Denoyel, R.; Polakovič, M. Characterization of Pore Structure of a Strong Anion-Exchange Membrane Adsorbent under Different Buffer and Salt Concentration Conditions. J. Chromatogr. A 2009, 1216 (6), 941–947.
- (108) Hagel, L.; Östberg, M.; Andersson, T. Apparent Pore Size Distributions of Chromatography Media. J. Chromatogr. A **1996**, 743 (1), 33–42.
- (109) Yao, Y.; Lenhoff, A. M. Determination of Pore Size Distributions of Porous Chromatographic Adsorbents by Inverse Size-Exclusion Chromatography. J. Chromatogr. A 2004, 1037 (1–2), 273–282.
- (110) Halisch, M.; Vogt, E.; Müller, C.; Pattyn, D.; Hellebaut, P.; Van Der Kamp, K. Capillary Flow Porometry - Assessment of an Alternative Method for the Determination of Flow Relevant Parameters of Porous Rocks. In *Annual Symposium of the Society of Core Analysts*; Napa Valley, USA, 2013.
- (111) Hardin, A. M.; Harinarayan, C.; Malmquist, G.; Axén, A.; van Reis, R. Ion Exchange Chromatography of Monoclonal Antibodies: Effect of Resin Ligand Density on Dynamic Binding Capacity. J. Chromatogr. A 2009, 1216 (20), 4366–4371.
- (112) Franke, A.; Forrer, N.; Butté, A.; Cvijetić, B.; Morbidelli, M.; Jöhnck, M.; Schulte, M.

Role of the Ligand Density in Cation Exchange Materials for the Purification of Proteins. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217* (15), 2216–2225.

- (113) Hage, D. S.; Phillips, T. M. Immunoaffinity Chromatography. In *Handbook of Affinity Chromatography*; CRC Press, 2005; pp 127–172.
- (114) Akashi, N.; Kuroda, S. Preparation and Characterization of Protein A-Immobilized PVDF and PES Membranes. *Express Polym. Lett.* **2015**, *9* (1), 2–13.
- (115) Boulet-Audet, M.; Byrne, B.; Kazarian, S. G. Cleaning-in-Place of Immunoaffinity Resins Monitored by in Situ ATR-FTIR Spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407 (23), 7111–7122.
- (116) Genieser, H. G.; Gabel, D.; Jastorff, B. Quantitative Ether Cleavage of Ligands in Hydrophobic Agaroses -Precise Determination of the Degree of Substitution. J. Chromatogr. A 1981, 215, 235–242.
- (117) Xu, Z.; Wan, L.; Huang, X. Surface Modification by Graft Polymerization. In *Surface Engineering of Polymer Membranes*; 2009; pp 80–149.
- (118) Roy, D.; Semsarilar, M.; Guthrie, J. T.; Perrier, S. Cellulose Modification by Polymer Grafting: A Review. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (7), 2046.
- (119) Hjertén, S.; Liao, J. L.; Zhang, R. High-Performance Liquid Chromatography on Continuous Polymer Beds. J. Chromatogr. A **1989**, 473, 273–275.
- (120) Tennikova, T. B.; Svec, F.; Belenkii, B. G. High-Performance Membrane Chromatography. A Novel Method of Protein Separation. J. Liq. Chromatogr. 1990, 13 (1), 63–70.
- (121) Svec, F.; Fréchet, J. M. J. Continuous Rods of Macroporous Polymer as High-Performance Liquid Chromatography Separation Media. *Anal. Chem.* 1992, 64 (7), 820– 822.
- (122) Arrua, R. D.; Strumia, M. C.; Igarzabal, C. I. A. *Macroporous Monolithic Polymers: Preparation and Applications*; 2009; Vol. 2.
- (123) Merhar, M.; Podgornik, A.; Barut, M.; Žigon, M.; Štrancar, A. Methacrylate Monoliths Prepared from Various Hydrophobic and Hydrophilic Monomers - Structural and Chromatographic Characteristics. *J. Sep. Sci.* **2003**, *26* (3–4), 322–330.
- (124) Zou, H.; Huang, X.; Ye, M.; Luo, Q. Monolithic Stationary Phases for Liquid Chromatography and Capillary Electrochromatography. J. Chromatogr. A 2002, 954 (1– 2), 5–32.
- (125) Siouffi, A. M. Silica Gel-Based Monoliths Prepared by the Sol-Gel Method: Facts and Figures. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000* (1–2), 801–818.
- (126) Maruška, A.; Kornyšova, O. Continuous Beds (Monoliths): Stationary Phases for Liquid Chromatography Formed Using the Hydrophobic Interaction-Based Phase Separation Mechanism. J. Biochem. Biophys. Methods 2004, 59 (1), 1–48.
- (127) Kłodzińska, E.; Moravcova, D.; Jandera, P.; Buszewski, B. Monolithic Continuous Beds as a New Generation of Stationary Phase for Chromatographic and Electro-Driven

Separations. J. Chromatogr. A 2006, 1109 (1), 51-59.

- (128) Svec, F.; Fréchet, J. M. J. Molded Rigid Monolithic Porous Polymers: An Inexpensive, Efficient, and Versatile Alternative to Beads for the Design of Materials for Numerous Applications. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1999**, *38* (1), 34–48.
- (129) Tsujioka, N.; Ishizuka, N.; Tanaka, N.; Kubo, T.; Hosoya, K. Well-Controlled 3D Skeletal Epoxy-Based Monoliths Obtained by Polymerization Induced Phase Separation. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 2008, 46 (10), 3272–3281.
- (130) Tran-Cong-Miyata, Q.; Nakanishi, H. Phase Separation of Polymer Mixtures Driven by Photochemical Reactions: Current Status and Perspectives. *Polym. Int.* **2017**, *66* (2), 213–222.
- (131) Wu, Y.; Xue, S.; Yang, H.; Zhang, H.; Zhang, T.; Gou, S. Polymerization-Induced Phase Separation for the Fabrication of Magnetic Sponges for Oil Spill Reclamation. *Chem. Eng. J.* 2017, *328*, 639–644.
- (132) Peters, E. C.; Petro, M.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J. Molded Rigid Polymer Monoliths as Separation Media for Capillary Electrochromatography. 1. Fine Control of Porous Properties and Surface Chemistry. *Anal. Chem.* **1998**, 70 (11), 2288–2295.
- (133) Viklund, C.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J.; Irgum, K. Monolithic, "Molded", Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations, Catalysis, or Solid-Phase Chemistry: Control of Porous Properties during Polymerization. *Chem. Mater.* **1996**, 8 (3), 744–750.
- (134) Unger, K. K. Porous Silica; Elsevier: Amsterdam, 1979.
- (135) Everett, D. H. Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units Appendix II Part I; London Butterworths, 1972.
- (136) Medina-castillo, A. L.; Fernandez-sanchez, J. F.; Segura-carretero, A.; Fernandezgutierrez, A. Micrometer and Submicrometer Particles Prepared by Precipitation Polymerization : Thermodynamic Model and Experimental Evidence of the Relation between Flory 's Parameter and Particle Size. 2010, 5804–5813.
- (137) Lim, F. Preparation of Divinylbenzene and Divinylbenzene- Co -Glycidyl Methacrylate Particles by Photoinitiated Precipitation Polymerization in Different Solvent Mixtures. 2009, 4436–4442.
- (138) Hansen, C. M. Hansen Solubility Parameters-A User's Handbook; CRC Press: Boca Raton, 1999; Vol. 1.
- (139) Amtsblatt der Europäischen Union. Richtlinie 2008/84/EG Der Kommission Vom 27. August 2008 Zur Festlegung Spezifischer Reinheitskriterien Für Andere Lebensmittelzusatzstoffe Als Farbstoffe Und Süßungsmittel — (Kodifizierte Fassung) (1); European Union: Brüssel, 2008; Vol. 51.
- (140) Hjertén, S. Some New Methods for the Preparation of Agarose. J. Chromatogr. A **1971**, 61, 73–80.
- (141) Hjertén, S.; Li, J. P. High-Performance Chromatofocusing of Proteins on Agarose Columns. I. Macroporous 15-20 Mm Beads. J. Chromatogr. A **1989**, 475 (2), 167–175.

- (142) Maruška, A.; Kornyšova, O. Homogeneous Reversed-Phase Agarose Thermogels for Electrochromatography. J. Chromatogr. A 2004, 1044 (1–2), 223–227.
- (143) Zucca, P.; Fernandez-Lafuente, R.; Sanjust, E. Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization. *Molecules* **2016**, *21* (11), 1–25.
- (144) Lahaye, M.; Rochas, C. Chemical Structure and Physico-Chemical Properties of Agar. *Hydrobiologia* **1991**, *221* (1), 137–148.
- (145) Amsterdam, A.; Er-El, Z.; Shaltiel, S. Ultrastructure of Beaded Agarose. *Arch. Biochem. Biophys.* **1975**, *171* (2), 673–677.
- (146) Xiong, J. Y.; Narayanan, J.; Liu, X. Y.; Chong, T. K.; Chen, S. B.; Chung, T. S. Topology Evolution and Gelation Mechanism of Agarose Gel. J. Phys. Chem. B 2005, 109 (12), 5638–5643.
- (147) Ioannidis, N. Manufacturing of Agarose-Based Chromatographic Media with Controlled Pore and Particle Size, University of Birmingham, 2009.
- (148) Hahn, R.; Schlegel, R.; Jungbauer, A. Comparison of Protein A Affinity Sorbents. J. *Chromatogr. B* 2003, 790 (1–2), 35–51.
- (149) Naredi-Rainer, N.; Prescher, J.; Hartschuh, A.; Lamb, D. C. Confocal Microscopy. In *Fluorescence Microscopy*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2013; pp 175–213.
- (150) Wang, J.; Dismer, F.; Hubbuch, J.; Ulbricht, M. Detailed Analysis of Membrane Adsorber Pore Structure and Protein Binding by Advanced Microscopy. J. Memb. Sci. 2008, 320 (1), 456–467.
- (151) Marroquin, M.; Bruce, T.; Pellegrino, J.; Wickramasinghe, S. R.; Husson, S. M. Characterization of Asymmetry in Microporous Membranes by Cross-Sectional Confocal Laser Scanning Microscopy. J. Memb. Sci. 2011, 379 (1), 504–515.
- (152) Klar, T. A.; Engel, E.; Hell, S. W. Breaking Abbe's Diffraction Resolution Limit in Fluorescence Microscopy with Stimulated Emission Depletion Beams of Various Shapes. *Phys. Rev. E Stat. Physics, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.* 2001, 64 (6), 9.
- (153) Hell, S. W.; Wichmann, J. Breaking the Diffraction Resolution Limit by Stimulated Emission: Stimulated-Emission-Depletion Fluorescence Microscopy. *Opt. Lett.* 1994, 19 (11), 780.
- (154) Hell, S. W.; Kroug, M. Ground-State-Depletion Fluorscence Microscopy: A Concept for Breaking the Diffraction Resolution Limit. *Appl. Phys. B Lasers Opt.* **1995**, *60* (5), 495–497.
- (155) Poiseuille, J. M. L. Experimental Investigations on the Flow of Liquids in Tubes of Very Small Diameter. *Rheol. Mem.* **1940**, *1* (No. 1), 1–101.
- (156) Beer, H.; Demmer, W.; Höerl, H.-H.; Wünn, E.; Melzner, D.; Nussbaumer, D.; Schmidt, H.-W. Hydrophile, Poröse Membranen Aus Vernetztem Cellulosehydrat, Verfahren Zu Ihrer Herstellung Und Ihre Verwendung. WO1995032793A1, 1995.

- (157) National Institute of Standards and Technology https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=51-67-2&Units=SI (accessed Aug 5, 2018).
- (158) Antony, J. Design of Experiments for Engineers and Scientists; 2014.
- (159) FUJITA, Y. The Determination Method of Surface Area by the BET Method. *Shinku* **1963**, *6* (5), 169–176.
- (160) Li, D.; Frey, M. W.; Joo, Y. L. Characterization of Nanofibrous Membranes with Capillary Flow Porometry. J. Memb. Sci. 2006, 286 (1–2), 104–114.
- (161) Bonnard, B.; Causse, P.; Trochu, F. Experimental Characterization of the Pore Size Distribution in Fibrous Reinforcements of Composite Materials. J. Compos. Mater. 2017, 51 (27), 3807–3818.
- (162) Akshaya, J.; Gupta, K. Liquid Extrusion Techniques For Pore Structure Evaluation Of Nonwovens. *Int. Nonwovens J.* **2003**, *12* (3), 45–53.
- (163) Jenkins, S. Hansen Solubility Parameters (HSP). Chem. Eng. 2011, 118 (1).
- (164) Hansen, C. M. Solubility Parameters An Introduction. In *Hansen Solubility Parameters*; CRC Press, 1999; pp 1–24.
- (165) Nguyen, A. M.; Irgum, K. Epoxy-Based Monoliths. A Novel Hydrophilic Separation Material for Liquid Chromatography of Biomolecules. *Chem. Mater.* 2006, 18 (26), 6308–6315.
- (166) Scheller, P. N.; Lenz, M.; Hammer, S. C.; Hauer, B.; Nestl, B. M. Imine Reductase-Catalyzed Intermolecular Reductive Amination of Aldehydes and Ketones. *ChemCatChem* 2015, 7 (20), 3239–3242.
- (167) Q. Luo, H. Zou, Q. Zhang, X. Xiao, J. N. No Title. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *80*, 481–489.
- (168) Fridley, G. E.; Holstein, C. A.; Oza, S. B.; Yager, P. The Evolution of Nitrocellulose as a Material for Bioassays. *MRS Bull.* **2013**, *38* (4), 326–330.
- (169) Wild, D. The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques; Newnes, 2013.
- (170) Owsley, D. C.; Bloomfield, J. J. The Reduction of Nitroarenes with Iron/Acetic Acid. *Synthesis (Stuttg).* **1977**, *1977* (02), 118–120.
- (171) Brun, E.; Vicente, J.; Topin, F.; Occelli, R.; Clifton, M. J. Microstructure and Transport Properties of Cellular Materials: Representative Volume Element. *Adv. Eng. Mater.* 2009, *11* (10), 805–810.
- (172) Huang, X.; Wang, Q.; Zhou, W.; Deng, D.; Zhao, Y.; Wen, D.; Li, J. Morphology and Transport Properties of Fibrous Porous Media. *Powder Technol.* **2015**, *283*, 618–626.
- (173) Röding, M.; Schuster, E.; Logg, K.; Lundman, M.; Bergström, P.; Hanson, C.; Gebäck, T.; Lorén, N. Computational High-Throughput Screening of Fluid Permeability in Heterogeneous Fiber Materials. *Soft Matter* **2016**, *12* (29), 6293–6299.
- (174) Sussman, M.; Smereka, P.; Osher, S. A Level Set Approach for Computing Solutions to

Incompressible Two-Phase Flow. J. Comput. Phys. 1994, 114 (1), 146–159.

- (175) Russo, G.; Smereka, P. A Remark on Computing Distance Functions. J. Comput. Phys. **2000**, 163 (1), 51–67.
- (176) Nilsson, O.; Söderström, A. *Euclidian Distance Transform Algorithms: A Comparative Study*; Institutionen för teknik och naturvetenskap, 2007.
- (177) Lee, T.-C.; Kashyap, R. L.; Chu, C.-N. Building Skeleton Models via 3-D Medial Surface Axis Thinning Algorithms. *CVGIP Graph. Model. Image Process.* **1994**, *56* (6), 462–478.
- (178) Homann, H. Implementation of a 3D Thinning Algorithm. Insight J. 2007, 421.

# 12. Anhang

### 12.1 Anhang zu Abschnitt 3.3.2

Tabelle 8: Versuchsbedingungen und Messdaten zu Abschnitt 3.3.2.

Versuch	Oberfläche [m²/mL]	Pfropfgrad [%]	Permeabilität [mD]	Anteil Monomer& Vernetzer [v%]	Leistung [mDm²/mL]
1	3,42	4,2	6,2	9,4	21,1
2	5,58	22,5	5,9	9,4	33,0
3	2,85	5,1	7,8	11,9	22,2
4	4,37	25,4	5,8	11,9	25,5
5	3,94	14,8	6,9	19,4	27,1
6	6,92	35,0	3,9	19,4	27,1
7	3,56	13,8	5,8	21,9	20,8
8	6,64	44,7	3,3	21,9	21,9
9	3,58	18,6	4,8	15,6	17,2
10	5,21	21,5	5,2	15,6	27,0
11	5,39	20,6	3,7	14,4	20,2
12	4,67	17,7	5,1	16,9	23,9
13	4,62	21,5	6,5	10,6	30,2
14	5,57	23,5	3,4	20,6	19,2
15	5,36	28,3	5,1	15,6	27,3
16	4,48	23,5	4,9	15,6	22,1
17	4,46	10,0	4,5	15,6	20,2
18	6,56	44,4	2,4	25,3	15,5
19	7,67	65,2	0,3	31,6	2,5
20	19,65	64,6	0,1	37,8	1,4
Referenz	1,90	0,0	9,6	0,0	18,2
21	2,26	19,6	5,6	19,2	12,7
22	2,61	13,8	5,0	27,1	13,0
23	2,05	56,3	0,7	34,8	1,5
24	1,93	53,4	0,5	42,7	1,0
25	3,16	33,1	4,8	19,2	15,2
26	4,06	37,0	3,5	27,1	14,4
27	2,66	54,3	2,2	34,8	5,8
28	3,17	65,0	1,6	42,7	5,2
29	2,28	32,2	6,0	27,0	13,6
30	2,93	38,9	1,7	34,9	4,9
31	3,12	25,4	4,0	23,1	12,6
32	2,70	53,4	0,5	38,8	1,3

33	1,86	11,9	4,0	30,9	7,4
34	3,50	42,8	3,0	30,9	10,5
35	2,95	40,8	2,7	30,9	8,0
36	2,97	33,1	3,6	30,9	10,7
37	2,74	37,0	4,1	30,9	11,3
Referenz 2	1,90	0,0	6,8	0,0	13,0

Tabelle 9: Zusammensetzung der Polymerisationlösungen zu Abschnitt 3.3.2.

Versuch	Initiator [g]	Monomer [mL]	Vernetzer [mL]	Lösungsmittel [mL] Cyclohexanol/ 1-Decanol (91,7/8,3 v%)
1	0,002	0,05	1,45	14,5
2	0,016	0,05	1,45	14,5
3	0,002	0,45	1,45	14,1
4	0,016	0,45	1,45	14,1
5	0,002	0,05	3,05	12,9
6	0,016	0,05	3,05	12,9
7	0,002	0,45	3,05	12,5
8	0,016	0,45	3,05	12,5
9	0,002	0,25	2,25	13,5
10	0,016	0,25	2,25	13,5
11	0,009	0,05	2,25	13,7
12	0,009	0,45	2,25	13,3
13	0,009	0,25	1,45	14,3
14	0,009	0,25	3,05	12,7
15	0,009	0,25	2,25	13,5
16	0,009	0,25	2,25	13,5
17	0,009	0,25	2,25	13,5
18	0,016	0,05	4,00	12,0
19	0,016	0,05	5,00	11,0
20	0,016	0,05	6,00	10,0
Referenz	-	-	-	-
21	0,0016	2,5	0,57	12,93
22	0,0016	2,5	1,83	11,67
23	0,0016	5	0,57	10,43
24	0,0016	5	1,83	9,17
25	0,016	2,5	0,57	12,93
26	0,016	2,5	1,83	11,67

27	0,016	5	0,57	10,43
28	0,016	5	1,83	9,17
29	0,0088	3,75	0,57	11,68
30	0,0088	3,75	1,83	10,42
31	0,0088	2,5	1,2	12,30
32	0,0088	5	1,2	9,80
33	0,0016	3,75	1,2	11,05
34	0,016	3,75	1,2	11,05
35	0,0088	3,75	1,2	11,05
36	0,0088	3,75	1,2	11,05
37	0,0088	3,75	1,2	11,05
Referenz 2	-	-	-	-

### 12.2 Anhang zu Abschnitt 3.3.3

Tabelle 10: Zusammensetzung der Polymerisationlösungen zu Abschnitt 3.3.3.

Versuch	Initiator [g]	Monomer [mL]	Vernetzer [mL]	Lösungsmittel [mL] Cyclohexanol/ 1-Decanol (01 7/8 3 y%)
1	0.016	0.85	0.00	(91,770,5 ¥ 70)
1	0,010	0,05	0,07	15,00
2	0,16	0,85	0,09	15,06
3	0,016	2,55	0,09	13,36
4	0,16	2,55	0,09	13,36
5	0,016	0,85	0,57	14,58
6	0,16	0,85	0,57	14,58
7	0,016	2,55	0,57	12,88
8	0,16	2,55	0,57	12,88
9	0,016	1,7	0,33	13,97
10	0,16	1,7	0,33	13,97
11	0,088	0,85	0,33	14,82
12	0,088	2,55	0,33	13,12
13	0,088	1,7	0,09	14,21
14	0,088	1,7	0,57	13,73
15	0,088	1,7	0,33	13,97
16	0,088	1,7	0,33	13,97
17	0,088	1,7	0,33	13,97

Tabelle 11: Messdaten zu Abschnitt 3.3.3

Versuch	Durchschnittlicher Durchmesser glob. Struktur [nm]	Pfropfgrad [%]	Leistung [m <sup>2</sup> mD/mL]
1	136	3,92	25,48
2	188	10,57	24,73
3	218	15,59	17,37
4	356	17,10	14,85
5	109	10,01	29,79
6	104	10,43	26,51
7	210	24,54	19,34
8	263	36,11	14,61
9	141	14,67	21,72
10	277	13,51	19,46
11	162	8,10	25,50
12	294	23,42	15,21
13	139	9,52	19,89
14	166	28,84	20,44
15	214	20,58	19,36
16	187	20,37	20,91
17	240	36,08	19,80

### 12.3 Anhang zu Abschnitt 3.3.4

Tabelle 12: Genutzte Lösemittel und ihre Hansen-Solubility Parameter  $\delta_D$ ,  $\delta_P$  und  $\delta_H$  aus Abschnitt 3.3.4.<sup>138</sup>

Lösemittel	$\delta_{ m D}$	$\delta_{ m P}$	$\delta$ н
Cyclohexanol	17,4	4,1	13,5
1-Decanol	17,6	2,7	10
Cyclohexanol/1-Decanol (76/24 v%)	17,52	3,2	11,26
Cyclohexanol/1-Decanol (55/45 v%)	17,5	3,5	12,1
Cyclohexanol/1-Decanol (25/75 v%)	17,4	3,9	12,9
2-Propanol	15,8	6,1	16,4
Aceton	15,5	10,4	7
Ethanol	15,8	8,8	19,4
Toluol	18	1,4	2
Methanol	15,1	12,3	22,3
Hexanol	14,1	8,6	12,7
Tetrahydrofuran	16,8	5,7	8
Dichlormethan	18,2	6,3	6,1
Acetophenon	19,6	8,6	3,7
Octan-2-on	16,2	4,5	4,1
Cyclohexanone	17,8	6,3	5,1
Trichlormethan	17,8	3,1	5,7

## Danksagung

Ich möchte mich hiermit recht herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Philipp Vana, für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit mit seiner Unterstützung und innerhalb seines Arbeitskreises anfertigen zu dürfen.

Weiterhin danke ich Frau Prof. Dr. Claudia Steinem für die freundliche Übernahme der zweiten Gutachterin und Herrn Prof. Dr. Burkhard Geil, Herrn Prof. Dr. Michael Buback, Frau Dr. Franziska Thomas und Herrn Dr. Sebastian Kruss für die Mitwirkung in der Prüfungskommission.

Zudem möchte ich mich bei der gesamten Abteilung SEMO der *Sartorius Stedim Biotech GmbH* für die Unterstützung während meiner Zeit dort bedanken. Insbesondere bei Herrn Dr. Volkmar Thom, Herrn Dr. Florian Taft und Herrn Dr. Louis Villain für das regelmäßige Feedback und Hilfestellungen.

Bei Herrn Igor Chmielewski, Herrn Tony Schreiber, Frau Rosanna Köhler, Frau Kathrin Gerlach, Frau Kornelia Kuper, Frau Silke Özer, Frau Nelli Marks, Frau Nicole Linne, Frau Jelena Kalinger, Frau Hiltrud Nilson und Herrn Sven Dankenbrink bedanke ich mich für ihre Hilfe und Unterstützung im Laboralltag sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre. Des Weiteren möchte ich mich bei allen Kollegen im Arbeitskreis für ihre Unterstützung bei fachlichen Fragen bedanken.

Für das Korrekturlesen bedanke ich mich bei Herrn Dr. Jan Schwellenbach, Herrn Dr. Volkmar Thom sowie Herrn Dr. Florian Taft.

Bei Herrn Dominik Stein bedanke ich mich für die gemeinsam durchgeführte Arbeit und die jederzeit spannenden Diskussionen rund um das Ingenieurswesen. Auch möchte ich mich bei Herrn Patrick Altschuh bedanken, der maßgeblich an Kapitel III mitgewirkt hat.

Ich möchte mich des Weiteren bei jedem in meiner Familie bedanken, der mich unterstützt und auf meinem Weg bestärkt hat.

Abschließend möchte ich meiner Ehefrau, Frau Carina Ley, meinen ganz besonderen Dank für ihre Geduld, ihre Hilfe und insbesondere ihre Unterstützung über den gesamten Zeitraum meines Studiums und meiner Promotion aussprechen.

## Lebenslauf

#### **Persönliche Daten:**

Name	Adrian Ley, geb. Deinert		
Geburtsdatum	01.05.1990		
Geburtsort	Dieburg		
Staatsangehörigkeit	Deutsch		
Schulausbildung:			
1996-1997	Janusz-Korczak-Grundschule, Duderstadt		
1997-2002	Geiersberg Grundschule/Förderstufe, Groß-Umstadt		
2002-2007	Gesamtschule Auf der Aue, Münster b. Dieburg		
2007-2010	Gymnasium Landrat-Gruber Schule, Dieburg		
	Abschluss: Abitur (Note 2,0)		
Hochschulbildung:			
10/2010-09/2013	Bachelorstudium an der Georg-August-Universität Göttingen		
	Hauptfach: Chemie		
	Abschluss: Bachelor of Science (B.Sc) (Note 2,3)		
Titel der Bachelorarbeit:	Investigation of temperature influence on catalyzed chain growth		
10/2013-12/2015	Masterstudium an der Georg-August-Universität Göttingen		
	Hauptfach: Chemie		
	Abschluss: Master of Science (M.Sc) (Note 1,6)		
Titel der Masterarbeit:	Herstellung und Charakterisierung alternativer		
	chromatographischer Medien		

#### Berufstätigkeit:

01/2016-12/2018 Promotion am Institut für Physikalische Chemie der Georg-August-Universität Göttingen in Zusammenarbeit mit der Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen

Göttingen den .....

.....

(Adrian Ley)